

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université SAAD DAHLEB de Blida



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Mémoire de projet de fin cycle en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la nature et de la Vie

Spécialité : Génétique et physiologie

Thème

Association HLA B51 et la maladie de Behçet

Présenté par :

AMAR SETTI Asma

Soutenu publiquement le 16/12/2012 devant le jury composé de :

- Présidente : BEN YAHIA Docteur (USDB)
- Promotrice : Pr CHAIB .S Professeur (HCA)
- Examinatrice : M^{elle} ANANE. A Doctorante (USDB)
- Examinatrice : M^R BESSAAD.A Doctorante (USDB)

Invité d'honneur

Mr BELKHADEM ABD EL AZIZE

Promotion 2011/2012

Remerciements

Je remercie tous ceux qui m'encouragé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail, en particulier.....

Mr Mobamed Saïd R.-chef d'option de génétique de la faculté science biologique de l'université Saad Dableb –de nous avoir offert une formation complète ,tout au long de ces dernières années, tout d'abord en licence de génétique ,puis en master de génétique et physiologie ,qui nous a permis d'acquérir les connaissances nécessaires afin d'entreprendre notre travail de fin de cycle .

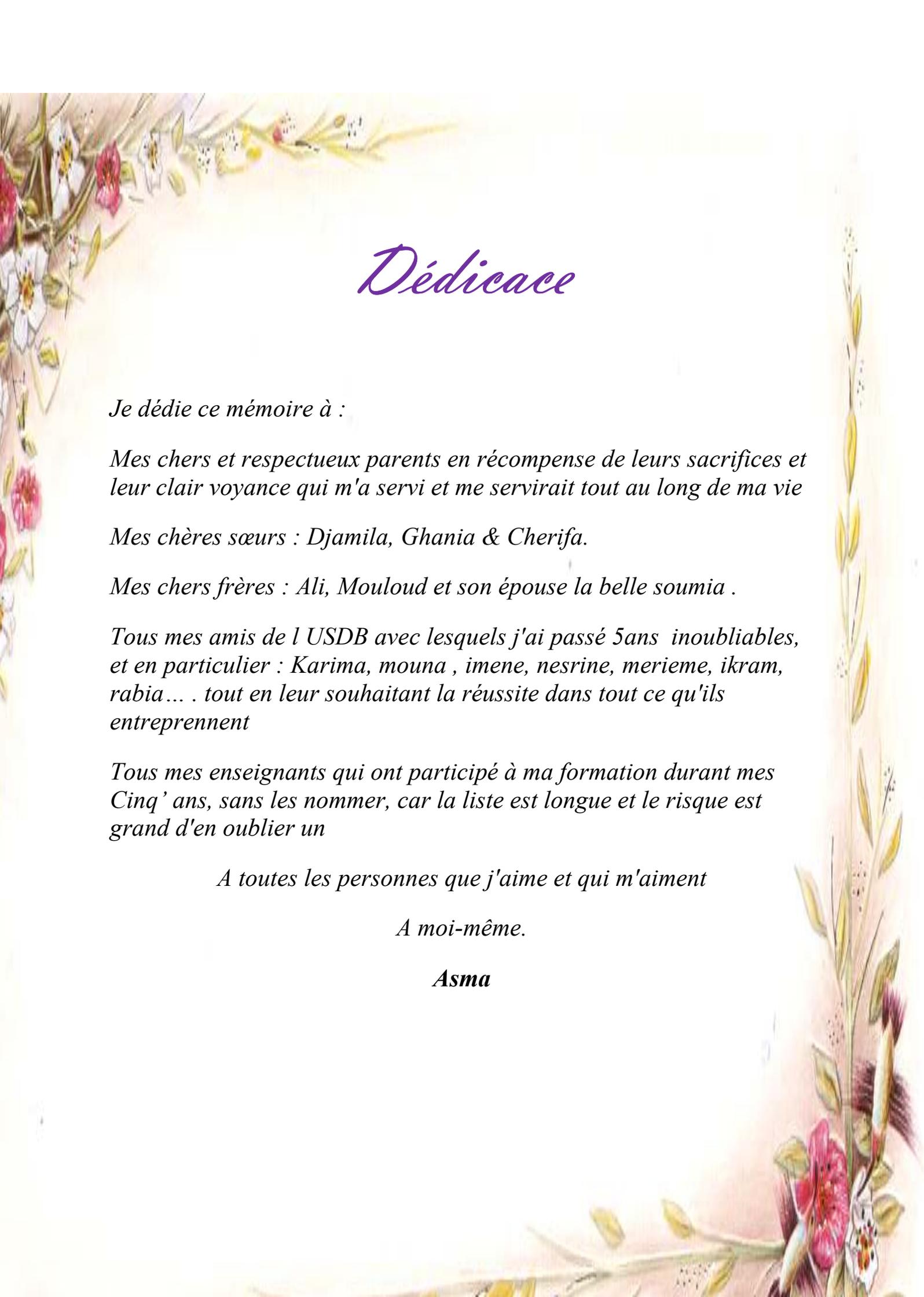
Ma promotrice Pr CHAIB S –chef de service d'immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA) de m'avoir si gentiment accueillie au sein de son service et de m'avoir offert un thème pour mon mémoire de fin de cycle, ainsi pour le partage de ses connaissances, de son savoir et de ses encouragements tout au long de mon stage.

M^{elle} ANANE. A qui m a fait l'honneur de m'orienter durant la préparation de ce mémoire et ma offert les meilleures et des excellents conseils qui m'a permis de mener à bien ce stage de fin d'étude

Dr MOUHOU B S.et Dr SAMARA M. M^{elle} Kawthar qui ont eu la gentillesse et la générosité de partager avec moi leur savoir et ses connaissances tout au long de mon passage au laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée(HCA) et qui a contribué à m'apporté de bonnes base en pratique de biologie moléculaire.

Je remercie également :

Toute l'équipe du laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée pour leur gentillesse et disponibilité, ainsi que tous ceux que je n'ai pas cité mais qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail .



Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers et respectueux parents en récompense de leurs sacrifices et leur clair voyance qui m'a servi et me servirait tout au long de ma vie

Mes chères sœurs : Djamilia, Ghania & Cherifa.

Mes chers frères : Ali, Mouloud et son épouse la belle soumia .

Tous mes amis de l'USDB avec lesquels j'ai passé 5ans inoubliables, et en particulier : Karima, mouna , imene, nesrine, merieme, ikram, rabia... . tout en leur souhaitant la réussite dans tout ce qu'ils entreprennent

Tous mes enseignants qui ont participé à ma formation durant mes Cinq' ans, sans les nommer, car la liste est longue et le risque est grand d'en oublier un

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment

A moi-même.

Asma

Liste du Figures

	Page
Figure 1 : Principales manifestations de la maladie de Behçet	2
Figure 2 : les étapes de test pathergique	6
Figure 3 : Gènes du complexe HLA.	8
Figure 4 : Immunoblot analysis with rabbit antiserum of the 65-kDa HSP and streptococcal and oral mucosal antigens.	11
Figure 5 : Les facteurs affectant l'activation des cellules endothéliales et l'extravasation des leucocytes (vascularite)	15
Figure 6 : Rôle des protéines du choc thermique: mimétisme moléculaire HSP65/60	17
Figure 7 : Rôle de l'antigène S rétinien (Ag-S) dans l'oculo-Behçet	18
Figure 8 : répartition des patients selon le sexe	26
Figure 9 : répartition des patients suspectés selon leurs tranches d'âge	
Figure 10 : répartition des patients suspectés selon leurs tranches d'âges	30
Figure 11 : Répartition du patient suspecté selon leurs signes cliniques	31
Figure12 : Répartition des patients suspectés selon le typage HLA	32
Figure1 3 : Résultats du typage HLA pour les sujets ayant la MB	33
Figure 15 :typage HLAB51 Chez les patients ayant Uvéite	34
Figure 16 :typage HLAB51 Chez les patients ayant Atteinte Articulaires	37

Liste du tableau

	Page
Tableau 1 : critères de classification de MB proposés par international study group for behcet disease	6
Tableau 2 : nouveaux critères de classification de la MB	7
Tableau3 :Fréquence de l'antigène HLA-B51 dans différentes populations.	9
Tableau 4 : les syndromes auto inflammatoires initialement classés	14
Tableau5 : Classification maladie inflammatoire	15
Tableau6 résume quelques signes cliniques communs	16
Tableau 7 : programme d'amplification ssp INNOTRAIN-Ready	21
Tableau 8 : répartition des patients selon le sexe	25
Tableau9 : Répartition du patient selon leurs signes cliniques	27
Tableau 10 : Répartition des patients selon le typage HLA B	29
Tableau11 :Répartition du résultat de typage HLA B selon le sexe	30
Tableau12 : typage HLAB51 selon les signes clinique	31

Glossaire

Aphthose : affection chronique caractérisé par les poussées d'aphtes (petites ulcérations superficielles, douloureuses) buccales ou génitales.

Anévrisme : est une dilatation localisée de la paroi d'une artère aboutissant à la formation d'une poche de taille variable, communiquant avec l'artère au moyen d'une zone rétrécie que l'on nomme le *collet*. Sa forme habituelle est celle d'un sac, son diamètre pouvant atteindre plusieurs centimètres.

Etiopathologie : c'est l'étude des mécanismes responsables du déclenchement et du développement d'une maladie.

Erythème noueux : inflammation aiguë de l'hypoderme.

Folliculite : est une inflammation « bénigne » du follicule pileux .La forme plus courante est infectieuse mais il existe des formes non infectieuses.

Herpes : maladie infectieuse virale, contagieuse, se traduisant par une éruption local, soit buccal soit génitale.

HSP : protéines chaperonnes servant de transporteurs, inhibant ainsi l'effet biologique de l'élément transporté, ces protéines sont transportées lors d'un stress ou d'une augmentation de la température.

Hypopion : désigne le pus qui s'amasse dans la partie inférieure de la chambre antérieure de l'œil (partie avant du globe oculaire).

Inflammation : séries de réactions qui attirent cellules et molécules du système immunitaire au site de l'infection ou de la lésion .L'apport sanguin, la perméabilité vasculaire et la migration leucocytaire à travers l'endothélium y sont augmentés.

Poussés : réapparition de la maladie.

Réactivité croisée : on parle de réaction croisée lorsqu'un même anticorps est capable de se combiner à des antigènes différents mais dont les déterminants antigéniques sont très proches.

Récidiver : réapparition après une guérison.

Synéchie du cristallin : Adhérence de l'iris à la face postérieure de la cornée ou à la capsule du cristallin.

Thrombophlébite : est une inflammation d'une veine accompagnée de la présence d'un caillot sanguin au siège de l'inflammation.

Thrombose veineuse : désigne la formation d'un caillot de sang au sein d'une veine. Entravant la circulation sanguine.

Ulcération : lésion superficielle entraînée par une perte de substance.

Uvéite antérieure : inflammation localisée en avant du plan du cristallin.

Uvéite postérieure : toute inflammation se localisent en arrière de base du vitré (vitré, rétine et choroïde).

Vascularite : inflammation de la paroi des vaisseaux sanguins.

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction

Chapitre I : Généralité

MALADIE DE BEHCET

1)-Epidémiologie

2)- Manifestations cliniques

2-1) Manifestation cutanéomuqueuse

2-1-1) Signes cutanés

2-1-2) Aphtes buccaux et génitaux

2-2) Manifestations oculaires

2-3) Manifestation neurologique

2-4) Atteinte articulaire

2-5) Atteinte digestive

2-6) Atteinte vasculaire

2-7) Autres manifestations

2-7-1) Atteinte rénale

2-7-2) Atteinte cardiaque

3) Evolution

4) Exploration de MB

4-1) Examens complémentaires

4-2) Teste pathergique

4-3) Diagnostic différentiel

5) Ethiopathogenie

5-1) Facteur génétique

SOMMAIRE

- Molécule HLA
- Analyses de gènes proche HLAB

5-2) Facteurs environnementaux

6) Anomalie immunitaire

6-1) Définition initiale de l'auto-inflammation

6-2) La MB est-elle une maladie auto-immune ?

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-Matériel

- 1- Matériels biologique
- 2- Matériels non biologiques
- 3- prélèvements

II-Méthodes

1. extraction d'ADN
 - a) principe
 - b) protocole expérimental
2. technique de typage par réaction de PCR SSP
 - a) principe
 - b) mode opératoire

3-preamplification

4-amplification

5-révélation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Répartition des patients selon le sexe
2. Répartition des patients selon les tranches d'âges
3. Répartition des patients selon les signes cliniques
4. Répartition des patients selon le typage HLAB
5. Répartition des patients selon le typage HLA B51 et signes cliniques
6. Répartition des résultats en fonction du sexe

Conclusion

Bibliographie

Résumé :

La maladie de Behcet (MB) est une maladie inflammatoire chronique multifactorielle

Le facteur génétique inducteur principal de MB est le système HLA.

Nous avons étudié le polymorphisme génétique des molécules HLA de class I dans une population de 25 patients d'origine algérienne atteints de la maladie de Behcet ; pour cela nous avons utilisés une technique de typage PCR SSP (polymérase chain réaction spécifique séquence primers) précédée par l'extraction d'ADN génomique du patients , afin de déterminées les fréquence des gènes HLA B51 .

Les résultats obtenus ont été comparés à des études algériennes, tunisienne, européenne, et confirme l'implication du HLAB51 dans la maladie de Behcet .

ملخص

مرض بهجت هو مرض التهابي مزمن. له عدة أسباب السبب الرئيسي هو العامل الوراثي بالضبط الجين المسمى HLAB .

درسنا من خلال هذه المذكرة مختلف أشكاله الجينية على شريحة من المرضى (25 مريض جزائري) يعانون من هذا المرض باستعمال تقنية استخراج الحمض النووي الجيني لهؤلاء المرضى و التأكد من وجود أو غياب هذا الجين المسؤول عن المرض (HLAB 51) .

و تمت مقارنة هذه النتائج مع دراسات أخرى أوروبية و مغربية و تونسية.

Summary:

Behcet's disease (BD) is a chronic inflammatory disease of multifactorial the main field of genetic factor is système HLA MB.

We studied the genetic polymorphism of HLA class I in a population of 25 patients of Algerian origin with Behcet's disease, and for this we used a technique of PCR SSP typing (polymerase chain reaction sequence specific primers) preceded by extracting genomic DNA from patients, to the determined frequency of HLA B51.

The results were compared to studies Algerian, Tunisian, European, and confirm the involvement of HLAB51 in Behcet's disease.

Abréviation

CD8+ : classe de différenciation 8.

CD4+ : classe de différenciation 4.

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

CRP : c-réactive protéine.

°C : degré Celsius.

g/l : gramme par litre.

HLA : Human leucocyte antigène.

HSP: Heat shock protein.

IFN: interferon.

IL: interleukine.

KDa: kilo Dalton.

MB: maladie de Behcet.

MICA: MCH class 1 Chain related gene.

Min: minute.

Mg: milligram.

ml :milliliter.

NO: monoxide d'azote.

pH: potential d'hydrogène.

µl: microlitre.

TNF: tumor necrosis factor.

Introduction:

La maladie de Behçet, est une vascularite multisystémique caractérisée par des désordres immunitaires et inflammatoires.

Cette pathologie est caractérisée par la diversité des manifestations cliniques, dont les plus fréquentes sont l'uvéïte et l'aphtose bipolaire.

Son étiologie reste inconnue car il n'y a pas de signes qui lui sont spécifiques.

Plusieurs éléments interviennent dans l'apparition de la maladie de Behçet (MB), en outre la susceptibilité génétique. [3 ; 4;5]

Plusieurs travaux ont démontré la présence d'une association génétique entre la maladie de Behçet et ,le gène HLA-B51, le gène MICA major histocompatibility complex class I chain related gene) et le gène du TNF α ,des facteurs environnementaux (infections virales et/ou bactériennes), des anomalies de la réponse inflammatoire (protéines du choc thermique, dysrégulation de la production de NO) et des anomalies de l'immunité : les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ produisant des cytokines pro-inflammatoires (l'IL2, l'IFN α , l'IL6, l'IL8, l'IL12 et le TNF α).[23]

Cette maladie est une maladie endémique qui touche avec prédilection les populations de l'Asie centrale et de l'Est, et du pourtour méditerranéen selon une distribution géographique rappelant les itinéraires de «la route de la soie» [2].

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'implication de certains facteurs génétiques dans la pathologie.

En effet, notre travail a porté sur la recherche des allèles HLA classe I, par la technique PCR SSP chez des patients atteints de MB. Ce travail a été réalisé au sein du service d'immunologie de l'HCA.

Chapitre I

Généralités

I -maladie de Behçet

Au 20ème siècle Hulusi Behçet, dermatologue turc, décrit en 1937 la classique triade comportant uvéite, aphtose buccale et génitale et il lui donna son nom.

Le nom d'adamantiades a été également proposé en référence au médecin grec admantiade qui a rapporté un cas, dont l'étiologie était attribuée à une infection streptococcique.

La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire chronique multisystémique caractérisée cliniquement par une aphtose buccale ou le plus souvent buccogénitale associée à des manifestations systémiques dont les plus fréquentes sont cutanées, oculaires et articulaires et les plus graves sont neurologiques, cardiovasculaires et intestinales [3 ; 4; 5].

Le substratum anatomique est une vascularite à tropisme veineux. Histologiquement, la maladie est caractérisée par un infiltrat périvasculaire de polynucléaires neutrophiles ou de lymphocytes ; selon l'âge de l'atteinte vasculaire [1].

Il s'agit d'une vascularite qui touche aussi bien les veines que les artères mais elle ne fait pas partie de la classification des vascularites de Chapel Hill qui rapporte uniquement les vascularites systémiques primitives touchant les artères [7].

1-épidémiologie:

La distribution géographique de la maladie de Behçet est particulière, elle s'étend du bassin méditerranéen, jusqu'à l'extrême orient, le long de la Route de la Soie.

La Turquie est le pays le plus touché au monde .en effet, la prévalence est de 110 à 420 cas/100000. [1]

En Iran et en Arabie Saoudite, la prévalence de la MB est respectivement de 16 et 20/100.000 [1]. Au Japon, elle semble se situer entre 7 et 30/100.000 [1, 7]. En Europe, il existe schématiquement un gradient Nord-Sud avec une prévalence allant de 0,64/100.000 aux Royaume-Uni à 7/100.000 en Espagne [1]. Dans les pays d'Afrique du Nord, la prévalence de la MB est mal connue[1, 7].

Sur la base des données épidémiologiques, il est probable que des facteurs environnementaux interviennent dans la MB. Des groupes ethniques prédisposés mais vivants dans d'autres pays que leur pays d'origine ont une fréquence moindre de la MB. Ceci a été constaté chez les turcs vivant en Allemagne par rapport à ceux vivant en Turquie et pour les japonais vivants à Hawaï par rapport à ceux vivant au Japon [3].

Généralités

La maladie de Behçet touche essentiellement l'adulte jeune avec un pic d'incidence entre 20 et 30 ans, cependant elle est exceptionnelle après 50ans. [36]

Etant rare pendant l'enfance, Des formes néonatales transitoires ont été décrites chez des nouveau-nés de mères atteintes. Ces formes néonatales régressent dans les 6 semaines avec absence de récurrence ultérieure. [2]

Contrairement à ce qui est observé en Asie, cette affection frappe le plus souvent les hommes au bassin méditerranéen. [2 ; 8 ; 9].

2-Manifestation cliniques :

Les manifestations de la maladie de Behçet sont très variées dont les plus fréquentes sont Les aphtes et l'uvéïte (**figure 1**).

Les signes généraux comme la fièvre et l'amaigrissement peuvent exister chez certains malades. En revanche, une asthénie importante est très souvent présente. [8]

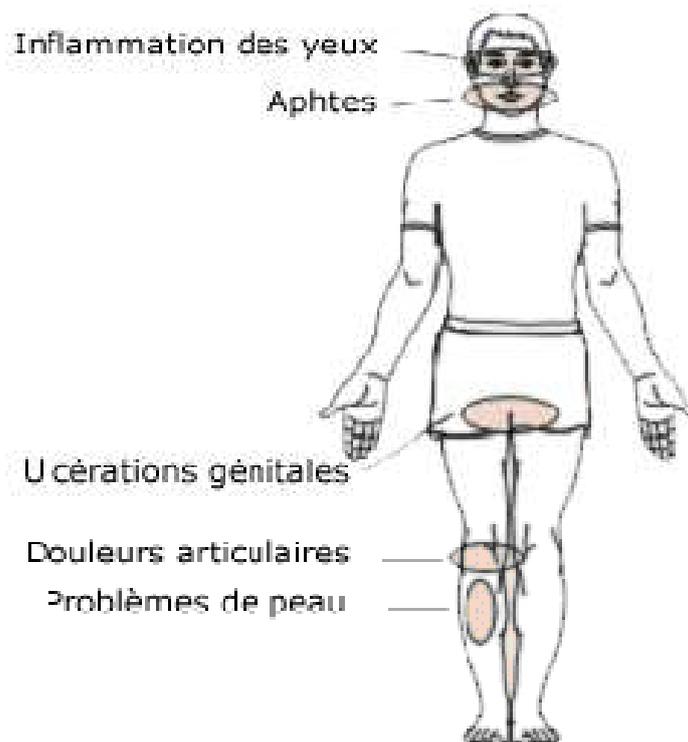


Figure 1 : Principales manifestations de la maladie de Behçet[7]

a) Manifestation cutanéomuqueuses :

Généralités

Les manifestations cutanéomuqueuses sont importantes à rechercher car elles permettent un diagnostic de quasi certitude. En comparaison avec les autres symptômes, ces manifestations sont plus précoces. [14]

b) Manifestations cutanées :

Les signes cutanés les plus caractéristiques de la maladie de Behçet sont :

- folliculite cutanée : une forme d'acné au niveau du tronc, des membres et des fesses, c'est une inflammation du follicule pileux.
- érythème noueux : une sous forme d'éruption caractérisée par des nodosités érythémateuses dermo-épidermique au niveau de jambes, des pieds et rarement au avant bras
- hyperréactivité cutanée après traumatisme « phénomène de pathergie »: il s'agit d'une hypersensibilité au point de pique avec formation de petites vésicules de pustules et hématome [15]

c) Aphtes buccaux et génitaux

Les aphtes sont la principale manifestation de la maladie de Behçet et concernent la quasi totalité des malades (98 %). Ce sont de petites plaies (ulcérations), uniques ou multiples, qui siègent au niveau de la bouche mais peuvent atteindre également les organes génitaux, d'où le nom d'aphtose bipolaire.

L'aphtose bipolaire peut persister en moyenne une dizaine de jours avec possibilité de survenir en poussées régulières. [15]

Les aphtes peuvent toucher (la langue, les lèvres, le palais ou l'intérieur des joues). Ils peuvent apparaître bien avant les autres symptômes de la maladie. Ils sont douloureux et peuvent rendre l'alimentation et l'élocution difficile.

En effet, chez l'homme, les aphtes peuvent toucher la verge et surtout les bourses (scrotum). Chez la femme, ils atteignent les petites et les grandes lèvres, le vagin, le col de l'utérus. [15]

d) Manifestations oculaires :

L'atteinte oculaire est la 1^{ère} manifestation de la maladie de Behçet chez environ 10% des patients, mais elle apparaît en général après les ulcérations buccales. Les patients ayant

Généralités

des lésions oculaires ont des symptômes variables, incluant une vision trouble, des douleurs oculaires, une photophobie, une larmimation exagérée, une rougeur oculaire. [16]

Cependant, le problème oculaire le plus sérieux chez des patients avec une maladie de Behçet est l'atteinte du segment postérieur (rétine). Celle-ci se manifeste en général par une diminution de l'acuité visuelle, sans douleurs oculaires associées.

L'uvéite antérieure à hypopion peut être fugace et cliniquement quiescente.

Des attaques répétées peuvent mener à des altérations structurelles telles que déformation de l'iris, synéchies du cristallin et hypertension oculaire par trouble de l'écoulement de l'humeur aqueuse.

e) Manifestations neurologiques :

Les manifestations neurologique peuvent apparaitre dans 5 à 30% des cas, et peuvent survenir de 1 à 10 ans après les premiers symptômes de la maladie.

Les signes neurologiques se manifestent par une épilepsie, des paralysies et d'une faiblesse articulaire. [11]

Une méningite est assez fréquente, elle peut se manifester par une fièvre, une raideur du cou et des maux de tête persistants.

Une encéphalite et une myélite peuvent survenir et s'aggraver entraînant des séquelles définitives.

Dans de très rares cas, le neuro-Behçet évolue progressivement vers une démence, s'accompagnant de troubles du langage, de l'attention, de la concentration, de la perception, de la mémoire. [10,12]

f) Atteinte articulaire

L'atteinte articulaire est fréquente puisqu'elle survient dans la plupart des séries dans plus 50% des cas. Il s'agit d'arthralgies et/ou d'une arthrite qui peut se manifester sous diverses formes: mono arthrite, oligoarthritis ou polyarthrite touchant surtout les grosses articulations (genoux, poignets, chevilles, coudes). L'atteinte articulaire est souvent récidivante et asymétrique. [12]

g) Atteinte digestive

Les signes digestifs sont similaires avec ceux des maladies inflammatoires de l'intestin, plus particulièrement la maladie de Crohn. [3]

h) Atteinte vasculaire

Généralités

L'atteinte vasculaire de la maladie de Behçet peut se manifester par des thromboses veineuses profondes (TVP), des thrombophlébites superficielles, des anévrismes artériels et des thromboses artérielles. [20]

i) autres manifestations :

- **Atteinte rénale :** Elle est exceptionnelle.
- **Atteinte cardiaque :** L'atteinte cardiaque est rare dans la maladie de Behçet. Elle peut se caractériser par une péricardite, une myocardite. [23]
- **Atteinte testiculaire et épiddymaire**

3) physiopathologie :

Les poussées sont d'intensités variables, elles semblent plus grave chez l'homme que chez la femme. A un âge tardif, la MB a cependant tendance à diminuer d'intensité.

Ainsi les manifestations cliniques peuvent s'aggraver et entraînant des handicaps résultent le plus souvent de l'atteinte neurologique et oculaire

Dans moins de 5% des cas la maladie est mortelle suite à un accident vasculaire ou une hémorragie par rupture d'anévrisme (rupture d'une artère) [17].

4) diagnostic immunologique :

Le diagnostic de cette affection repose sur un diagnostic clinique. Actuellement, les auteurs se réfèrent aux critères internationaux publiés en 1990 (tableau 1). Ces critères requièrent comme critère majeur la présence d'une aphtose buccale (au moins 3 par an), associé à au moins 2 critères mineurs parmi les quels des ulcérations génitales récurrentes, les lésions oculaires, des lésions cutanées et le test pathergique positif.

**Tableau I: Critères de classification de la maladie de Behçet, proposés par
« l'International Study Group for Behçet's Disease » [36]**

*** Un critère obligatoire :**

Aphthose buccale récidivante :

Ulcération aphtoïde mineure, majeure, ou herpétiforme, constatée par un clinicien ou par le patient, ayant récidivé au moins 3 fois dans une période de 12 mois.

*** Et 2 critères parmi les suivants :**

Ulcération génitale récurrente :

Ulcération aphtoïde ou cicatrice, constatée par un clinicien ou par le patient.

Atteinte oculaire:

Généralités

Uvéite antérieure, uvéite postérieure, ou cellules dans le vitré lors de l'examen à la lampe à fente ; ou vascularite rétinienne observée par un ophtalmologiste.

Lésions cutanées :

Erythème noueux constaté par un clinicien ou par le patient, pseudo-folliculite, ou lésions papulopustuleuses ou nodules acnéiformes constatées par un clinicien chez un patient ayant passé la période de l'adolescence et en dehors de tout traitement corticoïde.

Test pathergique positif :

Constataion d'une pustule aseptique par un clinicien dans les 48 heures après une piqûre sous-cutanée avec une aiguille stérile.

* Critères applicables uniquement en l'absence d'autres explications cliniques.

Récemment, ces critères de classification ont été révisés (tableau II).

Aphthose orale	1 point (critère obligatoire)
Aphthose génitale	2 points
Lésions cutanées	1 point
Atteinte oculaire	2 points
Test pathergique positif	1 point
Diagnostic établi si >3 critères positifs	

4-1) Examens complémentaires

Il n'y a aucun test de laboratoire spécifique de la maladie de Behçet. Les examens de laboratoire ne sont pas spécifiques. La formule sanguine montre fréquemment une anémie inflammatoire modérée et une neutrophilie chez environ 15% des patients. Les marqueurs non-spécifiques de l'inflammation (VS, CRP) sont souvent augmentés dans la phase aiguë de la maladie. Les auto-anticorps, tels que les anticorps anti-nucléaires, le facteur rhumatoïde et les ANCA (auto-anticorps anti-neutrophile cytoplasmique) sont en général négatifs.

4-2) Test pathergique

La valeur diagnostique du test pathergique est très variable en fonction de l'origine ethnique. En effet, il est positif chez 60% des patients issus du Moyen-Orient, et chez 5% des patients caucasiens. Son aide diagnostique chez les patients d'origine occidentale est donc quasi nulle. [8]

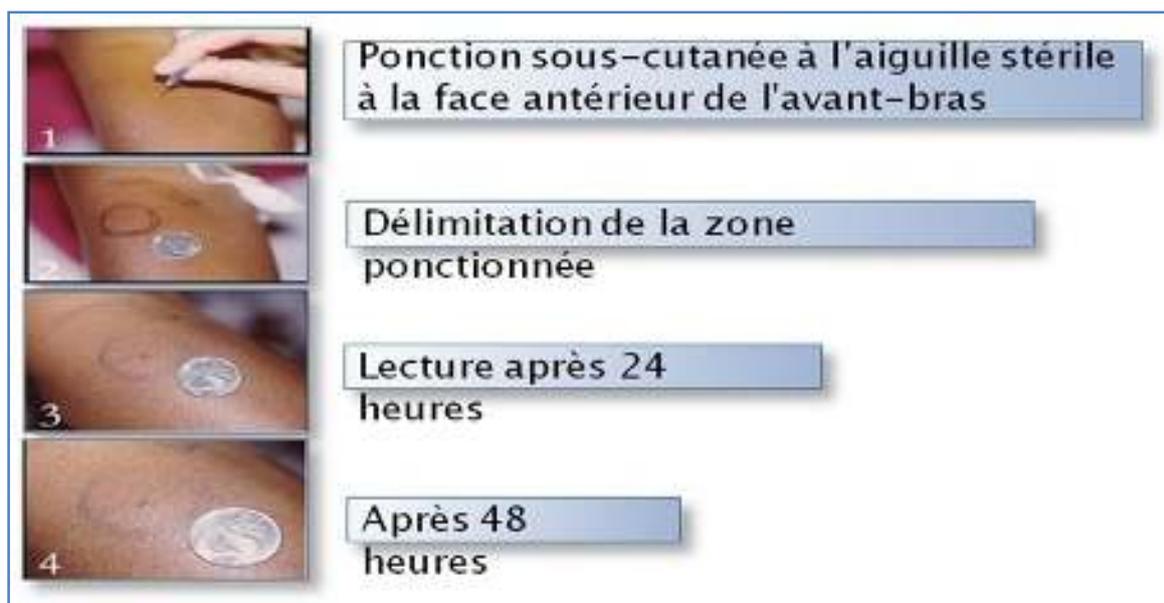


Figure 2 : les étapes de test pathergique

4-3) Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel varie en fonction de la présentation clinique. L'aphtose buccale, ouvre le diagnostic différentiel avec l'aphtose buccale bénigne récidivante, les lésions buccales induites par le virus herpès, les maladies inflammatoires de l'intestin (en particulier la maladie de Crohn), la maladie cœliaque, les ulcérations buccales telles que l'on peut les rencontrer dans le lupus érythémateux systémique. [1]

Beaucoup d'autres affections peuvent être associées à des manifestations cliniques telles qu'on peut les rencontrer dans la maladie de Behçet. Parmi ces affections on peut citer: la sarcoïdose, qui peut se manifester par un érythème noueux, une uvéite et des arthralgies; cette affection ne comporte toutefois pas la présence d'ulcères génitaux; le syndrome de Reiter peut être associé à des ulcérations orales et génitales, mais l'arthrite est en général érosive; La maladie de Crohn et la RCUH: des caractéristiques cliniques très similaires peuvent être communes entre la maladie de Behçet; La présence d'une fièvre périodique peut faire évoquer d'autres pathologies comme la fièvre méditerranéenne familiale, le TRAPS (tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome) et, chez l'enfant, le syndrome d'hyper-IgD ou le PFAPA (periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis); La présence d'une atteinte neurologique prédominante peut faire évoquer une sclérose en plaques. [7]

5) facteur génétique :

Généralités

L'étiologie de la MB reste inconnue et les mécanismes physiopathologiques ne sont pas clairement élucidés. C'est une pathologie multifactorielle qui résulte vraisemblablement de l'intervention de facteurs environnementaux (infectieux : herpès virus, streptocoque ; toxiques ; ...) chez les sujets génétiquement prédisposés comme en témoigne la fréquence de l'Ag HLA B51, l'existence de formes familiales et l'hypersensibilité au traumatisme [1 ; 19].

Molécule HLA

La caractéristique essentielle des molécules HLA est leur extrême polymorphisme qui leur permet de présenter une multitude de peptides différents aux lymphocytes T. Ce polymorphisme allélique porte sur des acides aminés qui sont essentiellement localisés au niveau du site de fixation peptidique. Ce polymorphisme conditionne donc la spécificité et l'affinité de la liaison de tel ou tel peptide par les molécules HLA d'un individu (Un individu HLAB35 ne va pas fixer et présenter un peptide donné aux lymphocytes T de la même façon qu'un individu HLAB51).

Gènes du complexe HLA

Situé sur le bras court du chromosome 6 Codent pour des protéines de membrane

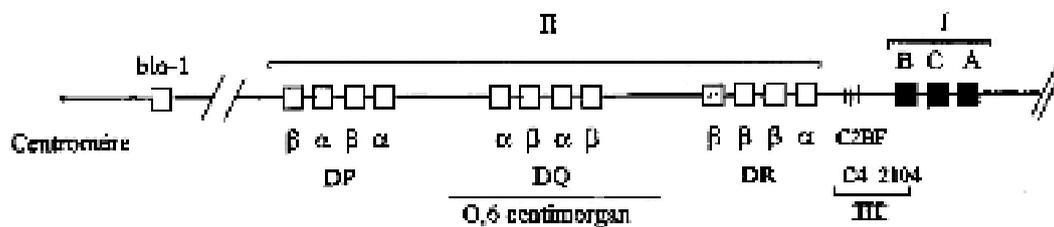


Figure 3 : Gènes du complexe HLA. [4]

Cet ensemble de caractéristiques fait des gènes HLA d'excellents candidats dans la prédisposition à de nombreuses maladies auto-immunes ou inflammatoires, telles que la maladie de Behçet. [35]

Généralités

L'association de la maladie de Behçet avec l'antigène HLA-B51 (une sous-division de l'antigène HLA-B5) a été initialement décrite par Ohno en 1982 dans la population japonaise : 57 % des patients expriment l'antigène HLA-B51 qui n'est présent que dans 16 % de la population contrôle saine ($p < 0,001$). Depuis, cette association a été confirmée dans de nombreuses autres populations d'origine géographique et ethnique différente (tableau III) :

Tableau III: Fréquence de l'antigène HLA-B51 dans différentes populations [36].

Population	Maladie Behçet	Groupe contrôle	Odds ratio/risqué relatif
Japon	57 %	16 %	6,95
Grèce	80 %	26 %	10,4
Italie	82 %	22 %	16
Arabie Saoudite	72 %	26 %	7,3
Mexique	70 %	31 %	5,2

Les techniques de séquençage ont permis depuis quelques années de mesurer l'étendue du polymorphisme des gènes HLA. On sait maintenant que la spécificité HLA-B51 regroupe plusieurs variant alléliques B51 différents, ou sous-types, appelés selon la nomenclature internationale HLA-B*5101 à B*5152. La distribution des sous-types B51 chez les malades est exactement la même que chez les sujets-contrôles, même si l'allèle B*5101 est dans tous les cas le plus fréquent.

Ainsi, si B51 est bien directement impliqué dans la prédisposition à la maladie de Behçet, c'est par l'intermédiaire d'acides aminés communs à tous les sous-types. [36]

En revanche, l'antigène HLA-B52, seconde sous-division de l'antigène B5, n'est pas associé à la maladie de Behçet [36].

La susceptibilité génétique à la maladie de Behçet ne peut être expliquée par la seule présence de l'allèle HLA B51.

HLA-B51 ne serait-il qu'un marqueur en déséquilibre de liaison avec un autre gène proche sur le génome, qui serait lui-même le gène responsable?

Généralités

Le gène HLA-B est localisé dans la partie centromérique de la région HLA de classe I. Si l'allèle HLA-B51 n'est qu'un marqueur de la maladie de Behçet en déséquilibre de liaison avec un gène causal proche, alors une association plus forte de la maladie de Behçet doit être retrouvée avec ce gène causal.

- Analyse de gènes proches de HLA-B

Le gène HLA-C est localisé à 80 kb en position télomérique du gène HLA-B. Mizuki et al. ont trouvé une fréquence augmentée de l'allèle HLA-C14 dans la maladie de Behçet (48,9 % chez les patients par rapport à 24 % chez les contrôles). Cependant, C14 est en déséquilibre de liaison avec B51, et l'association est plus forte avec B51, ce qui permet de conclure que le gène HLA-C n'est pas directement impliqué dans la maladie de Behçet. Par ailleurs, il n'existe pas d'autre gène entre les gènes HLA-B et HLA-C. [35,36]

Le gène TNFB, localisé dans la région HLA de classe III, 260 kb centromérique de HLA-B, présente un dimorphisme analysé par digestion avec l'enzyme de restriction NcoI. Ce dimorphisme est faiblement associé à la maladie de Behçet

Les gènes MIC (major histocompatibility complex class I chain Related gene) constituent une famille de gènes localisés dans la région HLA de classe I, centromériques au gène HLA-B, et codent pour une série de molécules (MICA, MICB...MICG.). Seuls les gènes MICA et MICB, localisés à 46 et 141 kb respectivement de HLA-B, sont fonctionnels et codent pour un polypeptide de 383 acides aminés dont la structure générale est similaire à celle d'une chaîne lourde alpha de classe I. La protéine MICA, comme la protéine MICB, est formée de 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique. [36]

Contrairement aux molécules de classe I classiques, la protéine MICA ou MICB n'est pas associée à la $\beta 2$ microglobuline à la surface cellulaire, mais présente a priori une structure tridimensionnelle similaire à celle des molécules de classe I. Il n'existe qu'environ 30% d'homologie de séquence entre les molécules HLA de classe I classiques et les molécules MIC au niveau des domaines extracellulaires qui constituent le site de fixation peptidique sur les molécules de classe I, ce qui fait penser que les molécules MIC ne fixent pas de ligands peptidiques conventionnels. À la différence des molécules HLA classiques, l'expression des molécules MIC n'est pas induite par l'interféron, mais par le stress cellulaire. Ce phénomène est lié à la présence dans la région promotrice des gènes MIC d'éléments régulés par le choc

Généralités

thermique (heatshock responsive éléments) similaires à ceux présents dans le promoteur du gène HSP70.

Les molécules MIC sont exprimées dans des conditions physiologiques normales en surface de cellules épithéliales (préférentiellement par l'épithélium intestinal) et de fibroblastes. Cependant suite à un stress cellulaire, ces molécules sont induites à la surface de nombreux types cellulaires.

L'allèle MICA-A6 (polymorphisme microsatellite 6 répétitions GCT/AGC) est significativement associé avec la maladie de Behçet (74% des patients contre 47% des sujets contrôles $P = 0.00055$). Cette association est supérieure à celle avec HLA-B51 (57 % des patients japonais). [36]

Le gène MICB quant à lui, n'est pas associé à la maladie de Behçet.

Vu le caractère athréophilique de la MB, plusieurs recherches ont démontrées son association à certains polymorphismes génétiques prédisposant aux thromboses intra vasculaires tels :

- le gène ICAM: Allèles E469, R241 ;
- L'allèle Asp298 du gène eNOS de la NO synthétase endothéliale ;
- Facteur V de Leiden ;
- Et le VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

5 -2) FACTEUR (INFECTIEUX) ENVIRONNEMENTAUX:

Le facteur infectieux est le plus incriminé dans la pathogenèse de la MB en raison de la fréquence des atteintes buccales (aphtes) qui se confond facilement avec celles causées par les agents microbiens (aphtoses herpétiforme, streptococciques...etc.)

- Infections virales:

Behçet en 1937 dans son premier rapport sur la MB proposa l'herpès simplex virus type 1 comme un agent causal de la maladie [35]. Ensuite plusieurs chercheurs ont essayé de confirmer cette hypothèse par la présence des anticorps anti-herpès virus chez les malades Behçet; et par la mise en évidence de l'ADN des virus par amplification génomique dans les lésions muqueuses des patients; mais la rareté de la MB parmi les populations noires et dans les régions subtropicales où sévit le virus herpes d'une façon endémique, ainsi que l'association de la MB avec d'autres virus: HCV, Parvovirus ...etc, ont conduit les chercheurs à délaisser cette voie. [36]

- Infections bactérienne (streptococciques):

Généralités

L'implication des infections à streptocoque était suspectée devant ;

- La présence constante des aphtes buccaux dans plus de 98% des cas.
- La corrélation entre l'incidence et l'activité de la maladie et l'hygiène buccale déficiente.

Ce qui a amené les chercheurs à analyser la flore buccale et de découvrir la présence d'espèces streptococciques atypiques (*S. sanguis*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*...) [36]

Encore là d'autres bactéries ont été rapportées : E. Coli, salmonelles Brucelles...etc.

Devant la multiplicité des microorganismes associés à la MB, les scientifiques ont conclu que le facteur infectieux ne pourrait pas agir par un seul antigène spécifique à un microorganisme particulier mais par l'intermédiaire d'un déterminant antigénique commun: protéines du choc thermique (HSP)

Et c'est LEHNER et al [36] qui ont mis en évidence l'existence d'une réactivité croisée entre des extraits de *S. Sanguis*, homogénat de muqueuse buccale et l'HSP65. (figure4)

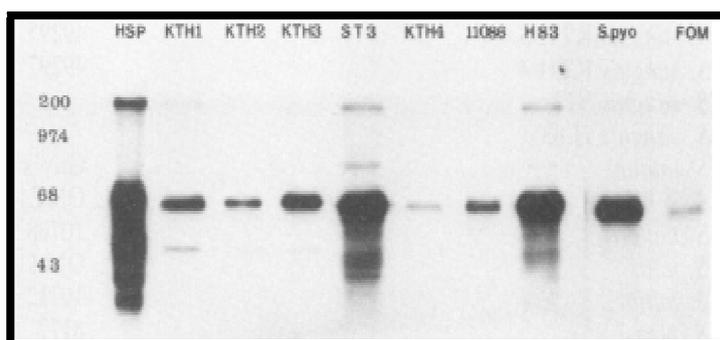


Figure 4: L'analyse par immunoblot avec antisérum de lapin de la HSP de 65 kDa et des streptocoques et orale antigènes muqueux. [36]

6) DYSFONCTIONNEMENT IMMUNITAIRE:

La MB se caractérise par son polymorphisme clinique, qui est traduit par deux concepts, le premier est auto inflammatoire et l'autre auto-immun [36]

6-1) Définition initiale d'auto-inflammation :

C'est un concept récent introduit pour la première fois par Michael F. Mc Dermott en 1999. Il a été défini au début comme le groupe des maladies génétiques caractérisées par des signes inflammatoires récurrents dont le prototype est la F M F.

Dans ce groupe de maladies le gène responsable code pour une protéine impliquée dans l'immunité innée:

Généralités

Tableau V : les syndromes auto inflammatoires initialement classés

La maladie	FMF	MAPS	TRAPS	CAPS
Mode de transmission	AR	AR	AD	AD
Anomalie située au niveau:				
- Chromosome:	16p13,3	12q24	12P13	1q44
- Gène:	MEFV	MVK	TNFRSA1	CIAS
- Protéine:	Marenosterin/pyrine	Mevalonate kinase	Récepteur du TNF de type I	Cryopyrine

FMF : Fièvre Méditerranéenne Familiale. MAPS : Mevalonate-Kinase Associated Periodic Syndrome. TRAPS: Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome. CAPS: Cold-Induced Associated Periodic Syndrome. [8 ,11,35]

Cette définition s'est élargie actuellement à d'autre syndromes et maladies non monogéniques, mais qu'une ou plusieurs caractéristiques rapprochent du groupe des maladies auto-inflammatoires de type mendélien à savoir :

- la démonstration du rôle joué par la l'IL-1.
- la sensibilité de la maladie à l'inhibition de l'IL-1.
- l'existence d'un gène de susceptibilité également impliqué dans une des formes mendéliennes.
- la ressemblance des signes cliniques avec ceux des maladies auto-inflammatoires monogéniques. [36]

Nouvelle classification des maladies inflammatoires :

Tableau 5 : Classification maladie inflammatoire

Classification	maladie inflammatoire
Maladies auto-inflammatoires mono géniques	FMF MAPS TRAPS CAPS Syndrome de Blau Syndrome de Majeed

Généralités

Maladies auto-inflammatoires polygéniques	Maladie de Crohn Goutte/chondrocalcinose Maladie de Horton Maladie de Still
---	--

La MB partage avec le groupe des maladies auto inflammatoires notamment leur prototype la FMF, plusieurs caractéristiques : épidémiologiques, cliniques ainsi que génétiques

Le tableau 6 : résume quelques signes cliniques communs [36]

	Atteintes cliniques	Maladie auto-inflammaoires
Tableau 6 : Similitudes cliniques entre la MB et les autres maladies auto inflammatoires	Aphtes buccale	HIDS
	ulcération génitale	HIDS
	Lésions acnéiformes	PAPA
	Réaction pathergique	PAPA
	Uvéite	TRAPS, Blau syndrome, NOMID
	Arthrite	FMF, HIDS, PAPA, TRAPS
	méningo-encéphalite	FMF, NOMID

Génétiques: de nombreuses mutations du gène MEFV lié à la FMF (E148V, M680L, M694V, V726A...), l'allèle P706 (du gène MEFV) sont significativement associées à la MB.

Thérapeutique : la colchicine Inhibe le chimiotactisme des neutrophiles est très efficace sur les lésions cutanées des deux maladies.[35]

On se basant sur des études comparatives entre ces syndromes auto inflammatoires et la maladie de Behcet, ainsi que de signes témoignant d'une hyperactivité de l'immunité innée (taux élevés des cytokines pro inflammatoires, hyperréactivité des polynucléaires et des monocytes macrophages), a amené certains auteurs à classer la MB parmi ce groupe de syndromes. [36]

6-2) La MB est-elle une maladie auto-immune

Il ya plusieurs critères communs entre La MB et les maladies auto-immunes classiques tel:

- Association avec d'autres maladies auto-immunes (syndrome de G. Sjögren)
- pas de model animal complet pour cette maladie
- Toutefois quelques critères mineurs sont présent comme:
- efficacité des traitements immunosuppresseurs: cyclosporine, azathioprine....
- Association avec les molécules HLA
- Réponse immunitaire Th1

Et il manque les critères suivants :

- la prédominance féminine
- la positivité des auto-anticorps

Le substratum anatomique dans la MB est une vascularite (a prédominance polynucléaire ou lymphocytaire) selon l'âge des lésions, elle affecte les vaisseaux de tout calibre. On sait que la majorité des vascularites sont classées parmi les maladies inflammatoires à mécanisme auto-immun, et comme ces dernières la MB est caractérisée par son atherophilie avec présence de plusieurs facteurs prédisposant aux thromboses vasculaires (Autoanticorps anti-cellules endothéliales hyperhomocysteinemie ; mutations Facteur V de leiden...).La présence d'autoanticorps tels anti cellules endothéliales, anti-enolasesalpha,anti-lymphocytes, anti-phospholipides...a été rapporte par certain auteurs mais leurs taux été faibles ainsi leurs affinité été médiocre. On note aussi dans la maladie de Behcet l'absence des autoanticorps classiques des vascularites les ANCA.[4,6 ;12 ;35,36]

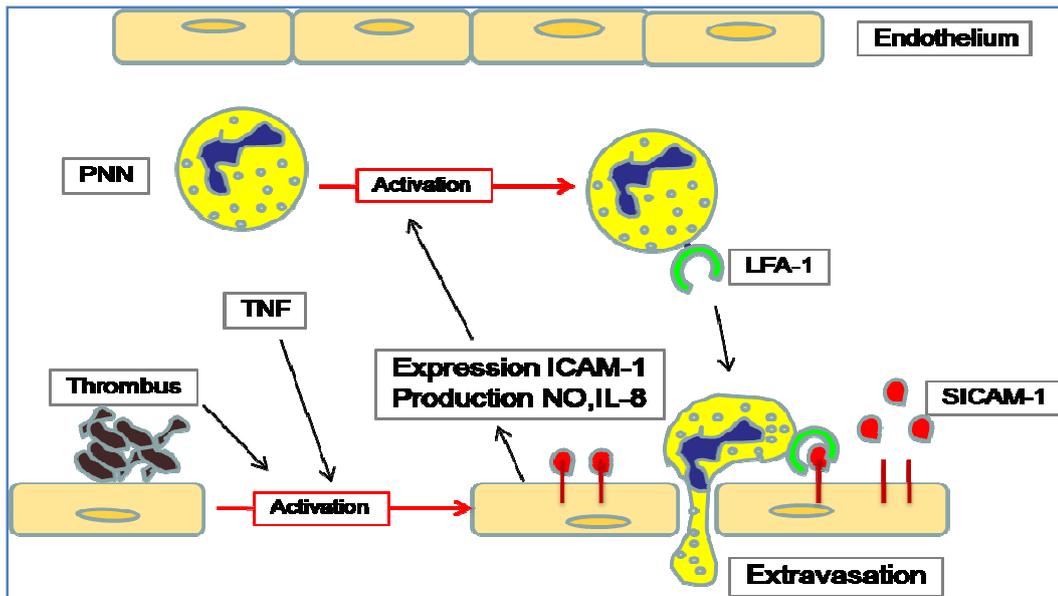


Figure 5 : Les facteurs affectant l'activation des cellules endothéliales et l'extravasation des leucocytes (vascularite) [36]

Le mécanisme auto-immun le plus plausible et le plus étudié dans la MB est celui du mimétisme moléculaire, qui consiste en l'existence d'un ou plusieurs épitopes antigéniques communs aux multitudes de germes associés à la MB, et qui pourraient avoir des homologues parmi les antigènes du soi chez le sujet prédisposé.

En faveur de cette hypothèse il a été rapporté :

- association MB et molécules HLA de classe I, dont la plus significative avec le HLA-B51.
- HLA-B51, et HLA-B52 sont deux subdivisions du HLA-B5. La comparaison entre les allèles HLA-B5101 et HLA-B5201 montre comme différence seulement 2 acides aminés situés dans la poche de présentation peptidique: positions 63 et 67.

Au Japon ces 2 allèles sont associés chacun à une vascularite différente:

-HLA-B51 avec la MB.

-HLA-B52 avec la maladie de Takayasu

Sur la base de ces données et de celle des études du site antigénique (mapping) de la molécule HLA-B51, un peptide « Behcetogénique » hypothétique a été proposé (DAIXXXXXF) :

HLA-B51 pourrait être impliquée de 2 manières :

Généralités

- présenter un auto-antigène (DAIXXXXXF) endogène au lymphocyte T CD8+ cytotoxique.
- et/ou comme HLA-B51 possède le motif Bw4 (ligand des récepteurs KIR des cellules natural killer) d'où la possibilité de se présenter comme un soi modifié aux récepteurs KIR et activer les cellules NK. [35]
- Le rôle des protéines du choc thermique dans le mimétisme moléculaire HSP65/60 : Il existe 60% d'homologie de séquence entre l'HSP60 (Protéine de choc thermique humaine) et l'HSP65 microbienne (notamment streptococcique).
- Les expériences in vitro ont démontré que la réponse des lymphocytes T spécifiques anti-HSP65, est prédominante pour 4 peptides dit immunodominants qui sont : Les séquences acides aminés 111-125 ; 154-172 ; 219-233 et 311-326.
- D'autres expériences ont trouvé que la prolifération des cellules T auto-réactives en réponse à l'HSP60 était elle aussi plus marquée avec 4 peptides immunodominants homologues à ceux décrits pour l'HSP65 et qui sont : 136-150 ; 179-197 ; 244-258 et le peptide 336-351. [36]

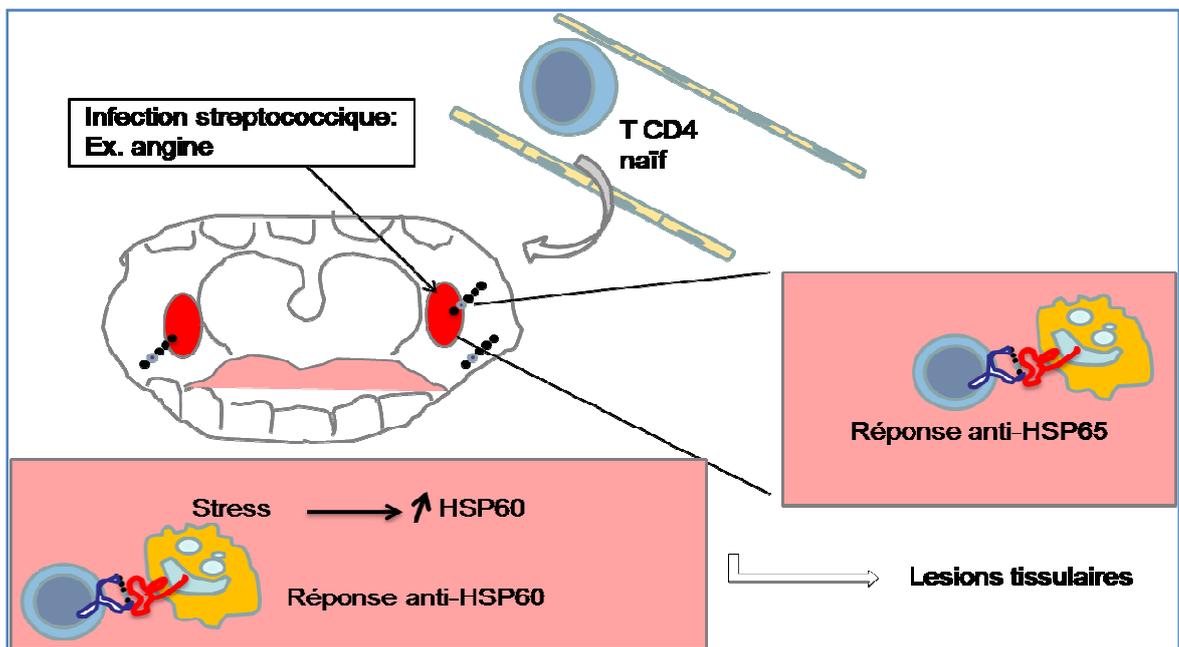


Figure6 : Rôle des protéines du choc thermique (mimétisme moléculaire HSP65/60) [36]

- **oculo-behçet** : rôle de l'antigène S rétinien (Ag-S). L'Ag-S est une protéine de la rétine à l'abri du système immunitaire, il possède un épitope immunodominant le

Généralités

PDS-Ag(342-355), qui présente une homologie de structure avec un peptide de la région conservée commune entre certaines molécules HLA-B comme HLA-B51 .

- Des études in vitro, avaient montrées que seules les cellules (lymphocytes T) issues de patients ayant eu dans leurs antécédents un épisode d'uvéïte, prolifèrent en présence des peptides PDS-Ag

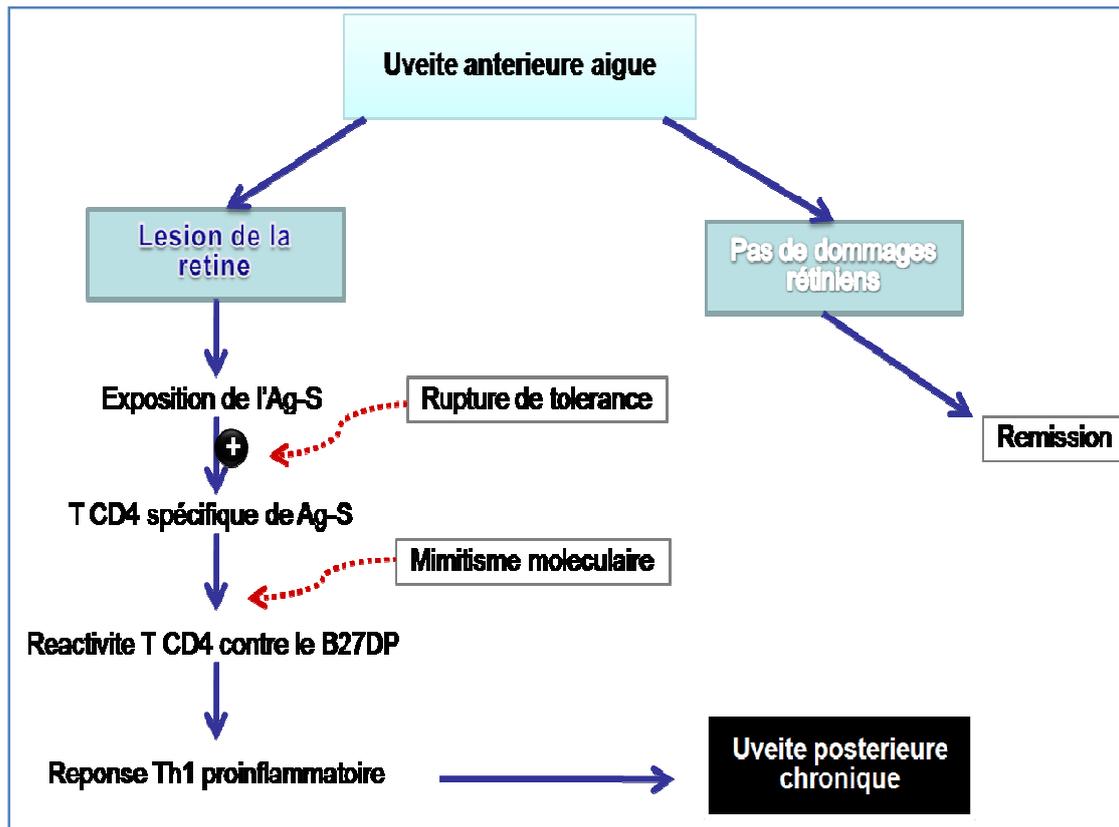


Figure 7 : Rôle de l'antigène S rétinien (Ag-S) dans l'oculo-Behçet[36]

Donc La cause exacte de la maladie de Behçet n'est pas connue. Elle appartient au groupe des vascularites, qui se caractérise par une inflammation des vaisseaux sanguins. Une inflammation est une réaction du système de défense de l'organisme qui se produit normalement en réponse à une agression (infection, blessure). Dans le cas de la maladie de Behçet, on ne sait pas pourquoi l'organisme réagit de la sorte. L'inflammation endommage les vaisseaux, qui ne sont alors plus en mesure d'irriguer correctement les organes, c'est-à-dire de leur apporter le sang et l'oxygène en quantité saine.

Les chercheurs pensent qu'une infection pourrait contribuer à l'apparition de la maladie, entraînant une réaction anormale des défenses immunitaires chez des personnes ayant une sensibilité particulière. Pour l'instant, aucun virus ou bactérie n'a toutefois pu être mis en cause.

La maladie de Behçet est donc considérée comme une vascularite « systémique », c'est-à-dire qui peut toucher tous les organes, et « primitive » car on n'en connaît pas la cause.

Chapitre II

Matériel et Méthode

I-Matériels

1) Matériel biologique :

- ❖ La population étudiée au niveau du laboratoire d'immunologie de l'HCA (hôpital central de l'armée) d'ain naaja est représentée par 25patients.
- ❖ ADN extrait à partir du sang total.

2) Matériels non biologique :

- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur (-20°c)
- Vortex (whili mixer)
- Les gants
- Tubes secs à usage unique
- Portoir
- Micropipette de volume réglable
- Embouts à usage unique
- Eau physiologique
- Minuterie
- Tubes coniques de 10 ou 15ml avec bouchon

3-1) Prélèvement :

Le sang a été prélevé sur tube violet stérile avec un anticoagulant.une fiche de renseignement est remplie, afin d'avoir les informations nécessaires (les coordonnées du patients ; nom, prénom et âge).

II-Méthodes

1) Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)

- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

Protocole expérimental :

Le sang total, conservé à -20°C, dans des tubes EDTA est décongelé à température ambiante au moment de l'utilisation. 200 µl de sang total est ajoutées à 30 µl de protéinase K aliquotés au préalable ainsi que 250µl de solution de lyse LDB (lysis dilution buffer) est ajoutée à ces derniers dont a pipetage rapide et immédiat était nécessaire, le tous est vortexé 15s et placé au flash spin down .une incubation est poursuivie à 56°C pendant 5 mn au bain marie.

Après 250µl d'éthanol absolu sont ajoutés à notre mélange, le tout est vortexé 15s puis placé au flash spin down .le lysat obtenu est transférée dans une colonne CAS (cartridges) posé sur un tube à déchets WTS (waste tube) et centrifugé à 8000rpm (Rq .le tube à déchets (WTS) est remplacé à chaque centrifugation), afin d'effectuer deux lavages on ajoutait 750µl de solution de lavage WDB (Wash dilution buffer) en centrifugeant à la suite à 8000 rpm.

A la fin notre colon est placé sur un tube oppendorff de 1,5 ul pour que 200µl de solution d'éluion est ajoutée et le tout est centrifugé à 8000 rpm ;ainsi un volume final de 200µl d'ADN génomique est obtenu.

2) Technique de typage par ssp (polymérase chain reaction-spécifique sequence primers) :

Principe :

le principe de cette technique que l'amplification par la taq polymérase n'est effective que lorsque l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence de l'ADN cible .les couples d'amorces sont définis pour être spécifique d'une séquence d'un ou plusieurs allèles .dans des conditions optimales de la PCR ,le couple d'amorces spécifiques permet l'amplification des séquences cibles (résultats positif) ,après la PCR ,les fragments d'ADN amplifiés sont met en évidence par électrophorèse sur un gel d'agarose incorporé de BET .

L'interprétation des résultats PCR SSP est basée sur la présence ou l'absence de bandes spécifiques .un contrôle positif interne est intégré .il permet de vérifier l'amplification de la réaction PCR

Mode opératoire :

Le kit utilisé est : INNO-TRAIN/HLA-Ready gene B low (conservée à -20°C et retirée juste avant utilisation).

Pour chaque patient, une plaque de 42 puits est préparée.

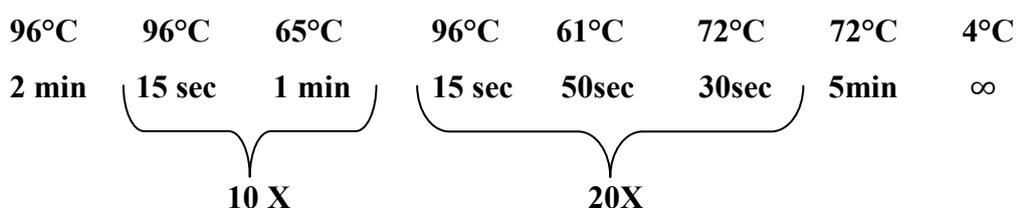
Chapitre II : Matériels et Méthode

Pré amplification :

Dans un tube eppendorff 200 μ l d'eau distillée stérile et 100 μ l de tampon PCR (conservé à -20°C) et 4 μ l de la taq sont ajoutés. Le tube est vortexé pendant 15secondes et 10 μ l de ce mélange sont déposés dans le premier puits de contrôle négatif .après cela ,60 μ l d'ADN génomique (50ng / μ l) préalablement vortexé pendant 20s (5U/ μ l) sont ajoutés. Le tout est vortexé pendant 20 secondes et 10 μ l de ce mélange sont déposés dans chaque puits a l'exception du puits contrôle négatif .les puits sont bien fermés a l'aide de couvercle afin d'éviter l'évaporation.

Amplification :

Une fois que les plaques sont prêtes, elles sont placées dans le thermocycleur (Applied biosysteme 9700), préalablement préchauffé pour l'amplification .un programme spécifique INNOTRAIN-Ready est lancé et l'amplification dure 1heure 35minute



programme d'amplification ssp INNOTRAIN-Ready

Révélation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose :

En parallèle à l'amplification, la préparation du tampon tris Acétate EDTA (TAE) et du gel d'agarose à 2% est effectuée .pour le tampon TAE ,242 gr de tris base ,57,1ml d'acide acétique et 100ml d'EDTA sont mélangés et ce mélange est ajouté à 100 ml d'eau distillée .le Ph de la préparation est ajusté à 8.5 en utilisant des pastilles de KOH ou NaOH.la solution obtenue est concentrée 50X elle est donc diluée afin d'obtenir une solution concentrée 1X .après cela le gel d'agarose à 2% est préparé en mélangeant 6gr d'agarose (genagarose)a 300ml de tampon TAE dans un bécher et en mettant le tout au micro-onde pendant 5minutes ou jusqu'à dissolution totale .

Entre temps le porte gel et les applicateurs sont préparés et déposés sous la hotte à flux laminaire (flufrance).

Quand le gel est prêt ,il est met sous la hotte ou 20 μ l de BET lui sont ajoutés, le gel est versé délicatement dans le porte gel et les applicateurs y sont placés tous doucement .le gel

doit reposer pendant 15 minutes sous la hotte chimique .Des que l'amplification s'achève le gel est déjà prêt et il est déposé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X et les applicateurs sont délicatement retirée pour ne pas créer de brèches .les plaques sont retirée de thermocycleure et à l'aide de micropipette à 8 canaux ,les amplicons sont déposés dans les puits de gel d'agarose à 2%.les fragments d'ADN amplifiés migrent 25 minutes à 160V et les bandes d'ADN ainsi formées sont révélées et visualisées par marquage au bromure d'ethidium BET et observées sous lumière UV à l'aide d'un équipement de capture de photo(GEL DOC XR biorad) et des logiciels quantity one.

L'interprétation des résultats PCR-SSP nécessite l'utilisation du logiciel INNO-TRAIN des tableaux de résultats fournies dans le kit .elle est basée sur la présence ou non .dans chaque puits .des fragments amplifiés spécifiques aux allèles.

Les différents stades de PCR ssp



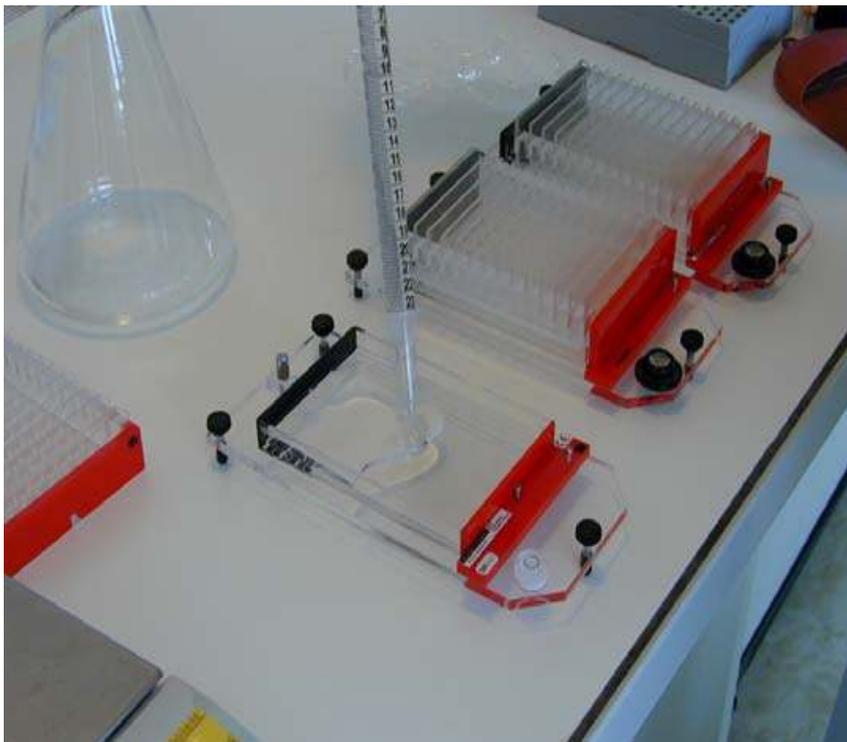
Extraction de l'ADN génomique



Pré-amplification



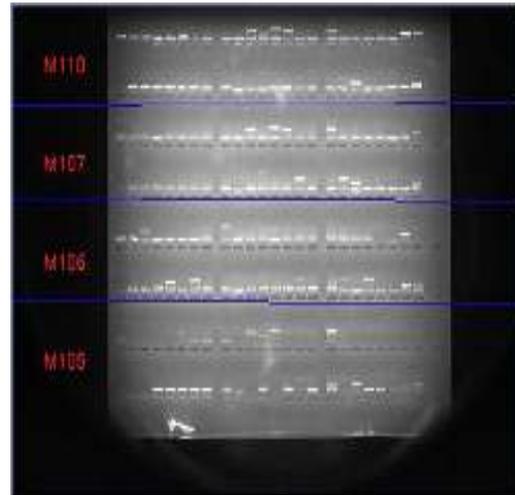
Amplification



electrophorese



Capture de photo



Interprétation des résultats

Chapitre III

Résultats et discussion

I-Résultats et discussion

Notre étude a porté sur un nombre de 25 échantillon «prélèvement sanguin » de patients classés en deux catégories (sujets suspectés et sujets ayant la MB) âgés de 2 à 64ans

L'âge moyen général de notre échantillonnage(les deux catégories) est de 21.5ans

Dans le but d'apporter plus de clarté sur les caractéristiques de notre population étudiée, nous l'avons reparti selon le sexe, l'âge et les différents signes cliniques .et cela pour les deux catégories de patients.

1-Répartition des patients selon le sexe :

La répartition des patients suspectés de Behçet en fonction du sexe montre presque une égalité entre les deux sexes féminin et masculin avec des pourcentages de 52.94% et 47.05% respectivement (**Tableau 8**).

Le sexe ratio est de 0.88 .

La répartition des patients ayant la maladie de Behçet selon le sexe montre une prédominance masculine avec un pourcentage de 75% et 25% pour le sexe féminin.

Le sexe ratio est de 3. (**Tableau 8**)

Ces résultats sont en corrélation avec les données bibliographiques. En effet, plusieurs études ont rapporté la prédominance masculine avec un sexe ratio entre qui peu atteindre le 4 [2 ; 9]

Cependant, un sexe ratio de « 0 .5 »a été rapporté en Allemagne, reflétant une prédominance féminine, ceci pourrait être expliqué par les variations ethniques.

Tableau-VIII: Répartition, selon le sexe, des patients suspectés pour la MB et des patients ayant la MB

sexe	Nombre de patients suspectés	Pourcentage	Nombre de patients ayant la maladie de Behçet	pourcentage
F	9	52.94%	2	25%
M	8	47.05%	6	75%
Total	17	100%	8	100%

2-Répartition des patients selon les tranches d'âges :

Quatre tranches d'Age sont observées dans notre population pour la catégorie des sujets avec suspicion (figure 9)

L'âge moyen est de 24.5ans

- 29.41% des patients (n=5) ont un âge inférieur à 15 ans
- 47.05% des patients (n=8) ont un âge compris entre 15 et 30ans
- 17.64% des patients (n=3) ont un âge compris entre 30 et 45ans
- 5.88 %des patients (n=1) ont un âge supérieur à 45 ans

En effet tous les patients qui ont la maladie de Behçet confirmée ont un âge compris entre 15ans et 30 ans avec un âge moyen de 22ans.

Nos résultats se rapprochent de ceux de la littérature, en effet, plusieurs travaux réalisés au Maroc, en Corée et en Turquie ont rapporté un âge moyen de 26.5 et 27.5 ans et de 28.8 respectivement [37] [38], cette différence pourrait être expliquée par le faible effectif de notre cohorte.

En Israël, la MB semble survenir plus précocement avec une moyenne d'âge de 19.9ans [39] Cependant, dans la population étudiée, une seule patiente avec suspicion de Behçet est âgée de 64ans ceci pourrait s'expliquer par la forme ou l'installation tardive de la maladie ce qui a été également rapportée dans la littérature, en effet, le groupe international d'étude sur la maladie de Behçet a rapporté dans leur classification(1990) l'apparition de cette maladie après 50 ans avec une rareté après l'Age de 60 ans [1]

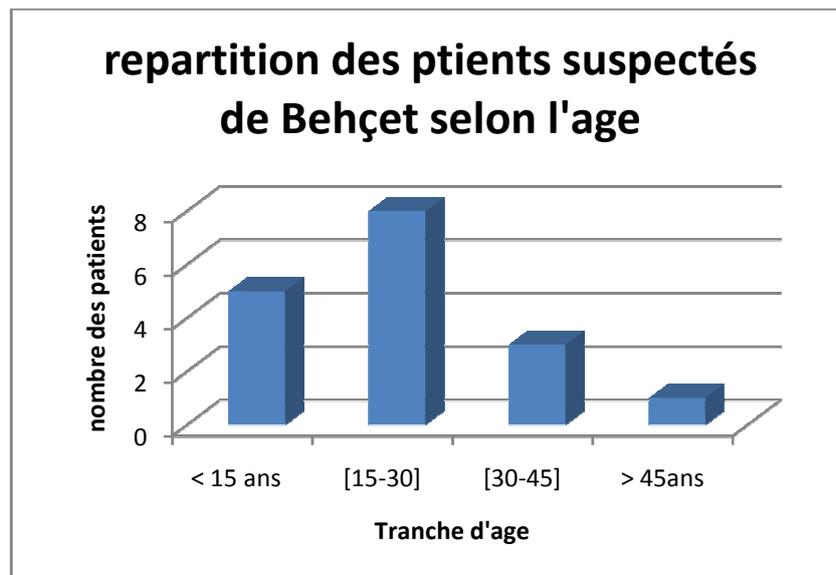


Figure 9 : répartition des patients avec suspicion selon leurs tranches d'âges

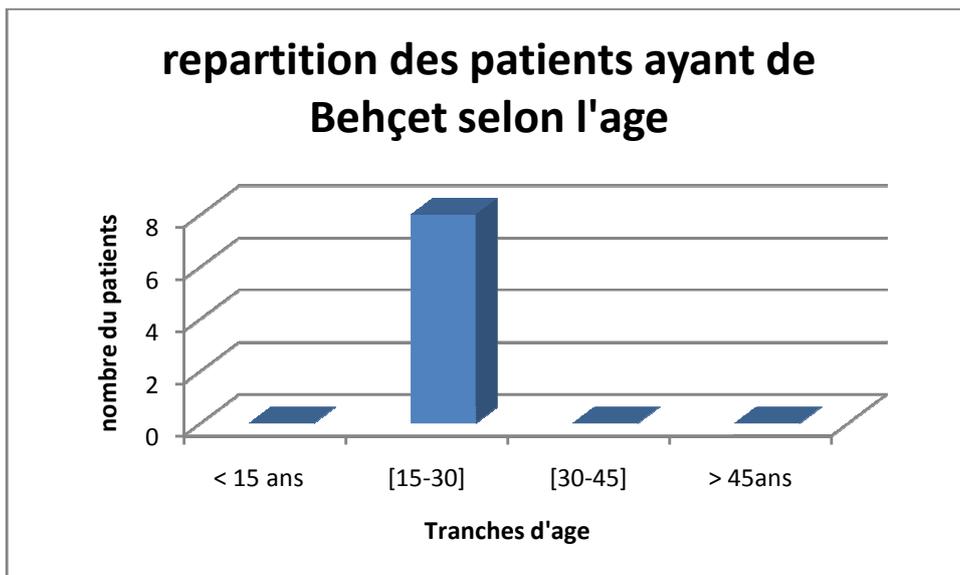


Figure 10 : répartition des patients avec MB selon leurs tranches d'âges

3- répartition des patients suspectés MB selon les signes cliniques :

Tableau 9: Répartition des patients avec suspicion de MB selon les différentes manifestations cliniques

Aphte génital	Atteinte neurologique	Atteinte articulaire	Uvéite	Aphte buccal
11.76%	5.88%	11.76%	17.64%	52.94%

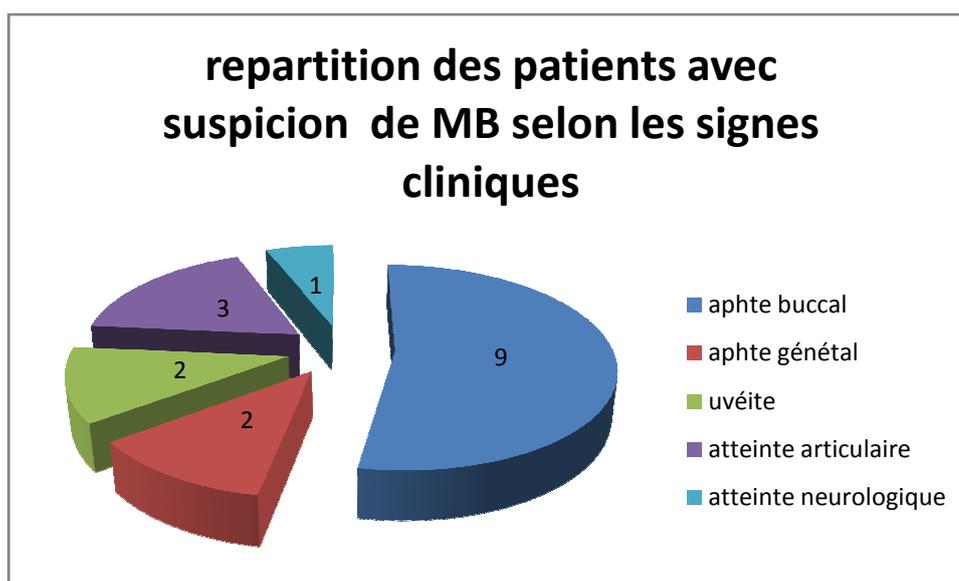


Figure 11 : Répartition des patients avec suspicion de MB selon leurs signes cliniques

La répartition des patients dans cette catégorie selon les manifestations cliniques montre une fréquence des aphtes buccaux, ainsi plus de la moitié de ces patients (52.94%) présentent le signe clinique majeur de la MB.

Cependant, les aphtes génitaux sont présents dans seulement 5.88% des cas.

Par ailleurs, Les données bibliographiques (12) ont rapporté des taux de 92 à 100% et de 60 à 80% respectivement pour les aphtes buccaux et génitaux chez les patients suivis pour maladie de Behçet. Ainsi 3% des malades atteints d'une MB authentique n'ont jamais présenté d'aphtose buccale. Toutefois, diverses affections inflammatoires peuvent ressembler à la maladie de Behçet et donnent à l'occasion des ulcérations buccales.

Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par le faible nombre des patients étudiés.

En ce qui concerne l'atteinte oculaire, nos résultats montrent un pourcentage de 17.64% chez les patients suspectés, ce dernier est bien inférieur au taux rapporté par d'autres études, en effet ils rapportent des taux compris entre 40 et 70% [40].

Les patients ayant une atteinte articulaire représentent un pourcentage de 11.26%.

Cette atteinte touche essentiellement les grosses articulations (genoux, chevilles), également citées dans d'autres travaux [41]. nous avons constaté que la polyarthrite est plus fréquente comme atteintes articulaires.

Par ailleurs, la polyarthrite a été également retrouvée chez les patients atteints de maladie Behçet[9]

Enfin l'atteinte neurologique est moins fréquente dans notre population, en effet seul un patient a présenté une atteinte neurologique. (Chez les patients suspectés)

La fréquence de cette atteinte rapportée dans d'autres travaux varie entre 2 à 44%. (pour les patients ayant la maladie de Behçet)

Dans les séries du Moyen Orient et des pays méditerranéens, les études rapportent un pourcentage de 13 à 44% [43], alors que les études réalisées sur des patients turques et asiatiques montrent une fréquence moindre de l'atteinte neurologique avec 2 à 11% [43]

4-Résultats du typage HLA pour les sujets avec suspicion de MB :

Le typage HLA B51 et B27 est compris dans les critères de prédiction de la maladie de Behçet pour le clinicien.

Tableau 10 : Répartition des patients avec suspicion de Behçet selon le typage HLA

typage	Nombre du patient	Pourcentage
B27+, B51-	0	0%
B51-, B27-	11	64,70%
B51+, B27-	4	23 ,52%
B51+, B27+	2	17.64%
Total	17	100%

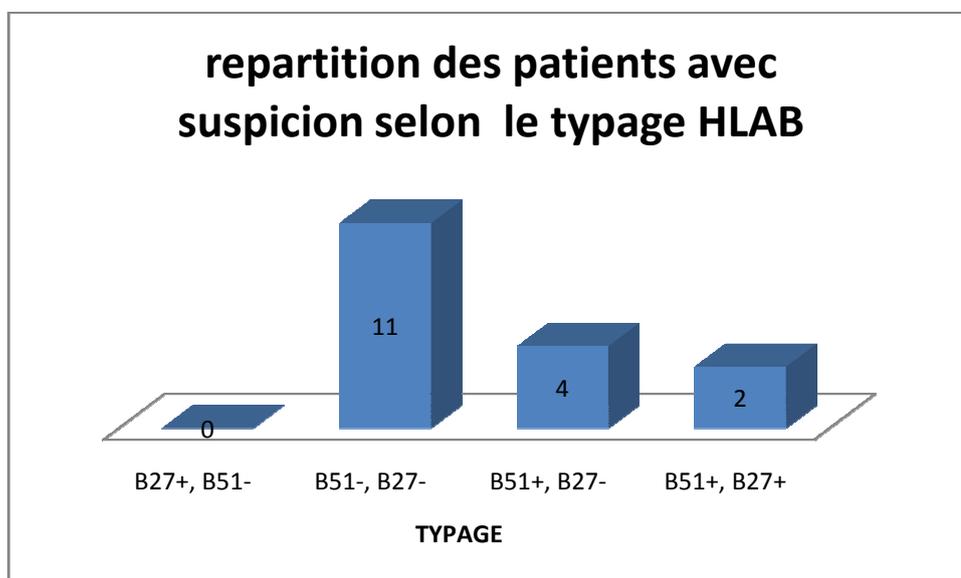


Figure12 : Répartition des patients avec suspicion de MB selon le typage HLA B

Dans notre étude, les résultats du typage HLA de classe I pour les sujets suspectés de Behçet ont montré un taux de positivité de 23 ,52% en HLA B 51 chez 4 patients, avec un taux de négativité de 64 ,70% chez 11 patients.

5-Résultats du typage HLA pour les sujets ayant la MB :

Tableau 11 : Répartition des patients atteints de Behcet selon le typage HLA B

typage	Nombre du patient	Pourcentage
B27+, B51-	1	12.5%
B51-, B27-	2	25%
B51+, B27-	4	50%
B51+, B27+	1	12.5%
Total	8	100%

6-résultats de typage HLA B des patients ayant de Behcet selon le sexe :

SEXE	Typage HLA				Total
	B27+, B51-	B51-, B27-	B51+ B27-	B51+, B27+	
F	0	1	1	0	2
M	1	1	3	1	6
Total	1	2	4	1	8

Tableau 12 : résultats de typage HLA B des patients ayant de Behcet selon le sexe

Les résultats du typage HLA de classe I pour les sujets atteints de Behcet ont montré un taux de positivité de 62.5 % en HLA B 51 chez 5 patients, ces résultats sont en faveur du diagnostic clinique en effet les données actuelles recommandent surtout le typage HLA B51 lors du bilan immunologique, cependant nous retrouvons un taux de négativité de 37.5% chez 3 patients

7- résultats de typage HLA B des patients suspectés de Behcet Selon le sexe :

SEX	Typage HLA				Total
	B27+, B51-	B51-, B27-	B51+ B27-	B51+, B27+	
F	0	8	2	1	11
M	0	5	2	1	8
Total	0	13	4	2	17

Tableau13:Répartition du résultat de typage HLA B selon le sexe

La liaison étroite entre les patients de sexe masculin atteints de la MB et le gène HLA B51 a été rapportée dans plusieurs travaux (25).

En effet, les résultats obtenus lors d'une étude effectuée sur une population tunisienne, ont montré une fréquence du gène B51 située entre 25 et 48 ,7% [33, 34 ,35].

Ce gène B51 à été également retrouvé dans d'autres populations tel que, le japon, la France et la Turquie, avec des pourcentages respectifs de : 51%- 58% et 50%.

Au travers de ces résultats, nous constatons que la fréquence estimée du gène B51 dans les pays du Maghreb est bien différente de celle rapportée par les données de la littérature ceci pourrait être expliqué par les variations ethniques.

Les résultats retrouvés pour le typage HLA B51 négatif dans les deux catégories (suspicion et MB) sont de 58.82% et 25% respectivement, ce qui pourrait soit évoquer un autre diagnostic, en effet les patients de ce groupe présentent comme signes cliniques : une oligoarthritis, et uvéite avec absence d'aphtes buccaux-génitaux. On ne peut pas exclure le diagnostic car ces patients présentent certains des signes cliniques de la MB. [3].

Nos résultats ont également montré une association entre le gène B51 et le gène B27 pour 17.64,% des suspicions et 12.5% chez les sujets MB.

Cette association HLA B51 /27 à été décrite dans la littérature [36].

La présence du gène isolé B27 peut orienter vers le diagnostic d'une spondylarthrite [5].

Cependant, son association avec le gène B51 peut traduire une MB associée à d'autre pathologies telles que ; SPA, Crohn, et RCH [7].

5- répartition des patients selon le typage HLA B51 et signes cliniques :

Dans le but de montrer l'implication du gène HLA B51, marqueur prédisposant de la maladie de Behcet, nous avons reparti les résultats du typage en fonction des signes cliniques. Cette répartition montre une association entre le gène B51 et Le signe majeur « Apthose buccale » chez 52,94% des patients suspectés et 11,76% pour l'aphtose génétale. Et pour les patients atteints de la maladie présentent une association de 100% entre B51 et les aphtes buccaux.

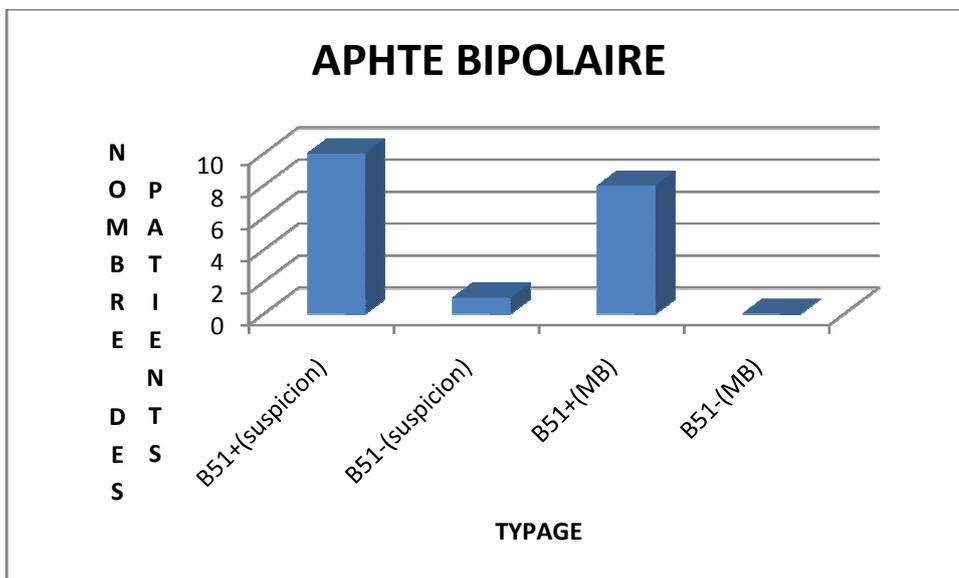


Figure 14: typage HLAB51 Chez les patients ayant Aphtose bipolaire

Effectivement, l'aphtose bipolaire a été apportée dans la littérature parmi les signes majeurs de MB [2].

Nous constatons que ce taux de 90.90% et 100 % retrouvé dans notre série semble corrélé avec les données bibliographique, Il serait intéressant de reprendre cette étude sur un effectif plus important.

Un seul patient du groupe de suspicion a présenté une association des deux gènes B51 et B27 ; ce qui permet d'orienter le diagnostic vers une MB et une SPA. [36]

L'uvéite avec HLAB51 a été décrite dans plusieurs études comme étant un signe clinique majeur de MB, n'est pas retrouvée dans notre série.

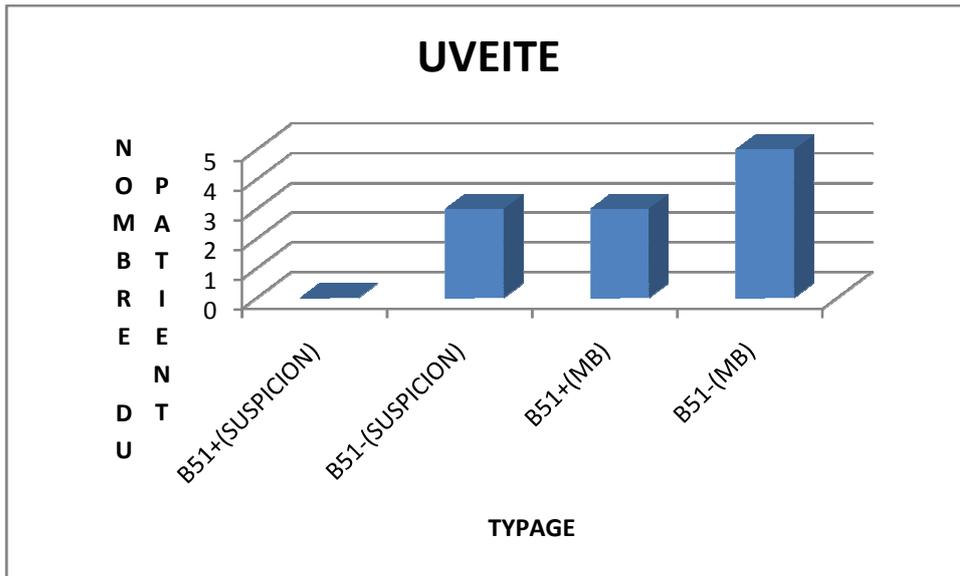


Figure 15: typage HLAB51 Chez les patients ayant Uvéite

Les sujets MB avec uvéite ont un HLA B51 avec un pourcentage de 45 ce qui correspond à littérature [36]

Les patients ayant présenté une atteinte articulaire, ont un résultat positif en HLA B51 avec un taux de 50%

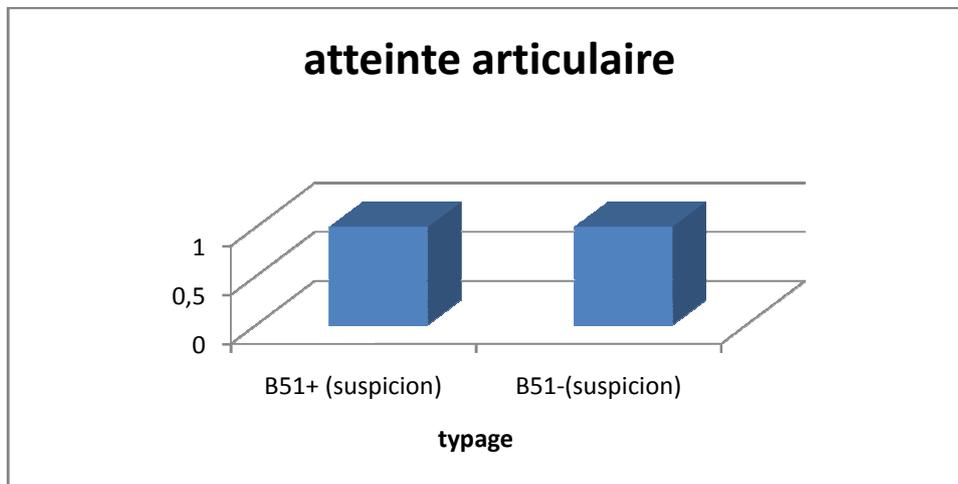


Figure 16: typage HLAB51 Chez les patients ayant Atteinte Articulaire

Cette fréquence qui est bien différente de ce qui est décrit pour les patients ayants de Behçet confirmé dans la littérature « étude tunisienne sur un effective de 69 patients une fréquence de 4.3% de HLA B51 positif »

Cette différence entre les deux résultats pourrait être expliquée par les variations ethniques

Conclusion et perspectives

Au terme de notre étude sur le polymorphisme génétique des molécules HLA de classe I B dans la maladie de Behcet qui été réalisée au sein de laboratoire d'immunologie au sein de l'hôpital centrale de l'armée (HCA), nous avons confirmé que la susceptibilité à cette maladie par le gène HLA classI est apporté par l'allèle B51.

En effet ce dernier est le plus fréquent dans notre série de MB algérienne mais il serais plus intéressant d'effectuer une étude sur le territoire national avec un effectif plus important afin d'avoir plus de données concernant le polymorphisme génétique de la MB en Algérie pour pouvoir établir de façon significative les fréquence génétiques des allèles déjà incriminés .

Le typage HLA classe 1 par la technique PCR-SSP a confirmé la prédominance masculine retrouvé par d'autre étude Algérienne et Magrébine, mais une grande fréquence féminine qu'il a rapprochée de celle du Japon et du Turque.

Même si la comparaison aux séries de la littérature est rendue difficile enraison de l'hétérogénéité du recrutement et des critères diagnostiques pour chaquemaniestation clinique, certaines particularités peuvent être dégagées : fréquence relativement élevée de l'aphtose génitale, des lésions pustuleuses et de l'atteintearticulaire, et de l'atteinte vasculaire dans notre étude. Cette dernière sembleconstituer un trait particulier de la maladie dans les pays du bassin méditerranéenpar rapport aux pays asiatiques.

Les fréquences relativement basses de l'atteinte oculaire et de l'atteinteneurologique par rapport à d'autres études sont cependant à interpréter avec plusde précaution en raison des critères restrictifs que nous avons adoptés pourl'inclusion dans ces deux atteintes.

L'implication des allèles HLA de susceptibilité dans l'éthiopathogénie dans la MB est très bien élucidée. cependant malgré les avancées considérables de ces dernièresdécennies dans la compréhension de facteurs génétiques de prédisposition et des mécanismes immuno-pathologiques qui participe a la maladie de Behcet , une grande part d'inconnu persiste ;sans doute à cause de la complexité de la réponse immunitaire .cela monte aussi la présence d'un gène de susceptibilité n'implique pas forcément la maladie par exemple il serait intéressant

D'étudier les gènes proches du gène HLAB afin de confirmer l'hypothèse d'équilibre de liaisons qui existe entre le B51 et les gènes proche de lui.

Si les nouvelles technologies de l'ADN permettent, dans un avenir proche, de préciser ces nouveaux gènes et allèles de susceptibilité, la tâche reste extrêmement lourde, avant de pouvoir en démontrer l'effet réel. Les connaissances acquises et confirmées concernant le complexe HLA permettent d'utiliser le génotypage HLAB dans la stratégie diagnostic.

Les avancées de la biologie moléculaire ouvrent donc la porte à des perspectives prometteuses pour la prise en charge des patients.

Tableau du Patients

Colonne2	Colonne3	Colonne4	Colonne5	Colonne6
sexe	service	age	diagnostic	résultats
F	EXTERNE	23ans	Uvéite a répétition HLAB 27 et B15	Absence de HLAB 27 ET B15
M	/	17 ANS	MB (B5, B51, B52)	B7. 38
M	EXTERNE	40ans	SUSPICION DE BEHCET B5, B51, B52	Absence de b27 A*31 Bw50.06
M	neurologie	35ans	SUSPICION DE BEHCET	B40 .44
F	EXTERNE	23 ANS	Oligoarthritis chronique de 2 genoux B27 ET B5	A*23.32 B*14.58 C*7.08 Absence de B27 ET B5
M	EXTERNE	11ans1/2	SUSPICION de MB Crohn A B C ?	A*23.32 B*18.35 Cw 03.04
F	PNEUMO	28 ANS	MB	B51
F	UMS	20ans	Aphtes buccal récursive plus d'une année	A*23.30 B*45.51 Cw 06.15
F	EXTERNE	18ans	MB	HLAB27 Absence d'allèles de HLAB27
M	EXTERNE	5ANS	UVEITE + ectopie testiculaire	Absence de HLA B27
F	EXTERNE	30 ANS	Suspicion de SEP et de behcet	HLA A* 02.02 B*49.58 C*07.07
M	externe	64ans	Polyarthrite bilatéral avec aphtose buccal	B27 B5
M	/	Adulte	MB	Présence d'allele HLA B27.27
F	EXTERNE	28ans	UVEITE	HLA B *44.78
F	EXTERNE	24ans	HLA B51, HLAB27	Absence HLAB27
M	EXTERNE	12ans	HLAB51,HLAB27	HLA A*24.30 B*13.39 Cw06.07
F	Medicine interne	38ans	HLA B27 ,B51	B51
M	Dermato	30 ans	MB	B51 ,B27
M	EXTERNE	2ans	Pathologie inflammatoire de système chronique	B51
M	PCL	12 ans	Thrombose nerveuse Suspicion de behcet	B51
F	EXTERNE	A	Aphthose buccale	B51
F	EXTERNE	25 ans	Aphthose bipolaire	B51,B27
M	MI	18ans	MB	B51
M	EXTERNE	18ans	MB	B51
M	EXTERNE	29ans	MB	B51

Bibliographies

Références

1. Wechsler B, Du-Boutin LTH, Amoura Z. Maladie de Behçet. In : L. Guillevin, O. Meyer, J Sabilia. Traité des maladies et syndromes systémiques (pp 779-804). 5^e Edition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2008.
2. S. B'chirHamzaoui, A. Harmel, K. Bouzlama, M. Abdallah, M. Ennafaa, S. M'rad, M. Ben Dridi and le groupe tunisien d'étude sur la maladie de Behçet ; Reçu le 2 mai 2006; accepté le 21 juillet 2006. Available online 18 August 2006.
3. Yazici H, Seyahi E, Yurdakul S. Behçet's syndrome is not so rare : Why do we need to know ? *Arthritis Rheum* 2008 ; 58 : 3640-3.
4. I. Krause, Y. Uziel, D. Guedj, M. Mukamel, Y. Molad and M. Amit et al., Mode of presentation and multisystem involvement in Behçet's disease: the influence of sex and age of disease onset, *J. Rheumatol.* 25 (1998), pp. 1566–1569.
5. HAMZA M.:juvenile BEHCET's disease in Tunisia.6ieme conference international sur MB,paris1993
6. HAMZA M.:physiopathologie de la MB .sem hospital paris, 1987, 63, n15,1195-1200
7. Yurdakul S, Yazici H. Behçet's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008 ; 22 : 793-809.
8. S. Benamour, B. Zeroual, R. Bennis, A. Amraoui and S. Bettal, Maladie de Behçet : 316 cas, *Press Med.* 19 (1990), pp. 1485–1489.
9. N. FilaliAnsary, Z. Tazi Mezalek, A. Mohattane, M. Adnaoui, M. Aouini and A. Maaoui et al., La maladie de Behçet : 162 observations, *Ann. Med. Interne(Paris)* 150 (1999), pp. 178–188.
10. La maladie de Behçet en Tunisie. Étude clinique de 519 cas Behçet's disease in Tunisia. Clinical study of 519 cases S. B'chirHamzaoui*, A. Harmel, K. Bouzlama, M. Abdallah, M. Ennafaa, S. M'rad, M. Ben Dridi, le groupe tunisien d'étude sur la maladie de Behçet 1,2
11. Communications orales / *La Revue de médecine interne* xxx (2008) S1–S55
12. Physiopathologie de la maladie de Behçet Pathophysiology of Behcet's disease Z. Amoura a,* , M. Guillaume a,b, S. Caillat-Zucman b, B. Wechsler a, J.-C. Piette
13. Posters / *La Revue de médecine interne* 29S (2008) S337–S411
14. WACHLER ,B ,(1999) la maladie de behcet ,revue de praticiens ,46 ,131 .

15. Frances, C (1999) manifestations cutanéomuqueuses de la maladie de Behçet, *Ann med interne*
16. Kontogiannis, V ; Powell, R, J (2000) Behçet disease post grad med, *76* :629-37.
17. Yazici, H. Esen, F. (2008) mortality in behçet syndrome. *Clinexprheumatol* ;26(5)suppl51 :S138-40
18. H. Makni, R. Kolsi and S. Kolsi, Clinical and immunological study of 26 cases of familial Behçet's disease. In: M. Hamza, Editor, Behçet's disease, PubAdhoua, Tunis (1997), pp.154.
19. Zouboulis. 9ème conférence Internationale sur la maladie de Behçet. Seoul, Mai 2000.
20. Z. Amoura, M. Guillaume, S. Caillat-Zucman, B. Wechsler and J.-C. Piette: Physiopathologie de la maladie de Behçet. Paris, France. Reçu le 9 janvier 2006; accepté le 22 février 2006. Available online 6 June 2006. 20 bis Mahesh SP, Li Z, Buggage R, Mor F, Cohen IR, Chew EY, et al. Alphasarcomin as a self-antigen in patients with Behçet's disease. *ClinExpImmunol* 2005;140:368–75.
21. S. Ohno, M. Ohguchi, S. Hirose, H. Matsuda, A. Wakisaka and M. Aizawa, Close association of HLA-B*51 with Behçet's disease, *Arch. Ophthalmol.* 100(1982), pp. 1455–1458.
22. D.H. Verity, J.E. Marr, S. Ohno, G.R. Wallace and M.R. Stanford, Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B*51: historical and geographical perspectives, *Tissue Antigens* 54 (1999), pp. 213–220.
23. T. Sakane, M. Takeno, N. Suzuki and G. Inaba, Behçet's disease, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999), pp. 1284–1291.
24. T. Ahmad, G.R. Wallace, T. James, M. Neville, M. Bunce and K. Mulcahy-Hawes et al., Mapping the HLA association in Behçet's disease: a role for tumor necrosis factor polymorphisms, *Arthritis Rheum.* 48 (2003), pp. 807–813.
25. F. Choukri, A. Chakib, H. Himmich, L. Marih and S. Caillat-Zucman, HLA-B*51 phenotype modifies the course of Behçet's disease in Moroccan patients, *Tissue Antigens* 61 (2003), pp. 92–96.
26. A. Gul, F.A. Uyar, M. Inanc, L. Ocal, J.H. Barrett and O. Aral et al., A weak association of HLA-B*2702 with Behçet's disease, *Genes Immun.* 3 (2002), pp. 368–372.

27. S. Bahram, M. Bresnahan, D.E. Geraghty and T. Spies, A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 91 (1994), pp. 6259–6263.
28. E.H. Hughes, R.W. Collins, E. Kondeatis, G.R. Wallace, E.M. Graham and R.W. Vaughan et al., Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients, *Tissue Antigens* 66 (2005), pp. 195–199.
29. H. Yasuoka, Y. Okazaki, Y. Kawakami, M. Hirakata, H. Inoko and Y. Ikeda et al., Autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes to major histocompatibility complex class I chain-related gene A in patients with Behcet's disease, *Arthritis Rheum.* 50 (2004), pp. 3658–3662
30. B. Turan, H. Gallati, H. Erdi, A. Gurler, B.A. Michel and P.M. Villiger, Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behçet's disease: soluble TNF-75 as a biological marker of disease activity, *J.Rheumatol.* 24 (1997), pp. 128–132.
31. Gul A. Behcet's disease as an autoinflammatory disorder. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:813
32. Imirzalioglu N, Dursun A, Tastan B, Soysal Y, Yakicier MC. MEFV1. gene is a probable susceptibility gene for Behcet's disease. *Scand J Rheumatol* 2005;34:56–8.
33. Atagunduz P, Ergun T, Direskeneli H. MEFV mutations are increased in Behcet's disease (BD) and are associated with vascular involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S35–7.
34. Amoura Z, Dode C, Hue S, Caillat-Zucman S, Bahram S, Delpech M, et al. Association of the R92Q TNFRSF1A mutation and extracranial deep vein thrombosis in patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum* 2005;52:608–11.
35. Mr le Professeur BELAHCEN Professeur agrège de NEUROLOGIE. HOPITAL HASSANII FES. Maladie de behcet
36. Etude algérienne Dr. MEHADJ . Pr. BENHALIMA 2010
37. Zouboulis C. Epidemiology of Adamantiades-Behçet's disease. *Ann Med Interne (Paris)* 1999;150:488–98.
38. Krause I, Uziel Y, Guedj D, Mukamel M, Molad Y, Amit M, et al. Mode of presentation and multisystem involvement in Behçet's disease: the influence of sex and age of disease onset. *J Rheumatol* 1998;25:1566–9.

39. BENAMOUR S.,CHAOUI S.,BETTAL S.,AMRAOUI A.:maladie de behçet;etude de 673patients;revue de med interne 1999;20 suppl 1
40. K. Janati , K. EL Omari , H. Benchiki , M. Hamdani , H. Lakhdar :Lesmanifestations oculaires de la maladie de Behçet (étude de 50 patientsconsultant en dermatologie) ;Service de dermatologie vénéréologie, CHU Ibn-Rochd, quartier des hôpitaux, Casablanca, Maroc ;Service d'ophtalmologie,hôpital 20-Août, Casablanca, Maroc;revue de medecine interne ; accepté le 20 juin 2005
41. Ben Taarit C, Turki S, Ben Maiz H. Les manifestations rhumatologiquesde la maladie de Behçet : à propos de 309 cas. Rev Med Interne 2001;22:1049–55.
42. NAKAE K.,MASAKI F.,HASHIMOTO T.et coll:recentepidemiologicalfeatures of behcet'sdisease in japon .6éme conference internationale sur laMB;Paris 1993
- 43-Ben Ahmed M, Abdelhak S, Houman MH, Louzir H, El Kares R, Labbane N, et al. Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behçet's disease in Tunisian population. Am J Hum Genet 2000;67(suppl 4):352.
- 44-Zouboulis C. Epidemiology of Adamantiades-Behçet's disease. Ann Med Interne (Paris) 1999;150:488–98.
- 45-Wallace G. HLA-B51 and genes in linkage disequilibrium on chromosome 6. In: Yazici H, Direskeneli H, Hamurydan V, Melikoglu M, Ozdogan H, Yavuz S, editors. 11th International Congress on Behçet's disease. Book of abstracts. Antalya. 2004 (S-128).