

Republique Algerienne Democratique et Populaire
Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA-1



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue d'obtention Du diplôme de Master II

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Bio signalisation cellulaire et moléculaire : Immunologie

Thème

*Validation d'une technique maison pour le typage
HLA-B27 par cytométrie en flux pour le diagnostic
de la Spondylarthrite Ankylosante*

Présenté par : *M^{lle}*. BENHAMADA Chahinez

Date de soutenance : 20/09/2017

Devant le jury composé de :

Mme. KANANE A.	MAA	USDB 1	Présidente
Mme. EDDAKRA A.	MAA	USDB1	Examinatrice
Dr. TAHIAT A.	MAHU	Faculté de Médecine d'Alger Université Alger 1	Promoteur
<i>M^{lle}</i> . LARAB Z.	Généticienne		Co-promotrice

Promotion 2016/2017

Republique Algerienne Democratique et Populaire
Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA-1



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue d'obtention Du diplôme de Master II

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Bio signalisation cellulaire et moléculaire : Immunologie

Thème

*Validation d'une technique maison pour le typage
HLA-B27 par cytométrie en flux pour le diagnostic
de la Spondylarthrite Ankylosante*

Présenté par : *M^{lle}*. BENHAMADA Chahinez

Date de soutenance : 20/09/2017

Devant le jury composé de :

Mme. KANANE A.	MAA	USDB 1	Présidente
Mme. EDDAKRA A.	MAA	USDB1	Examinatrice
Dr. TAHIAT A.	MAHU	Faculté de Médecine d'Alger Université Alger 1	Promoteur
<i>M^{lle}</i> . LARAB Z.	Généticienne		Co-promotrice

Promotion 2016/2017

REMERCIEMENT:

Avant tout, je dois remercier Dieu le tout puissant qui m'a permis de mener à terme ce modeste travail.

Je tiens en premier, à remercier **Dr TAHIAT AZZEDDINE**, Maître assistant en Immunologie au service d'immunologie à Beni Messous ALGER, de m'avoir encadré pendant la réalisation de ce travail, pour ses conseils, sa patience et son soutien : qu'il reçoit l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Mes vifs remerciements vont également à **M. DJIDJIK REDA**, Professeur Chef de service d'Immunologie au service d'immunologie à Beni Messous ALGER, qui m'a honoré en acceptant tout d'abord l'accès à son service.

Tout d'abord ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide exceptionnel du **Dr MEÇABIH F.** Maître assistant hospitalo-universitaire (service immunologie IPA). Je tiens à le remercier pour sa patience, sa disponibilité durant toute la période de mon stage, ainsi que pour tout le temps qu'il m'a consacré

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents ainsi que mes frères et sœurs qui m'ont accordé la liberté d'action et la patience nécessaire pour réaliser ce travail, sans eux je n'en serais pas là.

Sans oublier tout le personnel du service d'immunologie à Beni Messous ALGER qui a sans doute été d'une aide considérable durant la réalisation de ce travail parmi eux ma Copromotrice **M^{lle} LARAB Zineb**.

Enfin. Je remercie toutes les personnes, tous les professionnels qui ont contribuées de près et de loin à l'enrichissement de ce travail et à mon épanouissement intellectuel. Et Je tiens à dire merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant mon stage et qui m'ont toujours soutenu par leurs encouragements comme par leurs critiques.

Dédicace :

Merci Allah (Mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère mère que j'adore.

À mon père, école de mon enfance, qui a été ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

*À mes très chers frères : Housseme et Adel et à ma sœur Kenza.....
qui ont toujours été là pour moi, que dieu les garde et les protège.*

À ma grand-mère qui m'a soutenu avec ses « Douaa »

À mes tantes et oncles.

À chaque cousin et cousine.

À mes meilleurs amis Najah, Imene, Rahima, Nacima, Hassina, Wasid.

À tous ceux qui me sont chers.

À tous ceux qui m'aiment.

À tous ceux que j'aime.

Je dédie ce modeste travail.

BENHAMDA CHAHJNEZ

Résumé

La Spondylarthrite Ankylosante (SPA) est le chef de file d'un groupe d'affections appelés spondylarthropathies ayant plusieurs points communs et un même terrain génétique de susceptibilité représenté par l'antigène d'histocompatibilité HLA-B27. Présent dans 90% des cas, le HLA-B27 est un élément de diagnostic important dans la SPA. Plusieurs techniques sont utilisées pour la recherche de ce marqueur. Dans ce présent travail, Nous avons évalué une nouvelle technique de typage d'antigène l'HLA-B27 à savoir la cytométrie en flux (CMF). Pour cela sur 152 patients avec suspicion de SPA nous avons analysé un échantillon de sang de chaque patient via la CMF pour le phénotypage à la surface des cellules lymphocytaires de la molécule HLA-B27. Ces mêmes échantillons ont été typés pour la recherche d'allèle HLA B27 par PCR en temps réel. Au cours de cette étude, nous avons validé les résultats obtenus par la technique CMF avec les résultats obtenus par la technique RT-PCR qui est le gold standard (une référence) pour définir le statut d'un patient (sain ou malade). Par ailleurs avec les résultats obtenus nous avons déterminé une médiane de 250 pour les valeurs médianes d'intensité de fluorescence ou MFI du marqueur HLA B27 pour chaque patient. Ainsi, les résultats de la médiane des MFI des patients positifs à la présence HLA-B27 par PCR en temps réel était significativement plus élevée que celle des patients négatifs à l'absence HLA-B27 3300 vs 195. En effet, l'anticorps anti-HLAB27 utilisé dans notre test cytométrique peut donner des réactions croisées avec d'autres spécificités HLA ayant une parenté antigénique avec l'antigène HLAB27. Les patients porteurs de ces spécificités peuvent donner des MFI proches de celles des patients HLAB27 positifs. Il existe donc une zone grise dans laquelle peuvent chevaucher les MFI des « vrai » positifs (HLAB27) et celles des faux positifs. Grâce aux résultats de notre étude on a pu définir les bornes 1800 et 2500 comme valeurs médianes de fluorescence de la zone grise. La performance de notre technique a été évaluée à partir de la courbe ROC déterminant ainsi que notre phénotypage par CMF à une excellente sensibilité et spécificité pour la valeur dans le coin supérieur gauche du graphique caractériser par un point 1800 qui présente la plus faible valeur des médianes de fluorescence des échantillons connus positifs par RT-PCR ceci donc est le seuil de positivité. Enfin les résultats obtenus dans notre étude ont une parfaite discrimination entre malade et non malade.

Mots clés : Spondylarthrite Ankylosante, HLA-B 27, PCR-TR.

Listes des abréviations

ADN : Acide Désoxy-Ribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

BET : Bromure d’Ethidium.

CMF : cytométrie en flux

CI : Contrôle Interne.

CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité.

Ct : Cycle threshold.

dNTPs : Désoxyribo Nucléotide TriPhosphate.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

FAM : Acronyme de 6-carboxyfluorescéine.

HCl : Acide Chlorhydrique.

HLA : Human Leucocyte Antigen
(Antigène des leucocytes humains).

HLA-B*27 : l’allèle.

HLA-B27 : la molécule.

KCl : Chlorure de Potassium.

LMP : Large Multiple Protease.

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium.

MIC: CMH class I chain related

PCR- SSO: PCR-Sequence Specific
Oligonucléotide probe.

PCR-SSP : PCR-Sequence Specific
Primer.

SPA : Spondylarthrite Ankylosante.

SA : Spondylarthropathie.

Taq : *Thermus aquaticus*.

Liste des tableaux

Tableau I. Les bandes spectrales des principaux fluochromes utilisées en CMF	22
Tableau II. Les résultats de la spécificité, sensibilité, concordance, VPP, VPN de nos valeurs seuil.....	33
Tableau III. Performance du processus analytique et le seuil de positivité de la CMF....	36

Liste des figures

Figure 1. Cartographie des gènes HLA sur le chromosome 6 humain.....	2
Figure 2. La structure protéique de HLA-classe I	3
Figure 3. Les hypothèses expliquant le rôle pathogène de HLA-B27 dans la spondylarthrite	7
Figure 4. Physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante mécanismes inflammatoires et érosion osseuse	8
Figure 5. Les principales étapes de la réaction de PCR.....	9
Figure 6. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay).....	10
Figure 7. Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	11
Figure 8. Schéma récupératif des différents compartiments d'un cytomètre et son fonctionnement	12
Figure 9. Schéma récapitulatif pour l'étape du marquage.....	22
Figure 10. Schéma récapitulatif de l'étape de la lyse	23
Figure 11. Schéma présente l'acquisition des lymphocytes par le système fluidique à gauche et leurs traitements par le système électroniques à droite	24
Figure 12. Représentation des résultats obtenues par CMF	25
Figure 13. Représentation des résultats des patients positif ou négatif obtenues par CMF ...	26
Figure 14. Chevauchement spectrale.....	26
Figure 15. Schéma explique la notion d'intensité de fluorescence	27
Figure 16. Répartition des patients selon le sexe.....	31
Figure 17. Résultats du typage HLA B27 par PCR en temps réel.....	31
Figure 18. La distribution de nos patients en fonction des différentes valeurs seuils.	33
Figure 19. Variation de la sensibilité et la spécificité du test en fonction du seuil de positivité.	34
Figure 20. La courbe ROC	36

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre I : Recherche bibliographique

I. Système HLA	2
I.1 Génétique	2
I.2 La structure biochimique du HLA-B27 et son fonctionnement.....	2
I.3 La nomenclature du systèmes HLA	3
I.4 Caractéristiques du système HLA.....	4
I.4.1 Polymorphisme HLA	4
I.4.2 Le polymorphisme d'un locus B du HLA-B27	4
II. La spondylarthrite ankylosante (SPA)	5
II.1 Définition.....	5
II.2 Epidémiologie.....	5
II.3 Diagnostic SPA.....	5
III. Rôle HLA-B27 dans la survenue SPA	6
III.1 Les facteurs de risques de SPA	6
III.1.1 La présentation d'un peptide arthritogène par le HLA-B27	6
III.1.2 Anomalies de repliement du HLA-B27	6
III.2 La physiopathologie de la SPA	7
IV. La recherche d'antigène HLA-B27	8
IV.1 Le typage HLA*B27 par PCR-SSP et PCR-TR	8
IV.1.1 PCR-SSP	Erreur ! Signet non défini.
IV.1.2 PCR-TR	9
IV.2 Le phénotypage HLA-B27 par cytométrie en flux	11
IV.2.1 Le fonctionnement du cytomètre en flux	12
IV.2.2 Les applications de la CMF en immunologie.....	13

Chapitre II : Partie pratique

I. Matériels et méthodes.....	21
I.1 Matériels biologique	21
I.1.1 Population d'étude	21
I.1.2 Prélèvements	21
I.2 Méthodes.....	21
I.2.1 Phénotypage HLAB27 par cytométrie en flux.....	21
I.2.1.1 Principe.....	21
I.2.1.2 Mode opératoire.....	22
I.3 Etude statistique	27
II. Résultats.....	31
II.1 Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.....	31
II.2 Résultats du typage HLA B27 par PCR en temps réel	31
II.3 Résultats du typage HLAB27 par cytométrie en flux.....	32
II.4 Détermination du seuil de positivité de la technique par cytométrie en flux	32
II.4.1 Analyse des résultats de la CMF.....	32
II.4.2 Analyse comparative entre les résultats de la CMF et de la RT-PCR	35
II.4.3 Analyse comparative des cas discordants entre les résultats de la CMF et de la RT-PCR et la PCR-SSP	Erreur ! Signet non défini.
II.4.4 Performance du processus analytique et le seuil de positivité de la CMF.....	36
III. Discussion.....	37
IV. Conclusion et perspective	32

Introduction

La spondylarthrite ankylosante (SPA) est un rhumatisme inflammatoire chronique atteignant principalement le rachis et les articulations sacro-iliaques, mais qui peut également toucher les articulations des membres. Des épisodes d'arthrites ainsi que des inflammations des tendons et des ligaments peuvent également être liés à cette pathologie, qui vont se manifester par des douleurs avec raideurs de plusieurs articulations. **(Dougados., 2005)**

La maladie est chronique, évolutive et handicapante, atteint les individus habituellement jeunes dans 80% des cas, plutôt les hommes que les femmes. La SPA se manifeste dans 0,2% de la population générale, cette prévalence de la SPA serait en étroite corrélation avec la fréquence du HLA-B27 dans les différentes populations, ce qui se traduit au niveau mondial par l'existence d'un gradient décroissant nord/sud. Quant à neuf patients sur 10 souffrant de SPA portent le gène d'histocompatibilité HLA B27. **(Astier et al, 2013 ; Claudepierre et al, 2009 ; Saraux et al, 2000)**

En effet, le dépistage HLA-B27 chez les patients atteints d'une SPA est associé à la multiplicité des techniques du laboratoire biologique, chacune avec ses avantages et inconvénients. L'étude du polymorphisme HLA est liée par deux approches, l'une est sérologique qui détermine la présence de cette protéine ou antigène à la surface cellulaire ; et l'autre est moléculaire et caractérisée par l'étude génomique globale des exons. **(Moalic., 2008)**

Cependant la détermination de l'HLA B27 par cytométrie a l'avantage d'être objective, quantitative et multiparamétrique des cellules en suspension, et qui nécessite moins de temps par rapport aux autres techniques ; Mais elle dépend aussi de l'expression de la molécule recherché à la surface cellulaire et à la sensibilité aux changements conformationnels de l'antigène HLA-B27, qui sont à l'origine des ressemblances moléculaires avec d'autres groupes HLA de classe I (Groupe B7 GREC). **(Christine et al, 2014 ; Levering et al, 2003)**

Du fait que les techniques de référence (technique de biologie moléculaire exp : la PCR-SSP ; RT-PCR) utilisées pour le typage d'antigène HLA-B27 ne sont pas adaptées à l'activité de routine d'un laboratoire d'immunologie biologique. L'utilisation de la cytométrie en flux est une alternative performante, mais elle implique une importante phase de validation propre à chaque laboratoire **(Monneret et al, 2000)**. Donc qu'elles sont les procédures à suivre pour valider notre technique de la cytométrie en flux ?

La validation de cette technique est l'objectif de notre étude, qui consiste à phénotypée un mélange hétérogène de populations cellulaires afin de quantifier l'expression de l'antigène HLA-B27 via l'intensité de fluorescence moyenne (MFI), et ensuite l'optimisation de la technique par la détermination des seuils de positivité et de négativité éventuellement séparés par une zone grise. D'autre part nous avons évalué les performances du processus analytique de cette technique.

*Recherche
bibliographique*

Bien que les systèmes Antigènes du Leucocytes Humains HLA soient mieux connus pour leur rôle dans la transplantation, du moins certaines sont aussi associées à des maladies spécifiques. Faisant partie la molécule HLA-B27 qui est fortement associée à un certain nombre de maladies rhumatismales, y compris la spondylarthrite ankylosante. (Seipp et al, 2005)

I. Système HLA

I.1 Génétique

La découverte du système HLA remonte en 1958 par Jean Dausset, les molécules HLA sont des protéines de surface cellulaire résultant de l'expression des différents gènes réunis sur un segment chromosomique unique qui forme le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Chez l'homme le CMH est situé sur le bras court du chromosome 6 (6p22.1 à 6p21.3), une région qui s'étale sur environ 3,6 méga bases. Cette région est composée d'environ 200 gènes dont 40 codent pour les antigènes tissulaires HLA de classe I et de classe II. Ces molécules sont importantes pour que les cellules du système immunitaire différencient le *soi* du *non soi* et communiquent entre elles dans le but d'avoir une réponse immune contre les antigènes protéiques étrangers et dans l'élimination des cellules qui expriment à leur surface des antigènes protéiques anormaux d'origine microbienne, tumorale ou allogénique. (Toussirot et al, 2012 ; Semana., 2002 ; kuby., 2008)

De la région télomérique vers la région centromérique on trouve les gènes HLA de classe I, répartis en plusieurs groupes (A, B et C) dont HLA-B27 qui représente un variant allélique du gènes B, codent pour des antigènes présents sur toutes les cellules nucléées de l'organisme et interviennent dans la présentation des peptides endogènes aux lymphocytes T CD8+. (kuby., 2008)

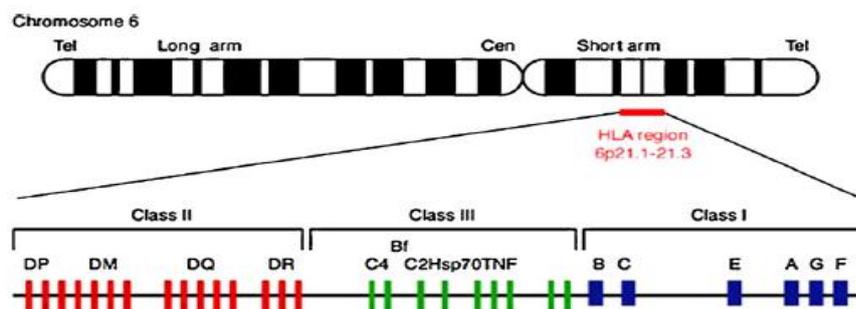


Figure 1. Cartographie des gènes HLA sur le chromosome 6 humain (Moalic, 2008)

Les gènes de classe I sont localisés en position télomérique avec les 3 principaux loci A, B, C. (Semana., 2002)

I.2 La structure biochimique du HLA-B27 et son fonctionnement

HLA-B27, comme toute molécule HLA de classe I, est un hétérodimère de nature protéique, formé par l'association non covalente d'une chaîne lourde α de 45 kDa avec une chaîne légère β 2-microglobuline (12kDa) codée par un gène situé sur le chromosome 15. L'interaction du

peptide antigénique et de la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) à la chaîne lourde α est nécessaire pour la stabilisation et l'expression de ces molécules à la surface cellulaire. (Kuby., 2008)

La structure tridimensionnelle de cette molécule révèle que la chaîne lourde compte une partie intracytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire organisée en 3 domaines externes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$). Une cavité de liaison au peptide (sillon) s'organise suite à l'interaction des feuillets plissés β et des hélices α des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Cette structure est suffisamment large pour accueillir des peptides de 8 à 11 acides aminés, bien qu'il ait été montré que le B27 peut présenter des peptides jusqu'à 33 acides aminés (Moalic., 2010). Les domaines $\alpha 3$ et la $\beta 2m$ sont organisés en 2 feuillets plissés β caractérisés par un repliement immunoglobulinique. Les séquences d'acides aminés du domaine $\alpha 3$ sont conservés et contiennent un site de liaison au corécepteur CD8 des lymphocytes T. (Abbas et al, 2009)

Les antigènes endogènes doivent acquérir une forme pour se lier à la cavité (sillon) HLA. Pour cela, l'antigène protéique étrangère est clivé par le protéasome, puis transporté activement sous forme de peptide à travers le réticulum endoplasmique avant de se fixer dans les poches de A à F du sillon par l'intermédiaire des résidus d'ancrage de P1 à P9 spécifiques au peptide. Ces étapes représentent le mécanisme d'apprêtement antigénique. Du fait qu'il y a une complémentarité entre la molécules HLA de classe I et le peptide constituent pour cela un complexe reconnu au moyen de leurs résidus par le Récepteur des Cellules T (TCR) du lymphocyte CD8+, le polymorphisme de ces résidus influent sur la capacité de liaison du peptide ou modifie la reconnaissance par le TCR. (Abbas et al, 2009 ; Klein et sato, 2000)

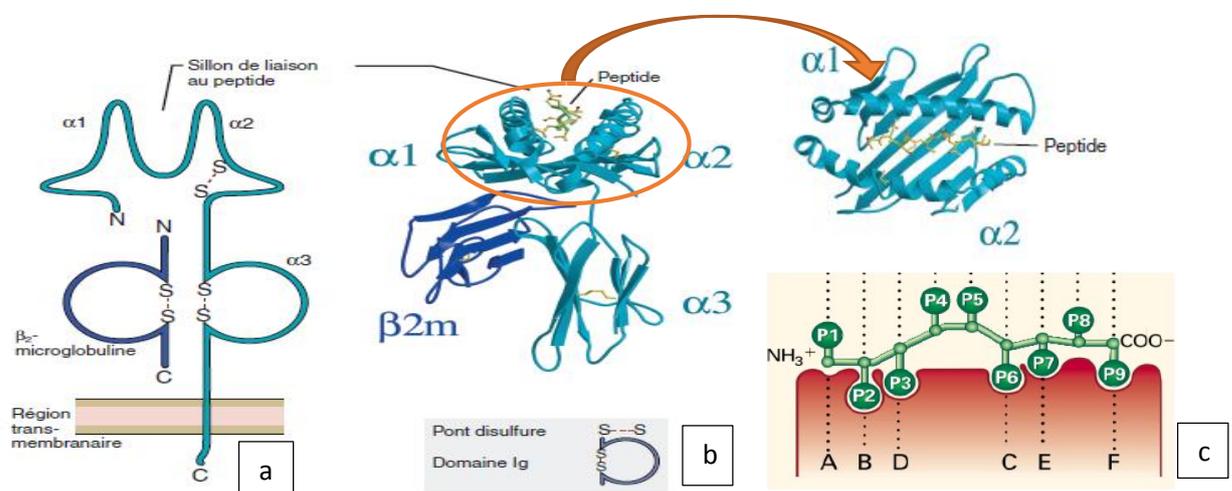


Figure 2. La structure protéique de HLA-classe I (Abbas et al, 2009 ; Klein et sato, 2000)

(a) schéma représente la chaîne lourde α constituer des domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), le sillon et la $\beta 2$ -m, (b) structures cristallines de la molécule HLA, (c) représentation cristalline et schématique de la liaison du peptide via ces ancrage dans les poches du sillon de A à F.

I.3 La nomenclature du systèmes HLA

Le système de nomenclature HLA initialement basé sur la nomenclature sérologique qui comporte le locus (HLA-B) suivi d'un numéro identifiant l'antigène (27, 51,...) a été

complété par la nomenclature génétique qui définit les gènes HLA et leurs différents variants alléliques. Selon la nomenclature HLA-B*27:05:02, on interprète que le locus est suivi d'un astérisque (*) suivi de 3 champs séparés par le signe « : ».

- Le premier champ qui définit le groupe allélique (ex : HLA-B*27), est l'équivalent de la définition sérologique.
- Le deuxième champ désigne les mutations de type faux sens dans les régions codantes du gène (HLA-B*27:05). Donc chaque allèle code une protéine différente.
- Le troisième champ désigne les mutations synonymes dans les régions codantes. (Antony., 2016).

I.4 Caractéristiques du système HLA

L'étude du CMH de centaines d'individus différents a fait découvrir son extrême *polymorphisme* qui désigne les différences entre deux êtres d'une même espèce, chez qui un phénotype, ou caractère est présent sous au moins deux forme (allèles). Ce polymorphisme est dû à l'apparition de mutation génétique au cours de l'évolution, et peut être expliqué par l'existence de nombreux allèles qui définissent le caractère unique de chaque individu. (Jacques et al, 2014)

L'existence d'un système immunogénétique très polymorphe et aux fonctions immunitaires primordiales dans l'initiation et le contrôle de la réponse immune, a encouragé très tôt des travaux de recherche de susceptibilité à certaines pathologies. L'exemple rapportée en 1973 de l'association la plus ancienne et l'une des plus fortes entre HLA-B27 et la spondylarthrite ankylosante. (Cesbron Gautier., 2007)

I.4.1 Polymorphisme du HLA

Le polymorphisme génétique multiallélique : il existe dans l'espèce humaine un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA classique (plusieurs centaines pour la plupart d'entre eux: ce sont les gènes les plus polymorphes de l'espèce humaine).

Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA de classe I et de classe II, et n'exprime qu'un ou deux des allèles de chaque gène présent dans l'espèce humaine. Cette caractéristique rend chaque individu quasiment unique.

Le polymorphisme de la protéine correspondante (allotype HLA) : chaque allèle code pour une protéine caractérisée par un ou plusieurs acides aminés (variants) comparée aux protéines codées par d'autres allèles. (Bahram et al, 2013)

I.4.2 Le polymorphisme d'un locus B du HLA-B27

On compte jusqu'à 4242 allèles du locus B codant pour 3131 protéines différentes, le locus à partir duquel HLA*B27 inclut 188 allèles qui codent pour 147 protéines différentes (HLA-B27:01 à HLA-B27:147), (Antony., 2016) résultant principalement des variations nucléotidiques des exons 2 et 3 qui codent pour les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du fonctionnement de la protéine (antigène tissulaire HLA-B27). (Moalic., 2008)

Ces allèles se distribuent différemment selon les régions géographiques, certains sont très fréquents, tel que l'allèle ancestral HLA-B*27:05 duquel tous les autres allèles proviennent par mutation et présentent en commun la même poche B (de la structure protéique HLA-B27).

Mais d'autres semblent présenter des modifications structurales au niveau de la poche F des variants B*27:06 et B*27:09, qui leurs confèrent un risque moindre de présenter la maladie de la spondylarthrite ankylosante. (Végvári., 2009 ; Bowness., 2015 ; Moalic., 2010)

II. La spondylarthrite ankylosante (SPA)

II.1 Définition

Le mot *spondylarthrite* est dérivé des mots grecs *spondylos* (vertèbre) et *artron* (articulation), avec un suffixe *ite* qui signifie inflammation. Le nom suggère donc qu'il s'agit d'un rhumatisme inflammatoire touchant essentiellement la colonne vertébrale (au niveau du rachis). Le terme *ankylosante*, lui fait référence à une complication qui survient au bout de plusieurs années d'évolution de la maladie. Elle s'explique par un fusionnement des zones de contact entre les os, rendant ces derniers très rigides, en particulier ceux des articulations rachidiennes et ceux qui sont entre le sacrum et l'os iliaque (sacro-iliaque), d'où l'ankylose. (Asim khan., 2002 ; Braem et Lories, 2011)

II.2 Epidémiologie

La spondylarthrite ankylosante se produit dans 0,2% de la population générale, elle atteint les deux sexes, mais elle est plus fréquente chez l'homme. Elle s'interprète par un sexratio moyen de deux à trois hommes pour une femme atteinte conformément aux études récentes. Cette pathologie peut survenir à tout âge, mais pour 80% des cas environ elle se manifeste chez l'adulte jeune, entre 18-30 ans. Notons ainsi l'existence des formes à début plus précoce (SA juvénile) à 15 % et plus tardif, avec 5% des cas après l'âge 45 ans. (Claudepierre et al, 2009 ; Saraux et al, 2000 ; Tae-Jong Kim et Tae-Hwan, 2010)

La prévalence de la SA serait en étroite corrélation avec la fréquence du HLA-B27 dans les différentes populations, ce qui se traduit au niveau mondial par l'existence d'un gradient décroissant nord/sud. (Astier et al, 2013)

II.3 Diagnostic SPA

La spondylarthrite ankylosante évolue sous la forme de poussées douloureuses interrompues par des périodes où les symptômes sont absents ou tout au moins, moins prononcés. Donc pour poser le diagnostic, on dispose d'une part de l'imagerie et d'autre part des examens biologiques. Cependant tant que les manifestations radiologiques ne sont pas apparues dans le cas d'une SPA il est alors utile, de rechercher la présence du gène HLA B27 adapté par les critères de diagnostic d'Amor, ESSG (*European Spondyloarthritis Study Group*) et d'*Assessment in Spondyloarthritis International Society*. (Wendling, Racadot., 2006)

La recherche HLA-B27 ne doit pas être systématique. Cet examen n'apporte rien quand le diagnostic clinique est évident et n'a pas de valeur pronostique en termes de sévérité ou d'évolution de la maladie. (Labalette, Béné et al, 2014)

En aucun cas la présence de HLA- B27 ne permet à elle seule de poser le diagnostic de SPA, ni de prédire le risque de survenue de la maladie chez un sujet sain. Une fois réalisé, il ne doit pas être répété. Enfin, l'absence de HLA-B27 n'exclut pas le diagnostic de SA. (Labalette, Béné et al, 2014)

III. Rôle HLA-B27 dans la survenue SPA

La SA est un exemple parfait de maladie multifactorielle. En effet, de nombreux facteurs semblent impliqués, ce qui rend difficile la compréhension de sa physiopathologie. Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer son déclenchement et sa progression. Si l'influence des facteurs génétiques, et notamment du HLA-B27, semblent indiscutables, d'autres facteurs, environnementaux (stress mécanique, infection bactérienne...), seraient nécessaires pour l'apparition de la maladie. (Astier., 2013)

III.1 Les facteurs de risques de SPA

III.1.1 La présentation d'un peptide arthritogène par le HLA-B27

L'une des caractéristiques spécifiques retrouvée pour les allèles associés aux SPA est la présence d'acide glutamique en position 45 et de cystéine en position 67 dans la poche B de la molécule HLA-B27, perturbant ainsi sa fonction normale. Des théories fonctionnelles ont donc émergé, basées sur cette composition en acides aminés de la poche B qui confère une sélection et une spécificité pour la liaison de peptides comportant une chaîne latérale d'arginine, à l'origine de la théorie du peptide arthritogénique. (Anikó Végvári et al, 2009)

III.1.2 Anomalies de repliement du HLA-B27

La caractéristique de la poche B provoque des anomalies de repliement (*misfolding*) des HLA-B27, soit par un repliement ralenti lors de son assemblage, soit par la présence de ponts bisulfures entre deux cystéines en position 67 des chaînes lourdes α formant des homodimères. Ces malformations protéiques ont tendance à s'accumuler, plaçant les cellules dans une situation de stress du réticulum endoplasmique soumis à une réponse *Unfolded Protein Response* (UPR), qui a pour but d'augmenter les capacités d'éliminer ces protéines ou de leur conférer une structure spatiale correcte via les protéines chaperonnes *Immunoglobine Binding Protein* (BIP). Par contre, ce stress participe à l'activation du facteur de transcription NF-kB de l'une des voies de synthèse des cytokines pro-inflammatoires, augmentant pour cela la réponse inflammatoire. (Miceli-Richard., 2010 ; Moalic., 2010 ; Pham., 2008)

Les données actuelles convergent vers l'importance du *misfolding* du B27 dans la genèse d'une réponse inflammatoire, au détriment des autres hypothèses qui n'ont jamais réellement fait leurs preuves, comme par exemple le mimétisme moléculaire (homologie de séquence) entre HLA B27 et certaines peptides bactériens (*Klebsiella pneumoniae*). (Toussirot., 2012)

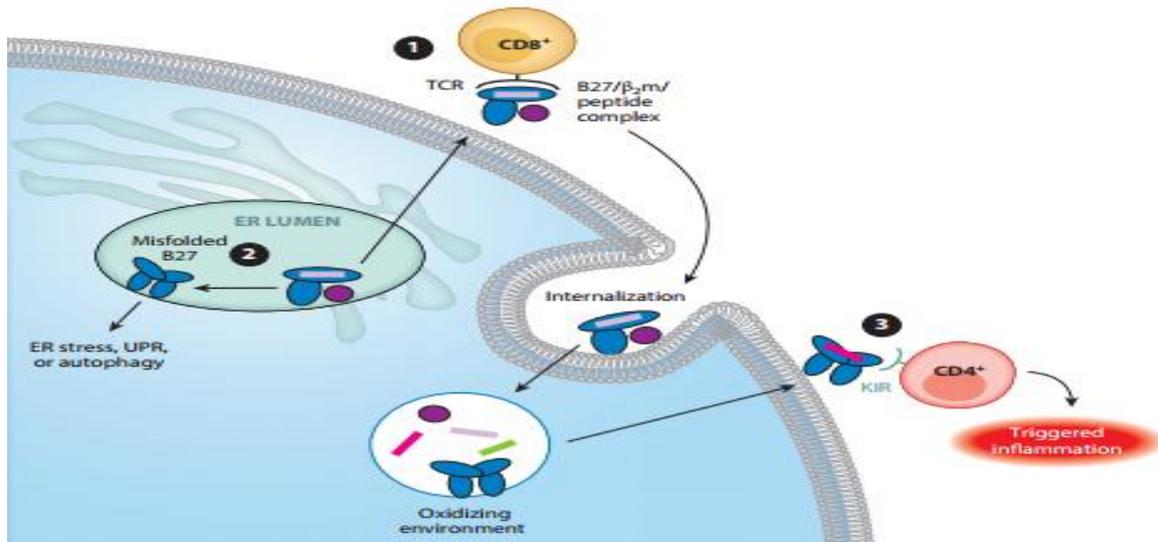


Figure 3. Les hypothèses expliquant le rôle pathogène de HLA-B27 dans la spondylarthrite (Bowness., 2015)

III.2 La physiopathologie de la SPA

La maladie s'exprime par une persistance à la fois de l'inflammation (processus d'érosion osseuse) et sa progression structurale par une production de nouveau cartilage et os (processus de cicatrisation). (Braem, Lories., 2011 ; wendling et al, 2008)

C'est au niveau de l'enthèse que le processus inflammatoire aura lieu. On essaye d'assembler les différentes théories discutées auparavant sur les facteurs déclenchant l'affection, nous parviendrons à débattre sur l'existence des *réactions de reconnaissance* mettent un point commun sur la stimulation des voies de signalisation intracellulaires des cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) pour la production des médiateurs inflammatoires TGF β , TNF- α et les interleukines c'est ainsi que l'inflammation apparait.

Le processus d'érosion osseuse s'effectue par la présence Il-17 et TNF- α qui agissent sur les monocytes, macrophages et chondrocytes pour la synthèse des métalloprotéinases (MPP) et des monoxydes d'azotes (NO) contribuent à la destruction articulaire. Une ostéoclastogenèse est ainsi induite par l'adhérence des ostéoclastes à l'os sécrétant des acides décalcifiant l'os puis des enzymes qui vont digérer le collagène de l'os.

L'environnement inflammatoire est réduit à la suite du remodelage osseux par les ostéoblastes c'est l'ostéoclastogenèse. Ce processus est expliqué par la synthèse des signaux moléculaires (prostaglandine, BMPs, WNT), interviennent dans la régulation et la différenciation des ostéoblastes qui libèrent au fond de la lacune de résorption de microfibrille de collagène ainsi la phosphatase alcaline enzyme fondamentale impliquée dans la minéralisation de la matrice osseuse. (Astier et al, 2013)

Enfin les facteurs déclenchant l'inflammation et sa persistance jouent un rôle au déséquilibre de la balance ostéoclastogenèse et ostéoformation qui à ce jour reste une énigme pour la physiopathologie SA.

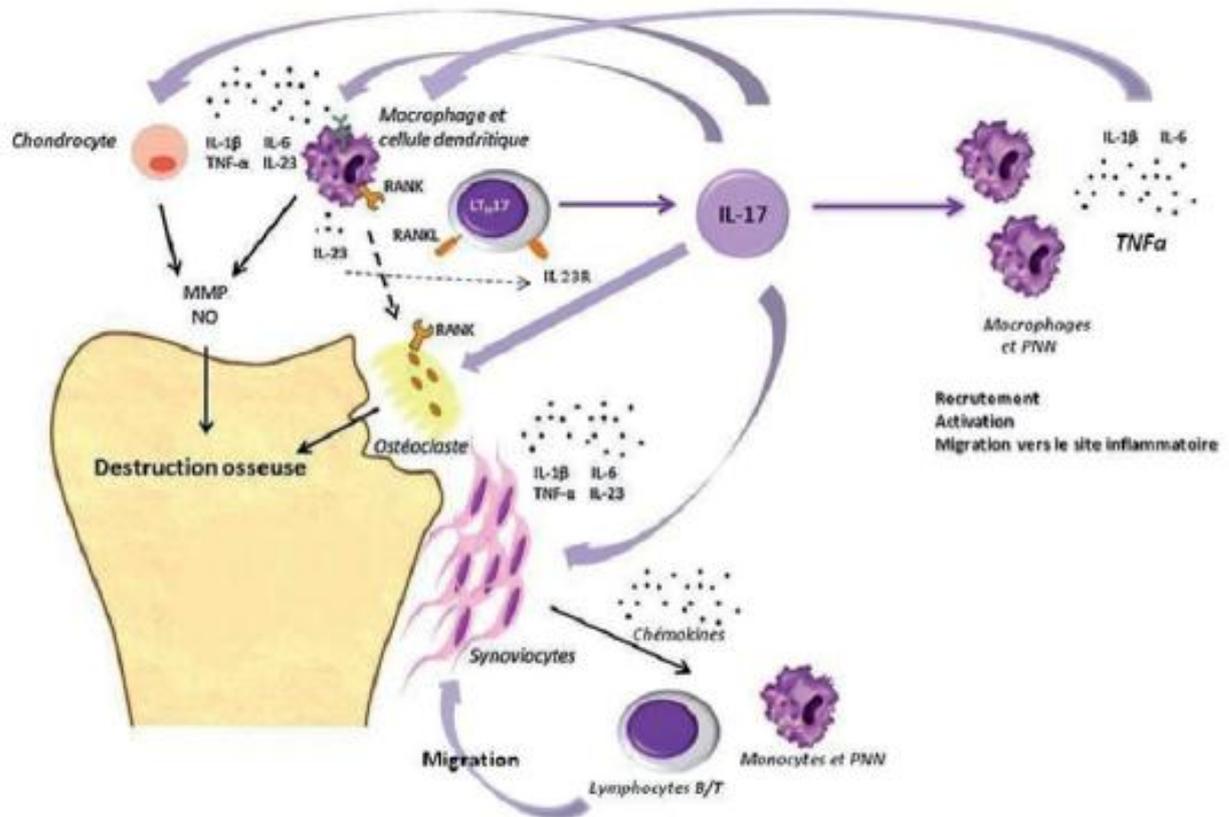


Figure 4. Physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante mécanismes inflammatoires et érosion osseuse (Astier et al, 2013)

IV. La recherche d'antigène HLA-B27

En biologie cellulaire le *phénotypage*, c'est la présence ou l'absence de l'antigène HLA-B27 à la surface des lymphocytes du sang périphérique déterminée à l'aide d'un anticorps monoclonal via les techniques de la microlymphocytotoxicité et la cytométrie en flux. Et le *typage*, c'est la présence ou l'absence de l'allèle HLA-B27 qui nous permet de définir des allèles spécifiques et de déterminer le type HLA d'une personne, par biologie moléculaires utilisant la réaction de PCR. A partir de cette méthode de base, différentes variantes de la PCR ont été développées citons *La réaction en chaîne par polymérase en temps réel* PCR-TR utiliser comme techniques de référence dans notre étude. (Labalette, Béné et al, 2014)

IV.1 Le typage HLA*B27 par PCR-TR

IV.1.1 La réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Depuis son invention, la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. (Poitras et Houde, 2002)

Elle se décompose en trois étapes : une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation avec des amorces et une étape d'élongation par l'ADN polymérase en présence de bases nucléotidiques ou désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP). Les produits de chaque cycle de synthèse servent de matrice pour les cycles suivants, ainsi une amplification

exponentielle de l'ADN est réalisée Les produits PCR seront détectés après incubation en présence de sondes oligonucléotidiques marquées qui se fixent à différentes positions polymorphes spécifiques pour un allèle ou un groupe allèlique. (Moalic., 2008)

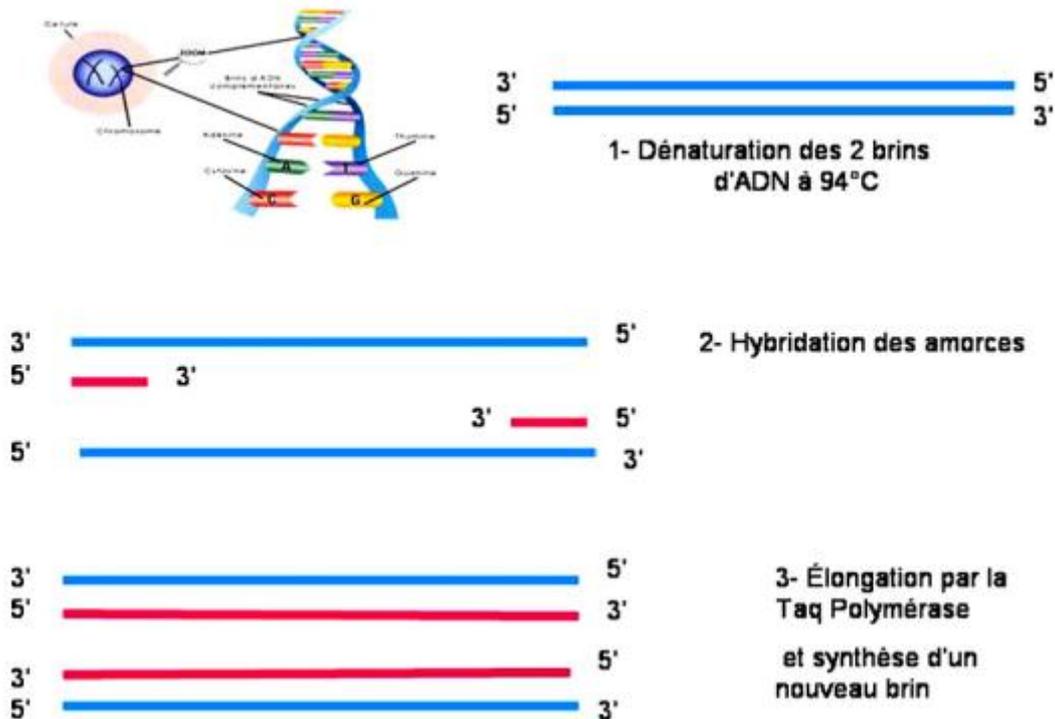


Figure 5. Les principales étapes de la réaction de PCR (Moalic., 2008)

IV.1.2 PCR-TR

La technique repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle. (Poitras et Houde, 2002)

Notre technique de référence est basée sur la technologie d'hydrolyse de sondes (Taqman assay) pour la détection quantitative des amplicons.

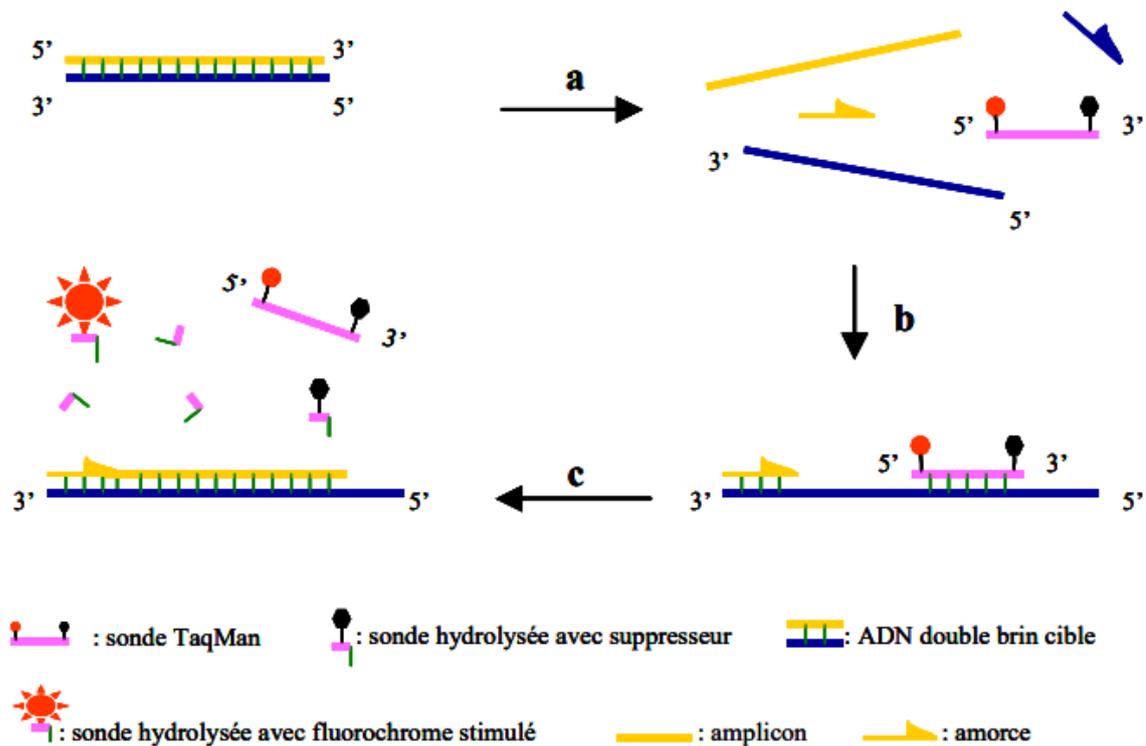


Figure 6. Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) (Poitras et Houde, 2002)

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. (Poitras et Houde, 2002)

Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus. (Poitras et Houde, 2002)

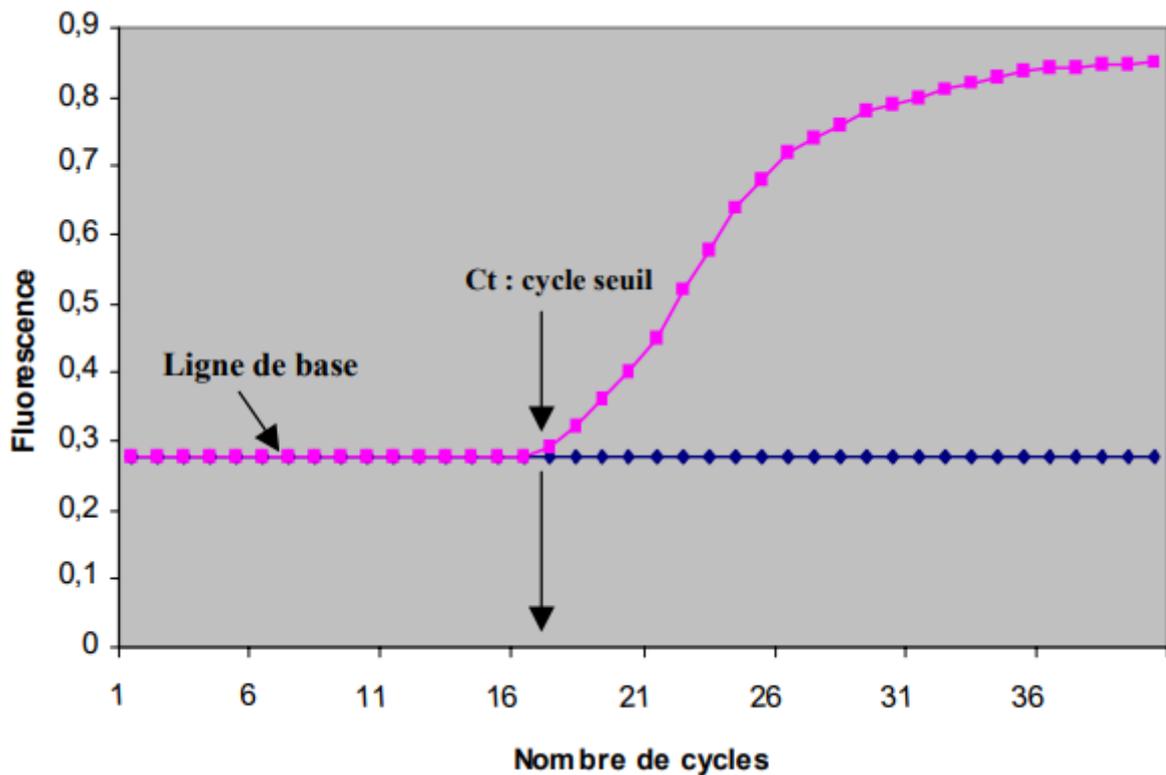


Figure 7. Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. (Poitras et Houde, 2002)

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base. (Poitras et Houde, 2002)

IV.2 Le phénotypage HLA-B27 par cytométrie en flux

La *cytométrie* à pour la signification *Cyto* (cellule) et *Métrie* (mesure) qui permet la mesure des propriétés d'une population cellulaire. (Terra, 2012) Cette technique est révolutionnaire car elle permet une mesure individuelle des caractéristiques physiques et biologiques des cellules ou des particules. En utilisant la fluorescence, les systèmes fluidiques, optiques et informatique rendent possible le traitement simultané de 4, 8, 16, 30 voire 50 paramètres différents, mais aussi elle permet une analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules en suspension. (Christine et al, 2014 ; Portalès., 2013)

Le principe fondamental de la cytométrie en flux est basé sur le défilement d'un flux de cellules une à une devant la source lumineuse ce passage constitue le point d'intersection ou d'interrogation et depuis ce point, différents canaux optiques (signaux lumineux) sont générés, séparés et focalisés par les filtres et les miroirs pour être acheminés vers les photodétecteurs et transformés en signaux électriques, amplifiés et digitalisés une valeur codée en bits est utilisable par le système informatique. (Leach et al, 2013)

IV.2.1 Le fonctionnement du cytomètre en flux

Une fois les cellules marquées et injectées dans l'appareil, deux événements se produisent lorsqu'elles atteignent le point d'intersection (point d'interrogation) du faisceau laser.

Premier événement : concerne la collecte des propriétés physiques de la cellule sans l'intervention de réactifs exogènes. En effet, une fois que la cellule coupe le rayon laser, la lumière est diffractée. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe (angle $< 10^\circ$), est proportionnelle à la taille de la cellule pour le paramètre *Forward Light Scatter* (FSC) ce signal sera capté et traité par le photodiode ; celle réfractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (complexité interne ou granulosité) pour le paramètre *Side Scatter* (SSC). (Terra., 2012)

Deuxième événement : implique des réactifs exogènes tels que des anticorps couplés à des fluorochromes (ex. marqueurs du typage HLA-B27) ou des réactifs avec des propriétés de fluorescence. La diffusion de ces signaux avec ceux du paramètre SSC du premier événement est orientée selon les différentes longueurs d'ondes et traitée par différents photomultiplicateurs (PMT). (Terra., 2012 ; Marie et al, 2013)

Ces fluorochromes absorbent l'énergie lumineuse et réémettent une lumière avec une énergie plus faible mais une longueur d'onde plus élevée que leur longueur d'onde d'absorption. Grâce à cette fluorescence on pourra alors déterminer d'une part si le marqueur recherché est positif (la majorité des cellules l'exprime), partiellement positif (moins que la moitié des cellules l'exprime) ou négatif (aucune ou très peu de cellules l'exprime). D'autre part, on pourra déterminer dans le cas des cellules positives si l'antigène est fortement ou faiblement exprimé puisque l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la densité antigénique à la surface ou à l'intérieur des cellules. (Terra., 2012)

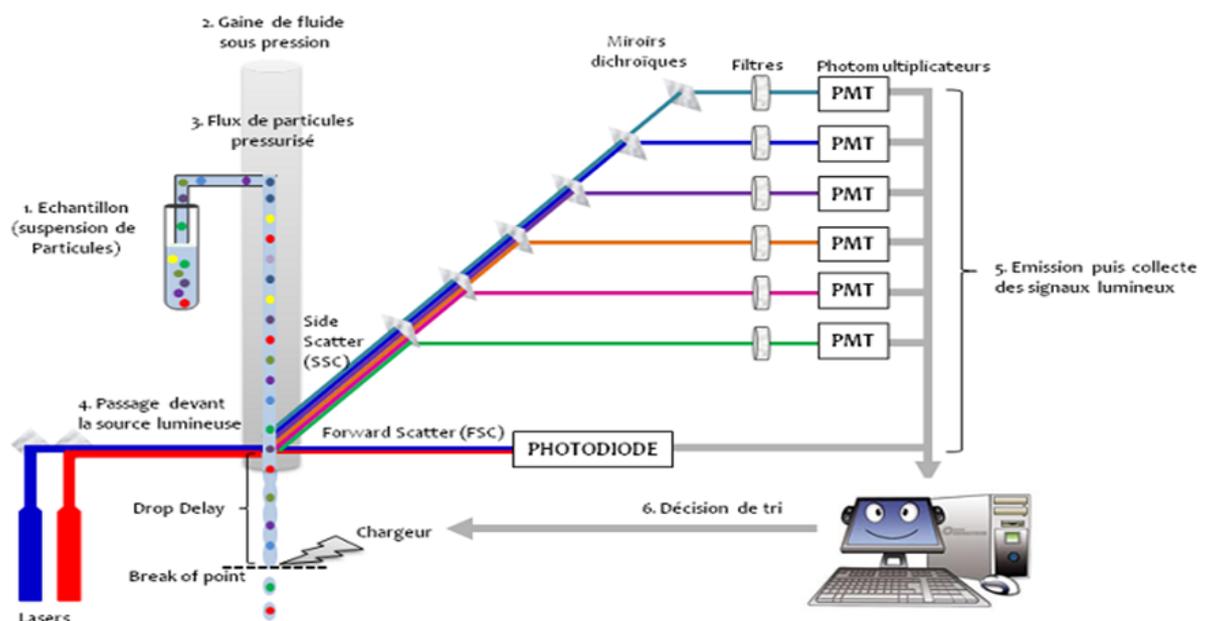


Figure 8. Schéma récapitulatif des différents compartiments d'un cytomètre et son fonctionnement

IV.2.2 Les applications de la CMF en immunologie

La *cytométrie* en flux (CMF) est utilisée dans le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs et permet l'identification de la lignée en cause (lymphocytes B ou T/NK) ce qui rend l'approche diagnostique très précise. Elle est de plus en plus utilisée dans le cas du myélome multiple pour émettre ou confirmer un diagnostic et évaluer la réponse thérapeutique. Elle représente en revanche, dans l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN), la seule technique qui permet à ce jour son diagnostic biologique. (Terra., 2012)

En immunologie clinique, La recherche est confrontée à la diversité et la complexité des différents paramètres cellulaires et moléculaires constituant le système immunitaire. La CMF est capable donc de lui permettre une étude de cette polyvalence.

En effet, elle permet une *analyse quantitative* très précise de la concentration des événements analysés et de la densité de la molécule cible à la surface cellulaire, ainsi que le nombre d'éléments analysés. Son *analyse multiparamétrique* offre la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs paramètres cellulaires, et génère des données statistiques individuelles pour chaque population. Grâce à *la sensibilité de détection*, elle peut comparer le signal émis par la cellule en présence d'un marqueur spécifique au bruit de fond émis par les cellules seules ou incubées avec un marqueur non spécifique. *Sa rapidité* repose sur une moyenne d'analyse de 1000 cellules par seconde. Elle comporte un processus *de tri cellulaires* qui a pour but de définir des sous-populations de la population globale : la veine liquide est chargée électriquement, puis fractionnée en une succession de gouttelettes déviées en passant dans un champ électrostatique et récupérées dans un récipient collecteur. Les critères de tri sont déterminés par l'utilisateur. Plusieurs concepts concernant les fonctions cellulaires sont clarifiés, par exemple la production de cytokines, l'apoptose, la phagocytose, la dégranulation des basophiles et l'analyse du cycle cellulaire et dans la réalisation des analyses antigéniques et fonctionnelles sur différents types de cellules eucaryotes et procaryotes. (Leopold., 2011)

Cette technique a l'avantage de nécessiter moins de temps par rapport aux autres techniques, mais elle est sensible à des changement conformationnels de l'antigène HLA-B27 qui offrent des similitudes moléculaires avec d'autres groupes HLA de classe I le B7 CREG (*Cross Reactive Group*), comprenant B13, B22, B27, B40, B41, B42, B47. Pendant le test, les anticorps monoclonaux réagissent de manière croisée avec ces déterminants antigéniques et ces réactions croisées influent sur la fiabilité des résultats lors du dépistage HLA-B27 par cette technique contribuant ainsi à l'objectif de notre étude détaillées dans la partie II.

Chapitre II

*Matériels
et méthodes*

Le stage de fin d'études que j'ai effectué au sein du service d'immunologie du centre hospitalo-universitaire Beni Messous, m'a permis d'acquérir des connaissances pratiques. J'ai eu en effet l'opportunité de réaliser, avec l'aide des biologistes et des immunologistes une étude de validation de l'une des techniques de biologie cellulaire basée sur le principe de la CMF. Les résultats de cette étude ont permis d'évaluer les performances du processus analytique de cette technique.

I. Matériels et méthodes

I.1 Matériels biologique

I.1.1 Population d'étude

Afin d'atteindre nos objectifs nous avons réalisé un travail de collaboration avec le laboratoire d'histocompatibilité et d'immunogénétique du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) qui nous a fourni les échantillons de sang total (sur EDTA) de 152 patients avec une suspicion de SA. Ces patients ont été typés pour le HLA B27 par PCR en temps réel que nous avons utilisés comme technique de référence. Ces mêmes échantillons ont été phénotypés pour le HLA B27 sous moins de 48 heures au niveau de l'unité d'immunologie cellulaire du service d'immunologie du CHU Beni Messous par cytométrie en flux.

I.1.2 Prélèvements

Pour chaque patient un prélèvement veineux sur deux tubes EDTA a été effectué. Le premier a été utilisé pour le typage par PCR en temps réel tandis que le deuxième a servi pour la détermination par cytométrie en flux. Les tubes dédiés à la biologie moléculaire étaient congelés à -20°C avant leur utilisation alors que ceux utilisés en cytométrie étaient conservés à température ambiante (position allongée) et analysés dans un délai maximum de 48 heures.

I.2 Méthodes

I.2.1 Phénotypage HLAB27 par cytométrie en flux

I.2.1.1 Principe

Le principe de cette technique est basé sur la recherche de l'antigène HLAB27 à la surface des lymphocytes T (CD3+) en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD3 permettant de cibler les lymphocytes T (anticorps de "gating" ou de fenêtrage) et des anticorps anti-HLAB27 qui permettent d'apprécier l'expression de la HLAB27 à la surface de ces derniers. Après une étape de préparation de l'échantillon, qui consiste à obtenir une suspension de cellules sanguines marquées par des anticorps monoclonaux, les cellules sont analysées une à une par un cytomètre en flux qui détermine leur taille et structure interne (ce qui permet de distinguer les lymphocytes des granulocytes et des monocytes) ainsi que l'intensité d'expression des différents fluorochromes. Les moyennes/médianes d'intensité de fluorescence du FITC, fluorochrome couplé à l'anticorps anti-HLAB27, sont calculées pour chaque patient grâce au logiciel d'acquisition de données qui pilote le cytomètre.

I.1.1.2 Mode opératoire

a. Préparation de l'échantillon

❖ Le marquage

Une prise de 50 μ l du sang total est déposée au fond d'un tube spécialement dédié à la CMF puis additionnée de 2,5 μ l d'un mélange de deux anticorps monoclonaux marqués par des fluorochromes : anti-CD3 marqué au PE (pour le ciblage des lymphocytes T) et anti-HLAB27 marqué au FITC (firme : BDTM biosciences, USA). Le volume d'anticorps recommandé par le fabricant (BDTM biosciences) est de 30 μ l mais nous avons mis au point un test « maison » dans lequel la quantité d'anticorps utilisée est divisée par dix.

La combinaison des volumes appropriés (sang et réactifs) doit être agitée au vortex et incubée 20 minutes à l'abri de la lumière qui permet la fixation des anticorps de manière spécifique sur leurs cibles antigéniques.

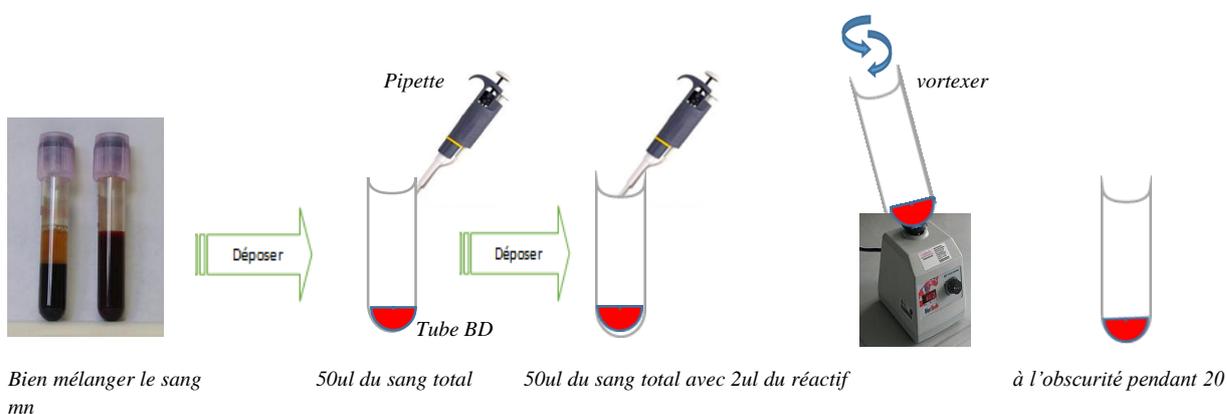


Figure 9. Schéma récapitulatif pour l'étape du marquage

❖ La lyse

La détection des lymphocytes dans le sang périphérique dépend de l'élimination des cellules interférentes par la méthode de sang total lysé qui est moins susceptible de montrer une perte de sous populations lymphocytaires et peut aider à améliorer la reproductibilité de l'analyse.

On prépare le concentré de la solution (BD FACS Lysing Solution) par le diluée 10X avec l'eau désionisée. Un volume de 2 ml de cette solution est ajouté aux tubes de nos échantillons ce qui permet de lyser les érythrocytes dans des conditions hypotoniques favorables tout en préservant les leucocytes. Les tubes sont ensuite bien agités au vortex et incubés à l'abri de la lumière pendant 10 mn, une centrifugation de 5 mn à 0,5 RCF (Force Centrifuge Relative) est ensuite réalisée pour séparer les différents composants du fluide pour qu'ensuite en récupérer le précipité des leucocytes et éliminer le surnageant des érythrocytes lysés.

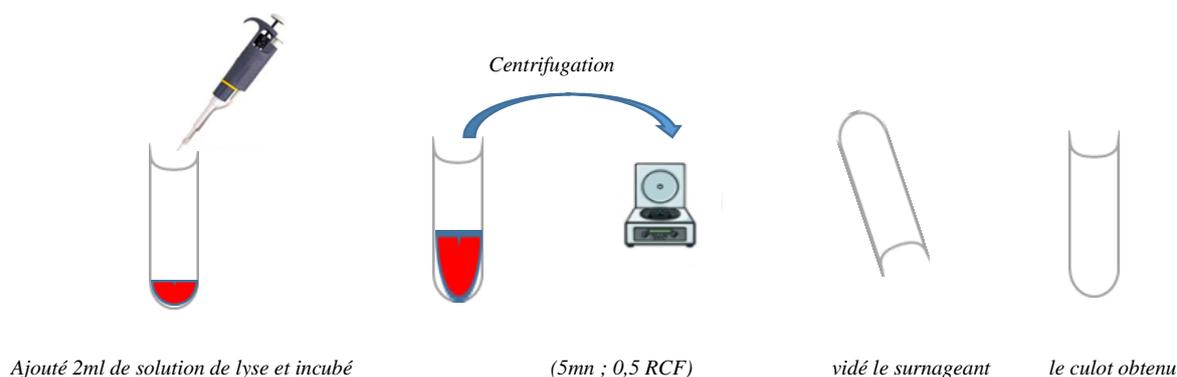


Figure 10. Schéma récapitulatif de l'étape de la lyse

Afin que les cellules puissent être acquises dans le cytomètre en flux, le contenu des tubes après la lyse des globules rouge (le surnageant) est vidé d'un geste brusque et le culot (globules blancs marqués) resuspendu dans 500ul du Tampon Phosphate Salin (PBS) de ce fait les cellules sont maintenues dans les conditions salines physiologiques, ce qui permet d'éviter l'agrégation des protéines et des anticorps sous l'effet des forces électrostatiques.

b. Acquisition des données

Les tubes contenant les suspensions cellulaires marqués sont ensuite passés au cytomètre (BD FACSCanto II 8 couleurs, BD Biosciences, USA). L'instrument a été optimisé pour mesurer jusqu'à 8 paramètres de fluorescences (cytomètre à 8 couleurs) ainsi que 2 paramètres physiques de la cellule (FSC et SSC), au moyen de ces trois lasers bleu (488nm), rouge (633nm) et violet (405nm) et ces systèmes fluidiques, électroniques et informatiques. (Figure.11)

Fluorochromes	Laser d'excitation	Fluorescence émise	Longueur d'onde
FITC	Bleu	Vert	519
PE	Bleu	Jaune	578
APC	Rouge	Rouge	560
PE-CY TM 5	Bleu	Rouge	667
PERCP	Bleu	Rouge	678
PERCP-CYTM 5.5	Bleu	Rouge foncé	695
PE-CY TM 7	Bleu	Infrarouge	785
APC-CY7	Rouge	Infrarouge	785

Tableau 1 : Les bandes spectrales des principaux fluorochromes utilisées en CMF

Un minimum de 10 000 lymphocytes T CD3+ a été analysé ou « acquis » pour chaque échantillon. Ces derniers interagissent avec le rayonnement d'un laser à argon émettant à 488

nm et grâce aux phénomènes des diffusions lumineuses ces lymphocytes sont repérés suivant leurs caractéristiques morphologiques (Taille et structures), qui sont déterminés sur un dot-plot biparamétrique FSC/SSC. (Figure.12-a)

Par ailleurs, les émissions des fluorescences du FITC et du PE mesurées à 525 et 575 nm respectivement déterminent aux lymphocytes T CD3+ leurs caractéristiques d'exprimer des molécules de surface cellulaire spécifique du cluster de différenciation CD3 ainsi que la présence de la molécule HLAB27, tandis que l'absence de celle-ci détermine un marquage négatif donc une absence d'émission du FITC.

En fonction de ces signaux lumineux, qui sont traités et transformés en signaux électroniques puis digitaux par les systèmes électroniques et informatiques, plusieurs profils de diagrammes sont générés (Figure. 12-b, c, d) ainsi que des mesures quantitatives obtenues grâce aux logiciels analytiques qui offrent pour cela les pourcentages de chaque population présente et des mesures telles que la moyenne et la médiane d'Intensité Moyenne de la Fluorescence (IMF). (Figure. 12-e, f)

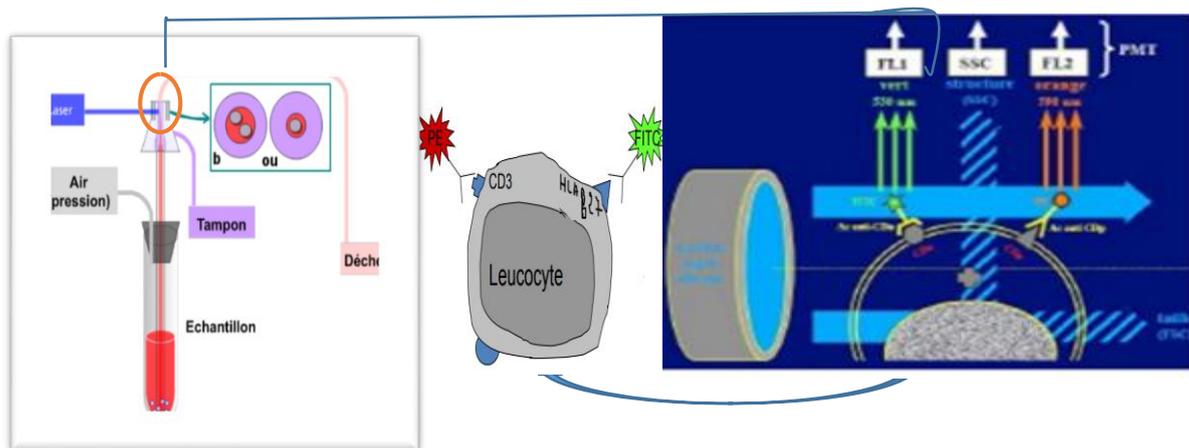


Figure 11. Schéma présente l'acquisition des lymphocytes par le système fluide à gauche et leurs traitements par le système électronique à droite

On note qu'avant que l'échantillon n'entre dans la chambre d'écoulement, les cellules se déplacent de manière aléatoire et désorganisée dans la suspension. Grâce au système fluide du cytomètre de flux ces problèmes sont traités en utilisant la mise au point hydrodynamique. En d'autres termes le système utilise un liquide (hydro) pour forcer les cellules à se déplacer une à une devant la source excitatrice constituant la zone d'interrogation. Les cellules qui traversent un cytomètre passe très peu de temps dans la zone d'éclairage. Etant donné une vitesse de flux de 20 mètre par seconde, un faisceau de 20 micromètre et une cellule de 15 micromètre, la cellule est éclairée pour seulement 0,015 microseconde. (Bushnell., 2015)

L'analyse des données de CMF repose fondamentalement sur le principe du gating défini par un processus qui consiste à sélectionner une zone sur le diagramme de dispersion généré lors

de l'expérience de flux qui décide quelles cellules poursuivent leurs analyses avec celles qui doivent être éliminées de l'analyse. La dispersion anarchique caractérise les débris cellulaires et les cellules mortes qui ont souvent une faible diffusion FSC avec des diffusions SSC plus élevées que les cellules vivantes, ces derniers sont situés à l'extérieur de la grille du gating ce qui exclut leurs analyses tandis que les cellules qui sont maintenues à l'intérieure de la grille du gating sont déterminées selon les contrôles effectués dans l'expérience analytique et aux connaissances de la biologie et par l'agrégat des populations qui caractérise la dispersion de ces cellules. (Bushnell., 2015)

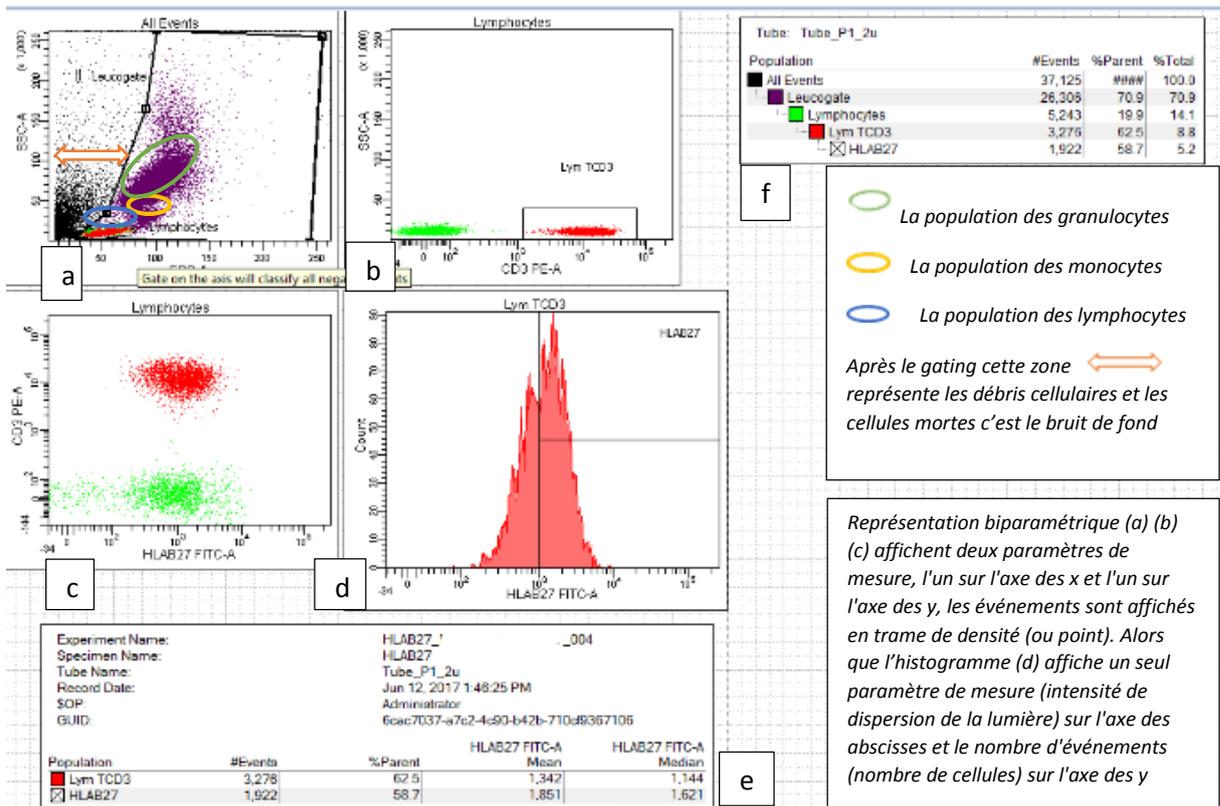


Figure 12. Représentation des résultats obtenues par CMF

On note qu'en fonction des paramètres de diffusion taille FCS et structure SSC des cellules on distingue 3 populations différentes dans le diagramme dot-blot (a), et via les paramètres des diffusions de fluorescence, on distingue la population lymphocytaire marquée qui est représenté dans les diagrammes (b et c). Pour l'histogramme (c) divisé en quatre quadrants, nous permet d'avoir des combinaisons possibles grâce au présence ou absence du complexe antigène-anticorps, distinguant ainsi les cellules uniques positives pour chaque marqueur ou double négatif ou double positif pour les 2 marqueurs.

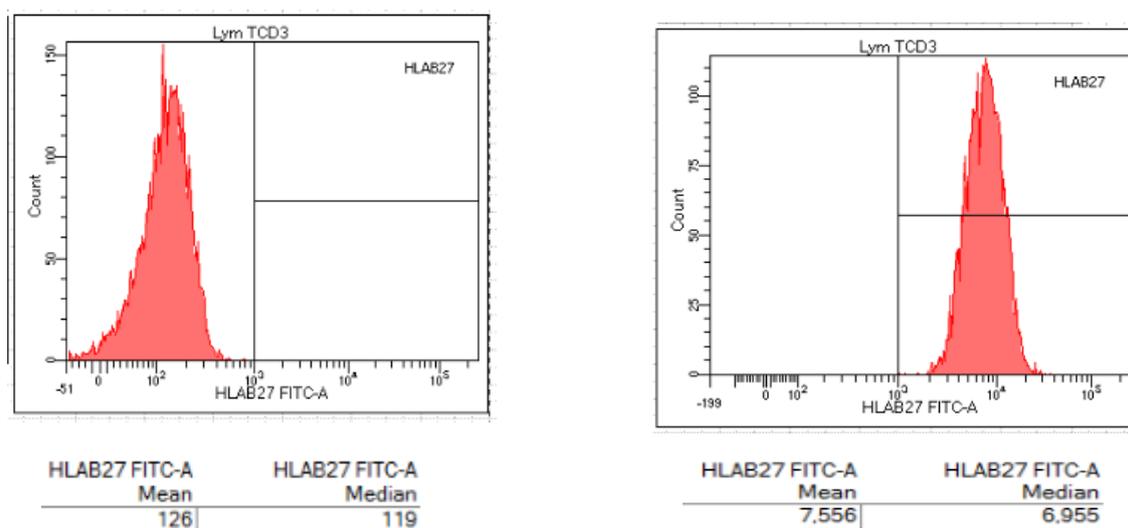


Figure 13. Représentation des résultats des patients positif ou négatif obtenues par CMF

On note qu'en fonction de la quantité d'événements des cellules lymphocytaires la valeur relative d'intensité de fluorescence présentée sur le diagramme mono-paramétrique varie entre 0 et 10^3 nm sur l'axe des abscisses et plus elle se déplace vers la droite plus le marquage est intense, ceci permet d'affirmer que le marquage des cellules lymphocytaires par HLA-B27 est positif.

c. Principe de compensation de fluorescence

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés simultanément en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des 2 signaux de fluorescence. Sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais pas en orange (PE) par exemple, est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des 2 fluorescences. Le système de compensation permet de soustraire artificiellement et électroniquement la fluorescence orange parasite qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC. (Leach et al, 2013)

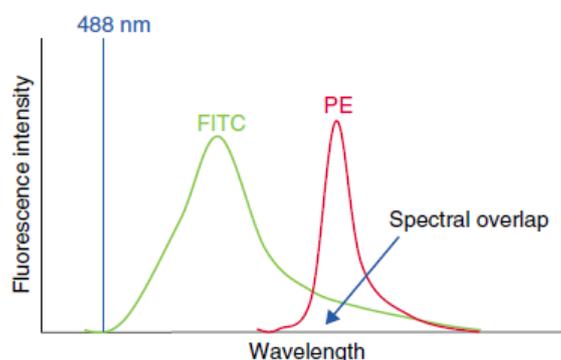


Figure 14. Chevauchement spectrale (Leach et al, 2013)

d. Intensité de fluorescence

La cytométrie en flux est avant tout une technique qualitative qui permet d'objectiver la présence d'un antigène donné (ex HLAB27) sur une population donnée.

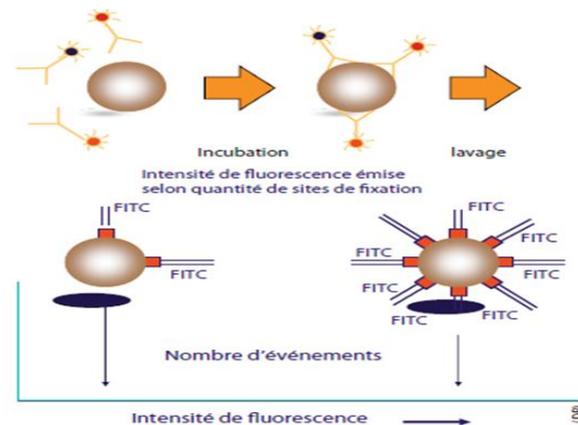


Figure 15. Schéma explique la notion d'intensité de fluorescence

Il n'en demeure pas moins que le CMF peut, grâce au calcul de l'Intensité de Fluorescence Moyenne (IMF) de l'antigène en question, apprécier son intensité d'expression sur la population étudiée, ce qui est d'une importance capitale étant donné que l'IMF peut distinguer un vrai positif (expression de l'antigène en question) d'un faux positif (auto-fluorescence ou réaction croisée). (Leach *et al*, 2013)

I.3 Etude statistique

L'objectif du diagnostic via CMF sur 152 patients avec une suspicion de SA est de déterminer précisément l'affection ou la pathologie dont souffre une personne, en apportant une réponse la plus précise possible.

Notre étude porte sur la validation des résultats obtenu par CMF et pour pouvoir être élaboré, le test doit être confronté à un gold standard (une référence) c'est à partir de ce gold standard (le teste par RT-PCR) que on peut définir le statut d'un patient (sain ou malade). Pour cela le teste par CMF peut être positif (identifiant le sujet comme étant malade) ou négatif (sujet non malade).

Notre test étant rarement parfaitement fiable, des erreurs peuvent être observées, ce sont les faux-négatifs et les faux-positifs. La sensibilité et la spécificité permettent de les caractériser. Elles mesurent respectivement la proportion de personnes ayant un test positif, sachant que les personnes testées sont toutes malades ; et celles ayant un test négatif, sachant que les personnes testées sont saines. Les valeurs prédictives positives (proportion de personnes réellement malades parmi celles qui ont un test positif) et négatives (proportion de personnes réellement saines parmi celles ayant un test négatif) intègrent cette particularité, en étant sensible à la prévalence de la maladie. Contrairement à la sensibilité et la spécificité, elles permettent de prédire le risque d'être malade en cas de test positif, et celui d'être sain en cas de test négatif. (Bousquet, Daures, Demoly, 2005)

	Malade	Non malade	Total	
Test Positif	VP	FP	VP + FP	VPP
Test Négatif	FN	VN	FN + VN	VPN
Total	VP + FN	FP + VN	VP + FP + FN + VN	
	Se	sp		

VP : vrai-positif ; FP : faux-positif ; VN : vrai-négatif ; FN : faux-négatif ;
Se : sensibilité ; sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN :
valeur prédictive négative.

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$sp = \frac{VN}{FP + VN}$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Le schéma représentatif ci-dessus du tableau de contingence permet de connaître la répartition d'un ensemble de sujets testés exp : typage HLA-B27 par CMF chez les personnes non malade (VN) et chez les personnes malade (VP). On constate aussi que certaines personnes sont considérées comme malades (car positive au test) alors qu'elles ne le sont pas en réalité ; ce sont les faux positifs (FP). De même, certaines personnes sont considérées comme non malades (car négative au test) alors qu'elles sont malades ; ce sont les faux négatifs (FN).

Le seuil de positivité est égal à la plus faible valeur des médianes de fluorescence des échantillons connus positifs par RT-PCR. Il existe donc une zone grise dans laquelle peuvent chevaucher les MFI des « vrai » positifs (HLAB27) et celles des faux positifs. Cela revient à dire qu'un seuil élevé favorise la spécificité (absence de faux-positif) et qu'un seuil faible favorise la sensibilité (aucun faux-négatif). L'inconvénient est l'évolution opposée de la sensibilité par rapport à la spécificité. Donc pour déterminer le meilleur seuil possible il est nécessaire de réaliser une courbe ROC (Receiver-operating characteristic) qui représente la sensibilité en fonction de la spécificité (en fait de 1 - spécificité), et ce pour différents seuils. **(Bousquet, Daures, Demoly, 2005)**

La comparaison des valeurs d'intensité moyenne de fluorescence entre les différents groupes de patients a été réalisé à l'aide de test non paramétrique de Mann et Whitney (les effectifs dans les différents groupes sont inférieur à 30) et Pour évaluer les performances du test, nous avons réalisé une courbe ROC. Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel minitab.

Résultats
et
discussion

II. Résultats

II.1 Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

Un typage HLA-B27 a été réalisé dans le cadre du bilan diagnostique chez les patients qui présentent une symptomatologie en faveur de la SPA. Notre échantillon est constitué de 91 femmes (60%) et de 61 hommes (40%).

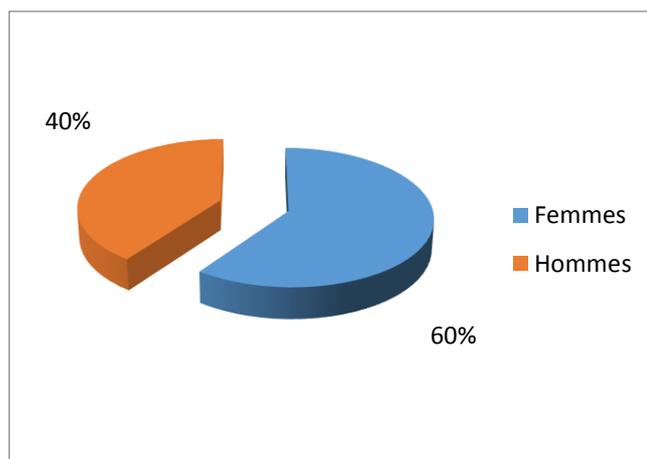


Figure 16. Répartition des patients selon le sexe

II.2 Résultats du typage HLA B27 par PCR en temps réel

Le typage HAL B27 effectués sur 152 patients a révélé des résultats positifs sur 30 patients (20%) dont 13 femmes et 17 hommes alors que 122 patients (80%) étaient négatifs.

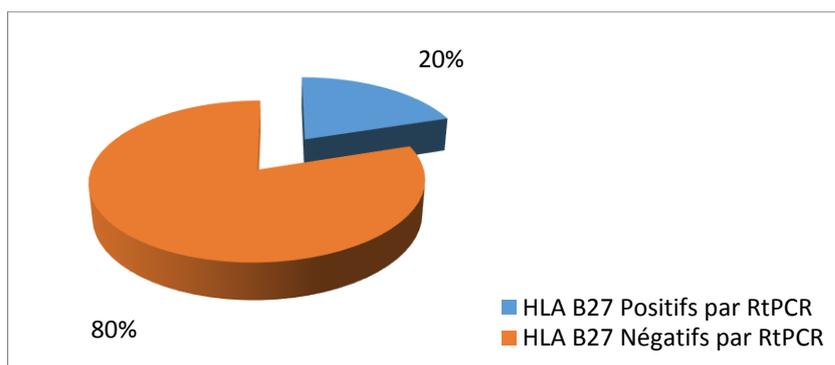


Figure 17. Résultats du typage HLA B27 par PCR en temps réel

L'antigène HLA B27 est associé à la spondylarthrite ; la majorité des patients présentant une spondylarthrite ankylosante sont HLA B27 positifs mais seulement un petit nombre de sujets HLA B27 positifs développent la maladie. L'antigène HLA B27 a été associé avec une moindre fréquence à des arthrites réactionnelles, au syndrome de Reiter et à l'uvéite antérieure aiguë.

II.3 Résultats du typage HLAB27 par cytométrie en flux

Les résultats des patients obtenus par CMF sont de types qualitatifs (positif / négatif) extrapolés à partir de la mesure d'une donnée quantifiable qui représente la mesure de l'intensité de fluorescence du HLA-B27 analysé sur la population lymphocytaires CD3⁺. En effet nous avons déterminé une médiane de 250 pour les valeurs médianes d'intensité de fluorescence ou MFI du marqueur HLA B27 pour chaque patient.

Nous avons analysé par RT-PCR (Figure 17) : 122 échantillons négatifs et 30 échantillons positifs. Compte tenu de la fréquence de l'Ag HLA B27 dans la population algérienne, de tels effectifs permettaient d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs et d'établir des panels de médianes de fluorescence représentatifs des populations négatives et positives vis-à-vis de l'Ag HLA B27.

Ainsi, les résultats obtenus montrent clairement que la médiane des MIF des patients positifs par PCR en temps réel était significativement plus élevée que celle des patients négatifs : 3300 vs 195, P 0.0001 pour le risque alpha 0.05 : (Par test de Mann Whitney).

II.4 Détermination du seuil de positivité de la technique par cytométrie en flux

II.4.1 Analyse des résultats de la CMF

Par définition, le seuil de positivité est égal à la plus faible valeur des médianes de fluorescence des échantillons connus positifs par RT-PCR. Il paraît à première vue logique de prendre la plus faible MFI des patients positifs par RT-PCR dans notre série comme valeur seuil. Cependant, procéder de la sorte ne permet de tenir compte de toute la réalité de la réaction antigène anticorps ; en effet, l'anticorps anti-HLAB27 utilisé dans notre test cytométrique peut donner des réactions croisées avec d'autres spécificités HLA ayant une parenté antigénique avec l'antigène HLAB27. Il s'agit notamment des spécificités HLAB7, B13, B22, B40, B41 et B4 faisant partie du CREG B7. Les patients porteurs de ces spécificités peuvent donner des MFI proches de celles des patients HLAB27 positifs. Il existe donc une zone grise dans laquelle peuvent chevaucher les MFI des « vrai » positifs (HLAB27) et celles des faux positifs (autres spécificités du CREG B7).

Ainsi dans notre série, nous avons constaté que les patients HLAB27 positifs par PCR en temps réel avaient globalement des MFI > 1800, d'un autre côté certains patients HLAB27 négatifs pouvaient donner des MFI allant jusqu'à 2500 (Figure.18). Nous avons donc proposé 8 valeurs seuils : 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400 et 2500 qui définissent les bornes de notre zone grise.

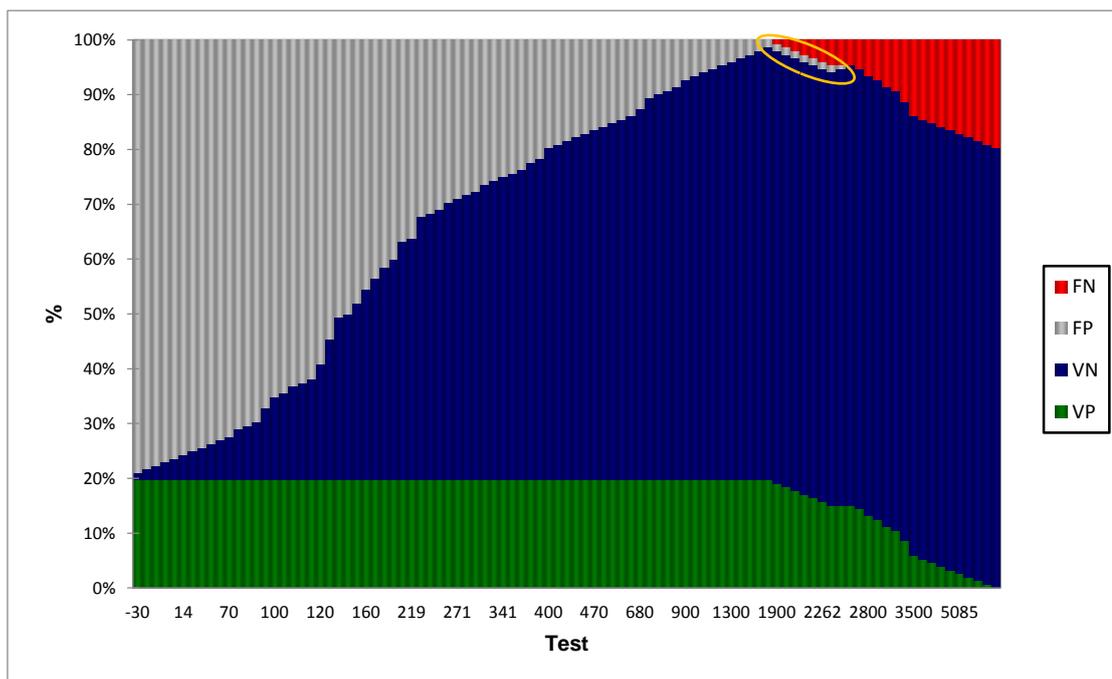


Figure 18. La distribution de nos patients en fonction des différentes valeurs seuils*

* : notez que la région grise sur graphique qui correspond au faux positifs (FP) va de 1800 à 2500.

Pour chacune de ces valeurs nous avons déterminé la sensibilité, la spécificité la valeur prédictive positive et la concordance avec la technique par PCR en temps réel (Tableau II)

MFI	1800	1900	2000	2100	2200	2300	2400	2500
Sensibilité %	100	96,70	93,30	86,70	80	76,70	76,67	76,67
Spécificité %	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	99,18	100
VPP %	93,80	93,50	93,30	92,90	92,30	92	92	100
VPN %	100	99,20	98,40	96,80	95,20	94,50	94,53	94,60
Concordance %			98,03	98,03	95,39	94,74	94,74	94,74

Tableau II. Les résultats de la spécificité, sensibilité, concordance, VPP, VPN de nos valeurs seuil

Comme on peut le constater sur le tableau ci-dessus le seuil de 1800 offre une meilleure performance en termes de sensibilité (100%) comparé aux autres seuils. Ce seuil est associé à une excellente spécificité de l'ordre de (98.4%).

Les seuils de 2400 et 2500 offrent une meilleure spécificité mais au détriment d'une perte de sensibilité.

Cependant, la probabilité d'être réellement malade si le teste est positive (VPP) varie entre 93,67% et 95,83%, c'est à dire que si on utilise la CMF pour la recherche du HLA-B27, on obtient un bon résultat positif n'est VP que dans 96% des cas au seuil 2500. Cependant la probabilité de ne pas être réellement malade si le teste est négative (VPN) par CMF elle est d'ordre 100% et elle diminue pour atteindre 94,50% par rapport aux seuils ; Cela montre que l'MFI à 1800 offre un meilleur résultat négatif n'est VN que dans 100% des cas pour la recherche du HLA-B27.

Nous avons remarqué que la concordance entre les deux techniques commence à diminuer jusqu'à atteindre la valeur de 95% au seuil 2500. Le déclin de la concordance est dû à l'amélioration de la spécificité qui passe de 99% à 100% (c'est à dire que les FP sont devenus négatifs).

En utilisant le seuil de 1800 nous avons eu une excellente concordance de l'ordre de 98% entre la technique par PCR en temps réel et la technique par cytométrie en flux.

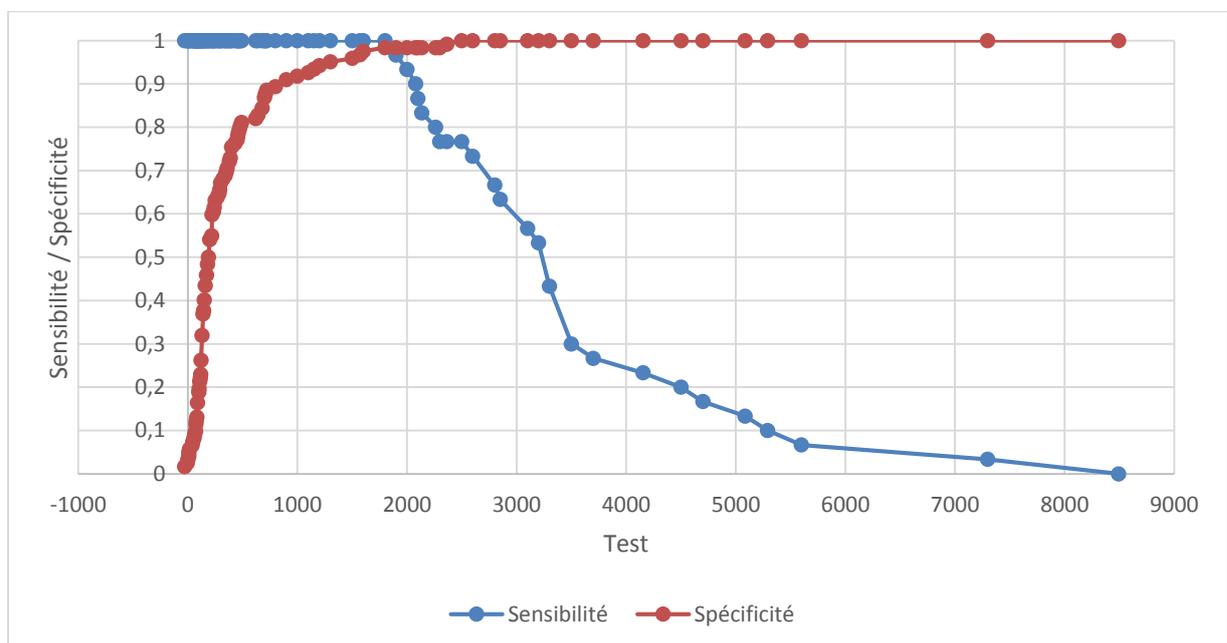


Figure 19. Variation de la sensibilité et la spécificité du test en fonction du seuil de positivité*

* : notez que la valeur seuil de 1800 offrent les meilleures performances en termes de spécificité et de sensibilité.

II.4.2 Analyse comparative entre les résultats de la CMF et de la RT-PCR

Les patients sont soumis aux confirmations d'examens, leurs résultats sont obtenus et interprétés pour suivre la démarche d'une comparaison des résultats de types qualitatifs (positif ; négatifs) entre les deux techniques analytiques CMF et RT-PCR. Cette comparaison révèle l'existence de 120 patients négatifs avec 29 patients positifs ce qui confirme une concordance de 98% entre les résultats analytiques par ces techniques tandis que 2% souligne une discordance.

Comparaison des résultats entre les 2 techniques		Résultats	
CMF	PCR-TR	Nombre	Pourcentage
Négatif	Négatif	120	79%
Positif	Positif	29	19%
Positif	Négatif	3	2%
Négatif	Positif		

Tableau III. Analyse comparative entre les résultats de la CMF et de la RT-PCR

II.4.4 Performance du processus analytique et le seuil de positivité de la CMF

La courbe ROC représentée ci-dessous en rouge montre une zone sous la courbe de 0,996 (pour la valeur seuil de 1800) à un intervalle de confiance 95%.

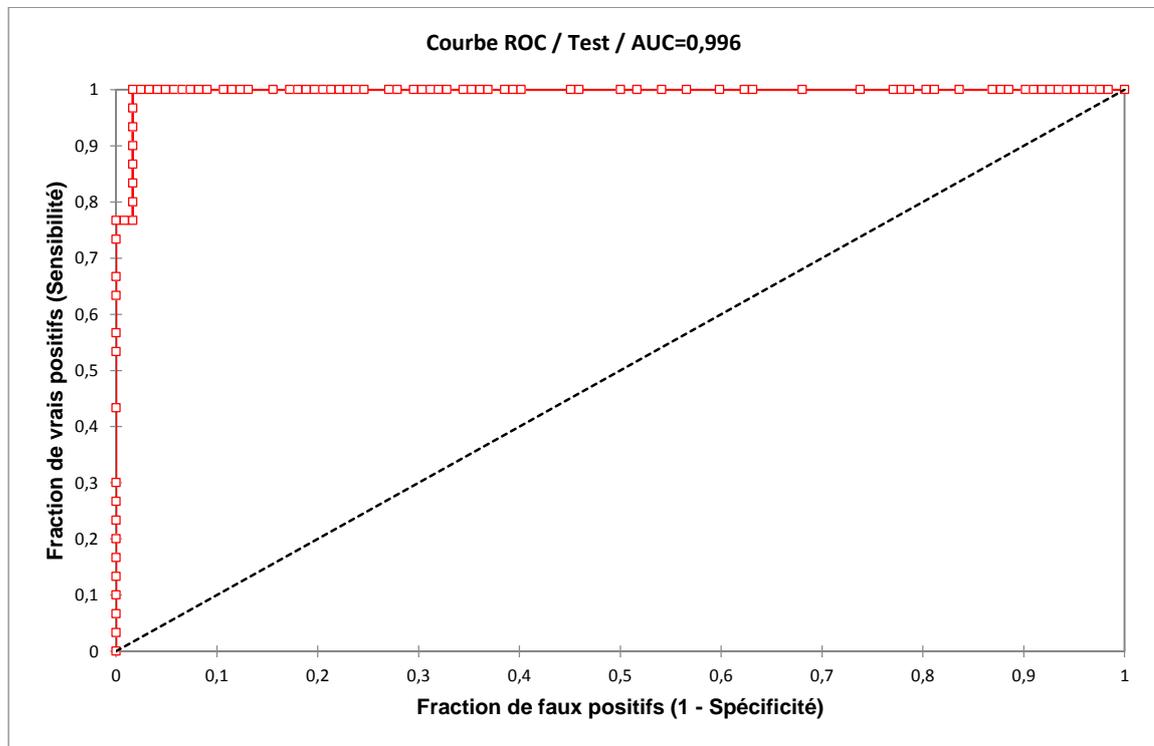


Figure 20. La courbe ROC

Pour rappel la courbe ROC est une représentation graphique de la relation qu'il existe entre la sensibilité et la spécificité d'un test pour chaque valeur seuil considérée et via l'aire sous la courbe on peut tester les performances de notre test.

Les résultats des performances du test vont dépendre de la valeur seuil que l'on s'est fixée. Plus le seuil de positivité d'un test est bas plus sa sensibilité va être élevée et sa spécificité basse.

Cette représentation graphique permet de représenter la capacité du test à classer les patients en malades et non malades en faisant varier la valeur seuil du test. La courbe ROC représente en ordonnée la proportion de tests positifs parmi les malades (sensibilité) et en abscisse la proportion de tests positifs parmi les patients non malades (1-spécificité) pour toutes les valeurs seuils du test. Un test avec une excellente sensibilité et spécificité aura une valeur dans le coin supérieur gauche du graphique caractériser par le point 1800.

Notre test à une parfaite discrimination entre malade et non malade. Cela signifie que face à deux personnes l'une est malade et l'autre non, déterminer par le calcul de la surface AUC (Area Under the Curve) situer sous la courbe ROC qui vaut 1 permettant ainsi à notre test de poser un diagnostic correcte en distinguant dans 100% des cas la personne malade de celle qui ne l'est pas. (Perneger, Perrier, 2004)

III. Discussion

L'une des plus fortes associations connues entre un phénotype HLA (Human Leukocyte Antigen) et une pathologie est celle de l'antigène (Ag) HLA B27 avec la spondylarthrite ankylosante (**Brewerton et al, 1973 ; Gladman et al, 1986**). La fréquence de ce dernier chez les patients atteints de spondylarthrite ankylosante est de l'ordre de 90 % tandis qu'elle est inférieure à 10 % dans l'ensemble de la population caucasienne (**Benjamin et al, 1990**). Ainsi, la recherche de l'Ag HLA B27 fait partie d'un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques utiles au diagnostic de spondylarthrite ankylosante (**Lopez de Castro et al, 1994 ; Schaefferbeke, 1999**). Dans la classification d'Amor, la présence de l'Ag HLA B27 compte pour 2 points sur les 6 permettant d'établir un diagnostic de spondylarthropathie (**Schaefferbeke, 1999 ; Amor et al, 1990**).

Actuellement, deux techniques font référence en matière de typage HLA. Il s'agit de la microlymphocytotoxicité (**Terasaki et al., 1964**) et des techniques utilisant la biologie moléculaire (PCR-SSP et RT-PCR) (**Kirveskari et al, 1997 ; Steffens-Nakken et al, 1995**). Cependant, ces analyses spécialisées, longues et coûteuses, sont pratiquées par des laboratoires disposant d'un recrutement important focalisé sur ce type d'analyse. À l'inverse, elles ne sont pas adaptées au fonctionnement de routine d'un laboratoire hospitalier d'immunologie biologique. En effet, ce dernier répond souvent à une demande d'analyse ponctuelle au « coup par coup » qui est fonction de la prescription lors de la consultation en rhumatologie.

Le développement de la CMF offre une alternative à ces techniques. Depuis les premiers travaux consacrés à ce sujet (**Albrecht et al, 1987**), plusieurs études ont confirmé la fiabilité d'une telle approche (**Hulstaert et al, 1994 ; Bonnaud et al, 1999**). Cependant, la mise en route d'une technique de cytofluorimétrie implique une importante phase de validation propre à chaque laboratoire (**Lingenfelter et al, 1995 ; Hulstaert et al, 1994 ; Bonnaud et al, 1999**). En effet, quelques contraintes existent ; certaines sont liées à un manque de standardisation de la cytofluorimétrie proprement dite, d'autres sont dues plus spécifiquement à son application au typage HLA B27 : un nombre limité de prélèvements positifs dans un recrutement tout venant (B27-positifs < 10 %), l'absence de contrôle de qualité utilisable dans ce contexte et, enfin, l'existence de réactions croisées avec les autres antigènes du CREG B7 (cross reactive group B7) dues à un manque de spécificité des anticorps utilisés.

Concernant le choix de l'anticorps monoclonal, plusieurs études comparatives démontrent la supériorité du clone *FD 705* en termes de sensibilité et de spécificité (**Neumüller et al, 1996 ; Orr et al, 1994 ; Ward et al, 1995**). En effet, cet anticorps reconnaît tous les sous-types de B27 et présente un faible taux de réactions croisées (**Neumüller et al, 1996 ; Orr et al, 1994**). **Ward et al, 1995** ont montré que pour 1 091 échantillons testés avec l'anticorps *FD 705* seulement 6 patients (0,5 %) donnaient un résultat indéterminé. Ces patients étaient B7-positifs et aucune réaction croisée avec un autre groupe HLA n'était décelée (**Pei et al, 1993**). Notre expérience permet d'arriver aux mêmes conclusions sur un type de recrutement similaire.

L'effectif de notre population, en accord avec les exigences de représentativité décrites dans la littérature (**Hulstaert et al, 1994**), nous a permis de définir pour seuil de négativité la plus forte valeur obtenue au sein de la population négative et pour seuil de positivité la plus faible valeur de la population positive.

Les résultats obtenus lors de la seconde phase de notre étude valident ces seuils d'interprétation. De plus, les 152 patients testés semblent représentatifs de la population générale puisque nous obtenons 20% de prélèvements HLA B27-positifs pour une moyenne de 14 à 20% décrite au sein de la population caucasienne (**Brewerton et al, 1973 ; Gladman et al, 1986**).

Au total, ces résultats, obtenus sur plus de 152 patients, illustrent la fiabilité de la méthode. Seul un échantillon présente une discordance d'interprétation entre cytofluorimétrie et RT-PCR à un seuil de 1900. Pour ce patient, la moyenne de fluorescence se trouve dans la zone grise et fait conclure à un test douteux, tandis que la RT-PCR donne un résultat positif. Afin d'exclure un problème de marquage, nous avons renouvelé celui-ci, mais les résultats sont restés identiques. La cause de cette discordance demeure inexplicée. Il est possible qu'il s'agisse d'une conséquence de la variation de l'expression des antigènes HLA, diminuée dans certaines circonstances, comme par exemple lors d'infections virales ou bactériennes (**Kirveskari et al, 1997 ; Wuorela et al, 1997**). Il faut toutefois noter que cet échantillon ne peut pas être considéré comme un réel faux négatif. Selon l'arbre décisionnel, l'échantillon, rendu douteux en cytofluorimétrie, aurait été analysé et rendu positif par RT-PCR. De la même manière, le travail de Pei *et al.* N'avait montré aucun cas de faux négatif (**Reynolds et al, 1996**).

Concernant la praticabilité de la méthode, plusieurs points sont à discuter. Le choix de l'héparinate de lithium comme anticoagulant a été dicté par la RT-PCR qui impose une viabilité cellulaire. Les résultats de la CMF ne sont pas influencés par la nature de l'anticoagulant (**Hulstaert et al, 1994 ; Orr et al, 1994**). Certaines études multicentriques ont même utilisé des anticoagulants différents en fonction des sites (**Hulstaert et al, 1994 ; Ward et al, 1995**) [11, 16]. De plus, c'est avec l'héparinate de lithium que sont obtenus les histogrammes les plus stables au cours du temps (**Ward et al, 1995**). À plus long terme pour notre activité de routine, l'héparinate de lithium présente l'avantage de pouvoir réaliser, sur le même prélèvement, la CMF puis la RT-PCR en cas de résultat douteux. Dans un but de standardisation et de diminution des interventions humaines pouvant induire des biais (séparation des cellules, lyse manuelle, lavage cellulaire), nous avons utilisé une technique sur sang total couplée à un système de lyse automatique. Le réglage du CMF est également automatique à l'aide de billes fluorescentes de calibration. Ce principe est décrit par plusieurs auteurs (**Lingenfelter et al, 1995 ; Hulstaert et al, 1994 ; Reynolds et al, 1996**).

Au total, la réalisation du typage B27 nécessite le dépôt manuel de 50 µl de sang total et de 2,5 µl d'anticorps. Le reste de la manipulation est automatique, l'interprétation du résultat est faite en 30 min par rapport à des seuils d'interprétation constants au cours du temps. La technique peut être insérée, au coup par coup, à n'importe quel moment dans l'activité du laboratoire. De plus, une fois les cellules marquées et fixées, l'analyse peut être différée de 24

à 48 heures. En termes de praticabilité et de standardisation, le typage HLA B27 par CMF semble très supérieur aux deux techniques de référence. Cependant, l'ensemble des auteurs s'accordent sur l'importance de l'étape de validation. Elle est à conduire dans chaque laboratoire qui doit établir et tester ses propres seuils d'interprétation. Ces derniers dépendent de l'anticorps monoclonal, des réactifs de lyse et des instruments utilisés. Toutefois en utilisant un même lot de billes de calibration et le même protocole, il doit être possible de transférer nos résultats dans d'autres laboratoires.

Enfin, il faut souligner, la nécessité de disposer d'une technique de référence. Que ce soit la microlymphocytotoxicité, CMF ou la biologie moléculaire, elle sera utilisée comme confirmation en cas de prélèvement douteux. L'association la plus pertinente semble être constituée par le couplage CMF et biologie moléculaire (**Bonnaud et al, 1999**). Cette dernière est le véritable gold standard puisqu'il s'agit d'un génotypage. Cependant, si les seuils d'interprétation en CMF sont correctement établis les échantillons douteux sont finalement peu nombreux : inférieurs à 1 % dans notre étude en accord avec d'autres travaux (**Hulstaert et al, 1994 ; Pei et al, 1993**).

IV. Conclusion et perspective

Dans le but de valider la technique de biologie cellulaire la Cytométrie en Flux dans le domaine d'immunologie, nous avons procédé à la réalisation d'un phénotypage par CMF du HLA-B27 à la surface des cellules lymphocytaires des échantillons de sang totale des patients présentent des signes en faveur de la spondylarthrite ankylosante. Ces mêmes échantillons de sang inclus dans notre étude sont diagnostiquer pour une détermination de l'allèle HLA-B27 par la technique de la biologie moléculaire PCR en temps réel que nous avons utilisé comme technique de référence.

La cytométrie est basée sur la détection du marqueur couplé à des fluorochromes. De nombreux anticorps existent pour les leucocytes, couplés avec plusieurs fluorochromes permettant plusieurs combinaisons. Il est ainsi été possible de définir le phénotype des cellules lymphocytaire T (CD3+) et la protéine HLAB-27 par des fluorochromes : anti-CD3 marqué au PE et anti-HLAB27 marqué au FITC.

Le phénotypage a permis via les valeurs médianes de fluorescence de révéler la présence ou l'absence des antigènes HLA-B27. En effet nous avons déterminé une médiane de 250 pour les valeurs médianes d'intensité de fluorescence ou MFI du marqueur HLA B27 pour chaque patient. Ainsi, les résultats obtenus montrent clairement que la médiane des MFI des patients positifs à la présence d'antigènes HLA-B27 par PCR en temps réel était significativement plus élevée que celle des patients négatifs à l'absence d'antigènes HLA-B27 : 3300 vs 195.

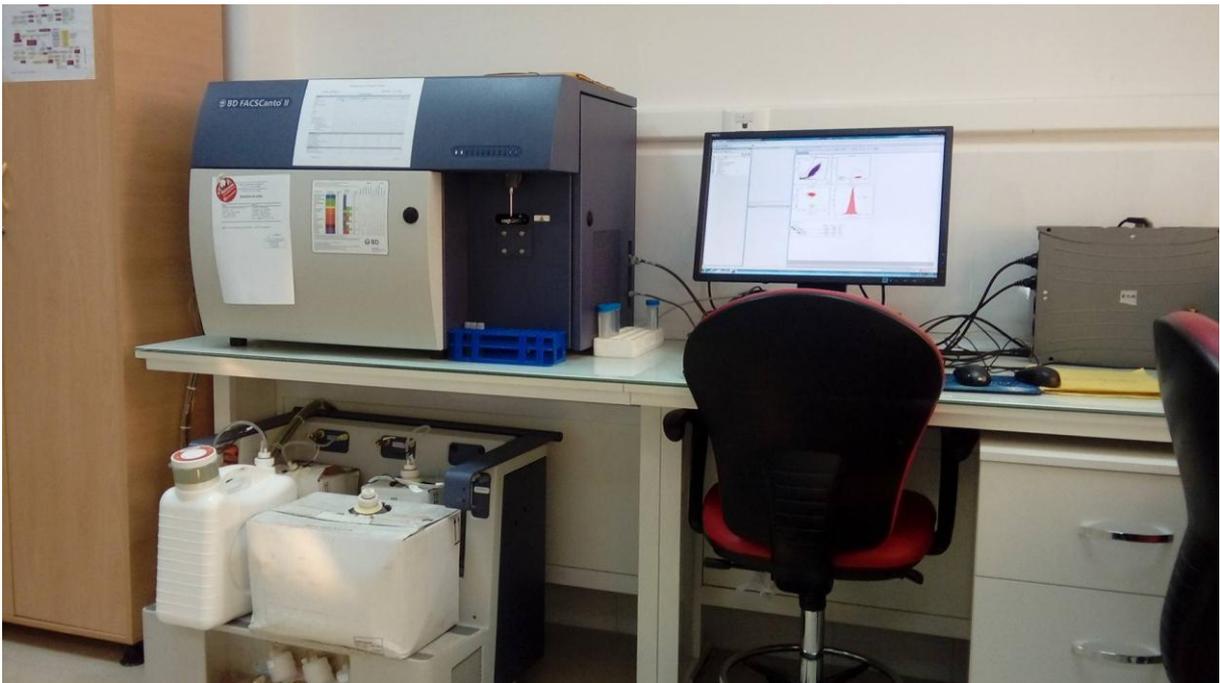
Le seuil de positivité a été déterminé par la plus faible valeur des médianes de fluorescence des échantillons connus positifs par RT-PCR. Ce qui égale à 1800 dans notre série comme valeur seuil.

En effet, l'anticorps anti-HLAB27 utilisé dans notre test cytométrique peut donner des réactions croisées avec d'autres spécificités HLA ayant une parenté antigénique avec l'antigène HLAB27. Les patients porteurs de ces spécificités peuvent donner des MFI proches de celles des patients HLAB27 positifs. Il existe donc une zone grise dans laquelle peuvent chevaucher les MFI des « vrai » positifs (HLAB27) et celles des faux positifs. Grâce aux résultats de notre étude on a pu définir les bornes 1800 et 2500 comme valeurs médianes de fluorescence de la zone grise.

Nos résultats restent préliminaires, des études complémentaires sont nécessaires afin d'étudier les facteurs impliqués dans le niveau d'expression de HLAB-27 sur les cellules lymphocytaires cette approche peut expliquer les cas où la médiane des MFI est douteuse alors que la technique génomique est nettement positive, pour cela nous envisageons d'identifier ces facteurs à travers un échantillon plus important.

Les résultats de notre étude ainsi que les nouvelles avancées technologiques dans le domaine cellulaire et de la génomique offrent de nombreuses perspectives pour améliorer et automatiser la recherche de l'allèle ou de la molécule HLA-B27 dans le cadre diagnostique de la SPA. À l'aide de ces données collectées, il sera également intéressant de modéliser plus finement le protocole de la technique par CMF dans le cadre de la recherche de l'HLA-B27.

Annexes



Annexe 1. L'instruments du cytomètre en flux BD FACSCanto II utilisé dans ce travail de recherche

CHU BENI-MESSOUJ / HOPITAL OUSAD HASSANI
SERVICE D'IMMUNOLOGIE MEDICALE
Chef de service : Prof. BOUDJIK
Unité d'immunologie cellulaire et de cytométrie en flux
Responsable Unité : Dr A. TABLAT

Tableau des Fluorochromes utilisés dans la cytométrie en flux (cytomètre à 6 couleurs) :

Fluorochromes	Laser d'excitation	Fluorescence émise	Longueur d'onde
FITC	Bleu	Vert	519
PE	Bleu	Jaune	578
APC	Rouge	Rouge	660
PE-Cy TM 5	Bleu	Rouge	667
Percp	Bleu	Rouge	678
Percp-Cy TM 5.5	Bleu	Rouge foncé	695
PE-Cy TM 7	Bleu	Infrarouge	785
APC-Cy7	Rouge	Infrarouge	785

N.B. :

- *Combinaisons interdites* : PE-CyTM5 + Percp / Percp-CyTM5.5
- *Combinaison à éviter* : APC + PE-Cy5

Annexe 2. Les bandes spectrales des principaux fluorchromes utilisées en CMF

BD™ HLA-B27 Kit

Catalog No. 340183



BD, BD Logo and all other trademarks are property of
Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD



02/2015

23-2563-12



Becton, Dickinson and Company
BD Biosciences
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131 USA

Becton Dickinson Pty Ltd,
4 Research Park Drive,
Macquarie University Research Park,
North Ryde NSW 2113, Australia



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire,
Co. Dublin, Ireland
Tel +353.1.202.5222
Fax +353.1.202.5388

Becton Dickinson Limited,
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,
Auckland, New Zealand

BD Biosciences
European Customer Support
Tel +32.2.400.98.95
Fax +32.2.401.70.94
help.biosciences@europe.bd.com

bdbiosciences.com
ClinicalApplications@bd.com

Annexe 3. Catalogue du kite

Unité d'Immunologie cellulaire & de cytométrie en flux
Responsable l'unité: Dr A. TABLAT

Tableau des volumes du sang à utiliser en cytométrie :

GB (GB/mm ³)	volumes à utiliser (µl)
<20000	100
20000-60000	50
60000-80000	40
80000-120000	30
>120000	20

Préparation du Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Pour préparer 1 litre de PBS il faut commencer d'abord par 800 ml d'eau doublement distillée

Ajouter :

- NaCl : 8 g
- KCl : 0.2 g
- Na₂HPO₄ : 1.44 g
- KH₂PO₄ : 0.24 g

Compléter par la suite jusqu'à 1 litre.

Annexe 4. Des informations pour la pratique dans un laboratoire biologique

- Alain S. 2011.** Spondylarthrite ankylosante. *La revue du praticien*, 61, p 999-1006.
- Albrecht J, Müller HAG. 1987.** HLA B27 typing by use of flow cytofluorometry. *Clin Chem*; 33 : 1619-23.
- André-Patrick Arrigo. 2005.** Chaperons moléculaires et repliement des protéines : L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *M/S : médecine sciences*, 216-7, 619–625.
- Amor B, Dougados M, Mijiyawa M.1990.** Critères de classification des spondylarthropathies. *Rev Rhum Mal Osteoartic* ; 57 : 85-9.
- Abdellah El Maghraoui. 2004.** Ostéoporose et spondylarthrite ankylosante. *Revue du Rhumatisme*, 71, 573–578.
- A. Vassault, A. Hulin, E. Chapuzet, J. Arnaud, C. Giroud et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. 2010.** Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin*, 68 (Hors série no 1) : 247-294.
- Arinsburg, S. A., Shaz, B. H., Westhoff, C. & Cushing, M. M. 2012.** Determination of human platelet antigen typing by molecular methods: Importance in diagnosis and early treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 87, 525-8.
- Anikó Végvári., Zoltán Szabó., Sándor Szántó., Tibor T. Glant., Katalin Mikecz., Zoltán Szekanecz. 2009.** Origine génétique de la spondylarthrite ankylosante. *Revue du Rhumatisme*, 76, 1278–1283.
- Antony Nolan Research Institute. 2016a.** *Nomenclature for factors of the HLA system* [Online]. : Available: <http://hla.alleles.org/alleles/class1.html> [Accessed 20/06/2017].
- A.-E. Depince-Berger., C. Aanei., C. Iobagiu., M. Jeraiby., C. Lambert. 2016.** New tools in cytometry. *Morphologie*, 100, 199-209.
- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman., Pierre L. Masson. 2009.** Les bases de l'immunologie fondamentale clinique. Traduction de la 3e édition anglaise : Pierre L. Masson ISBN : 978-2-8101-0023-1.
- Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Cogné M, Drouet M. 1999.** Optimisation of HLA B27 testing by association of flow cytometry and DNA typing. *Clin Rheumatol* ; 18 : 23-7.
- Benjamin R, Parham P. Guilt by association and ankylosing spondylitis. 1990.** *Immunol Today* ; 4 : 137-42.
- Brewerton DA, Caffey M, Ahrt FD, James DCO, Nichols A, Sturroch RD. 1973.** Ankylosing spondylitis and HLA B27. *Lancet*; 1 : 904-7.
- BENAMMAR Ikram., BOUNEKHLA Amina., KHAYATI Meriem., M. MEÇABIH F. 2016.** Etude comparative de la PCR-SSP et RT-Temps réel : exemple de la recherche du HLA-B*27. Mémoire de projet de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de Master : génétique du

développement. *Faculté des sciences biologique, UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE (USTHB).*

Bowness, P. 2015. HLA-B27. *Annu Rev Immunol*, 33, 29-48.

Bahram S., Béné M., Labalette M. 2013. Immunologie fondamentale et immunopathologie. *Chapitre 4 tissu lymphoïde et sanguine, P 22. Elsevier Masson SAS.*

Cesbron Gautier A., Gagne K., Retière C., Devys A., Bignon J.-D. 2007. Système HLA. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie*, 13-000-M-53.

Corinne Miceli-Richard. 2010. HLA B27 et spondylarthropathies. *Revue du rhumatisme monographies*, 77, 288–292.

Christine, Marie., Drouet, Christian., Fisson, Sylvain., Seillès, Estelle .2014. Méthode en immunologie des principes aux bon application. *62 rue Camille-Desmoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux cedex : Elsevier Masson, P.213.*

Claudepierre P., Wendling D. 2009. Spondylarthrite ankylosante. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur*, 14-230-A-10.

Daniel Wendling., Evelyne Racadot. 2006. Les taux sériques de facteur tissulaire sont corrélés à l'inflammation biologique au cours de la spondylarthrite ankylosante. *Revue du Rhumatisme*, 73, 692–694.

Dougados, Maxime., André, KAHAN., Michel, REVEL., Groupe Hospitalier Cochin, Paris. 2005. Spondylarthrite en 100 questions. *NHA Communication, 3 rue La Boétie, 75008 Paris.*

Daniel Wendling., Clément Prati., Éric Toussiro., Paul Ornetti. 2010. Spondylarthrite, spondylarthropathies : critères de diagnostic et de classification. *Revue du rhumatisme monographies*, 77, 43–47.

Dalva, K. & Beksac, M. 2007. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology. *Methods Mol Med*, 134, 61-9.

Dereure., Portalès.2013. Cytométrie de flux. *Les lymphomes cutanés-sous l'égide du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés*, 27-35.

El Maghraoui, A. 2004. La spondylarthrite ankylosante. *La Presse Médicale*, 33, 1459-1464. Erlich, H. 2012. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*, 80, 1-11.

El Hentatia, Fatima-Zahra et al. 2009. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue francophone des laboratoires*, 410, 23-32.

Frédérique Astier., Xavier Guillot., Jeanne Cook-Moreau. 2013. Épidémiologie, étiologie et physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante. *Supplément formation au n° 527 • 2^e*, 1-5.

François Rioult. 2011. Interprétation graphique de la courbe ROC. *résumée à EGC.*

Gladman DD, Anhorn KAB, Schachter RK, Mervart H. 1986. HLA antigens in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* ; 13 : 586-92.

Gilbert Semana., Erwann Quelvennec. 2002. Exploration du système HLA : pratique et indication. *Revue Française des Laboratoires*, N 341.

Gérald Grégori. La Cytométrie en flux : en flux : Principes. *Laboratoire de Microbiologie, de Géochimie et d'Ecologie Marines CNRS UMR 6117 163 Avenue de Luminy - Case 901- Bât TPRI, 13288 Marseille cedex 9.*

Hulstaert F, Albrecht J, Hannel I, et al. 1994. An optimised method for routine HLA B27 screening using flow cytometry. *Cytometry* ; 18 : 21-9.

Jacques A. 2015. Intérêt du séquençage dans les typages HLA et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. *Thèse pour le diplôme d'état de doctorat en pharmacie.*

Janis, Kuby. 2008. Immunologie. Dunod, paris, 6° édition.

Jouault, H., Imbert, M.1995. La cytométrie en flux intérêt et applications en hématologie. *Revue française des laboratoires*, 275, 29-35.

Klein, J. & Sato, A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343, 702-9.

Kravtsoff, S. Canepa, M.D. Boulanger, C. Babault et M. Chassaing. 1991. Phénotypage HLA B27 par cytométrie de flux. *Rev. Fr. Transfus. Hémodiol*, 34, 131 – 137.

Kirsten Braem., Rik J. Lories. 2012. Un aperçu de la physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante. *Revue du rhumatisme*, 79, 11–16.

Kirveskari J, Kellner H, Wuorela M, et al. 1997. False-negative serological HLA B27 typing results may be due to altered antigenic epitopes and can be detected by polymerase chain reaction. *Br J Rheumatol* ; 36 : 185-9.

Lopez de Castro JA. Structure, function, and disease association of HLA B27. 1994. *Curr Opinion Rheumatol* ; 6 : 371-7.

Levering WH, Wind H, Sintnicolaas K, Hooijkaas H, Gratama JW. 2003. Flow cytometric HLAB27 screening: cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens. *Cytometry B Clin Cytom* ;54B:28-38.

Leopold Gustave Lehman. 2011. Cours de cytométrie. *Université Catholique d'Afrique Centrale.* 1-31. http://www.ured-douala.com/download/cours_cytometrie_partie_i.pdf.

- LEACH, Mike., Drummond, Mark., Doig, Allyson.2013.** Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis. P. 248.
- Labalette, Béné et al., 2014.** Guide des analyses en immunologie. *Elsevier Masson SAS Chapitre 17 te 18.*
- Lingenfelter B, Fuller TFC, Hartung L, Hunter J, Wittwer C. 1995.** HLA B27 screening by flow cytometry. *Cytometry* ; 22 : 146-9.
- Moalic, V. 2008.** Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation*, 17, 407-411.
- Moalic, V. 2010.** Immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 25, 123-128.
- Moalic, V. & Ferec, C. 2005.** Typage HLA, méthodes d'analyses et applications cliniques. *La Presse Médicale*, 34, 1101-1108.
- Moalic, V. 2010.** Immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 25, 123—128.
- Muhammad Asim Khan. 2002.** Ankylosing Spondylitis. *Published in the United States by Oxford University Press Inc., New York [en ligne]*, 1-193.
- Monneret G., Seffert O., Debard A., Gutowski M.-C., Couprie N., Larbre J.-P., Tebib J., Bienvenu J. 2000.** Standardisation et automatisation du typage HLA B27 par une technique cytofluorométrique : validation par comparaison à la microlymphocytotoxicité. *Laboratoire d'immunologie, Centre hospitalier Lyon-Sud*. P 461-6, Volume 58, numéro 4.
- Neumüller J, Schwartz DWM, Dauber E, Mayr WR. 1996.** Evaluation of four monoclonal antibodies against HLA B27 for their reliability in HLA B27 typing with flow cytometry : comparison with the classic microlymphocytotoxic test. *Cytometry* ; 26 : 209-15.
- Orr K, Thomson GTD, Alfa M. 1994.** Utilization of commercial antisera and flow cytometry in HLA B27 typing. *Cytometry* ; 18 : 17-20.
- Pascal Claudepierre., Marie-CatherineVoisin. 2005.** Les enthèses : histologie, pathologie, et pathophysiologie. *Revue du Rhumatisme*, 72, 34-41.
- Perneger.T., Perrier.A. 2004.** Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou receiver operating characteristic. *Revue des maladie respiratoires*, 21, 398-401.
- Pei R., Arjomand-Shamsai M., Deng CT., Cesbron A., Bignon JD., Lee JH. 1993.** A monospecific HLA B27 fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody for rapid simple and accurate HLA B27 typing. *Tiss Antigens*; 41 : 200-3.

- Pialat, J., L. Di Marco., Feydy., C. Peyron., B. Porta., P.-H. Himpens., A. Ltaief-Boutrigou., S. Aubry., 2016.** Sacro-iliaques et spondyloarthrites. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*, 1-13.
- Rafik Terra. 2012.** La cytométrie de flux : un rôle majeur dans le diagnostic des néoplasies hématologique. *LE LABEXPERT*, 7-20.
- Rik J.U. Lories., Georg Schett. 2012.** Pathophysiology of New Bone Formation and Ankylosis in Spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin N Am*, 38, 555–567.
- Reynolds WM, Evans PR, Wilson PJ, Wong WM, Darke C, Smith JL. 1996.** Automated routine HLA B27 typing by flow cytometry. *J Immunol Methods*; 197 : 1-5.
- Schaefferbeke T. 1999.** Spondylarthrite ankylosante. *Rev Prat* ; 49 : 1791-6.
- Saraux, A., Allain, J., Guedes, C., Devauchelle, V., Le Goff, P. 2000.** Épidémiologie des spondylarthropathies. *La Lettre du Rhumatologue* - n° 261, 6-8.
- Steffens-Nakken HM, Zwart G, Van den Bergh FAJTM. 1995.** Validation of allele-specific polymerase chain reaction for DNA typing of HLA B27. *Clin Chem* ; 41 : 687-92.
- Spencer, Brown., Christel, Poujol. 2011.** Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. *Formation Permanente, CNRS, Gif-sur-Yvette*, 2-36.
- Sharma, N., Sharma, V., Masood, T., Nautiyal, S. C., Sailwal, S., Singh, R. K., Kushwaha, R. K. & Singh, R. K. 2013.** Usage of Conventional PCR Technology for the Detection of HLA-B27 Allele: A Significant Molecular Marker of Ankylosing Spondylitis. *Indian J Clin Biochem*, 28,189-92.
- Salih Ozgocmen., Ahmet Godekmerdan., Fatma Ozkurt-Zengin. 2007.** Réponse de phase aiguë, paramètres cliniques et activité inflammatoire dans la spondylarthrite ankylosante. *Revue du Rhumatisme*, 74, 465–469.
- Sibilia J., Pham T., Sordet C., Jaulhac B., Claudepierre P. 2005.** Spondylarthrite ankylosante et autres spondylarthropathies. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Traité de Médecine Akos*, 7-0510.1
- Spondylarthrite ankylosante aspect clinique et thérapeutique. Société parisienne d'expansion chimique S.P.E.C.I. S.A.
- Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. 2005.** HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays. *Cytometry B Clin Cytom* ;63:10-15.
- Terasaki PI, McClelland JD. 1964.** Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* ; 204 : 998-1000.
- T. Montange., A. Vejux., M. Labenne., P. Poncelet., J.B. Gouyon., G. Lizard. 2005.** Cytométrie en flux, microbilles et analyses biomoléculaires multiplexes. *Immuno-analyse & Biologie*

spécialisée, 20, 2–10.

- Toussirot, E., Semana, G., Perdriger, A., 2012.** Région HLA et pathologie ostéoarticulaire : aspects fondamentaux et applications en clinique. *EMC Appareil locomoteur*, 7(1):1-14 [Article 14-011-A-10].
- Tim Bushnell. 2015.** Modern Flow Cytometry. <https://expertcytometry.com>, 4-67.
- Tae-Jong Kim., Tae-Hwan. 2010.** Aspect clinique de la spondylarthrite ankylosante en Corée. *Kim Revue du rhumatisme*, 77, 273–278.
- Thao Pham. 2008.** Physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante. Actualités. *Revue du Rhumatisme*, 75, 925–930.
- Toussirot E, Semana G, Perdriger A. 2012.** Région HLA et pathologie ostéoarticulaire : aspects fondamentaux et applications en clinique. *EMC Appareil locomoteur*, 7(1), 1-14 [Article 14-011-A-10].
- Wendling D. 1998.** Spondylarthrite ankylosante. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Appareil locomoteur*, 14-230-A-10, 14 p.
- Ward AM, Nikaein A. 1995.** Comparison of monoclonal antibodies for flow cytometric analysis of HLA B27 antigen. *Cytometry* ; 22 : 65-9.
- Wuorela M, Jalkanen S, Kirveskari J, Laitio P, Granfors K.1997.** *Yersinia enterocolitica* serotype O : 3 alters expression of serologic HLA B27 epitopes on human monocytes. *Infect Immun*; 65 : 2060-6

