

The stiffening spondylitis (SA) is an inflammatory chronic disease and one of the most severe forms of the concept of spondylarthropathies (SPA). One of the criteria of its classification is the presence of the gene HLA-B*27, the gene of the major complex of histocompatibility of class I (CMH-I). This locus is localized at the level of the short arm of the chromosome 6, it plays a determining role in the inflammatory reaction by presenting endogenous antigens to lymphocytaires cytotoxiques cells (LT), carriers of specific receptors the TCRs. By default, the molecule HLA-B*27 presents to the surface of the cells which carries its antigens says, arthritogènes, so favoring a greater and sustainable inflammatory reaction.

In our study, adds us to us interested in a group of 77 patients (SA) confronted with a group of 100 healthy individuals, the gene B*27 of which we amplified by the technique of the real time quantitative PCR. The obtained, positive and negative results, allowed us to deduct the frequencies of the gene B*27, used in a study statistician. Crossed paintings one realized between the frequency of the gene and some of the clinical demonstrations of this pathology, Such as a coxite, a family form, ... etc., to confirm or counter its implication In the development of this disease, the (SA). The same work was made in parallel on another group of 80 patients (SA), the gene B*27 of which was amplified by the PCR-SSP.

The realized works, of one lasted one year, in the healthy of the laboratory of immunogenetics of the Institute Pasteur of Algeria (the IPA), framed(supervised) by Mrs Professor a hour H. AMROUN-AIT BELKACEM. The patients as well as their clinical data supplied by Mrs Doctor R. ALLAT of the-university hospital of Douira.

The results of our researches show the implication of the gene HLA-B*27 with a strong percentage in the appearance of this pathology, the limited company. For 157 studied patients, the frequency of the gene HLA-B*27 is 54,78 %, with family history and axial infringement, coxite, nevertheless the frequency of this gene to 100 witnesses is only 2 %.

KEYWORDS: HLA-B*27, Stiffening Spondylitis (SA), PCR-TR, PCR-SSP.

RESUME

La spondylarthrite ankylosante (SA) est une maladie inflammatoire chronique et une des formes les plus sévères du concept des spondylarthropaties (SPA). Un des critères de sa classification est la présence du gène HLA-B*27, un gène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Ce locus est localisé au niveau du bras court du chromosome 6, il joue un rôle déterminant dans la réaction inflammatoire en présentant des antigènes endogènes aux cellules lymphocytaires cytotoxiques (LT), porteuses de récepteurs spécifiques les TCRs. Par défaut, la molécule HLA-B*27 présente à la surface des cellules qui la porte des antigènes dit, arthritogènes, favorisant ainsi une réaction inflammatoire accrue et durable.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à un groupe de 77 patients SA confronté à un groupe de 100 individus sains, dont on a amplifié le gène B*27 par la technique de la PCR quantitative en temps réel. Les résultats obtenus, positifs et négatifs, nous ont permis de déduire les fréquences du gène B*27, utilisées dans une étude statisticienne. Des tableaux croisés ont été réalisés entre la fréquence du gène et certaines des manifestations cliniques de cette pathologie, telle qu'une coxite, forme familiale, ... etc, afin de confirmer ou d'infirmer son implication dans le développement de cette maladie, la SA.

Le même travail a été effectué en parallèle sur un autre groupe de 80 patients SA, dont le gène B*27 a été amplifié par la PCR-SSP.

Les travaux réalisés, rédaction en parallèle, d'une durée d'un an (mars 2016 - mars 2017), au sein du laboratoire d'immuno-génétique de l'Institut Pasteur d'Algérie (l'IPA), encadré par Mme le Professeur H. AMROUN-AIT BELKACEM. Les patients ainsi que leurs données cliniques fournies par Mme le Docteur R. ALLAT du centre hospitalo-universitaire de Douira.

Les résultats de nos recherches montrent l'implication du gène HLA-B*27 avec un fort pourcentage dans l'apparition de cette pathologie, la SA. Pour les 157 patients étudiés, la fréquence du gène HLA-B*27 est de 54,78%, avec des antécédents familiaux, une atteinte axiale et une coxite. Néanmoins, la fréquence de ce gène chez les 100 témoins est uniquement de 2%.

MOTS CLES : HLA-B*27, Spondylarthrite Ankylosante (SA), PCR-TR, PCR-SSP.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida -1-

Faculté Des Science De La Nature Et De La Vie

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme Master

Option : Génétique et Physiologie

Thème

**DETERMINATION DE LA FREQUENCE DE HLA-B27
PAR LA TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL DANS
LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE**

Thème proposé et encadré par : **Mme le Pr. AMROUN-AITBELKACEM. H**

Présenté par : Mr. TOUDERT Mohamed Ou Idir

Membres de jury :

Présidente : **Mme CHAKHMA A. MAA**

Promotrice : **Mme le Pr. AMROUN-AITBELKACEM. H**

Examineur : **Mr BENYAHIA N. MAA**

PROMOTION 2017



REMERCIEMENT

Je tiens à remercier tout ceux qui on contribués de prés et/ou de loin dans la concrétisation de ce simple document scientifique, mémoire de fin d'étude d'un master en Génétique et Physiologie, qui s'intitule : « Détermination de la fréquence de HLA-B27 par la technique de PCR en temps réel dans la spondylarthrite ankylosante ». Que j'espère, apportera satisfaction à tout ceux qui le consultent. Un travail réalisé à l'IPA, encadré par Me. Le professeur : H. AMROUN-AITBELKACEM et son compétant groupe de scientifique biologiste, du laboratoire d'immunogénétique et de transplantation. Sans oublier Me. Le docteur : R. ALLAT du centre hospitalo-universitaire de Douira, qui nous à fournie les données cliniques des patients sur les quels ce travail a été fait.

Un remerciement particulier, à Mr. Le professeur : CHERBAL Farid de l'FSB de l'USTHB ainsi qu'à Mr. Le docteur : MOHAMED SAID Ramdane de l'FSB de Saad Dahlab Blida 1, chef d'option Génétique et Physiologie, sans oublier les enseignants et enseignants chercheurs de son staff. Ceux qui m'ont permis d'évoluer dans mes études universitaires par l'obtention d'un diplôme en Master.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement, l'ensemble du staff Génétique licence 2 de l'FSB de l'USTHB, dont je fais partie depuis l'année universitaire 2005 à ce jour, grâce à Me. N. BANDOUC, responsable du module et MESSAI qui m'a fait découvrir le module. Je remercie également les enseignants des autres staffs dont je fais partie à l'FSB de l'USTHB : staff Biophysique et à notre tête mon ami, Mr. Ali KHALKHAL ainsi que Mr. IHADADEN, ZOUAMBIA, SOLTANI et BOUGRID. Le staff TCE 1 et TCE 2 et à notre tête Mr. MEFTAH, Me BELABES-NABI. Les staffs Biologie Cellulaire et Biologie Animale et à notre tête, Mr. R. AOUAMMEUR et Mr. F. BOUKROUFA.

Pour terminer, je ne dois pas oublier de remercier Me. OUAFI, Me. FERGANI, Me. La vice Doyenne T. HAMMOUDI et Me. La Doyenne LARABA, ainsi que tous mes collègues de l'USTHB sans exception et mes aimables étudiants anciens et nouveaux, pour qui je souhaite du succès dans leur parcours scientifique.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à tout les scientifiques, quelque soit leur discipline, et à tout les philanthropes du monde qui ne cessent de servir d'autrui, tel que les patients atteint de maladies incurable, afin de les soulager de leur souffrances quotidiennes.

Je le dédie aussi, à tous mes amis sans exception et à tous mes collègues universitaires (enseignants et autres) de : l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene de Bab-Ezzouar (Alger), l'Université Ben youcef Ben khedda d'Alger 1, l'Université Saad Dahleb Blida 1, ainsi qu'à la totalité du personnel (scientifiques et autres) de l'Institut Pasteur d'Algérie, à mes étudiants, et sans oublier mes proches et mes parents.

PLAN DU TAVAIL

PLAN

	Pages
OBJECTIF DU TRAVAIL (introduction)	01
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	02-22
I. LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE	02
I. A. MANIFESTATIONS CLINIQUES DES SPA	02
I. B. LES DIFFERENTS SOUS-TYPES SPA	04
I. C. LES CRITERES DE CLASSIFICATIONS DES SPA	05
I. D. LA REACTION INFLAMMATOIRE ET L'ANKYLOSE	08
I. E. TRAITEMENTS	10
II. LE SYSTEME HLA (CMH) ET LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE	12
II. A. GENERALITES SUR LE SYSTEME HLA	13
II. B. LES GENES DE LA SUSCEPTIBILITE ET LA SA	17
1. HLA-B27 ET SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE	17
2. AUTRES GENES DU CMH DE CLASSE I ET SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE (SA)	20
3. CMH DE CLASSE II ET SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE (SA)	21
4. CMH DE CLASSE III ET SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE (SA)	21
5. LES GENES DE SUCEPTIBILITE EN DEHORS DU CMH	21
MATERIELS & METHODES	23-29
I. MATERIELS BIOLOGIQUES	23
II. METHODES	23
II. A. L'EXTRACTION DE L'ADN PAR LA METHODE « SALTING OUT »	23
II. B. LA PCR-TR	24
II. C. LA PCR-SSP	25
II. D. ETUDES STATESTIQUES	26

RESULTATS & DISCUSSIONS	30-34
I. RESULTATS	30
II. DISCUSSION DES RESULTATS	32
CONCLUSION	35
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

La Spondylarthrite Ankylosante (SA) est la forme emblématique des Spondylarthropathies (SPA), elle est une maladie inflammatoire affectant principalement les articulations axiales et périphériques ; une inflammation dont le foyer primitif peut être d'origine digestif, déclenchée par la flore bactérienne ou virale. Une pathologie qui présente plusieurs manifestations cliniques qui nous permet de la classer parmi bien d'autres maladies inflammatoires. Un des critères de classification est la présence ubiquitaire du gène HLA-B*27, un gène du complexe majeur d'histocompatibilité CMH de la classe I, qui est exprimé à la surface des cellules et qui est associé aux peptides arthritogènes.

Plusieurs travaux ont été réalisés et qui ont tentés d'élucider ce concept (Brown et al ; Breben et al 1993 ; Eurlly et al ; Kheder et al ; ...). L'utilisation de différentes méthodes et techniques de biologie moléculaire, nous ont permis de déceler un nombre important de facteurs susceptibles d'être impliqués dans l'apparition et l'évolution de cette maladie ; d'où la notion de maladie multifactorielles.

Nous nous sommes intéresser à la mise en évidence de l'existence de ce gène déjà incriminé comme étant un marqueur fortement lié au développement de cette pathologie, pour cela on a pris 77 patients atteints d'une SA et un autre échantillon constitué de 100 individus sains, comme témoin, afin de vérifier ce lien pathologique entre la SA et le gène HLA-B*27. L'amplification de ce gène chez ces patients a été réalisé par la PCR-TR (Polymerase Chain Reaction à Temps Réel), puis on vérifie les données cliniques de ces même patients SA, telles qu'une coxite, la présence d'une forme familiale (antécédents familiaux) et autres critères possibles. Ces critères, sont pris en considération uniquement dans le cas ou leur fréquence est élevée.

La réalisation des tableaux croisés (2X2) des deux échantillons (patients et témoins) nous a permis de comparer, via le test chi deux (χ^2), l'association de chaque critère à la maladie. En parallèle, nous avons comparé ces résultats à ceux d'un autre groupe de 80 patients SA dont le gène HLA-B*27 a été amplifié par la PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE (SA)

La SA est une maladie inflammatoire qui existait depuis l'antiquité (étude des nécropoles de l'Égypte ancienne), décrite pour la première fois en 1559 par Realdo Colombo. C'est une des formes de la spondylarthropathie (SPA) longtemps liée au gène HLA-B27 ; gène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), locus porté par le bras court du chromosome 6. Le concept des SPA est né en 1974 grâce aux travaux de Moll et al, la SPA proche du syndrome SAPHO est le deuxième rhumatisme inflammatoire chronique (RIC) après la polyarthrite rhumatoïde (PR), elle englobe à la fois la spondylarthrite ankylosante (SA) comme chef de file ou la forme emblématique du groupe, le rhumatisme psoriasique (RhPso), la spondylarthrite des MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), la spondylarthrite juvénile, l'arthrite réactive ou réactionnelle (ARé) et la spondylarthrite indifférenciée (uSpA) ; c'est-à-dire formes d'SPA non classées.

Ces différents sous-types présentent certaines caractéristiques communes dans la manifestation clinique de la pathologie, qui s'interprètent généralement par des atteintes inflammatoires articulaires (axiales, périphériques) et extra-articulaires (psoriasis, uvéite...). Les patients SA sont majoritairement de sexe masculin, avec sex-ratio d'une moyenne de 2 ou 3 jusqu'à 9 hommes pour 1 femme, c'est selon la région géographique et l'appartenance ethnique, d'un âge de début inférieur à 35 ans, souffrant surtout d'atteintes axiales et d'enthésites. La cause de son apparition reste incertaine, mais des travaux réalisés montrent l'implication de facteurs génétiques tels que HLA-B27, dans un tiers de la prédisposition (J. Martinez-Borra et al 2000 ; Jane Freeston et al 2007 ; Alin SARAUX et al 1995 ; Gunal EK 2008 ; Brown et al ; Joël Taurog et Robert Hammer 1990), ainsi que des facteurs environnementaux tels que l'association de la barrière bactérienne intestinale et les MICI, et les formes d'arthrites réactionnelles déclenchées par les infections bactériennes de l'appareil intestinal et urinaire, comme elle peut être d'origine virale avec des antécédents aux bacilles de Koch (Alice Taplin 2013). Récemment, le tabagisme a été identifié comme facteur favorisant le déclenchement ou de l'aggravation de la SA, ou même de sa résistance au traitement, et que tout type de stress peut être un élément déclencheur de cette pathologie.

Au niveau des articulations enflammées du sacro-iliaque, par exemple, on observe la présence des lymphocytes T CD4+ et CD8+, des macrophages activés, l'oxyde nitrique (NO), une néo-angiogénèse, la prolifération des synoviocytes, stimulation du NFκB et l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, TNF-β, ...). Cette activité est suivie par une destruction du cartilage et de l'os sous-jacent, puis ultérieurement, l'apparition d'un tissu de cicatrisation fibreux et d'une ossification excessive, impliquant ainsi la disparition de l'articulation.

L'infiltrat cellulaire des synovites périphériques est représenté essentiellement par des lymphocytes T CD4+, CD8+, les cellules NK (natural killer), les lymphocytes B20+ et les macrophages CD68+, CD163+.

A-MANIFESTATIONS CLINIQUES DES SPA

1-Manifestations articulaires

a-Manifestations axiales

Se sont des douleurs inflammatoires généralement nocturne, elles affectent les articulations du squelette axial, tels que le sacro-iliaque ou sacroiliite (une des caractéristiques cliniques et radiologiques de la SA), le rachis ainsi que la paroi thoracique, provoquant une raideur qui peut évoluer en une ankylose progressive, autrement dit, une ossification des ligaments et des articulations. Voir figure 1

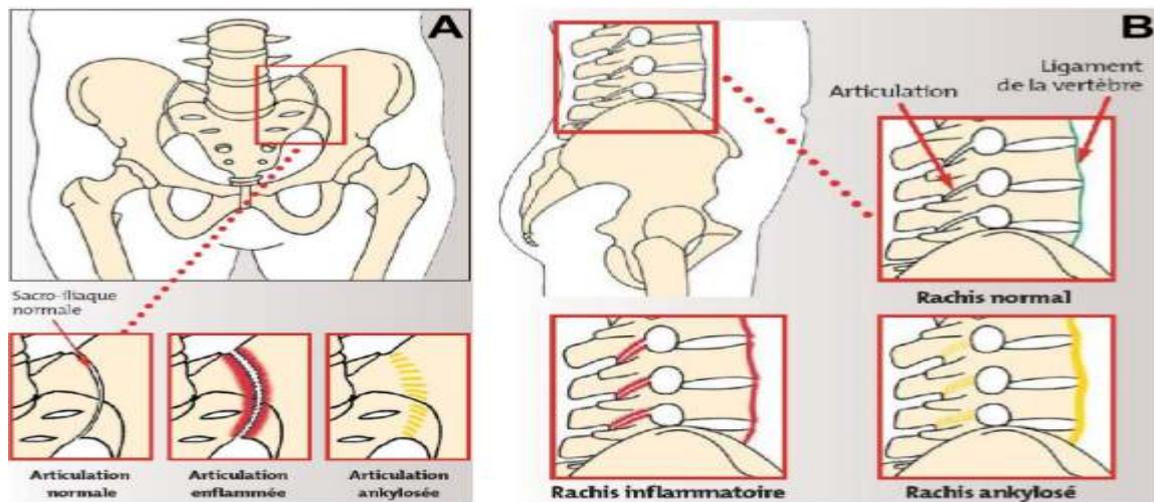


Figure 1 : Représentation des atteintes de la Sacro-iliaque (A) et du Rachis (B) dans les SpA.

b-Manifestations périphériques

C'est l'inflammation des articulations périphériques (épaules, genoux, chevilles, hanches,...), zone cible de l'inflammation est l'enthèse chez les SPA, représentée par des arthrites, dactylites et enthésites. Voir figure 2

– Dactylites : Ce sont des ténosynovites ; l'inflammation de toutes les articulations du doigt ou de l'orteil qui prend l'aspect d'une saucisse, elle est spécifique au SPA.

– Arthrites : Qui se manifestent par une rougeur, une raideur, des douleurs et gonflement de l'articulation dus à l'accumulation du liquide synovial, produit par l'inflammation de la membrane qui entoure la cavité articulaire, aboutissant à l'érosion de l'os sous-jacent. Présentent chez 50 à 70% De cas d'SPA.

– Enthésites : L'enthèse est le site d'attachement des ligaments et des tendons à l'os. Il existe deux types d'enthèses, fibreuses et fibrocartilagineuses. La première est formée essentiellement d'un tissu conjonctif à base de collagène, la seconde quand à elle renferme quatre zones : une zone contenant les fibres collagènes parallèles recouvertes de fibroblastes allongés (les ténocytes), l'autre zone est un cartilage formé de chondrocytes du collagène de type II et de protéoglycane du cartilage (aggrécane), la troisième zone caractérisée par une minéralisation du fibrocartilage, néanmoins la dernière zone est constituée de travées osseuses.

L'atteinte la plus fréquente chez les SPA est la talalgie (talon), une inflammation qui peut évoluer jusqu'à l'ossification des tendons et ligaments. Par ailleurs, ils existent des hypothèses expliquant la raison de l'inflammation de certains sites plutôt que d'autres. Au niveau des enthèses, le stress mécanique engendrerait des microtraumatismes causant l'augmentation de l'angiogénèse et de la circulation sanguine terminale ; favorisant ainsi le dépôt d'antigènes bactériens, reconnus par les TLR qui stimulent les macrophages et les polynucléaires par l'activation de leurs voies de signalisations cellulaires ; d'où la production de médiateurs inflammatoires. D'autres hypothèses, optent plutôt pour le cumul et le dépôt de médiateurs inflammatoires au niveau des enthèses, sans microtraumatismes préalable, véhiculés par le sang, en faveur d'une inflammation chronique. Voir figure 2

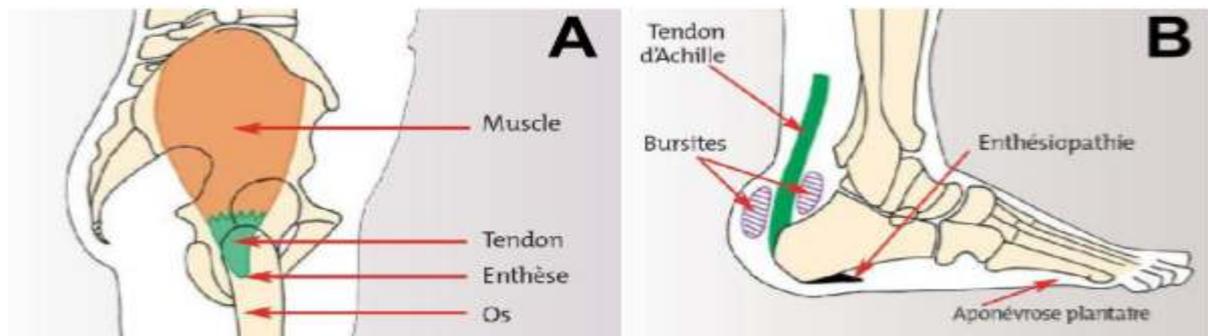


Figure 2 : Représentation d'une enthèse (A) et de son atteinte au talon (B) lors de la SpA.

2-Manifestations extra-articulaires

Ce sont des atteintes non rhumatismales, les plus répandues sont :

- Uvéite : C'est l'une des plus importantes manifestations extra-articulaire, retrouvée chez 40% des cas d'SPA qui présentent une atteinte de l'appareil oculaire marquée par une douleur, une rougeur, une sensibilité au photon accompagnée de larmoiement et d'une baisse de l'acuité visuelle.

- Psoriasis : C'est une inflammation cutanée, retrouvée sur différents endroits du corps y compris les phanères.

- Les inflammations intestinales : Se manifestent par la production des glaires, des douleurs abdominales et des hémorragies, comme la maladie de crohn, traitée par transplantation fécale.

D'autres manifestations plutôt rares peuvent survenir au cours d'une SPA, telles que les atteintes pulmonaires, cardiaques et de l'appareil uro-génitales.

B-LES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'SPA

1-Spondylarthrite Ankylosante (SA)

La prévalence de la SA est étroitement liée à la fréquence de l'antigène HLA-B27, très répandu au nord du globe terrestre, l'incidence de la SA diminue en passant du nord au sud de la terre. Il est d'environ de 8% chez la population caucasienne (90% des patients caucasiens, sont des B27+), 4% en Afrique, 2 à 9% chez les chinois et seulement 0,1 à 0,5% au Japon (là où l'allèle B27 est rare).

La prévalence la plus élevée est retrouvée chez la population autochtone du cercle polaire et subpolaire.

2-Rhumatisme Psoriasique (RhPso)

Retrouvé chez 15 à 20% de cas d'SPA, l'équivalent de 3% de la population générale porteuse de lésions cutanées et des arthrites. La manifestation axiale survient chez 50% des cas de RhPso après avoir développé des manifestations périphériques.

3-Spondylarthrite des MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin)

Les entérocopathies inflammatoires les plus répandues sont la maladie de Crohn (2 à 8% des malades) et la colite ulcéreuse. 20 à 30% des MICI présentent des manifestations articulaires, axiales (sacro-iliaque) et périphériques, ce qui fait que l'inflammation de la muqueuse intestinale est étroitement liée au SPA. D'ailleurs, 54% des patients HLA-B*27+ atteints de Crohn développent une SA et 50% des patients SPA présentent des lésions de la muqueuse intestinale semblables à celles de la maladie de Crohn. En outre, les rats transgéniques (B27+) privés de leur flore bactérienne intestinale ne développent pas d'SPA, alors que sa réintroduction déclenche la pathologie.

4-La Spondylarthrite Juvénile

Elle touche les enfants de moins de 16 ans, elle s'exprime généralement par des arthrites périphériques associées à des enthésopathies (dactylites, enthésites), elles sont caractéristiques des formes juvéniles, et comme on peut observer des manifestations extra-articulaires. Chez l'enfant en croissance, l'interligne sacro-iliaque est large ce qui rend difficile la lecture des clichés radiologiques afin de confirmer une atteinte axiale, mais à l'âge adulte ils développent souvent une SA ou une des formes d'SPA.

5-Arthrites Réactionnelles (ARé)

10 à 20% des SPA souffrent d'une ARé, la SPA associée à une arthrite réactionnelle microbienne isolée ou au syndrome de Fiechter-Leroy-Reiter apparaît 10 à 15 ans après une arthrite réactionnelle, parfois plus tôt ou même la précéder. Dans le cas d'une ARé microbienne, le foyer inflammatoire est hors articulation, il est localisé dans l'intestin ou dans les voies uro-génitales. Les souches bactériennes intestinales responsables de la maladie sont les entérobactéries, telles que les Salmonelles, Yersinia, Shigella, Campylobacteria,... et au niveau génitale ce sont les Eubactéries, telles que Chlamydia trachomatis et autres. Il paraît que ces micro-organismes ainsi que leurs débris persistent d'une manière anormale dans l'organisme en s'échappant aux phagolysosomes et en s'adaptant au milieu intracellulaire ; comme le cas des Salmonelles entérotoxis qui déclenchent des ARé. Sachant aussi que le facteur génétique HLA-B27 joue un rôle dans cette pathologie, vu qu'il est présent chez plus de 65% des patients ARé.

6-Spondylarthrite indifférenciée (uSpA)

C'est un rhumatisme inflammatoire chronique (RIC) qui évolue de manière variable, dont la difficulté de la classer dans une des catégories citées précédemment. Cependant, 50% des patients uSpA développent une SA 10 ans plus tard.

C-LES CRITERES DE CLASSIFICATIONS DES SPA

Le premier critère pris en considération dans les années 60 pour déterminer une SA c'est l'étude radiologique du sacro-iliaque ; une anomalie visible qu'après 6 ans d'atteinte, ce qui prive les patients de certains traitements préventifs, tels que les anti-TNF α qui semblent être efficaces au début du développement de la pathologie.

Les différents critères, radiologiques, cliniques et épidémiologiques, permettent de faire la distinction entre les différents groupes de maladies rhumatismales, et donc, l'identification d'une SPA ainsi que le classement de ses différentes formes.

Certains cliniciens les utilisent pour dresser un diagnostic.

1-Les critères modifiés de New-York

Qui résultent des critères de New-York et de Rome après modification en 1984, leur utilisation permet d'identifier des patients atteints de spondylarthrite ankylosante (SA). La SA est définie quand le sacro-iliaque (critère radiologique) est associé à au moins un critère clinique, et elle est considérée comme étant probable dans le cas d'observation de trois critères cliniques ou d'un seul critère radiologique. Voir tableau 1

Tableau 1 : Critères diagnostiques de la SA.

NEW YORK 1966 critères originaux	NEW YORK 1984 critères modifiés
<p>Diagnostic :</p> <p>1/ Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans les 3 plans de l'espace : flexion antérieure, latéro-flexion et hyperextension</p> <p>2/ Douleur de la jonction dorso-lombaire ou du rachis lombaire</p> <p>3/ Limitation de l'expansion thoracique à 2,5 cm au moins, mesurée sur le 4^e espace intercostal.</p>	<p>Critères cliniques (au moins 1) :</p> <p>1/ Lombalgies et raideur lombaire de plus de trois mois améliorées par l'activité physique et non soulagées par le repos</p> <p>2/ Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans le plan sagittal et frontal</p> <p>3/ Limitation de l'expansion thoracique par rapport aux valeurs de sujets de même âge et même sexe</p>
<p>Gradation radiographique (Normal 0, Suspecte 1, Sacroiliite minime 2, Sacroiliite modérée 3, Ankylose 4) :</p> <p><u>SA certaine :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> * Sacroiliite de grade 3-4 bilatéral avec au moins un critère clinique * Sacroiliite de grade 3-4 unilatéral ou grade 2 bilatéral avec le premier critère clinique ou avec les critères cliniques 2 et 3. <p><u>SA probable :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> * Sacroiliite de grade 3-4 bilatéral sans critère clinique 	<p>Critères radiologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Sacroiliite de grade \geq 2 si sacroiliite bilatérale ou * Sacroiliite de grade \geq 3 si sacroiliite unilatérale

D'autres critères de classification ont fait leur apparition, ils permettent cette fois-ci d'identifier une spondylarthropathie (SPA), parmi eux les critères d'Amor, d'ESSG et d'ASAS.

2-Les critères d'Amor

Avant la naissance du concept SPA, ses différentes formes étaient considérées comme des syndromes distincts et après étude il s'est avéré qu'ils présentent des caractères en communs, ce qui a conduit dans les années 90 l'élaboration des systèmes de classification en prenant en considération ces critères clinique et radiologique communs.

Parmi ces systèmes ; les critères d'Amor qui inclue les critères modifiés de New-York, il présente 90% de sensibilité avec 87% de spécificité. Voir tableau 2

Tableau II : Critères diagnostiques de la SpA d'Amor.

SIGNES CLINIQUES OU HISTOIRE CLINIQUE	Score
1/ Douleurs nocturnes lombaires ou dorsales ou raideur matinale lombaire ou dorsale	1
2/ Oligoarthritis asymétrique	2
3/ Douleur fessière sans précision	1
Douleur fessière à bascule	2
4/ Doigt ou orteil en saucisse	2
5/ Talalgie ou toute autre enthésopathie	2
6/ Iritis	2
7/ Urétrite non gonococcique ou cervicite moins d'un mois avant le début d'une arthrite	1
8/ Diarrhée aiguë moins d'un mois avant une arthrite	1
9/ Présence ou antécédent de psoriasis, de balanite, ou d'entérocolopathie chronique	2
SIGNES RADIOLOGIQUES	
10/ Sacro-iliite (stade>2)	2
TERRAIN GENETIQUE	
11/ Présence de l'antigène HLA-B27 ou antécédents familiaux de spondylarthrite, de MICI ou de psoriasis	2
SENSIBILITE AU TRAITEMENT	
12/ Nette amélioration en moins de 48 heures par anti-inflammatoires non stéroïdiens ou rechute à l'arrêt (<48 heures)	2
Le malade sera déclaré comme ayant une spondylarthrite si la somme des points des 12 critères est ≥ 6.	Sensibilité : 90% Spécificité : 87%

3-Les critères d'ASAS

Les avancées technologiques, telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'efficacité des traitements anti-TNF, ont permis d'améliorer les critères de classification des SPA. Ainsi en 2009 l'ASAS a validé de nouveaux critères de classification des SPA, prenant en compte les formes axiales et les formes périphériques. Voir tableau 3 et 4

Tableau III : Critères d'ASAS 2009 SpA axiale.

	<p>* Spondylite d'origine inflammatoire</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Imagerie (radiographie, échographie ou scintigraphie) de sacro-iliite à l'IRM OU ➢ une sacro-iliite radiographique bilatérale suivant les critères de New-York modifiés <p>** Critères de spondylarthrite</p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ myalgie(s) inflammatoire(s) ➢ arthrite ➢ entérite(s) (aiguë) ➢ urétrite ➢ dentrite ➢ psoriasis ➢ maladie de Crohn/maladie colite hémorragique ➢ éruption érythémateuse ASBO ➢ antécédent (antérieur) de SP ➢ HLA-B27 positif ➢ CRP augmentée
--	--

Sensibilité de 90% et spécificité de 87% chez les patients souffrant de spondylarthrite.

Tableau IV : Critères d'ASAS 2009 SpA périphérique

<p>Arthrite ou enthésite ou dactylite + ≥ 1 autre signe de SPA</p> <p>OU</p> <p>Arthrite ou enthésite ou dactylite + ≥ 2 autres signes de SPA</p>	<p>Critères A : autres signes de SPA parmi :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis • Maladie inflammatoire intestinale chronique • Antécédent récent d'infection • HLA-B27 positif • Uvéite • Sécro-iliite à la radiographie ou à l'IRM <p>Critères B : autres signes de SPA parmi :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arthrite • Dactylite • Enthésite • MICI • Antécédent familial de SPA
--	--

Sensibilité 75,0% et spécificité 82,2% chez 266 patients avec des syndromes périphériques

D-LA REACTION INFLAMMATOIRE ET L'ANKYLOSES

Comprendre ce phénomène est la clef qui permet l'ouverture des portes à des perspectives thérapeutiques prometteuses. Presque rien n'a été élucidé à ce jour d'autant que la maladie persiste, mais des travaux ont été réalisés pour mieux comprendre ces deux mécanismes afin de déceler des anomalies pathologiques possible.

Les TLR, ce sont des récepteurs exprimés à la surface de différents types cellulaires de l'immunité innée, comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, ils permettent la reconnaissance des PAMPs (épitopes antigéniques microbiens) et les ligands endogènes libérés par les cellules endommagées, telles que les protéines du choc thermique ou la fibronectine (appelées alarmins) qui appartiennent aux signaux de danger ou DAMPs. Les TLR stimulent par leur ligand déclenchent des voies de signalisations intracellulaires, d'où l'activation des facteurs de transcriptions NFκB suivie par la production de médiateurs inflammatoires.

Dans la SA, le TLR4 et TLR2 sont surexprimés chez les macrophages CD163+ de la synovie et de la muqueuse colique, ce type de macrophage connu pour sa production intense en TNF-α et une quantité moindre en IL-10, ce dernier est impliqué dans la réponse immunitaire adaptative. De plus, chez ces patients le traitement anti-TNFα régule l'expression des TLR2 et 4, ainsi que chez les rats malades, on observe une réduction de l'inflammation intestinale et articulaire. Les cellules dendritiques (CD) et les cellules présentatrices d'antigène (CPA), une fois activées par les TLRs, présentent l'antigène aux lymphocytes T naïves (LTh0) et libèrent l'IL-6, l'IL-1β, l'IL-23 associées au TGF-β, sous leur effet, les LTh0 se différencient en LTh17 qui à leur tour sécrètent l'IL-17F, l'IL-17A et l'IL-21 (cytokines pro-inflammatoires).

Les LTh0 stimulés grâce aux récepteurs de l'IL-23 exprimés à leur surface, tandis que le TGF-β a pour rôle d'inhiber leur transformation en LTh1.

Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN) possèdent des récepteurs spécifiques aux cytokines libérées par les LTh17, cette interaction les active, elles migrent vers le foyer inflammatoire en sécrétant à leur tour avec les cellules épithéliales des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1β, IL-6, TNF-α et des facteurs stimulant la granulopoïèse (formation des granulocytes). Ces faits antérieurs, augmentent l'inflammation locale.

L'IL-1 et l'IL-6 induisent la production d'IL-23 chez les monocytes et les CD ce qui fait que le taux d'IL-23 augmente davantage, d'où la surproduction d'IL-17 chez les LTh17. L'IL-17 provoque une cohue cellulaires en incitant la synthèse de chimiokines chez les synovies qui recrutent les LT, lymphocytes B (LB), les monocytes et les PNN au niveau de la membrane synoviale, ainsi que, la sécrétion par les chondrocytes, les CD et les macrophages de la métalloprotéinase et du NO (monoxyde d'azote), responsable de la destruction articulaire. D'autant plus, L'IL-17 augmente l'expression du facteur RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes qui taraudent le tissu osseux (ostéoporose). En conséquence de cette cascade, induit l'érosion-osseux chez les patients SPA. (Frédérique ASTIER, Limoge 2012) voir figure 3.

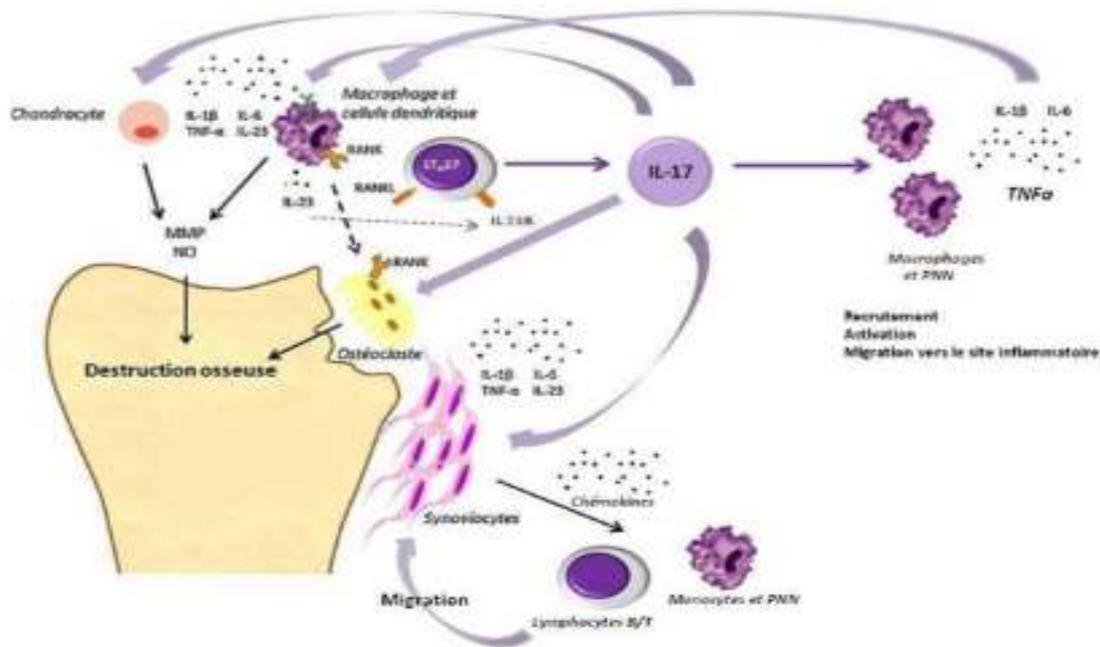


Schéma récapitulatif du rôle joué par l'IL-17 dans les mécanismes inflammatoires et de destruction articulaire. IL-1 β , 6, 17, 23 = Interleukines 1 β , 6, 17, 23 ; IL23R= Récepteur de l'interleukine 23 ; MMP = matrix metalloprotease ; NO = monoxyde d'azote ; PNN = Polynucléaires neutrophiles ; RANK/RANKL = Receptor activator of NF κ B/ligand ; TNF α = Tumor necrosis factor α [33]

Figure 3 : L'érosion-osseux dans la spondylarthrite ankylosante.

Mais la SA est caractérisée par un déséquilibre entre la destruction et la formation osseuse, la formation osseuse est plutôt excessive. Dans ce cas là, il faut qu'ils y aient des signaux moléculaires pour réguler l'activité et la différenciation des ostéoblastes, parmi elles on distingue :

-La PGE2, en synergie avec BMP de la famille du TGF, semble jouait un rôle dans la synthèse osseuse en induisant la prolifération des ostéoblastes et la synthèse d'une enzyme responsable de la minéralisation osseuse, appelée PAL.

Des taux élevés de BMP2 et BMP7 retrouvés chez les patients SPA. Les souris souffrant d'ankylose, leur traitement à base de Noggin, une protéine antagoniste de BMP, semble être efficace.

-La Wnt, est une protéine impliquée dans l'induction de l'ostéogénèse en s'interagissant aux récepteurs responsables de la phosphorylation des β -caténine et la transcription des gènes de

différenciation ostéoblastique. Elle possède deux antagonistes ; le récepteur DKK-1 et la sclérotine. Il semble que chez les patients SA ces deux inhibiteurs ne fonctionnent pas correctement.

-Les TLR aussi joueraient un rôle dans cette différenciation, d'ailleurs, Les cellules souches mésenchymateuses pluripotentes expriment différent type de TLR à leur surface et en grande quantité.

Certains travaux ont montrés que chez les cellules mésenchymateuses de la murène, le TLR-2 stimulé par un ligand synthétique augmente la sécrétion d'IL-6 et active leur prolifération en empêchant la différenciation en ostéoblastes.

-Les lipopolysaccharides (LPS), ligands naturels du TLR-4, accroitraient à la fois l'expression de RANKL à la surface des ostéoblastes et l'activité ostéoclastogénique ; d'où l'inflammation des enthèses et la formation des lésions tissulaires. Ces lésions déclenchent un processus de réparation osseuse (ossification enchondrale) et c'est ce qui est à l'origine des ankyloses chez les patients SA.

-Le TNF- α semble être impliqué lui aussi dans la régulation de ces deux processus, destruction tissulaire et formation osseuse, par son influence sur les molécules que l'on vient de citer. (Alice Taplin 2013)

E-TRAITEMENTS

On a les traitements médicamenteux et les traitements physiques (rééducation fonctionnelle ou kinésithérapie), tout deux sont indispensables aux patients SPA afin de soulager leurs souffrances quotidiennes, telles que les douleurs inflammatoires et les déformations squelettiques handicapantes. Sachant que ces traitements sont purement symptomatiques et que la chirurgie ne s'adresse qu'aux séquelles.

1-Les traitements médicamenteux

En s'inspirant des différentes molécules sécrétées lors d'une inflammation et l'étude de leurs interactions il a été permis de mettre en œuvre certains médicaments, qui semblent apporter satisfaction pour un nombre de patients atteint de cette pathologie, la SPA. Une panoplie subdivisée en trois groupes :

- les anti-inflammatoires dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les corticoïdes.
- Les traitements de fond classiques.
- Les anti-TNF α . (Jane Freeston, 2006)

a- Les anti-inflammatoires

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : C'est un traitement de première intention, prescrit pour des patients atteints d'une des formes d'SPA et d'autres maladies inflammatoires, leur utilisation permet la réduction des inflammations articulaires, les douleurs et raideurs, sauf que, 25% des patients ne répondent pas à ce type de traitement ainsi qu'une prise prolongée provoque des intolérances gastriques. Parmi eux, on a la famille des pyrazolés qui semble être les plus efficaces, représentées par la phénylbutazone qui doit être accompagnée d'une protection gastrique.

D'autres familles existent sur le marché, telles que l'indométacine, les propioniques et le diclofénac (voltarène), comme on peut utiliser de simple antalgiques.

– Les corticoïdes : Ils sont moins efficaces, prescrits dans le cas d'ulcère gastroduodéal provoqués par les AINS, leur usage est par administration locale (intra-articulaire) ou par voie générale. Prescrit aussi pour les atteintes extra-articulaires comme l'uvéite, les MICI et psoriasis.

b- Les traitements de fond classiques

Les traitements de fond avec les petites molécules de la polyarthrite rhumatoïde (PR) sont efficaces sur les manifestations axiales de la SPA, d'autres sont efficaces contre les atteintes périphériques et extra-articulaires, à titre d'exemple la salazopyrine, aurait une certaine efficacité sur les arthrites périphériques, la méthotroxane est parfois utile pour les arthrites réactionnelles ou psoriasiques. Ces traitements de fond sont une alternative possible en cas d'insuffisance des traitements AINS, ils sont à action lente.

c-Les anti-TNF α

Les biothérapies anti-TNF α certains les classent parmi les traitements de fond, ils sont très efficaces sur les manifestations inflammatoires axiales et périphériques, leur administration est en cas d'échec des traitements conventionnels, quand la maladie devient sévère et persistante, ou encore dans le cas d'une intolérance aux AINS. Ce qui fait d'eux un traitement de deuxième ligne (intention), mais aussi pour des raisons pécuniaires (leurs coûts élevés).

Le TNF- α est un médiateur du groupe cytokine de nature protéique, il peut induire l'apoptose chez les cellules cibles ou bien leurs prolifération, comme il peut induire chez ces cellules la production des médiateurs inflammatoire (l'IL-1, l'IL-6, métalloprotéases....). Il est synthétisé par les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales activées, les fibroblastes et chondrocytes. Parmi ses rôles lors d'une réponse inflammatoire :

- La stimulation de l'angiogénèse.
- La régulation de la migration trans-endothéliale des leucocytes.
- L'activation des lymphocytes.
- La prolifération des fibroblastes et les synoviocytes durant la destruction articulaire.

Dans une SPA, sa présence en excès favorise l'inflammation chronique et la destruction osseuse. Les traitements à base de cette molécule, parmi ceux qui ont reçu leur AMM (autorisation de mise sur le marché), on peut noter l'éta nercept, l'infléximab, adalimumab, golimumab et certolizymab qui a reçu son AMM dans certains pays pour traiter la (PR) et la maladie de crohn. Sachant que ce genre de traitement ne freine en aucun cas les dégradations radiographiques ni d'empêcher la constitution des syndesmophytes (les ankyloses). En cas d'échec, ou de contre indication aux anti-TNF α , les possibilités sont limitées, elles sont effectuées hors AMM telles que bisphosphates IV, l'inhibiteur de l'IL-1, l'abatacept qui est une protéine de fusion inhibant l'interaction de CD80/86 des lymphocytes avec le CD28 des cellules présentatrices d'antigène.

D'autres travaux s'intéressent à une variété de molécules impliquées dans la réaction inflammatoire, telles que l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-17.

2-La rééducation fonctionnelle

En complément des traitements médicamenteux, qui ne sont que symptomatique, il est nécessaire, pour le bien être des patients, d'exercer certains mouvements afin d'atténuer les douleurs et de ralentir l'enraidissement et la déformation du squelette axial. Le but, c'est d'améliorer la mobilité et de prévenir des déformations responsables d'attitudes vicieuses, en réalisant des exercices de posture et de gymnastique. De plus, une rééducation respiratoire est préventive pour l'Homme en cas d'ankylose de la cage thoracique, le fait qu'il respire par sa poitrine. Contrairement à la femme qui respire en utilisant le ventre.

Le coccyx, cette queue miniature qui nous rapproche de nos cousins primates est aussi efficace que la leur. En l'utilisant comme centre d'appuis et d'équilibre du corps, d'autant qu'il est le centre du poids corporel vis-à-vis de la pesanteur, permet de basculer le bassin, le maintien de l'axe de symétrie bilatérale, la réanimation des muscles qui enrobent la colonne vertébrale, et donc, plus d'habileté aux deux ceintures (pelvienne et scapulaire). Mais aussi, se dresser sur les métatarsiens des pieds et de tirer vers le haut via la nuque jusqu'à l'endurcissement de la pomme d'Adam en accentuant la courbure des reins (lordose lombaire) et inversement.

Contrairement aux chordés quadrupèdes, travailler ces muscles nous procure une posture correcte et spontanée ; c'est-à-dire, sans effort ni stress qui pourraient affectées les enthèses, qu'on considère comme un des facteurs déclencheurs de la SPA. Et du coup, surmonter les douleurs démesurées du nerf sciatique, éloigner l'arthrose et les accidents causant la hernie discale ainsi qu'a facilité le coït. (TOUDERT, Travaux Pratiques de Biologie Animale, FSB-USTHB 2012/13)

Des travaux menés par des chercheurs montrent l'existence d'un type de kératine, une protéine qui confère aux muscles plus de résistance, retrouvée chez la population asiatique. Il paraît que c'est un gène hérité par métissage avec une lignée d'hominidés qui s'est éteinte, le Néandertal. Ce métissage est succédé par un autre, avec les Denisoviens (relatif à la grotte où ont été retrouvés leurs ossements, Denisova en Sibérie) qui leur lèguent un gène du système HLA impliqué dans la résistance aux virus. Ces gènes pourraient expliquer la fréquence faible de cette pathologie dans ces territoires.

Des travaux réalisés par Khedr et al sur les muscles squelettiques de patients atteints de spondylarthrite montrent que 50% d'entre eux sont des myopathes (atteints de dystrophie musculaire), résultats obtenus par l'utilisation d'électromyographie (EMG). Ainsi que Hopkins et al, leurs travaux révèlent une perte de la force musculaire chez les patients atteints de spondylarthrite comparativement aux sujets sains. Cette myopathie est due à une dénervation et/ou une atrophie des fibres musculaires de type I et II, qui font partie du processus évolutif de la maladie, ou bien, secondairement produit par l'immobilité et l'ankylose.

L'étude de la qualité des fibres collagènes (qui est un des constituants majeurs des enthèses) et les fibres musculaires, devrait être pertinente pour mieux cerner la pathologie et d'expliquer surtout le cas de spondylarthrite juvénile (cas héréditaire). En outre, c'est ce qui peut aussi expliquer le fait qu'elle est une pathologie masculine (voir sex-ratio) ; car les muscles masculins contiennent plus de fibre rouge que de fibre blanc, contrairement aux muscles des femmes, d'où les problèmes

de posture chez les Hommes et certaines femmes porteuses de gènes holandriques (gènes masculinisant).

II-LE SYSTEME HLA (CMH) ET LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE (SA)

Ces deux entités sont liées en raison des études réalisées sur des patients caucasiens atteints de cette maladie, qui révèlent que 90% d'entre eux sont des HLA-B*27+. Sachant que la prévalence de la SA est de 3% dans la population générale et que ce gène est incriminé malgré que seulement 5% des individus parmi ceux qui le portent sont atteints, nous laisse penser que d'autres facteurs de susceptibilité (génétiques et/ou environnementaux) existent pour déclencher la pathologie.

A-GENERALITES SUR LE SYSTEME HLA

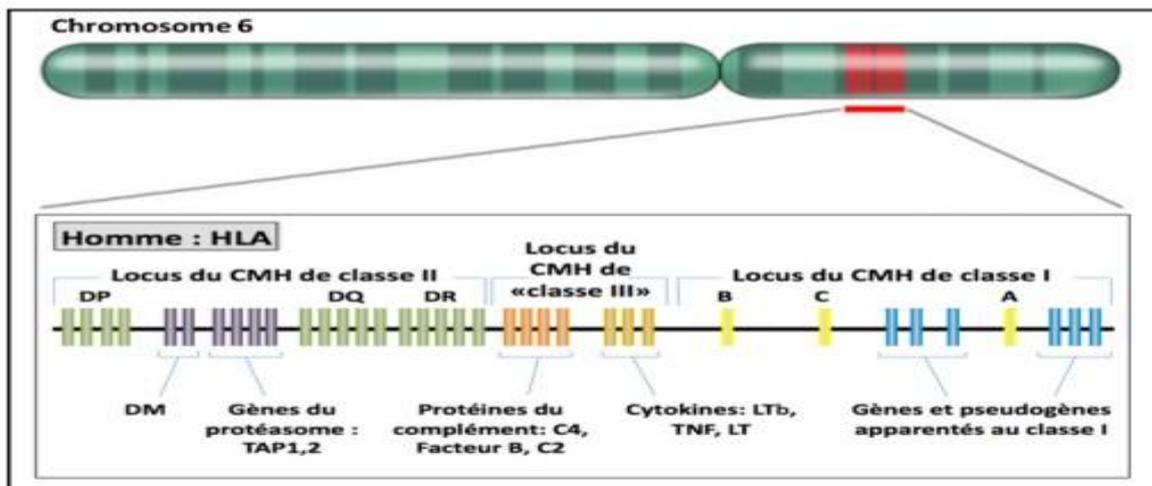


Figure 4 : Représentation schématique du chromosome 6 et la localisation du locus CMH.

Les gènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), appelés H2 chez la souris et HLA chez l'homme (human leukocyte antigen) vu que la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée comme un antigène leucocytaire, découvert pour la première fois par Jean Dausset en 1958 en réalisant des travaux de greffes d'organes. Leur fonction principale est de fixer des peptides antigéniques et de les présenter à la surface cellulaire aux récepteurs des lymphocytes T (TCR), ainsi le système HLA joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire (40% des gènes CMH sont impliqués).

Le locus CMH est subdivisé en trois régions principales (classe I, classe II et classe III) dont les transcrits sont des produits différents par leurs structures, fonctions et leurs localisations. L'origine des peptides antigéniques ainsi que leur affrètement et le type lymphocytaire auxquels ils sont présentés varient en fonction de la classe HLA (classe I présente l'antigène aux LT CD8+ cytotoxique, classe II aux LT CD4+ auxiliaires). Voir figure 4, 5, 6 et 7.

La région CMH de classe I (CMH-I) est la plus télomérique, contient des gènes HLA dits classiques (A, B et C) et des gènes HLA dits non classiques (E, F et G), les gènes MICA, MICB, HEF et de nombreux autres gènes existent dans cette région mais dont la fonction reste méconnue. La région CMH-II la plus centromérique est occupée par des gènes HLA (DR, DQ et DP) et des gènes impliqués dans les voies de présentation antigénique tels que LMP, TAP, DM et DO. La région CMH-III est une zone intermédiaire entre CMH-I et CMH-II. Ce sont pas des gènes

d'histocompatibilité qui l'occupent mais ont un rôle dans la réponse immune, tels que les facteurs du complément (C2, C4A, C4B et Bf) ainsi que des médiateurs (TNF- α , TNF- β), des protéines de choc thermique (HSP 70.1, 70.2 et AOM) et d'autres qui n'ont rien avoir avec l'immunité comme CYP21-B.

Les gènes HLA sont à transmission haplotypique, autrement dit, les gènes qui forment cette région sont étroitement liés (crossing-over de l'ordre de 1%) donc, un individu reçoit en bloc un haplotype de chaque parent et dont les gènes sont codominants (leurs produits coexistent à la surface cellulaire).

La région HLA est la région la plus polymorphe dans le génome humain, plus de 1500 allèles (pour l'ensemble des loci) connus à ce jour, produits par pression sélective (des mutations qui permettent de s'adapter aux agents pathogènes), qui fait que le nombre de combinaisons théorique entre les différents loci HLA (A, B, C, D, DR, DQ, DP) est supérieur à 10^{12} . Le déséquilibre de liaison (DL) ou linkage déséquilibre, est une expression qui désigne deux phénomènes distincts : le premier, c'est que le produit d'une recombinaison génétique par crossing-over (CO) entre deux gènes liés qui engendrent des génotypes (combinaisons) nouveaux, par rapport aux deux parents, retrouvés chez les descendants avec une fréquence qui ne concorde pas avec la distance qui les séparent en centi-Morgan (CM), c'est des valeurs sous-estimées ≤ 1 CM (1%) ; la raison est que, cette région est solidement conservée par les protéines de structures, qui empêchent toutes fractures possibles pendant la disjonction chromosomique lors d'une méiose, ou bien présence des (CO) mais, qui produit des combinaisons géniques qui ne vivent pas le jour, par faute de fausses couches ou autres. Le second phénomène c'est l'inverse, des combinaisons génétiques retrouvées avec des fréquences nettement supérieures à celles attendues, par exemple la fréquence observée de l'haplotype (HLA-A1, B8, DR3) dans la population caucasienne, elle est de 7,1% alors que sa fréquence théorique est de 0,98% ; ce résultat est probablement le produit de la sélection naturelle qui a fait en sorte que certaines populations disparaissent et d'autres prolifèrent, car porteuses de gènes favorisés qui leur ont permis de survivre aux épidémies.

La nomenclature des allèles HLA sont désignés par le nom du gène suivi d'un astérisque, suivi d'un chiffre qui signifie le groupe antigénique et d'un autres chiffres qui définissent le sous-type dont on peut rajouter un autre chiffre, vu le nombre élevé de sous-types découverts pour certains gènes (ex : HLA-B*27 05, HLA-B*27 0502). Tandis que les antigènes (protéines) définissent par le nom du locus (gène), suivi d'un chiffre (ex : HLA-B27, HLA-A2, HLA-DR4).

1-HLA de classe I (CMH-I)

Chacun des trois gènes de classe I classique (A, B, et C) code pour une chaîne lourde α associée à une chaîne légère β_2 micro-globuline (codée par le chromosome 15).

Du côté N-terminal extracellulaire hydrophile, la chaîne α est formée de trois domaines (α_1 , α_2 et α_3), stabilisés par des ponts disulfures, elle est ancrée dans la membrane cytoplasmique par une région transmembranaire hydrophobe et d'un court segment C-terminal intracellulaire hydrophile. α_1 et α_2 transcrits respectivement par l'exon 2 et l'exon 3.

CMH-I ce sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées à la surface des cellules nucléées à l'exception des cellules nerveuses, leur densité varie selon le type cellulaire (10^5 sur les lymphocytes) qui peut augmenter lors d'une inflammation. Voir figure 5

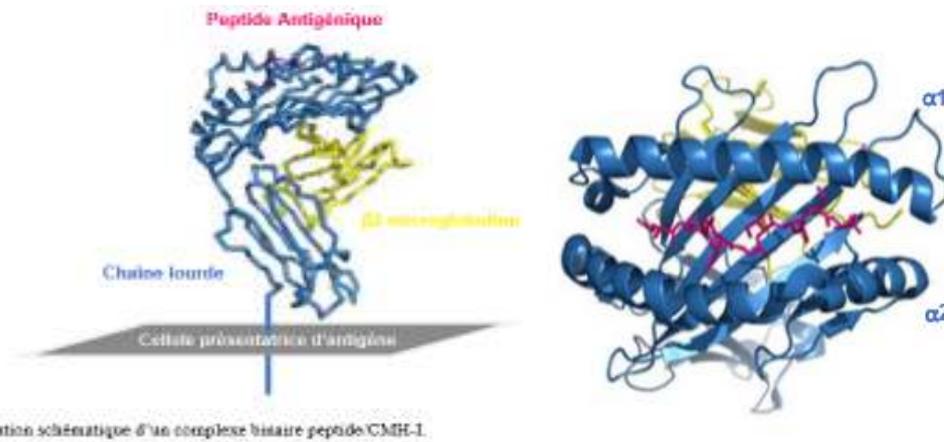


Figure 5 : Structure de la molécule CMH-I.

Grâce à la cristallisation aux rayons X, la structure de la région extracellulaire de la molécule CMH-I est connue. Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une cavité ou un sillon dont le fond est constitué de huit (08) feuillettes β plissés antiparallèles et les bordures par deux hélices α . L'ensemble délimitent six (06) poches (A, B, C, D, E et F) possédant des caractères physico-chimiques (profondeur, largeur, polarité et hydrophobicité) qui leurs permettent l'ancrage des peptides d'environ neuf (09) acides aminés. Les extrémités amine et carboxyle du peptide s'interagissent avec les poches A et F (très profondes et très conservées), retrouvées aux extrémités du sillon. Les résidus en position 2 et 9, du peptide, dits cruciaux ou résidus d'ancrage s'interagissent avec les poches B et C qui assurent spécificité et stabilité de la liaison. Tandis que la partie centrale du peptide (chaîne latérale) forme une protubérance qui établit des liaisons hydrogène avec la molécule HLA et/ou le TCR. (Caroline ROLLIN, 1995)

Le domaine $\alpha 3$ et la $\beta 2$ micro-globuline ($\beta 2m$) très conservés, juxta-membranaire, maintiennent la conformation de la molécule CMH-I à la membrane. En plus, $\alpha 3$ est muni d'un site d'interaction avec la molécule CD8 des LT. Voir figure 6

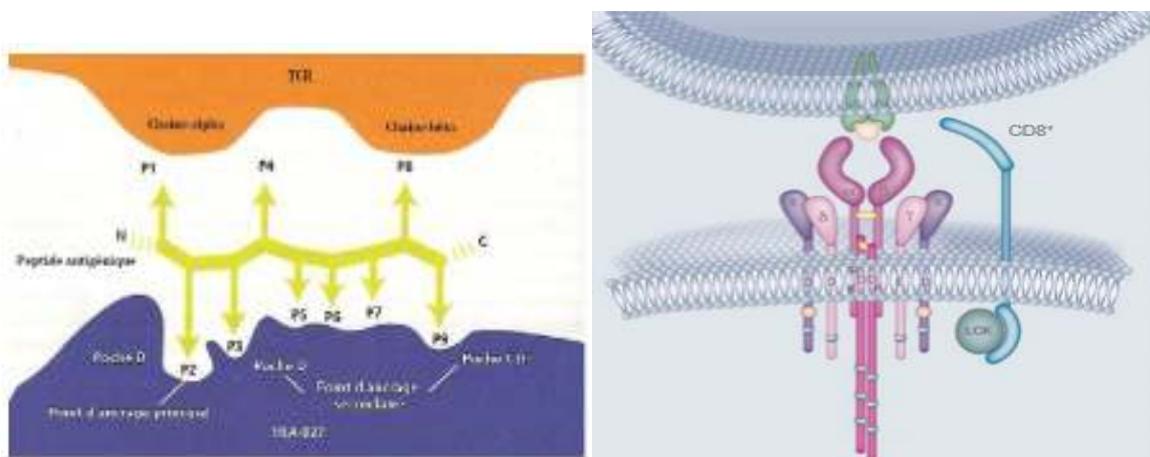


Figure 6 : Schéma d'une interaction entre une cellule présentatrice d'antigène et une cellule lymphocytaire, mettant en évidence les différentes poches CMH-I.

Remarque : La molécule CMH-I possède un seul site d'encrage à la membrane, contrairement à ce qui est représenté dans le schéma.

On dénombre 220 allèles au locus HLA-A, 450 au locus HLA-B et plus d'une centaine au locus HLA-C, certains auteurs indiquent un chiffre nettement supérieur, 2 128 allèles de classe I dont 150 HLA-B27. Ce polymorphisme allélique est le résultat des modifications (mutations) qui affectent surtout les exons 2 et 3, ces derniers codent pour les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, dont 25% de leurs acides aminés ce sont des résidus variables qui forment le plancher et les parois du sillon (les deux berges), ainsi, une molécule HLA-I arrive à fixer un nombre élevé et varié de peptide antigéniques (10^6 peptides distincts peuvent être présentés par un allèle donné) d'où l'appellation liaisons dégénérées.

Les 75% d'acides aminés restant sont très conservés, ils assurent le maintien de la conformation générale du sillon.

L'expression des gènes CMH-I est constitutive (transcrits en permanence), certains facteurs comme les interférons ainsi que les protéines tumorale et virales peuvent moduler leurs expressions. La répression absolue de ces gènes rend la cellule méconnaissable par les LT CD8+ cytotoxiques. La molécule CMH-I fixe essentiellement des peptides du soi et celles qui dérivent de virus et de bactéries qui nichent à l'intérieur d'une cellule, produits par la dégradation des protéines après marquage par ubiquitinylation.

Certains peptides générés par l'action des protéasomes cytoplasmique les LMP (formés de 2 sous-unités, LMP2 et LMP7) traversent la membrane du réticulum endoplasmique (RE) pour s'associer au CMH-I, cette translocation est assurée grâce à un canal formé par dimérisation de deux sous-unités (TAP1 et TAP2), un transport ATP-dépendant. Sachant que certains peptides produits par protéolyse sont nommés peptides dominant, car formés d'un ordre précis en acides aminés et/ou un certain nombre d'acides aminés qui revient souvent.

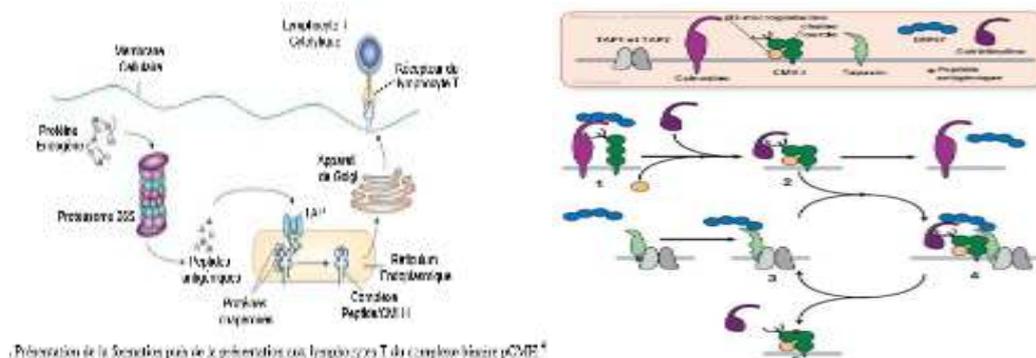


Figure 7 : Schéma récapitulatif du processus de la formation du complexe α - $\beta 2m$ -peptide antigénique.

Au niveau du RE, des protéines chaperonnes se lient à la chaîne lourde α nouvellement synthétisée ; parmi elles la calréticuline et la calnexine. Cette dernière initie le repliement de la chaîne α puis se détache par la fixation de $\beta 2m$ et de TAP, le peptide antigénique internalisé se fixe à la chaîne α en provoquant le détachement de TAP et de la calréticuline, ainsi le complexe produit (chaîne α - $\beta 2m$ -peptide antigénique) transite vers l'appareil de golgi. Voir figure 7

2-HLA de classe II (CMH-II)

Chacun des trois loci de classe II (DR, DQ et DP) porte deux gènes, A et B (DRA-DRB, DQA-DQB et DPA-DPB), le gène A code pour une chaîne α formée de deux domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, le gène B code pour une chaîne β formée de deux domaines $\beta 1$ et $\beta 2$. L'association des deux chaînes forme un dimère fonctionnel (CMH-II) qui s'exprime uniquement à la surface des cellules présentatrices d'antigène (cellule dendritique, macrophage, monocyte et lymphocyte B).

CMH-II est constitué de trois régions, une extracellulaire hydrophile formée de deux domaine N-terminaux ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$, $\beta 2$), une transmembranaire formée de parties hydrophobes des deux chaînes (α et β) dont les bouts hydrophile C-terminaux, région trois, plongent dans l'intracellulaire. L'organisation tridimensionnelle de la molécule CMH-II est presque similaire à celle de CMH-I, les domaines les plus externes ($\alpha 1$ et $\beta 1$) sont les plus polymorphes et qui forment un sillon ouvert sur ses deux extrémités, contrairement à CMH-I, permettant de loger une variété de peptides antigéniques issus de protéines exogènes long de 12 à 25 acides aminés qui débordent de part et d'autre. Deux hélices α forment les parois du sillon et des feuilletts plissés β forment le plancher, le peptide antigénique s'interagit avec la cavité du sillon via sa partie centrale, représenté par 3 ou 4 acides aminés d'ancrage, dont les chaînes latérales plongent dans des poches au fond du sillon. Les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ juxta-membranaire, ont pour rôle le maintien de la conformation de la molécule CMH-II et l'interaction avec la molécule CD4 exprimées à la surface des LT auxiliaires, qui reconnaissent un site porté par le domaine $\beta 2$.

Le locus DR contient 4 gènes B (B1, B3, B4 et B5) qui codent pour les chaînes β ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$), chacune peut s'associer à une chaîne α pour former une molécule DR à la surface cellulaire. Cette molécule (DRA-DRB) varie en fonction de l'haplotype, selon un mécanisme d'exclusion génique propre à cette région (l'épigénétique).

Le polymorphisme touche tout les gènes de classe II, sauf DRA qui code pour une chaîne identique chez tous individus.

Jusqu'à présent 300 allèles DRB1 existent, 20 allèles DQA1, 50 allèles DQB1, 20 allèles DPA1 et 100 allèles DPB1, d'autres sources indiquent 954 allèles de classe II. Ces variations concernent les domaines les plus externes du CMH-II ($\alpha 1$, $\beta 1$), qui forment le sillon.

Le polymorphisme est aussi la résultante de nouvelles combinaisons possibles ; dites hybrides. Elles sont produites par complémentation en trans, qui veut dire ; une chaîne β de l'haplotype paternel peut s'associer avec la chaîne α de l'haplotype maternel et inversement. Toutes ces possibilités offrent à une cellule diverses molécules HLA de classe II, exprimées à sa surface, lui permet de présenter des séquences peptidiques distinctes.

L'expression de ces gènes peut être augmentée par l'action des facteurs tels que l'interféron γ , IL-4, IL-13, TNF α et β .

B- LES GENES DE SUSCEPTIBILITE ET LA SA

1-HLA-B27 et spondylarthrite ankylosante (SA)

Ce gène a déjà été incriminé de puis long temps, il a fait l'objet de nombreuses études le fait que, plus de 90% des cas de SA caucasiens sont B27+. Cependant, dans les autres régions du monde la fréquence du gène B*27, retrouvée chez les patients SPA, est nettement inférieure que celle de la région Européenne. Cela prouve que B27 n'est pas l'unique facteur impliqué et que sa présence n'est pas forcément un élément déclencheur de la pathologie, comme le montre certains travaux réalisés par (Euryly et al, 1998) sur 107 patients axSPA (SPA de forme axiale) de sexe masculin « HLA-B27 a un rôle dans la sévérité et non pas sur l'activité de la maladie ». Mais ces résultats paraissent suffisants pour susciter un intérêt particulier à ce gène, nuancer ses fonctions ainsi que sa structure, pourrait nous apportés des connaissances requises pour la bonne compréhension de certains processus déclencheurs de la pathologie.

Dans une SPA, HLA-B27 est un marqueur de précocité, de syndrome inflammatoire plus intense avec risque d'atteinte sacro-iliaque.

Dans une SPA associée à un psoriasis, l'antigène HLA-B27 et HLA-B7 seraient un facteur de plus grande sévérité évolutive, par contre HLA-B27 serait associé à une atteinte intestinale éventuelle de gravité et de fréquence faible.

Une parmi les hypothèses qui incriminent le gène HLA-B27, énonce que ce gène pourrait présenter des peptides arthrytogènes à la surface cellulaire, une autre hypothèse, qui la justifie, parle du mimétisme moléculaire ; c'est la présentation d'un peptide similaire à celui des micro-organismes pathogènes qui déclencherait une réponse auto-immune, comme dans le cas des cellules β productrices d'insuline.

Des études réalisées dans ce sens portaient un intérêt particulier aux différents sous-types HLA-B27, décelés chez des patient SPA.

L'allèle HLA-B*2705 est considéré comme référence dans ces études comparatives, sa forte implication dans la SPA et sa présence dans les différentes ethnies géographiques, sauf au Sénégal et à la Gambie, fait de lui un allèle ancestrale.

Sachant que les sous-types B*2705 (B*27 0501, B*27 0502,...), diffèrent par une substitution silencieuse d'un nucléotide.

Comme il a été souligné précédemment, les variantes HLA de classe I est le produit des mutations ponctuelles qui ont affectées quelques nucléotides qui forment les séquences d'ADN qui codent pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Plus précisément, les acides aminés qui constituent les différentes poches qui s'interagissent avec les résidus cruciaux des peptides antigéniques.

La poche B qui lie le peptide par son résidu en position 2 est spécifique de HLA-B27 et HLA-B73. En outre, les différents sous-types HLA-B*27 (B*2701,...B*2723) présentent des similitudes au niveau de ces poches.

Sachant aussi que, les sous-types (B*2701,...B*2710) sont liés à la SA et SPA sauf, B-27 6 et B-27 9 faiblement liés, et que chaque sous-type présente des symptômes et des formes cliniques différents. Voir figure 8

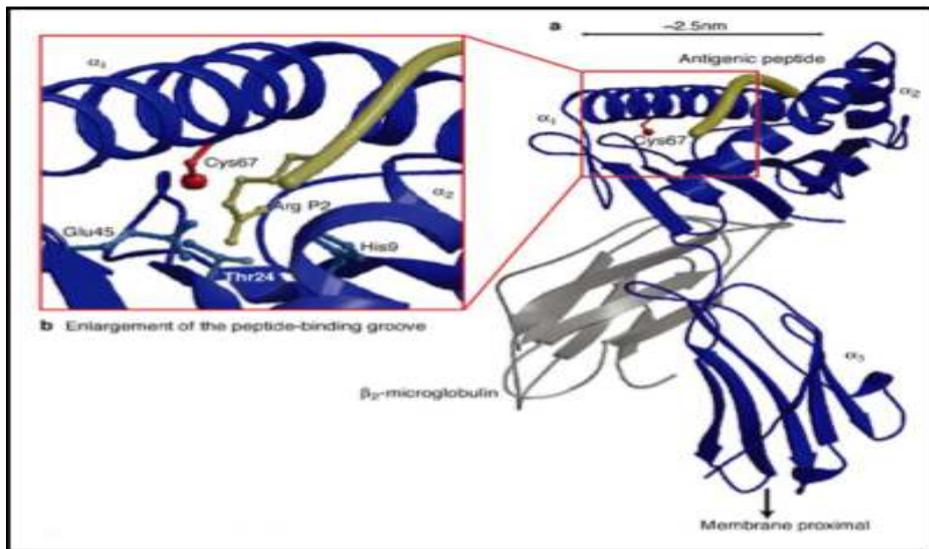


Figure 8 : Les interactions entre acides aminés de l'antigène et ceux du sillon CMH-I.

B27-13 lié à la maladie, il diffère de B27-052 par une substitution d'Alanine (position 20) par l'acide Glutamique, une mutation portée par l'exon 1 qui code pour le peptide signal. B27-01 retrouvé chez une seule famille atteinte de SA, sa poche B lui permet de se lier aux peptides qui portent des résidus Arginine ou Glutamine en position 2. Cependant, les autres sous-types ne se lient qu'à l'Arginine ; cette différence est le produit d'une substitution de l'Acide Aspartique 74 par une Tyrosine.

B27-03 retrouvé en Afrique de l'ouest, diffère de B27-05 par une substitution, Tyrosine 59 remplacée par une Histidine, le même acide aminé remplacé par Phényl Alanine chez B27-17 qui ne présente aucune donnée clinique.

B27-06, B27-11, B27-15, B27-20, B27-22 ne présentent aucune donnée clinique, sauf B27-06 faiblement lié à la SA et la SPA en Thaïlande. Ils sont issus de B27-04 ; allèle dominant en Chine et au Japon, retrouvé lié à la SA et la SPA. B27-06 diffère de B27-04, par une substitution de 2 acides aminés en position 114 et 116, tandis que B27-22 par une substitution dans l'exon 4, les domaines α_1 et α_2 sont identiques.

B27-08 et B27-12 non liés à la maladie en Espagne et au Royaume-Uni ; alors que B27-08 retrouvé associé à la SPA aux îles Açores (qui peut expliquer le cas d'SPA familiale, la cosanguinité). B27-08, B27-12, B27-18 portent l'épitope BW6 avec un motif Ser77 Asn80 Arg82 Glu85, les autres sous types portent l'épitope BW4. De plus, B27-08, B27-12 possèdent une poche B classique, alors que B27-18 et B27-23 portent une poche B modifiée par substitution d'une Cys67, remplacée par une Serine, qui pourrait modifier la capacité de liaison aux peptides arthrytogènes, puisque B27-12, B27-23, B27-16 et B27-18 jusqu'à présent ne présentent aucune donnée clinique. Sachant aussi que, ces derniers présentent tous Thr69 Asn70 Thr71 au lieu d'Ala69 Lys70 Ala71, retrouvé chez les autres B27.

B27-09 non liée à la SPA en Sardaigne, en revanche en Italie continentale elle est retrouvée chez un patient SPA indifférenciée sans douleurs inflammatoires lombaire et sacro-iliaque (peut être dû à l'environnement). Il diffère de B27-05 par une substitution, l'Acide Aspartique 116 par l'Histidine.

B27-10 retrouvé chez une famille d'Amérique blanche atteinte d'une SPA, il diffère par la substitution de l'acide aminé position 152 et il se lie à tous les peptides lié par B27-05.

B27-14 ne présente aucune donnée clinique.

(Edward J. Ball, Muhammed Asim Khan 2001 ; B. Galocha et al 1996)

Le résidu 116 contribue dans la formation de la poche F, impliquée dans la prise en charge de la partie C-terminale des peptides liés par HLA-B27. Il existe des différences de structure au niveau de la poche F entre B27-06 et B27-04 ainsi qu'entre B27-09 et B27-05, qui pourrait expliquer que le peptide arthrogène ne s'associe pas aux sous-types B27-06 et B27-09. Mais aussi, HLA-B27 des SPA possède une Tyrosine 116 retrouvée chez plusieurs sous-types et que les peptides qui se lient préférentiellement à B27-07, B27-06 et B27-09 ne contiennent pas de Tyrosine C-terminale retrouvé chez les peptides qui se lient aux B27 des SPA. (B. Galocha et al, 1996)

Deux autres hypothèses existent, les plus soutenues, qui tentent d'expliquer l'origine des inflammations chroniques des SPA. Une, parle du stress provoquée par le cumul des molécules HLA-B27 au niveau du RE, par faute de la lenteur du repliement de la chaîne lourde α , dont conséquences est la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'autre hypothèse, soutient l'idée de la formation des homo-dimères de la chaîne lourde α , exprimées à la surface cellulaire.

2-Autres gènes du CMH de classe I et spondylarthrite ankylosante (SA)

Comme cité préalablement le gène HLA-B27 ne peut être le seul facteur de susceptibilité appartenant à ce locus ; vu l'implication d'un ensemble de gènes dans les différents processus de la réaction inflammatoire, ainsi que l'existence de patients SA B*27- .

Parmi ceux du locus CMH, il est difficile d'incriminer tel ou tel gène, le fait que c'est un locus qui est transmis en bloc (DL) ; C'est un fait qui suggère en nous l'idée que l'ensemble des gènes créent un environnement particulier, qui favoriserait le développement d'une des formes d'SPA (J. Martinez-Borra 2000 ; V. Perez Guijo et al 2001).

Des travaux réalisés qui accordent un intérêt particulier aux jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ) descendants de parents atteint de SA ou SPA (cas d'SPA familiale), montrent que la prédisposition à une SPA est nettement supérieure chez les MZ que les DZ. Raison de plus, les cas d'SPA familiale avec une prévalence nettement élevée par rapport aux cas sporadiques (population générale). (Jarvinen et al)

Les travaux les plus convainquant viennent par la suite du séquençage complet du locus CMH en 1999, on parle alors du CMH étendue, ce qui a permis la réalisation des travaux sur des souris transgéniques. Ces avancés scientifiques, nous ont permis d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité et même d'incriminer certains d'entre eux.

A titre d'information, HLA-B27 familiale contribue avec un taux avoisinant 40% dans l'ensemble du déterminisme génétique de la SPA et l'effet global de la région CMH serait de 50% ; laisse la porte ouverte pour incriminer d'autres gènes et facteurs de tous types.

Parmi ces gènes, ceux du CMH classe I, représentés essentiellement par ceux dits, classique. HLA-B*60 lié à la SA en présence ou en absence de B*27 chez la population taïwanaise. HLA-B*1403, un allèle rare de structure proche de B*27, retrouvé en Afrique sub-saharienne et chez la population afro-américaine, lié à la SA au Togo et au Zambie.

Le gène HLA-A*0201 associé à une susceptibilité d'une SA en présence ou en absence de B*27. D'autres travaux montrent que HLA-A*02, HLA-B*58 et HLA-DRB1*08 (de classe II) liés à l'uvéite, MICA lié à la SA chez les patients B*27+ et B*27-.

Le gène MIC est un marqueur de stress endothéliale, en particulier MICA-A4, lié (DL) avec tous les types HLA-B, HLA-C et TNF α (de classe III), ainsi que MICA-007, présente une liaison absolue avec B*2705.

3-CMH de classe II et spondylarthrite ankylosante (SA)

Malgré la difficulté imposée par la présence du gène HLA-B*27, on a réussi à mettre en lumière l'implication de certains gènes de ce locus adjacent, tel que DRB1*01, associé à une SA chez les B27+ et les B27-. HLA-DRB1*08 lié à la spondylarthrite juvénile à l'âge de début très précoce et à l'uvéite antérieure aigue (uaa), ainsi que HLA-DR4 avec une susceptibilité à la SPA et il augmenterait le facteur de risque de deux fois chez les individus HLA-B*27+.

Une étude sur les arthrites périphérique faites sur 51 patients, 9 présentaient des érosions périphériques, parmi eux, 7 était des HLA-DR7+.

HLA-DPA1 et HLA-DPB1 tout deux associés à la SA en Espagne et au Portugal, d'autant plus HLA-DPB1*0301 est associé à la spondylarthrite juvénile.

Des études montrent que LMP est impliqué dans la susceptibilité d'une SPA chez la population canadienne et mexicaine. TAP1 et TAP2 pourraient l'être.

4-CMH de classe III et spondylarthrite ankylosante (SA)

Comme déjà précisé c'est un locus porteur de gènes qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire, et donc, impliqués dans les réactions inflammatoires.

De nombreuses études faites, dont les résultats sont sporadiques et qui restent à confirmer. Les gènes qui peuvent être impliqués dans le déterminisme de la SPA sont ceux des protéines de choc thermique HSP70 et du TNF- α .

5-Les gènes de susceptibilité en dehors du locus CMH

D'autres gènes, situés en dehors du locus CMH sont impliqués dans la physiopathologie de la maladie (SA). Comme il a été confirmé, la SPA à sa tête la SA est une pathologie multifactorielle. Grâce aux nouvelles techniques telles que, l'étude de liaison par criblage génomique (qui reste peu fiable pour de multiple raison), l'étude d'association pan-génomique et l'étude d'association de type

gène candidat, tentent d'inclure de nouveaux gènes de susceptibilité potentiel (philip C. Robinson. Matthew A. Brown 2013 ; Alice Taplin 2013).

La première technique citée a pour principe d'identifier des régions génomiques pouvant contenir des gènes de susceptibilité, par l'analyse de la co-ségrégation d'un locus avec un phénotype à partir de données familiales, grâce à des marqueurs génotypiques.

Trois groupes impliqués dans ce projet, le groupe d'oxford, d'Amérique et GFECS de France. Les résultats de leurs travaux est un ensemble de séquences chromosomiques qui portent des gènes de susceptibilité ; le locus HLA revient toujours. Parmi eux, le bras long du chromosome 16, 6, 11,5, 9, 17 et 13, ainsi que la région 1q34, 2q22, 9q24, 9q22-34, 10q23, 19q13 et bien d'autres.

L'approche par étude d'association dont le principe est de comparer les fréquences des allèles chez les patients et chez les sujets témoins, facilité par l'étude de génotypage de haut-débit à l'aide de puces.

On a Les résultats du groupe WTCCC qui décèle l'implication des gènes ERAP1 et IL23R, gènes retrouvés par GWAS du TASC avec d'autres gènes tels que, IL-1R2, ANTXR2, et des régions chromosomiques telles que, 6q15 et 21q22.

GWAS chinoise, quand à elle, c'est les gènes : EDIL3, HAPLN1 en 5q14 et ANO6 en 12q12.

Par GWAS de WTCCC et TAC, les gènes sont : ERAP1, IL23R, ANTXR2, CARD9, PTGERE4, KIF21B, RUNX3, IL12B, LTBR-TNFRSF1A.

Par immunochip du IGASG, le gène ERAP1.

Par l'étude d'association gène candidat : l'IL-1, IL-10, CARD15 /NOD2 et cytochrome P450 (cyp 2D6). Voir figure 9

Le gène ERAP1 revient à chaque fois, il occupe la région 5q15 où sont localisés les gènes qui codent pour des enzymes d'ubiquitinylation, parmi eux, UBE2E3 et UBE2L3 liées à la SA. C'est des amino-peptidases qui ont pour rôle, au niveau du RE, de compléter le clivage des peptides produits par les protéasomes, afin qu'ils puissent être présentés par les molécules HLA de classe I. Par contre, celles citées au dessus, génèrent des peptides longs de 30 acides aminés, considérées comme arthritogènes.

Ces enzymes défectueuses, produites par des allèles tels que rs116488202 (variante spécifique HLA-B27), rs27044 et rs30184, qui augmenteraient le risque de développer une SA. En revanche, les variantes telles que rs2248374, rs17482078, rs10050860 et rs2287987, contribueraient à diminuer le risque d'une SA, par la restriction de l'affrètement des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire.

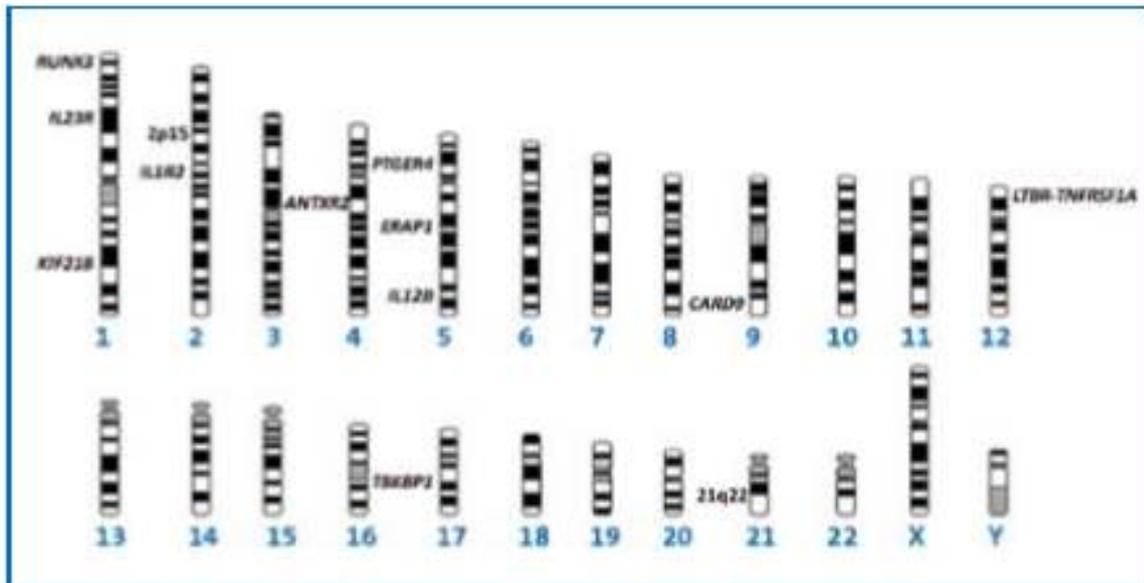


Figure 9 : Localisation des loci de susceptibilité à la SA, identifiés lors des GWAS.

MATERIELS & METHODES

- MATERIELS BIOLOGIQUES

Le matériel biologique est du sang total de deux groupes de patients, de l'hôpital de Daira, atteints de SA. Le premier groupe est constitué d'un effectif de 77 patients, dont l'allèle B27 a été amplifié par la PCR-TR (Polymerase Chain Reaction à Temps Réel). Le deuxième groupe est formé de 80 patients, dont l'allèle B*27 amplifié via la PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer). Le troisième groupe, de 100 individus sains, est un groupe témoin. Une étude réalisée au laboratoire d'immunogénétique et de transplantation du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

II- METHODES

A- EXTRACTION DE L'ADN PAR LA METHODE « SALTING OUT »

1- Principe de la méthode saline

Une technique qui permet de libérer l'ADN des cellules sanguines à l'aide de tampons de lyse (solution hypotonique, solution de protéinase K et des sels), puis, l'ADN est extrait et purifié par une solution de chlorure de sodium (NaCl) saturée impliquant ainsi, la précipitation des protéines et débris. L'ADN est récupéré sous forme de méduse grâce à sa précipitation via l'éthanol absolu glacial (à -20°C), puis, remis en suspension dans de l'eau distillée (Miller & *all.* 1988).

2- Mode opératoire de la méthode « salting out »

a- Lyse des globules rouges

Nous avons provoqués une hémolyse par l'addition de 10 ml d'une solution aqueuse (Tris à 10 mM, EDTA à 10 mM) à 5 ml de sang hépariné préalablement par l'EDTA à 0,5 M au 1/20^e et d'une incubation à -20°C durant 20 min, avec agitation toutes les 5 min afin de faciliter la lyse des érythrocytes. Le tout est centrifugé pendant 10 min à 1500 g, le culot formé de leucocytes est récupéré puis lavé (2 à 3 lavages) jusqu'à l'obtention d'un blanc dépourvu de rouge.

b- Lyse des globules blancs

Le culot récupéré est suspendu à nouveau dans 1,5 ml d'une solution de lyse (Tris à 10 mM, EDTA à 5 mM) et l'addition de 150 µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10% et de 10 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Le tout est fortement agité puis incubé une nuit à 37°C ou 1h à 56°C dans un bain-marie.

c- Purification de l'ADN

Après l'incubation nous avons additionné 500 µl d'NaCl à 6 M afin de provoquer la déshydratation des protéines et leurs précipitation, après 25 min de centrifugation à 2800 g le surnageant contenant l'ADN est récupéré, par contre, le culot contenant les protéines est éliminé. L'ADN récupéré est incubé à -20°C pendant 20 min, puis addition de 3 ml d'éthanol absolu glacial, suivie d'une centrifugation à 2800 g durant 10 min, le culot (l'ADN) est récupéré pour subir un second lavage avec 1 ml d'éthanol à 70%, le culot est récupéré, séché, afin d'éliminer toutes traces d'éthanol, puis solubilisé dans 200 µl d'eau distillée (conservation à +4°C).

d- Dosage de l'ADN

Dissolution complète de l'ADN par l'utilisation d'un vortex et la lecture de la densité optique peut s'effectuer à l'aide d'un spectrophotomètre « Nano-Drop », la lecture de l'ADN est à 260 nm et les protéines à 280 nm (dans le cas d'une contamination). A partir d'une solution mère et par dilution, on doit obtenir une solution fille dont la concentration finale comprise entre 50 et 100 ng/μl, nécessaire à la PCR (conservation à +4°C).

B- LA PCR-TR

1- Principe de la PCR-TR

La PCR-TR permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique, basée sur l'utilisation de deux sondes oligonucléotidiques marquées à leurs extrémités (5') par deux fluorophores. Une sonde (FAM) pour le gène HLA-B*27 et une sonde (Cy5), contrôle interne (CI), pour un gène non polymorphe en dehors du système HLA qui nous sert à vérifier le bon déroulement de la PCR. Dans le cas où la sonde est intacte, la fluorescence émise par le fluorophore en (5'), nommé « reporter », est absorbée par le suppresseur du côté (3'), nommé « quencher », de la même sonde, qui fait qu'aucune fluorescence n'est captée par le système de lecture. Une fois que la sonde s'hybride avec la séquence cible d'ADN la Taq polymérase la dégrade en progressant, grâce à son activité exonucléasique (5'→3'), permettant ainsi la libération du reporter en émettant une fluorescence décelée et mesurée au cours de chaque cycle de la PCR, d'où le nom de PCR en temps réel. (Heid *et al.*,1996) (voir figure 11)

2- Mode opératoire de la PCR-TR

a- Etape d'amplification

L'amplification du gène HLA-B*27 par PCR-TR a été effectuée par le kit « GeneFinder™ HLA-B27 Real Kit » (Infopia, Korea). On ajoute 5 μl de mélange réactionnel ou mix (primer, sondes, dNTPs, MgCl₂) 1 μl de Taq polymérase et 4 μl de la solution d'ADN, les tubes sont bien fermés pour éviter une évaporation, puis placés dans l'appareil de PCR-TR le « 7500 real time PCR System » (Applied Biosystem, USA) selon un programme présenté dans le tableau (V). L'obtention d'une fluorescence a lieu au cours de l'étape d'hybridation à 65°C.

Tableau V : Programme d'amplification de la PCR-TR.

	Étapes	Températures	Temps	Cycles
1	Dénaturation	96°C	5 min	1 cycle
2	Dénaturation	96°C	25 s	5 cycles
	Hybridation	70°C	45 s	
	Elongation	72°C	30 s	
3	Dénaturation	96°C	25 s	30 cycles
	Hybridation	65°C	45 s	
	Elongation	72°C	30 s	

b- Résultats et interprétation

La figure **12** (A, B) montrent les résultats, respectivement (positif et négatif), obtenus lors d'une PCR-TR, où on observe deux courbes, en rouge c'est celle de HLA-B*27 et en vert celle du CI. Pour une interprétation des résultats le Ct (Cycle Threshold) est calculé (voir figure **12** (C)), il correspond au nombre de cycles PCR dont l'amplification, mesurée par l'intensité de la fluorescence, dépasse le seuil. Ce dernier est la valeur de fluorescence pour laquelle l'amplification est significative (différente par rapport au bruit de fond). Sa valeur seuil doit être prise, théoriquement, dans la phase exponentielle de l'amplification (la firme propose une valeur de 0,1). La détermination de Ct se fait par extrapolation sur l'axe des abscisses et le point d'interaction entre la courbe d'amplification et la valeur seuil sur l'axe des ordonnées. A partir de Ct calculé et selon les valeurs proposées par la firme. L'interprétation des résultats est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau VI : Représentation des résultats de la PCR-TR.

Valeur Ct		Résultats
HLA-B*27 (FAM)	CI (Cy5)	
[16-26]	Quelle que soit la valeur Ct	HLA-B*27 positif
Indéterminée	≤ 28	HLA-B*27 négatif
Indéterminée	Indéterminée	Invalide

C- LA PCR-SSP

1- Principe de la PCR-SSP

La PCR-SSP décrite pour la première fois par Olerup en 1991, la distinction entre les différents allèles se fait durant la PCR-SSP en utilisant des amorces spécifiques d'allèle ou d'un groupe d'allèles. Dans la recherche d'HLA-B*27, deux amorces sont utilisées, l'une est spécifique du HLA-B*27 et l'autre spécifique du CI. La détection se fait par électrophorèse sur gel d'agarose et les résultats sont liés à la présence ou à l'absence des bandes de taille spécifique (Dunckley, 2012), (Olerup et Zetterquist, 1992).

2- Mode opératoire de la PCR-SSP

a- Etape pré-PCR

La recherche d'HLA-B*27 faite par le kit « HLA-Ready Gene B*27 » (innotraining, Allemagne). Dans chaque puits on a micropipeté 6 µl d'eau distillée, 3 µl de mix (1,5 mM d'MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl et 0,001% de gélatine), 0,08 µl de Taq polymérase à 5 unités/µl (UI) et 1 µl d'ADN à tester, pour un volume finale de 10 µl par puits. Après fermeture des puits l'amplification est réalisée dans un thermocycleur « T professional thermocycleur » (Biometra, Allemagne), selon le programme qui est représenté dans le tableau suivant.

Tableau VII : Programme d'amplification de la PCR-SSP.

Phase	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	2 min	1
Dénaturation	94°C	10 s	10
Hybridation et Elongation	65°C	60 s	
Dénaturation	94°C	10 s	20
Hybridation	61°C	50 s	
Elongation	72°C	30 s	

b- Etape post-PCR

Les produits de la PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans un tampon TBE (Tris 0,445 M-borate, EDTA 0,0125 M, une goutte de bromure d'éthidium). Les produits de la PCR ainsi qu'un marqueur de taille sont spotés dans les puits du gel est soumis à une différence de potentiel (ddp) de 120 volts durant 15 min. A la fin de la migration, la visualisation de l'ADN se fait sous la lumière ultraviolet (UV) émise par un trans-illuminateur UV, l'ADN apparaît sous forme de bandes fluorescentes (figure 10).

D- ETUDES STATISTIQUES

Dans cette partie de travail nous avons représentés nos résultats sous forme de tableau croisés (2X2). L'obtention des résultats du test chi deux via le logiciel WINPEPI (compare 2) qui donne les résultats de différents tests, on a pris en compte le P de Yate's afin d'éviter toute population avec un effectif inférieur à 5 et le test de Fisher exact pour l'odd ratio (OR) ainsi que l'intervalle de confiance (IC).

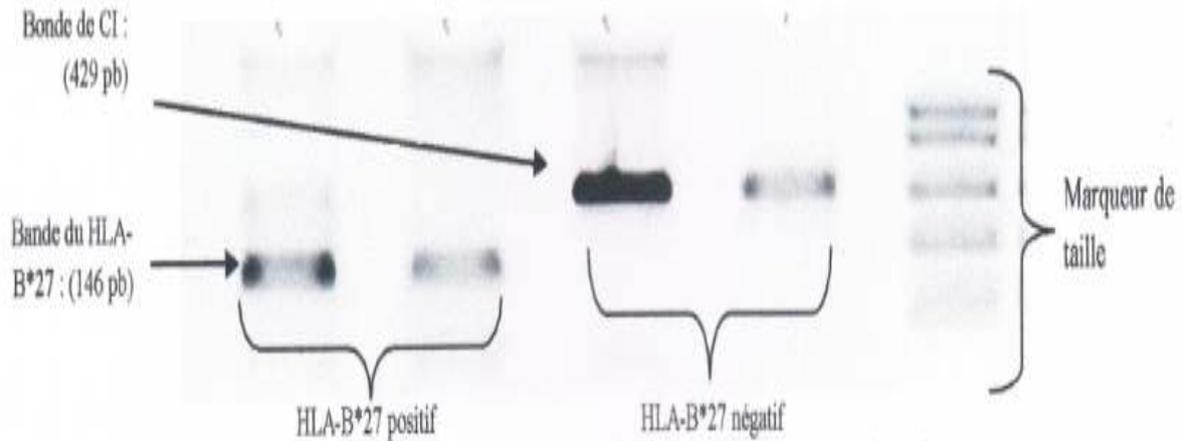


Figure 10 : Représentation des résultats de la PCR-SSP après migration électrophorétique sur gel.

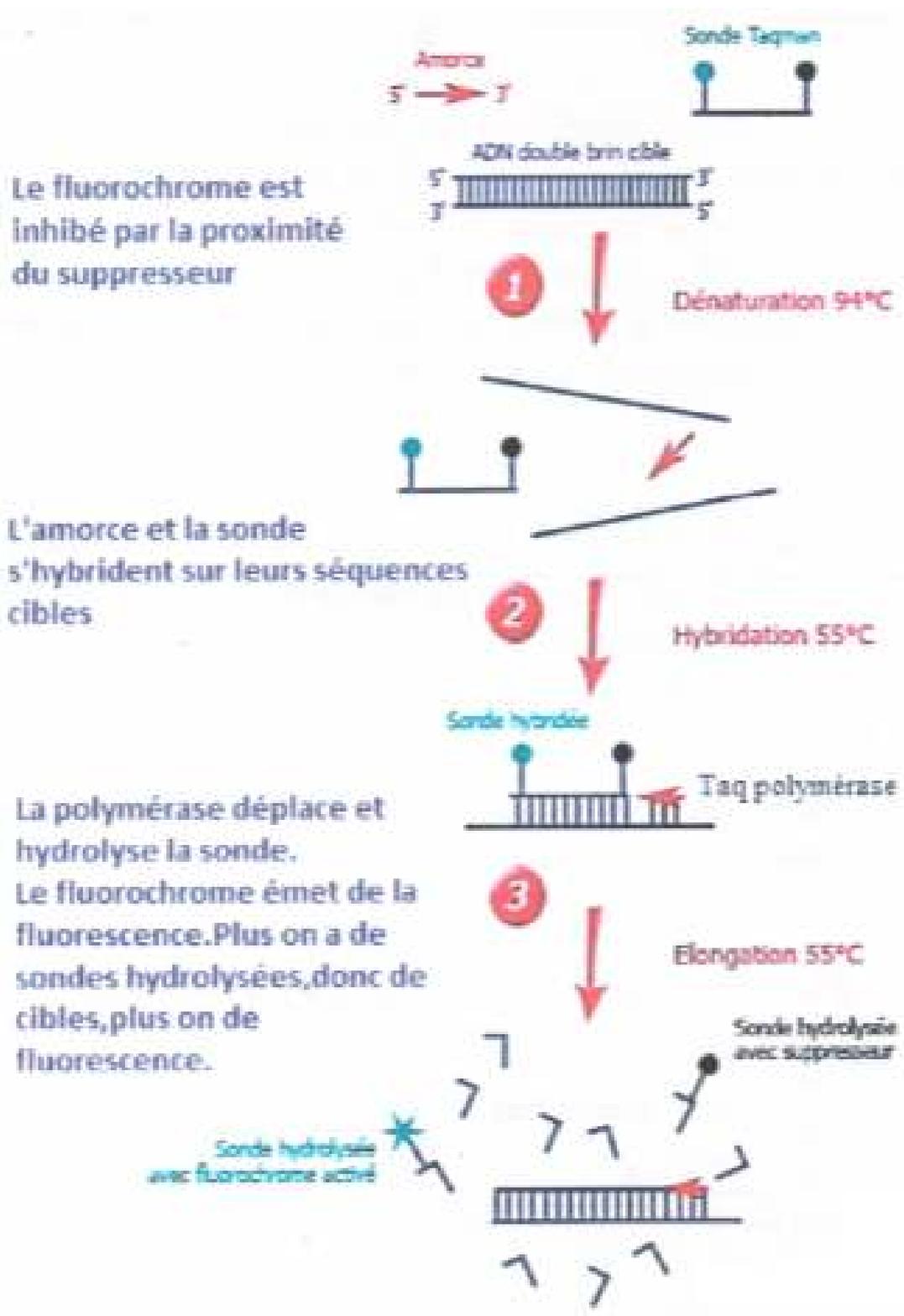


Figure 11 : Principe de la PCR-TR.

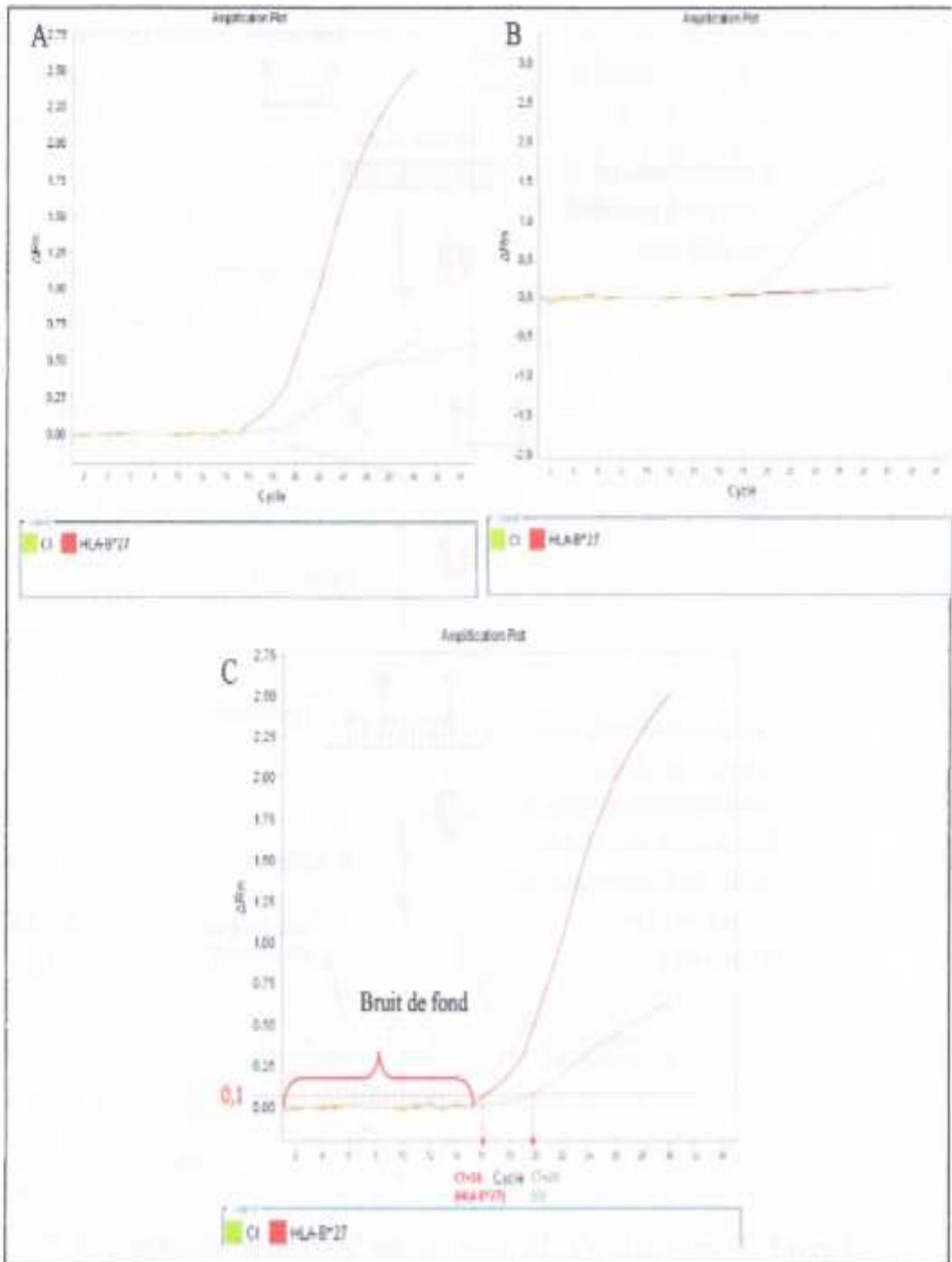


Figure 12 : (A) Résultat positif, (B) Résultat négatif, (C) Mode de calcul du Ct.

RESULTATS & DISCUSSIONS

I- RESULTATS

Dans cette présente étude, comme cité dans la partie matériel et méthode, nous avons travaillé sur deux groupes de patients confrontés à un groupe de témoins. Nous avons pris en considération comme paramètre de comparaison via le test chi 2, l'absence ou la présence de l'allèle HLA-B*27, développement ou non d'une coxite, présence ou pas d'une forme familiale.

A- PREMIER GROUPE DE PATIENTS (SA)

Notre échantillon est constitué de deux populations distinctes. La première population est un groupe de patients SA dont le gène HLA-B*27 a été amplifié par la technique PCR-TR, leur nombre n=77. La deuxième population est un groupe d'individus sains (témoins) de nombre n=100.

1- Comparaison des fréquences de l'allèle HLA-B*27 chez ces deux populations via le test chi carré

Les résultats de ce test de comparaison des fréquences (%) entre les deux populations sont rassemblés dans le tableau suivant.

Tableau VIII : Fréquences HLA-B*27+ du groupe 1 par rapport au groupe témoins.

	PATIENTS (SA) : n= 77		TEMOINS : n= 100		P	OD ratio (OR)	IC à 95%
	n	%	n	%			
B*27+	40	51,95	2	2	3,9 E-14	52,97	[12,382-463,674]

2- Comparaison par test chi 2 de la fréquence du HLA-B*27 chez les patients avec coxite

Dans cette partie du travail nous avons pris en considération uniquement les 77 patients atteints d'SA, subdivisé en deux sous groupes. Le premier sous groupe, ce sont des patients SA (B*27+) et des SA (B*27-) qui ont développés une coxite, le deuxième sous groupe ce sont des patients SA (B*27+ et B*27-) qui n'ont pas développés de coxite. La fréquence (%) du premier sous groupe est un rapport entre patients avec coxite B*27+ et patients avec coxite B*27+ et B*27- (la totalité des coxite) et celle du deuxième sous groupe, des patients sans coxite B*27+ par rapport aux patients sans coxite B*27+ et B*27-. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau IX : Fréquences (%) des coxites positives et négatives chez les patients B*27+. C+ : coxite positive, C- : coxite négative

	Patients SA : n= 77	
	Sous groupe 1 (C+) : n= 48	Sous groupe 2 (C-) : n= 29
HLA-B*27+	25	15
%	52,08	51,72
P	1	
OD ratio (OR)	1,01	
IC à 95%	[0,36-2,82]	

3- Fréquences (%) des formes familiales (FF) chez les patients SA (B*27+)

Dans cette étude nous avons pris les B*27+ parmi les 77 patients SA qui présentent une forme familiale et ceux qui ne la présentent pas (B*27+FF+ et B*27+ FF-), en les comparant respectivement aux FF+ et FF- total (B*27+ et B*27-) pour en déduire deux fréquences, et grâce au test chi deux les résultats sont représentés comme suit, tableau X.

Tableau X : Fréquences (%) des formes familiales positives et négatives (FF+ , FF-).

	Patients SA : n= 77	
	FF+ (n= 21)	FF- (n=56)
HLA-B*27+	15	25
%	71,43	44,64
P	0,066	
OD ratio (OR)	3,1	
IC à 95%	[0,95-11,1]	

B- DEUXIEME GROUPE DE PATIENTS SA

C'est le même travail que celui réalisé avec le premier groupe d'étude et en utilisant le même groupe témoin sauf que, les patients c'est un autre groupe de 80 individus dont l'allèle B*27 a été amplifié par la technique de PCR-SSP.

Les résultats sont représentés sous forme de tableau, trois tableaux dont la représentation est similaire aux précédents.

Tableau XI : Fréquence HLA-B*27+ du groupe 2 par rapport au groupe témoins.

	PATIENTS (SA) : n= 80		TEMOINS : n= 100		P	OD ratio (OR)	IC à 95%
	n	%	n	%			
B*27+	46	57,50	2	2	1,1 E-14	53,67	[12,75-467,12]

Tableau XII : Fréquences (%) des coxites positives et négatives chez les patients B*27+.
C+ : coxite positive, C- : coxite négative

	Patients SA : n= 80	
	Sous groupe 1 (C+) : n= 51	Sous groupe 2 (C-) : n= 29
HLA-B*27+	32	14
%	62,74	48,27
P	0,306	
OD ratio (OR)	1,8	
IC à 95%	[0,65-5,02]	

Tableau XIII : Fréquences (%) des formes familiales positives et négatives (FF+ , FF-).

	Patients SA : n= 80	
	FF+ (n= 12)	FF- (n= 68)
HLA-B*27+	11	35
%	91,66	51,47
P	0,023	
OD ratio (OR)	10,37	
IC à 95%	[1,34-459,65]	

II- RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans ce travail rétrospectif, la discussion des résultats est basée sur les données obtenues durant ces travaux et en prenant en compte celles requises lors de la recherche bibliographique (littérature). Le premier groupe d'étude (77 patients SA) de sex-ratio 6 hommes / 2 femmes, celui du deuxième groupe (80 patients SA) est de 6 hommes / 2 femmes, tandis que celui des témoins est de 5 hommes

/ 7 femmes. Comme cité en amont (Alain SARAUX et al, 1995. Page 519), la SPA à sa tête la SA est une maladie qui se répond le plus chez le sexe masculin.

A- DISCUSSION DES RESULTATS DU PREMIER GROUPE D'ETUDE

-Les résultats de la fréquence B*27 positif est de 51,95% chez les patients atteints d'SA, en revanche les témoins c'est uniquement 2%. Le test chi 2 indique $P=3,9 \times 10^{-14}$ ($P < 0,05$), prouve, que le gène HLA-B*27 est un marqueur fort pour prévoir le développement d'une des formes d'SPA (marqueur de prévalence puissant) de plus, un facteur de risque très important ($OR=52,97$). Donc, l'implication du gène B*27 dans cette pathologie est hautement significative. Selon AMROUN et al, 62% des cas d'SPA en Algérie sont des B*27+.

-Le gène B*27 aurait un rôle dans l'évolution de la maladie vers une spondylarthrite ankylosante (SA), une parmi les formes les plus sévères (l'allèle B*27 est un facteur de sévérité, François EURLY, 1998. Page 624). La SA est confirmée lors qu'une atteinte axiale est vérifiée (critère d'Amor et autres), telle qu'une coxite.

-Dans notre analyse, comme indiqué dans le tableau (IX), la fréquence des patients B*27+ avec coxite (C+) est de 52,08% et les patients B*27+ sans coxite (C-) est de 51,72%. Le test chi 2 a donné des résultats non significatifs ($P=1$ et $OR=1,01$). Selon ces résultats, la présence du gène B27 n'est pas suffisante pour développer une coxite. Il travaille forcément en synergie avec d'autres facteurs tels que environnementaux, qui peut expliquer le cas des C- B*27+ comparés aux C+ B*27+ et que son absence ne protège pas contre une coxite, le cas des C+ B*27-, cela signifie qu'en plus du gène B*27 d'autres gènes sont impliqués dans le développement d'une SA et l'apparition d'une coxite. En revanche, vu l'âge pas très avancé des patients C- B*27+ (< à 36 ans) n'écarte pas l'idée de développer une coxite ultérieurement ; car la SA est une maladie progressive. Mais pour écarter toutes ambiguïtés, des travaux plus poussés s'imposent afin d'identifier avec précision l'allèle ou les allèles du gène B27 responsables dans l'apparition d'une coxite chez les patients C+ B*27+ comparés aux patients C- B*27+, car comme cité (Edward J. Ball, 2001), les différents allèles du gène B27 (sous-types) présentent des symptômes et des formes cliniques différents.

-Parmi les critères de classification pris en considération lors de ces travaux est la forme familiale (FF+), des patients B*27+ avec des antécédents familiaux à la SA comparés à des patients B27+ avec forme sporadique (FF-).

-Les résultats indiquent que 71,14% des patients FF+ sont des B*27+ et 44,64% des patients FF- sont des B*27+. Le test chi 2 donne un P avec une valeur de 0,066 ($>0,05$), donc non significative. Néanmoins, la présence du gène B*27 est nettement plus importante chez les FF+ que les FF- ($OR=3,1$) qui est un résultat positif, un facteur de risque important. Cela nous laisse penser que cette pathologie est héréditaire et que le gène B*27 n'est pas le seul facteur de susceptibilité car, l'apparition soudaine de cette maladie chez les B*27+ FF- ça peut être due à l'acquisition d'un facteur de susceptibilités autre que le gène B*27, soupçonné de travailler en synergie avec lui pour développer une SA ; conséquence d'un héritage parental, ou bien d'une combinaison génique nouvelle favorisant le développement d'une des formes d'SPA. Comme ça peut être le résultat d'une perte d'un facteur génique protecteur (par dilution), retrouvé chez l'aïeul inexistant chez les descendants atteints. Cependant, ça peut être dû à un environnement particulier ; c'est-à-dire une hygiène de vie qui favoriserait l'apparition de cette pathologie.

Le gène B*27 est tributaire de d'autres facteurs afin de pouvoir développer une des formes d'SPA.

B- DISCUSSION DES RESULTATS DU DEUXIEME GROUPE

-Les résultats de ce groupe sont nettement significatifs et qui confirment l'analyse faite sur le premier groupe. Pour la positivité du gène B*27, on observe $P= 1,1 \text{ E-}14$ avec un IC= [12,75-467,12] et OR= 53,67. Ainsi que pour une coxite, la présence de ce gène augmente deux fois le risque de la développer (OR= 1,8) malgré que son P est non significatif, égal à 0,306 ($>0,05$). Mieux encore avec la forme familiale, elle marque une relation forte avec le gène B*27, qui donne des résultats hautement significatifs, avec un P de 0,023 et sa présence est dix fois plus importante (OR= 10,37) par rapport à la forme sporadique. Cela confirme l'idée que, B*27 est un facteur de risque puissant dans le développement d'une SA et un marqueur de prévalence inéluctable, ainsi que, à cause de sa présence ubiquitaire, la SPA et à sa tête la SA est considérée comme une maladie héréditaire.

CONCLUSION

Les résultats en notre possession montrent l'existence d'un lien entre la Spondylarthrite Ankylosante (SA) et le gène de l'histocompatibilité HLA-B*27, avec un $P \ll 0,05$ et un OR = 53 donc, ce gène augmente le risque de développer une SA. Toutefois sa présence n'est pas suffisante pour provoquer l'apparition de cette maladie, cela signifie qu'il n'est pas le seul facteur impliqué, c'est une pathologie qui nécessite la présence de d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux. D'ailleurs, c'est ce qui explique la différence entre la SA forme familiale et celle des jumeaux monozygotique comparés à la forme sporadique et les témoins B27+. Sans oublier l'existence de facteurs protecteurs (gènes, hygiène de vie) empêchant le déclenchement du processus inflammatoire chronique. Par ailleurs, il existe d'autres gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) doté d'un même pouvoir pathogène que celui du gène HLA-B*27, cas d'SA B27-.

La SA est une pathologie très complexe, vu qu'il existe un nombre élevé de facteurs impliqués dans son apparition; c'est comme une réaction inflammatoire, une réaction en chaîne, qui fait intervenir différentes molécules. Mais le fait de ne pas connaître avec précision le facteur ou l'élément déclencheur de cette pathologie, en l'occurrence elle demeure à ce jour sans traitement efficace.

L'étude moléculaire faite sur les différents sous-types du gène HLA-B*27, pourrait servir dans le cas d'envisager une thérapie-génique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alain SARAUX, Véronique de SAINT PIERRE, Dominique BARON, Isabelle VALLS, Djallil KOREICHI, Pierre YOUINO, Paul LE GOFF, (1995) ANTIGENE HLA B27 ET SPONDYLARTHROPATHIE. Rev. Rhum. [Ed. Fr.], 1995, 62 (7-8), 517-521. Expansion Scientifique Française, 1995
- Alice Taplin, Paris Descartes 2013. Complexe Majeur d'Histocompatibilité et génomique fonctionnelle dans la spondylarthrite.
- ATLAS DE POCHE D'IMMUNOLOGIE. GERD-RUDIGER BURMESTER ANTONIO PEZZUTTO. Médecine-Science. Flammarion.
- B. Galocha, J. R. Lamas, J. A. Villadangos, J. P. Albar, J. A. Lopez de Castro. Binding of peptides naturally presented by HLA-B27 to the differentially disease-associated B*2704 and B*2706 subtypes, and to mutants mimicking their polymorphism. Tissue Antigens 1996 : 48 : 509-518. Munksgaard, 1996
- Caroline Rollin, Lille I 1995. Conception, synthèses et études immunologiques d'analogues peptidiques dérivés de la séquence carboxy-terminale de la Sm28 GST : intérêts de modifications structurales dans le cadre de stratégies vaccinales et diagnostiques.
- E. Costantino, M. Breban. Génétique des spondylarthrites (2013). Réalités en RHUMATOLOGIE 53_Avril/Mai 2013.
- Edward J. Ball, Muhammad Asim Khan. Le polymorphisme HLA-B27 (2001). Rev Rhum [Ed Fr] 2001 : 68 : 807-12
- Emmanuel Chaplais, Versailles saint-Quentin-en-Yvelines 2015. Une approche de Modélisation de Biologie des systèmes sur la Spondylarthrite.
- Frédérique ASTIER, Limoge 2012. La Spondylarthrite Ankylosante et la place de l'Immunothérapie dans son traitement.
- Gunal EK, Sarvan FO, Kamali S, Gul A, Inanc M, Carin M, Konice M, Aral O, Ocal L. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. Joint Bone Spine. 2008 May ; 75(3) :299-302. Pub Med
- François EURLY, Hervé MAYAUDON, Lyse SIR VIN-BORDIER, Eric PERIER, Christophe GUILLEMOT, Dominique LECHEVALIER, Jacques MAGNIN. HLA B27 ET ATTEINTE RESPIRATOIRE DES SPONDYLARTHROPATHIES A FORME AXIALE Etude rétrospective de 107 observations masculines (1998). Rev. Rhum. [Ed Fr], 1998, 65 (10), 618-625. Expansion Scientifique Publication, 1998
- Jane Freeston, Nick Barkham, Elisabeth Hensor, Paul Emery, Alexander Fraser. Ankylosing spondylitis, HLA-B27 positivity and the need for biologic therapies (2007). Joint Bone Spine 74 (2007) 140-143. 2007 Elsevier Masson SAS.
- J. Martinez-Borra, Segundo Gonzalez, A. Lopez-Vazquez, M. A. Gelaz, J. Bruges Armas, U. Kanga, N. K. Mehra, and C. Lopez-Larrea. HLA-B27 Alone Rather than B27-Related Class I Haplotypes Contributes Ankylosing Spondylitis Susceptibility (2000). Human Immunology 61, 131-139 (2000). American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000. Published by Elsevier Science Inc.

- Marion TARBE, Bordeaux 1 2010. Propriétés Fonctionnelles de nouveaux Peptidomimes Antigéniques pour une Immunothérapie Antitumorale.
- Philippe Dieudé, François Cornélis. Génétique de la polyarthrite rhumatoïde. Rev. Rhum. 72 (2005) 310-316.
- Philip C. Robinson, Matthew A. Brown. Genetics of ankylosing spondylitis (2013). Molecular Immunology 57 (2014) 2-11. 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Ulrich Weber, Rudolf O. Kissling. La maladie de Bechterw-nouveaux traitements, questions en suspens. Forum Med Suisse 2006 ; 6 : 163-171.
- V. Perez-Guijo, E. Munoz, A. Escudero, R. Veroz, M. Sanchez, M.J. de la Torre, M.C. Munoz-Villanueva, R. Gonzalez, J. Pena, E. Collantes-Estevez. Distribution du gène HLA-DRB1 dans une population de patients atteints de spondylarthrite ankylosante sporadique du sud de l'Espagne (2001). Rev Rhum [Ed Fr] 2002 ; 69 : 886-91. Edition scientifiques et médicales Elsevier SAS 2002.