



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

**Option:** Génétique et Physiologie

**Thème:**

# Les gènes de susceptibilités HLA-B classe I dans la Spondylarthrite Ankylosante

**Présenté par :**

**Zoubiri Karima**

Soutenu le 03/07/2014 devant le jury composé de :

<b>Mme Rouaki F.</b>	Maitre Assistante A (USDB)	Présidente
<b>Mme Aissani R.</b>	Maitre Assistant A (USDB)	Examinatrice
<b>Mme Guessaibia N.</b>	Maitre Conférence B (USDB)	Examinatrice
<b>Mr Smara M.</b>	Assistant (HCA)	Promoteur
<b>Mr Benyahia N.</b>	Maitre Assistant A (USDB)	Co-promoteur
<b>Pr Chaib S.</b>	Professeur (HCA)	Invitée

**Promotion : 2013/2014**

**Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir donné le courage et la patience afin de réaliser ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Professeur Chaib S. chef de service d'immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA) de m'avoir accueillie au sein de son service, pour ses précieux conseils et connaissances, ses encouragements ainsi que pour sa gentillesse.

Mes remerciements à mon encadreur Dr Smara M. pour son aide, le partage de ses connaissances ainsi que pour sa disponibilité en tous moments.

Je remercie également mon co-promoteur Mr Benyahia N. pour sa sympathie, sa disponibilité ainsi que pour ses idées et conseils.

J'adresse aussi ma gratitude aux membres du jury Mme Rouaki F, Mme Aissani R et Mme Guessaibia N pour l'honneur qu'elles m'ont fait en évaluant mon travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mr Mohamed.S responsable du Master Génétique et physiologie du département de Biologie à l'université Saad Dahleb de Blida qui m'a permis d'acquérir les connaissances nécessaires à travers sa formation complète afin d'entreprendre mon travail de fin d'étude.

Je remercie tout le personnel du laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA) pour leur gentillesse, disponibilité et l'amabilité qu'ils ont manifesté à mon égard.

Enfin, je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## **Dédicace**

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères et qui comptent le plus dans ma vie, je cite respectueusement :

Mon papa « mon exemple éternel » pour son amour, sa confiance, ses précieuses aides et ses encouragements ce qui m'a permis de mener à terme ces années d'étude, que dieu te préserve.

Mon adorable maman la lumière de mes jours, pour sa tendresse, ses encouragements, sa compréhension et surtout pour sa grande patience durant mes mauvaises humeurs, que dieu te protège et te préserve.

Ma précieuse sœur Mounia et mes adorables frères Nassim et Kheireddine pour leurs soutiens et encouragements.

A la mémoire de mon oncle Dr Zoubiri M'hammed, j'aurais aimé que tu sois à mes cotées dans ces moments de bonheur et de réussite, que dieu te garde dans son vaste paradis.

A ma grand-mère que dieu te garde pour nous.

A ma chère amie Nesine.

## **Résumé :**

La spondylarthrite ankylosante est un rhumatisme inflammatoire qui est fortement associé avec le gène HLA-B\*27 ainsi qu'à d'autres gènes qui sont en cours d'identification.

Notre travail a consisté en la recherche du gène HLA-B\*27 et l'investigation des sous-types dans une population de 36 patients algériens atteints de la SpA ainsi que chez 60 patients sains par le recours d'une méthode de biologie moléculaire : PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide) précédé par l'extraction d'ADN génomique des patients.

La fréquence du gène HLA-B\*27 dans notre étude est estimée à 55,56% observée chez les patients avec les deux sous-types HLA-B\*27:02 et HLA-B\*27:03 dont les fréquences respectives sont de 70% et 30%. Mis à part le sous-type HLA-B\*27:03 observé pour la première fois les résultats ne diffèrent pas de la tendance générale en Algérie mais une meilleure évaluation du HLA-B\*27 nécessite des études plus approfondies sur une population plus étendue.

Mots-clés : Spondylarthrite ankylosante, HLA-B\*27, HLA-B\*27:02, HLA-B\*27:03, PCR-SSO.

**Abstract:**

Ankylosing spondylitis is an inflammatory rheumatism which is strongly associated with the gene HLA-B\*27 as well as other genes that are being identified.

Our work consisted in the research for the gene HLA-B\*27 and in investigation of the subtypes in a population of 36 Algerian patients with SpA and 60 controls by uses a method of molecular biology: PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide) preceded by genomic DNA extraction from patients.

The frequency of the gene HLA-B\*27 in our study is estimated at 55.56% observed in patients with two subtypes of HLA-B\*27:02 and HLA-B\*27:03 with the respective frequencies of 70% and 30%.

Apart from the subtype HLA-B\*27:03 observed for the first time the results don't differ from the general trend in Algeria but a better assessment of the HLA-B \*27 requires further studies on a larger population.

**Keywords:** Ankylosing spondylitis, HLA-B\*27, HLA-B\*27:02, HLA-B\*27:03, PCR-SSO.

## ملخص:

التهاب الفقار اللاصق هو روماتيزم يرتبط ارتباطا قويا بالجينات HLA-B \* 27 فضلا عن الجينات الأخرى التي يتم تحديدها.

يتألف عملنا في البحث عن الجينات HLA-B\*27 والتحقيق في الأنواع الفرعية عند 36 مريضا جزائري الذين يعانون من التهاب الفقار اللاصق و عند 60 غير مصابين و هذا باستخدام البيولوجيا الجزيئية: PCR-SSO يسبقه استخراج الحمض النووي الجينومي للمرضى.

تواتر الجينات HLA-B\*27 في دراستنا وتقدر % 55.56 لوحظ في المرضى الذين يعانون من التهاب الفقار اللاصق اثنين من الأنواع الفرعية HLA-B\*27:02 و HLA-B\*27:03 مع ترددات كل منها %70 و %30 . وبصرف النظر عن HLA-B\*27:03 لوحظ للمرة الأولى فإن النتائج ليست مختلفة عن الاتجاه العام في الجزائر ولكن إجراء تقييم أفضل لل HLA-B \* 27 يتطلب مزيدا من الدراسة على عدد أكبر من السكان

**الكلمات المفتاحية:** التهاب الفقار اللاصق, PCR-SSO, HLA-B\*27:02, HLA-B\*27:03, HLA-B\*27

## Liste des figures

- Figure 1** : le concept de SPA est ses différentes formes 2
- Figure 2**: schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée. (Talpin., 2013)  
4
- Figure 3**: Schéma du rachis normal, inflammatoire et ankylosé.(Talpin., 2013) 5
- Figure 4**: Schéma résumant l'immunité innée et acquise de la Spondylarthrite Ankylosante8
- Figure 5**: carte physique de la région chromosomique des gènes HLA. (Cesbron *et al.*,2007) 11
- Figure 6**: structure d'une molécule HLA-B classe I. (McHugh *et al.*, 2012) 13
- Figure 7**: localisation du polymorphisme des gènes HLA-B classe I. (Benhalima., 2009) 14
- Figure 8**: répartition des sous-types d'HLA-B\*27 dans le monde. (Elsermans., (2012) 15
- Figure 9** : la composition en acides aminés de la poche B de la molécule HLA-B\*27. (Talpin., 2013)  
15
- Figure 10**: Présentation d'un peptide antigénique par la molécule HLA-B27 à la cellule T cytotoxiques. (Ramos M *et al.*, 2002) 17
- Figure 11** : Homodimère de chaine lourde de la molécule HLA-B\*27 (Bowness *et al.*, 2009) 18
- Figure 12** : Trois différentes structures de HLA-B27 et les hypothèses quant à la façon qu'ils pourraient induire la spondylarthrite ankylosante. (Tam *et al.*, 2010) 18
- Figure 13**: conséquence de la repense UPR 19
- Figure 14**: Représentation du vortex et le flash spin ANNEXE 2
- Figure 15** : L'appareil Quikgene mini 80 et ses constituants ANNEXE 2
- Figure 16**:Le NANODROP ANNEXE 2
- Figure 17**: le Thermocycleur (BIOMERTA Tprofessional) ANNEXE 2
- Figure 18**: Appareil Luminex GEN-PROBE ANNEXE 2
- Figure 19**: agitatrice de plaque ANNEXE 2

**Figure 22:** Kit d'amplification LIFECODES ANNEXE 3

**Figure 23:** Eau sans nucléases (Nucleas free water) ANNEXE 3

**Figure 24:** Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex 24

**Figure 25:** Réaction de PCR-SSO 30

**Figure 26:** Technologie Luminex<sup>TM</sup> : lasers rouge et vert excitant une microbille ANNEXE 5

**Figure 27:** Logiciel d'acquisition des données (d'après Luminex) ANNEXE 5

**Figure 28:** classification des billes selon Luminex ANNEXE 5

**Figure 29 :** Répartition des patients selon les tranches d'âge 32

**Figure 30:** Répartition des patients SpA selon les antécédents familiaux 33

**Figure 31:** HLA-B27 et antécédents familiaux 33

**Figure 32:** Répartition des patients en fonction des formes cliniques 34

**Figure 33:** Les manifestations cliniques chez les patients atteints de la SpA 35

**Figure 34 :** Fréquence du gène HLA-B\*27 chez les patients et les témoins 36

**Figure 35:** Répartition des patients selon le sexe 37

**Figure 36:** Fréquence de HLA-B\*27 chez les patients en fonction du sexe 38

**Figure 37:** fréquence des sous types HLA-B\*27 40

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> les critères de classifications des Spondylarthrite Ankylosante modifiés de New-York en 1984	ANNEXE 1
<b>Tableau 2:</b> Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite périphérique	ANNEXE 2
<b>Tableau 3:</b> Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite axiale	ANNEXE2
<b>Tableau 4:</b> Prévalence de l'allèle HLA-B27 dans les différentes formes de SpA	12
<b>Tableau 5:</b> les facteurs génétiques prédisposant à la SpA	20
<b>Tableau 6:</b> Les données des patients	ANNEXE 3
<b>Tableau 7:</b> Programme d'amplification SSO-LIFECODES	28
<b>Tableau 8:</b> Programme d'hybridation	29
<b>Tableau 9:</b> Volume de dilution de la Streptavidine-PE	29
<b>Tableau 10 :</b> Fréquence du gène HLA-B*27 chez les patients atteints de la spondylarthrite ankylosante et les témoins	36
<b>Tableau 11:</b> Age moyen d'apparition de la SpA chez les patients	39



## Liste des abbreviations

**ARTS:** Aminopeptidase receptor TNF shiding 1

**ASAS:** Assessment of Spondyloarthritis international Society

**BIP:** immunoglobulm heavy chain binding protein

**BMP:** Bone Morphogenic Protein

**CMH:** Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**Cys:** Cysteine

**CPA:** Cellule présentatrice d'antigène

**DC:** Cellule dendritique

**DZ:** Digygote

**EBV:** Epstein-Barr Virus.

**EDTA:** Acide éthylène diamine tétraacétique

**ERAD:** Dégradation associée du RE

**ERAP:** Aminopeptidase du réticulum endoplasmique

**GWAS:** genome wide association studies (études d'association pan-génomiques)

**HCA:** Hopital central de l'armée

**HLA:** Human leucocyte antigene

**IC:** Intervalle de Confiance

**IL:** Interleukine

**KDa:** kilodaltonne

**KIRs:** Killer cell immunoglobulin-like receptors

**LB:** Lymphocyte B

**LILRs:** Leukocyte immunoglobulin-like receptors

**LT:** Lymphocyte T

**MMP:** métalloprotéinases

**MZ:** Monozygote

**NF-κB:** nuclear factor - kappa B (facteur nucléaire – kappa B)

**NK:** Natural Killer

**Nm:** nanometer

**NO:** Oxide Nitrique

**P :** P-value (niveau de probabilité)

**PAMPs:** Pathogen associated molecular patterns

**PCR-SSO:** Polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide

**RANK:** Receptor Activator of NFκB

**RANKL:** receptor activator of NFκB ligand

**RE:** Reticulum Endoplasmique

**SpA:** Spondylarthritis Ankylosante

**TAP:** Transporter associated with antigen processing

**TCR:** T cell receptor

**TGF:** Transforming Growth Factor-

**TH:** T helper

**TLR:** Toll Like Receptor.

**TNF:** Tumor necrosis factor

**UPR:** Unfold protein response

**VIP:** Vasoactive intestinal peptide

**β2m:** β2-microglobuline

## Sommaire

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. Description de la spondylarthrite ankylosante	2
I.1.1. Définition et historique de la spondylarthrite ankylosante	2
I.1.2. Epidémiologie de la spondylarthrite ankylosante	2
I.1.3. Formes cliniques et diagnostiques	3
I.1.4. Pathogénie de la spondylarthrite ankylosante	6
I.2. Génétique de la spondylarthrite ankylosante	9
I.2.1. Etude de la concordance chez les jumeaux	9
I.2.2. Transmission de la SpA	9
I.2.3. Système HLA	10
I.2.3.1. Cartographie physique des gènes HLA	10
I.2.3.2. Nomenclature des gènes HLA	11
I.2.4. HLA-B*27 et SpA	11
I.2.4.1. HLA-B*27 : gène HLA-B de classe I	12
I.2.4.2. Polymorphismes du gène HLA-B*27	13
I.2.4.3. Association des sous-types d' HLA-B*27 à la SpA	14
I.2.4.4. Pathogénie des gènes HLA-B*27 dans la SpA	16
I.2.5. Implications des facteurs génétiques autres que le gène HLA-B*27	19

## MATERIELS ET METHODES

### II. Matériels

#### II.1. Matériel biologique

#### II.2. Matériel non biologique

#### II.3. Méthodes

##### II.3.1. Technique de typage par réaction de PCR –SSO

##### II.3.1. 2. Mode opératoire

##### A. Extraction d'ADN

B. Dosage et contrôle de qualité de l'ADN	26
C. Typage des gènes HLA-B par PCR-SSO	26
II.4. Statistiques	30
RESULTATS ET DISCUSSION	
III. 1. Evaluation de l'âge moyen des patients	32
III. 2. SpA et antécédents familiaux	33
III. 3. Fréquence des formes cliniques	34
III. 4. Evaluation des signes cliniques	35
III.5. Evaluation de la fréquence du gène HLA-B*27	35
III. 6. Rapport homme/femmes	37
III. 7. HLA-B*27 et l'âge d'apparition de la maladie	38
III. 8. Fréquence des sous types de HLA-B*27	39
CONCLUSION	43
REFERENCES	44
ANNEXE	
GLOSSAIRE	

La Spondylarthrite Ankylosante SpA est une maladie inflammatoire chronique qui atteint principalement la colonne vertébrale et les articulations sacro-iliaques (Maolic V., 2010) elle touche les deux sexes mais avec une prédominance masculine (Amroun *et al.*, 2010; Wendling., 1998), le début des symptômes se situe dans la majorité des cas entre 20 et 30ans, (Wendling., 1998) la prévalence globale de la SpA est entre 0,1 et 0,5% (Toussirot *et al.*, 2006)

Le système HLA chez l'homme est situé sur le bras court du chromosome 6 et joue un rôle capital dans la réponse immunitaire, dans la distinction le soi du non-soi d'où son rôle dans le rejet de greffe. (Cesbron *et al.*, 2007)

L'association génétique de la molécule HLA-B\*27 et la Spondylarthrite ankylosante est considérée comme une forte association entre un gène de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité et une maladie complexe (Talpin., 2013), cependant le mécanisme moléculaire est imparfaitement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer son rôle dans la physiopathologie de la maladie. (Robinson *et al.*, 2013)

La détermination du typage HLA est réalisée par une méthode de Biologie moléculaire, qui consiste en une Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) basée sur l'amplification des régions polymorphes des gènes HLA. (Cesbron *et al.*, 2007)

L'objectif de la présente étude, réalisé au laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Central de l'Armée (HCA) Mohamed Sghir Nekkache, est le génotypage HLA de patients atteints de Spondylarthrite Ankylosante par la technique de PCR-SSO. Ce travail se veut une contribution à l'investigation de l'association du gène de susceptibilité HLA B\*27 dans la Spondylarthrite Ankylosante afin d'utiliser le génotypage HLA-B27 dans la stratégie diagnostique.

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## **I.1. Description de la spondylarthrite ankylosante:**

### **I.1.1. Définition et historique de la spondylarthrite ankylosante:**

La SpA est un rhumatisme inflammatoire chronique décrit en 1899 par Pierre Marie (Pertuiset., 2008), elle atteint avec prédilection le squelette axial et les articulations sacro-iliaques et peut également affecter les articulations périphériques. (Diaz-Pena *et al.*, 2012; Toussirot., 2013)

La SpA est le chef de file des Spondylarthropathies présentant des caractéristiques communes sur le plan immunogénétique et radiologique. (figure 1) (Wendling., 1998; Talpin., 2013)

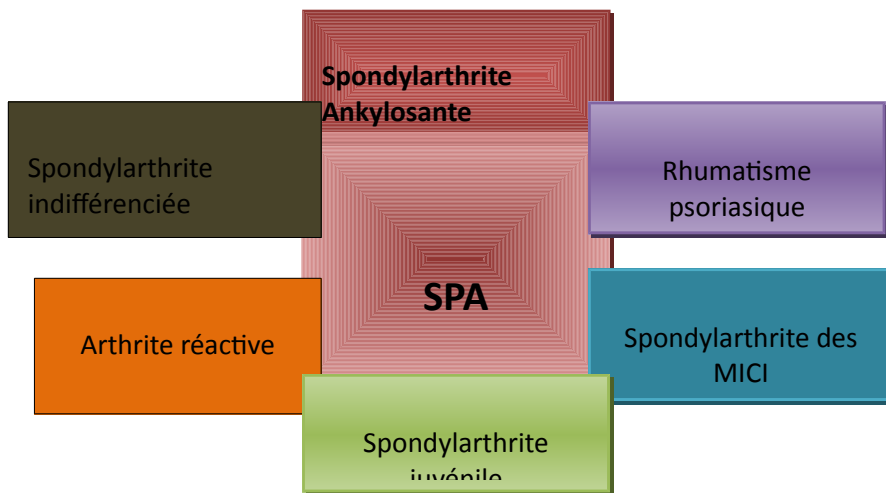


Figure 1 : le concept de SPA est ses différentes formes.

### I.1.2. Epidémiologie :

La prévalence globale de la SpA est estimée entre 0.1 et 0.5%, (Toussirot *et al.*, 2006; Dakware *et al.*, 2008), elle varie selon l'ethnie et la répartition géographiques (Blanco-Gelaz *et al.*, 2001; Dakware *et al.*, 2008).

Chez les caucasiens: elle est comprise entre 1,1 et 1,4% en Norvège, 0.86% en Angleterre et 0.14% en France. Chez les autres ethnies, la fréquence de la maladie est variable chez les Indiens elle est de 6.2%, au Japon et la Chine la SpA est de 0.2%. (Wendling., 1998)

La SpA touche préférentiellement l'homme jeune avec une prédominance masculine responsable d'un handicap progressif source d'un retentissement fonctionnel. (Toussirot *et al.*, 2006)

### I.1.3. Formes cliniques et diagnostiques :

#### I.1.3.1. Les formes cliniques : (Wendling., 1998)

a. **Formes juvéniles :**

Elles se définissent arbitrairement par un début des symptômes avant l'âge de 16ans avec une atteinte articulaire périphérique, une fréquence plus élevée de fièvre (5 à 10%) et une anémie.

b. **Forme du sujet âgé :**

Débutent après 50ans, ces formes sont dénommées sous le vocable de: Late Onset Spondylarthropathy « LOSPA ».

Les signes généraux sont francs avec une fièvre, amaigrissement et une vitesse de sédimentation (Vs) élevée.

c. **Formes féminines :**

L'âge moyen de début est de 23ans, se manifeste par la présence d'arthrite périphérique, uvéite antérieure et entéropathie.

### I.1.3.2. Manifestations cliniques de la maladie :

La symptomatologie clinique est dominée par l'atteinte du squelette axial, des arthrites périphériques et peut s'y associer des atteintes extra-articulaires. (Wendling., 1998)

#### a. Manifestations axiales :

##### a.1. Atteinte des articulations sacro-iliaques :

Chaque articulation sacro-iliaque réunit le sacrum (bassin) au dernier os de la colonne vertébrale, son inflammation est appelée : sacroïlite c'est l'une des caractéristiques particulières de la SpA. (Wendling., 1998; Talpin., 2013)

La sacroïlite est responsable de douleurs fessières uni ou bilatérale prédominant dans la 2ème partie de la nuit et s'accompagne d'une raideur lombaire au lever.

Cet état inflammatoire disparaît complètement par un phénomène de fibrose et d'ossification aboutissant à un stade final l'ankylose. (figure 2)

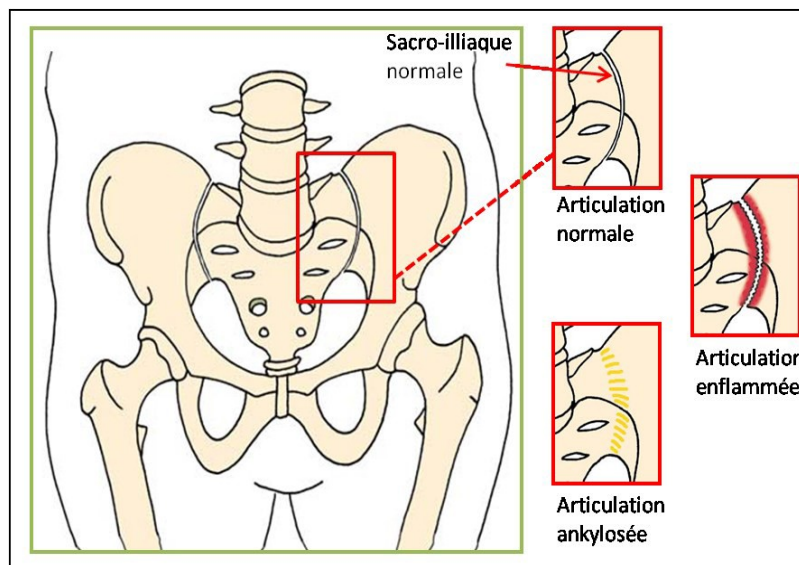


Figure 2: schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée. (Talpin., 2013)

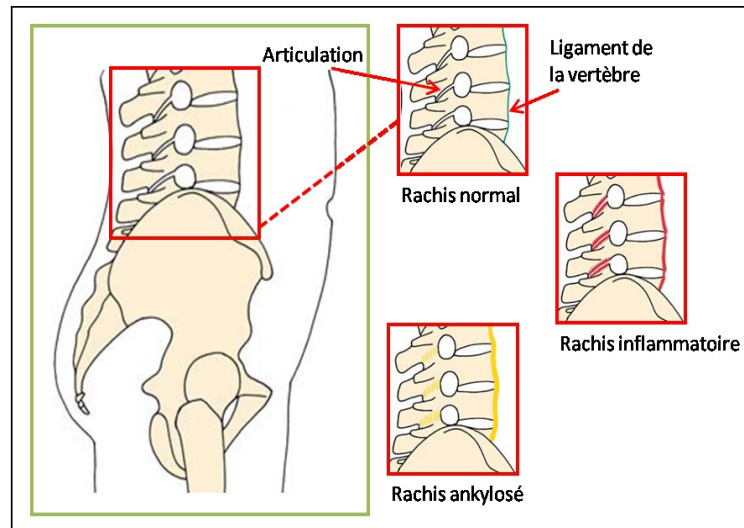
##### b.2. Atteinte du rachis :

Le rachis est constitué de vertèbres, ligaments et d'articulations joignant ces vertèbres entre elles.

L'atteinte rachidienne se traduit par une douleur lombaire particulière exacerbée au milieu de la nuit ou au réveil avec une raideur du dos qui provoque un dérouillage matinal, elle est responsable de



gêne fonctionnelle et de diminution de la mobilité conduisant à une ankylose. (figure 3) (Wendling., 1998; Talpin., 2013)



**Figure 3:** Schéma du rachis normal, inflammatoire et ankylosé. (Talpin., 2013)

L'ankylose rachidienne est due à la formation des syndesmophytes entre deux vertèbres d'où la forme en « bambou » de la colonne vertébrale, elle est responsable de la perte définitive de la souplesse rachidienne. (Talpin A., 2013)

**b. Manifestations périphériques :**

L'inflammation des articulations périphériques « enthèse : le site d'attache des ligaments et des tendons de l'os » est constaté tout au long de l'évolution de la maladie, elle touche les articulations telle que : les épaules, les genoux et les pieds plus particulièrement les talalgies ainsi que les petites jonctions comme les doigts, les orteils ou elle génère un aspect en saucisse par un phénomène de tuméfaction. (Wendling., 1998 ; Talpin., 2013)

**c. Manifestations extra-articulaire :**

La SpA est également accompagnée par des atteintes non rhumatismales les plus fréquents sont : uvéite, psoriasis, des atteintes pulmonaires et des atteintes cardiaques. (Wendling., 1998; Talpin., 2013)

**I.1.3.3. Diagnostique :**

Le signe initial de la SpA est souvent des douleurs lombaire inflammatoire mais ce caractère n'est ni suffisant ni spécifique pour établir un diagnostique.

En effet le diagnostique de la SpA repose sur les éléments cliniques et les signes radiologiques d'une sacroilite comprenant :

Des douleurs lombaire et raideur d'une durée de > 3mois qui s'améliore avec l'exercice et persiste avec le repos, une limitation de la mobilité de la colonne vertébrale déterminé par le test de Schober et enfin la présence d'une sacroilite classée en 5 grade. (Dakware *et al.*, 2008; Toussirot., 2013; Raychaudhuri *et al.*, 2014).

Des systèmes de critères de diagnostique ont été proposés : les critères de New York modifiés en 1984 spécifique à la SpA (ANNEXE N°1 tableau 1) cependant, ce système n'est pas adapté à un diagnostique précoce, en 2009 un autre groupe ASAS valide le nouveau critère de classification permettant de faire le diagnostique des formes précoces et des formes périphériques avant que les modifications radiologiques ne soient visibles. (ANNEXE N°2, tableau 2, tableau 3) (Dakware *et al.*, 2008; Toussirot., 2013; Raychaudhuri *et al.*,2014)

#### **I.1.4. Pathogénie de la spondylarthrite ankylosante**

La physiopathologie de la SpA est multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et des modifications de la réponse immunitaire. (Toussirot *et al.*, 2006; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)

##### **a. Les facteurs génétiques :**

Le facteur majeur de la susceptibilité à la SpA est le gène HLA-B de classe I qui fait partie du complexe majeur d'histocompatibilité. (Toussirot E *et al.*, 2006; Cesbron *et al.*, 2007) En effet il expliquerait à lui seul environ un tiers des prédispositions génétiques totales.(Costantino *et al.*, 2013)

D'autres facteurs génétiques ont été identifiés grâce à l'étude de l'ensemble du génome.

##### **b. Les facteurs environnementaux :**

###### **b.1. *Klebsiella pneumoniae* et SpA :**

La bactérie *Klebsiella pneumoniae* à été proposé comme agent causal de la SpA suite à la présence des anticorps anti- *Klebsiella* chez les patients atteint de la SpA.

###### **b.2. Tabac et SpA :**

Le tabagisme aurait un effet sur le développement de la SpA, selon une étude il serait associé à une apparition plus précoce de douleurs lombaire ainsi que l'inflammation des articulations sacro-iliaques avec un taux élevé de protéine C réactive. (Braun *et al.*, 2012)

c. **Immunité innée et acquise de la SpA :**

La SpA est déclenchée par divers processus suite : à un stress mécanique, un mauvais repliement de HLA-B\*27 ou une infection bactérienne. (Astier *et al.*, 2013)

L'activation du système immunitaire aboutit à la sécrétion des cytokines qui induisent un processus inflammatoire principalement au niveau de l'enthèse, l'activation de la réponse immunitaire se fait par l'intermédiaire des TLRs, ces récepteurs sont impliqués dans la réponse inflammatoire, exprimés sur les CPA et les monocytes, leur stimulation engendre une cascade de voies de signalisation cellulaire impliquées dans la production de médiateurs inflammatoires comme : IL-17, IL-22, IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui engendre une destruction osseuse avec une ostéoformation. (Schéma récapitulatif en figure 4) (Lories *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2012)

## **I.2. Génétique de la spondylarthrite ankylosante:**

L'existence d'un terrain génétique dans la SpA a été suspecté à partir de 1918 par l'étude du taux de concordance chez les jumeaux et l'héritabilité chez les apparentés d'un sujet atteint par la SpA. (Toussirot *et al.*, 2006)

### **II.2.1. Etude de la concordance chez les jumeaux**

La comparaison du taux de concordance chez les jumeaux monozygotes et dizygotes est nécessaire pour déterminer la susceptibilité des facteurs génétiques dans la survenue de la SpA. (Maolic., 2010; Talpin., 2013)

Des études ont été menées sur les paires de jumeaux afin d'évaluer le taux de concordance de la SpA, il était de 50 à 70% pour les paires de jumeaux MZ comparativement aux jumeaux DZ qui était de 12.5 à 15%. (Maolic., 2010; Talpin., 2013)

Les jumeaux monozygotes présenteraient un taux de concordance bien supérieur à celui des jumeaux dizygotes ce qui renforce l'argument du rôle des facteurs génétiques dans le déterminisme de la SpA; la discordance chez les jumeaux MZ pourrait être purement d'origine environnemental. (Maolic., 2010; Talpin., 2013)

### **II.2.2. Transmission de la SpA**

Le risque de transmission de la SpA chez les apparentés d'un patient de premier degré était estimé à 8.2% avec une prévalence de SpA de 0.1 dans la population générale, le risque diminuait de 1% pour les apparentés du second degré. (Maolic., 2010)

### **II.2.3. Système HLA :**

#### **II.2.3.1. Cartographie physique des gènes HLA :**

Le système HLA se situe dans une région chromosomique localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6 (6 p21 3), c'est une région la plus dense en gène et la plus polymorphe du génome, elle s'étend à 4000 Kb. (Cesbron *et al.*, 2007; Talpin., 2013)

Découvert en 1958 par Jean Dausset suite à sa contribution dans la réponse immunitaire. (Talpin A, 2013)

Les gènes HLA comportent 3 régions riches en gènes, du centromère vers le télomère (figure 5): (Cesbron *et al.*, 2007)

#### **a Les gènes HLA de classe II : (les plus centromériques)**

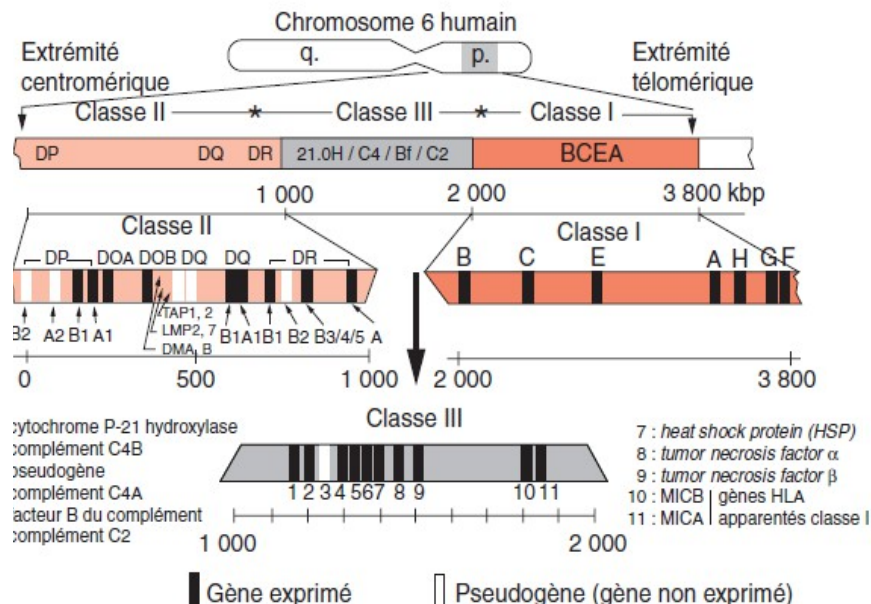
Constitué d'un ensemble de gènes codant pour les molécules: HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR ainsi que pour des molécules impliquées dans la présentation de l'antigène: TAP1 et TAP2. (Cesbron *et al.*, 2007; Talpin., 2013)

#### **b Les gènes HLA de classe III : (intermédiaire)**

Codent pour des gènes qui ne sont pas apparentés au système HLA mais dans la réponse immunitaire codant pour certaines protéines du complément : C2, C4 et pour des cytokines inflammatoire : TNF. (Semana *et al.*, 2002; Cesbron *et al.*, 2007)

#### **c Les gènes HLA de classe I : (les plus télométriques)**

Comportent les gènes HLA dits classiques : HLA-A, HLA-B et HLA-C ainsi que les gènes mineurs dits non classique : HLA-E, HLA-F, HLA-G et MIC. (Semana *et al.*, 2002; Cesbron *et al.*, 2007)



**Figure 5:** carte physique de la région chromosomique des gènes HLA. (Cesbron *et al.*, 2007)

### II.2.3.2. Nomenclature des gènes HLA :

La nomenclature du système HLA est standardisée et mise au point par l'OMS qui assure la mise à jour. Deux nomenclatures sont utilisées (Benhalima., 2009) :

#### ❖ Sérologique :

Les gènes HLA sont désignés par le nom du locus suivi d'un chiffre (exemple : HLA-A3). (Moalic *et al.*, 2006)

#### ❖ Biologie moléculaire :

Un allèle est référencié par le locus auquel il appartient suivi d'un astérisque puis de deux chiffres pour désigner la spécificité allélique (exemple : HLA-B\*27 :05). (Cesbron *et al.*, 2007)

### II.2.4. HLA-B\*27 et SpA :

L'association du gène HLA-B\*27 avec la SpA a été découverte en 1973 (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013) par : Scholsstein « université de Californie » puis Brewerton « hopital Westminster » (McHugh *et al.*, 2012),

elle demeure l'une des plus fortes associations entre un allèle du système HLA et une maladie complexe. (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)

Plus de 90% des patients caucasiens atteints de la SpA sont porteurs du gène HLA-B\*27. (Tableau 4) (Talpin., 2013)

**Tableau 4:** Prévalence de l'allèle HLA-B27 dans les différentes formes de SpA chez les populations Caucasiennes. (Talpin., 2013)

Sous-types SPA	Prévalence de HLA-B27 (%)
Spondylarthrite ankylosante	≥ 90%
Arthrite réactionnelle	70%
Rhumatisme psoriasique	60-70%
Spondylarthrites des entérocolopathies inflammatoires	50-60%

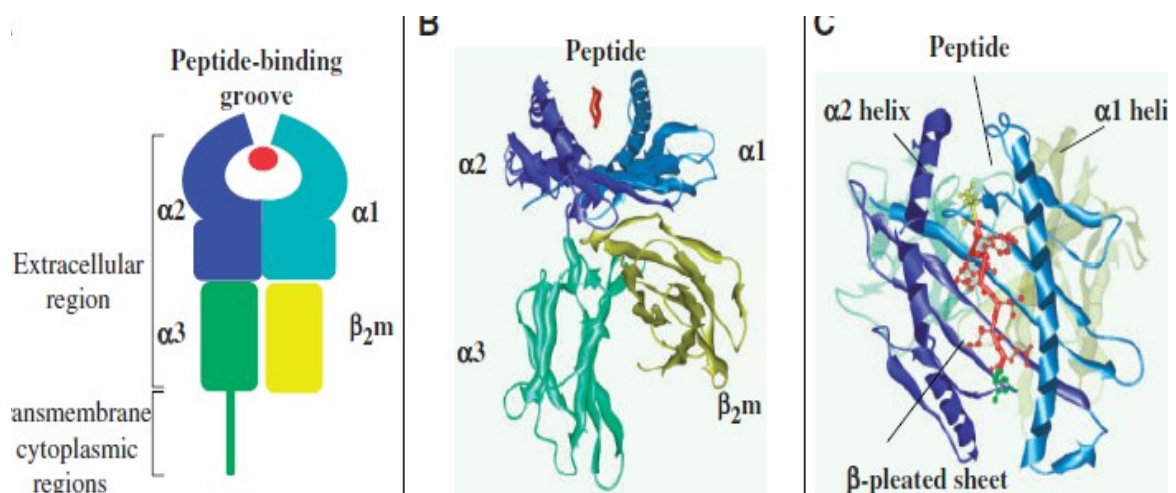
### II.2.4.1. HLA-B\*27 : gène HLA-B de classe I :

#### a. Structure : (figure 6)

Les molécules HLA-B classe I sont des hétérodimère de nature protéique, formé par l'association non covalente d'une chaîne lourde  $\alpha$  (44KDa) avec une chaîne légère  $\beta_2$  microglobuline (11.5 KDa). (figure 6A, B) (Semana *et al.*, 2002; Toussiro *et al.*, 2006)

- ❖ La chaîne lourde  $\alpha$  est une glycoprotéine, compte une partie intra-cytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire, elle est composée de 3 domaines :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . (Cesbron *et al.*, 2010)
- ❖ La protéine  $\beta_2$  microglobuline dite chaîne légère ne faisant pas partie du système HLA, le gène codant est situé sur le chromosome 15, elle est constituée d'un seul domaine extra-membranaire. (Cesbron *et al.*, 2010)

La structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B classe I révèle que les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  de la chaîne lourde forment le site d'ancrage du peptide de 8 à 11 acides aminés dont le fond est constitué d'un feuillet  $\beta$  plissé et les bords par deux hélices  $\alpha$ . (figure 6C) (Toussiro *et al.*, 2006)



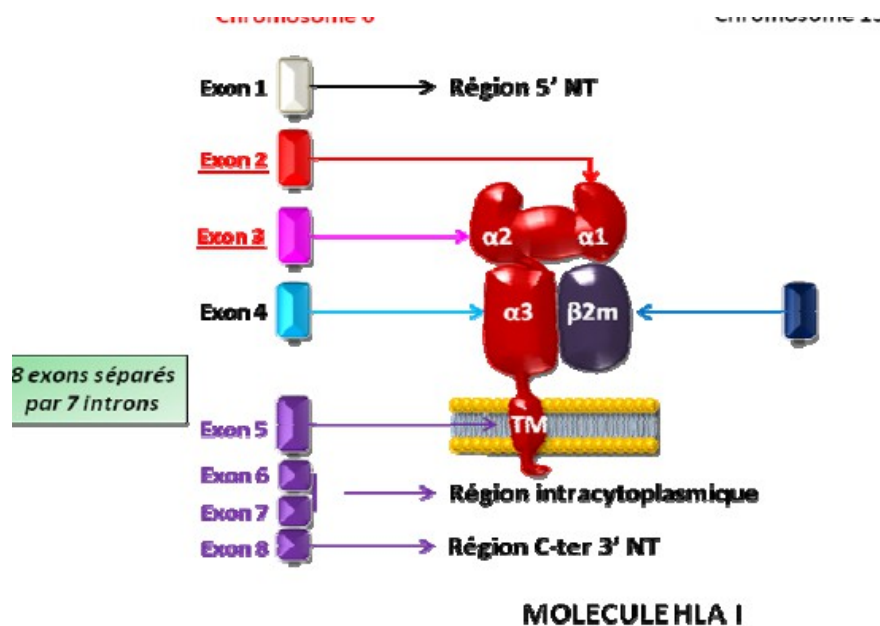
**Figure 6:** structure d'une molécule HLA-B classe I. (McHugh *et al.*, 2012)

b. **Expression :**

Les molécules HLA-B classe I sont exprimées à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées, (Cesbron *et al.*, 2007), elles sont des initiatrices de la réponse immunitaire en présentant des peptides endogènes aux récepteurs  $\alpha\beta$  des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. (Benhalima., 2009)

**II.2.4.2. Polymorphismes du gène HLA-B\*27 :**

Une des principales particularités des gènes HLA est qu'ils sont hautement polymorphes qui se traduit par un nombre important d'allèle pour chaque locus, (Toussirot *et al.*, 2006; Abbas A *et al.*, 2009) le HLA-B\*27 comprend 105 sous types de HLA-B\*27:01 à HLA-B\*27:105 (Talpin., 2013). Qui dériveraient par mutations d'un seul allèle ancestral c'est le HLA-B\*27:05 dans la population caucasienne (Amroun *et al.*, 2010) Parmi ces sous-types 39 codant pour des protéines de la surface cellulaire, se distinguent par des substitutions d'acides aminés dans les domaine  $\alpha1$  et  $\alpha2$  de la molécule HLA-B\*27 (figure 7) (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013) formant le site de fixation du peptide qui est constitué de 6 poches d'ancrage (de A à F).



**Figure 7:** localisation du polymorphisme des gènes HLA-B classe I. (Benhalima., 2009)

**II.2.4.3. Association des sous-types d' HLA-B\*27 à la SpA :**

L'association des sous-types du HLA-B\*27 à la SpA est restreinte aux allèles les plus anciens soit HLA-B\*27:01 à HLA-B\*27:12 (figure 8) (Maolic., 2010), ces allèles présentent deux acides aminés conservés dans la poche B qui pourrait être impliqué dans la prédisposition à la SpA, il s'agit de l'Acide Glutamique en position 45 et de la Cystéine en position 67. (figure 9) (Toussirot *et al.*, 2006)



Néanmoins, il existe deux sous-types qui semblent ne pas être associés à la SpA.

B\*2706 assez fréquent dans le Sud-Est de l'Asie et B\*2709, retrouvé spécifiquement dans le sud de l'Italie et chez les Sardes. Ces deux formes alléliques ont en commun une mutation de l'acide aminé en position 116 qui pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité à la maladie. (Toussirot et al., 2006; Maolic., 2010)

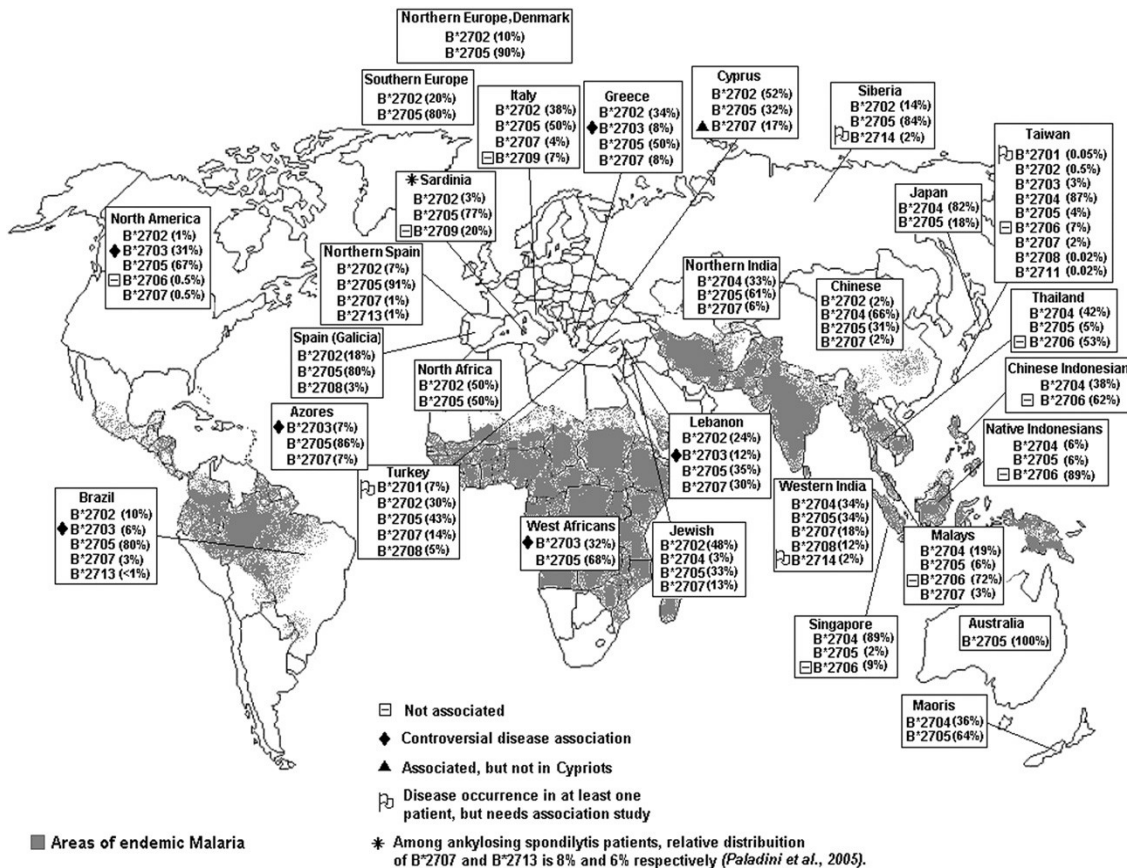


Figure 8: répartition des sous-types d'HLA-B\*27 dans le monde. (Mathieu A et al., 2009).

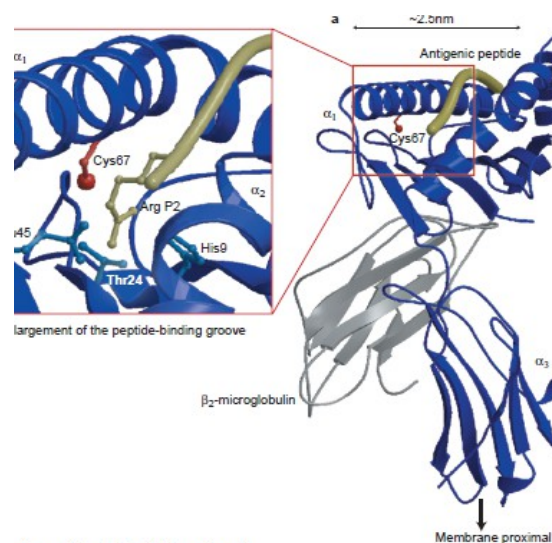


Figure 9 : la composition en acides aminés de la poche B de la molécule HLA-B\*27. (Talpin., 2013)

#### II.2.4.4. Pathogénie des gènes HLA-B\*27 dans la SpA :

Si il est généralement admis que le gène prédisposant à la SpA est le gène HLA-B\*27, le mécanisme de cette association n'est pas encore élucidé ; plusieurs hypothèses ont été énoncé pour expliquer ce mécanisme (Talpin., 2013), on distingue :

#### **II.2.4.4.1. Hypothèses spécifiques d'antigènes :**

Repose sur la présentation des peptides antigéniques par les molécules HLA-B\*27 aux cellules T cytotoxiques: CD8+.

##### **a Théorie du peptide arthritogène :**

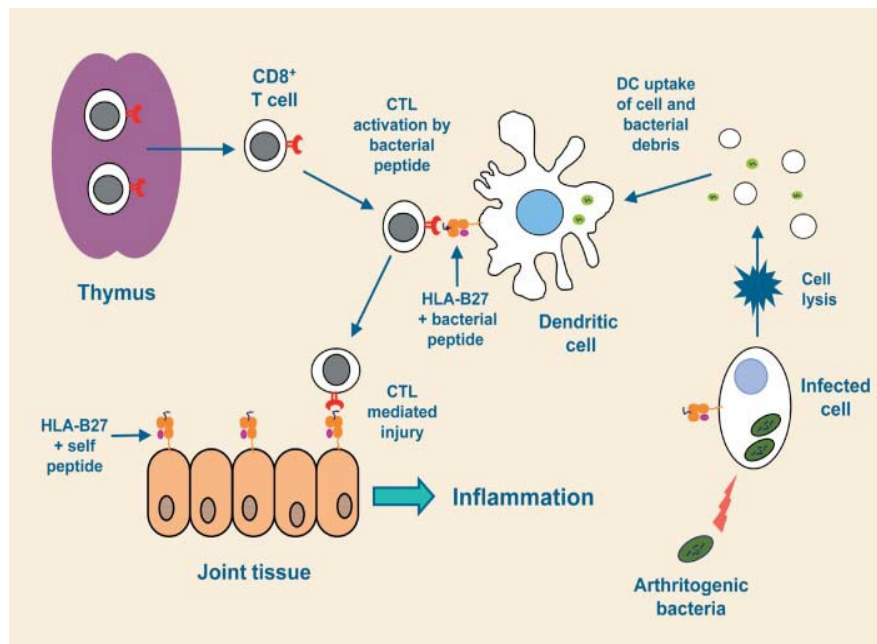
La molécule HLA-B\*27 fixerait un peptide du soi exprimé sur le tissu cible (articulations, enthèse) qui pourrait engendrer une réponse inflammatoire médiée par les cellules T CD8+ auto réactive. (figure 10) (Miceli-Richard., 2010; McHugh *et al.*, 2012)

Une particularité de la molécule HLA-B\*27 est de pouvoir présenter des peptides de 33 acides aminés, certains peptide du soi ont été proposé comme peptide arthritogène : (Maolic., 2010)

- ❖ Un peptide de 9AA dérivant du collagène de type VI reconnu par les LT CD8+ du liquide synovial. (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)
- ❖ Un peptide de 8AA provenant du récepteur du peptide vaso-intestinal (VIP). (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)

##### **b Mimétisme moléculaire :**

Cette hypothèse relie celle du peptide arthritogène au rôle de l'environnement, la molécule HLA-B\*27 pourrait présenter un peptide du soi (enthèse) possédant des homologues de séquences avec des peptides étranger (bactéries *Klebsiella pneumoniae*) aux lymphocytes T CD8+ rompant ainsi le système de tolérance du soi contre ce peptide, ce qui conduit à une réponse auto-immune et une pathologie inflammatoire.(figure 10) (Maolic., 2010; Diaz-Pena *et al.*, 2012)



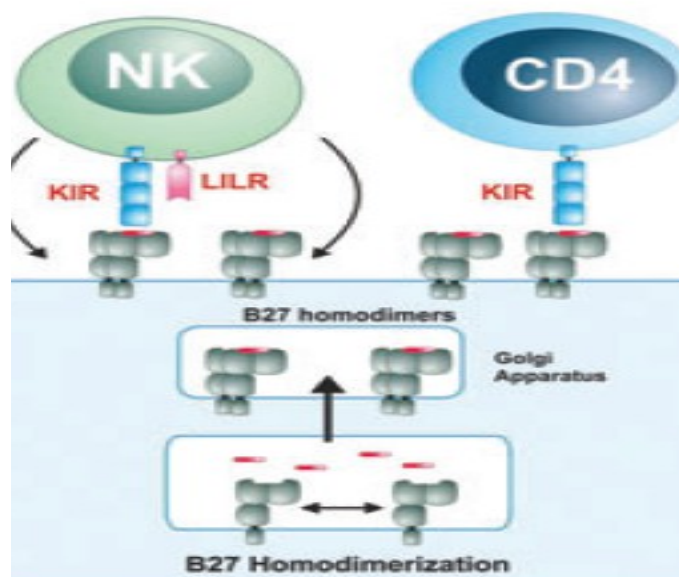
**Figure 10:** Présentation d'un peptide antigénique par la molécule HLA-B27 à la cellule T cytotoxiques. (Ramos M *et al.*, 2002)

#### II.2.4.4.2. Hypothèses non spécifiques d'antigènes :

Une particularité structurales du HLA-B\*27 est un repliement ralenti dans le RE durant sa synthèse et son assemblage avec la  $\beta 2m$  et le peptide générant deux conséquence distinctes : (Miceli-Richard., 2010; Maolic., 2010; McHugh *et al.*, 2012)

##### a Expression d'homodimères de chaîne lourde à la surface cellulaire :

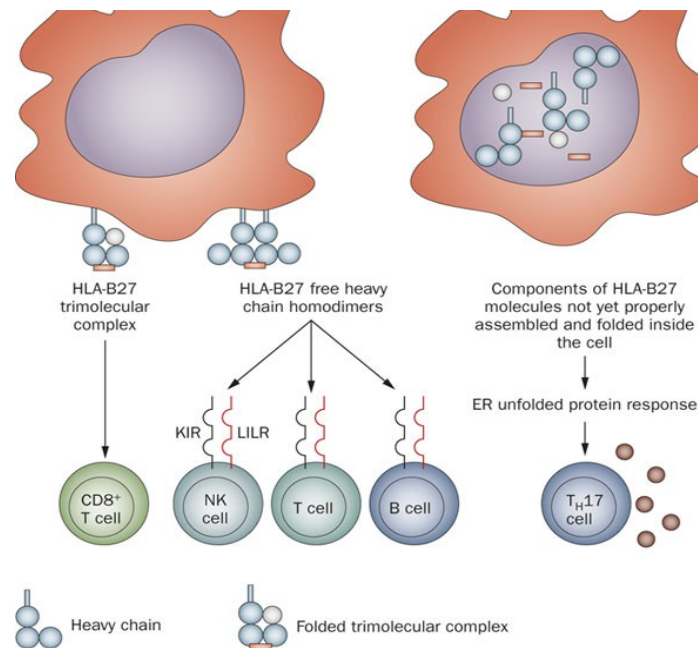
Suggère que la SpA résulte de la reconnaissance immunitaire des molécules HLA-B\*27 mal repliées formant des homodimères de chaîne lourde qui sont stabilisées par des ponts disulfures entre les résidus Cys 67 de la poche B. (figure 11) (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)



**Figure 11 :** Homodimère de chaîne lourde de la molécule HLA-B\*27 (Bowness *et al.*, 2009)

Ces homodimères sont reconnus par des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules NK comme les KIRs et LILIRs ainsi que les récepteurs des LB et LT qui peuvent induire

la réaction inflammatoire en modulant la fonction de ces leucocytes. (figure 12) (McHugh *et al.*, 2012)



**Figure 12** : Trois différentes structures de HLA-B27 et les hypothèses quant à la façon qu'ils pourraient induire la spondylarthrite ankylosante. (Tam *et al.*, 2010)

#### b Induction d'un stress cellulaire par le misfolding :

Dans le cas normal, les chaînes lourdes du HLA-B\*27 mal repliées vont se lier aux protéines chaperonnes Bip puis éliminer selon la voie ERAD « ER- Associated- Degradation» qui prévient l'accumulation des homodimères de chaînes lourdes.

La SpA pourrait provenir d'un stress cellulaire du RE suite à l'accumulation de protéines mal repliées qui active la réponse UPR (**Upload Protein Response**), ce qui conduit à l'activation de la voie NF-κB. (Dakware *et al.*, 2008; López de Castro *et al.*, 2014)

#### c Conséquence de la réponse UPR :

Déclenche une série de voie de signalisation qui aboutit à l'activation des protéines chaperonnes BIP considérées comme les régulateurs clés de cette voie car elles interagissent avec les molécules effectrices de la réponse UPR et induisent l'activation des cytokines pro-inflammatoires : TNFα, IL-6 et IL-1. (McHugh *et al.*, 2012; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2013)

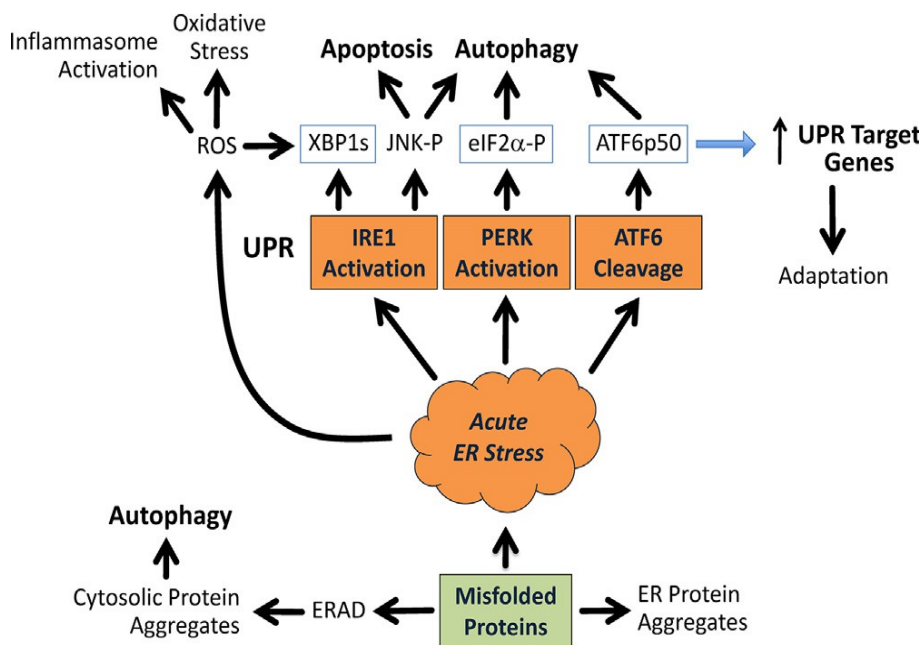


Figure 13: conséquence de la repense UPR

## II.2.5. Implications des facteurs génétiques autres que le gène HLA-B\*27:

Le gène HLA-B\*27 semble un facteur prépondérant à la susceptibilité à la SpA. En effet, Les études familiales suggèrent une contribution de HLA-B27 correspondant à moins de 40% de l'ensemble du déterminisme génétique de la SpA mais cela ne semble pas suffisant, ce qui pourrait suggérer l'implication d'autres facteurs génétiques (tableau 5) (Brown *et al.*, 1997).

Quelques gènes se sont révélés comme de bons marqueurs de la maladie

Tableau 5: les facteurs génétiques prédisposant à la SpA (Dougados *et al.*, 2011)

Gene	Function	Associated with			
		Ankylosing spondylitis	Psoriasis*	Inflammatory bowel disease <sup>a</sup>	
6p21.3	HLA-B	Antigen presentation	Yes	..	..
5q15	ERAP1	Aminopeptidase	Yes	Probable	..
1p31.2	IL23R	Cytokine receptor	Yes	Yes	Yes
2p15	..	..	Yes	..	..
21q22	..	..	Yes	..	..
12p13.2	TNFRSF1A	Cytokine receptor	Probable	..	Yes
16q22	TRADD	Signalling	Probable	..	..
9q32	TNFSF15	Inflammatory cytokine	Probable	..	Yes
2q14	IL1A	Inflammatory cytokine	Probable	..	..
2q12	IL1R2	Cytokine receptor	Probable	..	..
9q34	CARD9	Innate immune defence	Probable	..	..
4q21.3	ANTXR2	Vascular morphogenesis	Probable	..	..

Some factors are also associated with psoriasis or inflammatory bowel disease.

### a IL-23 :

Son association avec la SpA fut découverte en 2007 (Thomas *et al.*, 2010), c'est une cytokine pro-inflammatoire codé par le chromosome 1p31, elle est hétérodimérique composé de deux sous-unités : p40 commune à l'IL-22 et p19 (Pham T., 2008).

Son activité inflammatoire a été attribuée à sa capacité d'induire la différenciation et le maintien des TH17 via le récepteur à IL-23 ainsi que la production des cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6 et IL-22. (Pham T., 2008; Maolic V., 2010)

**b ERAP1 :**

Le gène ERAP1 ou ARTS pour « Aminopeptidase Regulator of TNFR1 Shedding » localisé sur le chromosome 5q15, code pour une aminopeptidase transmembranaire ayant pour principale fonction de compléter dans le RE le clivage des peptides générés par le protéasome afin d'atteindre une longueur optimale de 9AA pour leurs présentations par HLA classe I. (Robinson *et al.*, 2013; Abdullah *et al.*, 2014)

L'association d'ERAP1 avec la SpA n'est pas encore claire (Thomas *et al.*, 2010) mais des études suggèrent que la SpA résulte d'une perte de fonction du gène ERAP1, ce qui aboutirait à une présentation aberrante d'un peptide (Reveille., 2012).

**c IL-1 :**

Comporte 9 gènes codé par le chromosome 2, les plus connus sont : IL-1, IL-1 $\beta$  et IL-1RN codant pour : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-1RA. (Maolic., 2010)

IL-1 $\alpha$  stimule la production de plusieurs médiateurs inflammatoire parmi lesquels la prostaglandine E2 impliquée dans le phénomène articulaire et les MMP impliqués dans la destruction du cartilage. (Maolic., 2010)

# **MATERIEL ET METHODES**

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire d'immunologie de l'hôpital central de l'armée (HCA) Mohamed Seghir Nekkache, Ain Naâdja, durant la période s'étendant du : 19-03-2014 au 22-05-2014.

## **II. Matériels:**

### **II.1. Matériel biologique:**

#### **II.1.1. Sang:**

L'étude présente a été réalisée à partir de l'analyse du sang total prélevé dans des tubes EDTA de 36 patients algériens, atteints de Spondylarthrite Ankylosante.

L'effectif des malades comprenait 05 femmes et 31 hommes de tous âges. (ANNEXE N°3 Tableau 6)

#### **II.1.2. Groupe témoin :**

Le groupe témoin a consisté en 60 sujets indemnes de toute pathologie rhumatismale inflammatoire ou antécédents familiaux de SpA.

Les prélèvements ont été recueillis au niveau du service de Rhumatologie de l'hôpital central de l'armée Mohamed Seghir Nekkache Ain Naâdja.

### **II.2. Matériel non biologique: ANNEXE N° 4**

#### **II.2.1. Appareillages: (: les figures de 13 à 19)**

Matériels utilisés :

- Eppendorf.
- Pipettes à volume réglables et embouts.
- Vortex : agitateur de paillasse (**34524E**)
- Flash spin : centrifugeuse de paillasse (Espresso 11210801)
- Etuve
- appareil à pression (Quickgene mini80)
- Colonne CAS (Cartridges)
- Cuve à déchet WTS (Waste tube)
- Nanodrop 2000 (spectomètre)
- Plaque agitatrice : IKA MS 3 digital
- Plaque de 96 puits
- Thermocycleur Biometra Tprofessional
- Luminex GEN PROBE

#### **II-2-2 Réactifs: (ANNEXE N°5: figure 20, figure 21, figure 22)**

Les réactifs utilisés dans les techniques :

- 1- Kit d'extraction d'ADN Quikgene qui contient :
  - Solution de Lyse LBD (Lysis Dilution Buffer)
  - Solution de Lavage WDB (Wash Buffer)
  - Solution d'élution CDB (Elution Buffer)
  - Protéinase K en poudre.



- 2- Ethanol.
- 3- Eau distillée.
- 4- Streptavidine-PE
- 5- Kit typage HLA-B LIFECODES contient :
  - Solution de master MIX (MX-B)
  - Sonde nucléiques appropriées (BM-B)
  - Solution de dilution (DS)
- 6- Eau sans nucléases (nucleas free water)

## II. 3. Méthodes:

### II.3.1. Technique de typage par réaction de PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide)

❖ Principe :

Une méthode réalisée après l'extraction d'ADN à partir du sang total : La « PCR-SSO » qui consiste en utilisation des sondes oligonucléotidiques spécifiques du système HLA qui sont fixées sur des microsphères de polystyrène possédant chacune des caractéristiques de fluorescence.

Le produit de PCR amplifié est marqué à la biotine au cours de la réaction d'amplification. L'hybridation du produit de PCR sur une bille portant la sonde complémentaire est révélée par un conjugué couplant streptavidine et phycoerythrine. (figure 23)

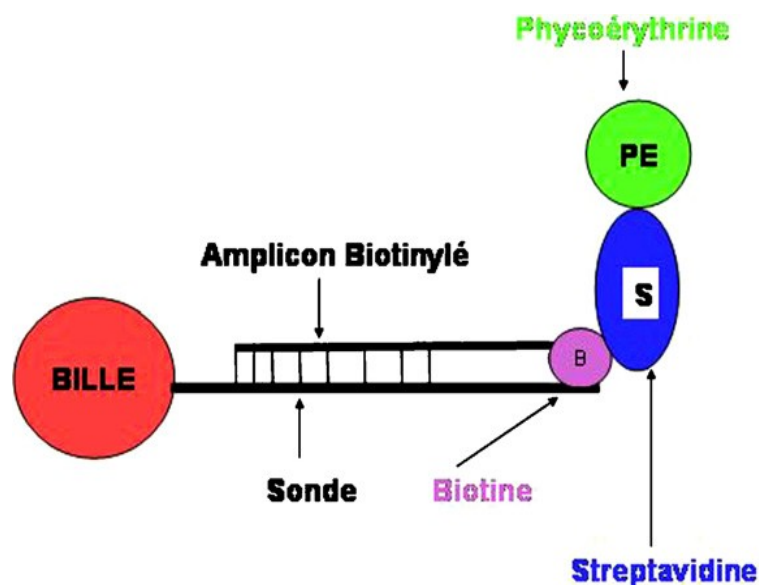


Figure 24: Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex.

## II.3.1. 2. Mode opératoire:

### A. Extraction d'ADN :

Technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus.

L'extraction d'ADN que nous avons réalisé en utilisant le Kit « Quikgene », se fait à partir d'échantillons sanguins prélevés dans des tubes EDTA décongelés à température ambiante après avoir été conservés à -20°C.

Cette technique étant rapide, elle se caractérise par un risque de contaminations réduites, un haut rendement et une très grande pureté, elle se déroule en trois grandes étapes :

#### 1-Phase de lyse :

Dans un tube Eppendorff, on prépare un mélange contenant 30µl de protéinase k qui est reconstituée en lui ajoutant 3,3ml d'eau distillée, elle doit être conservé à 2°C on ajoute 200µl de sang et 250µl de solution de lyse LBD (Lysis Dilution Solution). Le tout est pipeté et homogénéisé ans le Vortex pour 15 seconde. Le mélange est soumis à une centrifugation dans le Flash spin pendant 5 secondes.

Après incubation dans l'étuve pendant 2 min à 56°C on rajoute 250µl d'éthanol absolu à 99%, la solution est à nouveau vortexée et centrifugée.

Le lysat obtenu est transféré dans une colonne CAS (Cartridges) placé sur un tube à déchet WTS (Waste Tube) du Quikgene mini 80 qui est un appareil semi-automatique, utilisé pour optimiser le processus d'extraction en appliquant une pression d'air sur les colonnes : **l'ADN sera fixé sur la membrane de la colonne.**

#### 2- phase de lavage :

Selon le kit « Quickgene » on va procéder à un premier lavage par l'ajout de 750µl de solution de lavage WDB (Wash Dilution Buffer) sur les colonnes du Quikgene mini 80, on appliquant une pression d'air ; un second et un troisième lavage sont effectués.

#### 3-Phase d'élution:

Le tube à déchet est remplacé par un Eppendorff en déplaçant le porte colonne du Quikgene mini 80, l'élution se fait par addition de 200µl de solution d'élution CBD (Elution Buffer) : **permet la récupération de l'ADN génomique dans le tube d'Eppendorff.**

### B. Dosage et contrôle de qualité de l'ADN

Le dosage de l'ADN s'effectue par spectrométrie en mesurant la densité optique à 260nm (A260).

La valeur A260 =1 (DO=1) correspond à environ 50µ /ml d'ADN.

En vue de déterminer le degré de contamination de l'ADN par des protéines on peut procéder a une mesure à 280nm et calculer le rapport A260/A280 : **L'ADN pur devrait situé entre un rapport de 1,65 et 1,80.**

❖ **Mode opératoire :**

Pour le dosage de l'ADN on utilise le NANODROP 2000, spectromètre qui permet l'analyse d'échantillons extrêmement faibles, 1µl à 2µl, sans utiliser de cuvette ni de capillaire, on doit d'abord calibrer le NANODROP par 1µl d'eau physiologique ensuite on ajoute 1µl de solution d'ADN à doser.

**C. Typage des gènes HLA-B par PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide)**

On a réalisé l'amplification de l'ADN extrait à partir du sang total à l'aide du Kit LIFECODES (conservé à -20°C et retiré juste avant l'utilisation) ; pour chaque patient un tube à Eppendorf est préparé contenant : le volume d'ADN, solution de Mix, taq polymérase et H2O.

**Une étape préliminaire qui consiste en la préparation des échantillons :**

Après le dosage de l'ADN, on prépare le mélange de la réaction de PCR dans un Eppendorff à un volume total de 50µl (pour n+1).

❖ **Préparation du volume d'ADN :**

L'ADN est vortexé pendant 20 secondes ; on doit avoir une quantité d'ADN de 150 ng/l pour optimiser la réaction de PCR, pour cela chaque concentration d'ADN sera divisée par 150 qui seront par la suite ajustée avec de l'eau sans nucléase pour parvenir à un volume de 10µl.

Ensuite on procède à la préparation du Mix : dans un second Eppendorff on dépose 15 µl du master mix avec 0.5 µl de taq polymérase et on ajuste avec de l'eau sans nucléases pour atteindre un volume de 40µl, le tout est agité au vortex pendant 20s (On prépare le mélange à n+1).

❖ **Mode opératoire :**

On commence par déposer le volume d'ADN de chaque patients dans un Eppendorf qui est complété avec de l'eau sans nucléase ; à ce stade les Eppendorffs contiennent 10µl d'ADN+H2O.

On distribue des aliquotes de 40µl du Mix dans les Eppendorffs contenant au préalable 10µl du mélange : ADN+H<sub>2</sub>O.

La réaction de PCR se déroule en deux étapes (figure 24) :

### 1. Amplification :

Une fois les échantillons sont prêts, ils sont placés dans le thermocycleur pendant 2h25min en lançant le programme : Luminex ampli (tableau 7)

**Tableau 7:** Programme d'amplification SSO-LIFECODES.

Nombre de cycles	Température	Temps	étape
01	95°C	5min	Dénaturation
08	95°C	30s	Dénaturation
	60°C	45s	Hybridation
	72°C	45s	Elongation
32	95°C	30s	Dénaturation
	63°C	45s	Hybridation
	72°C	45s	Elongation
1	72°C	15min	Elongation
/	4°C		Conservation

La réaction de PCR comprend 32 cycle, elle est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins d'ADN (95° C), une hybridation des amorces aux extrémités des séquences recherché (à 60° C) et une élongation grâce à l'ADN polymérase (72° C)

Ce cycle est amplifié en un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (exon 1 et 2 du gène HLA-B)

### 2. Hybridation :

On préchauffe la solution de sonde fixé sur des billes dans un bloc thermique à 56°C pendant 10 minutes afin de solubiliser les réactifs puis on mélange au vortex durant 15minutes.

Dans une plaque de 96 puits on distribue 5 µl du produit de PCR puis on ajoute 15 µl de solution de sonde dans chaque puits, on recouvre la plaque par un film adhésif pour éviter tout risque d'évaporation. A l'aide d'un agitateur de plaque « IKA MS 3 digital » on homogénéise la préparation avant de la mettre dans le thermocycleur pendant 45 minutes en suivant le programme Luminex hybri (tableau 8)

**Tableau 8:** Programme d'hybridation

Temps	Température
5min	97°C
30min	47°C
10min	56°C

Pendant l'hybridation des échantillons, on procède à la préparation de la solution de Streptavidine-PE : dans un tube sec on mélange 170µl de solution de dilution (DS) et de 0.85 µl de la solution de Streptavidine-PE concentrée par échantillon ; le tube doit être conservé à l'abri de la lumière car il est photosensible.(tableau 9)

**Tableau 9:** Volume de dilution de la Streptavidine-PE

Nombre d'échantillons	Solution de dilution (µl)	Streptavidine-PE (µl)
1	170	0,85
5	850	4,25
10	1700	8,5
20	3400	42,5

Une fois l'hybridation achevée, on ajoute 170 µl de solution de Streptavidine-PE dilué dans chaque puits.

❖ **Analyse des échantillons :**

On place la plaque dans l'appareil Luminex (ANNEXE N°5 : figure 23) qui est basé sur le principe de la cytométrie en flux à deux lasers :

- ❖ Un laser rouge excite les fluorochromes incorporés à la microsphère servant de support à la sonde => permet de définir l'allèle présent.
- ❖ Un laser vert excite la molécule porteuse « Phycoérythrine » => permet de détecter la réaction: ampli-sonde.

❖ **Interprétation :**

La fluorescence émise détermine la positivité de la réaction, en fonction des données brutes qui seront normalisées par rapport au seuil de fluorescence propre à chaque microsphères et ensuite traduites en intensité de réaction (scores de 1 à 8).

## Typage HLA par PCR-SSO

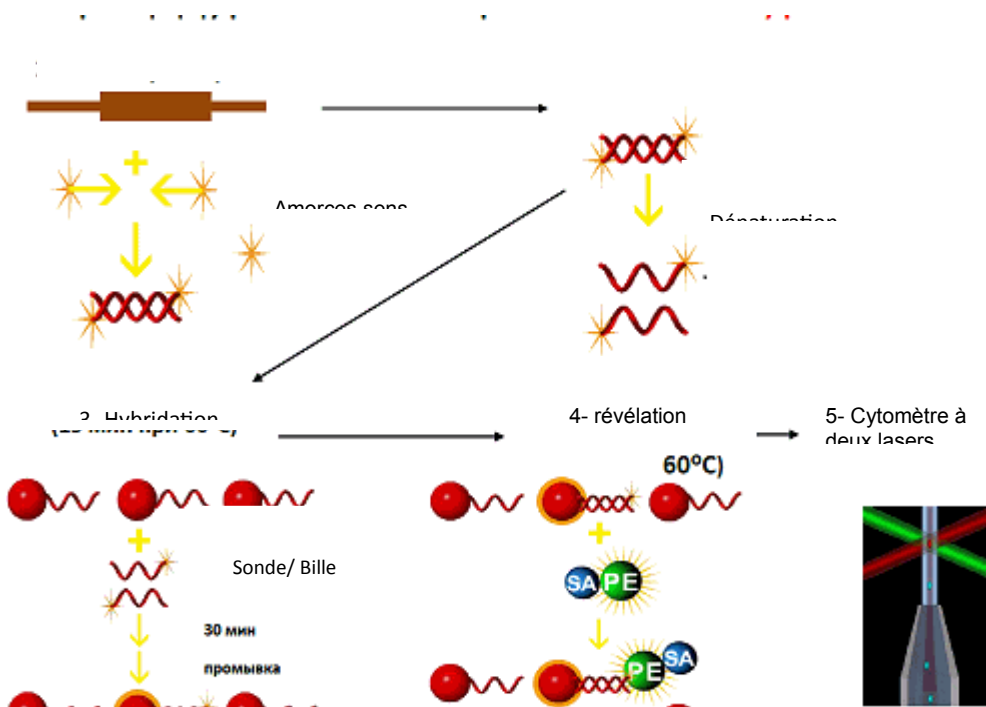


Figure 25: Réaction de PCR-SSO

### ❖ Lecture des microplaques :

Le cymomètre est équipé d'un lecteur de microplaque de 96 puits piloté par un ordinateur, les billes excitées sont détectées et comptées jusqu'à ce que chacune d'entre elles ait été détectée au minimum 100 fois par un logiciel d'acquisition des données qui permet également d'éliminer les doublets de billes. (ANNEXE N°6: figure 23)

### ❖ La classification des billes :

Les nuages de billes correspondent à la fluorescence rouge et infrarouge émise par les billes qui détermine la positivité de la réaction en fonction des données brutes qui seront normalisé par

rapport au seuil de fluorescence propre à chaque bille et transmise en intensité de réaction de 1 à 8. (ANNEXE N°6 : figure 24)

Le logiciel d'interprétation Quick-type établit le type d'allèle en catégorisant chaque bille par sa fluorescence.

#### **II.4. Statistiques:**

Le test du  $\chi^2$  a été calculé à l'aide du logiciel Compare 2 afin de déterminer le degré d'association du gène HLA-B\*27 à la spondylarthrite ankylosante.

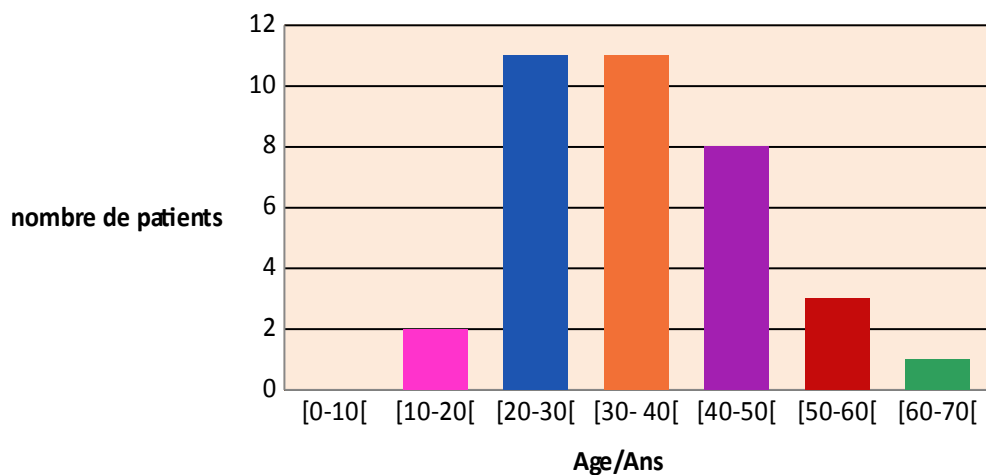
Ce degré est considéré comme significatif quand il est inférieur à 0,05 ( $P < 0,05$ ).

# RESULTATS ET DISCUSSION

## III. 1. Evaluation de l'âge moyen des patients :

L'âge moyen des 36 patients est de 32,33 ans avec des extrêmes de 15 ans à 60 ans (figure 27).





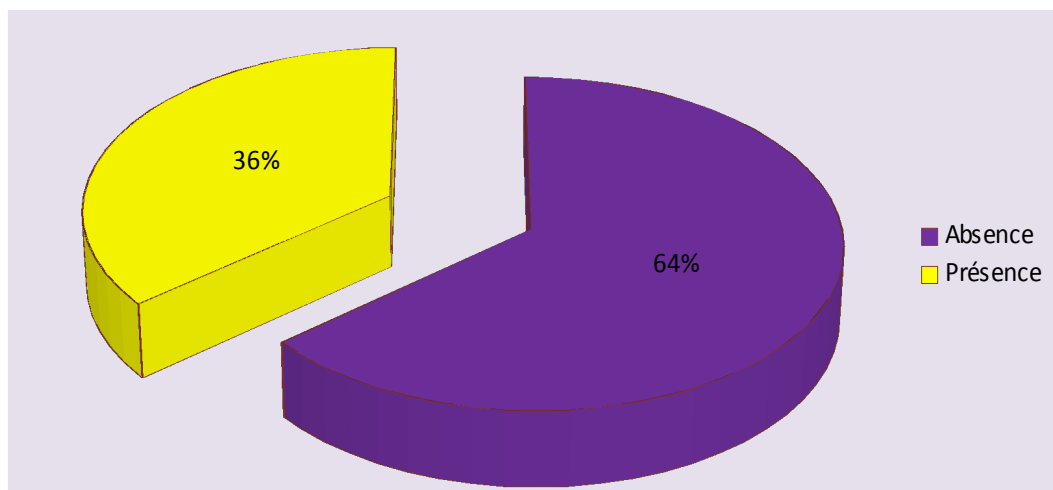
**Figure 29:** Répartition des patients selon les tranches d'âge.

Dans une précédente étude réalisée en Algérie, l'âge moyen était de 35 ans (Amroun *et al.*, 2010). Le résultat de notre étude est sensiblement comparable à ce qui a été rapporté en Corée (33,2 ans) (Tae-Jong *et al.*, 2010), mais est inférieur à ce qui a été observé au Maroc 37,6 ans (Belkhou *et al.*, 2013) et en Turquie 39,1 ans (Gunal *et al.*, 2008).

### III. 2. SpA et antécédents familiaux:

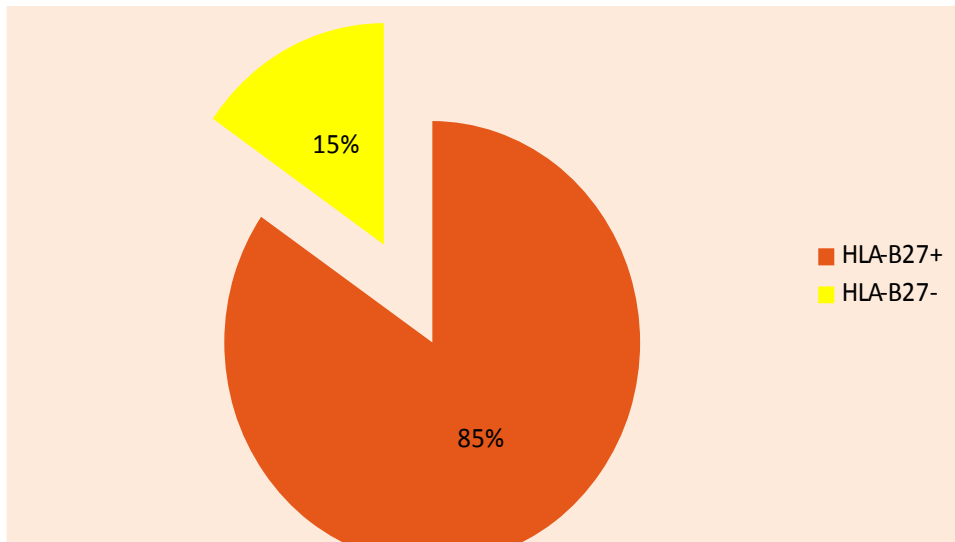
La présence d'antécédents familiaux chez les patients atteints de la spondylarthrite Ankylosante est estimée à 36% (13/36) ce qui pourrait suggérer l'implication d'une part génétique dans le déterminisme de la maladie (Wendling, 2008), par contre 64% (29/36) des patients n'avaient pas une histoire familiale avec la Spa (Figure 28)

Notre résultat se rapproche d'une étude turque où une histoire familiale de spondylarthrite ankylosante chez les patients a été enregistrée de 12,5% (14/112) (Gunal *et al.*, 2008).



**Figure 30:** Répartition des patients SpA selon les antécédents familiaux.

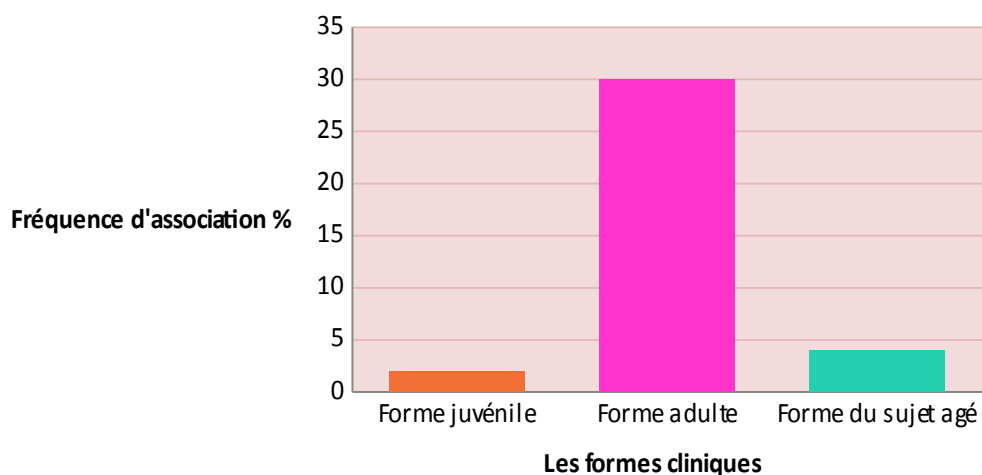
Parmi les 13 patients présentant des antécédents familiaux, 85% (11/13) sont porteurs du gène HLA-B27 alors que seulement deux patients négatifs pour HLA-B27 avaient une histoire familiale avec la SpA (figure 29), ce qui pourrait renforcer l'implication du gène HLA-B27 dans la pathogénie de la spondylarthrite ankylosante; ces résultats rejoignent ceux rapportés par une étude turque. (Gunal *et al.*, 2008)



**Figure 31:** HLA-B27 et antécédents familiaux.

### III. 3. Fréquence des formes cliniques:

Dans notre étude la forme adulte est dominante. En effet, elle concerne 83,3% (30/36) des patients. La forme du sujet âgé a une fréquence de 11% (4/36) et celle de la forme juvénile ne représente que 5,5% (2/36) (figure 30).



**Figure 32:** Répartition des patients en fonction des formes cliniques.

Nos résultats concordent avec ceux d'une étude algérienne (Amroun *et al.*, 2010) qui a trouvé une prédominance de la forme adulte avec une fréquence de 68,6%, suivie de la forme juvénile et de la forme du sujet âgé avec respectivement 26% et 5,4%.

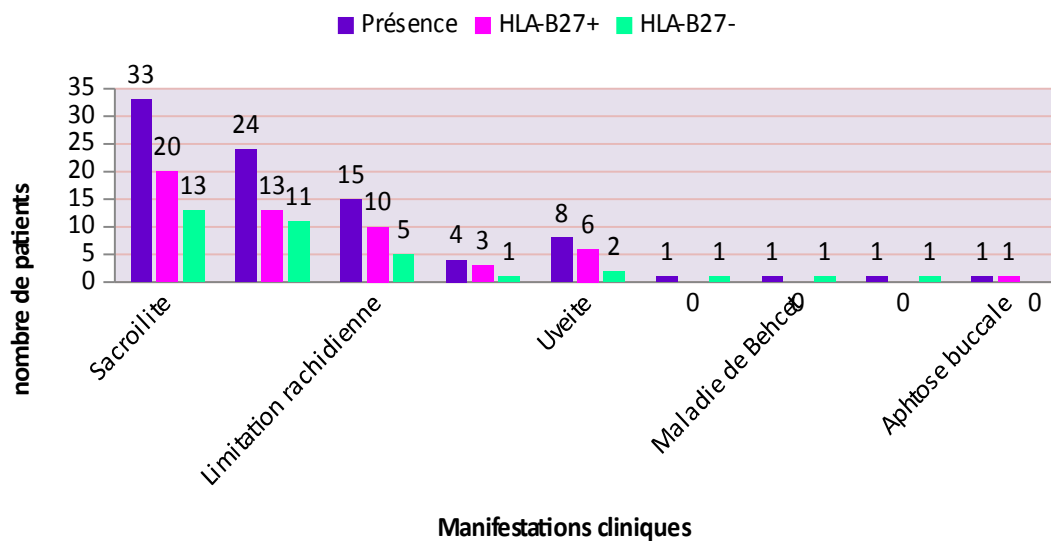
#### III. 4. Evaluation des signes cliniques:

La SpA se caractérise par des atteintes : rachidiennes, périphériques et des manifestations extra-articulaires.

L'atteinte axiale est prédominante chez la majorité des patients (Figure 31) qui se manifeste par: une sacroilite, une rachialgie inflammatoire et une limitation rachidienne observé respectivement chez : 100% (20/20), 65% (13/20), 50% (10/20) pour les patients HLA-B27+, alors qu'ils ne sont que de : 81% (13/16), 68,5% (11/16), 31,8% (5/16) chez les patients HLA-B27 négatif.

L'atteinte articulaire périphérique n'est présente que chez 15% des patients HLA-B27+ et à 6% chez les patients HLA-B27-, il s'agit de l'arthrite.

Les manifestations extra-articulaires, particulièrement l'uvéite, est observée chez 30% (6/20) des sujets HLA-B27+ alors que seulement 6,25% chez les sujets HLA-B27-, l'uvéite peut parfois constituer un signe révélateur de la maladie et précéder à de longue date les lombalgies inflammatoires. (Freeston *et al.*, 2007)



**Figure 33:** Les manifestations cliniques chez les patients atteints de la SpA.

Les résultats obtenus concordent avec les précédents travaux qui montrent une évolution clinique plus sévère chez les patients HLA-B27+. (Freeston *et al.*, 2007)

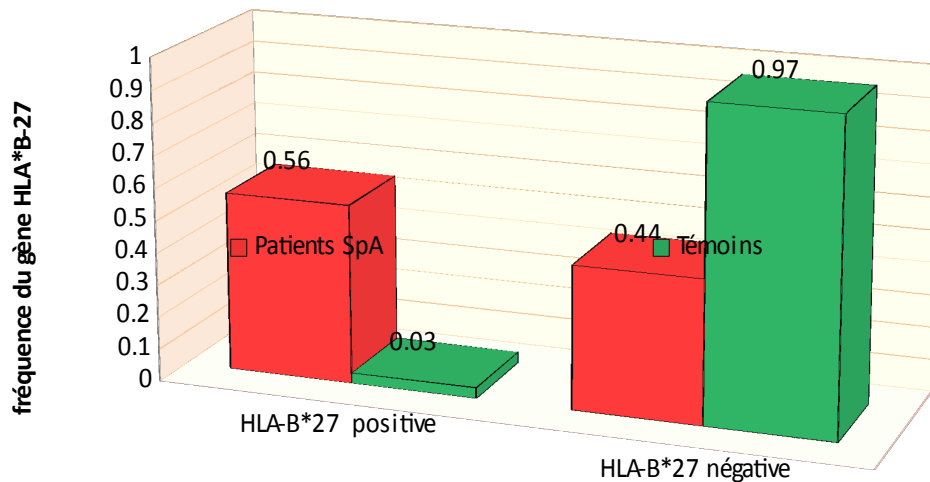
### III.5. Evaluation de la fréquence du gène HLA-B\*27:

Parmi les 36 patients atteints de la SpA, 55,56% (20/36) étaient porteurs du gène HLA-B\*27, alors que seulement 3,3% des témoins sont HLA-B\*27+; la fréquence est significativement différente ( $P=3,8.10^{-9}$ , OR= 36,25) (Fig. 32, Tableau 9).

**Tableau 9 :** Fréquence du gène HLA-B\*27 chez les patients atteints de la spondylarthrite ankylosante et les témoins.

Patients SpA	Fréquence d'association n	Fréquence d'association n	Odds Ratio	IC à 95%	P
	« patients »	« témoins »			
HLA-B*27 positifs	55,56 %	3,33 %	36,25	[7,243-335,784]	3,8. ...
HLA-B*27 négatif	44,44 %	96,67 %	0,03	[0,003-0,138]	3,8.

La figure suivante (Fig. 32) représente la distribution du gène HLA-B\*27+ chez les patients et les témoins.



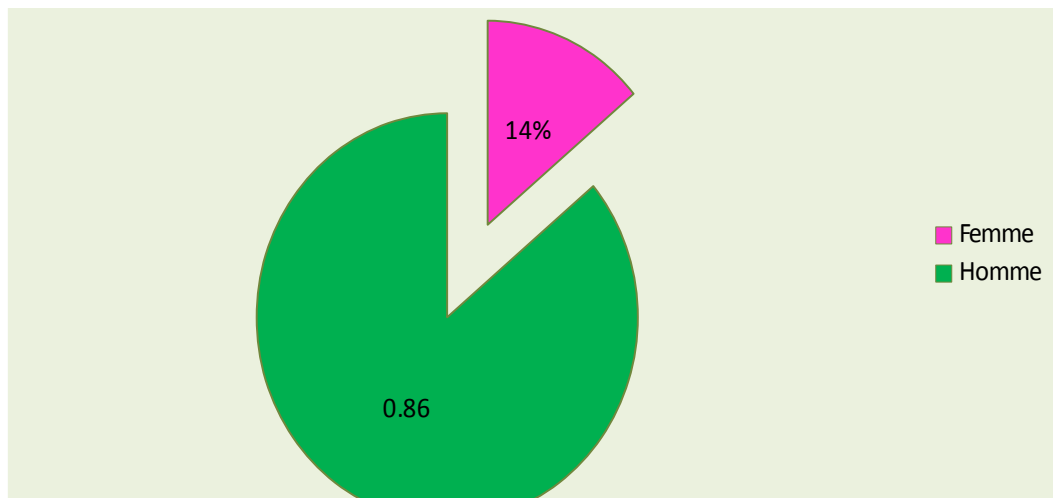
**Figure 34** : Fréquence du gène HLA-B\*27 chez les patients et les témoins.

Le résultat de l'étude présente se rapproche de ce qui a été rapporté dans des travaux réalisés dans différentes parties du monde: 61% vs 3,3% en Algérie (Amroun *et al.*, 2010), 63% vs 6% pour la population marocaine (Belkhou *et al.*, 2013), 52% en Tunisie (Frikhaa *et al.*, 2006) et 60% en Afrique du sud (Burch *et al.*, 1999). Les populations caucasiennes atteintes de la SpA sont porteuses du gène HLA-B\*27 dans 90% des cas (Slobodin *et al.*, 2012). Les fréquences estimées en France sont de 75% vs 6,9% (Costantino *et al.*, 2013), en Angleterre elles sont de l'ordre de 96% vs 4% (Brewerton *et al.*, 1973), en Espagne de 94% et 80% en Grèce (Fernandez-Sueiro *et al.*, 2004).

Par conséquent, la fréquence d'association de HLA-B27 avec la SpA varie en fonction de la race et de l'ethnie. Une évaluation robuste de la fréquence de l'allèle HLA-B27 requiert un effectif de taille important. La méthode de typage utilisée constitue également un facteur essentiel dans la détection de l'allèle HLA-B27. En effet, les techniques de typage ont évolué de méthodes sérologiques vers des méthodes de biologie moléculaire plus résolutes et donc plus sensibles (PCR-SSP et PCR-SSO). (Moalic *et al.*, 2005)

### III. 6. Rapport homme/femmes:

La prédominance masculine semble être confirmée dans notre étude. Parmi les 36 patients atteints de la spondylarthrite ankylosante il est noté une prédominance masculine de 88% (31/36) alors que les femmes ne représentent que 14% des patients (5/36) (Figure 33).



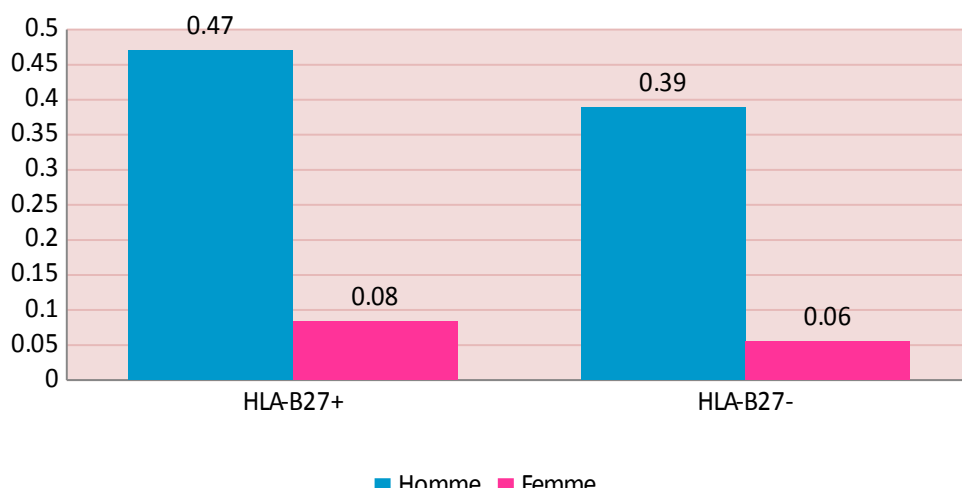
**Figure 35:** Répartition des patients selon le sexe.

Le rapport est de 6, supérieur à l'estimation de 2,5 trouvée dans une étude effectuée en Algérie (Amroun *et al.*, 2010). Cela pourrait s'expliquer par la taille de l'effectif plus élevée, 200 patients remplissant les critères de classification modifiés de New York pour la SpA. La même observation pourrait-être faite avec les autres pays chez qui le rapport a été estimé à : 1,5 au Maroc (Belkhou *et al.*, 2013), 2,27 en Tunisie (Ben Radhia *et al.*, 2008), 6,3 en Jordanie (Askari *et al.*, 2000) et 1,8 en Turquie (Gunal *et al.*, 2008).

La prédominance masculine pourrait être due à l'existence d'un gène de susceptibilité lié au sexe codant pour une protéine qui provoquerait la surexpression des molécules HLA-B\*27 (Seignale, 2004) ou il se pourrait que la maladie soit moins bien connue chez les sujets féminins.

Chez les 20 patients porteurs du gène HLA-B\*27 nous retrouvons une prédominance masculine de 85% (17/20) par contre chez les sujets du sexe féminins la fréquence est de 15% (3/20), ce qui confirme la prédominance masculine de notre étude (figure 34).

Ces données rejoignent celle citées dans une étude coréenne, qui est de l'ordre de 94,9% ( Tae-Jong *et al.*, 2010).



**Figure 36:** Fréquence de HLA-B\*27 chez les patients en fonction du sexe.

### III. 7. HLA-B\*27 et l'âge d'apparition de la maladie:

L'âge moyen d'apparition de la maladie est de  $35,27 \pm 10,69$  ans (Tableau 10), elle est similaire aux résultats d'une étude tunisienne (Ben Radhia *et al.*, 2008) qui était de  $36,5 \pm 15,2$ , par contre elle reste plus élevée que celle trouvée dans d'autres études :  $29,19 \pm 9,5$  ans chez la population algérienne (Amroun *et al.*, 2010), 30,5 ans au maroc (Belkhou *et al.*, 2013) et 23 ans en turquie (Gunal *et al.*, 2008).

**Tableau 10 :** Age moyen d'apparition de la SpA chez les patients.

	Age moyen d'apparition	Nombre
<b>Patients SpA</b>	$35,27 \pm 10,69$ ans	36
<b>HLA-B*27 positifs</b>	$33,47 \pm 9,156$ ans	20
Homme	$32,82 \pm 9,52$ ans	17
Femme	$39,66 \pm 17,78$ ans	3
<b>HLA-B*27 négatif</b>	$37,56 \pm 12,27$ ans	16
Homme	$37,01 \pm 13,09$ ans	14
Femme	$41 \pm 1,41$ ans	2

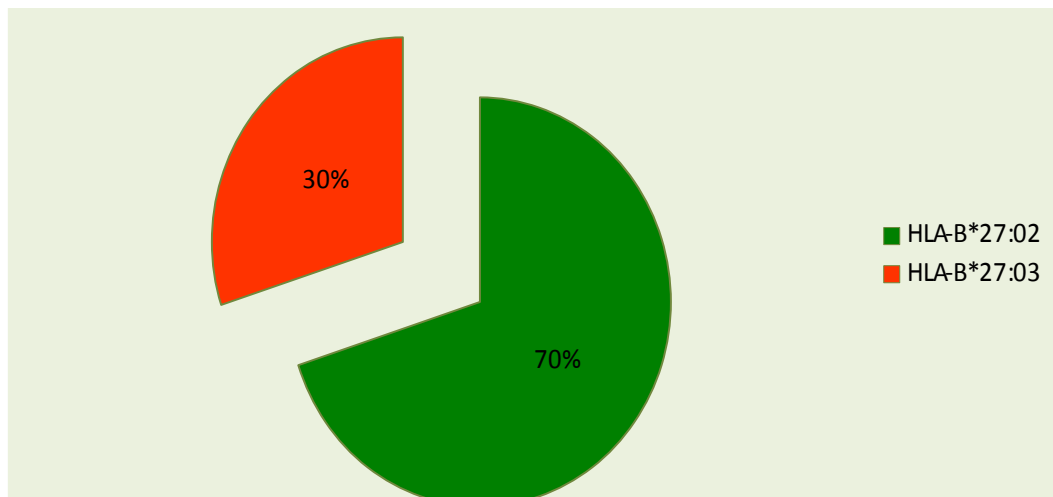
Il semblerait que les femmes aient un âge tardif de début de la maladie par rapport aux hommes, tel que cela est observé chez les patients HLA-B\*27+ et HLA-B\*27-. Une observation similaire est rapportée par Tae-Jong *et al.*, (2010) en Corée. Mais un échantillon plus large est nécessaire pour avoir une évaluation plus exacte de la réalité de la survenue de la maladie chez la femme.

D'après nos résultats, il semblerait que la présence de HLA-B\*27 permettrait le déclenchement précoce de la SpA.

### III. 8. Fréquence des sous types de HLA-B\*27:

HLA-B\*27 comprend un grand nombre de sous types qui sont distribués selon les origines ethnico-géographique de la population étudiée (Blanco-Gelaz *et al.*, 2001; Dakware *et al.*, 2008).

Dans notre étude, deux sous-types ont été détectés : HLA-B\*27:02 (B\*2702) et HLA-B\*27:03 (B\*2703) avec une fréquence respective de : 70% et 30% (figure 35).



**Figure 37:** fréquence des sous types HLA-B\*27.

La prédominance de HLA-B\*27:02 concorde avec les données de la littérature. En effet, l'allèle HLA-B\*27:02 s'observe chez les caucasiens méditerranéens (Talpin, 2013) avec une distribution européenne Sud-est et Nord-Ouest. En Algérie, Amroun *et al.*, (2010) note une fréquence de 59,83% du B\*27:02 et 40,16% du B\*2705, ces résultats sont confirmés par une étude récente effectuée sur la population tunisienne et qui souligne la prédominance du HLA-B\*27:02 dans le périmètre méditerranéen (Ben Radhia *et al.*, 2008).

Selon une étude turque, l'allèle HLA-B\*27:02 est clairement associé avec la SpA, il est présent dans 4-10% des patients Nord européens, 20% en Espagne et au Portugal et 55% dans les populations Arabes (Oguza *et al.*, 2004) et juives avec une fréquence de 54%. (Alaez C *et al.*, 2007)

En Europe, HLA-B\*27:02 et HLA-B\*27:05 sont associés à la SpA avec une prédominance du HLA-B\*27:05 qui est considéré comme l'allèle ancestral (Marcilla *et al.*, 2008).

Par ailleurs, dans notre étude, il est noté la présence du HLA-B\*27:03, allèle qui diffère du HLA-B\*27:05 par un seul acide aminé, et suit une distribution principalement Ouest africaine (Wendling, 1998; Diaz-Pena *et al.*, 2012). Son association avec la SpA demeure méconnue. (Thomas *et al.*, 2010)



La répartition des différents allèles du gène HLA-B\*27 est un marqueur de la dynamique des populations, en effet, elle peut être révélatrice des flux migratoires. (Lopez-Larrea C *et al.*, 2009) La présence du sous type HLA-B\*27:02, marqueur de la population caucasienne indique bien la présence dans la population algérienne d'un brassage de populations d'origines diverses.

Si le rôle du gène HLA-B\*27 dans la pathogénie de la SpA ne fait pas de doute, son mécanisme est non éclairci; de nombreuses théories ont émergé (Robinson *et al.*, 2012). Selon l'hypothèse du peptide arthritogène capable d'induire une réponse inflammatoire médiée par les LT CD8+ auto-réactifs qui peuvent également reconnaître des peptides dérivés de pathogènes ressemblant à des peptides du soi, rompant ainsi le système de tolérance du soi et conduisant à une réponse auto-immune et à une inflammation (Toussirot *et al.*, 2006).

La lenteur du repliement de la chaîne lourde de HLA-B\*27 dans le RE pourrait déclencher une surcharge de protéines mal repliées et engendrer un stress du RE avec comme conséquence l'activation des TH17, une seconde propriété biochimique est la tendance accrue des molécules HLA-B\*27 à se dimeriser et s'exprimer à la surface cellulaire, il peut s'en suivre une interaction inhabituelle entre ces homodimères et des LT CD4+, des récepteurs exprimés sur les polynucléaires « LILRs » ou les cellules NK « KIR » (Berthelot *et al.*, 2002 ; Dowlearn, 2011; Toussirot *et al.*, 2006).

La compréhension du rôle génétique du gène HLA-B\*27 dans le déterminisme de la spondylarthrite ankylosante est un processus long et complexe, cependant les données actuelles convergent vers l'importance du misfolding du B27 dans la genèse d'une réponse inflammatoire, notamment l'induction de la voie IL-23 avec une différenciation lymphocytaire Th17. (Miceli-Richard., 2010)

S'il est acquis que le gène HLA-B\*27 constitue le facteur prédisposant à la SpA (Talpin, 2013), des données de la littérature suggèrent que la SpA est une maladie polygénique (Maolic, 2010). Une étude récente GWAS (Maolic, 2010) a révélé l'association d'ERAP1 avec la SpA chez les patients HLA-B\*27+, cette association résulte d'une perte de fonction d'ERAP1 (Abdullah *et al.*, 2014).

La SpA est une maladie multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques, environnementaux et des modifications de la réponse immunitaire (Toussirot *et al.*, 2006).

**CONCLUSION**

L'association de l'antigène tissulaire HLA-B\*27 et la spondylarthrite ankylosante demeure l'une des plus fortes associations entre un gène du CMH et une maladie inflammatoire, cependant la physiopathologie de la SpA reste mystérieuse, elle nécessite la compréhension du rôle de la génétique, des facteurs environnementaux de types bactériens mais aussi de la réponse immunitaire.

L'objectif de notre travail a été de déterminer la susceptibilité du gène HLA-B\*27 dans la SpA chez une population algérienne par l'utilisation de la technique PCR-SSO.

Notre étude incluait 36 patients (31 hommes et 05 femmes) atteints de la SpA, le rapport homme/femme était de 6, la moyenne d'âge était de  $35,27 \pm 10,69$  ans.

La fréquence du gène HLA-B\*27 est de 55,56% chez les patients et 3,33% chez les témoins, deux sous types ont été retrouvés dans notre étude : HLA-B\*27 :02 et HLA-B\*27 :03.

Les résultats obtenus lors de cette étude concordent avec les données de la littérature, pour le sous-type HLA-B\*27 :02, par contre le sous-type HLA-B\*27 :03 est signalé pour la première fois en Algérie.

Les nouvelles technologies de biologie moléculaire, à savoir l'étude de liaison génétique et le génotypage des SNP permettraient de préciser de nouveaux gènes ou allèles pouvant être des facteurs de susceptibilité de cette maladie et d'en démontrer le rôle exact dont le gène ERAP1.

Une meilleure estimation de la fréquence du gène HLA-B\*27 et de ces différents sous-types dans la population algérienne devrait faire l'objet d'une étude plus étendue impliquant un effectif plus important et des techniques de détection plus sensible telle que la PCR-SSO.

## **REFFERENCES**

Abbas A., Lichtman A.(2009). Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Masson P. 290 pages.

Abdullah H., Haroon N. (2014). The role of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) in Ankylosing Spondylitis. *Indian journal of Rheumatology*, 9 : 14-18.

Amroun H., Salah S., Allat R., Louzai Y., Meçabih F., Djoudi H., Abbadi M., Tamouza R. (2010). Distribution des sous-types HLA-B27 et susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante dans une population du grand Alger. *Revue Algerienne d'immunologie et d'immunopathologie*, 16-20.

Alaez C., Gazit E., Ibarrola B., Yaron M., Livneh A., Avishai O., Gorodezky C . (2007). Distribution of HLA-B27 Subtypes in Ankylosing Spondylitis in an Israeli Population. *Archives of Medical Research*, 38: 452-455.

Askari A., Al-Bdour M., Saadeh A., Sawalha A. (2000). Ankylosing spondylitis in north Jordan: descriptive and analytical study. *Ann Rheum Dis*, 59: 571

Astier F., Guillot X., Cook-Moreau J. (2013). Épidémiologie, étiologie et physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante. *Actualités pharmaceutique*, 52 : 1-5.

Belkhou A., Bakri Y., Yakoubi H., Amine M., Niamane R., El Hassani S. (2013). Prévalence du gène HLA B-27 dans la spondylarthrite ankylosante au Maroc. *Revue Marocaine de Rhumatologie*, 25 : 38-41.

Ben Radhia K., Ayed-Jendoubi S., Ben Romdhane I., Makhoul M., GorgiY., Ayed K. (2008). Distribution des sous-types *HLA-B27* en Tunisie et leur association avec la spondylarthrite ankylosante. *Revue de Rhumatisme*, 75 : 250-253.

Benhalima M, (2009). Méthode d'étude du polymorphisme HLA. Faculté de médecine d'Alger.

Berthelot JM., Glémarec J., Guillot P., Laborie Y., Maugars Y. (2002). Nouvelle hypothèses concernant la pathogénie des spondylarthropathies. *Rev Rhum*, 69: 197-206.

Blanco-Gelaz M., Lopez-Vasquez A., Garcia-Fernandez S., Martinez-Borra J., Gonzalez S., Lopez-Larrea C. (2001). *Human Immunology*, 62 :1042-1050.

Bowness P., Zaccari N., Bird L., Jones Y. (1999). HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Expert reviews in molecular medicine*, 1462-3994.

Braun J., Sieper J., Zink A. (2012). The risks of smoking in patients with spondyloarthritides. *Ann Rheum Dis*, 71: 791-792.

Brewerton DA., Hart FD., Nicholls A., Caffrey M., James DC., Sturrock RD. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* **28** : 904–907.

Brown MA., Kennedy LG., Macgregor AJ., Darke C., Duncan E., Shatford JL., Taylor A., Burch V., Issacs S., Kalla A. (1999). Ethnicity and Patterns of spondyloarthritis in South Africa analysis of 100 Patients. *The Journal of rheumatology*, 26.

Cesbron A., Gagne K., Retière C., Devys A., Bignon J. (2007). système HLA. EMC, 13-000-M-53.

Costantino F., Breban M. (2013). Génétique des spondylarthrites, *réalité en rhumatologie*. CNRS UMR 8104.

Costantino F., Talpin A., Said-Nahal R., Goldberg M., Henny J., Chiocchia G., Garchon H., Zins M., Breban M. (2013). Life-time Prevalence of Spondyloarthritis in Reference to HLA-B27 in a French Worker Population: Results of the GAZEL Cohort.

Dakware E., Reddy J., Vale F., Uribe J. (2008). A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurology Focus*, 24.

Diaz-Pena R., Lopez-Vazquez A., Lopez-Larrea C. (2012). Old and new HLA associations with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* : 80, 205-213.

Dougados M., Beten D. (2011). Spondyloarthritis. *Arthritis* 2. 377: 2127-2137.

Dowlearn E. (2011). A review of the molecular and genetic foundations of Ankylosing Spondylitis. A Senior Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for graduation in the Honors Program

Fernandez-Sueiro JL., Alonso C., Blanco FJ., Rodriguez-Gomez M., Galdo F., Gonzalez-Gay MA. (2004). Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain. *Clin Exp Rheumatol*, 22 : 465-468.

Freeston J., Barkham N., Hensor E., Emery P., Fraser A. (2007). Spondylarthrite ankylosante, positivité de HLA-B27 et utilisation des biotherapies. *Revue du Rhumatisme*, 74 : 232-236.

Frikhaa F., Marzouka S., Jalloulia M., Friguia M., Kaddoura N., Jribia S., Meftaha S., Grinea S., Bahloula Z. (2006). La spondylarthrite ankylosante: étude d'une série de 83 cas. *Revue du Rhumatisme*, 73 : 1251.

Gunal EK., Oguz Sarvan F., Kamali S., Gul A., Inanc M., Carin M., Konice M., Aral O., Ocal L. (2008). Faible fréquence d'HLA-B27 chez des patients atteints de spondylarthrite ankylosante en Turquie. *Revue de Rhumatisme*, 75 : 433-437.

López de Castro J. (2014). The pathogenesis of ankylosing spondylitis: HLA-B27 and beyond. *Molecular Immunology*, 57 : 1.

Lopez-Larrea C., Diaz-Pefia R., (2009). Molecular Mechanisms of Spondyloarthropathie. *Landes Bioscience and Springer Science*: 159-176

Lories R., McInnes L. (2012). Primed for inflammation: enthesitis-resident T cells. *Nature Medicine*, 18 : 1069-1076.

Maolic V. (2010). Immunogénétique de la Spondylarthrite ankylosante. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 25 : 123-128.

Marcilla M., Lopez de Castro J. (2008). Peptides : the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenic rôle in spondyloarthritis. *Tissue Antigens*, 71: 495-506.

Mathieu A., Paladini F., Vacca A., Cauli A., Fiorillo M., Sorrentino R. (2009). The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: A unifying hypothesis. *Autoimmunity Reviews*, 8: 420–425

McHugh K., Bowness P. (2012). The link between HLA-B27 and SpA—new ideas on an old problem. *Rheumatology*, 51: 1529-1539.

Miceli-Richard C. (2010). HLA B27 et spondyloarthropathies. *Revue du rhumatisme monographies*, 77 : 288–292.

Miceli-Richard C. (2010). HLA-B27 et Spondyloarthropathies. *Revue du rhumatisme monographique*, 77 : 288-292.

Moalic V., Ferec C. (2005). Typage HLA, méthodes d'analyses et applications cliniques. *Presse Med*, 34: 1101-1108.

Oguza F., Ocalb L., Dilera A., Ozkula H., Ascioglua F., Kasapoglub E., Bozkurtc G., Koniceb M., Carina M. (2004). HLA B-27 subtypes in turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Disease Markers*, 20: 309–312.

Pertuiset E. ( 2008). Diagnostic précoce des spondylarthropathies. *La Revue de médecine interne*, 29 : 596-605.

Pham T. (2008). Physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante. *Actualités. Revue du Rhumatisme*, 75: 925–930.

Ramos M., Lopez de Castro J. (2002) HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens*, 60: 191–205.

Raychaudhuri S., Deodhar A. (2014). The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis. *Journal of Autoimmunity*, 48 : 128-133.

Reveille J. (2006). Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best practise & research clinical Rheumatology*, 20: 601-609.

Reveille J. (2012). Genetics of spondyloarthritis \_beyond the CMH. *Nat.Rev Rheumatol*, 8: 296-304.

Robinson P., Brown M. (2012). The genetics of ankylosing and axial spondylarthritis. *Rheum Dis clin*, 38: 539-553.

Robinson P., Brown M. (2013). Genetics of ankylosing spondylitis. *Molecular Immunology*, 57: 2-11.

Seignale J. (2004). L'alimentation ou la troisième médecine. François Xavier de Guibert, Paris. 658, 191-205.

Semana G., Quelvenec E. (2002). Exploration du système HLA : Pratiques et indications. *Revue Française des Laboratoires*, N°341.

Slobodin G., Rosner I., Rimar D., Boulman N., Rozenbaum M., Odeh M. (2012). Ankylosing Spondylitis: Field in Progress. *Revue IMAJ*, 14 : 763-767.



Tae-Jong K., Tae-Hwan K. (2010). Aspect clinique de la spondylarthrite ankylosante en Corée. *Revue de Rhumatisme*, 77 : 273-278.

Talpin A. (2013). Complexe majeur d'histocompatibilité et génomique fonctionnelle dans les spondylarthrites. Thèse de doctorat en Génétique humaine. Université Paris Descartes, 231p.

Tam LS., Gu J., Yu D. (2010). Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat. Rev. Rheumatol*, 6: 399-405.

Thomas G., Brown M. (2010). Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunological reviews*, 233 : 162-180.

Toussirot E. (2013). Des spondylarthropathies aux spondylarthrites: vers une nouvelle dénomination pour un diagnostic précoce et de nouvelles indications thérapeutiques?. *La revue de médecine interne*, 34 : 661-666.

Toussirot E., Wendling D. (2006). Immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante. *La revue de médecine interne*, 27 : 762-711.

Wendling D. Spondylarthrite ankylosante. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Appareil locomoteur*, 14-230-A-10, 1998, 14 p.

Wordsworth P. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum*, 30:1823–1828.

Zambrano-Zaragoza J., Agraz-Cibrian J., González-Reyes C., Durán-Avelar M., Vibanco-Pérez N. (2013). Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes. *International Journal of Inflammation*, Article ID 501653: 16 pages. doi: 10.1155/2013/501653.

## ANNEXE N°1

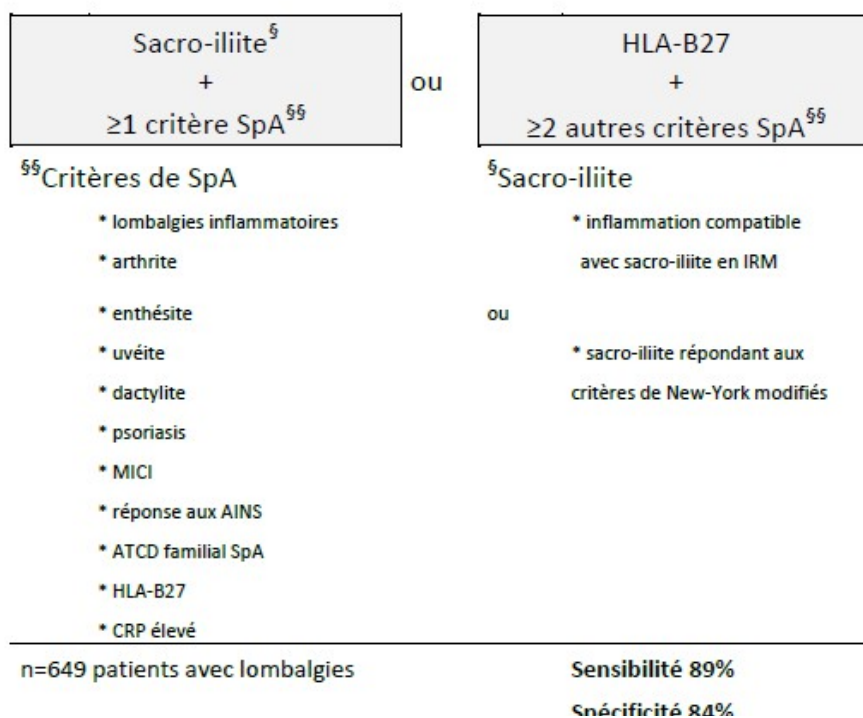
**Tableau 6** : les critères de classifications des Spondylarthrite Ankylosante modifiés de New-York en 1984.

Critères de classification de la spondylarthrite ankylosante (SPA) : critères de New York modifiés (1984) :	
<b>1. Critère radiologique</b>	
Sacro-illite radiologique : bilatérale de grade $\geq$ II OU unilatérale de grade III ou IV	
<b>2. Critères cliniques</b>	
2.1.	Lombalgies avec raideur de plus de trois mois, améliorées à l'effort, mais ne cédant pas au repos
2.2.	Limitation des mouvements du rachis lombaire à la fois dans le plan frontal et sagittal
2.3.	Limitation de l'ampliation thoracique par rapport aux valeurs normales corrigées pour l'âge et le sexe

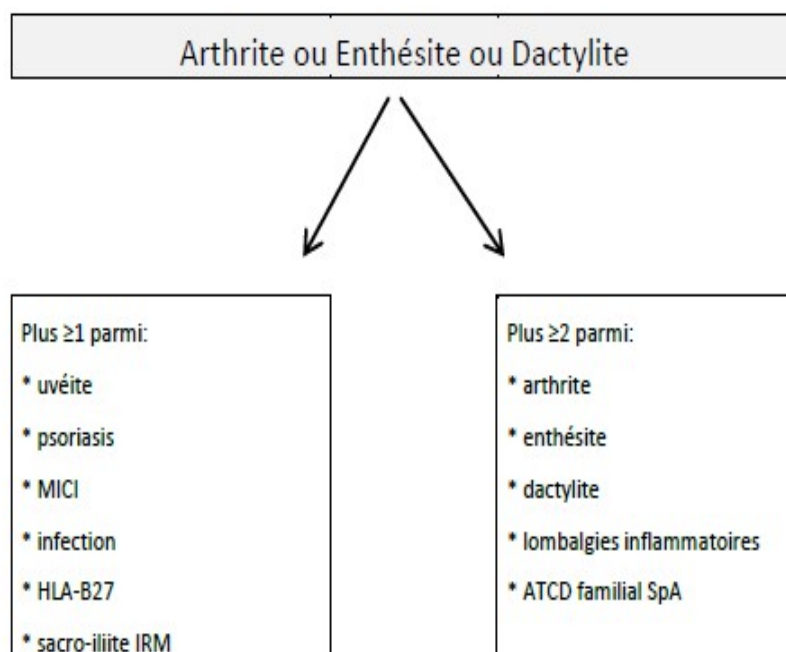
Le diagnostic de la SpA est retenu si au moins un des trois critères cliniques et le critère radiologique sont remplis. (Raychaudhuri *et al.*, 2014)

## ANNEXE N°2 :

**Tableau 7:** Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite axiale. (Raychaudhuri *et al.*,2014)



**Tableau 8:** Critères de classification ASAS pour la spondylarthrite périphérique. (Raychaudhuri *et al.*,2014)



## ANNEXE N°3 :

Les figures d'appareillages utilisés :



1-Vortex

2- Flash spin

**Figure 14:** Représentation du vortex et le flash spin.



1-Quikgene min 80

2- Les colonnes CAS (Cartridges)

3- déchet WTS (Waste Tube)

**Figure 15:** L'appareil Quikgene mini 80 et ses constituants.



**Figure 16:** Le NANODROP.



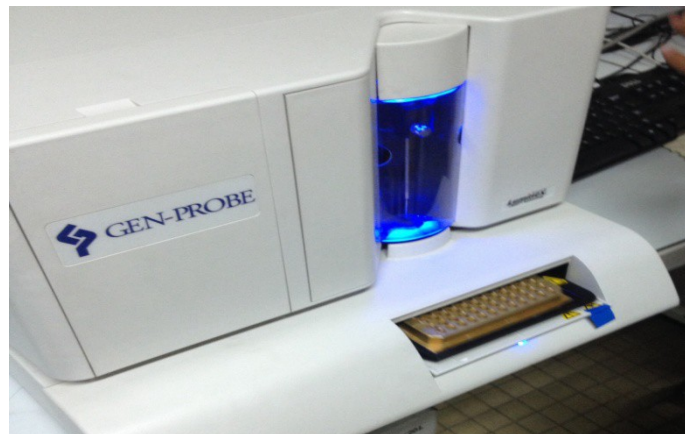
**Figure 17:** le Thermocycleur (BIOMERTA TProfessional).



**Figure 18:** Appareil Luminex GEN-PROBE



**Figure 19:** agitatrice de plaque



**Figure 20:** dépôt de la plaque à 96puits dans l'appareil Luminex firm GEN-PROBE.

#### **ANNEXE N°4 :**

Les réactifs utilisés :



1-Solution de Lyse LBD

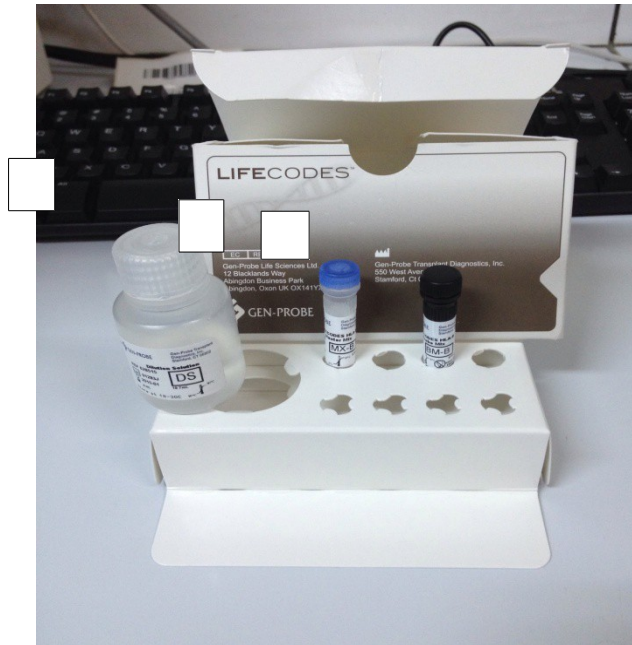
2- Solution d'éluion



3- Solution de Lavage WDB

4- Proteinase K en poudre.

**Figure 21:** images des différents constituants du Kit Quikgene pour l'extraction d'ADN.



1-Solution de master Mix (MX-B)

2-Sonde nucléiques appropriées (BM-B)

3-Solution de dilution (DS)

**Figure 22:** Kit d'amplification LIFECODES



**Figure 23:** Eau sans nucléases (Nucleas free water)

## ANNEXE N° :5

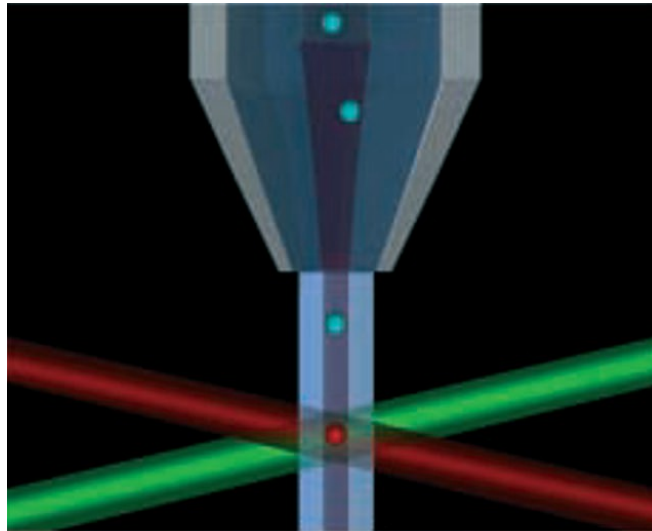
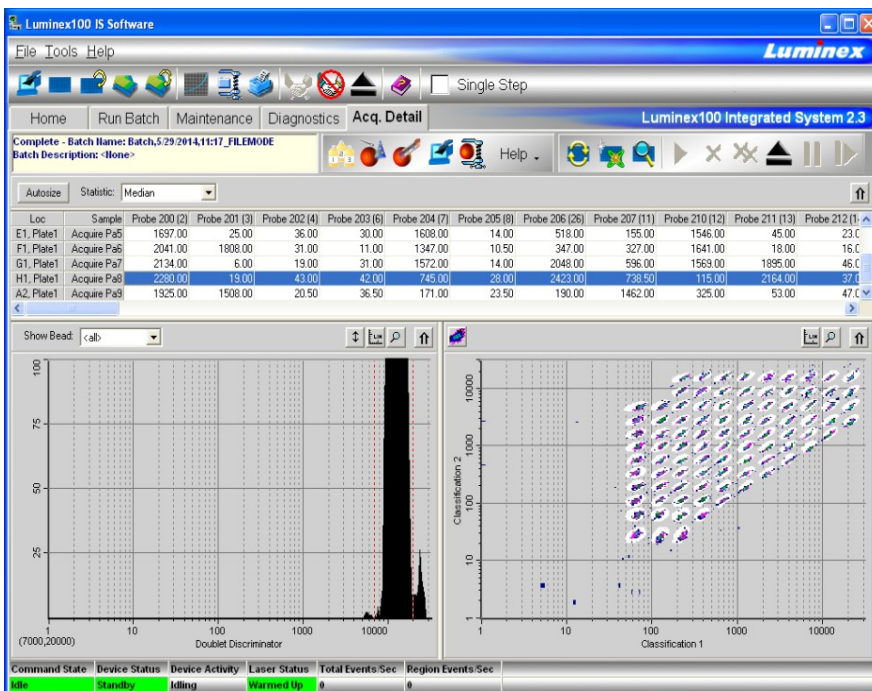


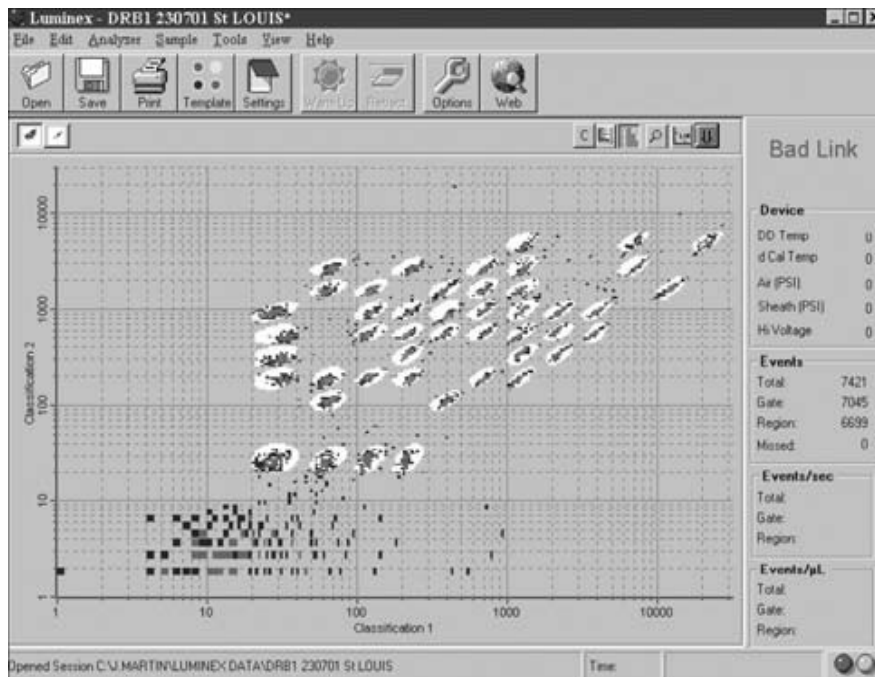
Figure 26: Technologie Lumindex™ : lasers rouge et vert excitant une microbille





**Figure 27:** Logiciel d'acquisition des données (d'après Luminex)

## ANNEXE N° 5



**Figure 28:** classification des billes selon Luminex.

## GLOSSAIRE:

**Arthrite:** Atteinte articulaire inflammatoire caractérisée par la douleur, la rougeur, la chaleur et parfois le gonflement de l'articulation, et s'accompagnant de modifications biologiques caractéristiques.

**Dilatation:** augmentation du volume d'un corps sous l'influence d'une variation de température.

**Erosion:** Perte de substance très superficielle de la peau ou d'une muqueuse.

**Fibrose:** désigne la transformation de certains tissus en un tissu composé de fibres, proche du tissu conjonctif.

**Photophobie:** Tendance à éviter la lumière et la gêne qu'elle provoque, lors de certaines maladies.

**Psoriasis:** manifestation inflammatoire de la peau.

**Raideur:** Gêne ou limitation plus ou moins importante des mouvements articulaires au niveau des membres ou de la colonne vertébrale.

**Sclérose:** Développement du tissu conjonctif dans un organe, pouvant altérer la structure de ce dernier et provoquant un durcissement ; fibrose.

**Syndesmophytes:** ossification pathologique qui se forme entre deux vertèbres voisines et les soude entre elles.

**Talalgie:** désigne toutes les douleurs se localisant au talon.

**Tuméfaction:** désigne l'augmentation du volume ou au gonflement d'un tissu, d'un organe ou d'une partie du corps. La tuméfaction peut être liée à une inflammation.

**Uvéite:** est une atteinte ophtalmique se manifeste par des rougeurs oculaires, douleurs, avec larmoiements et photophobie.