

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAÂD DAHLEB DE BLIDA -1-



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MÉMOIRE DE PROJET DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE
L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE
LA VIE

Filière : Science Biologique
Option : Génétique et Physiologie

THÈME :

**Étude d'association des gènes HLA-DQB1 et la Sclérodermie
Systémique**

Présenté par :

M^{lle} ALEM Sara

Devant le jury composé de :

M^r MOHAMED SAID R.	MCB	USDB	Président
M^{me} EDDAÏKRA A.	MAA	USDB	Examinatrice
M^{me} BERKANI L. Assistante en Immunologie	CHU de Béni Messous		Promotrice
M^{me} GUESSAIBIA N.	MCB	USDB	Co-promotrice

Année Universitaire 2016/2017

~Remerciements~

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant.

J'exprime mes profonds remerciements à ma Promotrice Madame BERKANI L. la chef d'unité d'Immuno-génétique au service d'Immunologie de l'Hopital Issad Hassani de Béni Messous, qui m'a permis de bénéficier de son encadrement. Sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ses précieux conseils et ses bonnes explications m'ont éclairé le chemin de la recherche et m'ont servi à l'accomplissement de ce travail.

Je voudrais également exprimer mes sincères remerciements à ma Co-promotrice, Madame GUESSAIBIA N. maitre de conférences à l'université de SAÂD DAHLËB de Blida pour sa disponibilité, pour son aide compétente qu'elle m'a généreusement apporté.

Je tiens à remercier Monsieur le président, Mr. MOHAMED SAID R, qui me fait le plus grand honneur de présider le jury de ma soutenance, et qui n'a jamais cessé de m'enrichir de ses valeureuses remarques.

Veillez trouver ici, monsieur, ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

Mes remerciements vont également au membre du jury Madame EDDAIKRA A. d'accepter d'examiner mon modeste travail et de l'enrichir par leur proposition.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde gratitude au professeur DJIDJIK R, pour m'avoir accueillie au sein de son service.

Je tiens à remercier chaleureusement M^{lle} DENNANE LINDA, grâce à sa gentillesse et générosité, grâce à son aide et son orientation, j'ai pu effectuer ce travail.

« En vérité, le chemin importe peu ...

la volonté d'arriver suffit à tout... »

Albert CAMUS

Je dédie mon travail

A l'Amour de ma vie : A toi Maman ; A toi Papa

A mes grands parents

A mes sœurs : Chahrazed, Samia et Aicha

A mes frères : Zakaria, Abdelmoumane et Salah Eddine

A mes belles-sœurs : Fatima Zohra, Nawal et Hayat

A mon beau-frère Mohamed

A mes Anges : Hadjar, Aya, Anfal, Alaà Eddine et ma petite Alaà

A mes chères amies : Djamila, Wissem, Lamia et Khadidja

A toute ma famille ALEM et HENNI

Je vous aime...

Résumé

La sclérodermie systémique (ScS) est une maladie auto-immune systémique rare et multifactorielle. L'étiologie de cette pathologie est encore mal connue. Les études épidémiologiques mettent en évidence plusieurs facteurs à la fois, notamment les gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains (HLA).

Le système HLA est un ensemble de gènes qui s'expriment sous forme d'antigènes à la surface de la plupart des cellules de l'organisme, il est caractérisé par son polymorphisme extrême grâce aux approches génétiques.

Le but de cette étude était de rechercher les allèles HLA-DQB1 de susceptibilité à la ScS dans une population de malades algériens.

Pour cela une étude cas/témoins a été menée au service d'immunologie CHU de Béni Messous au sein de l'unité d'immuno-génétique. Nous avons recruté 50 cas, dont le diagnostic de la ScS a été établi selon les critères du 'Collège Américain de Rhumatologie' ACR. En parallèle nous avons constitué un échantillon de 55 sujets normaux. Les ADN sont extraits et typés par la PCR-SSP (Séquence Spécifique Primer).

L'analyse des résultats a été réalisée par les tests statistiques classiques, χ^2 et Odds Ratio.

Nous avons observé une augmentation significative de l'allèle HLA-DQB1*05 chez les femmes malades 5% par rapport aux témoins 0% ; $p=0,024$. Cet allèle semble être associé positivement à la ScS et son augmentation a été rapportée dans d'autres populations. Par ailleurs, une diminution significative a été observée pour l'allèle HLA-DQB1*02 (21% versus 36%, OR=2.13, $p=0,015$) chez les cas, cet allèle semble être protecteur contre la ScS.

Mots clés : Sclérodermie systémique, typage HLA, HLA-DQB1, PCR-SSP.

Abstract

Systemic Scleroderma (SSc) is a rare and multifactorial systemic autoimmune disease. The etiology of this pathology is still poorly understood. Epidemiological studies reveal several factors at the same time, notably the genes coding for human leukocyte antigens (HLA).

The HLA system is a set of genes that express itself as antigens on the surface of most cells in the body, characterized by its extreme polymorphism through genetic approaches.

The aim of this study was to investigate HLA-DQB1 alleles of susceptibility to SSC in a population of Algerian patients.

For this purpose, a case / control study was carried out at the Immunology Department CHU of Beni Messous in the unit of immunogenetics. We recruited 50 cases, the diagnosis of which was made according to the criteria of the 'American College of Rheumatology' ACR. In parallel, a sample of 55 normal subjects was collected. The DNA is extracted and genotyped by PCR-SSP (Specific Sequence Primer).

The analysis of the results was carried out by the conventional statistical tests, X² and Odds Ratio.

We observed a significant increase in the HLA-DQB1*05 allele in sick women 5% compared to controls 0%, $p = 0.024$. This allele appears to be positively associated with SSc and its increase has been reported in other populations. In addition, a significant decrease was observed for the HLA-DQB1 02 allele (21% versus 36%, OR = 2.13, $p = 0.015$) in the cases, this allele appears to be protective against SSc.

Key words: Systemic scleroderma, HLA typing, HLA-DQB1, PCR-SSP.

ملخص

إن مرض تصلب الجلد النظامي هو مرض من أمراض المناعة الذاتية النظامية النادرة ومتعددة العوامل، مسبباته تبقى إلى يومنا هذا غير واضحة، الدراسات الوبائية سلطت الأضواء على أكثر من عامل واحد له علاقة فيها، بما في ذلك الجينات التي تشفر لمستضدات السطحية للكريات البيضاء.

إن معقد التوافق النسيجي البشري المتواجد على سطح كل خلايا الجسم هو مجموعة من الجينات تشفر مستضدات سطحية مناعية خلوية، تتميز بتعدد أشكالها الشديدة التنوع بفضل المناهج الجينية.

والهدف من هذه الدراسة هو البحث عن أليلات ALH-BQD1 التي تعطي احتمال لظهور مرض تصلب الجلد النظامي عند عدد من المرضى الجزائريين.

لهذا دراسة استعداده أجريت في المستشفى الجامعي ببني مسوس في وحدة المناعة. قمننا بجلب 50 حالة، وكان تشخيصها على أساس معايير الكلية الأمريكية للروماتيزم (RCA). وبموازاة ذلك، تم جمع عينة من 55 فرد غير مصاب. يتم استخراج الحمض النووي وتصنيفها الجيني من قبل تقنية RCP-PSS.

تم إجراء تحليل النتائج من خلال الاختبارات الإحصائية التقليدية، X^2 ونسبة الأرجحية.

لاحظنا زيادة كبيرة في الأليل ALH-BQD1*5 عند النساء 5% مقارنة مع الضوابط 0%، $p=0.024$.

ويبدو أن هذا الأليل مرتبط إيجابيا مع مرض تصلب الجلد النظامي وقد تم الإبلاغ عن زيادة في السكان الآخرين. وبالمقارنة إلى ذلك لوحظ انخفاض كبير في الأليل ALH-BQD1*2 (21%) مقابل 36% $p=0.015$ (RO) عند الحالات، يبدو أن هذا الأليل واقى ضد مرض تصلب الجلد النظامي.

الكلمات المفتاحية: مرض تصلب الجلد النظامي، تقنية قراءة جينات المستضدات الخلوية، معقد التوافق النسيجي البشري، ALH-RCP, 1BQD-PSS.

Liste des tableaux

Tableau I : Critères de classification de la sclérodermie systémique de l’American College of Rheumatology (ACR).....	06
Tableau II : Les volumes à préparer pour le mélange réactionnel	24
Tableau III : Le programme d’amplification	24
Tableau IV : Caractéristiques générales de la population malade et témoins	28
Tableau V : Comparaison des fréquences HLA-DQB1 de notre population avec ceux des autres pays	36

Liste des Figures

Figure 01 : Les trois caractéristiques de la sclérodermie systémique.....	02
Figure 02 : L'étiopathogénèse de la ScS.....	04
Figure 03 : Formes de la ScS.....	05
Figure 04 : Synthèse physiopathologique.....	10
Figure 05 : Représentation schématique des gènes du locus du CMH.....	12
Figure 06 : Représentation schématique des gènes de classe Ia du CMH, des ARNm transcrits et des protéines obtenues	13
Figure 07 : Représentation schématique des gènes de classe II du CMH, de l'ARNm transcrit et des protéines obtenues	13
Figure 08 : Différents composants de la réaction de PCR.....	20
Figure 09 : Schéma de la réaction PCR.....	21
Figure 10 : Les trois étapes d'amplification.....	21
Figure 11 : Principe de la PCR-SSP.....	23
Figure 12 : Réactions positives et négatives.....	25
Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose pour 2 patients.....	26
Figure 14 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les patients ScS	28
Figure 15 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS.....	29
Figure 16 : Répartition des allèles HLA DQB1 par tranche d'âge chez les malades ScS.....	30
Figure 17 : Répartition des allèles HLA-DQB1 selon le sexe et les tranches d'âge des patients ScS	31
Figure 18 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS et les témoins.....	31
Figure 19 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS et les témoins	32
Figure 20 : Répartition des allèles HLA DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge.....	33
Figure 21 : Répartition des allèles HLA DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les hommes.....	33

Figure 22 : Répartition des allèles HLA-DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge et le sexe chez les femmes.....34

Liste des abréviations

AACE : Anticorps Anti-Cellules Endothéliales.
AAN : Anticorps Anti-Nucléaires.
ACR : American College of Rheumatology.
ADN : Acide DésoxyriboNucléique.
alpha-SMA : alpha Smooth Muscle Actin.
ARNm : Acide RiboNucléique messenger.
ATA : Anticorps Anti- Topoisomérase I.
BET : Bromure d'ETHédium.
CE : Cellule Endothéliale.
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
CREST : Calcinose, Raynaud, oEsophagien, Sclérodactylie, Télangiectasie.
CTGF : Connective Tissue Growth Factor.
dcScS : Sclérodémie systémique cutanée diffuse.
ddNTP : didésoxynucléotides triphosphates.
dNTP : désoxynucléotides triphosphates.
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique.
ET-1 : Endothéline-1.
EULAR : European League Against Rheumatism.
Fas-L : Fas Ligand.
FOXP3 : Forkhead box P3.
GvHD : Graft vs Hôte disease.
HGH : Humain Growth Hormone.
HLA : Antigène Leucocytaire Humain.
IC : Intervalle de confiance.
ICAM : InterCellular Adhésion Molécule.
IFN : Interféron alpha.
IL : Interleukine.
IMGT : International ImMunoGeneTics project.
IRAK1 : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1.
LB : Lymphocyte B.
LcScS : Sclérodémie systémique cutanée limitée.
LCT : LymphoCytoToxicité.
IScS : Sclérodémie systémique limitée.
LT : Lymphocyte T.
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1.
MEC : Matrice Extra Cellulaire.
MECP2: Methyl CpG binding Protein 2.
Mg⁺⁺ : Magnésium sous forme ionique en solution.
MMP : Métalloprotéases.
Mn⁺⁺ : Manganèse sous forme ionique .
mRSS :modified Rodnan Skin Score.
NO : Monoxyde d'Azote.

OR : Odd Ratio.
p : P valeur.
PCR: Polymerase Chain Reaction.
PCR-SBT: Sequence Based Typing.
PCR-SSO: Sequence Specific Oligonucleotide.
PCR-SSP: Sequence Specific Primer.
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor.
PF4 : Platelet Factor 4.
PSORS1C1 : PSORiasis Susceptibility 1 Candidate 1.
RNase : RiboNuclease.
ROS : Reactive Oxygen Species.
ScS : Sclérodemie Systémique.
TAP : Transporter Associated with antigen Processing.
Taq : Thermus aquaticus.
TBE : Tris Borate EDTA.
TGFβ : Transforming Growth Factor-beta.
TLR : Toll-Like Receptor.
Th1/2 : Lymphocytes T helper1 / 2.
UV : UltraViolet.
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule.
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor.

Table des Matières

Introduction.....	01
-------------------	----

Chapitre I : Partie bibliographique

I.1 Historique.....	02
I.2 Description de la sclérodémie systémique.....	02
I.2.1 Définition de la sclérodémie systémique.....	02
I.2.2 Épidémiologie de la sclérodémie systémique.....	03
I.2.3 Etiologie de la sclérodémie systémique.....	03
I.2.4 Les formes cliniques de la maladie	04
I.2.5 Diagnostic.....	05
I.2.6 Principales manifestations cliniques.....	06
I.3 La physiopathologie de la Sclérodémie systémique.....	07
I.4 Associations génétiques connues avec la sclérodémie systémique.....	11
I.5 Le système HLA.....	11
I.5.1 Généralités	11
I.5.2 Caractéristiques du système HLA.....	13
I.5.3 Nomenclature.....	14
I.5.4 Typage HLA.....	15
I.6 Association HLA et la Sclérodémie systémique.....	16
I.6.1 Association entre les allèles HLA classe II et la sclérodémie systémique.....	16
I.6.2 Association entre les allèles du gène HLA-DQB1 et la sclérodémie systémique.....	17

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 Matériel.....	18
II.1.1 Critères d'inclusions.....	18
II.1.2 Les réactifs	18
II.2 Méthodes.....	19
II.2.1 Extraction de l'ADN par le Kit Invitrogene.....	19
II.2.2 Etude des allèles HLA-DQB1 par la PCR-SSP.....	19
II.2.2.1 PCR.....	19
II.2.2.2 La PCR-SSP.....	22
II.2.3 Mode Opératoire.....	23
II.2.4 Outils et tests statistique.....	27

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Résultats	28
III.1.1 Description de la cohorte	28
III.1.2 Répartition des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS	28
III.1.3 Répartition des allèles HLA-DQB1 selon le sexe chez les malades ScS	29
III.1.4 Répartition des allèles HLA-DQB1 par tranche d'âge chez les malades ScS	29
III.1.5 Répartition des allèles HLA-DQB1 selon les tranches d'âge et le sexe des patients ScS.	30
III.1.6 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des malades ScS avec ceux des témoins.....	31
III.1.7 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon le sexe.....	32
III.1.8 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge.....	32
III.1.9 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les hommes.....	33
III.1.10 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patientes ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les femmes.....	34
III.2. Discussion	35
Conclusion	38
Référence bibliographique	
Annexe	

Introduction

Introduction

Les maladies auto-immune (MAI) résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire affectant 5 à 10 % de la population mondiale et constituent le troisième processus pathologique le plus fréquent après les maladies cardio-vasculaires et les cancers. En effet, on dénombre chez l'adulte plus de 80 maladies auto-immunes. Ce sont des maladies dans lesquelles les lésions observées sont dues à la mise en jeu d'une réaction immunitaire vis-à-vis des constituants de soi les « auto-antigènes ».

Le terme « Sclérodémie » signifiant littéralement « durcissement de la peau » est souvent employé pour définir un groupe de maladies ayant en commun une fibrose excessive de la peau. De façon générale, la sclérodémie peut exister sous deux formes : la forme limitée ou sclérodémie localisée (ScL), appelée encore Morphée, et la forme systémique ou Sclérodémie Systémique (ScS). La ScL est considérée comme une maladie dont l'atteinte cutanée est limitée et l'atteinte systémique extrêmement rare. Par contre, la ScS peut atteindre elle plusieurs organes en plus de la peau pouvant conduire ainsi à une morbidité importante et au décès, cette dernière suscite l'intérêt des médecins et chercheurs depuis longtemps.

Un grand nombre de facteurs génétiques et non-génétiques jouent un rôle dans le développement de cette pathologie. Parmi ces facteurs génétiques, les gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains (HLA) joueraient un rôle majeur dans la susceptibilité à la maladie. Certaines spécificités (ou allèles de ce système) se retrouvent avec une plus grande fréquence chez les sujets malades par rapport à la population saine.

Plusieurs études ont exploré l'association du système HLA à la ScS dans différentes ethnies. Néanmoins, peu ont été effectuées sur les populations du Maghreb et plus particulièrement en Algérie où l'incidence de la ScS n'a pas encore été clairement établie.

Cependant, cette maladie a de lourdes répercussions sur la vie du patient, notamment sur son activité socioprofessionnelle ainsi que sur sa situation économique. D'où l'importance d'un diagnostic précoce et d'un traitement immédiat.

Notre travail a pour objet d'étudier le polymorphisme des allèles HLA de classe II : HLA-DQB1, chez une cohorte algérienne atteinte de ScS. Le but étant de :

- Mettre en évidence les principaux allèles de susceptibilité génétique impliqués dans le déterminisme de la Sclérodémie Systémique dans notre cohorte.
- Étudier les fréquences alléliques de ces gènes HLA dans la cohorte étudiée.
- Comparer nos résultats avec ceux des autres pays et faire ressortir des similitudes ou des différences avec les autres ethnies.

Chapitre I :

Partie

Bibliographique

I.1 Historique

Le nom sclérodémie provient du grec : "skleros" qui signifie "dur" et "dermos" qui signifie "peau" (Jimenez et Koenig, 2006), Hippocrate, en 400 avant J-C, semble avoir été le premier à rapporter une affection de la peau comparable à la sclérodémie mais, par manque de précision, ce cas ne fut pas pris en compte. La première description précise de la maladie a été retrouvée dans la monographie du Dr. Carlo Curizo, à Naples (Italie) en 1753, mais le terme de sclérodémie n'a été introduit qu'en 1847 par Dr. Gintrac. Durant cette même année, le Dr. Forget a fait la première description de l'atteinte articulaire dans la sclérodémie. En 1862 Maurice Raynaud a décrit un patient atteint de la sclérodémie et de «localisation asphyxie» provoquée par le froid, ce fut la première description du phénomène de Raynaud dans la sclérodémie. En 1878 Dr. Weber a prouvé la coexistence de la sclérodémie et de la calcinose. En 1892 monsieur William Osler a décrit la tendance à mourir d'une maladie pulmonaire ou rénale chez les patients atteints de sclérodémie .Ce n'est qu'en 1924, au Japon, que l'atteinte systémique fut reconnue, et ce, grâce à la description du Dr. Matsui de 5 cas présentant des lésions pulmonaires, rénales et gastro-intestinales. En 1945, Goetz à Capletown, a confirmé l'implication multisystémique et a suggéré que la maladie soit appelée sclérodémie systémique progressive. Le terme qualifié de «progressif» a ensuite été jugé inexact dans certains cas, il fut par la suite abandonné peu à peu car la maladie n'est pas toujours progressive et en raison du fardeau émotionnel que ce terme peut mettre sur le patient et la famille du patient (Avouac *et al*, 2011). En 1964 Winterbauer a signalé des cas avec le syndrome CREST. En 1980 Masi a publié les critères préliminaires de classification de la sclérodémie systémique (Varga *et al*, 2017).

I.2 Description de la sclérodémie systémique

I.2.1 Définition de la sclérodémie systémique

La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune du tissu conjonctif caractérisée par un dépôt excessif de collagène dans la peau et les organes internes avec une vasculopathie associée et la production d'auto-anticorps (Bolster et Silver, 2011). Ces trois caractéristiques communes sont responsables des manifestations cliniques et pathologiques de la maladie (Chen *et al*, 2003).

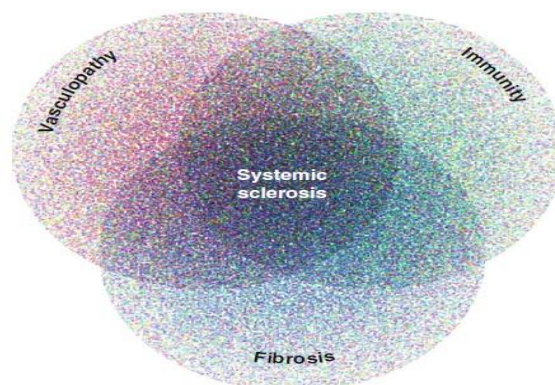


Figure 01 : Les trois caractéristiques de la sclérodémie systémique (Varga *et al*, 2017).

I.2.2 Épidémiologie de la sclérodermie systémique

La sclérodermie systémique est une maladie rare, sa prévalence est hautement variable selon les études, sa prévalence varie de 3 à 24 cas pour 100 000 habitants (Ranque et Mouthon, 2010 ; Masi *et al*, 1980).

Elle est plus élevée aux États-Unis et en Australie qu'en Europe et au Japon. Les femmes sont plus souvent atteintes que les hommes, elle touche trois à huit femmes pour un homme. Elle débute rarement avant l'âge de 20 ans dans moins de 10% des cas, et on observe un pic de fréquence entre 45 et 60 ans. Pour les femmes, le début est plus précoce, entre 30 et 39 ans (Ranque et Mouthon, 2010).

I.2.3 Etiologie de la sclérodermie systémique

Malgré la recherche intensive effectuée dans ce domaine, l'étiologie exacte de la sclérodermie systémique reste à ce jour inconnu. Plusieurs études suggèrent, que la ScS se produit chez un hôte génétiquement susceptible, probablement après avoir rencontré des expositions environnementales (Mayes *et al*, 2014 ; Granel *et al*, 2009).

a) Facteurs génétiques

Bien que la sclérodermie ne soit pas une maladie transmissible héréditairement, il existe de fortes évidences que des facteurs génétiques contribuent à son développement et à l'apparition de ses manifestations cliniques. Leur participation est suggérée par : La présence d'anomalies chromosomiques, des mutations ou polymorphismes présents au niveau de certains gènes cibles, l'association de certains sous-groupes HLA et de certains anticorps (Kahan et Menkes, 1995 ; Fautrel *et al*, 2001).

b) Facteurs environnementaux

Les premières observations suggérant l'implication des facteurs environnementaux dans le déclenchement de la maladie ont été présentées par le Dr Brawell en 1914. Ce dernier a décrit une incidence plus élevée de la sclérodermie systémique chez les tailleurs de pierre, suggérant le rôle de l'exposition à la silice dans ce phénomène. Dans les années 1970, d'autres recherches ont établi un lien entre la sclérodermie et l'exposition au chlorure de vinyle et aux solvants (Garabrant *et al*, 2003). Il a également été postulé que des agents infectieux pouvaient être les agents étiologiques de la sclérodermie systémique. Cette hypothèse suggère que les auto-anticorps spécifiques à la sclérodermie systémique seraient produits en réponse à des antigènes qui contiennent des épitopes similaires, au niveau structural, à ceux des protéines virales ou bactériennes, processus connu sous le nom de "mimétisme moléculaire" (Lunardi *et al*, 2005).

c) Facteurs immunitaires

Une grande variété d'anticorps anti-nucléaire a été montrée, dans une certaine mesure en corrélation avec certaines formes de la maladie. Des facteurs immunitaires cellulaires ont été identifiés. Il ya une diminution relative des cellules T avec une augmentation de la réactivité in vitro des sous-ensembles de lymphocytes T contre la peau et le muscle.

d) Microchimérisme

Les microchimérismes foetal-maternel et maternel-foetal ont été proposés comme mécanismes déclenchant l'auto-immunité dans la ScS et d'autres maladies auto-immunes (Nelson, 1999 ; Adams et Nelson, 2008). Ce microchimérisme, chez des individus sensibles, pourrait initier une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) produisant une sclérodémie systémique avec les cellules microchimériques agissant comme effecteurs ou comme cibles d'une réponse immunitaire (Adams et Nelson, 2008).

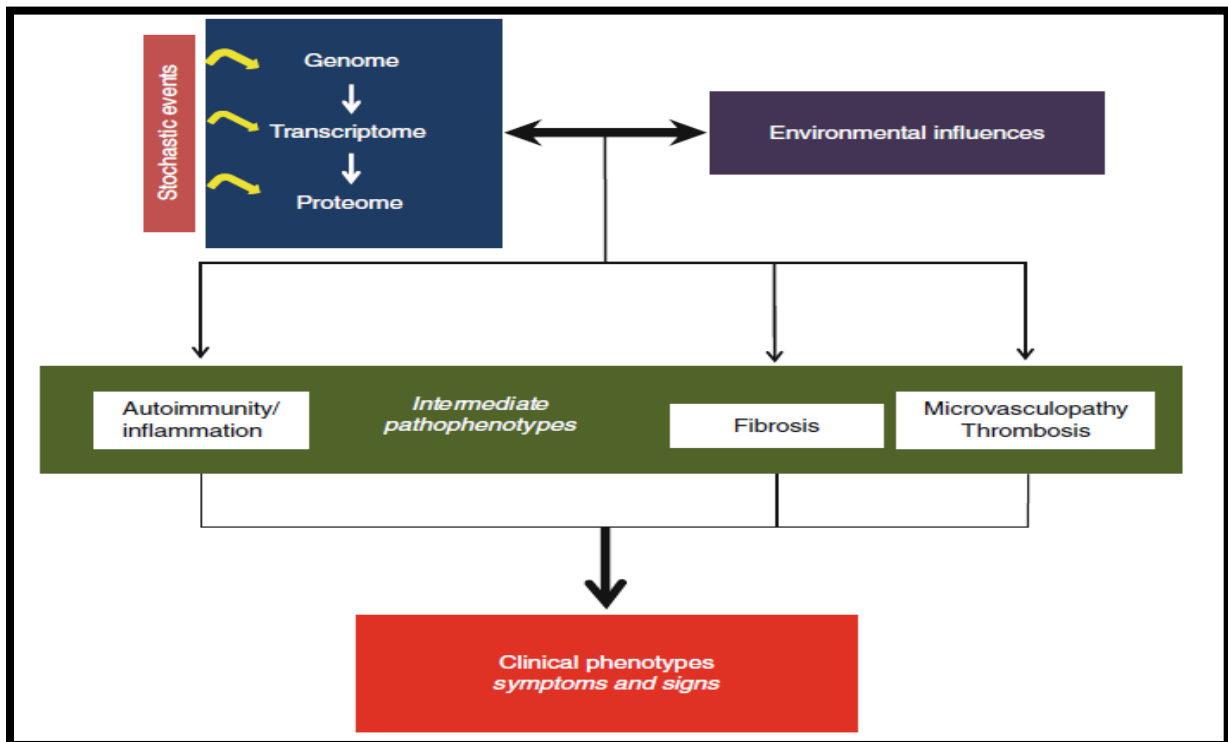


Figure 02 : L'étiopathogénèse de la ScS. Les interactions réciproques des influences génétiques et environnementales, impactées par des événements aléatoires (stochastiques), donnent une triade de pathophénotypes intermédiaires dans les ScS (Varga *et al*, 2017).

I.2.4 Les formes cliniques de la maladie

Trois formes cliniques de la sclérodémie systémique peuvent être discernées : ScS cutanée limitée (lcScS), ScS cutanée diffuse (dcScS) et sclérodémie sans atteinte cutanée (Hoogen *et al*, 2013) (Figure 3).

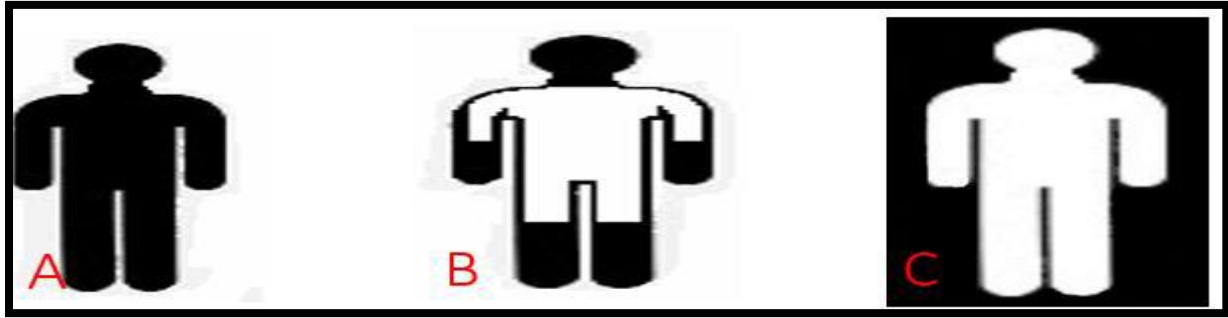


Figure 03 : Formes de la ScS : A) Atteinte cutanée diffuse, B) Atteinte cutanée limitée, C) Absence d'atteinte cutanée (Ould Barikalla, 2015).

1) ScS cutanée limitée (lcScS)

Affecte environ 60% des malades et se caractérise par une évolution lente. L'atteinte cutanée touche la peau du visage, des bras et des jambes, mais pas celle du tronc. Les organes internes vitaux, comme le cœur, les poumons et les reins sont souvent épargnés dans un stade précoce de la maladie (Bianchi *et al*, 1996). Par contre, après plusieurs années d'évolution, l'atteinte grave d'un ou de plusieurs organes internes peut survenir (Jancic, 2002). Cette forme de sclérodémie porte aussi le nom de syndrome de CREST. Cet acronyme fait référence aux symptômes caractéristiques : la Calcinose, le phénomène de Raynaud, le dysfonctionnement Oesophagien, la Sclérodactylie et la Télangiectasie (Jancic, 2002).

2) ScS cutanée diffuse (dcScS)

Qui touche environ 10% des malades, se caractérise par un épaissement de la peau qui s'étend sur toute la superficie du corps (les bras, les jambes, le visage et le tronc) avec des variations importantes d'une personne à l'autre. L'altération de la peau peut évoluer très rapidement et entraîner éventuellement une perte fonctionnelle par diminution de la capacité de bouger les articulations (Gulin et Korn, 1999). La fibrose touche également d'autres organes comme les poumons, les reins, le cœur et les intestins causant une diminution importante de leur fonction, voire même la mort (Jancic, 2002).

3) ScS limitée (lScS)

Appelée aussi Sine Scleroderma, cette forme est une présentation non commune de la ScS où la sclérose cutanée est absente (Varga *et al*, 2012).

I.2.5 Diagnostic

En une trentaine d'années, plusieurs critères diagnostiques de la ScS ont été établis et révisés (Hudson et Fritzler, 2014).

Les premiers critères ont été publiés en 1980 par l'American College of Rheumatology (ACR) (tableau I), mais ils ont été beaucoup critiqués après leur publication du fait de leur échec à

diagnostiquer les formes cutanées limitées (lcScS) ou limitées (Sine Scleroderma) ce qui suggère une sensibilité plus faible que celle initialement rapportée (Mellal, 2014).

Tableau I : Critères de classification de la sclérodermie systémique de l'American College of Rheumatology (ACR) (Avouac *et al*, 2010).

Critère majeur Sclérodermie cutané proximale remontant vers la racine des membres au-delà des articulations métacarpo-et/ou métatarsophalangiennes.
Critères mineurs Sclérodactylie (épaississement cutané limité aux doigts et aux orteils). Cicatrice déprimée d'un doigt ou perte de substance de la partie distale de la pulpe digitale. Fibrose pulmonaire des bases.
Le diagnostic de ScS peut être porté si le patient a un critère majeur ou deux critères mineurs.

Depuis 1980, de nouveaux tests d'exploration ont été développés et ont permis d'élever la sensibilité des critères. C'est ainsi qu'en 1988 LeRoy et ses collaborateurs ont établi d'autres critères permettant d'individualiser dans la ScS deux formes : la forme cutanée limitée (lcScS) et la forme cutanée diffuse (dcScS). Par la suite, LeRoy et Medsger ont individualisé une troisième forme, la sine scleroderma, qui a été incluse dans les critères (LeRoy et Medsger, 2001). En 2013, de nouveaux critères ACR/EULAR ont été établis (Hoogen *et al*, 2013).

I.2.6 Principales manifestations cliniques

I.2.6.1 Atteintes cutanées

Les premiers signes cliniques de la sclérodermie systémique apparaissent au niveau de la peau. L'expression de la maladie prend alors différentes formes qui englobe l'apparition d'une fibrose cutanée, la présence du phénomène de Raynaud et l'apparition de télangiectasies ou de calcinoses. Dans certains cas, l'ensemble de ces symptômes se manifesteront chez un même patient, dans d'autres, une ou plusieurs de ces manifestations seront présentes (Rodnan, 1979 ; Fritzler *et al*, 1980).

I.2.6.2 Atteintes viscérales

En plus des atteintes cutanées qui peuvent être très handicapantes du point de vue fonctionnel et esthétique, la maladie se caractérise par des complications au niveau des organes internes. Les organes les plus souvent concernés sont l'appareil gastro-intestinal, les poumons, le cœur et les reins.

I.3 La physiopathologie de la ScS

La physiopathologie de la ScS n'est que très partiellement connue. En revanche, les anomalies histologiques sont bien décrites, montrant l'implication des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules du système immunitaire dont les monocytes/macrophages et les lymphocytes.

I.3.1 Lésions vasculaires et dysfonction endothéliale

L'atteinte du réseau microvasculaire et l'activation des cellules endothéliales semblent être parmi les événements les plus précoces de la maladie (Matucci *et al*, 2013).

L'activation des cellules endothéliales conduit à l'expression de molécules d'adhésion (dont ICAM, VCAM, des E-sélectines) qui favorisent le recrutement des cellules inflammatoires (Rabquer *et al*, 2009). Cette activation peut être la conséquence de l'effet des auto-anticorps anti-cellules endothéliales (AAE) qui sont dirigés contre des antigènes mal définis situés à la surface des cellules endothéliales (Hill *et al*, 1996).

Une dysfonction endothéliale favorise également la vasoconstriction. Les cellules endothéliales lésées augmentent la synthèse et la sécrétion des cytokines vasoconstrictrices comme l'endothéline-1 (ET-1) et diminuent celle de facteurs endothéliaux vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline. Ceci entraîne une vasoconstriction et un défaut d'oxygénation tissulaire dont l'hypoxie résultante stimule la production de VEGF (Dooley *et al*, 2006).

Les cellules endothéliales produisent, de plus, des molécules profibrosantes dont le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire (MEC) (Liu *et al*, 2013).

Les cellules inflammatoires qui sont recrutées au niveau des sites agressés, semblent par ailleurs être une source importante de cytokines pro-inflammatoires (IL[Interleukine]-1 et IL-6) et de molécules profibrosantes (TGF β , PDGF [Platelet-Derived Growth Factor]).

L'évolution des lésions conduit à une raréfaction capillaire, à un épaississement de la paroi des vaisseaux en raison d'une prolifération intimale et des cellules musculaires lisses, et finalement à l'oblitération des petits vaisseaux qui est responsable d'une hypoxie et d'un stress oxydant (Allanore, 2016). Un autre acteur important est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), dont la synthèse est stimulée par la perméabilité endothéliale accrue et les phénomènes d'hypoxie malgré des taux sériques élevés de ce facteur régulateur dans la formation de nouveaux vaisseaux, il semble également exister dans la sclérodémie systémique une altération des mécanismes compensatoires de l'atteinte vasculaire que sont à la fois l'angiogenèse (croissance compensatrice de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux résiduels) et la vasculogenèse (formation de nouveaux vaisseaux de novo) (Allanore, 2016).

I.3.2 Activation des fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules principales du tissu conjonctif et sont responsables de la synthèse de plusieurs composantes de la MEC, incluant le collagène. Ces cellules jouent

normalement un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus ainsi que dans les processus de cicatrisation.

L'aboutissement de la séquence pathogénique de la ScS est la fibrose qui peut toucher différents organes mais débute habituellement au niveau du derme profond de la peau. Cette fibrose est définie par l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC). Les dépôts de collagène, mais aussi d'acide hyaluronique, de glycosaminoglycanes ou de fibronectine, forment un tissu conjonctif épais et rigide qui détruit l'architecture d'origine et perturbe les fonctions du tissu (Allanore, 2016). Les mécanismes responsables de l'hyperactivation des fibroblastes dans la ScS ne sont pas complètement élucidés, mais de nombreux travaux ont récemment mis en évidence certains facteurs solubles synthétisés par les fibroblastes eux-mêmes, les CE ainsi que les cellules mononuclées. Parmi ces facteurs, on retrouve notamment le TGF- β (Blobe *et al*, 2000). Plusieurs études ont montré le rôle important de la voie de TGF- β dans l'augmentation de la production de collagènes par les fibroblastes ScS (Kikuchi *et al*, 1992 ; Kawakami *et al*, 1998).

En dehors de la production exagérée de collagènes, les fibroblastes contribuent à la persistance de l'inflammation locale par un effet chimiotactique via la sécrétion de la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), favorisant la migration des monocytes à travers la barrière des cellules endothéliales vasculaires et augmentant l'infiltration inflammatoire des tissus (Galindo *et al*, 2001). Le tissu fibreux est également caractérisé par l'apparition de myofibroblastes, des cellules positives pour l'alpha-actine du muscle lisse (alpha-SMA [*smooth muscle actin*]) et résistantes à l'apoptose (Allanore, 2016).

L'origine de ces myofibroblastes n'est pas clairement établie, des fibroblastes résidents peuvent se différencier, de même que d'autres cellules résidentes comme les péricytes ou les cellules endothéliales. Des cellules progénitrices (fibrocytes) pourraient aussi être attirées et contribuer à l'accumulation des myofibroblastes. Une autre source de myofibroblastes a été évoquée avec l'implication possible de cellules progénitrices, normalement confinées dans la couche graisseuse adjacente au derme, qui pourraient se distribuer dans l'ensemble du derme lésionnel, perdre leurs marqueurs adipocytiques et exprimer des marqueurs de myofibroblastes (Marangoni *et al*, 2015). Un défaut d'apoptose est également impliqué dans l'accumulation des myofibroblastes. En effet, les fibroblastes isolés des patients atteints de ScS sont plus résistants à l'apoptose induite par le système Fas/Fas-L par rapport aux fibroblastes normaux. Cette résistance à l'apoptose peut être liée à l'exposition chronique au TGF- β (Jelaska et Korn, 2000).

I.3.3 Dysfonction du système immunitaire

L'altération des réponses immunitaires est observée au cours de la ScS et plusieurs éléments indiquent que les cellules immunitaires pourraient faire partie des initiateurs du processus moléculaire et biochimique aboutissant à la fibrose et à la vasculopathie, bien que les facteurs à l'origine de leur activation restent inconnus (Brembilla et Chizzolini, 2012).

a) Rôles des lymphocytes B

La présence des autoanticorps au cours de la ScS indique l'importance des lymphocytes B (LB), certaines études ont montré aussi le rôle que jouent certains autoanticorps dans la pathogénie de la maladie (Chung et Utz, 2004 ; Chizzolini *et al*, 2002 ; Arnett, 2006). La présence d'autoanticorps est depuis longtemps utilisée pour identifier et stratifier les malades atteints de ScS. Il existe des autoanticorps, dirigés contre des autoantigènes ubiquitaires, nucléaires et nucléolaires (protéine centromérique B, topo isomérase I, ARNpolymérase III, etc.), d'autres autoanticorps, qui ne reconnaissent pas des autoantigènes ubiquitaires, ont été décrits plus récemment. Ils sont dirigés contre les MMP1 ou MMP3 (métalloprotéases), les protéines de choc thermique (HSP47 [heat choc protein 47]) et la fibrilline-1 (Allanore, 2016).

b) Rôles des lymphocytes T

L'implication du système immunitaire a été démontré il ya plus de trois décennies lorsque l'étude histologique des lésions a révélé la présence, dès les stades précoces de ScS, de cellules immunitaires dans l'infiltrat inflammatoire (monocytes/macrophage, mastocytes et LT activés), à localisation périvasculaire généralement (Fleischmajer *et al*, 1977 ; Giacomelli *et al*, 1998 ; Prescott *et al*, 1992 ; Kalogerou *et al*, 2005). Les LT peuvent entraîner l'activation des fibroblastes soit par contact direct soit par action des cytokines et chimiokines sécrétées (Brembilla et Chizzolini, 2012). En outre, les LT autoréactifs peuvent interagir avec les lymphocytes B et conduire à la production d'autoanticorps (Brembilla et Chizzolini, 2012 ; Kuwana *et al*, 1995).

Un nombre important d'études suggèrent que les LT infiltrant la peau et les poumons, et présents dans le sang périphérique, présentent un profil Th2 (T helper 2) principalement, sécrétant les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 (Sakkas et Platsoucas, 2004 ; Wynn, 2004). IL-4 est considérée comme une puissante cytokine profibrotique puisqu'elle promeut la prolifération des fibroblastes, la synthèse des protéines de la MEC tel que le collagène et la production du TGF- β (Sakkas et Platsoucas, 2004 ; McGaha *et al*, 2003 ; Ihn *et al*, 2002). Quant aux cellules Th1, minoritaires au cours de la ScS, elles ont un effet anti-fibrotique qu'elles exercent essentiellement via la cytokine IFN- γ aux effets antagonistes à ceux de l'IL4, ces cellules pourraient être impliquées dans le processus inflammatoire qui a lieu précocement au cours de la maladie (Brembilla et Chizzolini, 2012) (Figure 04).

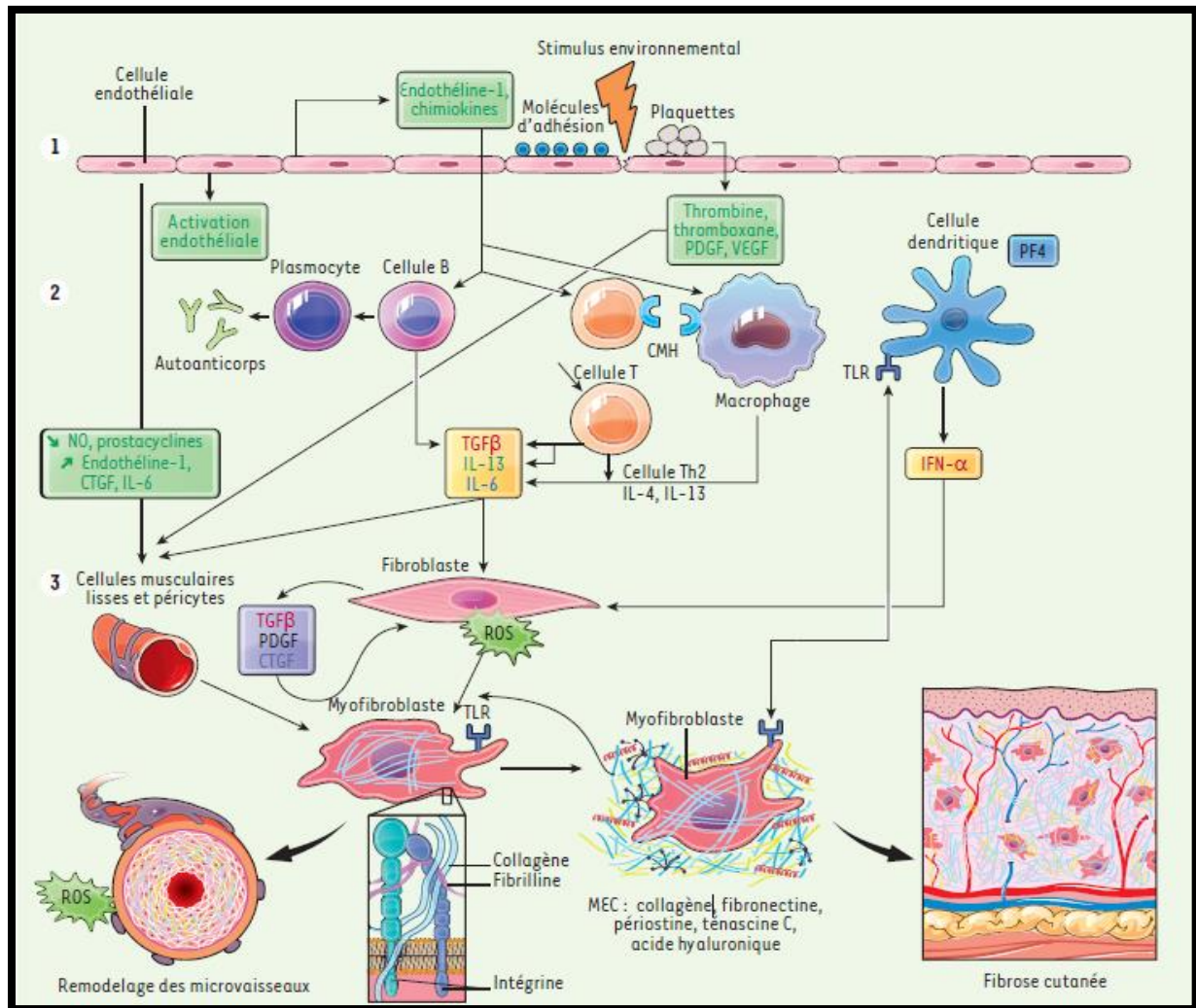


Figure 04 : Synthèse physiopathologique : L'activation fibroblastique qui conduit à la fibrose caractéristique de la ScS résulte de lésions microvasculaires avec agression endothéliale accompagnée d'une réaction inflammatoire et immunitaire dérégulée. *Étape 1* : Activation endothéliale, perméabilité, expression de molécules d'adhésion et dépôt de plaquettes conduisent à la synthèse de vasomodulateurs, de cytokines, de facteurs de croissance et de chimiokines. *Étape 2* : Différentes cellules inflammatoires et immunitaires sont recrutées et activées. Elles produisent de l'interféron de type 1, des cytokines Th2, de l'interleukine 6, des facteurs de croissance et des autoanticorps. *Étape 3* : Les fibroblastes sont activés par ces stimulus, produisent de la matrice de façon dérégulée, se différencient en myofibroblastes qui entretiennent le processus avec une matrice désorganisée, des troubles métaboliques en réponse au stress mécanique et à l'hypoxie, une production d'espèces réactives de l'oxygène et de facteurs de croissance conduisant au remodelage vasculaire et à la fibrose tissulaire. PDGF : Platelet-Derived Growth Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; CTGF : Connective Tissue Growth Factor ; TGF β : Transforming Growth Factor-beta ; TLR : Toll-Like Receptor ; MEC : Matrice Extra Cellulaire ; PF4 : Platelet Factor 4 ; IFN- α : Interféron alpha ; ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène ; IL : Interleukine ; NO : Monoxyde d'Azote (Allanore, 2016).

I.4 Associations génétiques connues avec la sclérodémie systémique

I.4.1 Région du CMH : gène de l'antigène leucocytaire humain 'HLA'

La plus forte association génétique observée dans la ScS est dans la région du HLA, et les polymorphismes dans la région HLA ont été étroitement liés à la susceptibilité à la ScS (Gloria et Maureen, 2015).

I.4.2 Région du CMH : gènes non HLA

NOTCH 4 et PSORS1C1 sont deux gènes associés à la ScS qui sont également situés dans la région du CMH mais ne codent pas pour les protéines HLA (Arnett *et al*, 2010).

I.4.3 Gènes non CMH

Plusieurs loci non-CMH ont été associés à la ScS telque IRAK1, FOXP3 et MECP2 qui sont trois gènes situés sur le chromosome X, considérant la forte prédilection féminine de la ScS (Carmona *et al*, 2013 ; Skarmoutsou *et al*, 2013).

I.5 Le système HLA

I.5.1 Généralités

Le système des antigènes leucocytaires humains (HLA) est le nom courant du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de notre espèce. Il a été mis en évidence en 1958 par Jean Dausset, environ 20 ans après la découverte de son analogue chez la souris par P.A. Gorer en 1937.

Le système HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6 (Breuning *et al*, 1977 ; Francke et Pellegrino, 1977), et, plus précisément, sur la bande 6p21.3 (Morton *et al*, 1984), cette région de 3,6 mégabases (Mb) comprend plus de 200 gènes exprimés, dont environ 10% à 20% sont liés aux fonctions immunes (Marsh *et al*, 2000). Elle est aussi connue aujourd'hui comme la région la plus polymorphe du génome humain. Du côté centromère, on trouve les gènes de classe II, et du côté télomère les gènes de classe I, entre lesquels une classe III est définie.

Les principaux gènes de classe I comprennent les locus dits « classiques » HLA-A, -B, -C, et « non-classiques » HLA-E, -F et -G, dont chacun code seulement pour la chaîne lourde (chaîne α) des deux chaînes d'un « isoforme » de molécule correspondante de classe I. Quelques pseudogènes HLA-H, -J, -K et -L se trouvent aussi dans la région, sans qu'aucune protéine soit exprimée.

Les gènes de classe II codent chacun pour les deux chaînes (chaînes α et β , de taille similaire) d'un isoforme de molécule correspondante de classe II : les gènes « classiques » HLA-DP, -DQ, et -DR, et les gènes « non-classiques » HLA-DM et -DO.

Les gènes codants des chaînes α et β se nomment par « A » et « B » : les chaînes α et β de HLA-DM sont codées par les gènes HLA-DMA et -DMB, respectivement, et celles de HLA-DO par HLA-DOA et -DOB. Dans le cas des pseudogènes, des chiffres sont ajoutés : les deux chaînes de HLA-DQ sont codées par les gènes HLA-DQA1 et -DQB1, respectivement, auprès desquels se trouvent les pseudogènes HLA-DQA2, -DQB2 et -DQB3. De la même façon, les deux chaînes de HLA-DP correspondent aux gènes HLA-DPA1 et -DPB1, avec les pseudogènes HLA-DPA2 et -DPB2. La région codante de l'isoforme HLA-DR est encore plus compliquée. Sa chaîne α est codée par le gène HLA-DRA, sans pseudogène qui l'accompagne, mais sa chaîne β est codée par plusieurs gènes, avec un ou plusieurs pseudogène(s), dont le nombre varie entre chromosomes. Outre les gènes HLA-DRA et -DRB1, on connaît des gènes et pseudogènes HLA-DRB2, -DRB3 jusqu'à -DRB9.

Les molécules HLA de classe I sont distribuées sur l'ensemble des cellules nucléées et sur les plaquettes d'un individu (Cesbron-Gautier *et al*, 2007). Les molécules HLA de classe II ont une distribution tissulaire restreinte aux lymphocytes T activés, aux lymphocytes B, aux monocytes, aux macrophages et aux cellules dendritiques (Choo, 2007) (Figure 05).

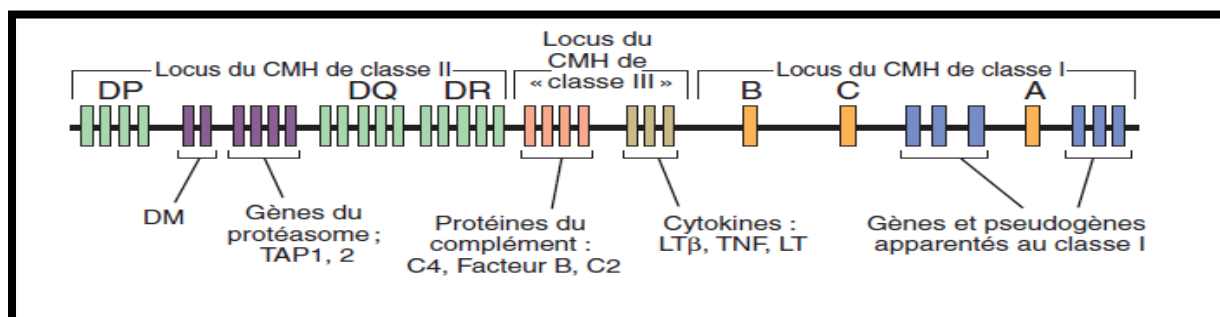


Figure 05 : Représentation schématique des gènes du locus du CMH est présentée, illustrant les principaux gènes codant les molécules participant aux réponses immunitaires. La taille des gènes et les distances qui les séparent ne sont pas représentées à l'échelle. Les locus de classe II sont montrés comme des blocs uniques, mais chacun comprend au moins deux gènes. Le locus du CMH de classe III (terme utilisé peu souvent) concerne des gènes qui codent des molécules autres que des molécules présentatrices de peptides. On trouve aussi de multiples gènes du type de ceux de la classe I ainsi que des pseudogènes (non montrés). LT: lymphotoxine; TAP, Transporter Associated with antigen Processing (Abbas et Lichtman, 2008).

Les gènes HLA de classe I se composent de huit parties codantes (exons) séparées par des parties non codantes (introns) (Cesbron-Gautier *et al*, 2007) (Figure 06).

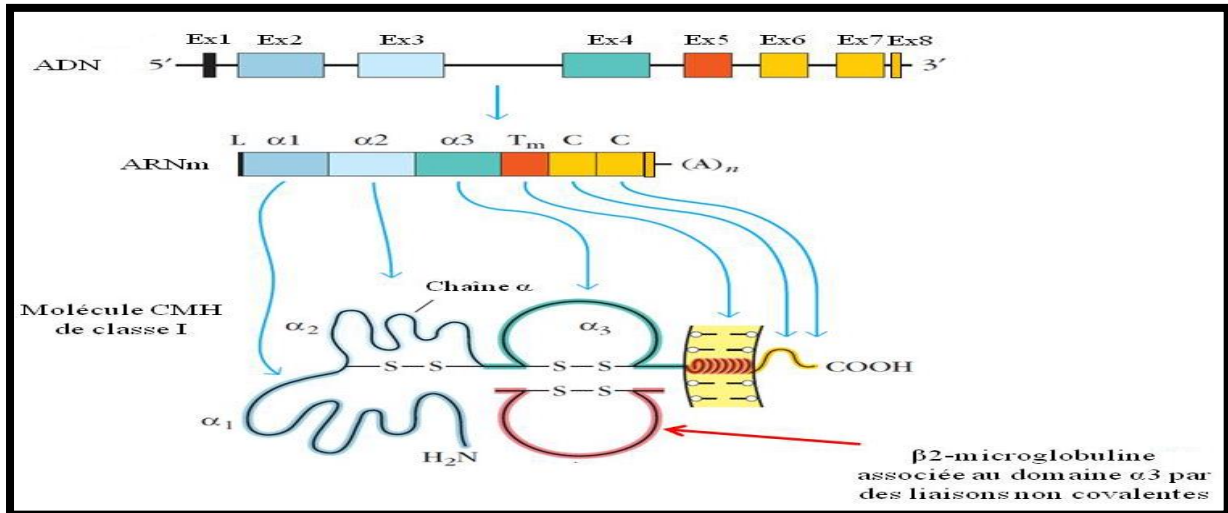


Figure 06 : Représentation schématique des gènes de classe Ia du CMH, des ARNm transcrits et des protéines obtenues (Goldsby *et al*, 2000).

Les gènes de classe II contiennent également cinq ou six exons séparés par des régions introniques (Choo, 2007). (Figure 07).

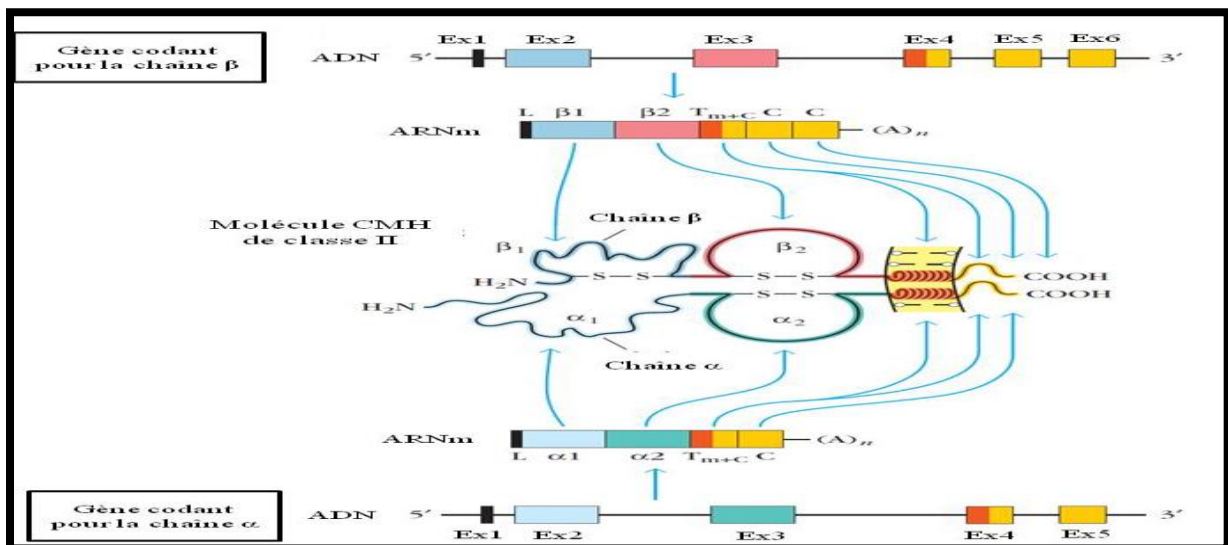


Figure 07 : Représentation schématique des gènes de classe II du CMH, de l'ARNm transcrit et des protéines obtenues (Goldsby *et al*, 2000).

I.5.2 Caractéristiques du système HLA

Plusieurs caractéristiques des gènes et des molécules du système HLA jouent un rôle important pour les fonctions normales de ces molécules :

a) Un polymorphisme extrême

Les gènes du CMH sont hautement polymorphes, Ce polymorphisme correspond au fait que chaque gène est multiallélique, ces allèles diffèrent par leurs séquences d'ADN, qui changent d'un individu à un autre dans une population. Le polymorphisme est tellement important qu'il n'existe pas deux individus, dans une population non consanguine, présentant exactement le même ensemble de gènes et de molécules du CMH (Abbas et Lichtman, 2008).

b) La codominance

Les gènes du système HLA sont exprimés de manière codominante, ce qui signifie que les allèles hérités des deux parents sont exprimés de manière équivalente à la surface des cellules : chaque allèle porté par chaque haplotype est exprimé et son produit protéique est détecté (Abbas et Lichtman, 2008).

c) Le déséquilibre de liaison

Parmi les caractéristiques fondamentales du système HLA ; On retrouve la notion de déséquilibre de liaison entre deux allèles proches sur le même chromosome. Des associations préférentielles entre allèles sont rencontrées avec une fréquence plus grande que ne le voudrait le hasard (Dausset et Pla, 1993), par exemple, dans la population caucasienne le HLA-A1 coexiste très souvent avec HLA-B8 et HLA-DR3.

Ceci signifie que la probabilité de trouver associés deux allèles particuliers est supérieure au simple hasard.

I.5.3 Nomenclature

Le polymorphisme extensif des gènes HLA a nécessité l'élaboration d'une nomenclature adaptée. Dans un premier temps les spécificités HLA ont été détectées par des typages sérologiques classiques. Il a été alors possible de distinguer les spécificités dites sérologiques HLA-A (A1, A2, A3 ...), HLA-B (B1, B2, B3 ...), HLA-C (C1, C2, C3 ...) et HLA-DR (DR1, DR2, DR3...). Avec l'émergence des méthodes de biologie moléculaire ces spécificités ont été affinées. En effet, les sous types HLA qui était indécélables, par les méthodes sérologiques ou cellulaires, ont été révélés par ces méthodes. Il était alors impératif d'adapter la nomenclature HLA aux nouvelles spécificités trouvées. Par exemple, la spécificité sérologique HLA-A2 comporte en réalité 60 allèles notés HLA-A*0201 à *0206, les huit allèles restant sont des sous-types de ces allèles (www.anthonynolan.org).

La nomenclature retenue par les différentes 'International Histocompatibility workshop HLA' impose une écriture stricte des différents allèles HLA. Les allèles sont désignés par HLA suivi par le locus (A, B, C, DR, DQ et DP), puis par une étoile (*) et par quatre chiffres. Les deux premiers désignent la correspondance sérologique ou tissulaire et les deux derniers la variation

allélique. Par exemple l'allèle HLA-DRB1*0401, HLA est le complexe de gènes, DR est le locus, B1 est le premier gène dans le locus DR, 04 correspond à la spécificité sérologique DR4 et enfin 01 désigne le premier variant allélique.

I.5.4 Typage HLA

A ce jour, un rendu de typage est ciblé sur une portion génomique restreinte codant pour le HLA. Il s'agit de l'exon 2 et 3 des loci HLA-A, HLA-B et HLA-C (région I), l'exon 2 et 3 des loci HLA-DQ (DQ-A et DQ-B) et l'exon 2 pour HLA-DR (DRA et DRB1), où repose près de 70% du polymorphisme. C'est ainsi que différentes approches de typages ont été développées et l'avènement de la technique de PCR au milieu des années 1980 a pallié aux limites de résolution de la sérologie employée jusqu'alors. D'un typage rendu au niveau générique (2 Digits), la « PCR-SSO » (Sequence Specific Oligonucleotide) et la « PCR-SSP » (Sequence Specific Primer) développées dans les années 1990 ont permis d'accéder à un résultat allélique (4 Digits). Cette avancée technologique s'est poursuivie la décennie suivante avec la « PCR-SBT » (Sequence Based Typing) ou séquençage « Sanger » puis plus récemment avec la PCR en temps réel (ex: linkage). Toutes ces techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en avant le polymorphisme et la grande diversité génétique du HLA. Chaque année, de nombreux allèles sont découverts, alimentant continuellement la banque de données de référence IMGT (International ImMunoGeneTics project) (<http://www.biorigami.com/?p=6737>).

Le typage des allèles HLA peut s'effectuer soit par :

I.5.4.1 La technique sérologique de microlymphocytotoxicité

Communément appelée LCT (Terasaki et Mac Clelland, 1964) : Elle est considérée comme technique de référence pour la détermination des antigènes HLA de classe I (A, B, C) et de classe II (DR, DQ) , Cette technique consiste à incuber les cellules du sujet à typer (soit les lymphocytes totaux ou les lymphocytes T pour les groupages HLA de classe I (loci HLA-A et HLA-B) , soit les lymphocytes B pour les groupages HLA de classe II (loci HLA-DR et HLA-DQ) , avec une batterie d'alloanticorps ou d'anticorps monoclonaux anti-HLA de classe I ou de classe II de spécificité anticorps connu (Ac), en présence de complément de lapin en vue de lyser les cellules portant l'antigène correspondant au sérum utilisé (Moalic, 2008).

I.5.4.2 Les différentes techniques de biologie moléculaire, basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin unique qui sert de matrice (Moalic, 2008).

1) La « PCR-SSO » (Sequence Specific Oligonucleotide)

La technique consiste en l'utilisation d'amorces localisées dans des séquences conservées, encadrant les régions polymorphes. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur une

membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme (Scharf *et al*, 1991).

2) La « PCR-SSP » (Sequence Specific Primer)

A été développé en 1992 et utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle (Olerup et Zetterquist, 1992). L'amplification ne sera vraiment effective que si la séquence de l'amorce est complémentaire de la séquence présente dans l'ADN génomique.

3) La « PCR-SBT » (Sequence Based Typing)

Elle est basée sur un typage HLA par séquençage direct de la région polymorphe. L'étape de séquençage est précédée d'une amplification par PCR spécifique au locus pour générer des modèles pour l'étape de séquençage, cette dernière nécessite des matrices d'ADN monocaténares, des amorces d'ADN, d'ADN polymérase, des dNTP et des ddNTP marqués par fluorescence, Les produits de la réaction de séquençage sont analysés à l'aide d'analyseurs de séquences d'ADN automatisés à haut débit. L'interprétation du séquençage se fait par comparaison avec une banque de données contenant toutes les séquences HLA mise à jour régulièrement.

4) La PCR en temps réel

Son principe est d'utiliser deux amorces nécessaires à l'amplification du produit. Pour la PCR en temps réel, on ajoute un oligonucléotide en même temps que les amorces, cet oligonucléotide est complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier située entre les deux amorces (appariement de l'oligonucléotide et des deux amorces au cours de l'étape d'hybridation). A son extrémité 5' se trouve un fluorochrome (reporter) et à son extrémité 3' se trouve un groupement quencher. Lorsque le fluorochrome et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée par le quencher. Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y aura séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable. Il y aura alors émission de la fluorescence car le fluorochrome s'éloignera du groupement quencher. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR.

I.6 Association HLA et la Sclérodémie systémique

I.6.1 Association entre les allèles HLA classe II et la sclérodémie systémique

Différents allèles HLA de classe II semblent être associés à la susceptibilité à la ScS dans différents groupes ethniques. De fortes corrélations ont été trouvées entre des autoanticorps spécifiques de ScS et HLA de classe II (Jin *et al*, 2014). Récemment, une étude de grande envergure portant sur une cohorte multiethnique américaine de 1300 patients ScS et 1000 contrôles sains a analysé les allèles HLA de classe II (DRB1, DQB1, DQA1 et DPB1), les

haplotypes et les épitopes partagés pour l'association avec la ScS et les sous-types (Arnett *et al*, 2010), chez les patients blancs et hispaniques ScS, les allèles HLA-DRB1 * 1104, DQA1 * 0501, DQB1 * 0301, et l'épitope DQB1 * 26 (absence de leucine en position 26) ont été significativement augmentés. L'haplotype HLA-DRB1 * 0701, DQA1 * 0201, DQB1 * 0202 et l'haplotype HLA-DRB1 * 1501, DQA1 * 0102, DQB1 * 0602 ont été protecteurs pour la ScS chez les blancs, respectivement dans un modèle dominant et récessif. Chez les Afro-Américains, HLA-DRB1 * 1104 n'était pas associé à la ScS, mais DRB1 * 0804 était, avec DQA1 * 0501 et DQB1 * 0301. Les associations les plus fortes avec le sous-type d'anticorps anti-centromère (ACA) étaient HLA-DQB1 * 0501 et l'épitope DQB1 * 26. Le sous-type d'anticorps anti-topoisomérase I (ATA) a été mieux expliqué par HLA-DPB1 * 1301 et l'HLA-DRB1 * 1104, DQA1 * 0501, DQB1 * 0301 haplotype (Reveille *et al*, 1992 ; Kuwana *et al*, 1995).

Le sous-ensemble anticorps anti-ARN polymérase III (ARA) a été mieux expliqué par HLA-DRB1* 0404, DRB1 * 11 et DQB1 * 03 chez les Blancs et les Hispaniques et DRB1 * 08 chez les sujets noirs (Jin *et al*, 2014).

I.6.2 Association entre les allèles du gène HLA-DQB1 et la sclérodémie systémique

Des allèles spécifiques de l'antigène leucocytaire humain (HLA) DQB1 confèrent une forte susceptibilité à la sclérodémie systémique, ils ont été associés à la ScS. Cependant, les principaux allèles HLA-DQB associés à la ScS varient selon les populations ethniques. Par exemple, DQB1 * 03: 01 était associé à la sensibilité à la ScS dans les populations caucasiennes mais pas chez les Coréens et seulement chez les dcSSc chez les Sud-Africains ; DQB1 * 02: 02 et * 06: 02 ont été associés à la protection contre la ScS chez seulement les caucasiens américains, DQB1 * 05: 01 a été significativement augmenté chez les patients caucasiens, espagnols et japonais avec ACA (Zhou *et al*, 2013).

Chapitre II :

Matériel

&

Méthode

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'association entre les gènes de l'antigène leucocytaire humain (HLA-DQB1) et la susceptibilité à la sclérodémie systémique.

Notre étude a été réalisée au niveau de l'unité d'immuno-génétique du service d'immunologie du centre hospitalo-universitaire ISSAD HASSANI de Béni Messous pendant une durée de 4 mois.

II.1 Matériel

II.1.1 Critères d'inclusions

Nous avons fait une étude cas/témoins sur un échantillon comprenant 50 sujets présentant une ScS diagnostiquée selon les critères de l'ACR 1980 et ceux de Leroy et Medsger de 2001, et recrutée au niveau du service de Rhumatologie de l'EHS de Ben Aknoun ainsi que des services de pneumologie et néphrologie du CHU Béni Messous, et un groupe témoin composé de 55 sujets sains.

Une fiche de renseignements a permis de recueillir les renseignements démographiques et cliniques des patients (Annexe I).

II.1.2 Les réactifs

Kit pour extraction d'ADN manuelle : PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (USA).

Kit pour typage HLA classe II (DQ): DQB SSP KIT Bio-Rad (Allemagne).

La Taq polymérase : Sacace BIOTECHNOLOGIES s.r.l. Recombinant Thermostable DNA Polymerase 5U/μl (Italie).

II.2 Méthodes

Dans notre étude, nous avons réalisé chez les patients et les témoins un typage des allèles HLA-DQB1 par PCR-SSP. Le matériel biologique sur lequel nous avons travaillé est l'acide désoxyribonucléique (ADN), qui a été extrait des leucocytes du sang total en utilisant des colonnes chromatographiques à base de silice (Invitrogene).

II.2.1 Extraction de l'ADN par le Kit Invitrogene

➤ Protocole

Le sang est prélevé sur anticoagulant de type EDTA. Tous d'abord nous avons ajouté 200µl de sang total, dans un Eppendorf stérile et nous avons rajouté 20µl de protéinase K et 20 µl de RNase A. Nous avons vortexé le mélange et le laissé 2 minutes à température ambiante et puis nous avons rajouté 200 µl de solution de lyse (Pure Link Genomic Lysis/ Binding Buffer) et on a vortexé pour assurer la lyse de l'échantillon.

Nous avons incubé le mélange à 55°C pendant 10 minutes pour assurer une lyse optimale, et puis nous avons rajouter 200 µl d'éthanol (96 -100%) au lysat, nous avons bien mélangé au vortex pendant 5 secondes et nous avons transféré le lysat obtenu dans une colonne stérile.

Nous avons centrifugé à >>>> 10000g pendant 1 minute à température ambiante et puis nous avons placé la colonne dans la 1^{ère} poubelle, nous avons rajouté 500 µl du tampon 1 (Wash Buffer 1) et nous avons centrifugé à >>>> 10000g pendant 1 minute à température ambiante.

Nous avons placé la colonne dans la 2^{ème} poubelle et nous avons rajouté 500 µl du tampon 2 (Wash Buffer 2) et puis nous avons assuré une centrifugation à >>>> 14000g (Vitesse maximale) pendant 3minutes à température ambiante.

Nous avons placé la colonne dans un Eppendorf stérile et nous avons rajouté 25-100 µl de solution d'éluion (Pure Link Genomic Elution Buffer), le volume à rajouter est en fonction de la concentration d'ADN voulu, nous avons incubé le mélange pendant 1minute à température ambiante et finalement nous avons centrifugé à >>>> 14000g pendant 1minute à température ambiante. L'eppendorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne).

II.2.2 Etude des allèles HLA-DQB1 par la PCR-SSP

II.2.2.1 PCR

➤ Principe

La PCR est une technique utilisée pour amplifier l'ADN à travers des thermocycles (cycles de changement de températures) à des intervalles de temps fixés. En utilisant une ADN polymérase thermostable.

La PCR peut créer de nombreuses copies d'ADN depuis les blocs de construction de l'ADN appelés dinucléosides de triphosphates ou dNTP_s.

Une réaction de PCR nécessite (Figure 08):

1. De l'ADN à amplifier (dénommé template).
2. Des amorces (également appelés primers).
3. Des désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
4. Une ADN polymérase thermorésistante (la Taq par exemple).
5. Du magnésium (Mg^{++}) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase.

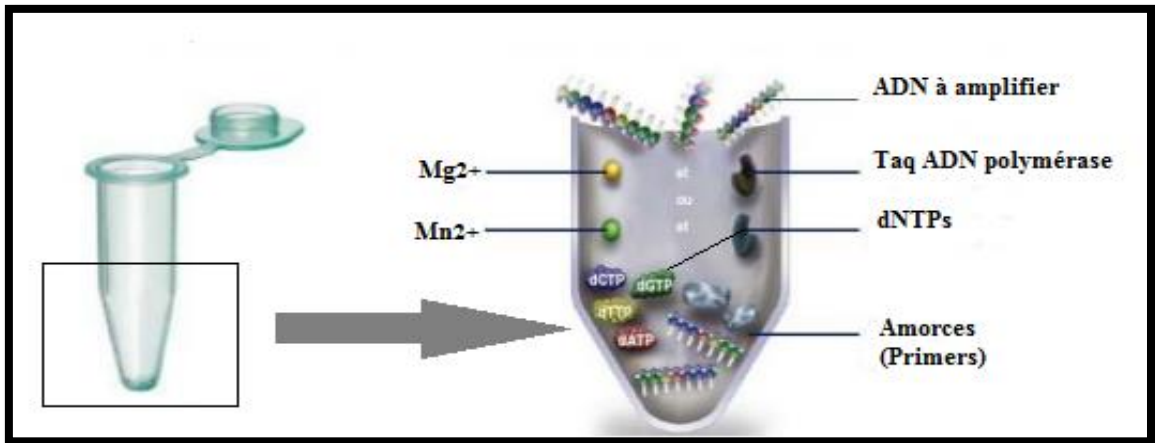


Figure 08 : Différents composants de la réaction de PCR (Mellal, 2014).

Ces 5 ingrédients sont mélangés dans un tube à essai et soumis à différents cycles de températures (Figure 09).

1 cycle de PCR

1^{ère} étape : **la dénaturation** (94°C) : L'ADN template est chauffé à 94°C. Les deux brins de l'ADN se séparent. On parle de dénaturation de l'ADN.

2^{ème} étape : **l'hybridation** (40-65°C) : En descendant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3^{ème} étape : **l'élongation** (72°C) : A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme (la Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute).

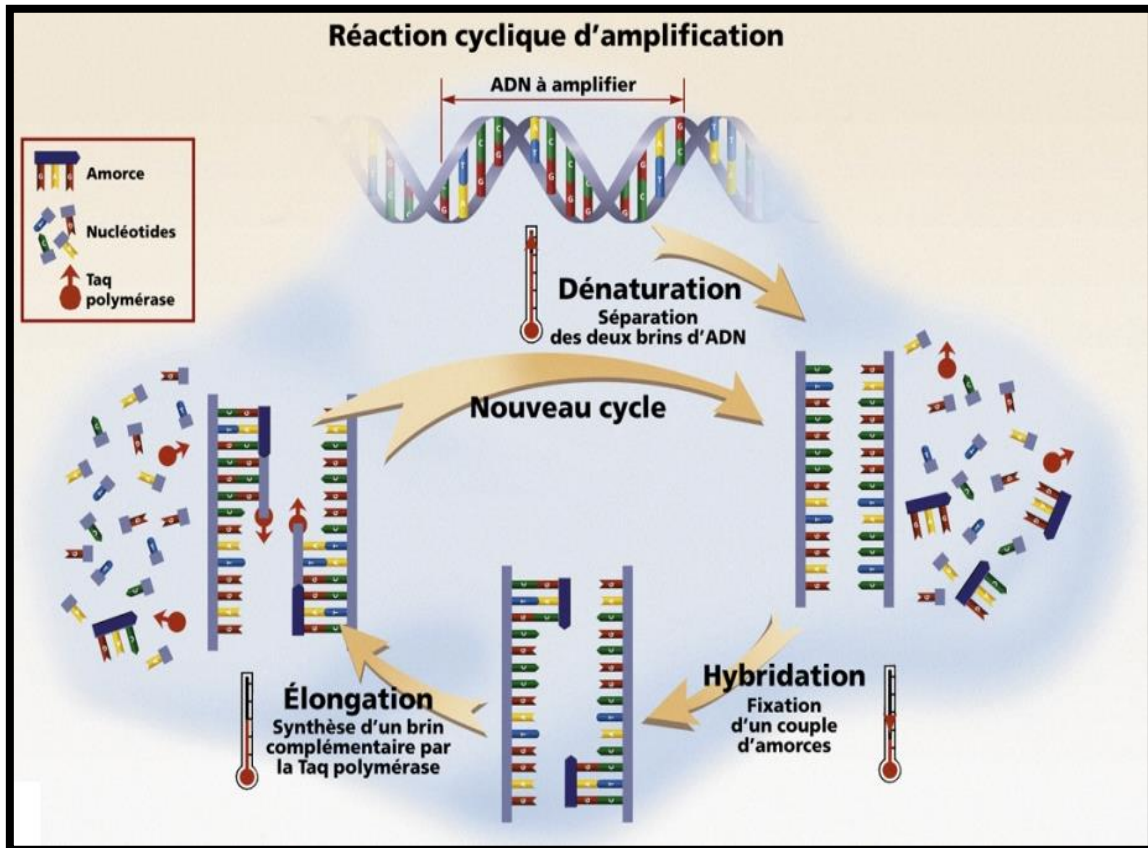


Figure 09 : Schéma de la réaction PCR (Hamani, 2013).

Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel on a doublé le nombre de fragment d'ADN cible initial. Environ une trentaine de cycle sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2^n fois notre ADN cible (Figure 10).

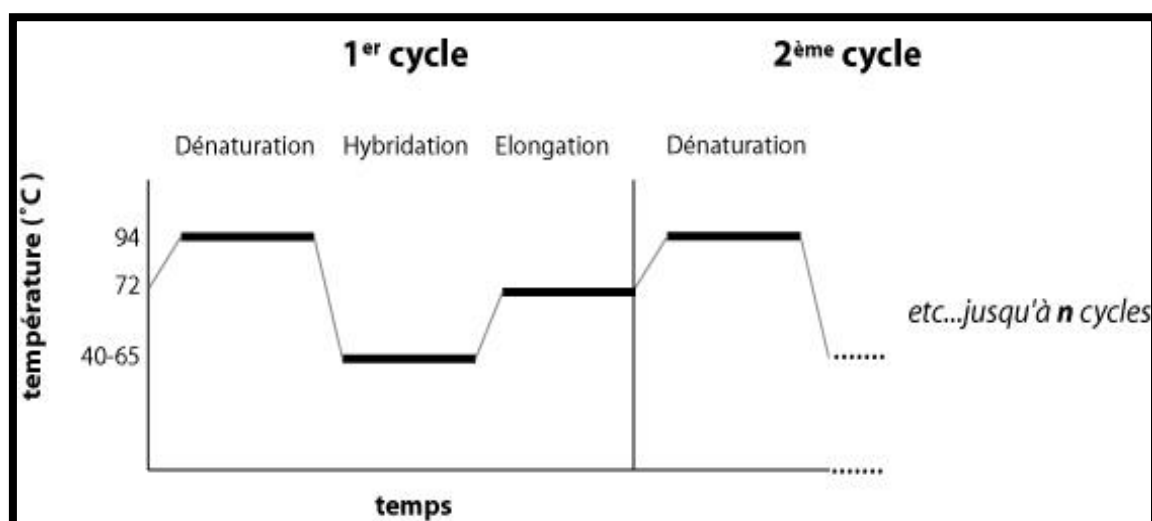


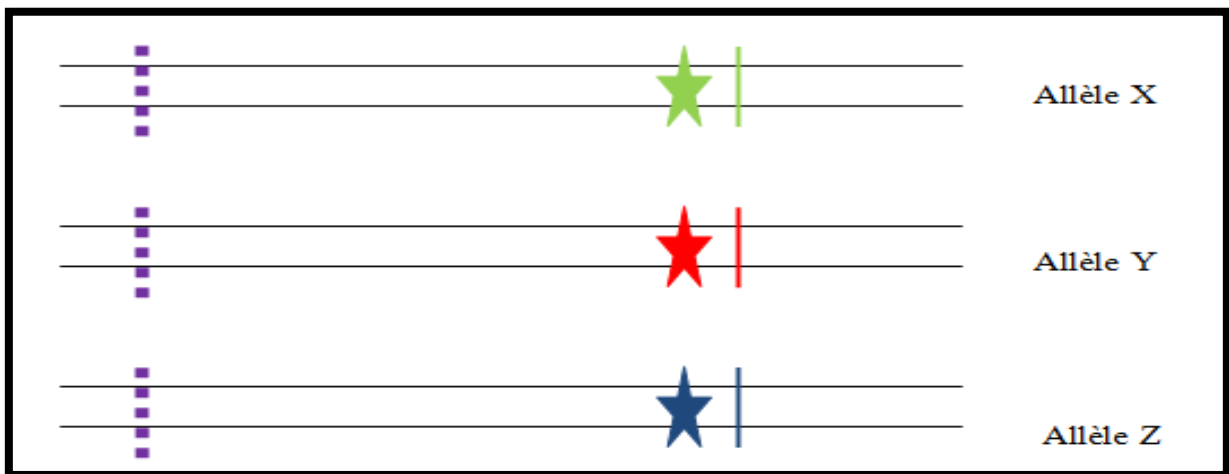
Figure 10 : Les trois étapes d'amplification.

II.2.2.2 PCR-SSP

➤ Principe

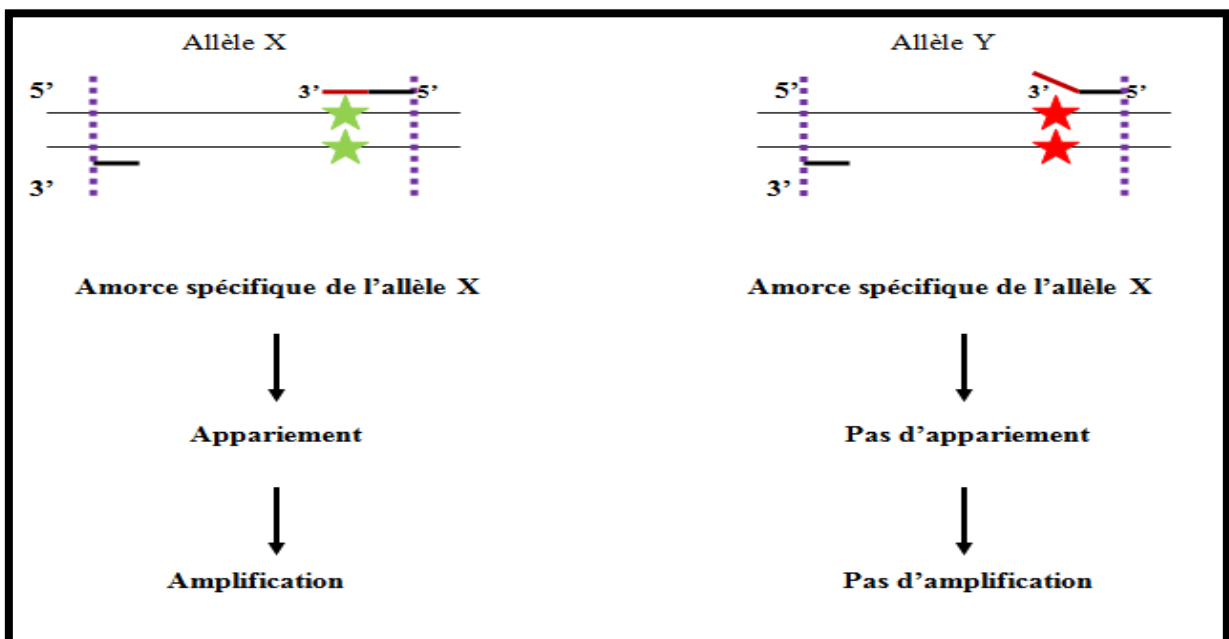
La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules sont amplifiées les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées grâce à une ADN polymérase thermostable sans activité correctrice. Ces couples d'amorces sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles selon le degré de résolution du kit utilisé. Dans des conditions très précises de PCR, les couples d'amorces hybridées ou presque totalement hybridées permettent l'amplification (résultat positif), tandis que les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif) (Figure 11).

A)



Autant de PCR que d'allèle à identifier

B)



C) Révélation par électrophorèse

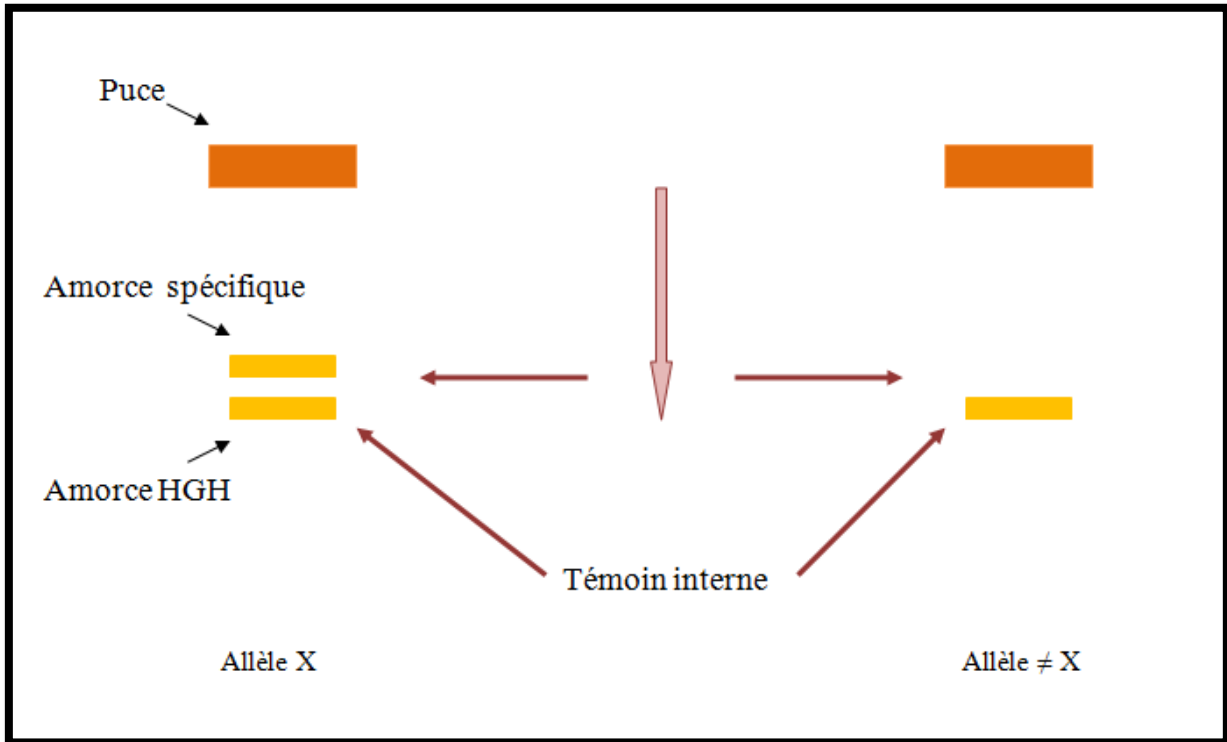


Figure 11 : A, B, C : Principe de la PCR-SSP (original).

➤ Mode Opérateur

Au départ nous avons préparé les prélèvements, nous avons remis en suspension l'ADN isolé dans de l'eau distillée stérile tout en ajustant à la concentration de $100 \pm 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (concentration optimale $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Pour le test de PCR-SSP, il faut un ADN dont le quotient A_{260}/A_{280} sera supérieur ou égale une valeur de 1,6 (ADN pur).

Pour réaliser un typage HLA SSP il faut préparer un mélange réactionnel qui consiste à agiter sur vortex le cocktail de PCR (conservé à $+4^\circ\text{C}$) pendant 15s, et ajouter $44 \mu\text{l}$ dans un Eppendorff stérile. Replacer immédiatement le cocktail à la température de conservation. Ce dernier contient principalement du MgCl_2 , du glycérol et du rouge crésol qui permettra par la suite de suivre la migration électrophorétique des amplicons. Nous avons rajouté $55 \mu\text{l}$ d'eau distillée au mélange, nous avons pris la taq-polymérase qui a été conservée à -20°C et nous avons la vortexé pendant 15s et nous avons ajouté $0.7 \mu\text{l}$ au mélange en la remplaçant immédiatement à -20°C . Le cocktail de PCR et la Taq polymérase ne doivent être retirés du froid qu'au moment de l'utilisation. Nous avons vortexé la dilution de l'ADN génomique pendant 15s et nous avons rajouté $11 \mu\text{l}$ au mélange (Tableau II).

Tableau II : Les volumes à préparer pour le mélange réactionnel.

Nombre de réactions de PCR	8
Cocktail de PCR	44µl
Taq ADN polymérase	0.7µl
H ₂ O	55µl
ADN (de 50 à 150 ng/µl).	11µl

Nous avons bien fermé le tube eppendorff et nous avons agité sur le vortex pendant 20s. On a sortis les blocs de PCR sélectionnés du réfrigérateur, qui sont composés de tubes de PCR contenant les mélanges desséchés d'amorces/nucléotides. Afin d'aider à l'identification, un marquage de couleur noire apparait sur la position 1 (Annexe II). Nous avons distribué 10 µl du mélange réactionnel (ADN + cocktail de PCR + eau distillée + Taq polymérase) dans tous les 8 tubes du bloc sans exception et on a tapoté légèrement le bloc et vérifié que chaque mélange soit bien descendu au fond du tube sans laisser des bulles d'air. A la fin nous avons fermé avec le couvercle fourni.

Nous avons placé les blocs préparés dans le thermocycleur et on a lancé un programme spécifique d'amplification : BioTest qui dure 1 heure et 30 minutes (Tableau III).

Tableau III : Le programme d'amplification.

Étapes	Températures	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	2 min	1 cycle
Dénaturation	94°C	10 s	10 cycles
Hybridation et élongation	65°C	60 s	
Dénaturation	94°C	10 s	20 cycles
Hybridation	61°C	50 s	
Elongation	72°C	30 s	

Le typage HLA a été réalisé pour 50 patients présentant une ScS, et 55 témoins, avec un bloc de 8 puits pour chaque individu.

Ensuite nous avons préparé le gel d'agarose à 1.5%, pour cela nous avons pesé 3 g d'agarose et mettre le dans un Erlenmeyer de 200 ml. Nous avons ajouté 200 ml de tampon d'électrophorèse TBE 1x (Tris Borate EDTA) dilué et préalablement préparé. On a fait fondre dans la micro-onde pendant 5 minutes jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Nous avons retiré soigneusement l'erenmeyer de la micro-onde, une fois prêt, nous avons ajouté une goutte de 5 µl de BET (**B**romure d'**E**thidium) et mélangé doucement. Nous avons coulé lentement le gel sur 2 à 3 cm d'épaisseur dans le support du gel et on a positionné les 6 peignes. Nous avons laissé le gel se solidifier pendant 15 minutes et puis on a enlevé soigneusement les peignes un à un en maintenant la plate-forme. Nous avons remplis la cuve à l'électrophorèse avec le tampon TBE qui permet le passage du courant électrique entre l'anode et la cathode, et

à la fin nous avons placé le support et le gel dans la cuve à l'électrophorèse. On a déposé 10 µl d'ADN amplifié dans chaque puits à l'aide d'une pipette monocanal en lavant l'embout 4 à 5 fois d'un puits à un autre et en le changeant entre les lignes, en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette et puis on a fermé la cuve et branché les fils au générateur et mis sous tension 150 volts pendant 20 minutes. Nous avons laissé migrer jusqu'à ce que les bandes de migration soient au milieu des deux lignes adjacentes visibles à l'œil nu grâce au rouge de crésol, nous avons coupé l'alimentation, débranché les connexions et récupéré soigneusement le gel dans son support. Nous avons placé le gel sur le plateau d'un transilluminateur UV.

Les bandes d'électrophorèse sont visualisées sous rayons UV par un dispositif capteur de photos, et finalement nous avons analysé les résultats.

L'interprétation des résultats était comme suit (Figure 12) :

- L'amplification positive montre la présence de deux bandes. Une bande contrôle correspondant à l'allèle du gène de l'hormone de croissance humaine HGH et une bande de l'allèle HLA-DQB1.
- L'amplification négative montre la présence uniquement d'une seule bande du contrôle interne.

Après validation de la technique, l'interprétation consiste à prendre note de la position des bandes HLA positives. Ces dernières seront introduites dans le logiciel Bio-Rad HLA-SSP Typing Software qui nous donnera le typage HLA-DQB1 de chaque patient.

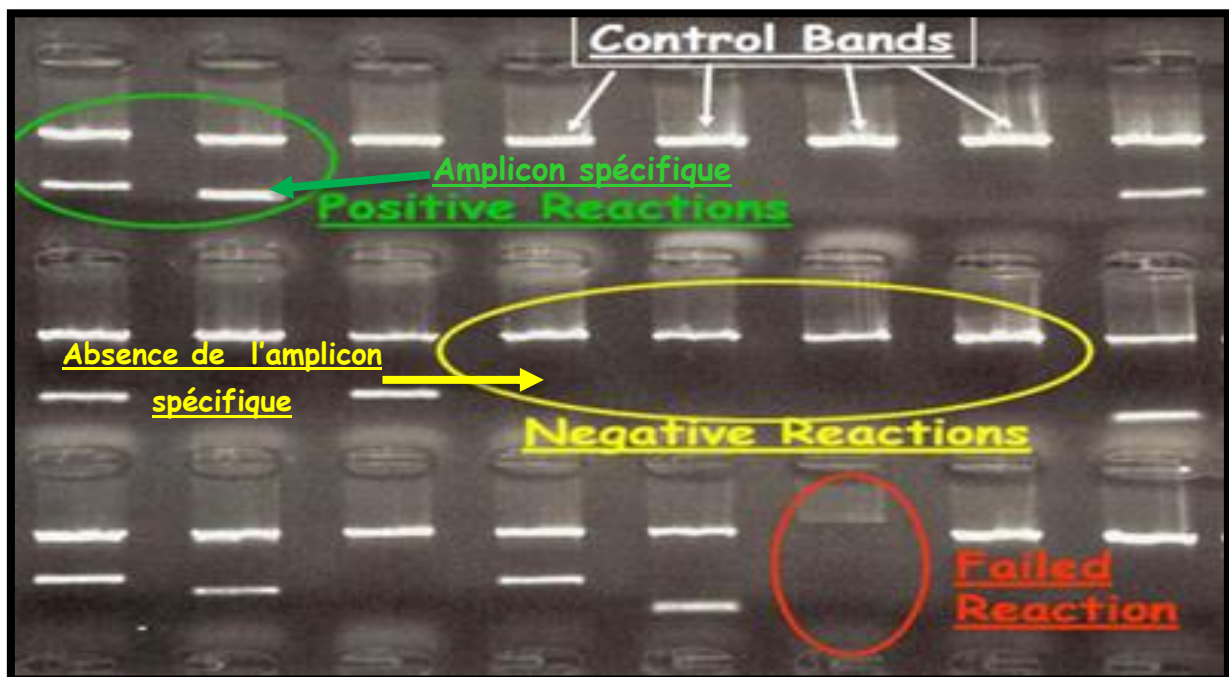


Figure 12 : Réactions positives et négatives.

La figure 18 illustre un exemple de migration d'un échantillon d'ADN pour 2 patients après amplification. Pour les deux patients A et B on note la présence des bandes HLA en position 3,4 et 6 correspondant au typage DQ2, DQ8.

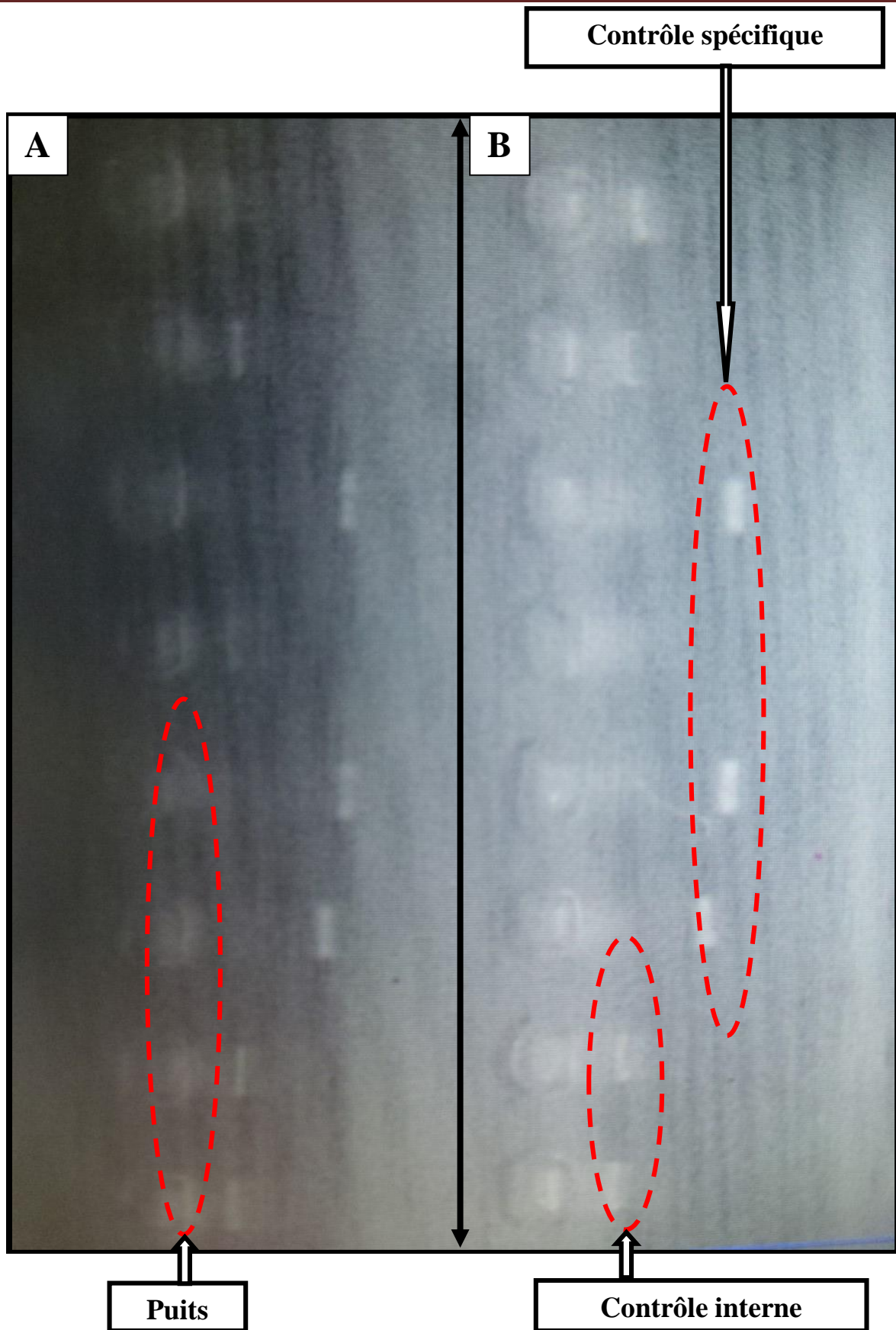


Figure 13 : Électrophorèse sur gel d'agarose pour 2 patients.

II.2.4 Outils et tests statistique

- ✓ Les bases de données sont répertoriées par l'Exel.
- ✓ Les fréquences alléliques des gènes HLA-DQB1 sont déterminées par comptage des sujets en tenant compte des homozygotes qui sont dénombrés deux fois.
- ✓ Les résultats ont été présentés sous forme de graphes et tableaux.
- ✓ La comparaison entre les fréquences alléliques HLA DQB1 des gènes étudiés est faite par le test de χ^2 obtenu par le logiciel COMPARE2, entre les sujets atteints de ScS et les sujets sains,
- ✓ Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs pour les valeurs de p et de $p < 0.05$.

Chapitre III :

Résultats

&

Discussion

III.1 Résultats

En vue de rechercher une association entre les allèles HLA-DQB1 et la susceptibilité de la sclérodémie systémique, nous procédons à la comparaison des fréquences alléliques entre les patients sclérodermiques et les témoins.

III.1.1 Description de la cohorte

Cette étude cas/témoin a été réalisée sur 105 sujets Algériens, des deux sexes et comprenant :

- 55 sujets témoin âgés entre 22 et 69 ans.
- 50 patients présentant une ScS âgés entre 19 et 76 ans.

Les caractéristiques générales de la population malade et témoins sont résumées ci-dessous (Tableau IV) :

Tableau IV : Caractéristiques générales de la population malade et témoins.

Caractéristique	Témoins (N=55)	Patients (N=50)
Age (Moyenne d'âge ± Ecart-type)	48,24 ± 8,64	48,74 ± 13,59
Sexe ratio (%)	1 H : 10 F (0.1)	1 H : 11 F (0.09)
Hommes (%)	5 (9.09 %)	04 (8 %)
Femmes (%)	50 (90.91 %)	46 (92%)

III.1.2 Répartition des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS

Un nombre de 100 allèles HLA-DQB1 présent chez notre population malade s'est réparti comme suit :

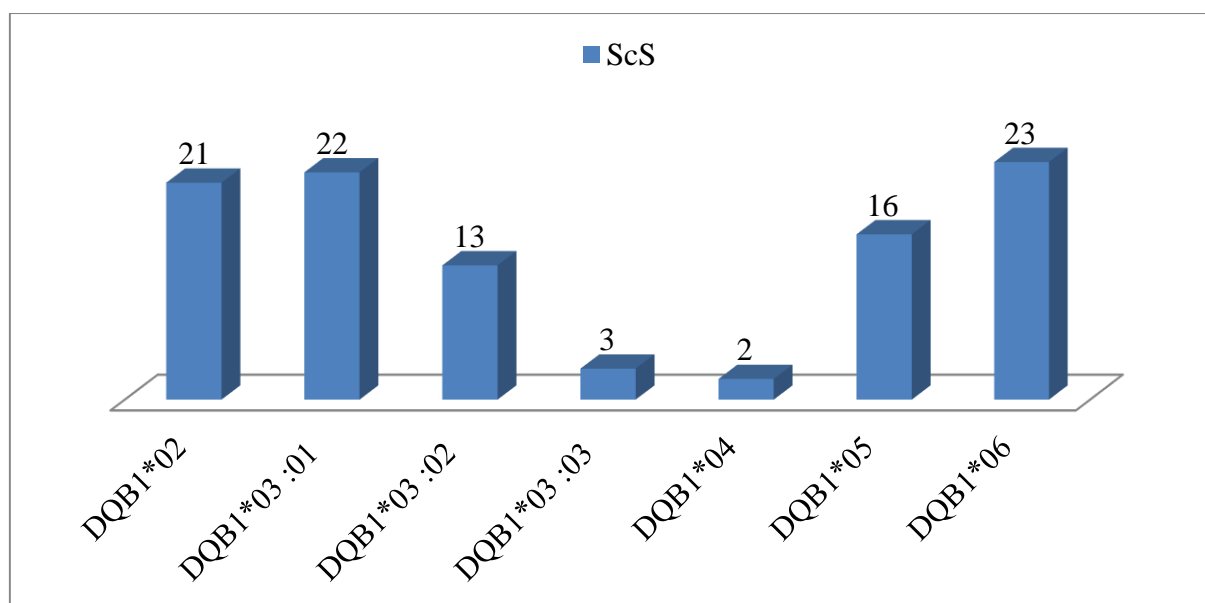


Figure 14 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les patients ScS.

Les allèles HLA-DQB1*06, DQB1*03 :01 (DQ7) et le DQB1*02 étaient les plus fréquents chez les malades ScS avec des pourcentages de 23%, 22% et 21% respectivement (Figure 14).

III.1.3 Répartition des allèles HLA-DQB1 selon le sexe chez les malades ScS

L'analyse de la répartition de ces allèles HLA-DQB1 selon le sexe est illustrée dans le graphique suivant :

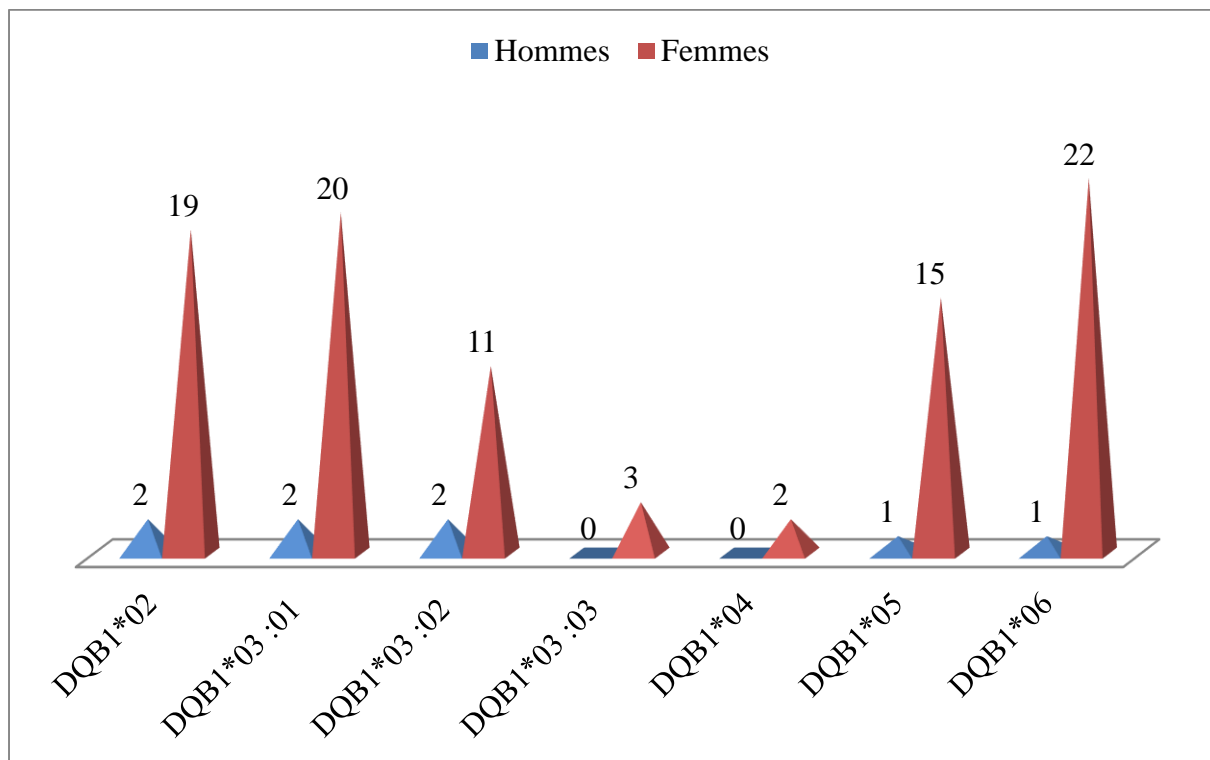


Figure 15 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS.

a) Chez le sexe Féminin :

-Les allèles DQB1*06, DQB1*03 :01 (DQ7), DQB1*02, DQB1*05 et DQB1*03 :02 (DQ8) sont les plus retrouvés selon les fréquences de 22%, 20%, 19%, 15% et 11% respectivement.

-Les allèles DQB1*04 et DQB1*03 :03 (DQ9) sont très faiblement représentés.

b) Chez le sexe Masculin :

-Les deux groupes d'allèles DQB1*05, DQB1*06 et DQB1*02, DQB1*03 :01 (DQ7), DQB1 :03 :02 (DQ8) sont les plus présents avec des fréquences 1% et 2% respectivement.

-Les allèles DQB1*04, DQB1*03 :03 (DQ9) sont totalement absents chez les hommes.

III.1.4 Répartition des allèles HLA-DQB1 par tranche d'âge chez les malades ScS

Par ailleurs, si l'on examine la distribution de ces allèles selon les tranches d'âge, on constate que :

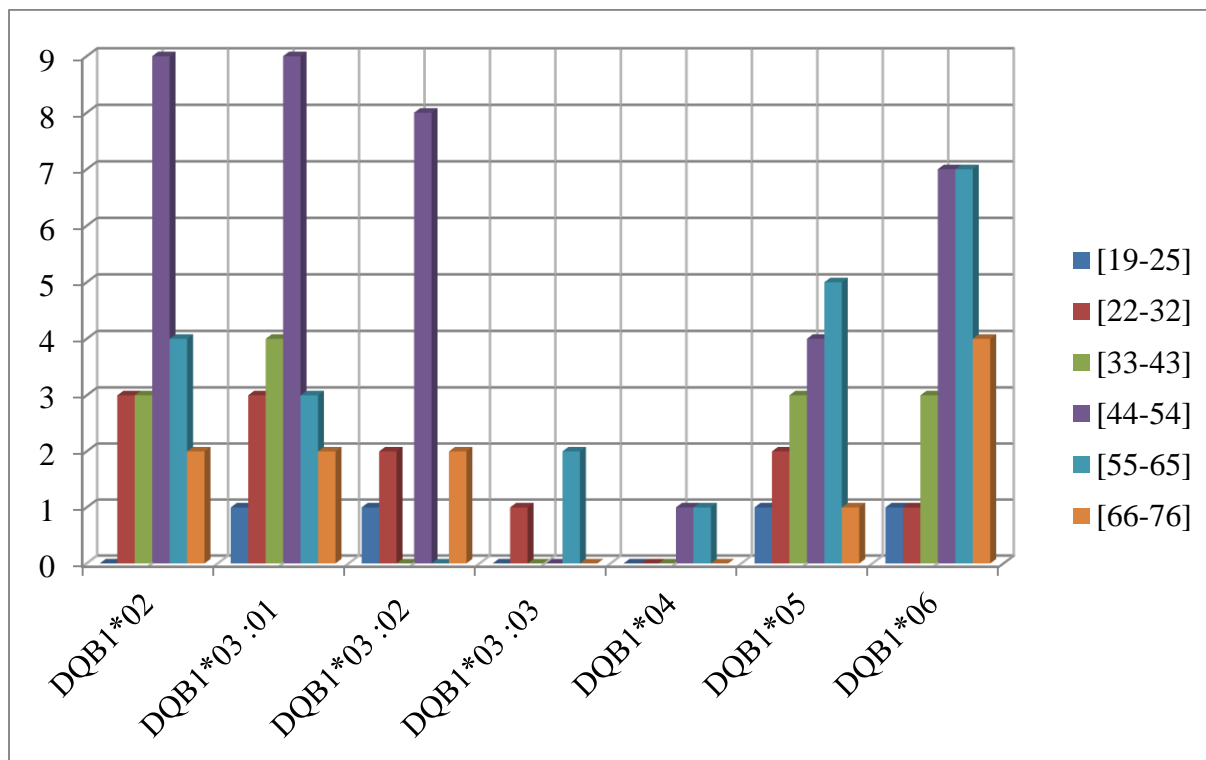


Figure 16 : Répartition des allèles HLA DQB1 par tranche d'âge chez les malades ScS.

-Les allèles DQB1*02, DQB1*03 :01 (DQ7), DQB1*03 :02 (DQ8) et DQB1*06 sont les plus fréquents dans la tranche d'âge allant de 44 jusqu'à 54 ans en comparaison avec les autres tranches d'âge avec des fréquences de 9%, 9%, 8% et 7% respectivement.

-Par contre les allèles DQB1*04, DQB1*05 et DQB1*03 :03 (DQ9) sont faiblement présents quelle que soit la tranche d'âge.

- Le nombre d'allèle HLA-DQB1 est très élevé dans la tranche d'âge de 44-54 ans (Figure 16).

III.1.5 Répartition des allèles HLA-DQB1 selon les tranches d'âge et le sexe des patients ScS

Le graphique suivant illustre la distribution des allèles HLA-DQB1, par classes d'âge et sexe des patients :

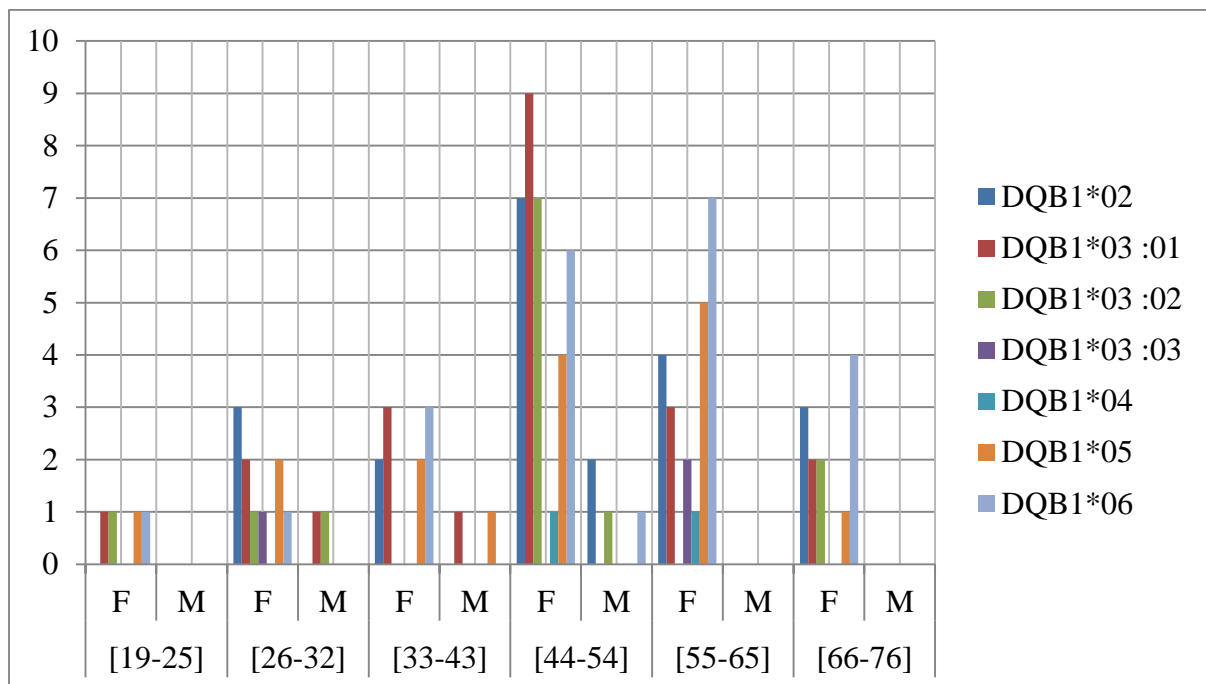


Figure 17 : Répartition des allèles HLA-DQB1 selon le sexe et les tranches d'âge des patients ScS.

Le sexe féminin était dominant dans toutes les tranches d'âge sans exception.

III.1.6 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des malades ScS avec ceux des témoins

L'objectif principal de notre étude a été de comparer la distribution des fréquences des allèles HLA-DQB1 entre les malades ScS et les témoins.

Un total de sept allèles DQB1 a été retrouvé dans la cohorte. La fréquence de chaque allèle chez les patients ScS et les témoins sains est indiquée dans le graphique suivant :

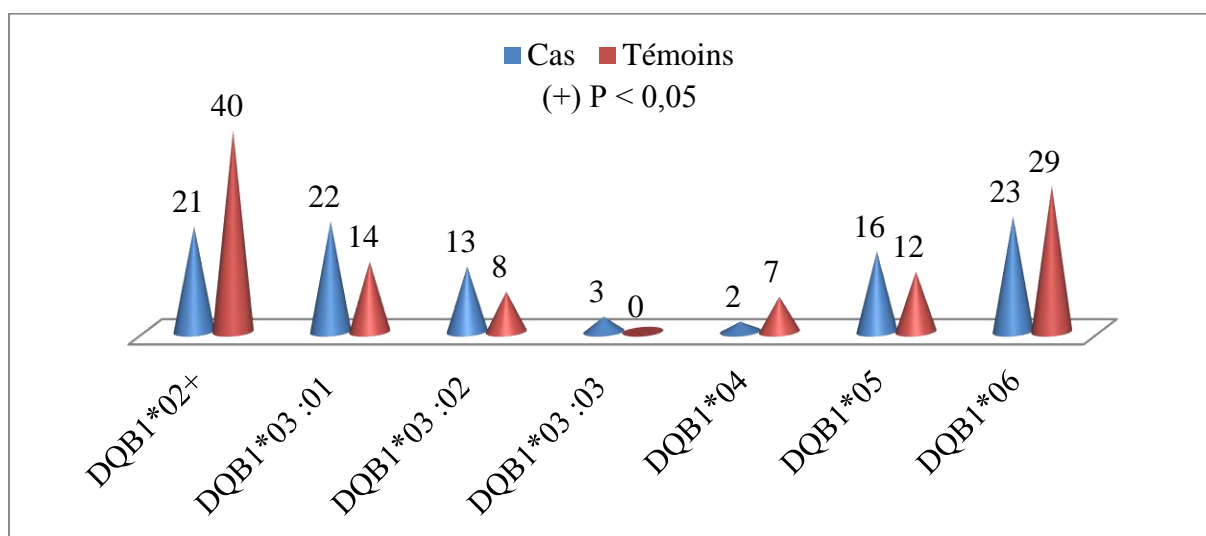


Figure 18 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS et les témoins.

L'analyse des allèles HLA-DQB1 montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DQB1*02 chez les témoins par rapport aux malades avec une différence significative selon les valeurs respectives : (36% versus 21%, OR= 0,47, p= 0,015). L'allèle DQB1*03 :03 (DQ9) n'a été observé que chez les patients ScS (Figure 18).

III.1.7 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon le sexe

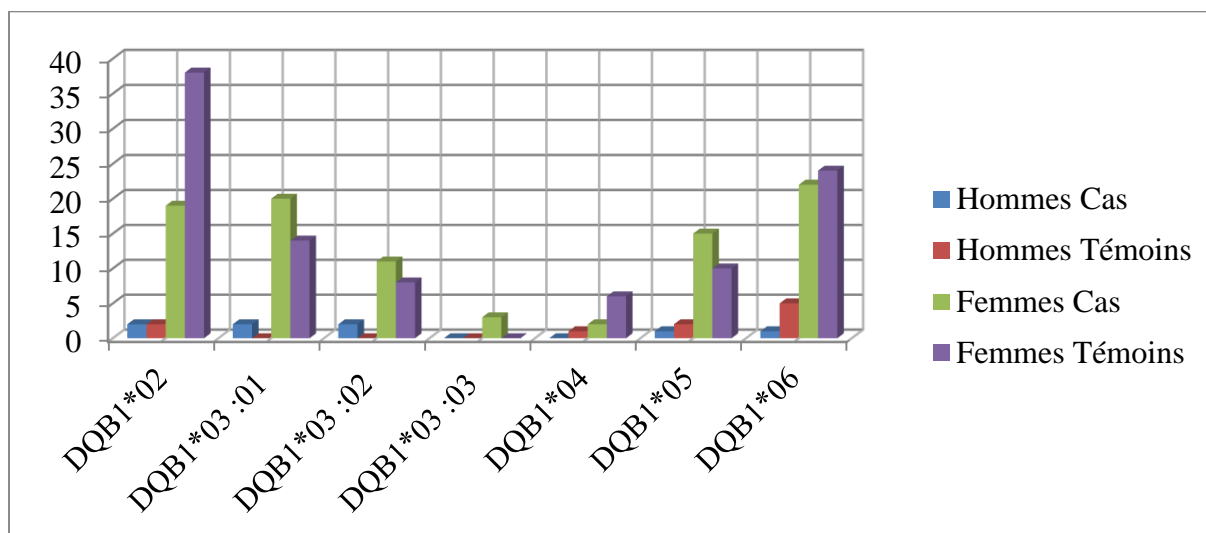


Figure 19 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS et les témoins.

La comparaison des fréquences alléliques HLA-DQB1 chez les hommes n'a pas révélé de différence statistiquement significative entre les hommes malades et les hommes témoins sains ; Cependant l'analyse allélique chez les femmes montre une fréquence élevée de l'allèle DQB1*02 chez les femmes témoins par rapport aux femmes malades avec une différence significative (34% versus 19%, OR=0,44, p=0,013, IC : [0.22-0.87]) (Figure 19).

III.1.8 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge

L'analyse allélique de la distribution des allèles HLA-DQB1 des cas avec ceux des témoins selon les tranches d'âge montre une fréquence élevée de l'allèle HLA-DQB1*02 chez les témoins par rapport aux malades avec une différence significative (19% versus 9%, OR=0,42, p=0,048) dans la tranche d'âge 44-54. Cependant dans la tranche d'âge 55-65 ans, l'allèle HLA-DQB1*05 a une fréquence élevée chez les malades par rapport aux témoins avec une différence significative (p=0,023) (Figure 20).

L'allèle HLA-DQB1*06 est à la limite de la significativité entre les ScS et les témoins dans la tranche d'âge 66-76 ans (p=0,05).

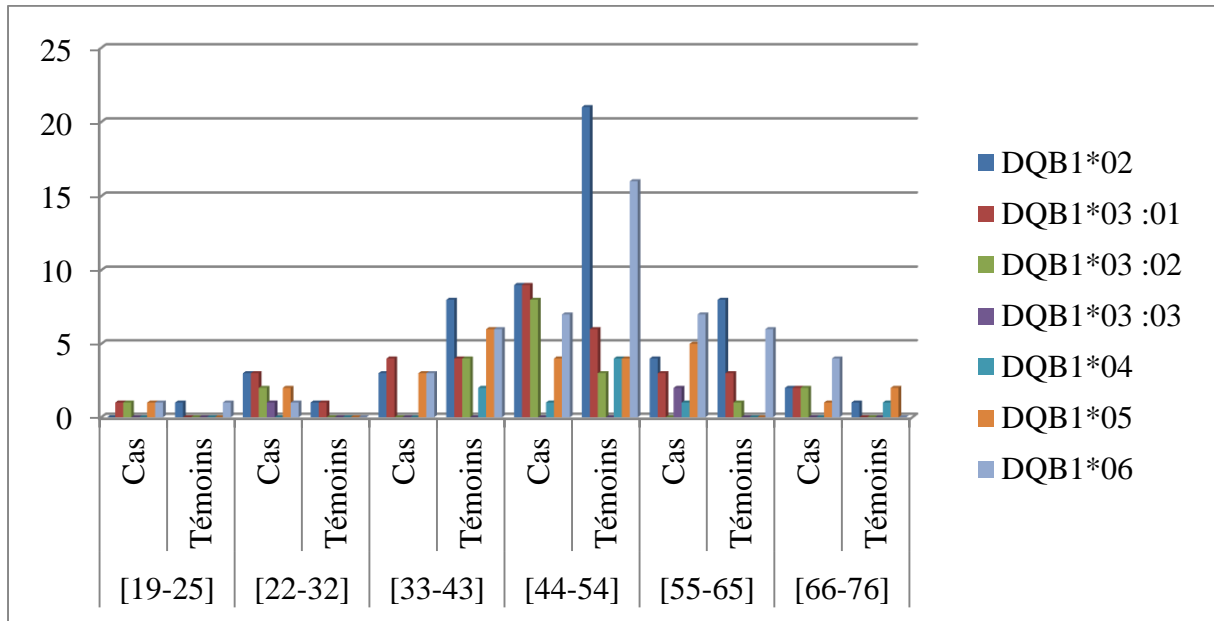


Figure 20: Répartition des allèles HLA DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge.

III.1.9 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patients ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les hommes

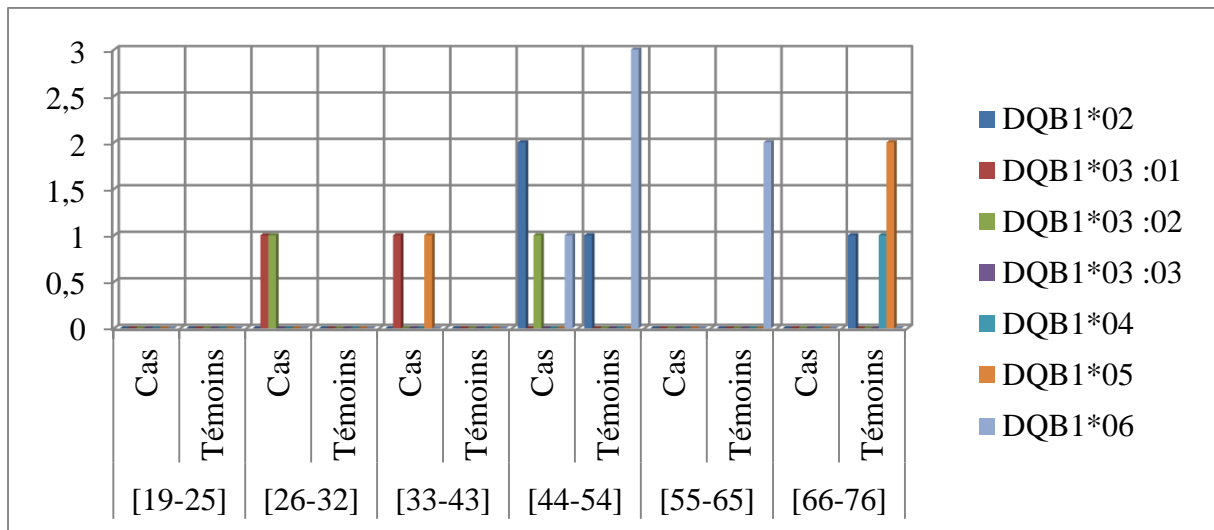


Figure 21 : Répartition des allèles HLA DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les hommes.

L'analyse allélique de la distribution des allèles HLA-DQB1 selon les tranches d'âge chez les hommes ne montre aucune différence significative entre les hommes malades et les hommes témoins sains (Figure 21).

III.1.10 Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des patientes ScS avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les femmes

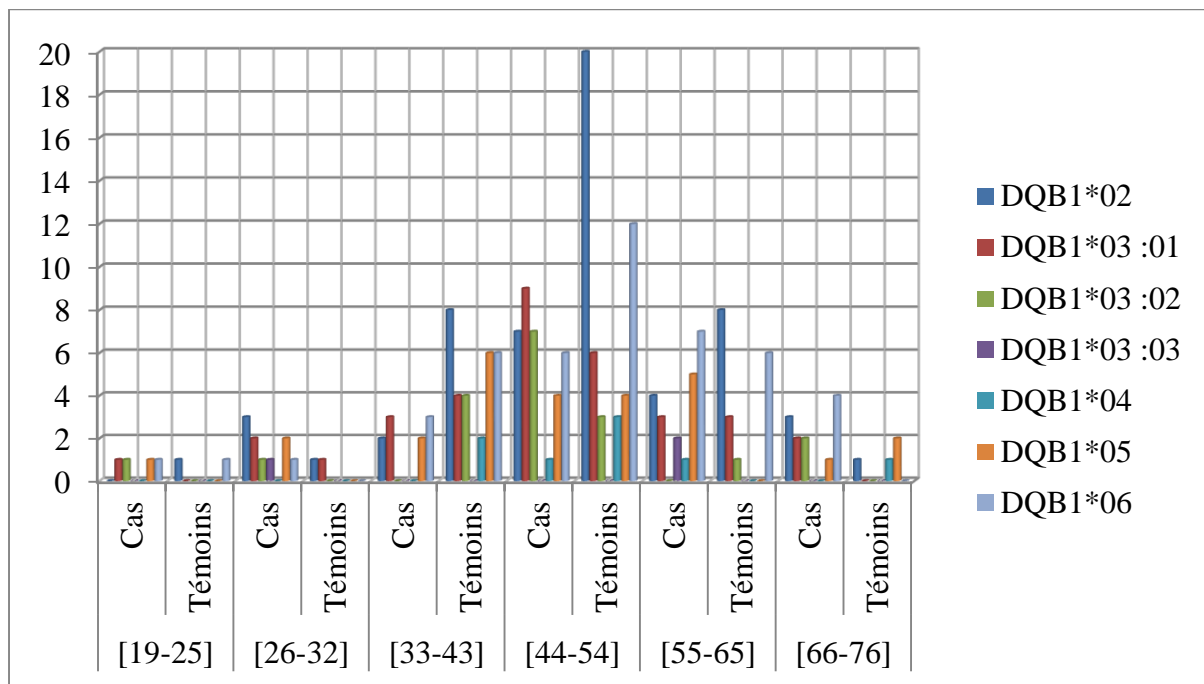


Figure 22 : Répartition des allèles HLA-DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge et le sexe chez les femmes.

L'exploration des allèles HLA-DQB1 a montré une augmentation significative de la fréquence de l'allèle HLA-DQB1*02 chez les femmes témoins par rapport aux patientes (20% versus 8%, OR=0,33, p=0,021) dans la tranche d'âge 44-54 ans. Cependant, la fréquence de l'allèle HLA-DQB1*05 est plus élevée chez les femmes malades par rapport aux femmes témoins avec une différence significative (5% versus 0%, OR= Infini, p= 0,024) dans la tranche d'âge allant de 55 jusqu'à 65 ans. L'allèle DQB1*03 :03 (DQ9) n'a été observée que chez les patientes ScS (Figure 22).

L'allèle HLA-DQB1*06 est à la limite de la significativité entre les femmes ScS et les femmes témoins dans la tranche d'âge 66-76 ans (p=0,05).

III.2 Discussion

Dans notre étude cas/témoins, nous avons pris un échantillon de 55 témoins sains et 50 patients ayant une Sclérodémie systémique. Il est nécessaire de faire remarquer qu'il existe, au vu des résultats, une différence notable dans les proportions selon le sexe des patients, qui se caractérise par une proportion plus élevée des femmes (92%) par rapport aux hommes dont la proportion touchée ne représente que 8%. Nous constatons aussi que ces résultats sont très proches des fréquences Espagnole (Simeón *et al*, 2009), Sud-Africaines (Tikly *et al*, 2004), Mexicaine (Rodriguez-Reyna *et al*, 2015), et Grecque (Vlachoyiannopoulos *et al*, 2000).

D'un autre côté, notre étude a pu pratiquement démontrer que la répartition des allèles HLA-DQB1 est en fonction des tranches d'âge. En effet, il a été noté que la plupart des malades se regroupaient dans la tranche d'âge allant de 44 jusqu'à 54 ans soit 38% (La moyenne d'âge de nos patients est de 48,74 ans). Cette tranche d'âge est la plus touchée par la ScS même dans d'autres populations notamment : les Français Caucasiens (49.3 ans), les Français (52.5 ans) (Azzouz *et al*, 2012) et les Mexicains (45 ans) (Rodriguez-Reyna *et al*, 2015). Cependant, une moyenne d'âge plus élevée a été décrite chez les Japonais (58.4 ans) (Furukawa *et al*, 2016).

Nos résultats ont montré que seuls deux allèles HLA-DQB1 présentent une distribution significative dans notre population : Les allèles HLA-DQB1*02 et HLA-DQB1*05.

L'allèle HLA-DQB1*02 est significativement diminué chez les malades par rapport aux témoins (21% versus 36%, OR=2.13, p=0,015), donc les témoins sont 2.13 fois plus protégés de la maladie quand ils sont porteurs de l'allèle. Ceci vient conforter le statut protecteur de cet allèle vis-à-vis de la ScS. Cette protection a été également rapportée dans d'autres populations : chez les Américains Caucasiens, Hispaniques Américains, les Afro-Américains (Zhou *et al*, 2013), et les Européens (Furukawa *et al*, 2016).

On peut noter aussi que l'allèle HLA-DQB1*02 est statiquement plus élevé seulement chez les femmes témoins par rapport aux femmes malades entre les quatrième et cinquième décades de la vie, soit 34% contrairement aux hommes dont la répartition n'était pas en fonction des tranches d'âges.

Ce même allèle a été rapporté associé avec la ScS dans les populations : Sud-Africaine (Tikly *et al*, 2004), Américaine et Européenne (Simeón *et al*, 2009). Il a également été rapporté comme étant associé à d'autres maladies auto-immunes telles que la Polyarthrite Rhumatoïde (Atouf *et al*, 2008) et le diabète de type I (Mosaad *et al*, 2012).

D'après ces résultats, notre étude suggère que l'allèle HLA-DQB1*02 est un facteur de protection important de la survenue de la ScS et spécifiquement chez les femmes.

La comparaison globale des allèles HLA-DQB1 entre les témoins et les malades ScS n'a pas permis de mettre en évidence l'association de l'allèle HLA-DQB1*05 avec la maladie. Par contre, la comparaison selon le sexe et les tranches d'âge a permis de mettre en évidence une association de cet allèle avec la survenue de la maladie chez les femmes ScS contrairement aux témoins (5% versus 0%, p= 0,024), et plus précisément dans la tranche d'âge allant de 55

jusqu'à 65 ans. Plusieurs études ont également rapporté une association de cet allèle avec la ScS chez les populations : Caucasiennne Américaine, Espagnole, Hispanique, Afro-Américaine, Chinoise (Zhou *et al*, 2013) et Japonaise (Furukawa *et al*, 2016) .

L'allèle HLA-DQB1*06 est à la limite de la significativité entre les ScS et les témoins dans la tranche d'âge 66-76 ans (4% versus 0%, $p=0,05$). Cependant quelques populations ont rapporté une association de cet allèle avec la ScS, c'est le cas chez : les Japonais (Simeón *et al*, 2009), et les Chinois (zhou *et al*, 2013). Par ailleurs, un effet protecteur de cet allèle a été rapporté dans d'autres études européennes (Arnett *et al*, 2010) et japonaise (Furukawa *et al*, 2016). Une augmentation de l'effectif de notre série serait souhaitable afin d'obtenir une différence plus significative.

Par ailleurs, nous avons observé une absence de significativité statistique pour certains allèles qui ont été rapportés comme étant associés avec la maladies dans diverses populations, tels que l'allèle HLA-DQB1*03 :01 (DQ7) chez les caucasiens, hispaniques ,afro-américains (Arnett *et al*, 2010) et chez les Sud-Africains (Tikly *et al*, 2004) ainsi que l'allèle HLA-DQB1*04 chez les Mexicains (Rodriguez-Reyna *et al*, 2015), les Japonais (Furukawa *et al*, 2016). En revanche, ces allèles ont été rapportés comme protecteurs vis-à-vis de la maladie dans d'autres études, tel que l'allèle HLA-DQB1*03 :01 (DQ7) chez les Japonais (Furukawa *et al*, 2016).

Très peu d'études ont été réalisées en Afrique du Nord sur l'association entre les allèles HLA-DQB1 et la ScS. Ceci explique l'absence de la comparaison de nos résultats avec ceux des autres populations maghrébines.

La comparaison de nos résultats obtenus avec la population témoin avec ceux des pays suivants : Japon, Caucase, Chine et la Grèce est représentée dans le tableau suivant :

Tableau V : Comparaison des fréquences HLA-DQB1 de notre population avec ceux des autres pays.

Populations Fréquence allèle HLA-DQB1	CHU de Béni Messous Témoins (n=110)	Japonaise (Furukawa <i>et al</i> , 2016) Témoins (n=413)	Caucasienne (Arnett <i>et al</i> , 2010) Témoins (n= 1000)	Chinoise (zhou <i>et al</i> , 2013) Témoins (n=239)	Grecque (Vlachoyiannopoulos <i>et al</i> , 2000) Témoins (n=130)
HLA-DQB1*02	36%	0,7%	10,3%	5%	12%
HLA-DQB1*03 :01 (DQ7)	13%	23,2%	16,8%	23%	33%
HLA-DQB1*03 :02 (DQ8)	7%	20,1%	/	/	8%
HLA-DQB1*03 :03 (DQ9)	/	/	/	/	/
HLA-DQB1*04	6%	7%	/	3.3%	1%
HLA-DQB1*05	11%	10,7%	/	3.3%	4%
HLA-DQB1*06	26%	12,1%	14,6%	7,1%	4%

Nous remarquons la prédominance de l'allèle DQB1*02 dans notre population contrairement aux populations témoins asiatiques et européennes dans lesquelles l'allèle DQB1*03 :01 (DQ7) prédomine. Par ailleurs, conformément aux résultats de notre étude, l'allèle HLA-DQB1*03:03 (DQ9) était absent chez toutes ces populations sans exception.

La distribution des allèles HLA-DQB1 dans la ScS algérienne semblerait largement différente des autres populations ethniques. Cependant, nous remarquons des similitudes dans la répartition des fréquences entre quelques populations, notamment asiatiques. Ceci pourrait être expliqué par l'emplacement géographique et le partage d'un patrimoine génétique. Il serait donc intéressant de mettre en évidence une empreinte génétique HLA commune, chez les patients sclérodermiques du bassin méditerranéen, et plus particulièrement maghrébins.

Conclusion

Conclusion

La ScS est une maladie multifactorielle dont la composante génétique fait l'objet de nombreuses études, il s'agit d'une maladie multigénétique pour laquelle on connaît plusieurs gènes de susceptibilités.

Notre travail a permis d'étudier l'association du gène HLA-DQB1 avec la Sclérodermie systémique (ScS).

Depuis l'avènement de la technique de PCR, la diversité génétique a été étudiée au niveau de l'ADN génomique par des techniques de la biologie moléculaire, nous avons choisi la PCR-SSP (Séquence Spécifique Primer) comme un outil d'étude.

Nous avons fait une étude cas/témoins et nous avons comparé les fréquences alléliques de 50 malades avec 55 témoins sains dans le but de trouver une association entre les allèles HLA-DQB1 et la ScS. Nos résultats confirment le rôle majeur du gène HLA-DQB1 dans la survenue de la maladie avec une prédominance de l'allèle HLA-DQB1*05 dans notre population. Par ailleurs, nous avons constaté que l'allèle HLA-DQB1*02 avait un effet protecteur vis-à-vis de la maladie.

La ScS peut survenir à tout âge, toutefois, chez notre population le pic d'incidence s'est situé à la quatrième décennie avec une prédominance féminine nette, rapportée dans toutes les séries.

Il serait intéressant de réaliser une étude de corrélation entre les allèles HLA-DQB1 et la ScS sur une plus large série, afin de confirmer nos résultats. Ceci serait d'un grand apport pour la prise en charge de la ScS.

L'étude de l'implication d'autres gènes non-HLA dans le déclenchement et/ou le développement de la ScS aurait une contribution considérable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette affection.

Il existe des perspectives thérapeutiques encourageantes pour traiter la ScS du fait d'une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie ainsi que l'avènement des immunothérapies et des thérapies ciblées, et ce grâce à une action sur les différentes composantes de la maladie : vasculaire, inflammatoire et auto-immune.

Annexes

Annexe I

Fiche de renseignements des patients atteints de ScS

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Sclérodémie systémique (ScS)

Nom : _____ Prénom : _____ Sexe : _____ Origine : _____
 Date de naissance : _____ Date de prélèvement : _____ Hôpital/Service : _____

Signes cliniques initiaux

Année d'apparition :

Phénomène de Raynaud : Oui Non Si non :

Signes cutanéomuqueux Préciser :

Manifestations articulaires : Arthralgies Raideur Arthrites

Signes d'atteinte pulmonaire Préciser :

Signes d'atteinte digestive Préciser :

Autres Préciser :

Antécédents familiaux

Sclérodémie systémique Autres :

Antécédents personnels

Grossesses Nombre : Pertes fœtales : Oui Non Nombre :

Autres :

Forme clinique de la maladie et durée d'évolution

ScS cutanée limitée ScS cutanée diffuse ScS limitée

Année d'apparition du 1^{er} signe clinique Année du diagnostic

Association à d'autres maladies

Syndrome de Gougerot-Sjögren Cirrhose biliaire primitive PR

Thyroïdite autoimmune Polymyosite LES SAPL

Autres maladies :

Atteintes cutanéomuqueuses

Sclérose cutanée Score de Rodnan :

Nez effilé Microstomie Effacement des rides frontaux Calcinose Dyschromie

Syndrome sec : Xérostomie Xérophtalmie BGSA :

Atteintes vasculaires

Phénomène de Raynaud Année d'apparition :

Ulcérations digitales Cicatrices Nécroses digitales Auto-amputations

Télangiectasies Acro-ostéolyse Thromboses veineuses artérielles

Capillaroscopie :

Atteintes pulmonaires

Dyspnée Stade NYHA Toux sèche Râles crépitants

Pneumopathie interstitielle Si oui : aspect en TDM : Rayon de miel Verre dépoli

EFR : Normale Syndrome restrictif CVF =

HTAP PAPs =mmHg

Fiche de renseignements des patients atteints de ScS (suite)

Atteintes digestives

Dysphagie Si oui : liquides solides Pyrosis RGO Ballonnements

Diarrhée Constipation Autres :

Conclusions des explorations (Manométrie, FOGD, TOGD) :

- Atteinte œsophagienne préciser :

- Atteinte gastrique préciser :

- Atteinte intestinale préciser :

- Autres préciser :

Atteintes articulaires

Arthralgies Raideur Arthrites Si oui : Erosion Ténosynovite

Déformation préciser :

Atteintes cardiaques

Oui Non préciser :

Atteinte rénale

Crise rénale aiguë Protéinurie > 0,5 g/24h Insuffisance rénale HTA

Atteinte musculaire

Myasthénie Myalgies EMG :

Autres signes cliniques

.....

Bilan biologique

1. Autoimmunité

AAN : Négatif Positif Aspect :

Ac anti-dsDNA titre : UI/ml Ac anti-centromère

Ac anti-Ag solubles : Cibles : SSA SSB Sm Sm/RNP Scl70 Jo-1

Autres autoanticorps :

FR (technique :) Ac anti-CCP

Ac anti-cardiolipines (IgG IgM) Ac anti-β₂GP₁ (IgG IgM)

LKS ANCA Anti-TPO Anti-TG

2. Autres :

VS CRP IgG IgM IgA C₃ C₄ CH₅₀

GR GB PLT Hb

Urée Créa Protéinurie de 24h

ASAT ALAT γGT PAL

CPK Aldolases LDH

TSH FT₃ FT₄

Traitement

.....

Annexe II

Tableau 01: Séquence des amorces desséchées utilisées en PCR-SSP pour l'étude des allèles HLA DQB1.

PRIMERMIX	5' PRIMER	3'PRIMER
1 (H1)	GGG Exon2, 77	GGT Exon 2,260
2 (G1)	TTA Exon 2, 77 TCT Exon 2, 77	ACG Exon 2,257 ACC Exon2, 257
3 (F1)	AAG Exon 2, 89	GCT Exon 2, 257
4 (E1)	TCT Exon 2, 77 ACC Exon 2,63	GGC Exon 2, 169
5 (D1)	TTA Exon 2, 77	GCG Exon 2, 164
6 (C1)	TCT Exon2, 77 ACC Exon 2, 63	GCG Exon 2, 164
7 (B1)	TGA Exon 2, 170	GCT Exon 2, 257
8 (A1)	ACC Exon 2, 63	CTA Exon 2, 186

Tableau 02: les différentes cibles des gènes HLA-DQB1.

1/1H DQ5 220pb	2/1G DQ6 220pb	3/1F DQ2 210pb	4/1E DQ2 130pb DQ3(8) 140pb	5/1D DQ3(7) 130pb	6/1C DQ3 (8,9) 130pb 140pb	7/1B DQ3 (7,9) 120pb	8/1A DQ4 160pb
DQB1*05:01 DQB1*05:02 DQB1*05:03 DQB1*05:04 (DQ5)	DQB1*06 :01 DQB1*06 :02 DQB1*06 :03 DQB1*06 :04 DQB1*06 :05 DQB1*06 :08 DQB1*06 :09 (DQ6)	DQB1*02 :01 DQB1*02 :02 (DQ2)	DQB1*02 :01 DQB1*02 :02 (DQ2) DQB1*03 :02 (DQ8)	DQB1*03 :01 (DQ7)	DQB1*03 :02 (DQ8) DQB1*03 :05 DQB1*03 :03 (DQ9)	DQB1*03 :01 (DQ7) DQB1*03 :03 (DQ9)	DQB1*04 :01 DQB1*04 :02 (DQ4)

Annexe III

Répartition des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS

Tableau 01 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les patients ScS.

Allèles	ScS	
	Effectifs	Pourcentages
DQB1*02	21	21%
DQB1*03 :01 (DQ7)	22	22%
DQB1*03 :02 (DQ8)	13	13%
DQB1*03 :03 (DQ9)	3	3%
DQB1*04	2	2%
DQB1*05	16	16%
DQB1*06	23	23%
Total	100	100%

Tableau 02 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS.

(Eff : Effectifs ; % : Pourcentage).

	Femmes		Hommes		TOTAL	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%
DQB1*02	19	19%	2	2%	21	21%
DQB1*03 :01 (DQ7)	20	20%	2	2%	22	22%
DQB1*03 :02 (DQ8)	11	11%	2	2%	13	13%
DQB1*03 :03 (DQ9)	3	3%	0	0%	3	3%
DQB1*04	2	2%	0	0%	2	2%
DQB1*05	15	15%	1	1%	16	16%
DQB1*06	22	22%	1	1%	23	23%
TOTAL	92	92%	8	8%	100	100%

Tableau 03 : Répartition des allèles HLA-DQB1 par tranche d'âge chez les malades ScS.

Tranche d'âge	[19-25]		[22-32]		[33-43]		[44-54]		[55-65]		[66-76]		Total	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%
DQB1*02	0	0%	3	3%	3	3%	9	9%	4	4%	2	2%	21	21%
DQB1*03 :01 (DQ7)	1	1%	3	3%	4	4%	9	9%	3	3%	2	2%	22	22%
DQB1*03 :02 (DQ8)	1	1%	2	2%	0	0%	8	8%	0	0%	2	2%	13	13%
DQB1*03 :03 (DQ9)	0	0%	1	1%	0	0%	0	0%	2	2%	0	0%	3	3%
DQB1*04	0	0%	0	0%	0	0%	1	1%	1	1%	0	0%	2	2%
DQB1*05	1	1%	2	2%	3	3%	4	4%	5	5%	1	1%	16	16%
DQB1*06	1	1%	1	1%	3	3%	7	7%	7	7%	4	4%	23	23%
Total	4	4%	12	12%	13	13%	38	38%	22	22%	11	11%	100	100%

Tableau 04 : Répartition des allèles HLA-DQB1 selon le sexe et les tranches d'âge des patients.

(F : Femelle ; M : Male)

Classe d'âge	[19-25]		[26-32]		[33-43]		[44-54]		[55-65]		[66-76]		TOTAL	
	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)	F (%)	M (%)
DQB1*02	0 (0)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	7 (7)	2 (2)	4 (4)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	19 (19)	2 (2)
DQB1*03 :01 (DQ7)	1 (1)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	3 (3)	1 (1)	9 (9)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	20 (20)	2 (2)
DQB1*03 :02 (DQ8)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	7 (7)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	11 (11)	2 (2)
DQB1*03 :03 (DQ9)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3)	0 (0)
DQB1*04	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
DQB1*05	1 (1)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	4 (4)	0 (0)	5 (5)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	15 (15)	1 (1)
DQB1*06	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	3 (3)	0 (0)	6 (6)	1 (1)	7 (7)	0 (0)	4 (4)	0 (0)	22 (22)	1 (1)
TOTAL	4 (4)	0 (0)	10 (10)	2 (2)	10 (10)	2 (2)	34 (34)	4 (4)	22 (22)	0 (0)	12 (12)	0 (0)	100 (100)	

Annexe IV :

Comparaison entre les allèles HLA-DQB1 des malades ScS avec ceux des témoins

Tableau 01 : Distribution des allèles HLA-DQB1 chez les malades ScS et les témoins.

(χ^2 :Khi deux ; OR: Odd Ratio ; p: Signification statistique ; IC : Intervalle de confiance ; Eff : Effectifs ; % : Pourcentages).

Allèles DQB1	Cas		Témoins		χ^2	OR	p	IC
	(n=50)		(n=55)					
	Eff	%	Eff	%				
DQB1*02	21	21%	40	36%	0.014	0.47	0.015	[0.24 - 0.90]
DQB1*03 :01 (DQ7)	22	22%	14	13%			ns	
DQB1*03 :02 (DQ8)	13	13%	8	7%			ns	
DQB1*03 :03 (DQ9)	3	3%	0	0%			ns	
DQB1*04	2	2%	7	6%			ns	
DQB1*05	16	16%	12	11%			ns	
DQB1*06	23	23%	29	26%			ns	
TOTAL	100	100%	110	100%				

Tableau 02 : Répartition des allèles HLA DQB1 selon le sexe chez les patients ScS et les témoins.

	Hommes					Femmes					χ^2	OR	P	IC
	Cas		Témoins		p	Cas		Témoins						
	Eff	%	Eff	%		Eff	%	Eff	%					
DQB1*02	2	2%	2	2%	ns	19	19%	38	34%	0.011	0.44	0.013	[0.22-0.87]	
DQB1*03 :01 (DQ7)	2	2%	0	0%	ns	20	20%	14	13%			ns		
DQB1*03 :02 (DQ8)	2	2%	0	0%	ns	11	11%	8	7%			ns		
DQB1*03 :03 (DQ9)	0	0%	0	0%	ns	3	3%	0	0%			ns		
DQB1*04	0	0%	1	1%	ns	2	2%	6	5%			ns		
DQB1*05	1	1%	2	2%	ns	15	15%	10	9%			ns		
DQB1*06	1	1%	5	5%	ns	22	22%	24	22%			ns		

Tableau 03 : Répartition des allèles HLA-DQB1 des cas avec ceux des témoins selon les tranches d'âge.

(C : Cas ; T: Témoins ; OR: Odd Ratio ; p: Signification statistique).

	[19-25]			[22-32]			[33-43]			[44-54]				[55-65]				[66-76]		
	C	T	p	C	T	p	C	T	p	C	T	OR	p	C	T	OR	p	C	T	p
DQB1*02	0	1	ns	3	1	ns	3	8	ns	9	21	0.42	0.048	4	8		ns	2	1	ns
DQB1*03 :01 (DQ7)	1	0	ns	3	1	ns	4	4	ns	9	6		ns	3	3		ns	2	0	ns
DQB1*03 :02 (DQ8)	1	0	ns	2	0	ns	0	4	ns	8	3		ns	0	1		ns	2	0	ns
DQB1*03 :03 (DQ9)	0	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	0	0		ns	2	0		ns	0	0	ns
DQB1*04	0	0	ns	0	0	ns	0	2	ns	1	4		ns	1	0		ns	0	1	ns
DQB1*05	1	0	ns	2	0	ns	3	6	ns	4	4		ns	5	0	infinity	0.023	1	2	ns
DQB1*06	1	1	ns	1	0	ns	3	6	ns	7	16		ns	7	6		ns	4	0	0.050

Tableau 04 : Répartition des allèles HLA DQB1 des patients avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les hommes.

(C : Cas ; T: Témoins ; p: Signification statistique).

	[19-25]			[26-32]			[33-43]			[44-54]			[55-65]			[66-76]		
	C	T	p	C	T	p	C	T	p	C	T	p	C	T	p	C	T	p
DQB1*02	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	2	1	ns	0	0	ns	0	1	ns
DQB1*03 :01 (DQ7)	0	0	ns	1	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns
DQB1*03 :02 (DQ8)	0	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	0	0	ns
DQB1*03 :03 (DQ9)	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns
DQB1*04	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	1	ns
DQB1*05	0	0	ns	0	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	0	2	ns
DQB1*06	0	0	ns	0	0	ns	0	0	ns	1	3	ns	0	2	ns	0	0	ns

Tableau 05 : Répartition des allèles HLA-DQB1 des patientes avec ceux des témoins selon les tranches d'âge chez les femmes.

	[19-25]			[26-32]			[33-43]			[44-54]				[55-65]				[66-76]			
	C	T	p	C	T	p	C	T	p	C	T	OR	p	C	T	OR	p	C	T	p	OR
DQB1*02	0	1	ns	3	1	ns	2	8	ns	7	20	0.33	0.021	4	8		ns	3	1	ns	
DQB1*03 :01 (DQ7)	1	0	ns	2	1	ns	3	4	ns	9	6		ns	3	3		ns	2	0	ns	
DQB1*03 :02 (DQ8)	1	0	ns	1	0	ns	0	4	ns	7	3		ns	0	1		ns	2	0	ns	
DQB1*03 :03 (DQ9)	0	0	ns	1	0	ns	0	0	ns	0	0		ns	2	0		ns	0	0	ns	
DQB1*04	0	0	ns	0	0	ns	0	2	ns	1	3		ns	1	0		ns	0	1	ns	
DQB1*05	1	0	ns	2	0	ns	2	6	ns	4	4		ns	5	0	infinity	0.024	1	2	ns	
DQB1*06	1	1	ns	1	0	ns	3	6	ns	6	12		ns	7	6		ns	4	0	0.051	infinity

Références

Références bibliographiques

A

Abbas Abul K, Lichtman Andrew H. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique ; Traduction de la 3e édition anglaise, Paris : Pierre L. Masson, (2008).

Adams Waldorf KM, Nelson JL. Autoimmune disease during pregnancy and the microchimerism legacy of pregnancy. *Immunol Invest* (2008) 37(5):631–44. doi:10.1080/08820130802205886.

Allanore Yannick. Physiopathologie de la sclérodémie systémique. *médecine/sciences* (2016) ; 32 : 183-91.

Arnett FC .Is scleroderma an autoantibody mediated disease? *Curr Opin Rheumatol*.nov (2006);18(6): 579-81.

Arnett FC, Gourh P, Shete S, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis*. (2010); 69(5):822–827. [PubMed: 19596691].

Atouf O, Benbouazza K, Brick C, Bzami F, Bennani N, Amine B, Hajjaj-Hassouni N, Essakali M. HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. (2008) Oct;75(5):554-8. doi: 10.1016/j.

Avouac J, Fransen J, Walker UA, Riccieri V, Smith V, Muller C, Miniati I, Tarner IH, Randone SB, Cutolo M, Allanore Y, Distler O, Valentini G, Czirjak L, Müller-Ladner U, Furst DE, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, EUSTAR Group. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis*. (2011) Mar; 70(3):476–481. [PubMed: 21081523].

Avouac Jérôme , Kahan André , Allanore Yannick. Sclérodémie systémique : critères diagnostiques et de suivi. *Revue du rhumatisme monographies* 77 (2010) 103–107.

Azzouz D, Rak JM, Fajardy I, Allanore Y, Tiev KP, et al. Comparing HLA shared epitopes in French Caucasian patients with Scleroderma. *PLoS One*. (2012);7(5):e36870. doi: 10.1371/journal.pone.0036870.[PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

B

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Maie fetal progenitor cells persist in maternai blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. (1996); 93: 705-8.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* (2000);342(18):1350-8.

Bolster MB, Silver RS. Clinical features of systemic sclerosis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 5th ed. Philadelphia: Mosby, Elsevier; (2011). p. 1373–86.

Brembilla NC, Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *European cytokine network*. (2012) ;23(4):128-39.

Breuning MH, van den Berg-Loonen EM, Bernini LF, Bijlsma JB, van Loghem E, Meera Khan P, et Nijenhuis LE.. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum Genet* (1977); 37(2):131-139.

C

Carmona FD, Cenit MC, Diaz-Gallo LM, et al. New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. (2013); 72(12):2032–2038. [PubMed: 23444193] .

Cesbron-Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon JD. *Système HLA*. EMC, *Hématologie* (2007), 13-000-M-53.

Chen K, See A and Shumack S. Epidemiology and pathogenesis of scleroderma. *Australasian Journal of Dermatology*. (2003); 44:1-9.

Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis . *Arthritis Rheum*.juin (2002);46(6):1602-13.

Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* (2007);48:11—23.

Chung L, Utz Pj. Antibodies in scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations. *Current rheumatology reports*.(2004);6(2):156-63.

D

Dausset J and Pla M, *HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme*, Flammarion. (1993).

Dooley, B. Gao, N. Bradley, D.J. Abraham, C.M. Black, M. Jacobs, K.R. Bruckdorfer, Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. *Rheumatology (Oxford)* (2006): 45; 676-84.

F

Fautrel B, Aeschlimann A, Bourgeois -Droin C, Bourgeois P. Les sclérodermies. In maladies et syndromes systémiques . Kahn MF, Peltier AP, Meyer O, Piette JC. Médecine – Flammarion – (2001) : 469-521.

Fleischmajer R, Perlsh JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum.* Mai (1977);20(4):975-84.

Francke U, et Pellegrino MA. Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1977) ;74(3):1147-1151.

Fritzler MJ, Kinsella TD. The Crest syndrome: a distinct sérologie entity with anticentromere antibodies. *Am J Med.* (1980); 69: 520-6.

Furukawa H, Oka S, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Matsushita T, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kobayashi K, Osada A, Ihata A, Kondo Y, Nagai T, Setoguchi K, Okamoto A, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Kono H, Katayama M, Hirohata S, Sumida T, Migita K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Nagaoka S, Takehara K, Tohma S, Tsuchiya N. Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01. (2016) Apr 26;11(4):e0154255. doi: 10.1371/journal.pone.0154255.

G

Galindo M, Santiago B, Rivero M, Rullas J, Alcamí J, Pablos JL. Chemokine expression by systemic sclerosis fibroblasts: abnormal regulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression. *Arthritis Rheum* (2001); 44: 1382 -6.

Garabrant DH, Lacey JV Jr, Laing TJ, Gillespie BW, Mayes MD, Cooper BC, et al. Scleroderma and solvent exposure among women. *Am J Epidemiol.* (2003); 157: 493-500.

Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A, et al. Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* Fév (1998); 41(2):327-34.

Gloria Salazar et Maureen D. Mayes . Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* (2015) August ; 41(3): 345–366.

Goldsby R. A, Kindt T. J, and Osborne B. A, *Immunologie : Le cours de Janis Kuby*, Dunod (2000). p.182,

Granel B, Bernard F, Chevillard C. Genetic susceptibility to systemic sclerosis from clinical aspect to genetic factor analyses. *Eur J Intern Med.* (2009); 20(3):242–252. [PubMed: 19393491].

Gulin J, Korn JH. Systemic sclerosis: challenges in diagnosis and management. *J Musculo Med.* (1999); 310: 795.

H

Hamani L, Association des alleles HLA de classe II : DQ et DQ, dans la polyarthrite rhumatoïde, Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biosignalisations Cellulaires et Moléculaires/ Immunologie, Université de SAAD DAHLAB de Blida 1, (2013).

Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol* (1996);106(3):491-7.).

Hoogen F van den, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 Classification criteria for systemic sclerosis:an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative.*Ann Rheum Dis.*11 jan (2013);72(11):1747-55.

<http://www.biorigami.com/?p=6737>

Hudson M, Fritzler MJ. Diagnostic criteria of systemic sclerosis. *Journal of Autoimmunity* .févr (2014);48-49:38-41.

I

Ihn H, Yamane K, Asano Y, Kubo M, Tamaki K. IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathway.*J Immunol.*15 fév (2002),168(4):1895-902.

J

Jancic B. Advances make scleroderma manageable (skin, rénal, GI manifestations). *Skin and Allergy News.* (2002); 33 (3): 4.

Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* (2000); 43: 2230-9.

Jimenez S, Koenig AS. Scleroderma. *eMedicine from WebMD.* (2006): 1-11.

Jin Jingxiao , Chou Yi-Chun, Lima Maria, Zhou Danielle, and Zhou Xiaodong . Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune Regulatory and Inflammatory Genes. *The Open Rheumatology Journal*, (2014), 8, 29-42.

K

Kahan A, Menkes JC. Sclérodémie systémique. *Encycl Méd Chir (Paris-France) Appareil locomoteur*, 14-245-A-10, (1995), 8 p.

Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Setta L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. Aout (2005);64(8):1233-5.

Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* (1998); 110: 47-51.

Kikuchi K, Yamakage A, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Differential modulation of bFGF receptors by TGF-beta in adult skin, scleroderma skin, and newborn foreskin fibroblasts. *J Invest Dermatol* (1992); 99: 201-5.

Kuwana M, Medsger TA, Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase 1 in systemic sclerosis. *J Immunol*. 1 sep (1995);155(5):2703-14.

L

LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*.juill (2001) ;28 (7):1573-6.

Liu S, Parapuram SK, Leask A. Fibrosis caused by loss of PTEN expression in mouse fibroblasts is crucially dependent on CCN2. *Arthritis Rheum* (2013) ; 65 : 2940-4.

Lunardi C, Bason C, Corrocher R and Puccetti A. Induction of endothelial cell damage by hCMV molecular mimicry. *TRENDS in Immunology*. (2005); 26(1).

M

Marangoni RG, Korman BD, Wei J, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheum* (2015) ; 67 : 1062-73.

Marsh SG, Parham P, et Barber LD (eds). *The HLA Facts Book*: Academic Press (2000).

Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, Altman R, D'Angelo W, Fries J et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* (1980);23:581- 90.

Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis Rheum* (2013) ; 65 : 1953-62.

Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, et al. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet*. (2014); 94(1):47–61. [PubMed: 24387989].

McGaha TL, Le M, Kodera T, Stoica C, Zhu J, Paul WE, et al. Molecular mechanisms of interleukin-4 induced up-regulation of type1 collagen gene expression in murine fibroblasts. *Arthritis Rheum.* Aout (2003); 48(8):2275-84.

Mellal Yasmine ‘ Etude des polymorphismes des gènes de la voie Th17 dans la Sclérodémie systémique’ Mémoire de fin de spécialité d’immunologie, Faculté de médecine d’Alger. (2014).

Moalic V, Comment est réalisé un typage HLA? *Réanimation* (2008) 17, 407—411.

Morton CC, Kirsch IR, Nance WE, Evans GA, Korman AJ, et Strominger JL. Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1984); 81(9):2816-2820.

Mosaad YM, Auf FA, Metwally SS, Elsharkawy AA, El-Hawary AK, Hassan RH, Tawhid ZE, El-Chennawi FA.HLA-DQB1* alleles and genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus. (2012) Aug 15;3(8):149-55. doi: 10.4239/wjd.v3.i8.149.

N

Nelson JL. Microchimerism and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* (1999) 1(1):15–21. doi:10.1007/s11926-999-0019-z.

O

Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donorrecipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* (1992);39:225—35.

Ould Barikalla Ahmed ‘Sclérodémie systémique : prévalence et suivi de la pneumopathie interstitielle chronique d’une cohorte de 180 patients’ Mémoire pour l’obtention du diplôme de spécialité en Radiologie, Faculté de Médecine de pharmacie Fes, Juin (2015) .

P

Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol.* mars (1992);166(3):255-63.

R

Rabquer BJ, Hou Y, Del Galdo F, et al. The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatology (Oxford)* (2009) ; 48 : 734-40.

Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* (2010) ;9:A311-8.

Reveille JD, Durban E, MacLeod-St Clair MJ, et al. Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest* (1992); 90: 973-80.

Rodnan GP. Progressive systemic sclerosis : clinical features and pathogenesis of cutaneous involvement (scleroderma). *Clin Rheum Dis.* (1979); 5: 49-79.

Rodriguez-Reyna TS, Mercado-Velázquez P, Yu N, Alosco S, Ohashi M, Lebedeva T, Cruz Lagunas A, Núñez-Álvarez C, Cabiedes-Contreras J, Vargas-Alarcón G, Granados J, Zúñiga J, Yunis E. HLA Class I and II Blocks Are Associated to Susceptibility, Clinical Subtypes and Autoantibodies in Mexican Systemic Sclerosis (SSc) Patients. *PLoS One.* (2015) May 20;10(5):e0126727. doi: 10.1371/journal.pone.0126727.

S

Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* juin (2004) ;50(6):1721-33.

Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol* (1991) ;30:190—201.

Simeón CP, Fonollosa V, Tolosa C, et al. Association of HLA class II genes with systemic sclerosis in Spanish patients. *J Rheumatol.* (2009); 36:2733–36. [PubMed: 19884273].

Skarmoutsou E , D'Amico F, Marchini M, et al. Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett.* (2013); 152(2):109–113. [PubMed: 23707908].

T

Terasaki Pi, Mac Clelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* (1964);204:998—1000.

Tikly M, Rands A, McHugh N, Wordsworth P, Welsh K. Human leukocyte antigen class II associations with systemic sclerosis in South Africans. *Tissue Antigens.* (2004); 63:487–90 [PubMed: 15104683].

V

Varga J, Denton CP, Wigley FM, Allanore Y, Kuwana M,editeurs. *Scleroderma from pathogenesis to comprehensive management.* 2nd ed. Boston: Springer US; (2017).

Varga J. In: Denton CP, Wigley FM, editors. *Scleroderma from pathogenesis to comprehensive management.* 1st ed. Boston: Springer US; (2012).

Vlachoyiannopoulos PG, Dafni UG, Pakas I, et al. Systemic scleroderma in Greece: low mortality and strong linkage with HLA-DRB1*1104 allele. *Ann Rheum Dis.* (2000);59:359–67. [PMC free article][PubMed]

W

www.anthonynolan.org

Wynn TA. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature reviews Immunology.* Aout (2004) ;4(8) :583-94.

Z

Zhou XD, Yi L, Guo XJ, Chen E, Zou HJ, Jin L, et al. Association of HLA-DQB1*0501 with scleroderma and its clinical features in Chinese population. *Int J Immunopathol Pharmacol.* (2013); 26: 747–751. PMID: 24067471