



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Rahma CHAHBA

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Maladie cœliaque chez l'adulte : étude histopathologique, biochimique et implication du stress oxydatif, dans la région d'Annaba et de Biskra

Jury :

Mme. Mouna GUEROUI	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M. Abdlhamid MOUSSI	MCA	Université de Biskra	Président
M. Ahmed ATHEMNA	MCB	Université de Biskra	Examineur

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie ALLAH, tout puissant, de m'avoir donné la force, patience et volonté pour atteindre ce succès, ainsi que le courage de surmonter toutes les difficultés.

Ma profonde gratitude s'adresse à la personne qui m'a proposé ce projet et qui m'a encadrée tout au long de cette année d'étude : ma promotrice,

Dr. MOUNA. GUEROUI Au travers de nos travaille, il m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects Sujet Merci Mme.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail Dr : Abd elhamid MOUSSI comme Président et Ahmed ATHEMNA comme examinateur.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire anatomohistopathologie - Biskra. Dr. Kheïnche, ainsi aux laborantines Nadjat, Asma, Zineb, Amel et Khadra

Je voudrais remercier tous les responsables de laboratoires de biologie « université Mohamed Khider » Biskra, surtout Bacha Salifa, Tibermassi Moufida et Soltani Alima qui m'aident pour réaliser ce travail. Merci tous pour votre patience

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements pour tous les patients pour leur compréhension et a tous les personnes, en particulier les donneurs d'échantillons, à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie cette thèse à ...

A mes très chers parents

à leurs sacrifices, à leurs amours, à leurs affections et à leur soutien au cours de mes études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé, Dieu vous protège Je t'aime maman, je t'aime papa

Ames chers frères Omar, ABD ELMALAK ET RAFIK pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mes sœurs, HODA, SALMA ET ABLA pour leur appui et leur encouragement

À mon mari Qui ma toujours fait une confiance infinitive et absolue, qu'il m'a encouragé à continuer, je lui souhaite le bonheur et le succès

A ma belle fille de ma tante DALILA Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes chères ami (e)s FATIMA , CHAHINEZ , SAMAH ,LWIZA ,INSSAF ,Fifi ,ASMA ,NADJAT ,MERJEM.

Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble, de votre soutien et de votre serviabilité

Rahma

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principales associations morbides de la maladie cœliaque de l'adulte.....	4
Tableau 2. Répartition des patients selon l'étude sérologique.....	10
Tableau 3. Répartition des patients selon le sexe.....	30
Tableau 4. Répartition selon le degré de l'atrophie villositaire.....	31

Liste des figures

Figure 1. Composition du gluten.....	5
Figure 2. Facteurs environnementaux, immunologiques, génétiques impliqués dans la maladie cœliaque.....	6
Figure 3. Principe de la méthode d'Ellman.....	13
Figure 4. Principe de dosage de MDA.....	14
Figure 5. Principe de dosage de GST.....	17
Figure 6. Fixation dan formol.....	18
Figure 7. Déshydratation.....	19
Figure 8. Installation du bloc.....	19
Figure 9. Confection des coupes.....	20
Figure 10. Etalement.....	20
Figure 11. Coloration.....	21
Figure 12. Lecture des lames.....	22
Figure 13. Variation de la concertation sérique de l'urée chez les trois groupes	23
Figure 14. Variation de la concertation sérique de la créatinine chez les 3 groupes	23
Figure 15. Variation de concetration sérique de la bilirubine totale chez les 3 groupes.....	25
Figure 16. Variation de l'activité enzymatique ASAT chez les 3 groupes	25
Figure 17. Variation de l'activité enzymatique ALAT chez les 3 groupes.....	26
Figure 18. Variation du teneur sérique en GSH S chez les 3 groupes	27
Figure 19. Variation du teneur sérique en TBARS chez les 3 groupes.....	28
Figure20. Variation de concentration de GST chez les 3 groupes.....	28
Figure 21. Variation du teneur sérique de la GSH-Px chez les 3 groupes	29
Figure 22. Graphique représentant la répartition des patients selon le sexe.....	31
Figure 23. Graphique représentant la répartition des patients selon le degré d'atrophie villositaire.....	32
Figure 24. Aspect histopathologie d'une muqueuse duodénale inflammatoire de Stade 1 selon la classification de Marsh modifiée chez une patiente de 56 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).....	33
Figure 25. Aspect histopathologique d'une atrophie villositaire modérée de la muqueuse duodénale de grade 2 selon la classification de Marsh chez une patiente de 42 ans (figure gauche HE×40 / figure droite HE×10).....	33

Figure 26. Aspect histopathologique de muqueuse siège d'une atrophie villositaire partielle grade 3A selon la classification de Marsh chez une patiente de 22 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).....34

Figure 27. Aspect histopathologique de muqueuse siège d'une atrophie villositaire subtotale grade 3b selon la classification de Marsh chez une patiente de 24 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).....35

Figure 28. Aspect histopathologique de muqueuse d'une atrophie villositaire totale grade 3C selon la classification de Marsh chez une patiente de 27 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10)..... 35

Figure 29. Aspect histopathologique de muqueuse d'une atrophie villositaire grade 4 selon la classification de March chez une patiente de 29 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).....37

Liste des abréviations

AGA	Anticorps Anti-Gliadine
ALAT	Alanine amino-transférase
ASAT	Aspartate Amino-Transférase
CAT	Catalase
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DGP	peptide déamidé de la gliadine
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DTNB	Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	Endomysium
GPT	Glutamo-pyruvique transaminase
GR	Glutathion réductase
GOT	Glutamo-oxaloacétique transaminase
HLA DQ2	Human Leucocyte Antigen DQ2
H2O2	peroxide d'hydrogène
IFI	Immuno-Fluorescence-Indirecte
IFNα	Interféron α
IgA	Immunoglobuline A.
IgG	Immunoglobuline G.
MDH	Malate déshydrogénase
MC	Maladie Cœliaque.

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide rédui
NO	Monoxyde d'azot
RSG	Régime sans gluten
SOD	superoxyde dismutase
TBA	acide thiobarbiturique
TG2	Transglutaminase 2
TNB	Thionitrobenzoïque
TNF	Tumor Necrosis Factor.
tTG	Transglutaminase tissulai

SOMMAIRE

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations.....	V
Introduction générale	1

Première partie : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralité sur la maladie cœliaque

1. Définition.....	3
2. Symptômes.....	3
3. Pathologies associées.....	4
4. Physiopathologie.....	4
4.1. Les facteurs de risques.....	5
4.1.1. Facteurs environnementaux.....	5
4.1.1.1. Le gluten : Agent pathogène.....	5
4.1.1.2. Autres facteurs.....	5
4.1.2. Facteurs génétiques.....	6
4.1.3. Dérégulation immunitaire.....	6

Chapitre 2 : Diagnostic, traitement et implication du stress oxydatif

1. Diagnostique.....	7
1.1. Diagnostique sérologique.....	7
1.2. Anomalies histo-pathologiques.....	7
2. Traitement.....	8
3. Stress oxydatif.....	8
4. Les radicaux libres.....	8
5. Systèmes de défense.....	9
6. Implication du stress oxydatif dans la MC.....	9

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTAL

Chapitre 3 : Matériel et méthode

1. Population étudiée.....	10
2. Prélèvement sanguin.....	10
3. Prélèvement tissulaire.....	11
4. Méthodes d'analyses biochimiques (kit Biomagreb).....	11
4.1. Détermination cinétique de l'activité aspartate amino-transférase (ASAT).....	11

4.2. Détermination cinétique de l'activité Alanine amino-transférase (ALAT).....	11
4.3. Dosage de l'urée.....	12
4.4. Dosage de créatinine.....	12
4.5. Dosage de la bilirubine Totale et Directe.....	12
5. Méthodes de détermination quantitative des marqueurs biologiques de stress oxydant.....	12
5.1. Dosage de GSH sérique.....	12
5.1.1. Mode opératoire.....	13
5.1.2. Calcul de la concentration.....	13
5.2. Dosage de TBARS (thiobarbituric acid reacting substances).....	14
5.2.1. Mode opératoire.....	14
5.2.2. Calcul de concentrations.....	15
5.3. Détermination d'activité enzymatique de la GSH-Px (EC 1.11.1.9).....	15
5.3.1. Mode opératoire.....	15
5.3.2. Calcul de l'activité enzymatique.....	16
5.4. Détermination d'activité enzymatique de la GST (EC 2.5.1.18).....	16
5.4.1. Mode opératoire.....	17
5.4.2. Calcul de l'activité enzymatique.....	17
6. Technique histologique.....	18
6.1. Fixation.....	18
6.2. Déshydratation.....	18
6.3. Inclusion et construction des blocs.....	19
6.4. Confection des coupes histologiques.....	20
6.5. Etalement.....	20
6.6. Coloration.....	21
6.7. Lecture.....	21
7. Étude statistique.....	22
Chapitre 4 : Résultats et discussion	
1. Explorations biochimiques.....	23
1.1. Bilan rénal.....	23
1.2. Bilan hépatique.....	24
2. Marqueurs biologiques du stress oxydant.....	27
3. Etude histopathologique.....	30
3.1. Répartition des patients selon le sexe et le stade de développement.....	30
3.1.1. Répartition selon le sexe.....	30

3.1.2. Répartition selon la classification de Marsh.....	31
3.2. L'examen microscopique des patients.....	32
Conclusion.....	38
Références Bibliographique.....	39
Annexes	
Résumé	

Introduction générale

Introduction

La nourriture est, à valeur égale, une question de raison et de passion pour l'être humain, nous mangeons et buvons en premier lieu par besoin physiologique, mais nous y trouvons aussi un plaisir que nous essayons toujours d'augmenter, de perpétuer et de varier.

Néanmoins, chez certaines personnes, la nourriture elle-même devient un facteur de risque de la survenue d'une maladie, la maladie cœliaque (MC) fera un exemple (Bouziane, 2016).

La maladie cœliaque (MC) est définie comme un désordre chronique, auto-immune et inflammatoire du tractus gastro-intestinal chez des individus génétiquement prédisposés ; causé par la digestion du gluten et précisément les polypeptides insolubles de la prolamine qu'il contient, dont l'apport dans le blé et le seigle est très important (Pourtalebi-Firoozabadi *et al.*, 2016).

Cette entéropathie au gluten a été décrite pour la première fois par Samuel Gee et Francis Adams dès 1887 (Tagzout, 2017), sa fréquence est de 1% de la population, elle pourra affecter à toute tranche d'âge avec une variété de symptômes (Pourtalebi-Firoozabadi *et al.*, 2016).

Le diagnostic est basé sur un examen histologique via une biopsie de l'intestin grêle révélant une atrophie villositaire, une hyperplasie, ainsi qu'une lymphocytose intraépithéliale, mais aussi sur un examen sérologique détectant la présence des anticorps circulaires spécifiques à la MC citant les anti-peptides désaminés de la gliadine (DGP), les anti-endomysium et les anti-transglutaminases, la positivité de ce dernier test et le test du génotype HLA-associé à la maladie confirme le diagnostic (Tye-Din *et al.*, 2018).

Les complications de la MC sont nombreuses et diverses, le régime sans gluten à vie protège en grande partie de la survenue de la plupart des complications et corrige la surmortalité associée aux complications (Cosnes et Nion-Larmurier, 2013). Selon plusieurs études, le stress oxydatif apparaît comme l'un des principaux mécanismes pathologiques impliqués dans le développement de la maladie (Szaflarska-Popławska *et al.*, 2010).

Ceci est le résultat d'un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système de défense antioxydant incluant les enzymes et les substances non enzymatiques (Stojiljkovic *et al.*, 2007).

Par conséquent, l'oxydation de certains biomolécules au niveau membranaire pourra causer des altérations membranaires, voire cellulaires et tissulaires (Stojiljkovic *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, le gliadine pourra jouer un rôle cytotoxique direct (Stojiljkovic *et al.*, 2012), en exerçant un effet antiprolifératif sur les cellules intestinales par génération des pro-oxydants en faveur des antioxydants (Rivabene *et al.*, 1999).

Ces molécules sont aussi comme déjà mentionnées responsables du déclenchement des réactions immunitaires, elles-mêmes sont à l'origine de la génération des ERO (Szaflarska-Popławska *et al.*, 2010 ; Kaplan *et al.*, 2017).

Notre travail est intéressé aux personnes souffrant de la maladie à l'âge adulte, en évaluant la modification de quelques paramètres biochimiques, biomarqueurs du stress oxydatif au niveau sérique et aussi les altérations au niveau tissulaire.

Afin de réaliser ce travail, nous avons dans un premier temps accédé à une synthèse bibliographique subdivisée à deux chapitres :

- le premier a traité des notions générales sur la maladie ;
- alors que le deuxième a pris en considération le diagnostic, le traitement et l'implication du stress oxydatif.

La deuxième partie est la partie expérimentale dans laquelle nous avons détaillé le protocole expérimental suivis, les différentes méthodes utilisées, les résultats obtenus et la discussion, les principales analyses effectuées dans ce travail sont les suivantes :

- l'exploration biochimique ;
- les biomarqueurs du stress oxydatif ;
- l'examen histologique.

Partie

Etude bibliographique

Chapitre 1

Généralité sur la maladie cœliaque

1. Définition

La maladie cœliaque est une maladie chronique, multifactorielle, immunitaire et inflammatoire de l'intestin (Pinier, 2010), chez les enfants et les adultes génétiquement prédisposés, qui est induite par l'ingestion de nourriture contenant du gluten (Bai *et al.*, 2012).

Elle est considérée comme une maladie dysimmunitaire systémique initiée par la gliadine et les prolamines (Gargouri *et al.*, 2017), c'est une affection autoimmune aux manifestations variables allant de la latence complète à la malabsorption globale (Coton *et al.*, 2008). On la connaît aussi sous les noms de sprue cœliaque, d'entéropathie au gluten ou de sprue non tropicale (Bai *et al.*, 2012).

La MC est caractérisée dans sa forme classique par une atrophie villositaire sévère prédominante au niveau de l'intestin grêle proximal (Admou *et al.*, 2009), avec une augmentation des lymphocytes intra épithéliaux CD3+ CD8+ (Malamut et Cellier, 2012).

2. Symptômes

La présentation clinique de la MC est variée et les patients peuvent présenter un éventail de symptômes intestinaux et extra-intestinaux (Dupuis, 2017).

Les signes classiques en relation avec une malabsorption de l'intestin grêle regroupent principalement des manifestations de :

- l'appareil digestif (les plus fréquentes : diarrhée, douleurs abdominales et amaigrissement) ;
- la peau et des muqueuses (alopécies, aphtose buccale, purpura, et hippocratisme digitale) ;
- génitales (puberté tardive, ménopause précoce, infertilité, fausse couche, crampes, tétanies et atrophie musculaire);
- neuromusculaires (ataxie, atteinte périphérique, épilepsie, calcification cérébrales) ;
- ostéoarticulaires (douleurs osseuses, fracture spontanée, arthralgies /Arthrites) et biologiques (Anémie par carence en fer, folates, vitamines B12, thrombocytose: thrombopénie, déficit en facteurs vitamine K dépendants, hypoalbuminémie, hypocalcémie, hypomagnésémie, déficit en Zinc et élévation des transaminases (Bigare, 2016; Dupuis, 2017).

3. Pathologies associées

Le rapport causal entre la maladie cœliaque et d'autres désordres auto-immuns est toujours une issue controversée (Bouasla, 2011).

L'ensemble des affections associées à la maladie cœliaque sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 1. Principales associations morbides de la maladie cœliaque de l'adulte (Lefebvre, 2016; Dupuis, 2017).

Maladies auto-immunes et dysimmunitaires	Dermatite herpétiforme Diabète de type 1, thyroïdite auto-immune, maladie d'Addison Myasthénie, polymyosite, polyarthrite rhumatoïde, Anémie hémolytique et purpuras thrombopéniques auto-immuns Vascularite systémique et cutanée sclérosante Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique, déficit en IgA
Maladies immuno-allergiques	Atopie et asthme ; maladie du poumon de fermier, maladie des éleveurs d'oiseaux
Syndromes malformatifs	Trisomie 21 Syndrome de Turner Cardiopathie congénitale

4. Physiopathologie

La MC est une affection multifactorielle, dont l'étiopathogénie n'est pas encore clairement élucidée (Abouelarais *et al.*, 2009), elle est considérée comme un désordre auto-immun avec une composante génétique et une composante environnementale (Tagzout, 2017).

4.1. Les facteurs de risques

4.1.1. Facteurs environnementaux

4.1.1.1. Le gluten : Agent pathogène

La constitution des grains de blé est faite d'un sucre, l'amidon, et d'un mélange complexe de protéines (Weber, 2012).

Le gluten est la masse élastique obtenue en pétrissant longuement de la farine de blé ou d'autres céréales, Il est constitué d'albumine et de globulines, de glutéines et de gliadines (figure 1). Cependant, seules les gliadines sont susceptibles de déclencher la MC chez les sujets prédisposés (Cheikh Ali, 2016). Sa fraction toxique est représentée par la gliadine qui sera présentée par les molécules HLA aux lymphocytes T (Green et Cellier, 2007).

Des fragments peptidiques qui ont été résistants à la dégradation peuvent être transportés à travers l'épithélium principalement par voie transcellulaire. Cette voie permet un passage direct des fragments, de la lumière intestinale vers le milieu intérieur à travers les cellules de l'épithélium intestinal (Bousquet, 2015 ; Green *et al.*, 2015).

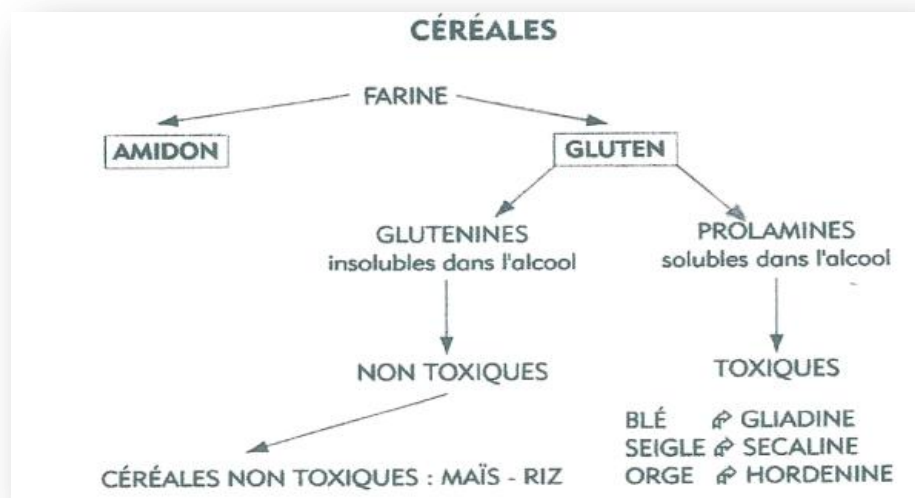


Figure 1. Composition du gluten (Lefebvre, 2016).

4.1.1.2. Autres facteurs

D'après Bigare (2016), d'autres facteurs environnementaux rentrent en jeu dans le développement de la maladie cœliaque citant les infections intestinales notamment à adénovirus et à rotavirus, les facteurs immuno-modulateurs du lait maternel, la quantité et l'âge d'introduction du gluten et aussi l'altération du microbiote intestinal.

4.1.2. Facteurs génétiques

Plus de 90 à 95 % des patients atteints de MC sont porteurs du HLA DQ2 et les 5 à 10% restants sont porteurs de HLA DQ8. La valeur prédictive négative de l'absence de HLA DQ2/HLA DQ8 est de 100 %. Sa valeur prédictive positive reste faible puisque cette prédisposition concerne 30 à 40% de la population générale T (Green *et al.*, 2015 ;Gargouri *et al.*, 2017).

4.1.3. Dérégulation immunitaire

Les peptides de gluten intacts (gliadine) traversent la sous-muqueuse de l'intestin grêle. Dans la sous-muqueuse, l'enzyme transglutaminase humaine 2 (Dupuis, 2017).

La transglutaminase transforme par désamidation, les glutamines chargées positivement en résidus d'acides glutamiques, chargés négativement. Ceci permet alors leur liaison aux poches à peptides, chargées positivement, des molécules HLA DQ2 ou DQ8 qui sont situées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (Nijeboer *et al.*, 2013 ;Khetabi et Boukhobza, 2016). Il en résulterait une réaction inflammatoire de type Th1 avec production d'interféron gamma et de tumor necrosis factor alpha et une réaction humorale avec production d'anticorps anti-gliadine, anti-transglutaminase tissulaire et anti-endomysium. Cette réaction est à l'origine des dommages causés aux éléments histologiques caractéristiques de la MC (Nijeboer *et al.*, 2013 ;Dupuis, 2017).

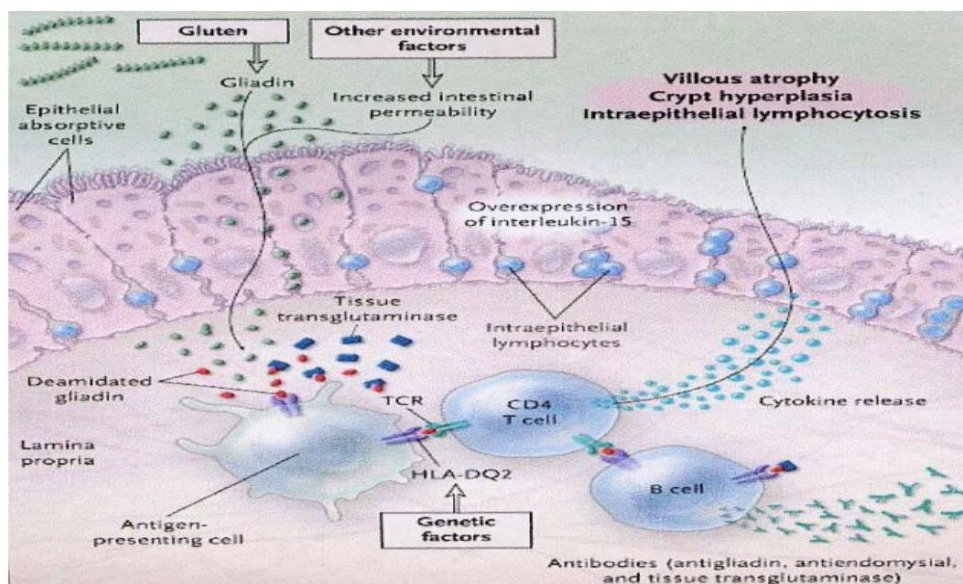


Figure 2. Facteurs environnementaux, immunologiques, génétiques impliqués dans la maladie cœliaque (Abouelrais, 2009).

Chapitre 2

Diagnostic, traitement et implication du stress oxydatif

1. Diagnostique

1.1. Diagnostique sérologique

La mise au point de tests sérologiques constitue la plus grande percée dans le dépistage de la maladie cœliaque (Rashid et Lee, 2016).

- **Anticorps anti-gliadine** : ce fut le premier test sérologique mis au point dans les années 1980. En raison de sa sensibilité et sa spécificité relativement faibles, ce test ne doit pas être utilisé pour dépister la maladie cœliaque (Rashid et Lee, 2016).
- **Anticorps anti-réticuline** : ce deuxième test sérologique mis au point a été utilisé brièvement. Puisqu'il existe des tests plus sensibles, ce test ne doit pas être utilisé à des fins de dépistage (Roujon *et al.*, 2013 ; Rashid et Lee, 2016).
- **Anticorps anti-endomysium** : le test d'anticorps anti-endomysium est un test très sensible et spécifique pour le dépistage de la maladie cœliaque. Ses inconvénients se résultent par un coût assez élevé nécessitant des techniques d'immunofluorescence (Rashid et Lee, 2016 ; Gargouri *et al.*, 2017).
- **Anticorps anti-TGt** : en 1997, on a découvert que l'antigène induisant la formation d'anticorps anti-endomysium était l'enzyme anti-transglutaminase tissulaire (TGt). Avec un coût du test peu chuté. La plupart des laboratoires hospitaliers mesurent maintenant les anticorps anti-TGt plutôt que les anticorps anti-endomysium (Rashid et Lee, 2016 ; Deprez, 2018).
- **Anticorps anti-peptide désaminé de la gliadine (DGP)** : dernière génération des tests sérologiques, ce test n'offre pas beaucoup plus d'avantages que le test des anticorps anti-TGt comme test de dépistage primaire; mais le test des anticorps anti-DGP de type immunoglobuline G (IgG) est légèrement plus sensible que le test des anticorps anti-TGt de type IgG et doit être considéré comme le test de choix chez les patients qui présentent un déficit sélectif en IgA (Ludvigsson *et al.*, 2014 ; Rashid et Lee, 2016).

1.2. Anomalies histo-pathologiques

Les biopsies intestinales représentent conjointement avec une sérologie positive l'étalon or pour le diagnostic de maladie cœliaque. En 1992, Marsh a effectué une revue de la sévérité de l'atteinte muqueuse observée chez les patients avec une maladie cœliaque traitée et qui ont été confrontés à des doses croissantes de gluten (Bai *et al.*, 2012).

Une classification modifiée selon Marsh est maintenant couramment utilisée pour diagnostiquer la maladie cœliaque dans la pratique clinique.

Stade 0 : muqueuse normale.

Stade I : muqueuse normale avec augmentation isolée des lymphocytes intraépithéliaux.

Stade II : augmentation isolée des lymphocytes intra épithéliaux + hyperplasie des cryptes.

Stade 3 : atrophique /hyperplasique (3a : partielle, 3b : sub totale, 3c : totale).

Stade 4 : atrophie vilositaire totale, si dépôt collagène en plus : sprue collagène. (Gargouri *et al.*, 2017).

2. Traitement

Un régime strict excluant le gluten est la seule façon de faire disparaître complètement les symptômes de la maladie. Cependant, il faut attendre que le diagnostic soit clairement établi avant d'adopter ce régime. Alors que l'amélioration clinique est rapide, l'atrophie vilositaire intestinale ne régresse généralement pas avant 6 à 24 mois de régime sans gluten (RSG). Ce dernier doit être préconisé à vie au cours de la maladie cœliaque, en particulier chez l'adulte, car il prévient en partie le risque de complications malignes, osseuses, ainsi que la survenue de maladies auto-immunes. Une diminution progressive des titres sériques d'anticorps cœliaques et leur négativation à un an de régime sans gluten est en revanche un signe de bon suivi du RSG. Le blé, le kamut, l'épeautre, l'orge, le seigle contiennent du gluten et sont donc interdits (Depez, 2018 ; Itzlinger *et al.*, 2018).

3. Stress oxydatif

Le stress oxydant résultera d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme) (Hopps *et al.*, 2010).

4. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres. Le plus souvent l'électron non apparié se trouve sur l'orbitale externe de la molécule. Cet électron libre la rend très réactive (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

Ces radicaux peuvent se former par réduction mono électronique ou par rupture homolytique, on distingue l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), les radicaux hydroxyle ($\cdot OH$) monoxyde d'azote radicalaire ($\cdot NO$) et aussi les composés oxygénés non radicalaires (Borg *et al.*, 2008).

De nombreuses enzymes, des réactions d'auto oxydation, les protéines héminiques, des organites (mitochondrie, réticulum endoplasmique, noyau,...), la réaction de Fenton, les radiations ionisantes, le rayonnement ultraviolet, les ultrasons et un grand nombre de cellules du corps (vaisseaux, neurones, muscles squelettiques, macrophages...) constituent une source très importante des radicaux libres (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003 ; Borg *et al.*, 2008).

5. Systèmes de défense

Les systèmes de défense antioxydants comportent:

- des enzymes: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxydases, glutathion réductase (GR), glutathionS-transférase (GST), hème oxygénase (HO), et système thiorédoxine ;
- des protéines (transferrine, haptoglobine, métallothionéine), qui diminuent la disponibilité des pro-oxydants tels que les ions Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cu^{+} ;
- des protéines, comme les protéines de choc thermique ;
- des composés de basse poids moléculaire (glutathion, α -tocophérol, acide ascorbique, bilirubine, acide urique) (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007).

6 .Implication du stress oxydatif dans la MC

Le déclenchement de la MC est basé sur plusieurs facteurs environnementaux, génétiques, immunologiques et infectieux. De même, des études ont montré que le stress oxydatif pourra jouer un rôle (Kaplan *et al.*, 2017) :

- les molécules de gliadine résistantes à la digestion protéolytique peuvent induire des dommages au niveau intestinal, ce qui provoque la production des cytokines pro-inflammatoires responsables de la génération de plusieurs espèces réactives de l'oxygène (Szaflarska-Popławska *et al.*, 2010 ;Kaplan *et al.*, 2017) ;
- d'après Piatek-Guziewicz *et al.*(2017), l'élévation de l'expression duodénale d'HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1), d'HSP-70 (heat-shock protein 70) et de SOD chez les cœliaques adultes avec des symptômes extra-intestinaux pourra être due à un état de défense cellulaire contre un stress oxydatif ;
- de plus, une élévation des biomarqueurs de la peroxydation lipidique, du rapport glutathion oxydé/glutathion réduit ainsi qu'une diminution des groupements -SH des protéines ont été mentionnées par quelques études après ingestion du gluten, ce qui pourra induire un déséquilibre oxydatif intracellulaire (Moretti *et al.*, 2018) ;
- une induction significative de NO (Nitric Oxide) synthase dans la paroi intestinale chez les mêmes patients a été aussi notée (Moretti *et al.*, 2018).

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthode

1. Population étudiée

Notre étude est consacrée aux personnes adultes souffrant de la maladie cœliaque de la région d'Annaba et de Biskra.

La population étudiée a été répartie comme suit:

- A. selon le diagnostic sérologique:** 52 personnes adultes (> 18 ans) des deux sexes (hommes et femmes) sont adressées au laboratoire des analyses médicales Djendi d'Annaba pour réaliser le test des anticorps anti-TGt durant les deux mois Février et Mars 2019 dont le but est le dépistage de MC après avoir des désordres digestifs et/ou des symptômes extra-intestinaux ou bien le suivi des patients sous régime sans gluten, d'où on distingue les deux groupes suivants:

Tableau 2. Répartition des patients selon l'étude sérologique.

	Groupe 1	Groupe 2	
Valeurs de référence : antiTGt (U/mL)	< 4	4 à 10	> 10
Nombre	48	3	1

- B. selon le diagnostic histologique:** 16 patients adultes (19 à 65 ans ; $34 \pm 1,89$) des deux sexes (hommes et femmes) ont été enregistrés au niveau de laboratoire d'Anatomie et de cytologie pathologiques (Examen anatomo- pathologique) d'Etablissement Hospitalier Spécialisé en Gynéco-Obstétrique et Pédiatre - Biskra pour une étude histopathologique du Janvier 2019 jusqu'à Mai 2019.
- C. Témoins:** il s'agit de 52 volontaires dont l'âge est compris entre (18 à 60 ans ; $26,18 \pm 1,31$), ils ont été choisis d'après leur état de santé en ne présentant aucune maladie chronique, auto-immune et/ou inflammatoire, les prélèvements sont effectués au niveau de l'établissements publique hospitalier Zeribet Eloued, Biskra le mois de Mars 2019.

2. Prélèvement sanguin

Le prélèvement du sang veineux des témoins et des patients :

- ✚ a été pris de 08H à 10H du matin à jeun après au moins 12 heures du dernier repas ;
- ✚ le sang a été immédiatement recueilli sur tubes secs bien étiquetés ;
- ✚ au moment du prélèvement, les tubes doivent être mélangés doucement pour éviter les hémolyses ;
- ✚ une centrifugation de 1500 tours/min pendant 10 minutes a été effectuée ;

- une conservation du sérum à -20°C est très importante jusqu'à le moment d'utilisation pour ne pas altérer les paramètres à doser.

3. Prélèvement tissulaire

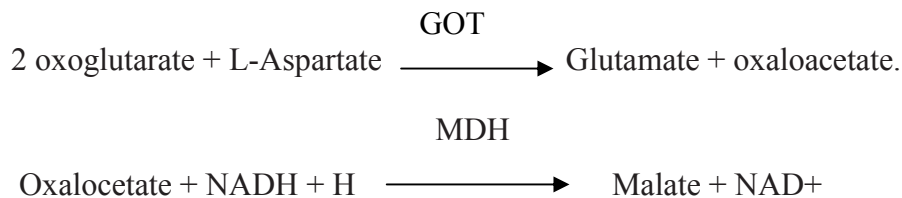
Une biopsie intestinale, le plus souvent duodénale a été réalisée par endoscopie au niveau de l'hôpital El Hakim Saâdane afin de procéder à un examen microscopique, les patients doivent être à jeun.

Une biopsie gastrique ou colique peut être complémentaire au diagnostic histopathologique de la maladie, les échantillons bien inclus dans un fixateur chimique sont directement envoyés au laboratoire d'anatomo-pathologie d'Etablissement Hospitalier Spécialisé en Gynéco- Obstétrique et Pédiatre - Biskra.

4. Méthodes d'analyses biochimiques (kit Biomagreb)

4.1. Détermination cinétique de l'activité aspartate amino-transférase (ASAT) (annexe 4)

L'ASAT ou glutamo-oxaloacétique transaminase (GOT) catalyse la réaction réversible de transfert d'un groupement amine NH_2 de l'aspartate à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et NADH :



La diminution de la concentration de NADH mesuré à 340 nm par minute est proportionnelle à l'activité catalytique d'ASAT présente dans l'échantillon.

4.2. Détermination cinétique de l'activité Alanine amino-transférase (ALAT) (annexe 5)

L'alanine amino-transférase ou glutamo-pyruvique transaminase (GPT). Enzyme catalysant la réaction de transamination par transfert réversible d'un groupement amine d'un acide aminé (α -alanine), sur un céto-acide, l' α -cétoglutarate produisant l'acide glutamique et l'acide pyruvique. Le pyruvate produit est réduit en lactate par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:

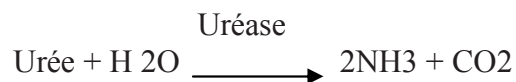




La diminution de la concentration de NADH mesuré à 340 nm par minute est proportionnelle à l'activité catalytique d'ALAT présente dans l'échantillon.

4.3. Dosage de l'urée (annexe 1)

Méthode enzymatique et colorimétrique basée sur l'action spécifique de l'uréase qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate. Les ions ammonium forment ensuite avec le chlore et le salicylate un complexe coloré bleu-vert. L'intensité de coloration, proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon, est mesurée à 580 nm.



4.4. Dosage de créatinine (annexe 2)

C'est un dosage colorimétrique cinétique basé sur la réaction de créatinine avec le picrate de sodium décrit par Jaffé. Le principe général de cette méthode consiste à mesurer, à 492 nm, l'intensité de la coloration du complexe rouge-orangé formé par la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin. La quasi-totalité des méthodes reposant sur ce principe effectuent cette mesure non plus en point final mais en cinétique, la vitesse de formation de la coloration étant proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon.

4.5. Dosage de la bilirubine Totale (annexe 3)

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. En présence de diméthyl sulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale se couple avec l'acide sulfanilique diazoté pour donner l'azobilirubine.

L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration en bilirubine présente dans l'échantillon et mesurée à 555 nm.

5. Méthodes de détermination quantitative des marqueurs biologiques de stress oxydant

5.1. Dosage de GSH sérique (Ellman, 1959)

Principe

Cette méthode de dosage consiste au développement d'une coloration jaune dès l'ajout de DTNB (acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque) aux composés contenant des groupements sulfuriques, parmi ces composés on distingue le glutathion qui se réagit avec le DTNB en libérant l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction ci-dessous:

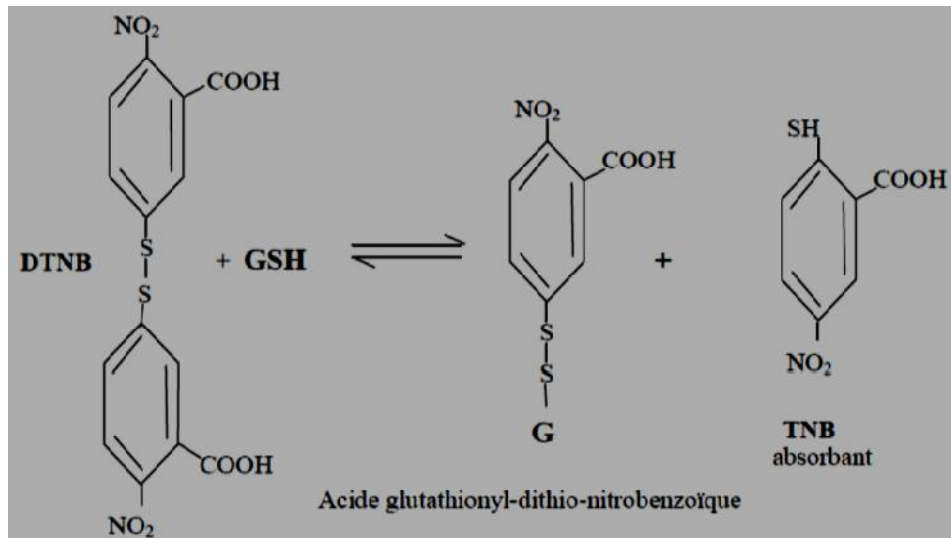


Figure 3. Principe de la méthode d'Ellman.

5.1.1. Mode opératoire

- ✓ Prélever 0.8 ml d'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml d'acide sulfosalicylique (0.25%).
- ✓ Laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger les tubes à 2500 g pendant 15min.
- ✓ Mélanger 0.5 ml de surnageant obtenu avec 1ml de TBS (pH 7.4).
- ✓ Ajouter 0.025 ml de DTNB (0.01 M).
- ✓ Incuber 5 min à température ambiante.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon contre le blanc à 412 nm.

5.1.2. Calcul de la concentration

$$\text{GSH (nmoles GSH/mg prot)} = \frac{\text{DO}}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: densité optique à 412 nm;

ε : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm = 13.1;

χ : Concentration en protéines (mg/ml);

L: Longueur du trajet optique =1 cm;

Fd: $(V_f \times V_F) / (V_{SI} \times V_S) = 3.81$.

V_{SI} : volume de l'échantillon, V_S : volume prélevé du surnageant

V_f : volume initial à l'incubation, V_F : volume final intermédiaire à la centrifugation

5.2. Dosage de TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) (Esterbauer et Cheeseman, 1990)

✚ Principe

C'est une méthode de dosage qui a pour but d'estimer la peroxydation lipidique par mesure du taux de TBARS dans l'échantillon résultant d'une certaine réactivité avec l'acide thiobarbiturique (TBA) à chaud. 99% de ces substances se présentent sous forme de MDA, l'un des principaux produits de cette peroxydation. L'intensité de la coloration rose obtenue, est directement proportionnelle au taux de TBARS mesurée à 532 nm et reflétant le degré d'oxydation dans les tissus essentiellement au niveau des membrane cellulaires.

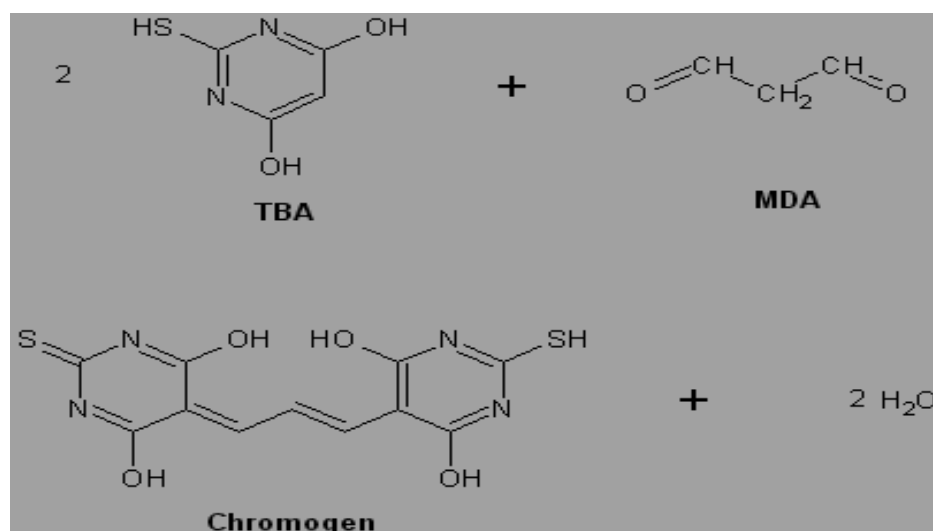


Figure 4.Principe de dosage de MDA.

5.2.1. Mode opératoire

- ✓ Prélever 250 µl d'homogénat.
- ✓ Ajouter 1.5 ml d'acide phosphorique 1% (pH 2.0) et 1 ml de TBA 0.6 %.
- ✓ Agiter.
- ✓ Mettre les tubes dans un bain marie (100 °C) pendant 45 minutes.
- ✓ Laisser refroidir à température ambiante.
- ✓ Ajouter 2.5 ml de butanol pour faire l'extraction du complexe MDA-TBA.
- ✓ Séparer la phase organique en centrifugeant à 2000 g pendant 5 minutes.
- ✓ Lire l'absorbance à 532 nm de l'échantillon contre le blanc.

5.2.2. Calcul de concentrations

$$\text{TBARS (nmoles TBARS/mg pro)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: densité optique à 532 nm ;

ε : coefficient d'extinction molaire de MDA $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

χ : Concentration en protéines (mg/ml);

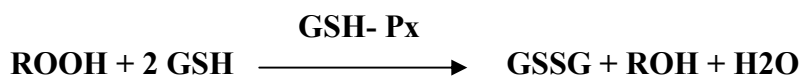
L: 1 cm.

Fd: 21.

5.3. Détermination d'activité enzymatique de la GSH-Px (EC 1.11.1.9) (Flohe et Gunzler, 1984)

Principe

Le glutathion peroxydase catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène en utilisant le GSH comme un réducteur. Cette méthode est parmi les méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination tissulaire de cette enzyme en mesurant la quantité de GSH oxydé par mg de protéine. Elle repose sur le même principe d'Ellman concernant le développement de la coloration jaune après avoir complexification du glutathion restant dans le milieu avec le DTNB.



5.3.1. Mode opératoire

- ✓ Prélever 0.2 ml d'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml de TBS (pH 7.4).
- ✓ Mélanger et ajouter 0.4 ml GSH (0,1mM).
- ✓ Laisser 5 minutes à 25 °C.
- ✓ Initier la réaction par addition de 0.2 ml H₂O₂ (1.3 mM).
- ✓ Laisser réagir pendant 10 min à température ambiante.
- ✓ Stopper la réaction par addition de 1 ml TCA (Trichloroacétic acid) à 1%.
- ✓ Centrifuger les tubes à 1500 g pendant 5 minutes.
- ✓ Prélever 0.48 ml de surnagent.
- ✓ Ajouter 2.2 ml TBS (pH 7.4).

- ✓ Ajouter 0.32 ml DTNB (1.0 mM).
- ✓ Incuber pendant 5 minutes à 25 °C.
- ✓ Lire l'absorbance de l'échantillon à 412 nm.
- ✓ Etablir un tube blanc subit le même protocole et dépourvu de l'homogénat (source d'enzyme).

5.3.2. Calcul de l'activité enzymatique

$$\text{GSH-Px } (\mu\text{moles GSH oxydé/mg prot}) = \frac{\text{DO} \times 10^3}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

DO: (DO blanc – DO échantillon) mesurée à 412 nm;

ε : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm = 13.1;

χ : Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

Fd: 62.5.

5.4. Détermination d'activité enzymatique de la GST (EC 2.5.1.18) (Habig *et al.*, 1973)

Principe

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase a été mesurée selon la méthode décrite par Habig *et al.* (1973). Cette activité est déterminée via la formation du 1-gluthation-2,4-dinitrobenzène qui sert de chromophore à la longueur d'onde de 340 nm à partir du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) considéré comme un substrat électrophile et du glutathion, le principe est illustré dans la figure ci-dessous:

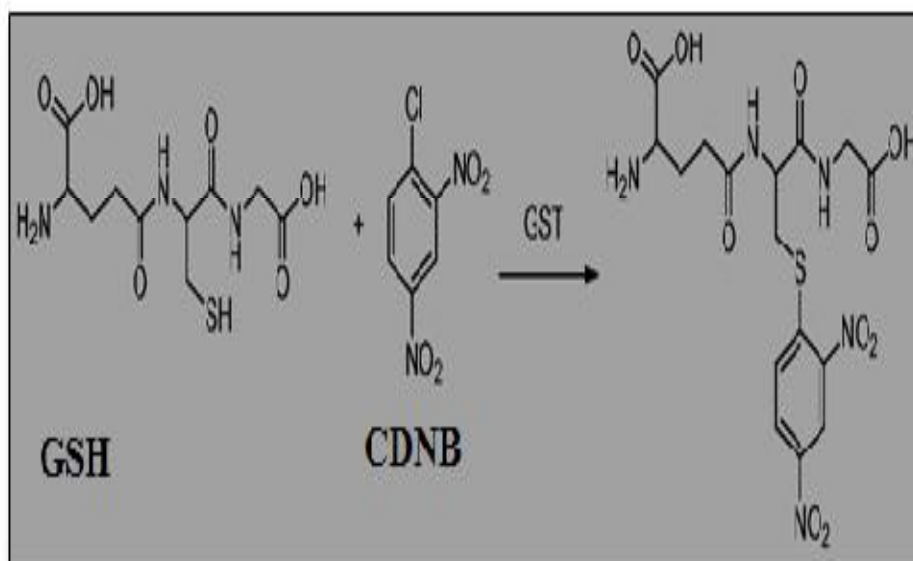


Figure 5. Principe de dosage de GST.

5.4.1. Mode opératoire

Mode opératoire Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1 M) pH 6.5	830	830
CDNB (0.02 M)	50	50
GSH (0.1 M)	100	100
Homogénat	0 (20 µl TBS)	20

Lire les absorbances de l'échantillon et du blanc à 340 nm toute les minutes pendant 5 minutes.

5.4.2. Calcul de l'activité enzymatique

$$\text{GST (UI/mg prot)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\varepsilon \times L \times \chi} \times \text{Fd}$$

UI: µmoles complexe CDNB-GSH formé/min;

ΔDO: (ΔDO échantillon/ min – ΔDO blanc/ min) à 340 nm;

ε: coefficient d'extinction molaire du CDNB = 9.6 mM⁻¹cm⁻¹;

χ: Concentration en protéines (mg/ml);

L: 1 cm;

Fd: 50.

6. Technique histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant la technique décrite par (Houlot, 1984). La technique comporte les étapes suivantes :

6.1. Fixation

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Les échantillons ont été alors mis dans le formol 10% qui constitue un fixateur classique très utilisé, il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer (15 à 20 fois son volume).



Figure 6. Fixation dan formol.

6.2. Déshydratation

Les échantillons doivent être complètement déshydratés avant d'être inclus dans la paraffine. Cette dernière n'est pas soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par un solvant (xylène). La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ce solvant est évaporé ensuite grâce à une étuve. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.



Figure 7. Déshydratation.

6.3. Inclusion et construction des blocs

Les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures. La paraffine va pénétrer dans les tissus en remplaçant le solvant. Après saturation par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat qui servent à donner la forme du bloc. Ce dernier peut se conserver pendant des années sans avoir des altérations. Le démoulage du bloc se fait après refroidissement de la paraffine.



Figure 8. Installation du bloc.

6.4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 μm .



Figure 9. Confection des coupes.

6.5. Etalement

Le premier procédé consiste à faire l'étalement dans un bain thermostat, en repêchant les coupes à l'aide d'une lame histologique ; dans le second procédé, on utilise une plaque chauffante, on dépose les lames que l'on recouvre de liquide d'étalement. On y place les coupes, puis on les étale. A la fin de l'opération, on absorbe l'excès de liquide avec papier buvard.

Les colles sont des substances adhésives à base d'albumine, de gélatine ou d'amidon.

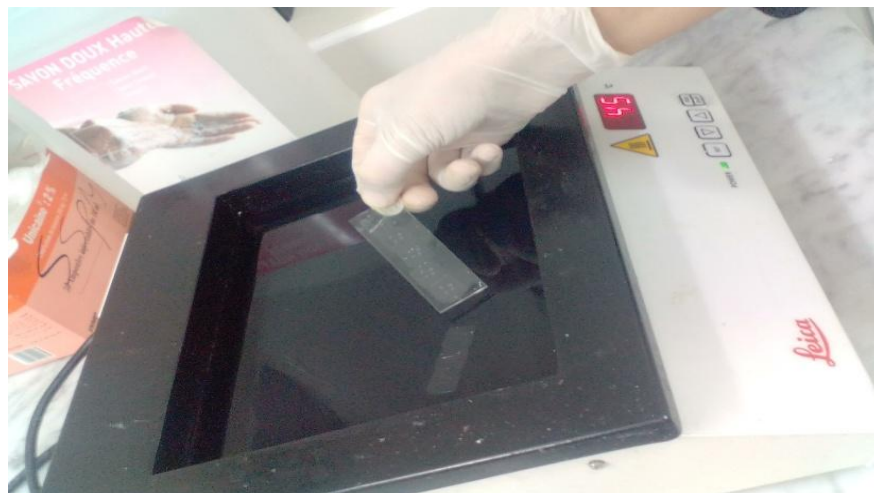


Figure 10. Etalement.

6.6. Coloration

La coloration nécessite l'utilisation de la technique à l'hématoxyline-éosine ou hémateïne-éosine; qui exige la présence d'un alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml d'HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml ammoniacque) et solution d'éosine (100 ml éosine solution aqueuse à 3 %, 125 ml alcool éthylique à 95 %, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes :

- ✓ déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée ;
- ✓ immerger dans un bain d'hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux) ;
- ✓ différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope ;
- ✓ bleuir dans un bain d'eau ammoniacale ;
- ✓ immerger dans un bain d'éosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

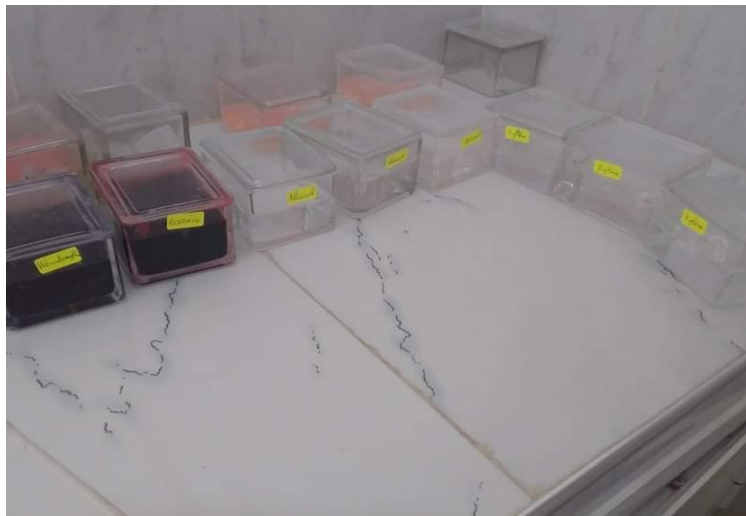


Figure 11. Coloration.

6.7. Lecture

Après montage entre lame et lamelle, Les préparations ont ensuite observées à différents grossissements au microscope optique par Dr Khineche, en donnant le compte rendu de chaque patient.



Figure 12. Lecture des lames.

7. Étude statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moy \pm SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées pour une probabilité définie selon le test de la variable ANOVA à 1 facteur basant sur la comparaison des moyennes deux à deux.

- ✓ différence significative entre patients et témoins:
 - * une différence significative $p \leq 0.05$;
 - ** une différence hautement significative $p \leq 0.01$;
 - *** une différence très hautement significative $p \leq 0.001$.
- ✓ différence significative entre groupe 2 et groupe 3:
 - # une différence significative $p \leq 0.05$;
 - ## une différence hautement significative $p \leq 0.01$;
 - ### une différence très hautement significative $p \leq 0.001$.

Chapitre 4

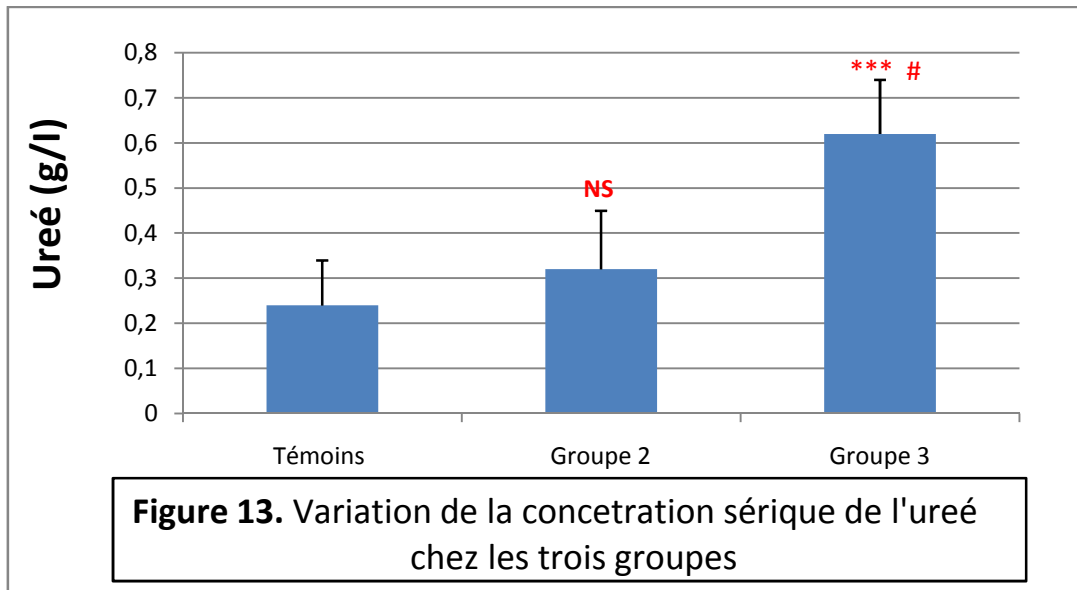
Résultats et Discussion

1. Explorations biochimiques

1.1. Bilan rénal

Aucune différence significative n'a été obtenue concernant la concentration sérique en urée et en créatinine chez le deuxième groupe par rapport aux témoins.

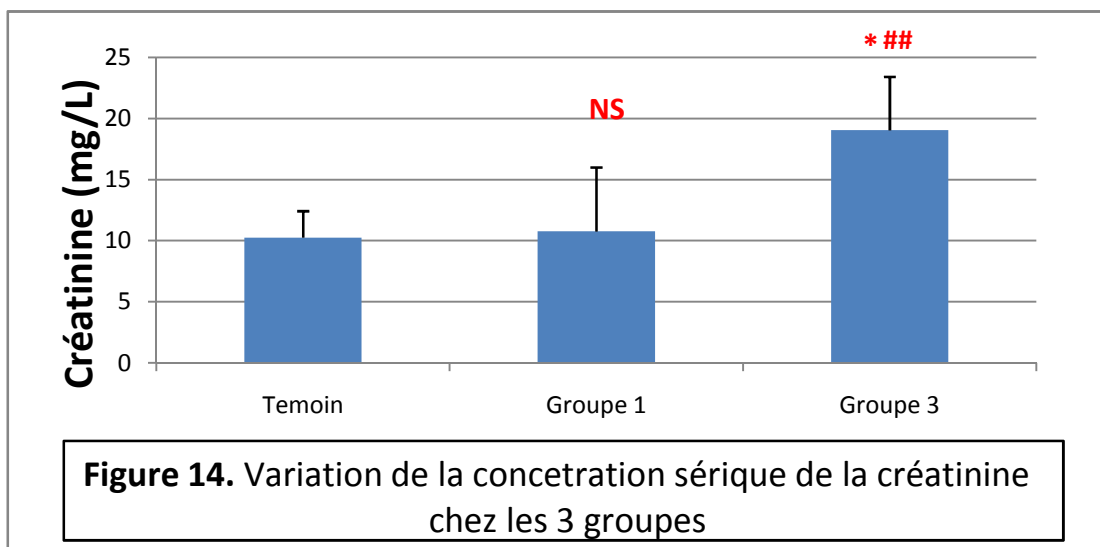
En revanche, une augmentation remarquable de ces deux paramètres chez le troisième groupe comparé aux témoins (urée: $p \leq 0.001$; créatinine: $p \leq 0.05$) et au deuxième groupe (urée: $p \leq 0.05$; créatinine: $p \leq 0.01$) (figures 13 et 14).



NS : différence non significative entre groupe 2 et témoins ;

*** : ($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et témoins ;

: ($p \leq 0.05$): différence significative entre groupe 2 et groupe 3.



NS : différence non significative entre groupe 2 et témoins ;

* ($p \leq 0.05$): différence significative entre groupe 3 et témoins ;

($p \leq 0.01$): différence hautement significative entre groupe 2 et groupe 3.

L'étude statistique a révélé que les patients du groupe 2 n'ont présenté aucun désordre des paramètres mentionnés ci-dessus comparé aux sujets sains, ils se caractérisent par des teneurs sériques en anti TGt inférieurs à 4 U/ mL, on parle donc d'une MC peu probable sauf si le patient suit une diète sans gluten.

Alors que le groupe 3 a inclus des personnes dont l'antiTGt est compris entre 4 à 10 U/ml, ce qui signifie un résultat douteux quant à la probabilité que le patient soit porteur d'une MC, l'interprétation dépend du contexte clinique du patient ; mais aussi des personnes avec des antiTGt supérieures à 10 confirmant la maladie, en interprétant en fonction du contexte médical.

L'urée est la forme principale d'élimination des déchets azotés provenant du catabolisme des protéines chez l'homme. Son cycle se déroule essentiellement dans le foie ; elle est complètement filtrée par le glomérule est réabsorbé partiellement au niveau du tubule rénal de façon inversement proportionnelle au débit urinaire. L'augmentation de l'urée sanguine traduit un déficit de la fonction d'excrétion des reins, avec ou sans lésion de l'organe (Bouayed, 2013).

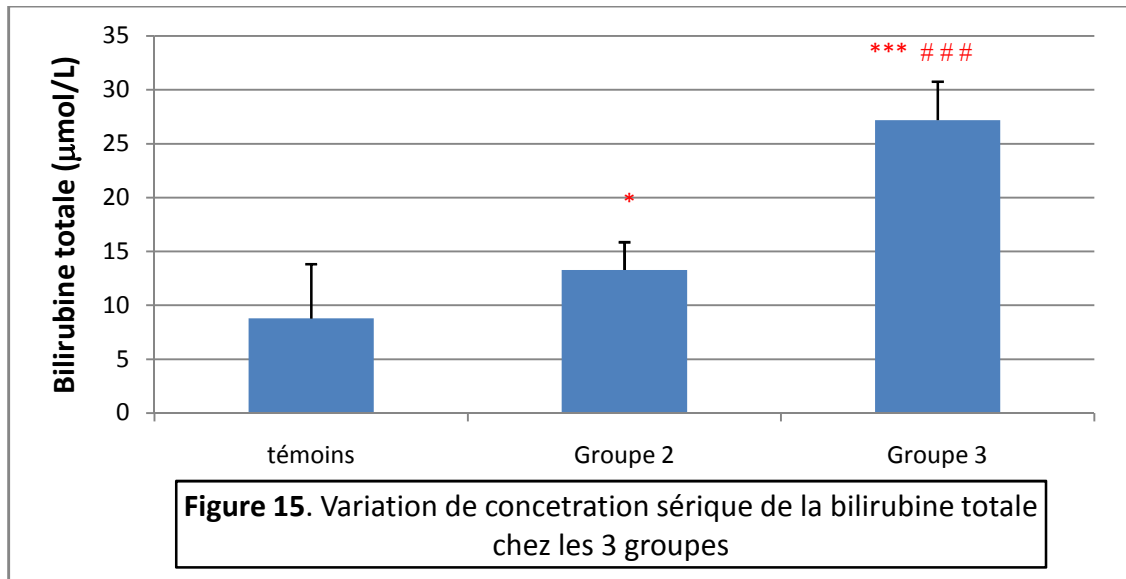
De même, la créatinine est une substance issue de la dégradation de la créatine au niveau des cellules musculaires. Elle n'est finalement qu'un simple déchet organique, qui doit normalement être évacué par voie urinaire après passage par les reins (Dekkiche et Smatti, 2018).

D'après Wijarnpreecha *et al.* (2016) et Boonpheng *et al.* (2018), de nombreuses recherches ont étudié les mécanismes pathologiques possibles d'une insuffisance rénale chronique ou en phase terminale, de la néphropathie diabétique, à IgA, membranaire, de la glomérulonéphrite, du syndrome néphrotique lié à la malabsorption chez des personnes atteintes de la MC.

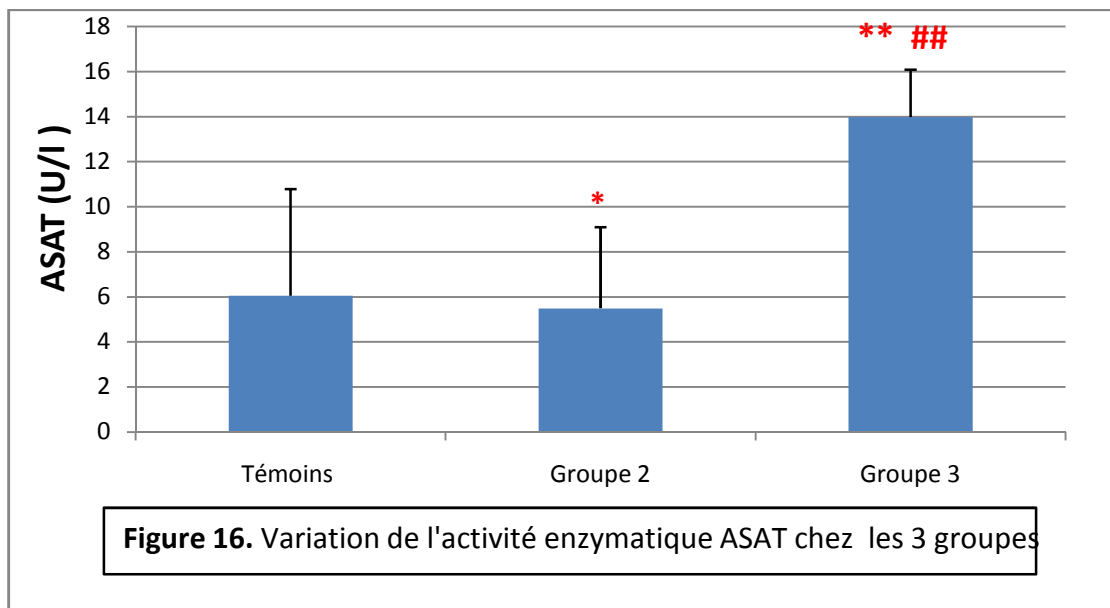
1.2. Bilan hépatique

D'après nos résultats (figures 15, 16 et 17), les patients du deuxième groupe ont noté les variations suivantes au niveau sérique de la bilirubine totale ($p \leq 0.05$), ASAT ($p \leq 0.05$) et ALAT (NS) par rapport aux témoins.

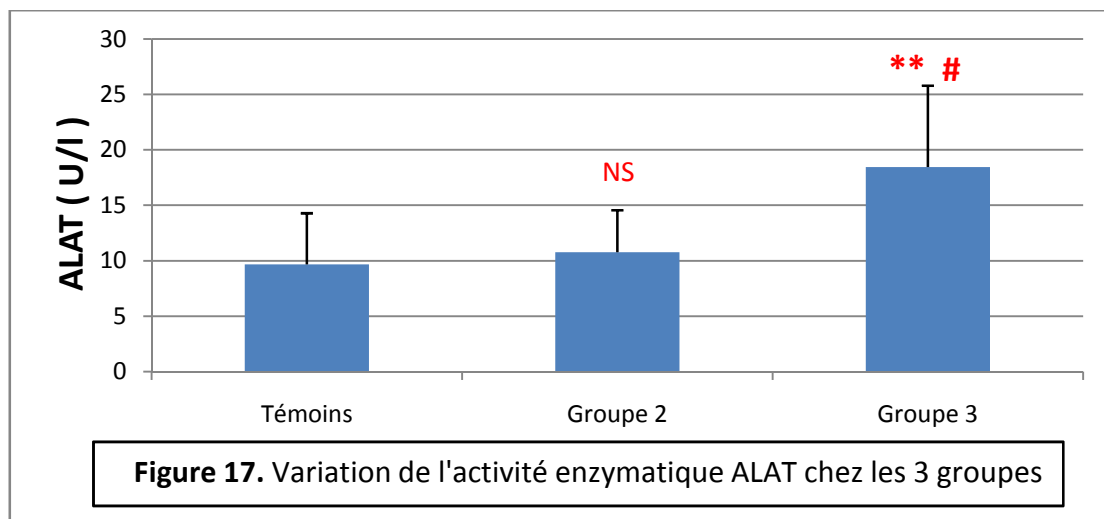
De leur part, les patients du troisième groupe ont signalé une élévation importante de la bilirubine totale ($p \leq 0.001$: témoins ; $p \leq 0.001$: groupe 2), l'activité enzymatique ASAT ($p \leq 0.01$: témoins ; $p \leq 0.01$: groupe 2) et l'activité enzymatique ALAT ($p \leq 0.01$: témoins ; $p \leq 0.05$: groupe 2).



* ($p \leq 0.05$): différence significative entre groupe 2 et témoins ;
*** ($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et témoins ;
($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et groupe 2



* ($p \leq 0.05$): différence significative entre groupe 2 et témoins ;
** ($p \leq 0.01$): différence hautement significative entre groupe 3 et témoins ;
($p \leq 0.01$): différence hautement significative entre groupe 3 et groupe 2



NS : différence non significative entre groupe 2 et témoins ;

** ($p \leq 0.01$): différence hautement significative entre groupe 3 et témoins ;

($p \leq 0.05$): différence hautement significative entre groupe 3 et groupe 2

La bilirubine des patients du groupe 2 a été significativement élevée par rapport aux témoins. Au contraire, elle a reconnue une élévation très hautement significative chez le groupe 3.

Ce paramètre constitue le produit final de la dégradation de l'hème de plusieurs protéines héminiques d'intérêt biologique comme l'hémoglobine des hématies et la myoglobine des muscles, la bilirubine est transportée dans le sang, et est conjuguée dans le foie (Benjamin, 2015).

Une hyperbilirubinémie pourra être la conséquence des maladies associées au foie telles qu'un dysfonctionnement hépatique, hépatite, maladies des voies biliaires intrahépatiques.

Mais aussi, des maladies extra hépatiques pourront être en cause comme les maladies hémolytiques (Thapa et Walia, 2007).

Les transaminases à leurs tours ont marqué une augmentation hautement significative comparée aux contrôles.

Ces enzymes permettent la mise en évidence de la présence d'éventuels perturbations métaboliques hépatiques et ainsi le contrôle de l'état fonctionnel du foie (Thapa et Walia, 2007).

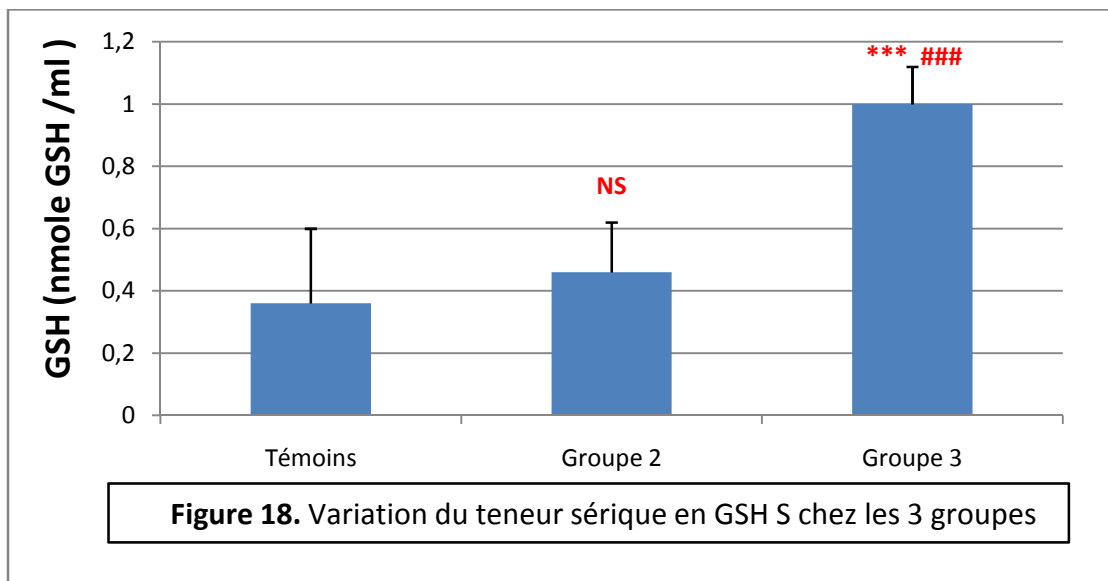
D'après Bigare (2016) et Lefebvre (2016), La biochimie est généralement perturbée chez les cœliaques se traduit par une stagnation pondérale ou une perte de poids, une diminution de la masse musculaire, une hypotonie, une inappétence, une augmentation des transaminases voire une hépatopathie sévère inexplicée, une anémie isolée et possible malabsorption du lactose.

2. Marqueurs biologiques du stress oxydant

Les figures 18, 19, 20 et 21 indiquent qu'aucune différence significative n'a été observée chez les patients avec une sérologie négative par rapport aux sujets sains au niveau des quatre paramètres GSH, TBARS, GSH Px et GST.

Mais nous avons remarqué une diminution très hautement significative chez les mêmes patients au niveau du GSH et de TBARS comparée au groupe 3.

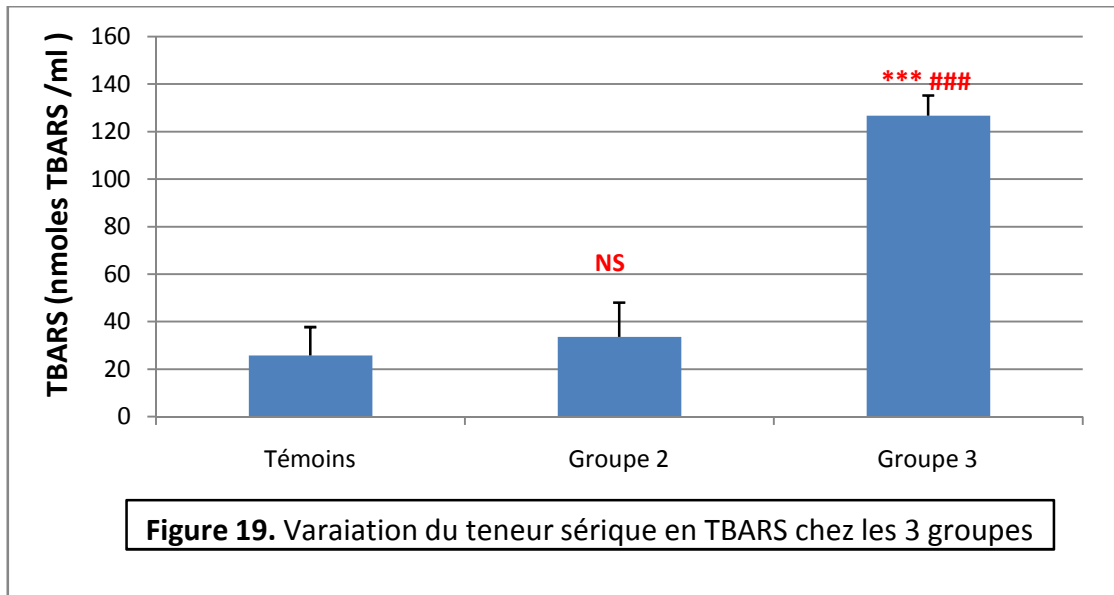
Les données ont aussi révélé une élévation importante des deux biomarqueurs du stress oxydatif par rapport aux contrôles (GSH et TBARS: $p \leq 0.001$) alors qu'on a signalé une NS au niveau des enzymes.



NS : différence non significative entre groupe 2 et témoins ;

*** ($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et témoins ;

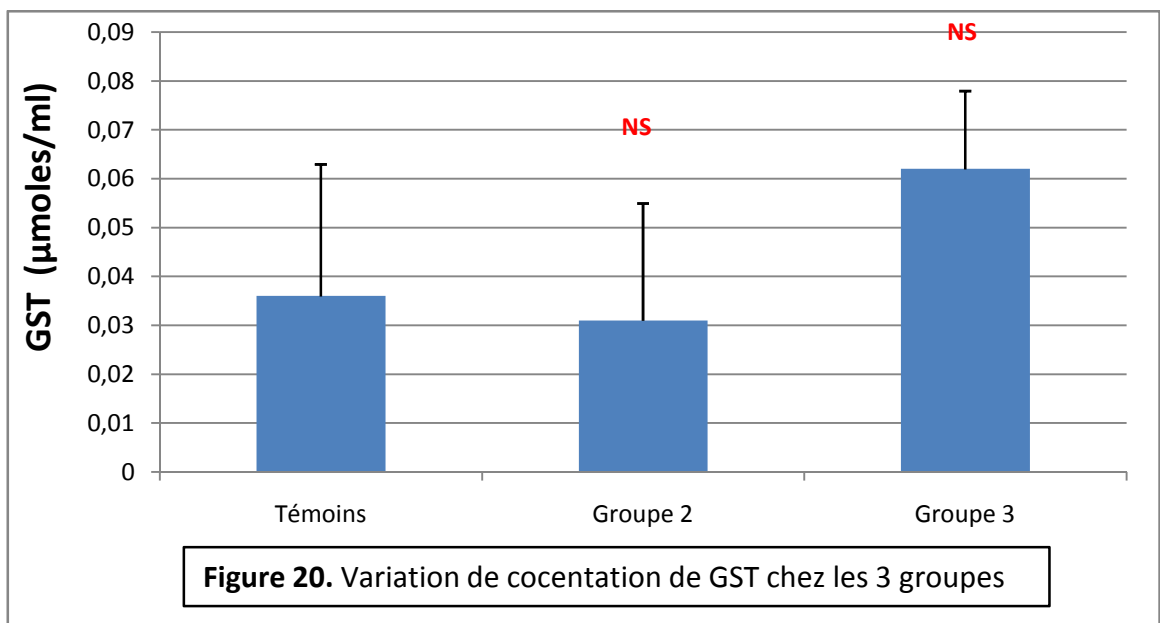
($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et groupe 2 ;



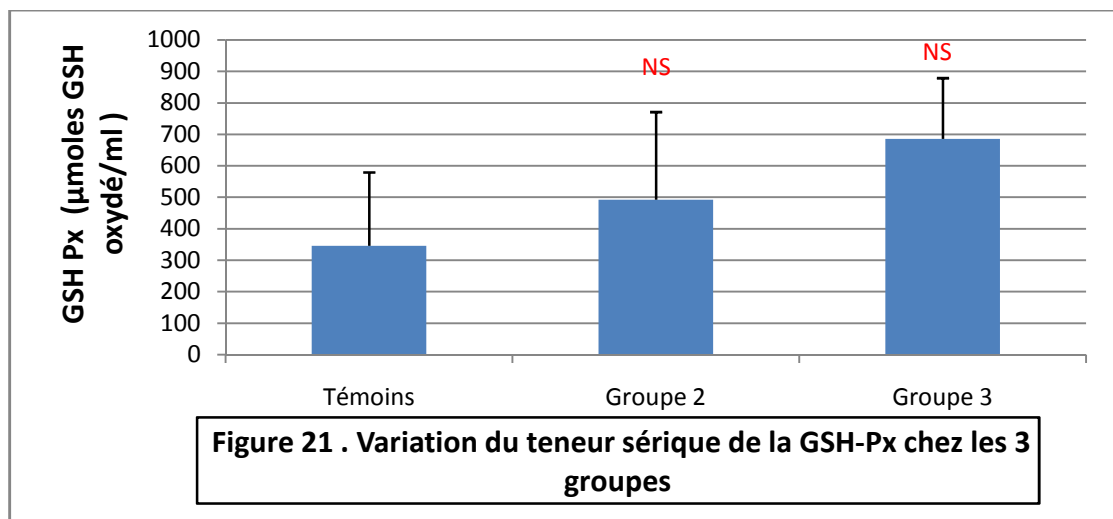
NS : différence non significative entre groupe 2 et témoins ;

*** ($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et témoins ;

($p \leq 0.001$): différence très hautement significative entre groupe 3 et groupe 2



NS : différence non significative



NS : différence non significative

La peroxydation lipidique est un processus qui se produit normalement à des niveaux faibles dans toutes les cellules et les tissus. Il implique la conversion des acides gras insaturés en hydroperoxydes lipidiques. Ce processus est initié par des radicaux libres. L'organisme possède des mécanismes antioxydants qui limitent ce processus.

Le MDA ou malondialdéhyde est un marqueur de l'oxydation des lipides, il reste le marqueur le plus utilisé pour déterminer un stress oxydatif. Il est considéré comme un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras insaturés (Berrached, 2017).

La GSH-Px, un antioxydant enzymatique catalyse la réduction d' H_2O_2 en oxydant deux molécules de glutathion GSH réduites en GSSG. Elle assure plus largement la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH, en alcools (ROH) (Benjamin, 2015).

En plus, le GSH peut réagir rapidement et spontanément sans intervention enzymatique avec le radical hydroxyl, l'oxyde d'azote (III) et le peroxydinitrite. il est aussi intervenue dans les processus de détoxification par la formation des complexes S-conjugués avec les métabolites toxiques au cours de biotransformation, ces réactions sont catalysées par la GST (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

En corrélation avec notre étude, de nombreuses études ont été consacrées sur l'implication du stress oxydatif dans la MC.

Rovaris *et al.*, (2017) ont trouvé une augmentation remarquable des paramètres (protéines carbonyles et TBARS) contre une diminution des activités enzymatiques CAT et SOD au niveau duodénal chez les cœliaques.

De même, l'oxydation d'ADN révélée par la teneur en 8-oxo-guanine leucocytaire et urinaire des patients a augmenté significativement par rapport aux témoins (Szaflarska-Popławska *et al.*, 2010).

La même étude a suggéré que ces dommages oxydatifs pourront être la conséquence d'une carence en apports nutritionnels en antioxydant tels que la vitamine A et l' α -tocophérol due à une malabsorption intestinale.

De plus, Piatek-Guziewicz *et al.* (2017) ont montré une augmentation importante de l'acide urique jouant un rôle antioxydant, des activités enzymatiques ASAT et SOD, ainsi qu'une diminution significative de la bilirubine et de la vitamine D chez des personnes souffrant de cette maladie.

Ils ont aussi indiqué la persistance du stress oxydatif chez les patients malgré le suivie d'un régime sans gluten. Son étude a mis en évidence deux nouveaux biomarqueurs de la MC tels que HSP-70 et l'HIF-1 α .

L'étude de Rivabene *et al.* 1999 *in vitro* a indiqué que l'effet antiprolifératif de la gliadine est associé au changement du statut oxydatif, par élévation taux des peroxydes, réduction du GSH et diminution du contenu protéique en groupement sulfhydriques.

3. Etude histopathologique

3.1. Répartition des patients selon le sexe et le stade de développement

Les 16 patients qui sont consultés le laboratoire d'anatomopathologie toute au long de la période de notre étude ont répartis en fonction des paramètres suivants :

3.1.1. Répartition selon le sexe

Tableau 3. Répartition des patients selon le sexe.

Sexe	Nombre
Femme	11
Homme	5

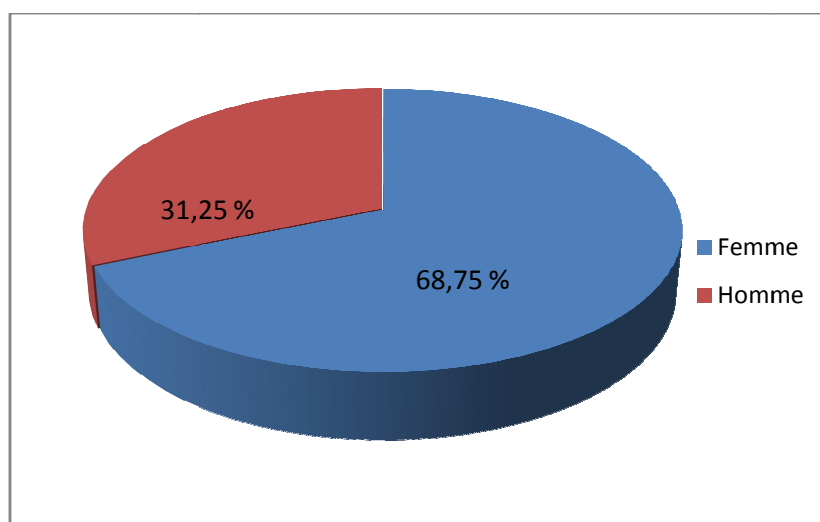


Figure 22. Graphique représentant la répartition des patients selon le sexe.

Nos résultats ont montré une prédominance du sexe féminin qui représente 68,75% de la population d'étude alors que le sexe masculin représente 31,25 %, ce qui est en accord avec la littérature (tableau 1, figure 1).

La maladie cœliaque est deux à trois fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (Yafi, 2017).

Il est connu que les maladies auto-immunes sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes car ces maladies sont portées sur le chromosome X. Sachant que la femme porte deux chromosomes XX, elle est plus prédisposée que l'homme pour exprimer une maladie auto-immune. Ce qui explique la prédominance de la maladie cœliaque chez les femmes (Malamut et Cellier, 2010).

3.1.2. Répartition selon la classification de Marsh

La répartition est expliquée par le (tableau 4 et figure 23) :

Tableau 4. Répartition selon le degré de l'atrophie villositaire.

Grade de l'atrophie villositaire	Nombre
Grade 1	2
Grade 2	3
Grade 3	8
Grade 4	3

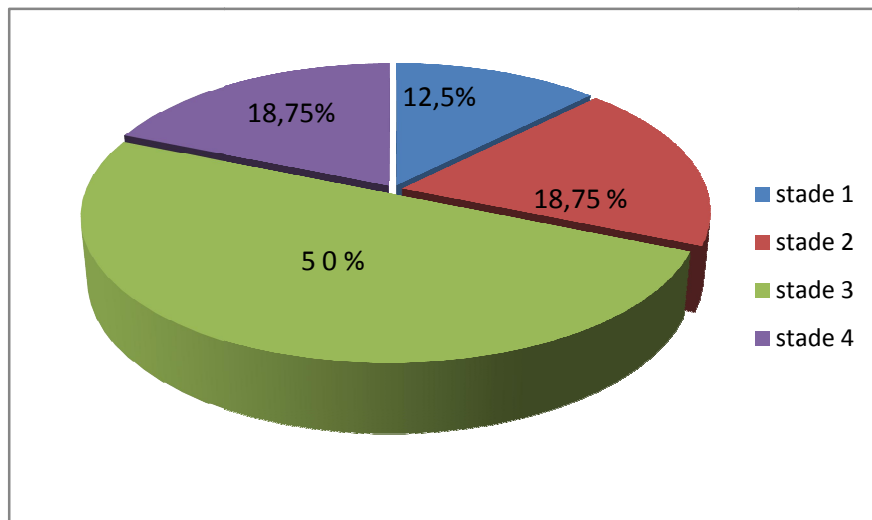


Figure 23. Graphique représentant la répartition des patients selon le degré d'atrophie villositaire.

D'après ces données, nous ne concluons que 50% des patients souffrant de la MC, 3^{ème} stade, suivi du 2^{ème} et du 4^{ème} stade et finalement seulement 12.5% du stade 1.

Des recherches ont suggéré que les taux d'IgA anti tTG étaient corrélés aux stades de Marsh et donc associés à une atrophie villositaire, et que la présence de ces anticorps était un prédictateur indépendant de lésions Marsh 3 (Yafi, 2017).

3.2. L'examen microscopique des patients

Après avoir réalisé les lames histologiques des patients, un examen microscopique est très important pour dépister les altérations au niveau tissulaire ainsi que le stade de développement de la maladie, des photos ont été prises pour visualiser toutes anomalies.

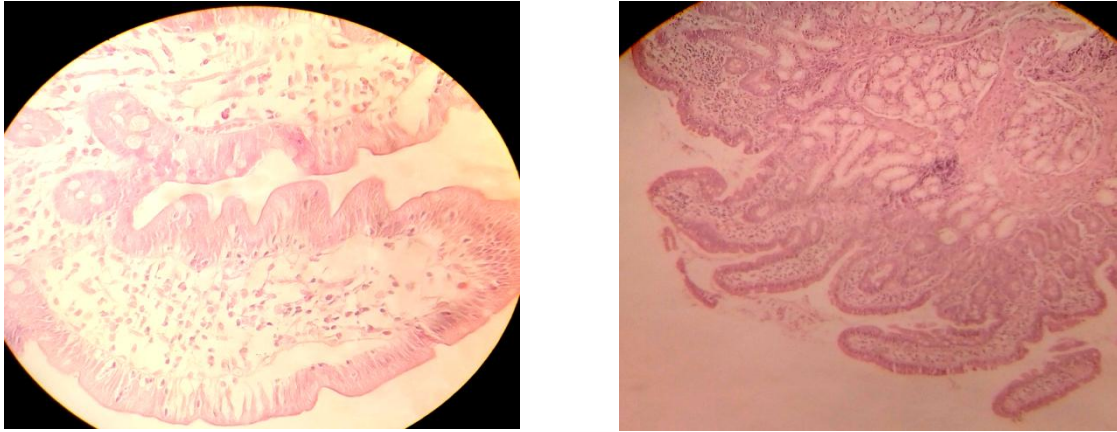


Figure 24. Aspect histopathologie d'une muqueuse duodénale inflammatoire de Stade 1 selon la classification de Marsh modifiée chez une patiente de 56 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).

D'après cette figure, nous pouvons observer une muqueuse duodénale dont le relief villositaire est conservé ; l'épithélium de surface est bien différencié fait de cellule entérocytaire à plateau strié conservé avec quelques cellules caliciforme et absence d'évidence d'hyperplasie cryptique.

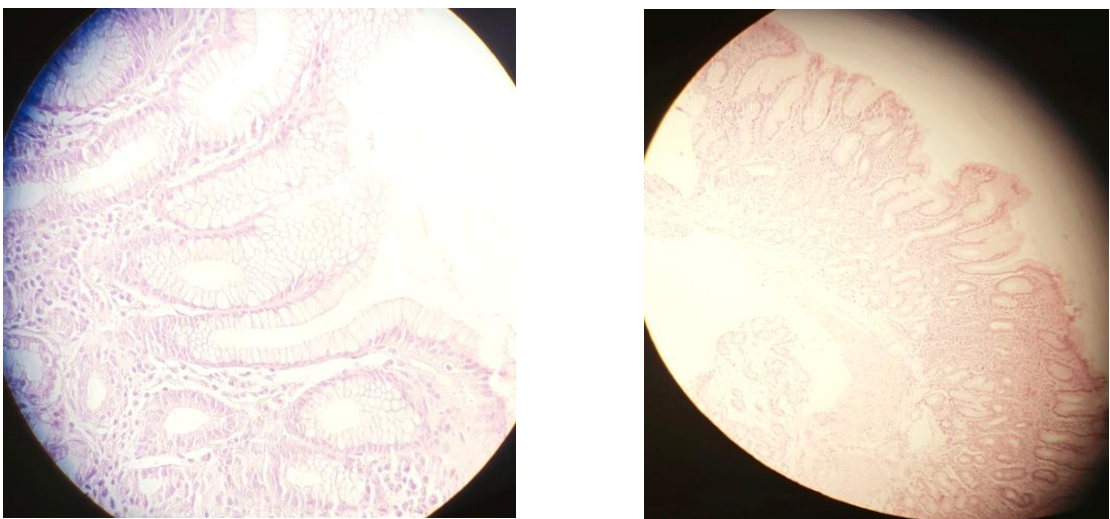


Figure 25. Aspect histopathologique d'une atrophie villositaire modérée de la muqueuse duodénale de grade 2 selon la classification de Marsh chez une patiente de 42 ans (figure gauche HE×40 / figure droite HE×10).

Cette figure montre que gastrite antrale chronique atrophique modérée sans métaplasie intestinale, sans dysplasie

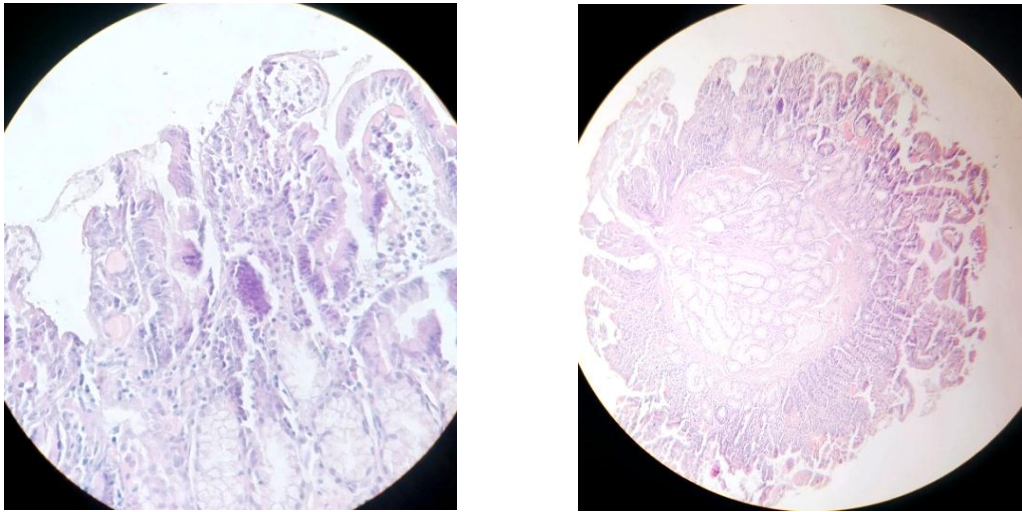


Figure 26. Aspect histopathologique de muqueuse siège d'une atrophie villositaire partielle grade 3A selon la classification de Marsh chez une patiente de 22 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).

La classification de Marsh grade 3A présente une muqueuse hérissée de villosités de taille modérément diminuée, contrastant avec des cryptes peu hypertrophiques. Le nombre de lymphocytes intraépithéliaux est peu élevé.

Le chorion est inflammatoire fait d'un infiltrat polymorphe de densité variable dissipant les glandes de Brunner d'allure régulière.

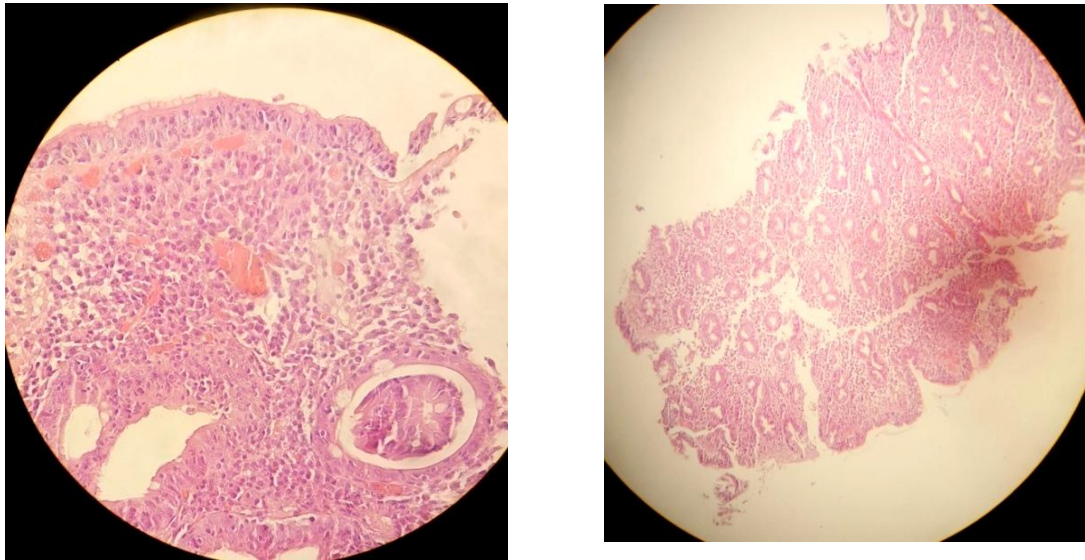


Figure 27. Aspect histopathologique de muqueuse siège d'une atrophie villositaire subtotale grade 3b selon la classification de Marsh chez une patiente de 24 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).

L'examen microscopique a révélé une muqueuse duodénale à relief villositaire aplatis avec une hyperplasie cryptique.

La lamina propria est le siège d'un infiltra inflammatoire essentiellement lymphocytaire avec une lymphocytose épithéliale estimée.

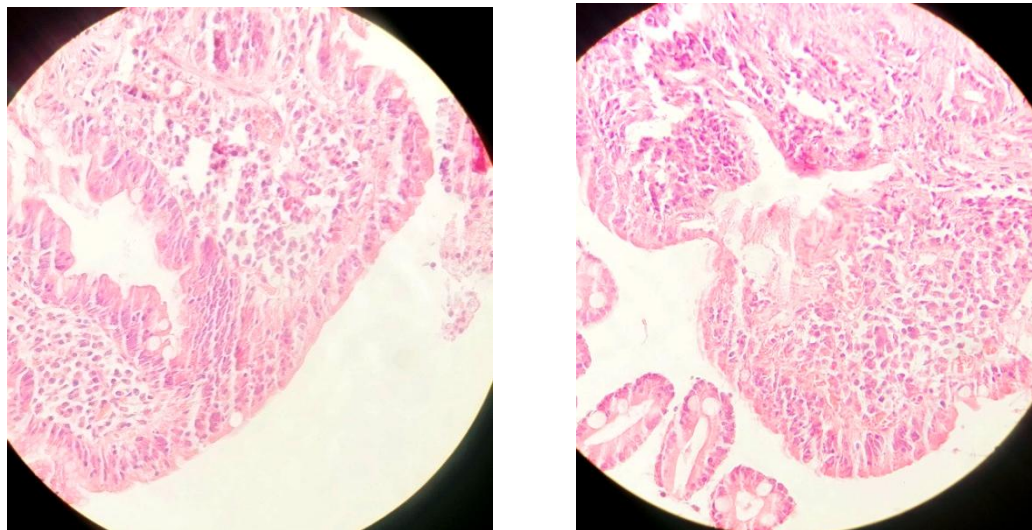


Figure 28. Aspect histopathologique de muqueuse d'une atrophie villositaire totale grade 3C selon la classification de Marsh chez une patiente de 27 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).

L'examen microscopique a révélé une muqueuse greliquée, hérissée de villosités en hauteur par endroit aplaties, revêtue par enterocytes bien différenciés.

Le chorion muqueux est congestif comportant un infiltrat lympho plasmocytaire modéré.

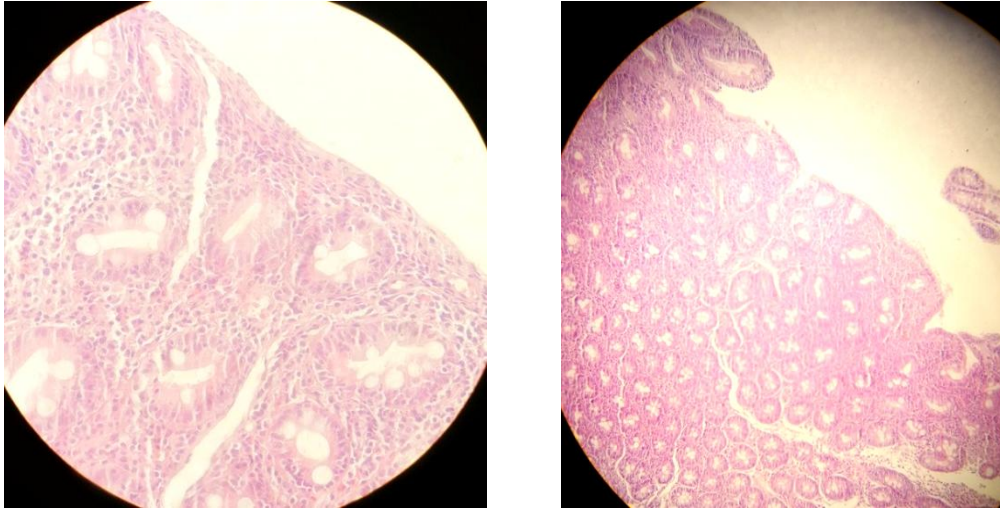


Figure 29. Aspect histopathologique de muqueuse d'une atrophie villositaire grade 4 selon la classification de Marsh chez une patiente de 29 ans (figure gauche HE×40/figure droite HE×10).

Dans ce stade de développement de la maladie, la muqueuse duodénale est presque totalement aplatie et est remplacée par endroit par un exsudat inflammatoire, le nombre des lymphocytes intra épithéliaux est nettement élevé.

Le chorion est hémorragique et épaissi par infiltrat inflammatoire dense essentiellement lympho-plasmocytaire dissociant, des glandes de Brunner d'apparence normale.

La maladie cœliaque, une entéropathie auto-immune chronique chez des sujets génétiquement prédisposés, le transport préalable du gluten dans le chorion déclenche une réponse immunitaire adaptative ; l'altération de la perméabilité paracellulaire observée dans la MC active contribuait à l'entrée anormale de peptides du gluten. Il semble en fait que l'entrée des peptides de la gliadine à travers l'épithélium ne se fasse pas par la voie paracellulaire mais par la voie transcellulaire (Malamut et Cellier, 2012). L'ingestion de gluten endommage la partie de l'intestin grêle responsable de l'absorption des nutriments ; également appelée entéropathie sensible au gluten (Mearns *et al.*, 2019).

Les réactions immunitaires et inflammatoires ainsi induites provoquent de plus la production d'auto-anticorps, mais aussi la destruction de la muqueuse intestinale (Admou et *al.*, 2009 ; Kaplan et *al.*, 2017).

L'expression des ARNm du TNF- α et d'IL-10 a été diminuée chez les patients traités par un régime sans gluten comparée aux patients nouvellement diagnostiqués. Par conséquent, les altérations histopathologique de la muqueuse duodénale persistent même après traitement (Piatek-Guziewicz et *al.*, 2017).

Selon Moretti *et al.* (2018), la production des espèces réactives de l'oxygène est en corrélation avec le degré de sévérité des dommages intestinaux, évalués par les différents stades de la classification de Marsh.

Cette corrélation a été aussi illustrée dans l'étude de Rovaris et *al.* (2017) par liaison entre les valeurs en IL6, l'activité enzymatique SOD et l'examen histopathologique.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a révélé que la maladie cœliaque chez l'adulte est responsable de l'apparition d'un certain nombre de troubles au niveau sanguin, cellulaire et par conséquent au niveau tissulaire :

- une perturbation des enzymes sériques telle qu'une augmentation des activités enzymatiques ASAT et ALAT ;
- une hyperbilirubinémie ;
- une hyperuricémie ainsi qu'une hypercréatininémie ;
- une augmentation de teneur sérique en MDA ;
- une élévation de la concentration du GSH dans le sang ;
- les différents stades de la classification de Marsh qui a exhibé des dommages intestinaux se développant d'une muqueuse duodénale dont le relief villositaire est conservé avec l'absence d'évidence d'hyperplasie cryptique. jusqu'à une muqueuse duodénale presque totalement aplatie et l'hyperplasie des cryptes.

D'après ces données, nous pouvons suggérer que le désordre produit au niveau des deux bilans hépatique et rénal pourra être en corrélation avec l'augmentation remarquable des deux paramètres MDA et GSH, le premier traduit le degré de la peroxydation lipidique, responsable des dommages membranaires consécutifs à des modifications biochimiques et fonctionnelles de celles-ci, ce qui conduit à la lyse et la libération non contrôlée du contenu cellulaire voire une hépatopathie et/ou néphropathie ; alors que le second, un antioxydant puissant, joue un rôle protecteur contre ces radicaux libres.

Nous avons décrit aussi les différents stades du développement de la maladie en montrant via une étude histopathologique l'état inflammatoire de l'entérocyte et l'association directe avec le degré de sévérité de la maladie qui se finit par une hyperlymphocytose intraépithéliale, le stress oxydatif pourra être aussi en cause.

D'après plusieurs études Clinique, l'adoption d'un régime stricte sans gluten est obligatoire, nous pouvons conclure qu'une alimentation équilibrée, riche en antioxydants et/ou l'administration de certain médicament avec un effet antioxydant devra être conseillée pour les cœliaques en les aidant de minimiser le risque du développement vers une maladie cancéreuse.

Références bibliographiques

Référence bibliographiques

- Abouelarais M., Guennoun N., Krati K. 2009. La Maladie cœliaque de l'adulte a propos de 47 cas. Thèse de doctorat d'état, université Cadi Ayyad –Marrakech ,118p .
- Admou B., Sbihi M., Bienvenu F., Chabaa L. 2008. Diagnostic immunologique de la maladie cœliaque chez l'enfant. Mise au point. Immuno-analyse et biologie spécialisée 218 : 217-222 .
- Bai J.C., Fried M., Corazza G.R., Schuppan D., Farthing M., Catassi C., Greco L., Cohen H., Ciacci C., Fasano A., et al. 2012. Maladie cœliaque. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines 3 :27.
- Bigare M.A. 2016. La maladie cœliaque de l'adulte : pourquoi et quand la dépister ?. Thèse de doctorat d'état, université Paris Descartes, 131p.
- Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J. 2007. Radicaux libres et anti-oxydants. In: Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires. Paris : Éd Médecine-Sciences Flammarion. p 59.
- Borg J., Reeber A., Andres C. 2008. Biochimie métabolique. 2^{ème} édition. Paris : Ellipses Edition Marketing S.A. PCEM. 285 p. Cours et Qcm.
- Bouasla A. 2011. Prévalence de la maladie cœliaque à Constantine (1996 2008) et diététique associée auprès des patients de l'EHS Sidi Mabrouk de Constantine (2009), Thèse de magistère, université Mentouri – Constantine, 122 p.
- Bouziane A. 2016. La maladie cœliaque .Thèse de doctorat d'état, université Abou Bakr Belkaid, Telemcen, 43p.
- Boopheng B., Cheundpasitporn W., Wijarnpreecha K. 2018. Renal disease in patients with celiac disease. Minerva Medica 109(2):126-40.
- Cheikh Ali M. 2016. Apport de l'étude anatomopathologique de la biopsie digestive haute dans le diagnostic de la maladie cœliaque chez l'adulte a propos de 110 cas. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed v – Rabat ,177p.
- Cosmes J., Nion –lamurier I. 2013. La complication de la maladie cœliaque .Pathologie Biologie .G1 (2) :e21-e26.
- Coton T., Grassin F., Maslin J., Gidenne S., Sarret D., Petit jeans F., Benois A., Kraemer P., Cloatre G. 2008. Maladie cœliaque : particularités africaines. A propos de 8 cas à Djibouti. Médecine Tropicale 2 : 144-148 .

- Deprez P.H. 2018. Maladie cœliaque, le vrai et le faux. Gastroentérologie. Louvain Med 137 (5):304-307.
- Dupuis R. 2017. Quels sont les facteurs associés à une meilleure qualité de vie chez les patients avec maladie cœliaque ? résultats d'une enquête portant sur 787 cas. Thèse de doctorat d'état, université de Bordeaux, 91p.
- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys 82: 70-7.
- Esterbauer H., Cheeseman K. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-hydroxynenal. Enzymology 186: 407-421.
- Flohe L., Gunzler W. A. 1984. Analysis of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105: 114-21.
- Gargouri L., Kolsi N., Maalej B., Well M., Mahfoudh A. 2017. Maladie Cœliaque chez l'enfant 20 :20-28.
- Green P.H.R., Lebowitz B., Greywoods R. 2015. Celiac disease. Clinical reviews in allergy and immunology 135(5) : 1099-1106.
- Goussé - De Percin A. 2015. Étude de La Prévalence de La Maladie cœliaque dans une population d'enfants diabétiques de type 1 dépistage systématique selon Les nouvelles recommandations européennes, université Toulouse iii – Paul Sabatier, 76p.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chm 249: 7130-71 .
- Haleng J., Pincemail J., Defrange J.O., Charlier C., Chapelle J.P. 2007. Oxidative stress. Rev Med Liege 62(10): 628-638.
- Houlot R. 1984. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Éd Maloine. 19-21, 225–227
- Hopps E., Noto D., Caimi G., Averna M.R. 2010. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative Stress. Nutrition, Metabolism et cardiovascular Diseases 20: 72-77.
- Itzlinger A., Branchi F., Elli L., Schumann. M.2018. Gluten-Free Diet in Celiac Disease—Forever and for All?. Nutrients 10: 1796.
- Kaplan M., Ates I., Yüksel M., Ozin Y.O., Kaplan M., Ates I., Akpınar M.Y., Topcuoglu C., Kayaçetin E. 2017. The rôle of oxidative stress in the etiopathogenesis of gluten-sensitive enteropathy disease. J Med Biochem 36(3):243–250.
- Khetabi R., Boukhobza A. 2016. Étude clinique et sérologique de la maladie cœliaque (MC). Thèse de magistère, université des Frères Mentouri, Constantine, 75pages.

- Lefebvre A. 2016. La maladie cœliaque : généralités, physiopathologie, mesures hygiéno-diététiques, réglementation des produits sans gluten et recherche thérapeutique .Thèse de doctorat d'état, université de Lille 2 ,127p.
- Ludvigsson J.F., Bai J.C., Biagi F., Card T.R., Ciacci C., Ciclitira P.J., Green P.H.R., Hadjivassiliou M., Holdoway A. et al. 2018. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 63(8): 1210–1228.
- Malamut G., Cellier C. 2012. Maladie cœliaque : définition et rappels physiopathogéniques. *La Lettre de l'Hépto-gastroentérologue* XV(6):240-243.
- Moretti S., Mrakic-Sposta S., Roncoroni L., Vezzoli A., Dellanoce C., Monguzzi E., Branchi F., Ferretti F., Lombardo V., Doneda L. et al. 2018. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*9:157.
- Nigeboer P., Wanrooij RLJ., Tack GJ., Mulder CJJ., Bouma G. 2013. Update on the diagnosis and management of refractory coeliac disease *Gastroenterology Research and Practice* Article ID 518483, 9 pages.
- Piatek-Guziewicz A., Ptak-Belowska A., Przybylska-Felus M., Pasko P., Zagrodzki P., Brzozowski T., Mach T., Zwolinska-Wcislo M. 2017. Intestinal parameters of oxidative imbalance in celiac adults with extraintestinal manifestations. *World J Gastroenterol* 23(44):7849-7862.
- Pinier M. 2011. Une nouvelle stratégie de traitement de la maladie cœliaque basée sur les polymères séquestrants. Thèse de doctorat, université de Montréal, 230 p.
- Pourtalebi-Firoozabadi A., Mohamadian M., Parsamanesh N., Moossavi M., Naseri M. 2016. Novel Insights to Celiac Disease. A review article. *Res Mol Med* 4 (2): 1 -8
- Rashid M., Lee J. 2016. Tests sérologiques dans la maladie cœliaque. Guide pratique à l'usage des cliniciens. *Canadian Family Physician. Le Médecin de famille canadien* 62 : e11-e17.
- Rivabene R., Mancini E., Vincenzi M D.1999. In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance : implications for coeliac disease. , *Biochimica et Biophysica Acta* 1453,152- 160.

- Roujon P., Sarrat A., Contin-Bordes C., Pellegrin I., Guidicelli G., Taupin J.L., Moreau J.F., Blanco P. 2013. Diagnostic sérologique de la maladie cœliaque. *Pathologie Biologie* 61(3):e39-e46.
- Stojiljkovic V., Todorovic A., Radlovic N., Pejic S., Mladenovic M, Kasapovic J., Pajovic S. B. 2007. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. *Ann Clin Biochem* 44: 537–543
- Stojiljković V., Pejić S., Kasapović J., Gavrilović L., Stojiljković S., Nikolić D., Pajović S. B. 2012. Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(1): 175-184.
- Szaflarska-Popławska A., Siomek A., Czerwionka-Szaflarska M., Gackowski D., Różalski R., Guz J., Szpila A., Zarakowska E., Oliński R. 2010. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(8):1960-1965.
- Tagzout D. 2017. Profil de La maladie Cœliaque de l'adulte. Thèse de doctorat d'état, université Mouloud Mammeri -Tizi-Ouzou, 299p.
- Thapa B.R., Walia A. 2007. Liver Function Tests and their Interpretation. *Symposium: Newer Diagnostic Tests. Indian J Pediatr* 74 (7):663-671.
- Tye-Din JA, Galipeau D.A., Agardh D. 2018. Celiac Disease :A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front. Pediatr.* 6:350
- Weber A.L. 2012. La Maladie cœliaque : Physiopathologie et Traitement. Thèse de doctorat d'état, université de Lorraine, 101p.
- Thongprayoon C., Panjawatanan P., Thamcharoen N., Pachariyanon P., Nakkala K., Cheungpasitporn W. 2016. Celiac disease and the risk of kidney diseases: A systematic review and meta-analysis. *Dig Liver Dis* 48 (12):1418-1424.
- Yafi I. 2017. La corrélation entre l'atrophie villositaire; la lymphocytose intra épithéliale et le taux des anticorps dans la maladie coeliaque. Thèse de doctorat d'état, université Cadi Ayyad, Marakach, 98p

Annexes

Annexe 1 : Dosage de l'urée

1.1. Réactifs utilisés

Réactif 1 Tampon		
Réactif 2	EDTA	2 mmol/l
	Salicylate de sodium	60 mmol/l
	Nitroprussiate de sodium	32 mmol/l
	Uréase	30000 U/l
	Phosphate pH 6,7	60 mmol/l
Réactif 3	Etalon urée	0,50 g/l 8,325 mmol/l
Réactif 4	Hypochlorite de sodium	40 mmol/l
10 x []	Hydroxyde de sodium	150 mmol/l

1.2. Préparation et stabilité

Le réactif 4 est à compléter avec 90 ml d'eau distillée : Réf. 20141, Dissoudre le flacon R2 dans le tampon R1 : réactif A.

Les réactifs de travail sont stables :

- 6 mois à 2-8°C, 14 Jours à 20-25°C

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif de travail A	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger, incuber 5 min. à 37° C ou 10 min. à 20-25°C. Ajouter ensuite.			
Réactif 4	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger, incuber 5 min, à 37°C ou 10 min. à 20° - 25°C. Lire contre le blanc. Stabilité de la coloration 2 heures à l'abri de la lumière			

1.3. Calcul de concertation

Urée = (D.O. Echantillon / D.O. Etalon) x n

❖ g/l : n = 0,50

1.4. valeurs usuelles

Sérum, plasma 0,15 - 0,40 g/l

Annexe 2. Dosage de créatinine

2.1. Réactifs utilisés

Réactif 1	Hydroxyde de sodium	1.6 mol/l
Réactif 2	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif 3	créatinine	2 mg/dl
Standard		20 mg/l 176,8 μ mol/l

2.2. Préparation et stabilité

Les réactifs sont prêts à l'emploi, stables à température ambiante jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Réactif de travail: mélanger à parts égales R1 et R2

Stabilité : 1 mois à 20°-25°C

2.3. Mode opératoire

	Standard	Echantillon
Standard	100 μ l	--
Echantillon	--	100 μ l
Réactif de travail	1 ml	1 ml

Mélanger et lire les densités optiques DO1 après 30 sec.
Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après.

2.4. Calcul de concentration

Calculer $\Delta DO = DO2 - DO1$ pour le standard et les échantillons

Créatinine = (ΔDO Echantillon / ΔDO Standard)

n = 20mg/l

Annexe 3. Dosage de la bilirubine Totale et Directe

3. Mode opératoire

Préparation de l'étalon (R4)

Reconstituer le lyophilisat R4 avec exactement 3 ml d'eau distillée. Attendre 15 minutes.

Compléter la dissolution de l'lyophilisat par retournement successifs du flacon. Les concentrations exactes sont indiquées sur chaque flacon.

La stabilité à l'obscurité après reconstitution est de:

2 jours à 20° - 25°C

4 jours à 2 - 8°C

6 semaines à - 20°C

Il est indispensable d'établir un facteur de calibration dans les conditions du laboratoire dès la reconstitution de l'étalon R4

$F = (\text{Conc. Bilirubine Totale ou Directe}) \text{ étalon} / (\text{Abs (étalon)} - \text{Abs (Blanc étalon)})$

❖ Bilirubine totale

- **Solution de travail (BT)**

Mélanger 20 Vol R1 avec 1 vol R3

- **Stabilité à l'obscurité**

6H à 20 -25°C / 2 Jours à 2-8°C

	Etalon		Echantillon	
	Blanc	Dosage	Blanc	Dosage
Etalon R4	50 µl	50 µl		
Echantillon			50 µl	50 µl
Réactif R1	1 ml		1 ml	
Solution de travail (B.T)		1 ml		1 ml

Mélanger et incuber exactement 5 minutes à 37°C lire l'absorbance (**A**) de l'étalon et l'échantillon contre leurs blancs.

3-2. Calcul de concentration (B.T et B.D.)

$[\text{Bil. Tot. ou Dir.}] = (\text{Abs (A) échantillon} / \text{Abs (A) étalon}) \times [\text{Conc. étalon}]$

$[\text{Bil. Tot. ou Dir.}] = \text{Abs (A) échantillon} \times F$

3.4. Valeurs usuelles

❖ Bilirubine totale

0.2-1.0 mg/dl; 2-10 mg/l ; (3.4 - 17µmol/l)

4 .Détermination cinétique de l'activité aspartate aminotransférase (ASAT)

4.1. Réactifs utilisés

Réactif 1	Tampon Tris PH 7.8 à 30°C	80 mmol/l
Solution Tampon	L- aspartate	200 mmol/l
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/l
Substrat	LDH	800 U/l
	MDH	600 U/l
	Oxoglutarate	12 mmol/l

4.2. Préparation et stabilité

Prendre le substrat R2 par 3 ml Réf (20042) ou 10 ml Réf (20043) de Tampon R1. Pour les Réf (20050) et (200492) reconstituer chaque R2 par un flacon R1.

Cette solution de travail est stable

- 7 jours à 2-8°C.

4.3 Mode opératoire

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25, 30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		

4.5. Calcul de concentration

à 340 nm $\Delta DO/\text{min} \times 1750 = U/l$

4.6. Valeurs usuelles

	25°C	30°C	37°C
Femmes	jusqu'à 16 U/l	Jusqu'à 22 U/l	Jusqu'à 31 U/l
Hommes	jusqu'à 19 U/l	Jusqu'à 26 U/l	Jusqu'à 38 U/l

5. Détermination cinétique de l'activité Alanine amino transférase (ALAT)

5.1. Réactifs utilisés

Réactif 1	Tampon Tris PH 7.5 à 30°C	100 mmol/l
Solution Tampon	Alanine	500 mmol/l
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/l
Substrat	LDH	1200 UI/l
	Oxoglutarate	15 mmol/l

5.2. Préparation et stabilité

Prendre le substrat R2 par 10 ml. Réf (20047) de Tampon R1

Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C.

5.3. Mode opératoire

solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25,30 ou 37 °C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		

5.4. Calcul de concentration

à 340 nm $\Delta DO/\text{min} \times 1750 = \text{UI/l}$

5.5. Valeurs usuelles

	25°C	30°C	37°C
Femmes	jusqu'à 16 U/l	Jusqu'à 22 U/l	Jusqu'à 31U/l
Hommes	jusqu'à 22U/l	Jusqu'à 29 U/l	Jusqu'à 40U/l

ملخص:

تهدف دراستنا إلى تقييم بعض العوامل الكيميائية الحيوية ، وتحديد وجود الإجهاد التأكسدي في المصل وإجراء فحص الأنسجة المرضية في المرضى البالغين الذين يعانون من مرض الاضطرابات الهضمية في كلا الجنسين. الدراسة اعتمدت على 52 مريضاً مقسمين إلى مجموعتين حسب كمية مصل الأجسام المضادة tTG ، وكذلك 52 من الشواهد. تم تحليل التحاليل البيوكيميائية والعوامل الحيوية للضغط التأكسدي على أساس الطرق الطيفية ، في حين تم إجراء الفحص المجهرى 16 مريضاً للكشف عن مرحلة التطور . أظهرت نتائجنا اضطراباً ملحوظاً للكيمياء الحيوية لدى مرضى الاضطرابات الهضمية عن طريق زيادة اليوريا (الشواهد: $P \geq 0.001$ ، مجموعة 2: $P \geq 0.05$) ، الكرياتينين (لشواهد: $P \geq 0.05$ ، مجموعة 2: $P \geq 0.01$) ، البيليروبين الكلي (الشواهد والمجموعة 2: $p \geq 0.001$) ASAT (الشواهد والمجموعة 2: $p \geq 0.01$) ALAT (الشواهد: $p \geq 0.01$ ، مجموعة 2: $p \geq 0.05$) بالإضافة إلى ذلك ، تم كشف عن الإجهاد التأكسدي لدى هؤلاء المرضى من خلال ارتفاع GSH (الشواهد والمجموعة 2: $p \geq 0.001$) ، TBARS (الشواهد والمجموعة 2: $p \geq 0.001$) ، بينما لم يظهر كل من GST و GSH Px فرق ملحوظ ، وقد تم تسجيل نسبة الإناث 68.75 % من بين 16 مريضاً ، كما حددت درجة شدة المرض عن طريق تصنيف مارش والمراحل المرتبطة بها.

الكلمات المفتاحية: مرض الاضطرابات الهضمية ، تصنيف مارش ، التشريح المرضي ، الإجهاد التأكسدي ، tTG

Résumé :

Notre étude vise à évaluer quelques paramètres biochimiques, déterminer la présence d'un stress oxydatif au niveau sérique et effectuer un examen histopathologique chez des patients adultes souffrant de la maladie cœliaque chez les deux sexes. Il s'agit de 52 patients répartis selon les teneurs sériques des anticorps anti tTG en deux groupes, ainsi que 52 témoins. Les analyses biochimiques et les biomarqueurs du stress oxydatif ont été dosés en se basant sur des méthodes spectrophotométriques, alors qu'un examen microscopique a été réalisé pour révéler le stade de développement chez 16 patients. Nos résultats ont montré une perturbation remarquable de la biochimie chez les cœliaques par augmentation de l'urée ($p \leq 0.001$: témoins ; $p \leq 0.05$: groupe 2), la créatinine ($p \leq 0.05$: témoins / $p \leq 0.01$: groupe 2) . la bilirubine totale ($p \leq 0.001$: témoins et groupe 2), l' ASAT ($p \leq 0.01$: témoins et groupe 2) et l' ALAT ($p \leq 0.01$: témoins ; $p \leq 0.05$: groupe 2) . De plus, un état de stress oxydatif a été signalé chez ces patients par élévation du GSH ($p \leq 0.001$: témoins et groupe 2), du TBARS ($p \leq 0.001$: témoins et groupe 2), la GST et la GSH Px n'ont présenté aucune différence significative, la prédominance de sexe féminin était de 68,75% parmi les 16 patient, le degré de sévérité de maladie a été indiqué par la classification de Marsh et les stades associés .

Mots- clés : maladie cœliaque, classification de March, histopathologie, stress oxydatif, anti tTG

Abstract

Our study aims to evaluate some biochemical parameters, determine the presence of serum oxidative stress and perform histopathological examination in adult patients suffering from celiac disease in both sexes. This is 52 patients divided according to the contents Serum anti tTG antibodies in two groups, as well as 52 controls. Biochemical analyzes and biomarkers of oxidative stress were measured based on spectrophotometric methods, while microscopic examination was performed to reveal stage of development in 16 patients. Our results showed a remarkable disruption of biochemistry in celiac patients by urea increase ($p \leq 0.001$: controls, $p \leq 0.05$: group 2), creatinine ($p \leq 0.05$: controls / $p \leq 0.01$: group 2). total bilirubin ($p \leq 0.001$: controls and group 2), ASAT ($p \leq 0.01$: controls and group 2) and ALAT ($p \leq 0.01$: controls, $p \leq 0.05$: group 2). In addition, a state of oxidative stress was reported in these patients by elevation of GSH ($p \leq 0.001$: controls and group 2), TBARS ($p \leq 0.001$: controls and group 2), GST and GSH Px showed no significant difference, the female predominance was 68.75% among the 16 patients, the degree of disease severity was indicated by the Marsh classification and associated stages.

Key words: celiac disease, March classification, histopathology, oxidative stress, tTG