

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA I
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Thème :

RECHERCHE DE L'ALLELE HLA-B51 PAR PCR EN TEMPS REEL
DANS LA MALADIE DE BEHCET

Mémoire de Fin d'Etude en vue de l'obtention
Du diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Génétique et physiologie

Présenté par :

- BRAHITI Milila

- MOKTAR Narimane

Date de soutenance : 13/09/2015

Devant le jury composé de :

Mme HERKAT. S	M.A.A (USDB)	Présidente de jury
Mme GUESSAIBIA. N	Dr (USDB)	Examinatrice
Mme ALLAM. I	M.A.A (CHE Beni-Messous)	Promotrice
Mme BENCHABANE. S	M.A.B (USDB)	Co-promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, on souhaite adresser nos remerciements à notre **bon Dieu** de nous avoir donné la puissance d'accomplir ce travail.

Un merci particulier à notre promotrice **Mme ALLAM.I**, pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour sa disponibilité, son aide et ses commentaires précieux nous ont permis de surmonter les difficultés et de progresser dans ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre co-promotrice **Mme BENCHABANE.S**, pour ses conseils et idées précieuses, sa disponibilité et pour son soutien et encouragement prodigué tout au long de ce travail.

Tout notre respect et nos remerciements vont vers les membres du jury : **Mme HERKAT.S** et **Mme GUESSAIBIA.N**, qui vont pleinement consacrer leur temps et leur attention afin d'évaluer notre travail.

Enfin, nos remerciements les plus sincères sont adressés aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents :

Merci pour votre soutien et encouragement pendant toute ma vie,

Mon cher frère Rachid,

Mes adorables sœurs : Kahina, Sonia et son fiancé Hamid,

Mes grands-parents,

Toute ma famille en particulier ma cousine Thilleli,

Tous mes amies particulièrement Kenza,

Ma chère binôme Narimane,

Tous mes camarades de promotion Master II 2014-2015.

Milila

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à toute ma famille qui m'a toujours témoignée son affection et m'a apportée réconfort et aide à tout moment,

A la prunelle de mes yeux, mes parents à qui je leur dois mon éducation, « je prie Dieu pour les protéger et les garder pour moi »,

A mes sœurs Noussaiba et CHorouk et mon frère Abd Elkarim,

A mon binôme BRAHITI Milila,

Aussi je dédie ce travail à tous les ami(e)s que j'aime surtout Imen et à mes chers (es) enseignants(es) qui m'ont beaucoup aidée tout au long de mes études.

Narimane

Résumé

La maladie de Behçet (MB) est une vascularite multi systémique, chronique et récidivante, Ses principales manifestations cliniques sont cutanéomuqueuses, mais les atteintes articulaires ne sont pas rares et les atteintes oculaires et neurologiques sont sévères. C'est une maladie rare atteignant surtout l'adulte jeune. La positivité d'HLA-B51 est un marqueur génétique de prédisposition. Cet allèle étant retrouvé chez jusqu'à deux tiers des patients.

Le but de notre travail est de déterminer la fréquence de l'allèle B51 au cours de la MB, et de savoir si HLA-B51 est un marqueur de sévérité de la MB, chez 21 patients algériens atteints de cette maladie au niveau du service d'immunologie médicale, laboratoire d'immunogénétique de l'hôpital « ISSAD Hassani » de Beni Messous, en utilisant la technique de PCR en temps réel (l'ADN extrait du sang).

Cette étude avait concerné 13 femmes (61,90%) et 8 hommes (38,10%), avec un sexe ratio de (1,63). La moyenne d'âge dans notre série au moment du diagnostic de MB est de $31,3 \pm 11,1$ ans. La catégorie la plus concernée est celle dont la tranche d'âge est comprise entre 18 et 40 ans chez les adultes jeunes avec un pourcentage de (66.66%). La fréquence des manifestations cliniques était comme suit : L'atteinte cutanéomuqueuse à 81%, l'atteinte articulaire à 43%, Atteinte ophtalmologique à (33%), neuro-Behçet à (19%), entéro-Behçet à (5%) et angio-Behçet à (0%). La comparaison des fréquences phénotypiques de l'allèle HLA-B51(+) des patients atteints de la MB et des témoins sains appariés en âge et en sexe nous ont révélé une fréquence élevée de l'allèle chez (52,38%) par rapport au groupe témoin sains (16 %). L'étude d'association de l'allèle HLA-B51 et les manifestations cliniques de la MB a montré une association entre l'antigène HLA-B51 et les atteintes neurologiques dans notre série.

Mots clés : Maladie de Behçet, Vascularite, Allèle HLA-B51, PCR en temps réel.

Summary

Behçet's disease (BD) is a multisystem vasculitis, chronic and recurrent, its main clinical symptoms are mucocutaneous, but the articular involvement are not uncommon and ocular involvement and neurological are severe. A rare disease affects mostly young adults. The HLA-B51 positivity is a marker for genetic predisposition. This allele is found in up to two thirds of patients.

The aim of our work is to determine the frequency of the B51 allele in the BD, and know if HLA-B51 is a severity marker of BD, in 21 Algerian patients with this disease at the service Medical Immunology, Immunogenetics Laboratory of the hospital "ISSAD Hassani" from Beni Messous, using the Real-time PCR (DNA extracted from blood).

This study involved 13 women (61, 90%) and 8 men (38, 10%), with a sex ratio of (1.63). The average age in our series at diagnosis of BD is 31.3 ± 11.1 years. The most relevant category is the one whose age range is between 18 and 40 years at young adults with a percentage of (66.66%). The frequency of clinical events was as follows: (81%) mucocutaneous involvement, articular involvement at (43%), ophthalmologic involvement at (33%), neurological involvement at (19%), digestive involvement at (5%) and vascular involvement at (0%). The comparison of phenotypic frequencies of HLA-B51 (+) patients with BD and healthy controls matched for age and sex have revealed a high frequency of the allele in (52.38%) compared to the healthy control group (16%). The study of association of the HLA-B51 allele and the clinical manifestations of BD showed an association between HLA-B51 antigen and neurological involvement in our series.

Keywords: Behçet's Disease, vasculitis, HLA-B51 allele, Real-time PCR.

المخلص

مرض بهجت (م ب) هو التهاب الأوعية الدموية المتعددة، المزمنة والمتكررة، مظاهرها السريرية الرئيسية هي مخاطي جلدي، لكن إصابة المفاصل ليست نادرة واصابة العين والاعصاب هي حادة. هو مرض نادر يصيب أساسا الشباب البالغين. إيجابية HLA-B51 هو علامة وراثية تسبب المرض. تم العثور على هذا الأليل فيما يصل إلى ثلثي المرضى. الهدف من دراستنا هو تحديد وتيرة الأليل B51 أثناء مرض بهجت، وعما إذا كان HLA-B51 هو علامة حدة مرض بهجت عند 21 مرضى جزائريين مصابين بهذا المرض في مصلحة المناعة الطبية، مخبر المناعة الوراثية، بمستشفى بني مسوس باستخدام تقنية PCR en temps réel (الحمض النووي المستخرج من الدم).

شملت هذه الدراسة 13 نساء 61.90% و 8 رجال 38.10%، مع نسبة الجنس 1.63. متوسط العمر في سلسلتنا أثناء تشخيص مرض بهجت هو 31.3 ± 11.1 سنوات. الفئة الأكثر عرضة هي تلك التي في الفئة العمرية بين 18 و 40 عاما بين الشباب البالغين بنسبة 66.66%. وكانت نسبة المظاهر السريرية على النحو التالي مخاطي جلدي 81%، إصابة المفاصل 43%، إصابة العين 33%، إصابة الاعصاب 19%، المعوية 5% والأوعية الدموية ب 0%. مقارنة الترددات المظهرية (+) HLA-B51 المرضى الذين يعانون من مرض بهجت مع غير المرضى كشفت عن ارتفاع وتيرة الأليل ب 52,38% مقارنة بغير المرضى ب 16%. أظهرت دراسة ارتباط الأليل HLA B51 والمظاهر السريرية لمرض بهجت وجود ارتباط بين المستضد HLA-B51 واصابة الاعصاب في سلسلتنا.

كلمات المفتاح: مرض بهجت، التهاب الأوعية الدموية، أليل HLA-B51، PCR en temps réel

Glossaire

Allèle : Version d'un gène occupant une place précise sur un chromosome.

Anévrismes : Poche qui se forme le long de la paroi d'une artère à cause notamment de dépôts de graisse dans les artères ou d'hypertension artérielle.

Aphte : Petite ulcération superficielle, douloureuse, observée le plus souvent sur la muqueuse buccale et parfois sur la muqueuse génitale.

Corticothérapie : Traitement par des médicaments corticoïdes ou par la corticostimuline.

Erythème noueux : Manifestation dermatologique qui prend la forme d'un ou plusieurs nodules, palpables, pouvant être rouges et chauds.

Fluorimètre : Appareil de mesure de l'intensité de l'émission de fluorescence.

Génotype : Ensemble des constituants génétiques d'un organisme, qu'ils soient exprimés ou non.

Haplotype : Ensemble de gènes situés côte à côte sur un chromosome. Ils sont généralement transmis ensemble à la génération suivante, et sont dits « génétiquement liés ».

Hypopion : La formation de pus dans la chambre antérieure de l'œil.

Méningo-encéphalite : Pathologies du système nerveux central.

Pseudofolliculite : Inflammation simulant celle des follicules pileux.

Phénotype : Expression visible des gènes.

Quencher : Entité moléculaire capable de désactiver un état excité par transfert d'énergie.

Récessive : Se dit d'un caractère ou d'un allèle qui ne s'exprime qu'à l'état homozygote.

Thermocycleur : Instrument servant à automatiser la réaction en chaîne par polymérase, une méthode de biologie moléculaire d'amplification génétique.

Thrombophlébites : Inflammation d'une veine superficielle ou profonde.

Transgéniques : Animal, plante... dont le génome a été modifié par introduction d'un gène étranger.

Uvéite : Inflammation de l'uvée, la région de l'œil qui contient l'iris, le corps ciliaire et la choroïde.

Vascularites : Maladies de système liées à un processus inflammatoire des parois vasculaires déclenché par une réaction immunitaire.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADN Pol : ADN Polymérase.

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens.

Anti-IL-1 : Inhibiteur de l'interleukine 1.

Anti-IL-6 : Inhibiteur de l'interleukine 6.

AZA : Azathioprine.

°C : Degré Celsius.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (Major Histocompatibility Complex).

CMV : Cytomégalovirus.

CXCR2 : Récepteurs de Chimiokine (Chemokine Receptors).

dNTP : Désoxyribonucléotides.

EBV : Virus d'Epstein Barr.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

ERAP1 : Aminopeptidase 1 du Réticulum Endoplasmique (Endoplasmic Reticulum. Aminopeptidase 1).

F : Femme.

FRET : Transfert d'Energie par Résonance de Fluorescence (Fluorescence Resonance Energy Transfert).

H : Homme.

HLA : Antigènes des Leucocytes Humains (Human Leukocyte Antigen).

HSP : Protéines du Choc Thermique (Heat Shock Protein).

HSV : Herpès Simplex Virus.

IC : Contrôle Interne.

ICAM : Molécule d'Adhésion Intercellulaire (Intercellular Adhesion Molecule).

IFN : Interferon.

IL: Interleukine (Interleukin).

IPC : Contrôle Positif Interne.

KDa : Kilodalton.

KIR : Récepteurs Tueurs de Type Immunoglobuline (Killer Immunoglobulin-Like Receptors).

LT CD8+ : Lymphocytes T Cluster de Différenciation 8+.

MB : Maladie de Behçet.

MICA : CMH de Classe I liés Polypeptide-Séquence A (Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related Gene A).

MICB: CMH de Classe I liés Polypeptide-Séquence B (Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related Gene B).

MICE: CMH de Classe I liés Polypeptide-Séquence E (Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related Gene E).

Mn : Minute.

NC : Contrôle Négatif.

NK : Cellules Tueuses Naturelles (Natural Killer cells).

NKG2D : Naturel Groupe Tueur 2 Récepteur D (Natural Killer Group 2 Receptor D).

NO : L'oxyde Nitrique (Nitric Oxide).

Nt : Nucléotides.

PC : Contrôle Positif.

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction).

PNN : Polynucléaires Neutrophiles.

Pol : Polymérase

RNase A : Ribonucléase A.

Sec : Seconde.

TLRs: Récepteurs Toll-Like.

TH1: Lymphocytes de Type T helper 1.

Tm : Température de Fusion.

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale (Tumor Necrosis Factor).

µL : Microlitres.

UV : Ultras Violets.

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme simplifié du CMH sur le chromosome 6 humain.....	3
Figure 2 : Hétérodimère HLA de classe I. La structure tridimensionnelle du site de fixation peptidique est représentée à droite de la figure.....	4
Figure 3 : Un modèle de la molécule HLA-B51.....	5
Figure 4 : Mécanismes de l'allèle HLA-B51 liés à la maladie de Behçet.....	6
Figure 5 : Infection ou une inflammation au niveau des surfaces muco-cutanées.....	7
Figure 6 : Rôle des molécules MICA.....	8
Figure 7 : Hypothèse de la réaction immunitaire orale dans la MB et rôle des HSP-65/60.....	9
Figure 8 : Hypothèse de l'immunopathologie de la maladie de Behçet.....	10
Figure 9 : Facteurs affectant l'activation des cellules endothéliales et l'extravasation des leucocytes.....	10
Figure 10 : Hypothèse de la pathogenèse de la maladie de Behçet.....	11
Figure 11 : Aphte géant de la joue.....	12
Figure 12 : Aphtose génitale du pénis.....	12
Figure 13 : Lésion de pseudofolliculite.....	13
Figure 14 : Uvéite antérieure à Hypopion.....	13
Figure 15 : Foyers nécrotico-hémorragiques au fond d'oeil lors d'une uvéite postérieure....	13
Figure 16 : Test pathergique positif.....	15
Figure 17 : Stratégie thérapeutique graduée dans la maladie de Behçet.....	16
Figure 18 : Schéma du principe de PCR en temps réel.....	18
Figure 19 : Principe de détection des ADN double brin par incorporation de SYBR Green..	19
Figure 20 : Principe du fonctionnement des balises moléculaire.....	20
Figure 21 : Amorces scorpion (Scorpion primer).....	20
Figure 22 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation PCR en temps réel.....	22
Figure 23 : Fonctionnement des réactifs TaqMan.....	26
Figure 24 : Profil d'une courbe de PCR en temps réel.....	30
Figure 25 : Modèle graphique de la PCR en temps réel HLA B51 (+) et HLA B51 (-).....	32
Figure 26 : Représentation de la répartition des patients selon leur sexe.....	33
Figure 27 : Histogramme montrant la répartition des patients en fonction de l'âge.....	34

Figure 28 : Histogramme montrant la répartition des patients selon leur sexe et leurs classes d'âge.....	35
Figure 29 : Histogramme montrant la répartition des patients atteints de la MB en fonction des manifestations cliniques.....	37
Figure 30 : Histogramme montrant les fréquences phénotypiques de HLA-B51(+) des patients et des témoins sains.....	38
Figure 31 : Histogramme montrant la répartition de l'allèle HLA-B51(+) en fonction du sexe....	40
Figure 32 : Histogramme montrant la comparaison des manifestations cliniques présentées par le groupe des patients HLA-B51 (+) et HLA B51 (-).....	42

Liste des tableaux

Tableau I : Critères diagnostiques de la maladie de Behçet selon L'International Study Group For Behçet's.....	15
Tableau II : Nouveaux critères de classification internationaux pour la maladie de Behçet..	15
Tableau III : Diagnostic différentiel de la maladie de Behçet.....	16
Tableau IV : Composants de Kit Gene Finder HLA B51 Real Amp.....	27
Tableau V : Composants du mélange maître.....	28
Tableau VI : Programme de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).....	29
Tableau VII : Réglage de fluorescence de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).....	29
Tableau VIII : Analyse de fluorescence de la PCR en temps réel.....	30
Tableau IX : Interprétation des résultats de de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).....	31
Tableau X : Représentation des patients selon les classes d'âge.....	34
Tableau XI : Représentation de la répartition des patients atteint de la MB selon le sexe et les classe d'âge.....	35
Tableau XI1 : Représentation de la répartition des patients en fonction des manifestations cliniques de la maladie.....	36
Tableau XIII : Calcul des fréquences de HLA-B51(+) des patients et des témoins sains.....	38
Tableau XIV : Comparaison des fréquences phénotypiques de HLA-B51(+) des patients et des témoins sains.....	39
Tableau XV : Répartition de l'allèle HLA-B51+ selon le sexe.....	40
Tableau XVI : Comparaison des manifestations cliniques présentées par le groupe des patients porteurs de l'antigène HLA-B51 et les non porteurs de HLA B51.....	41

Sommaire

Introduction.....	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1 GENERALITE SUR LA MALADIE DE BEHCET.....	2
I.1.1 Historique.....	2
I.1.2 Epidémiologie.....	2
I.1.3 Etiologie.....	2
I.1.4 Mécanismes physiopathologiques de la maladie de Behçet.....	3
I.1.4.1 Facteurs génétiques	3
A. Gènes des antigènes des leucocytes humains (HLA).....	3
Rappel sur les gènes et structure des molécules HLA classe I.....	3
Association allèle HLA-B51 et maladie de Behçet.....	4
Autres molécules HLA B.....	7
B. Gènes Apparentés de HLA B.....	7
Gènes MIC	7
I.1.4.2 Facteurs environnementaux.....	8
I.1.4.3 Anomalies de la réponse inflammatoire	8
I.1.4.4 Facteurs immunologiques.....	9
I.1.5 Manifestations cliniques	11
I.1.5.1 Atteinte cutanéomuqueuse.....	11
I.1.5.2 Atteinte ophtalmologique.....	13
I.1.5.3 Atteinte articulaire.....	13
I.1.5.4 Neuro-Behçet.....	14
I.1.5.5 Angio-Behçet.....	14
I.1.5.6 Entéro-Behçet.....	14

I.1.5.7 Symptômes constitutionnels.....	14
I.1.6 Critères diagnostiques	14
I.1.6.1 Diagnostic positif.....	14
I.1.6.2 Diagnostic différentiel.....	15
I.1.7 Les modalités thérapeutiques.....	16
I.2 GENERALITE SUR LA PCR.....	17
I.2.1 La technique de PCR en temps réel.....	17
I.2.1.2 Définition.....	17
I.2.1.3 Principe	17
I.2.1.4 Les systèmes de détection en temps réel.....	18
II. MATERIEL ET METHODES	
II.1 Matériel biologique.....	21
II.2 Matériel non biologique.....	22
II.3 Les méthodes d'études	22
II.4 Méthode analytique.....	32
III. RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1 Données épidémiologiques.....	33
III.2 Données cliniques.....	36
III.3 Recherche de l'allèle HLA-B51 dans les patients atteints de la maladie de Behçet	38
Conclusion.....	44

INTRODUCTION

Introduction

La maladie de Behçet (MB) est une maladie inflammatoire systémique multifactorielle (Bennani et al., 2009), relativement rare et ubiquitaire (B'chir Hamzaoui et al., 2006). Caractérisée, d'une part, par la fréquence et la bénignité des manifestations cutanéomuqueuses et articulaires et d'autre part, par la gravité des manifestations oculaires, neurologiques, vasculaires et digestives qui peuvent mettre en jeu le pronostic fonctionnel ou vital. (Hamzaoui et al., 2012). La principale manifestation de la MB est une inflammation thrombosante des gros vaisseaux, des veines et des artères (Berrebi, 2008).

La physiopathologie de la MB reste encore largement incomprise (Otmani, 2009). Il est bien établi qu'elle implique des facteurs infectieux et des anomalies de l'immunité à la fois innée et adaptative soulevant des interrogations sur la nature de la MB : auto-inflammatoire ou auto-immune (Mizuki et al., 2010 ; Remmers et al., 2010). Cependant, l'existence de cas familiaux (1/10 des cas), la prévalence élevée de la MB chez les jumeaux et leurs parents, la distribution géographique particulière de la maladie le long de l'ancienne route du commerce de la soie et la variation de la nature et de la fréquence des manifestations cliniques de la maladie en fonction du groupe ethnique suggèrent que des facteurs génétiques (Masatlioglu et al., 2010) tels que l'allèle HLA-B5 et plus particulièrement l'allèle B51 (Otmani, 2009), a un rôle important dans l'étiopathogénie de la maladie (Houman et Bel Feki, 2014).

L'association génétique entre la MB et HLA-B51 a été décrite, pour la première fois en 1982, par Ohno dans la population japonaise (Ohno et al., 1982), et a été confirmée dans de nombreuses autres populations d'origines géographique et ethnique différentes (Meyer, 2008). On retrouverait une fréquence de 60% de porteurs de l'allèle chez les sujets originaires du bassin méditerranéen (Sedrati, 2012).

Dans le cadre de ce travail réalisé au niveau de l'hôpital ISSAD Hassani de Beni Messous, on va essayer de rechercher cet allèle chez 21 patients algériens atteints de cette maladie par la technique de PCR en temps réel qui consiste à mesurer la quantité d'Acide Désoxyribonucléique (ADN) polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Une analyse statistique a été réalisée pour les atteints de la MB par rapport aux témoins sains dans le but d'étudier cette association génétique.

Les principales questions qui se posent dans cette pathologie : Quelle est la fréquence de l'allèle B51 au cours de la MB ? et savoir si l'allèle HLA-B51 est un marqueur de susceptibilité de la maladie ou plutôt un marqueur de sévérité ?.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique

I.1 Généralité sur la maladie de Behçet

I.1.1 Historique :

La première description de ce que nous appelons à l'heure actuelle la MB a probablement été faite par Hippocrate il y a 2500 ans, qui, dans son œuvre «Epidemion», décrit une maladie endémique en Asie mineure, caractérisée par des ulcérations aphteuses, des défluxions des parties génitales et une atteinte ophtalmique aqueuse de caractère chronique faisant perdre la vue à de nombreuses personnes (Boukantar, 2011).

Elle a été redécouverte par ses différentes manifestations cardinales indépendamment par plusieurs médecins dans les années trente (Gilbert en 1920, Planner en 1922, Shigeta en 1924, Adamantiades en 1931, Whitwell en 1934 et Behçet en 1937) (Behçet, 1937).

Hulusi Behçet, individualisa une triade associant une aphtose buccale, une aphtose génitale et une uvéite avec hypopion, qui par la suite, portera son nom (Prieur et al., 2009).

I.1.2 Epidémiologie :

La MB est ubiquitaire avec une prévalence variable selon les pays (Du-Boutin et Wechsler, 2009), mais le risque de survenue de la maladie demeure plus élevé dans les pays situés sur l'ancienne route de la soie, allant du Japon aux pays de l'Europe occidentale, en passant par le Moyen-Orient et le pourtour méditerranéen (Weber, 2012). Dans les grandes villes de la partie orientale de la Turquie, sa prévalence a été estimée entre 110 et 420/100.000 (Yurdakul et Yazici, 2008). En Asie la prévalence est de 30/100 000 habitants dans la ville d'Hokkaido, varie de 7 à 21/100 000 habitants en Europe (Sève et Kodjikian, 2014). Une étude récente en Seine-Saint-Denis fixe la prévalence à 34,6/100.000 chez les sujets originaires d'Afrique du Nord (Mahr et al., 2008 ; Saadoun et al., 2010). Au Maghreb la prévalence de la MB est à 110/100 000 habitants (Houman et al., 2007).

Cette maladie affecte l'adulte jeune avec un pic de fréquence entre 20 et 40 ans (Hamza, 2001). La MB paraît plus fréquente chez les femmes au Japon, en Chine et en Corée alors que les hommes semblent plus souvent affectés en Afrique et au Moyen Orient (Du-Boutin et Wechsler, 2009).

I.1.3 Etiologie :

Comme pour la majorité des maladies, la MB est considérée comme une maladie complexe (Mahr et Maldini, 2014). Il existe de prédispositions génétiques parmi lesquelles la présence de l'haplotype HLA-B51 représente le principal facteur prédisposant (Emmi et al. 2014).

D'autres gènes proches d'HLA-B pourraient être impliqués dans la susceptibilité génétique de la MB (Sève et Kodjikian, 2014), des facteurs environnementaux (infections virales et/ou bactériennes), des anomalies de la réponse inflammatoire (protéines du choc thermique, dysrégulation de la production de l'oxyde nitrique (NO)) et un dysfonctionnement du système immunitaire (Amoura et al., 2006 ; Du-Boutin et Wechsler, 2009).

I.1.4 Mécanismes physiopathologiques de la maladie de Behçet :

Bien que la description princeps de la MB remonte à 1937, sa physiopathologie reste toujours largement incomprise. Des données expérimentales nouvelles permettent toutefois de mieux comprendre les mécanismes qui président à l'émergence de la maladie (Alami, 2011).

I.1.4.1 Facteurs génétiques

A. Gènes des antigènes des leucocytes humains (HLA)

- **Rappel sur les gènes et structure des molécules HLA**

Le système immunogénétique HLA fait partie d'un ensemble génétique complexe, noté complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) (McCluskey et Peh, 1999) (**Figure 1**).

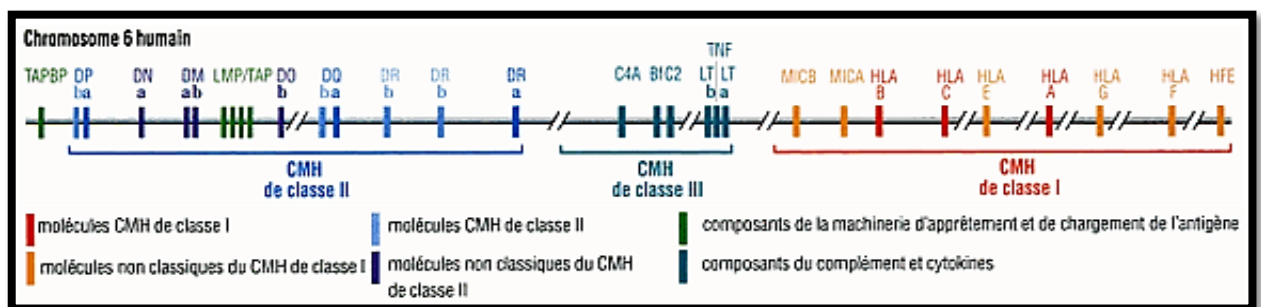


Figure 1 : Diagramme simplifié du CMH sur le chromosome 6 humain (Anthony, 2009).

Organisation des gènes HLA de classe I

Les gènes HLA A, B et C sont organisés en 8 exons séparés par 7 introns (Gilbert et Erwann, 2002), codent chacun pour une chaîne α appartenant respectivement à une molécule HLA-A, B ou C. Le 1er exon code pour le peptide signal clivé lors du transport intracellulaire de la molécule, les exons 2,3 et 4 codent respectivement pour les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, les exons 5, 6,7 et 8 codent pour le peptide de connexion, le domaine transmembranaire, la région intra cytoplasmique et la région 3' non transcrite (Chatenoud, 2012) (**Figure 2**).

Molécules HLA classe I

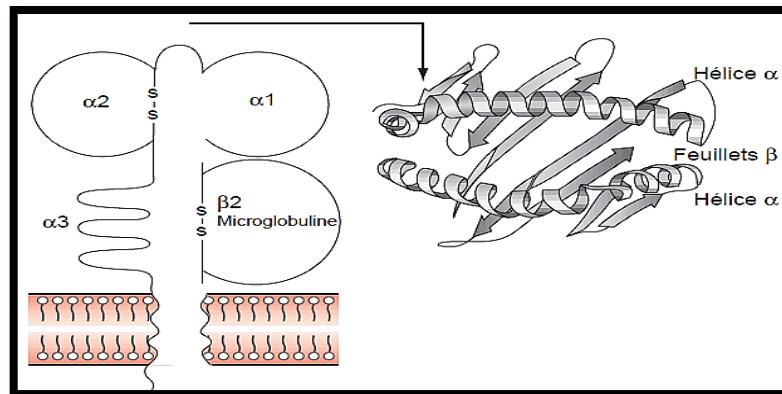


Figure 2 : Hétérodimère HLA de classe I. La structure tridimensionnelle du site de fixation peptidique est représentée à droite de la figure (Eliaou, 2002).

Le haut degré de polymorphisme des molécules HLA explique comment des individus différents s'adaptent et répondent différemment aux antigènes qu'ils rencontrent. Cet ensemble de caractéristiques fait des gènes HLA d'excellents candidats dans la prédisposition génétique à la MB (Amoura et al., 2006).

- **Association allèle HLA-B51 et maladie de Behçet**

A de rares exceptions près, il est admis que la MB est associée à l'antigène HLA-B5, plus précisément HLA-B51 (Hamza, 1989). Quelle que soit la population étudiée, le seul antigène fortement associé avec la MB. Cependant, cette association n'est pas absolue et les gènes pathogènes pourraient être en déséquilibre de liaison avec le gène HLA-B (Kamoun et al., 2012). La présence de l'antigène HLA-B51 est plus fréquente chez les patients en moyenne de 40-80 % (Guichard et al., 2010). Il présente 25 différents allèles (B5101-B5125), ainsi si l'HLA-B51 est impliqué dans la prédisposition de la MB c'est par l'intermédiaire des acides aminés communs à tous les sous types. L'allèle du B51 le plus incriminé est le B5101 qui coderait pour un épitope « Behçethogène » (Mizuki et al., 2002).

Cet antigène est plus fréquent chez les malades ayant une uvéite postérieure, atteinte du système nerveux central et thrombophlébite (Sakan et al., 1999), ces associations phénotype-génotype sont toutefois controversées car elles varient en fonction de l'origine ethnique des patients, de l'activité de la maladie et du type de l'étude (Verity et al., 1999).

Rôle fonctionnel de l'allèle HLA-B51 dans la maladie de Behçet

Le rôle exact du HLA-B51 dans la pathogénie de la MB n'est pas connu, différentes hypothèses ont été générées pour expliquer le rôle pathogène direct de HLA-B51. En revanche, l'antigène HLA-B52, seconde sous-division de l'antigène B5, n'est pas associé à la MB. La différence de séquence entre HLA-B*5101 et HLA-B52 porte uniquement sur deux acides aminés en position 63 et 67, localisés dans le site de fixation peptidique au niveau d'une poche qui accueille le résidu ancré majeur du peptide (résidu P2) (**Figure 3**). Ces positions sont fortement impliquées dans la spécificité et l'affinité de la liaison peptidique, et pourraient avoir un rôle important dans la présentation d'un antigène (Amoura, 2006).

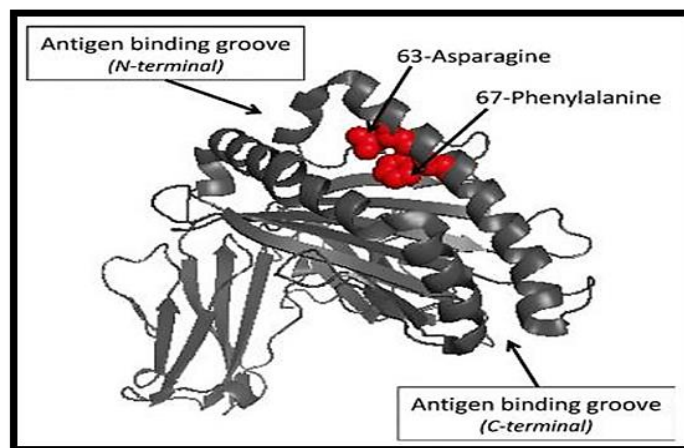


Figure 3 : Un modèle de la molécule HLA-B51 (Yazici et Yazici, 2010).

La présence du HLA-B51 disposerait les patients à l'hyperactivité des polynucléaires par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé. Les neutrophiles des patients HLA-B51 et des souris transgéniques HLA-B51 ont une production accrue d'ions superoxyde. Ces observations rappellent le rôle potentiel joué par HLA-B51 dans le dysfonctionnement des neutrophiles observé au cours de la maladie (Amoura et al., 2006).

HLA-B51 peut interagir avec les récepteurs tueurs de type immunoglobuline (KIR) des cellules tueuses naturelles (NK), des lymphocytes T cluster de différenciation 8+ (LT CD8+) et des LT $\gamma\delta$ grâce à son épitope HLA-Bw4 (Ahmet-Gul et Shigeaki-Ohno, 2012) ; engendrant ainsi une inhibition du pouvoir cytotoxique de ces cellules tueuses (Takeno et al., 2004). HLA-B51 peut contribuer à la pathogénèse de la MB par divers mécanismes, impliquant aussi bien les mécanismes de l'immunité adaptative (par la présentation de certains peptides pathogènes aux cellules T CD8) que innée (en interagissant par exemple avec des récepteurs des cellules NK ainsi que l'activation de voies inflammatoires

intracellulaires associée à des problèmes de repliement de la chaîne lourde et le stress du réticulum endoplasmique) les réponses immunitaires (Gul, 2015) (**Figure 4**).

L'identification des polymorphismes au sein du gène Aminopeptidase 1 du réticulum endoplasmique (ERAP1) est décrit comme un facteur de risque héréditaire récessive seulement chez les individus porteur du gène HLA-B51 (Kirino et al., 2013). Les Polymorphismes ERAP1 peuvent affecter l'activité enzymatique et éventuellement la spécificité de ce réticulum endoplasmique. Par ailleurs, d'autres peptidases peuvent affecter la sensibilité de la MB (Ombrello et al., 2014).

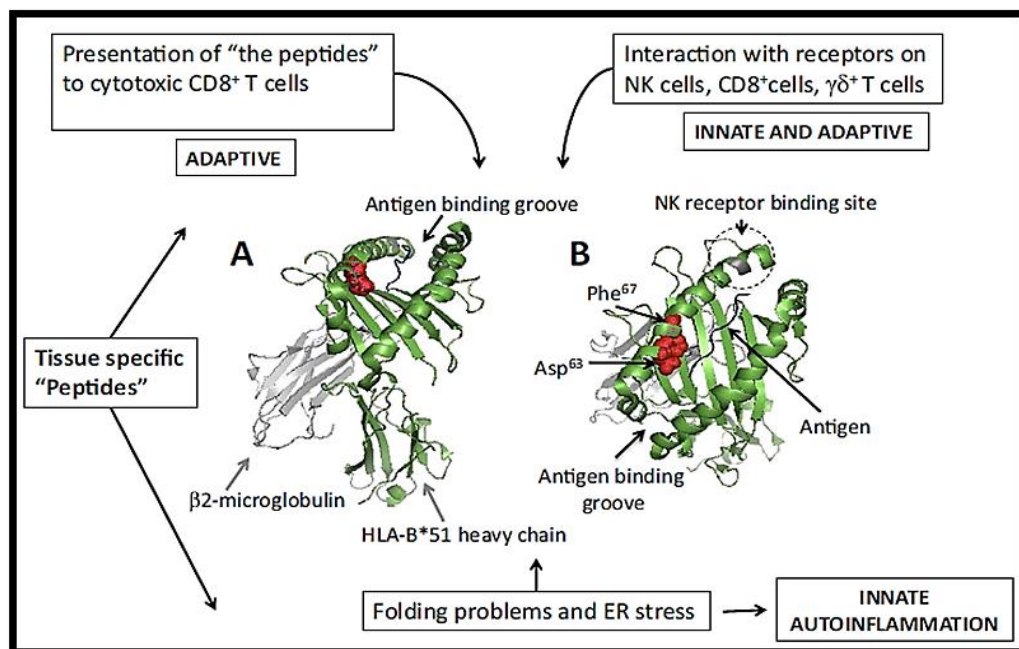


Figure 4 : Mécanismes de l'allèle HLA-B51 liés à la maladie de Behçet (Gul, 2015)

La famille KIR peut se lier à des épitopes HLA-Bw4 conservés d'un groupe d'antigènes de CMH de classe I au niveau des résidus 77 à 83 de l' α 1-hélice (Gul et Ohno, 2012), l'engagement de ces récepteurs peut conduire à l'inhibition sélective de la cytotoxicité à médiation cellulaire, Cet effet est compensé par des interactions activatrices via naturel groupe tueur 2 récepteur D (NKG2D) et CMH de classe I liés polypeptide-séquence A (MICA) (Petrushkin et al., 2015), Bw4 motif de HLA-B*51 interagit avec un récepteur KIR connu sous le nom KIR3DL1 (Gul et Ohno, 2012), ERAP1 peut avoir un rôle dans le traitement des peptides qui sont présentés par des molécules HLA de classe I (**Figure 5**).

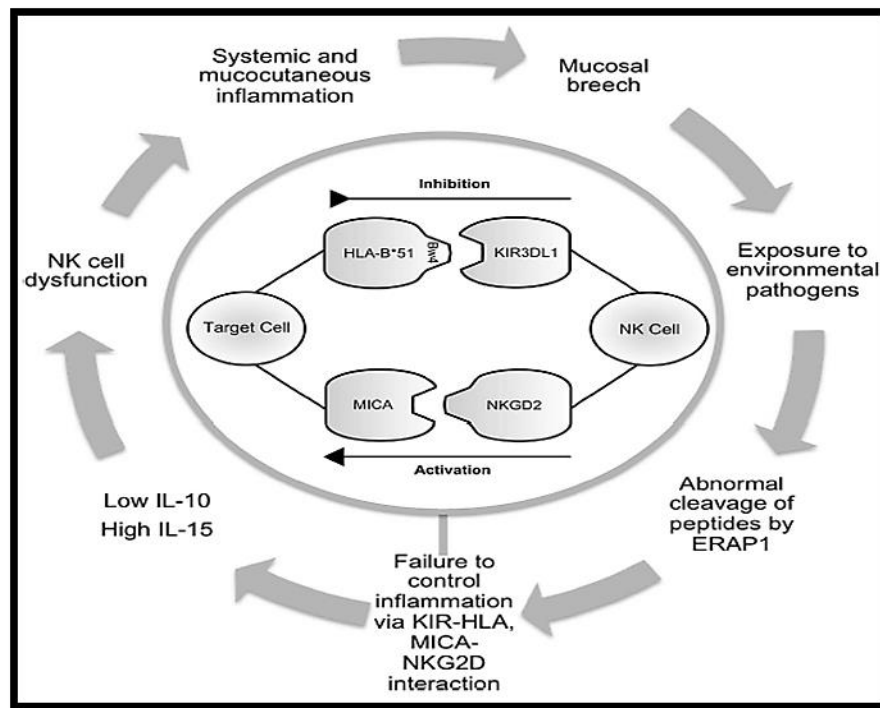


Figure 5 : Infection ou une inflammation au niveau des surfaces mucocutaneuses (Petrushkin et al., 2015).

- **Autres molécules HLA-B**

D'autres allèles codés par la région HLA de classe 1 ont été associés à la MB et cela dans différentes populations : HLA-A26, HLA-B15, HLA-B44, HLA-B52, HLA-B56 avec une force de liaison inférieure à celle observée avec HLA-B51 (Falk et al., 1995).

B. Gènes Apparentés de HLA-B

L'absence de rôle fonctionnel précis de HLA-B51 a fait évoquer la possibilité qu'il soit un marqueur génétique en déséquilibre de liaison avec un autre gène proche (Alami, 2011).

- **Gènes MIC**

Parmi les cinq gènes MIC (Major histocompatibility complex class 1 chain related gene) MICA à MICE (Amoura et al., 2006). Seuls les gènes MICA et MICB sont fonctionnels. Les molécules MIC peuvent être induites à la surface de nombreux types cellulaires à l'occasion de stress cellulaire, notamment au cours d'infections virales ou bactériennes. Ce phénomène est lié à la présence dans la région promotrice des gènes MIC d'éléments régulés par le choc thermique (Bauer et al., 1999). Le ligand de MICA est le récepteur NKG2D, de type C-lectine. NKG2D est associé, à la membrane cellulaire, avec la protéine DAP10 qui possède un domaine de fixation pour la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3 kinase. L'interaction de MICA avec le complexe NKG2D-DAP10 provoque l'activation des lymphocytes T

cytotoxiques et des cellules NK (Amoura et al., 2006). Elles fonctionnent comme signal de « danger » cellulaire conduisant à l'activation de la réponse immune à la fois innée NK et adaptative T CD8, en déclenchant des mécanismes de cytotoxicité, de sécrétion cytokinique et de prolifération cellulaire (Groh et al., 2001) (**Figure 6**). MICB ne semble par contre pas associé à la MB (Hughes et al., 2005).

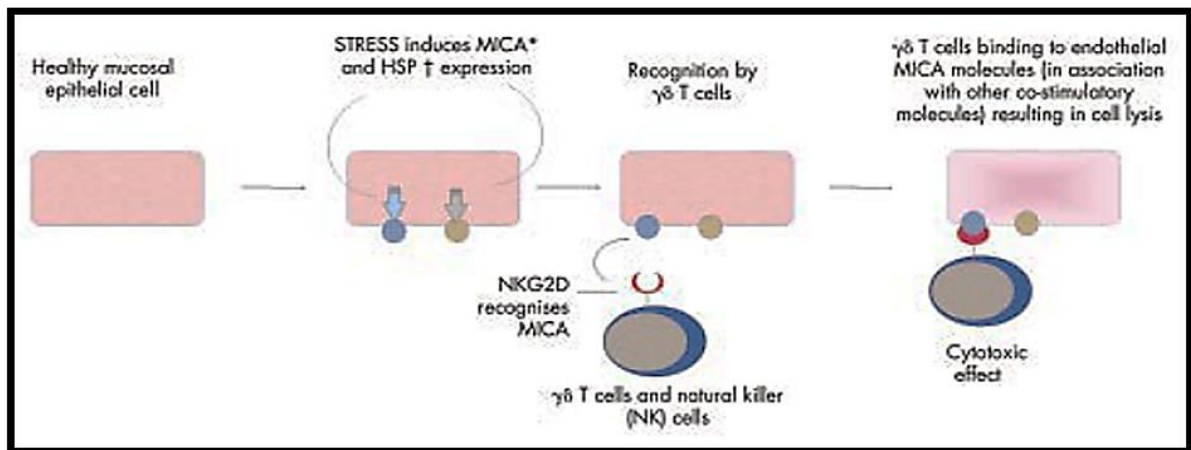


Figure 6 : Rôle des molécules MICA (Verity et al., 2003).

I.1.4.2 Facteurs environnementaux

Plusieurs virus de la famille Herpès ont été incriminés dans la genèse des lésions muqueuses de la MB : herpès simplex virus (HSV), cytomégalovirus (CMV) et virus d'Epstein Barr (EBV) et virus de la varicelle (Pinto et al., 2010).

La présence constante des aphtes buccaux au cours de la MB a suggéré que la flore microbienne orale, notamment streptococcique, pouvait être impliquée dans la pathogénie de la maladie (Pinto et al., 2010). KTH-1 antigène de *Streptococcus sanguis*, peut activer les $LT\gamma\delta$ des malades, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (Mochizuki et al., 1994) .

I.1.4.3 Anomalies de la réponse inflammatoire

Les protéines du choc thermique (HSP), spécialement celles de 60 et 65 kilodalton (kDa), sont des antigènes candidats potentiels comme initiateurs de l'apparition de la MB ou des poussées (Ergun et al., 2001). La protéine HSP-60 (60 kDa), sous l'effet du stress, subit une redistribution tissulaire et se localise à la surface cellulaire. La réponse des cellules T vis-à-vis des HSP bactériennes pourrait entraîner secondairement, par réactivité croisée, la prolifération de cellules T autoréactives vis-à-vis des HSP humaines (Direskeneli et al., 2000). HSP-60 est un ligand des récepteurs Toll-Like 2 et 4 (TLRs) et pourrait stimuler l'immunité innée. HSP60 agirait comme un signal de danger et provoquerait une réponse inflammatoire rapide avec production d'IL6, IL12, IL15 et facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'expression de

molécules d'adhésion et une réponse immune de type T helper 1 (TH1) (Direskeneli et Saruhan-Direskeneli, 2003) (**Figure 7**).

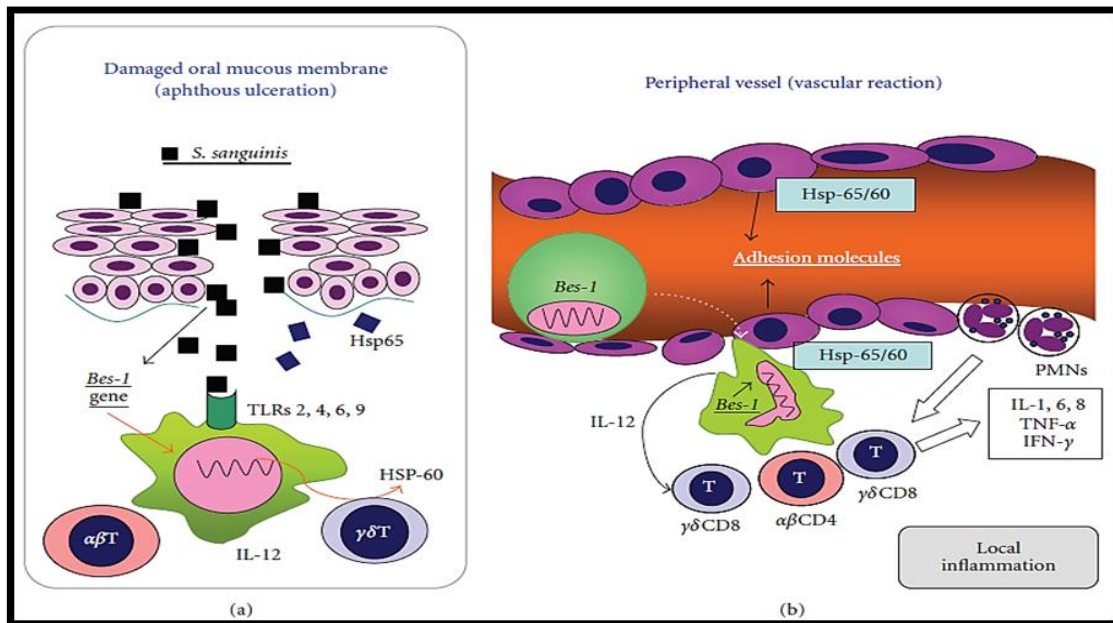


Figure 7 : (a) et (b) Hypothèse de la réaction immunitaire orale dans MB et rôle des HSP-65/60 (Kaneko et al., 2008).

Une augmentation de la concentration du NO a été décrite dans différents tissus au cours de la maladie, ce qui pourrait inhiber la migration des neutrophiles au sein des lésions inflammatoires liées à la MB en entraînant la persistance in situ de ces cellules activées (Zuber et al., 2008).

I.1.4.4 Facteurs immunologiques

La réponse initiale de la réaction pathergique est médiée par les monocytes et les neutrophiles, avec une accumulation rapide de neutrophiles au point de ponction de l'aiguille. Par la suite le derme est infiltré majoritairement par des cellules mononuclées (LT, monocytes et macrophages, les neutrophiles). Les monocytes sont activés et sécrètent des cytokines pro inflammatoires, IL-1, IL-6, TNF α , et IL-8, capables d'attirer et d'activer les polynucléaires au sein des tissus (Sahin et al., 1996) (**Figure 8**). Les neutrophiles des patients expriment des récepteurs d'activation, des protéines d'adhésion (**Figure 9**), des récepteurs de chimiokine (CXCR2), produisent des radicaux libres en excès et ont une activité phagocytaire accrue. Les LT participent également au recrutement et à l'activation des neutrophiles au sein des lésions (Keller et al., 2005). Ils sécrètent notamment de l'IL-8 qui attire les polynucléaires neutrophiles (PNN). Les cellules endothéliales produisent également de l'IL-8. Cette sécrétion de cytokines par les LT et les cellules endothéliales serait déclenchée par des souches particulières de *Streptococcus sanguis* (Kurauchi et al., 2005) (**Figure 8**).

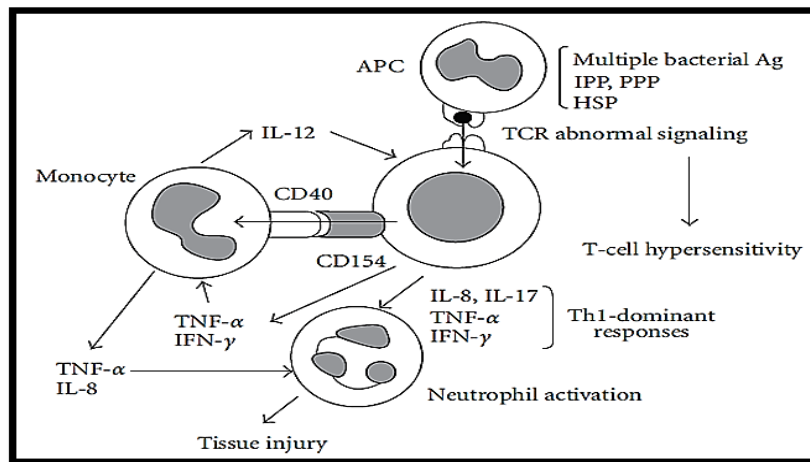


Figure 8 : Hypothèse l'immunopathologie de la maladie de Behçet (Tursen, 2012).

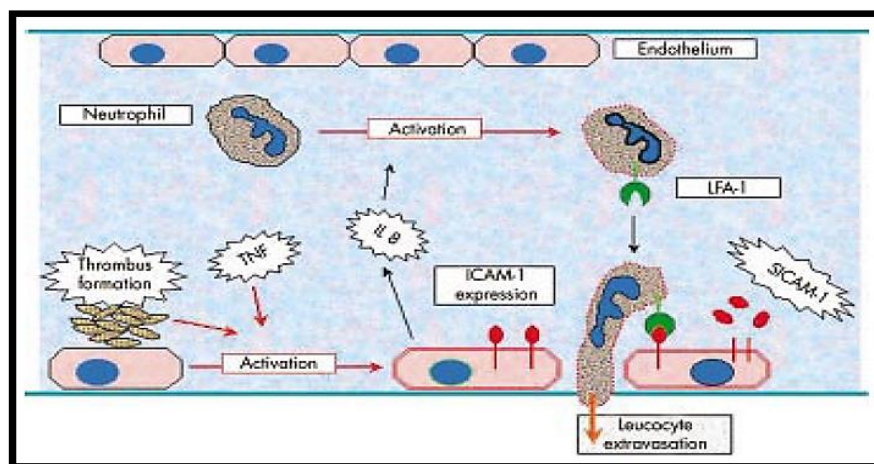


Figure 9 : Facteurs affectant l'activation des cellules endothéliales et l'extravasation des leucocytes (Verity, 1998).

Au cours de la MB, les lymphocytes T expriment des marqueurs d'activation comme CD29 et CD69 dans le sang périphérique et dans les tissus. Les lymphocytes CD4+ et CD8+ produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, interféron γ (IFN γ), l'IL-6, L'IL-8, l'IL-12 et le TNF. L'augmentation du nombre des lymphocytes Th-1 dans le sang périphérique est corrélée à l'activité de la maladie (Amoura et al., 2006).

En conclusion, un modèle physiopathologique a progressivement émergé permettant de mieux comprendre les étapes successives qui président à l'apparition des lésions tissulaires de la maladie (Amoura et al., 2006) (**Figure 10**).

La première étape du déclenchement de la maladie impliquerait les cellules effectrices, les monocytes et les polynucléaires. Sur un terrain génétique particulier (HLA-B51) il pourrait se produire une infection pour certains par les streptocoques provoquant une activation excessive des monocytes avec stimulation de l'expression d'Hsp et de MICA par des cellules

épithéliales et endothéliales. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes TH1 provoquerait le recrutement de neutrophiles activés et entraînerait une activation des cellules endothéliales vasculaires. **La seconde étape** consisterait à ce que les cellules effectrices soient les lymphocytes. Il se développerait une réponse T cytotoxique dirigée contre les cellules exprimant les Hsp et contre le peptide formé par l'association HLA-B51-MICA (susceptibilité génétique). La sécrétion de cytokines par les lymphocytes T provoquerait le recrutement de neutrophiles (Keogan, 2009).

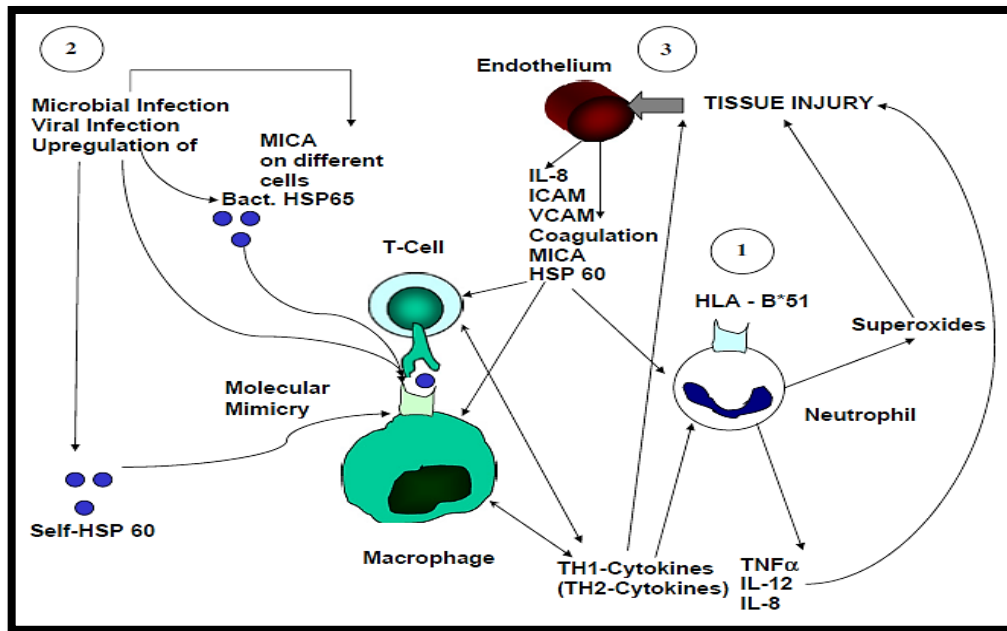


Figure 10 : Hypothèse de la pathogenèse de la maladie de Behçet (Christoph et al., 2008).

I.1.5 Manifestations cliniques :

La MB est une vascularite touchant essentiellement les vaisseaux de petit calibre. Elle se définit avant tout par une uvéite associée à une aptose bipolaire. À ces manifestations s'ajoutent des signes articulaires, vasculaires, neurologiques, digestifs (Berrebi, 2008).

I.1.5.1 Atteinte cutanéomuqueuse

Ces manifestations peuvent précéder ou survenir concomitamment aux autres éléments systémiques. Elles peuvent survenir plusieurs mois voire années après les autres manifestations (Boukantar, 2011).

Aptes buccaux

Ils existent dans 98% des cas, il s'agit d'ulcérations douloureuses, isolées ou multiples, parfois précédées d'une vésicule éphémère, de quelques millimètres à 1cm de diamètre, à bords nets ; l'ulcération est tapissée d'un enduit, son pourtour est inflammatoire et douloureux. Ils siègent sur la face interne des lèvres, des joues (**Figure 11**), le sillon gingivolabial, le pourtour de la langue, le frein le plancher buccal, le palais, les amygdales et le pharynx (Boukantar, 2011).



Figure 11 : Aphte géant de la joue (Parent et Vaillant, 2008).

Aptes génitaux

Des ulcérations génitales récurrentes se produisent chez 80% environ des patients atteints de la MB et elles touchent la vulve, le vagin, le pénis (**figure 12**), le scrotum, ainsi que le périnée. Elles sont plus douloureuses chez les hommes et peuvent être asymptomatiques chez les femmes (Mark, 2004).



Figure 12 : Aphtose génitale du pénis (Parent et Vaillant, 2008).

Les autres manifestations cutanées

Les autres manifestations cutanées comportent l'érythème noueux, la pseudofolliculite (**figure 13**), les nodules acnéiformes, les thrombophlébites superficielles migratoires et l'hyperréactivité cutanée aspécifique aux agressions de l'épithélium (Camille, 1999).



Figure 13 : Lésion de pseudofolliculite (Edouard, 2009).

I.1.5.2 Atteinte ophtalmologique

L'atteinte oculaire est précoce, elle est présente chez 48% à 75% des patients. Il peut s'agir d'une uvéite antérieure avec ou sans hypopion, d'une uvéite postérieure ou d'une uvéite totale. L'uvéite antérieure se présente comme un œil rouge (**Figure 14**) et douloureux, uni-ou bilatéral, ne retentissant peu ou pas sur la fonction visuelle (Sève et Kodjikian, 2014). Les atteintes oculaires postérieures incluent des exsudats rétiniens, des œdèmes papillaires, des infiltrats cellulaires dans le corps vitré, et des lésions vasculaires rétiniennes (**Figure 15**) associées à des hémorragiques. Elle doit être recherchée et traitée rapidement car elle peut conduire à la perte de la vision. L'uvéite totale se caractérise par une inflammation sévère du segment antérieur, intermédiaire et postérieur (Gabay, 2008).

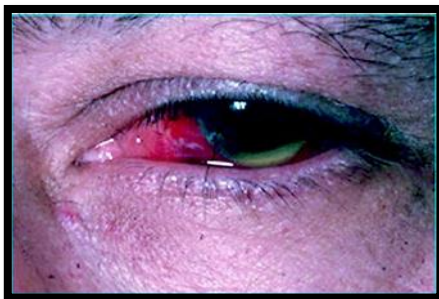


Figure 14 : Uvéite antérieure à Hypopion (Sève et Kodjikian, 2014).



Figure 15 : Foyers nécrotico-hémorragiques au fond d'oeil lors d'une uvéite postérieure (Pamir, 1981).

I.1.5.3 Atteinte articulaire

Des arthrites ou des arthralgies sont présentes dans 45 % des cas. Elles sont non érosives et touchent principalement les grosses articulations (genoux, chevilles). Elles peuvent précéder ou être concomitantes aux autres atteintes (Ambrose et Haskard, 2013).

I.1.5.4 Atteinte neurologique (neuro-Behçet)

Elle est présente dans 5,3 à 50 % des cas. Les atteintes parenchymateuses prédominent sous la forme de méningo-encéphalite. Les myélites et les pseudotumeurs sont beaucoup plus rares. Les atteintes extra parenchymateuses sont représentées par les thrombophlébites cérébrales et les anévrismes artériels et rejoignent les atteintes macro vasculaires de la maladie (Ambrose et Haskard, 2013).

I.1.5.5 Manifestations vasculaires (angio-Behçet)

Elle touche jusqu'à 40 % des patients selon les séries (Desbois et al., 2014) et survient une fois sur quatre au bout de la première année d'évolution, sans empêcher pour autant qu'elle soit inaugurale (Alami, 2011). La vascularite peut toucher les artères et les veines de tout calibre (Ara, 2000).

I.1.5.6 Atteinte digestive (entéro-Behçet)

Elles ressemblent aux lésions de la rectocolite hémorragique et de la maladie de Crohn. Les symptômes fonctionnels ne sont pas spécifiques : nausées, ballonnements, éructations, diarrhée, anorexie ; rectorragie sont possibles (Boukantar, 2011).

I.1.5.7 Symptômes constitutionnels

En plus de l'atteinte spécifique des différents organes, beaucoup de patients présentent des symptômes non spécifiques, particulièrement une fatigue et un malaise généralisé, avec ou sans fièvre et perte pondérale (Zuber et al., 2008).

I.1.6 Critères diagnostiques :

I.1.6.1 Diagnostic positif

Il n'y a aucun test de laboratoire spécifique de la MB et le diagnostic de cette affection repose sur une base clinique. Les critères internationaux de 1990 sont des critères de classification. Ces critères sont exclusivement dermatologiques et ophtalmologiques (Pertuiset, 2009) (**Tableau I**).

L'association, d'une aphtose buccale récurrente (>3 poussées/an) à au moins deux critères mineurs (parmi l'aphtose génitale, l'atteinte oculaire, les lésions cutanées et l'hyperréactivité cutanée) rend le diagnostic de MB hautement probable. Le test pathergique consiste en une intradermoréaction par une aiguille stérile de gros calibre (20 à 22 G) faite à l'avant-bras et sans instillation d'une solution. La lecture à 24 à 48 heures est considérée positive en cas de

formation d'une lésion pustuleuse ou d'un nodule (**Figure 16**). Ce test est fréquemment positif au cours de la MB (30 à 75 p.100) (Guillevin, 2014).



Figure 16 : Test pathergique positif (Coulon et Piette, 2007).

Tableau I : critères diagnostiques de la maladie de Behçet selon l'international Study Group For Behçet's (Weber, 2012).

- Aphthose buccale récurrente (au moins 3 fois en un an) De plus, le patient doit avoir deux des manifestations suivants :
- Aphthose génitale récurrente
- Atteinte oculaire (uvéite, vasculite rétinienne) identifiée par un ophtalmologiste
- Atteinte cutanée (érythème noueux, pseudofolliculite, nodules acnéiformes chez un patient adulte en dehors d'une corticothérapie)
- Pathergy test positif

De nouveaux critères de classification internationaux pour la MB ont été publiés en 2013. Ces critères incluent les atteintes suivantes (Guillevin, 2014) (**Tableau II**).

Tableau II : Nouveaux critères de classification internationaux pour la maladie de Behçet

Signe/symptôme	points
Lésions oculaires	2
Aphtes génitaux	2
Aphtes oraux	2
Lésions cutanées	1
Manifestations neurologiques	1
Manifestations vasculaires	1
Test pathergique positif	1

Un patient ayant un score d'au moins 4 points est classé comme ayant une MB (Guillevin, 2014).

I.1.6.2 Diagnostic différentiel

En l'absence de test diagnostique spécifique de la MB, la difficulté se présente notamment lorsque la triade syndromique uvéite et aphthose bipolaire n'est pas complète, chacune des

manifestations présentes devant faire l'objet d'une exclusion de ses autres possibles étiologies. Les principales autres causes de chacune des manifestations cardinales de la MB, sont résumées dans le **tableau III** (Yoshida et al., 2004).

Tableau III : Diagnostic différentiel de la maladie de Behçet (Marshall, 2004).

Symptômes	Diagnostic différentiel
érythème noueux, une uvéite et des arthralgies	sarcoïdose
ulcérations orales et génitales	syndrome de Reiter
Atteintes oculaires et cutanéomuqueuses	Syndrome de stevens- johnson
manifestations extra-intestinales et que la MB manifeste une atteinte gastro-intestinale prédominante	maladie de Crohn et la rectocolite ulcéro-hémorragique
atteinte neurologique	Sclérose multiple

I.1.7 Les modalités thérapeutiques :

Il n'y a que peu d'études contrôlées, randomisées, concernant le traitement de la MB (Zuber et al., 2008). Le traitement actuel est guidé par la sévérité de la maladie et le type d'organe atteint (**Figure 17**). L'objectif du traitement est de limiter le nombre de poussées et d'éviter la survenue de lésions irréversibles afin d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients (Hatemi et al., 2008).

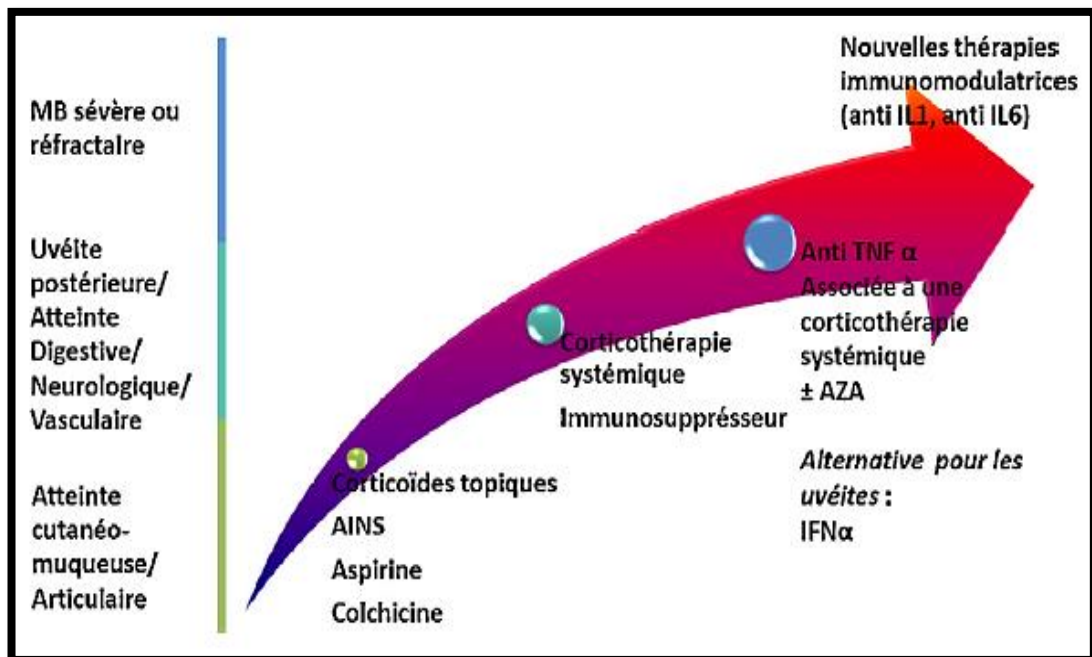


Figure 17 : Stratégie thérapeutique graduée dans la maladie de Behçet.

I.2 Généralité sur la PCR

La Réaction en chaîne par polymérase (PCR) a profondément marqué la biologie moléculaire (Primrose et al., 2001), est une technique puissante, largement répandue pour amplifier l'ADN et produire in vitro de grandes quantités d'une séquence d'ADN spécifique (Pasternak, 2003). L'amplification est obtenue grâce à la répétition de 30 à 40 cycles environ, de dénaturation, hybridation et extension (Kaplan et Delpech, 1989).

Actuellement deux grands types d'amplification ont été mis au point :

- **La PCR conventionnelle**
- **La PCR en temps réel**

I.2.1 La technique de PCR en temps réel

I.2.1.1 Définition

La PCR (polymerase by chain reaction) en temps réel est une révolution dans l'utilisation de la PCR (Ronsin, 2005), une technique de biologie moléculaire qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent (Vassias, 2003).

I.2.1.2 Le principe

Le principe de la PCR en temps réel est le même que celui de la PCR conventionnelle à la différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction.

La réaction se déroule dans un mélange réactionnel contenant des désoxyribonucléotides (dNTP), une polymérase, du magnésium et un tampon. A ce mélange sont ajoutées des amorces, courtes séquences nucléotidiques encadrant la séquence d'intérêt, et une sonde marquée, oligonucléotide permettant la détection de la séquence d'intérêt.

La PCR se déroule en plusieurs étapes (**figure 18**) :

1. dénaturation du double brin d'ADN par chauffage
2. hybridation des amorces et de la sonde
3. synthèse de la séquence complémentaire au brin matrice
4. ce cycle de 3 étapes est répété n fois (Dubosson, 2011), chacune se déroulant pendant un temps très court (environ une minute), et à une température bien précise (Hamidine, 2007).

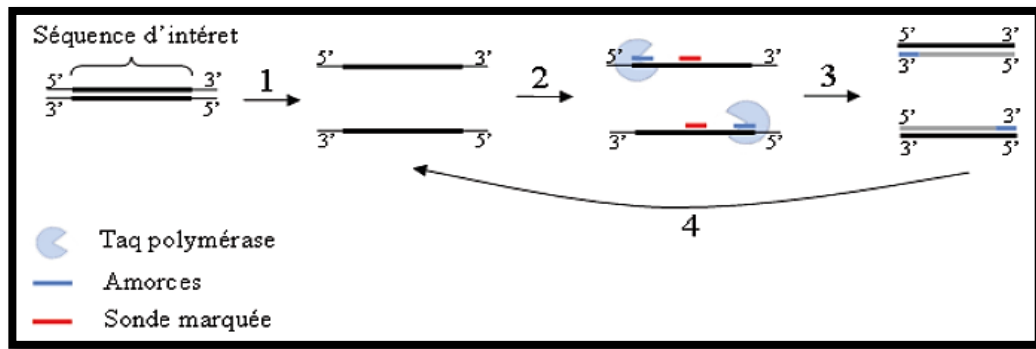


Figure 18 : Schéma du principe de PCR en temps réel (Dubosson, 2011).

L'appareillage, couplant un thermocycleur à un fluorimètre, permet alors de mesurer la fluorescence à chaque cycle d'amplification, et de tracer ainsi la courbe exponentielle de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles (Monsonogo, 2007).

I.2.1.3 Les systèmes de détection en temps réel

Plusieurs techniques existent : elles utilisent soit des molécules se liant à l'ADN, soit des sondes moléculaires spécifiques de la cible amplifiée (Ngoc Uyen, 2008).

- **Agents se liant à l'ADN double brin :**

SYBR Green

La réaction de PCR en temps réel contient l'ensemble des réactifs précédemment décrits (ADNg, dNTP, tampon, Taq polymérase, un couple d'amorces) avec l'addition d'un colorant fluorescent peu coûteux, le SYBR Green (**Figure 19**). Lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, il émet une forte fluorescence. Ainsi après chaque cycle de PCR, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produit amplifié. Les produits d'amplification non spécifiques peuvent être différenciés des produits spécifiques par analyse de la courbe de fusion. Elle est réalisée en soumettant les amplicons à une température progressant de +55°C à +95°C par palier de 0.5°C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température et permet de définir la température de fusion (T_m) d'un amplicon (Jacques et al., 2011).

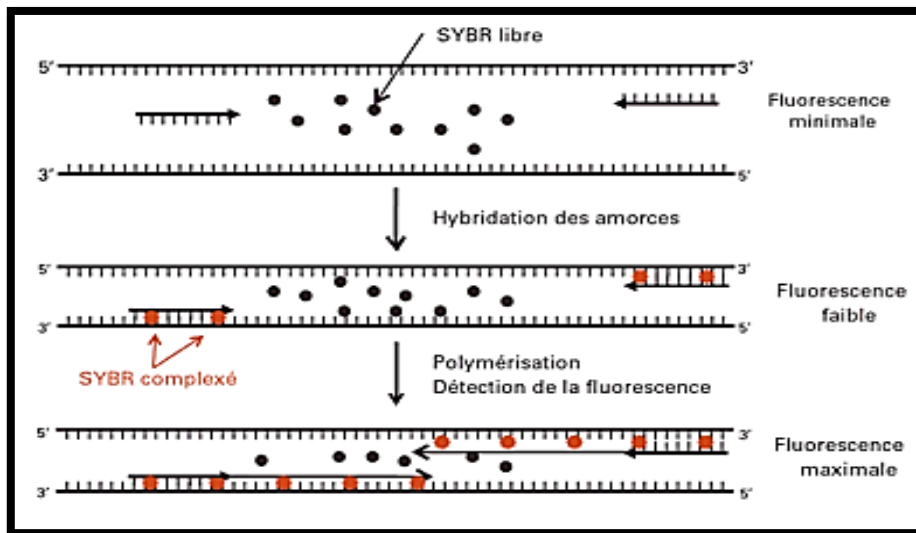


Figure 19 : Principe de détection des ADN double brin par incorporation de SYBR Green.

- **Les sondes fluorescentes :**

Les sondes fluorescentes utilisées en PCR en temps réel sont basées sur le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Il existe différents types de sondes fluorescentes utilisées pour la détection de l'ADN (Dubosson, 2011).

Hydrolyse de sondes (TaqMan)

Le principe TaqMan est présenté dans la partie pratique.

Balises moléculaires

La technique des balises moléculaires utilise des sondes particulières qui renferment trois segments : deux séquences courtes complémentaires portant respectivement un reporter et un quencher en 5' et 3' et encadrant une séquence complémentaire du produit de PCR à détecter. En absence de cible, la balise moléculaire est en configuration fermée en épingle à cheveux, le reporter est proche du quencher, il n'y a pas de signal de fluorescence. Lorsque la balise moléculaire s'associe à sa cible (dans le cas d'hybridation spécifique), sa structure s'ouvre, le quencher et le reporter s'éloignent l'un de l'autre, une mesure de fluorescence est alors possible (**Figure 20**) (Le Morvan et al., 2005).

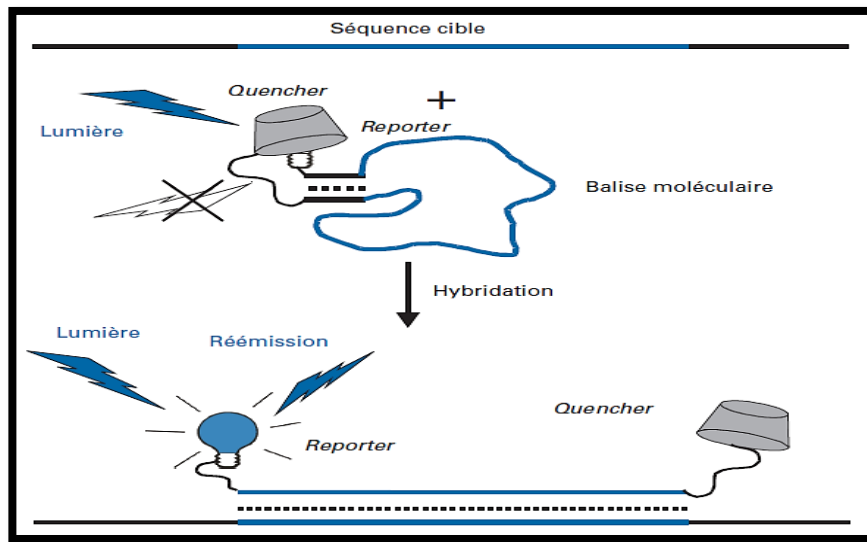


Figure 20 : Principe du fonctionnement des balises moléculaire.

Amorces scorpion

Les amorces scorpion représentent une variante de la technologie des balises moléculaires. Les fluorochromes et la sonde (partie balise moléculaire) sont intégrés à même l'amplicon de façon irréversible durant l'amplification par PCR. La région amorce du scorpion permet donc d'intégrer la balise moléculaire dans le nouvel amplicon pendant la réaction de PCR. La boucle de l'épingle à cheveux est dessinée dans le but de permettre l'hybridation de la sonde à sa séquence complémentaire cible située sur l'amplicon (figure 21). Cette hybridation force l'épingle à cheveux à changer de conformation permettant ainsi l'émission de fluorescence (Whitcombe et al, 1999 ; Thelwell et al, 2000 ; Mackay et al, 2002).

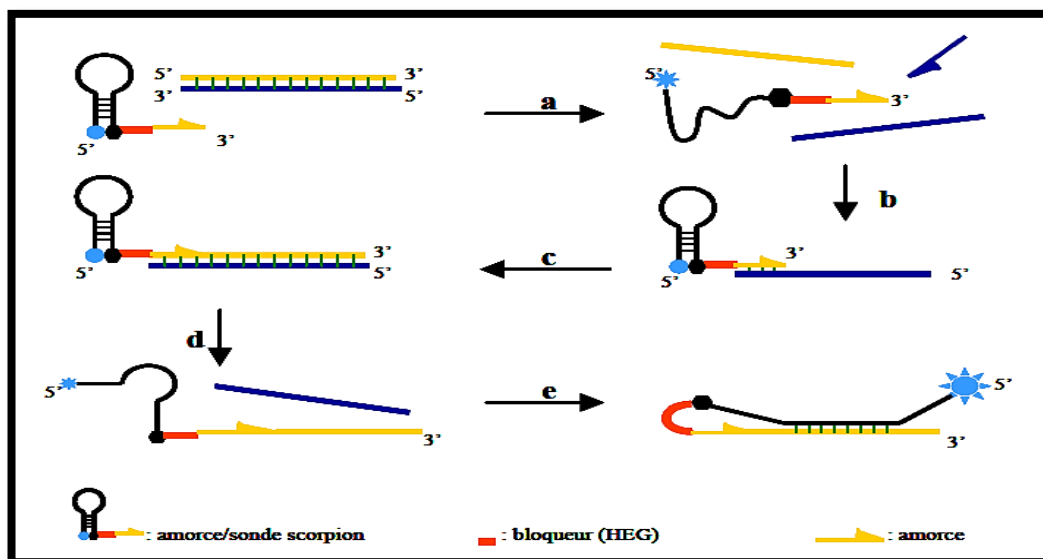


Figure 21 : Amorces scorpion (Scorpion primer).

**MATERIEL ET
METHODES**

II- Matériel et méthodes

Notre étude pratique a été réalisée au niveau du service d'immunologie médicale, laboratoire d'immunogénétique de l'hôpital « ISSAD Hassani » de Beni Messous pendant une durée de trois mois. L'objectif essentiel de ce travail est de rechercher et déterminer la fréquence de l'allèle B51 au cours de la maladie de Behçet chez les patients Algériens atteints de cette maladie et de corréler la présence de cet allèle avec les manifestations cliniques de la maladie. La recherche de l'antigène B51 a été faite par la technique de PCR en temps réel dont le principe repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN polymérisé présente dans la réaction à tout instant grâce à un marqueur fluorescent.

Une analyse statistique a été effectuée pour les patients atteints de la MB par rapport aux témoins sains afin de tester les résultats de cette étude.

II.1 Matériel biologique :

Les Patients

Il s'agit d'une étude qui a porté sur 21 patients atteints de la MB, originaires de différentes régions d'Algérie et appariés d'âge et de sexe, 8 hommes et 13 femmes, dont l'âge varie entre 5 et 59 ans, avec une moyenne de $31,33 \pm 11,14$ ans. On note un sexe-ratio F/H de 1,63.

Une fiche de renseignements a été remplie pour chaque patient par le médecin traitant, incluant des informations sur son âge, sexe, région d'origine, antécédents personnels et familiaux, la date du prélèvement, les différentes manifestations cliniques de la MB et l'examen demandé (typage HLA-B51 positif ou négatif) (**Voir Annexe 1**).

Le prélèvement de sang se fait par ponction veineuse dans des conditions stériles dans des tubes EDTA avec une étiquette où on écrit le nom, prénom du patient et la date du prélèvement.

Conserver l'échantillon à -20°C si celui-ci ne peut être analysé en moins de 24 h. Le sang est décongelé à température ambiante au moment de l'utilisation.

Témoins sains

Elle comprend 50 sujets sains indemnes de toute affection cliniquement décelable. L'âge moyenne de cette population est 34 ans avec un sexe ratio de 1/1.

II.2 Matériel non biologique :

L'appareillage, le matériel et les réactifs utilisés dans notre étude est représenté en (**Annexe1**).

Processus de travail

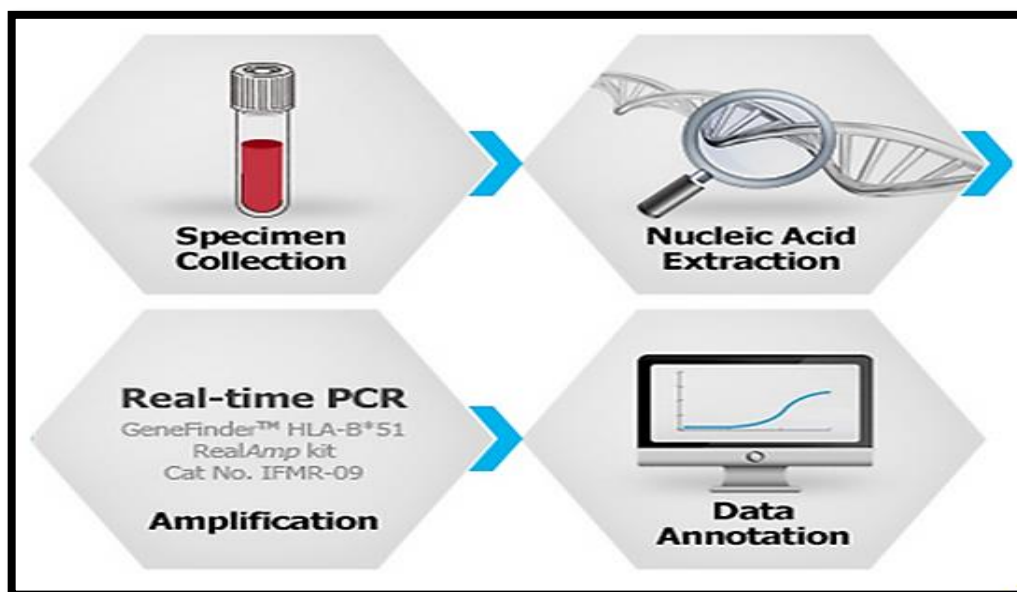


Figure 22 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation PCR en temps réel.

II.3 Les méthodes d'études :

Extraction d'ADN par la technique de KIT INVITROGENE :

L'ADN utilisé comme matrice d'amplification pour les réactions PCR en temps réel a été extrait par la technique « de Kit invitrogene ».

a. Principe

La technique de Kit invitrogene utilise la technologie de la membrane de gel de silice pour l'isolation simple et rapide de l'ADN génomique sans phénol-chloroforme. L'homogénéisation n'est pas nécessaire car les tissus sont directement lysés par la protéinase K. Le système tampon est optimisé pour permettre la liaison sélective de l'ADN à la membrane de gel de silice.

b. Mode opératoire

La lyse des globules blancs

Ajouter 200 µl de sang total, dans un eppendorf stérile **1***

Rajouter 20µl de protéinase K

Rajouter 20 µl de RNase A

Vortexer, laisser 2 (Minutes) mn à Température ambiante

Rajouter 200 Microlitres (µl) de Pure Link Genomic Lysis/ Binding Buffer, Vortexer

Incuber à 55°C pendant 10mn (pour une lyse optimale)

Rajouter 200µl d'éthanol (96-100%) au lysat

Vortexer pendant 5 seconds

Transvaser le lysat dans une colonne stérile

Centrifuger à 10000g pendant 1 mn à T ambiante

Etape de lavage (Elimination des contaminants de l'ADN)

Placer la colonne dans la première poubelle

Rajouter 500 ul Du Tampon 1 (Wash Buffer 1)

Centrifuger à 10000 g pendant 1mn à T ambiante

Placer la colonne dans la deuxième poubelle

Rajouter 500 ul du tampon 2 (Wash Buffer 2)

Centrifuger à 14000g (vitesse maximale) pendant 3 mn à T ambiante

Etape d'élution (Solubilisation de l'ADN pure)

Placer la colonne dans un eppendorf stérile

Rajouter 25-100 ul de solution d'élution (Pure Link Génomic Elution Buffer) **2***

Incuber a pendant 1 mn à T ambiante

Centrifuger à 14000 g pendant 1 mn à T ambiante

L'ependorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne) **3***

1* Le sang est prélevé sur anticoagulant. S'il est congelé laisser décongeler une nuit à +4 ou 20 à 30 mn à T ambiante

2* Le volume de solution d'éluion à rajouter est fonction de la concentration d'ADN voulu

3* Pour augmenter le rendement de l'extraction, il est recommander de faire deux éluions sur la même colonne en utilisant deux tubes différents (pour prévenir la dilution de l'ADN).

c. Détermination de la concentration de l'ADN

Quantité de l'ADN

Remettre en suspension l'ADN isolé dans de l'eau distillée stérile et ajuster à la concentration de 100 ± 50 ng/ μ l. L'ADN ne devra pas être remis en suspension dans des réactifs qui contiennent des chélateurs tels que l'EDTA à une concentration $> 0,5$ mM.

Qualité de l'ADN

La concentration de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (A260).

La valeur $A_{260} = 1$ (= DO 1,0) correspond à environ 50 μ g/ml d'ADN bicaténaire.

- En vue de déterminer le degré de contamination de l'ADN par des protéines, on peut procéder en complément à une mesure à 280 nm et calculer le quotient A_{260}/A_{280} .
- L'ADN pur donne un quotient de 1,8 ou plus.
- Un quotient A_{260}/A_{280} inférieur à 1,8 → Indice en faveur d'une contamination de l'ADN par des protéines.
- Un quotient A_{260}/A_{280} égal à 1,5 → Le pourcentage de protéines de la préparation d'ADN est de l'ordre de 50 %.

PCR en temps réel

a. Principe

La PCR en temps réel combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique (dénaturation, hybridation, extension). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la

réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle (Elyse, 2002).

b. Détection

La technique PCR utilisée lors de ce travail est basée sur le principe de sonde fluorescente avec une technique de détection : La technologie de sonde d'hydrolyse TaqMan. La sonde a une taille qui varie de 15 à 25 nucléotides (Nt) et est complémentaire à une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier.

La sonde d'hydrolyse : TaqMan

Les systèmes de PCR en temps réel ont été améliorés par l'introduction de sondes marquées par un fluorophore qui utilisent l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase. Ces sondes ont permis de développer une méthode qui ne détecte en temps réel que les produits d'amplification spécifiques.

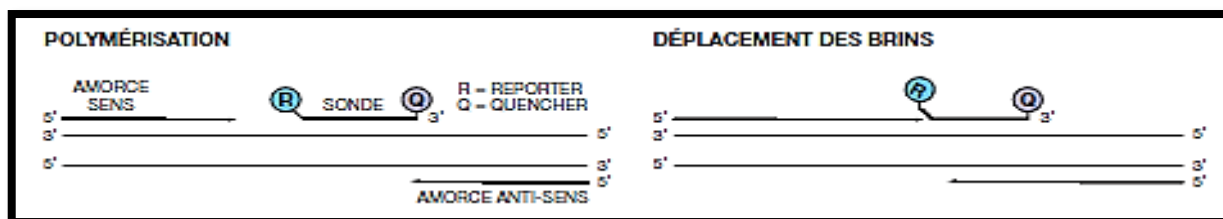
Fonctionnement des réactifs TaqMan

Les réactifs TaqMan utilisent une sonde marquée par un fluorophore pour détecter un produit de PCR spécifique accumulé pendant la PCR. Ils fonctionnent d'après le principe suivant :

1. Une sonde oligonucléotidique est marquée par un reporter fluorescent lié à l'extrémité 5' et un quencher lié à l'extrémité 3'. Lorsque la sonde est intacte, la proximité du quencher réduit fortement la fluorescence émise par le reporter du fait d'un transfert d'énergie dans l'espace (technologie de FRET).
2. Si la séquence cible est présente, la sonde s'hybride entre les amorces, puis elle est clivée par l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase pendant l'extension.
3. Le clivage de la sonde :
 - Sépare le reporter du quencher en augmentant le signal du premier.
 - Supprime la sonde du brin cible et permet à l'amorce de poursuivre son extension jusqu'à la fin du brin modèle. Ainsi, l'ajout de la sonde ne bloque pas le processus général de PCR.
4. Une quantité croissante des molécules du reporter est libérée à chaque cycle, ce qui augmente l'intensité de la fluorescence proportionnellement à la quantité d'amplicon produite. Plus le nombre de copies de la séquence cible est élevé au départ, plus l'augmentation de la fluorescence est précoce.

La **Figure 23** illustre ce processus.

Etape 1 et 2 :



Etape 3 et 4 :

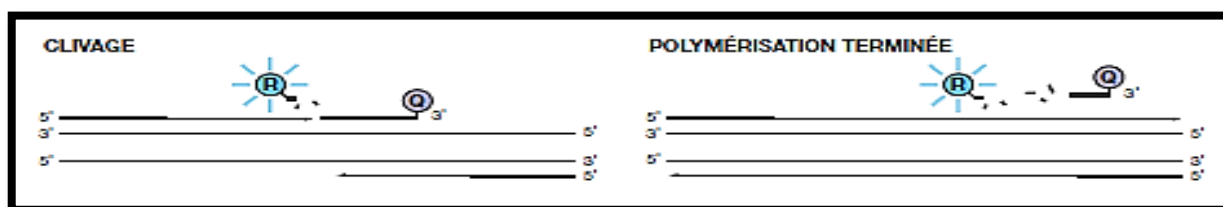


Figure 23 : Fonctionnement des réactifs TaqMan (Anonyme, 2010).

Etapes de réalisation de la PCR en temps réel

Une expérience de présence/absence est réalisée en point final pour indiquer la présence ou l'absence d'une séquence d'acide nucléique spécifique (**Allèle B51**) dans un échantillon. La quantité réelle de l'**allèle B51** n'est pas déterminée.

Composants

Les réactions de PCR pour les expériences de présence/absence incluent les composants suivants :

- **Échantillon**

- Échantillon dans lequel la présence de la cible est inconnue.

- **Réplicats**

- Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.

- **Contrôle positif interne (IPC)**

- Échantillon d'ADN synthétique court ajouté aux réactions de PCR. L'IPC peut être utilisé pour distinguer les vrais résultats négatifs et les réactions affectées par les inhibiteurs de PCR, une préparation incorrecte de l'expérience ou une défaillance du réactif.

- **Puits de contrôle négatif avec IPC bloqué**

– Puits qui contient un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Aucune amplification ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif avec IPC bloqué car la réaction ne contient pas d'échantillon et l'amplification de l'IPC est bloquée.

- **Puits IPC à contrôle négatif**

– Puits qui contient un échantillon d'IPC et du tampon ou de l'eau à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Seul l'échantillon d'IPC doit être amplifié dans les puits IPC à contrôle négatif car la réaction ne contient pas d'échantillon.

HLA-B*51 Real Amp Kit

Le Kit utilisé dans notre étude pour la recherche de présence ou l'absence de l'allèle HLA-B*51 est le « Gene Finder HLA-B*51 Real Amp » (**Annexe 1**), conservé à -20 °C retiré juste avant l'utilisation (La durée de conservation est de 12 mois). Une plaque de 96 puits est utilisée. Le kit est conçu pour la détection directe et qualitative du gène HLA-B*51 (85 mn) dans l'échantillon de l'ADN humain. Le test est conçu pour être utilisé comme une aide dans le diagnostic de la maladie associée par HLA-B*51.

Composants de Kit

Le kit de Gene Finder HLA-B*51 Real Amp (**Tableau IV**) est un kit qualitative utilisant le système de PCR en temps réel pratique et simple détectant les gènes HLA-B*51.

Tableau IV : Composants de Kit Gene Finder HLA-B51 Real Amp

kit HLA-B51 Real Amp	100rxns
B51 2X Rxn*	550µl
B51 ADN Pol**	110 µl
B51 PC***	50µl

* B51 2X Rxn, oligonucléotides pour l'amplification et la détection de la cible et du contrôle interne, amortisseur contenant des dNTPs.

** B51 ADN Pol, ADN polymérase.

*** B51 PC, clones pour les cibles.

c. Mode opératoire

Préparation du mélange réactionnel (réactifs) pour l'amplification de l'ADN :

Avant la mise en place PCR, tous les composants doivent être décongelés, mélangés doucement et centrifugés brièvement pour rassembler la solution au fond.

1. Mélanger 5 μ L de B51 2X Rxn et 1 μ L de B51 ADN pol. Pour préparer le mélange pour chaque réaction (**tableau V**). Préparer assez de volume de mélange pour toutes les réactions et un peu plus pour prévenir toute erreur,
2. Après avoir bien mélangé, placer 6 μ L de mélange dans la plaque de 96 puits,
3. Ajouter 4 μ L de l'échantillon d'ADN extrait en plaque de 96 puits, puis mélanger tous les composants par pipetage. Procéder de la même manière avec d'autres échantillons d'ADN, contrôle positif et négatif (eau de qualité ultra pure, qualité PCR),
4. fermer avec précision le sceau de la plaque de 96 puits,
5. Transférer la plaque de 96 puits pour un test dans la PCR en temps réel et procéder à l'amplification.

Tableau V : Composants du mélange

Composants	Par réaction (μ L)
B51 2X Rxn	5
B51 ADN pol.	1
Échantillon d'ADN ou PC ou NC	4
Volume total	10

Réglage de la PCR en temps réel

Ce produit est validé sur le système de l'appareil PCR en temps réel ABI 7500.

1. En se référant au manuel de l'appareil, introduire les paramètres du cycle thermique sur le logiciel.
2. Mettre en place le programme de PCR (**tableau VI**) et de la fluorescence (**tableau VII**), puis cliquer sur le bouton de démarrage "Exécuter".

Tableau VI : Programme de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).

Programme PCR				
	Étape	Température.	Temps	Cycle
1	Dénaturation	95°C	5min	1
	Dénaturation	96°C	25 sec	
2	Hybridation	70°C	45sec	5
	Extension	72°C	30 sec	
	Dénaturation	96°C	25 sec	
3	Hybridation	65°C	45 sec	30
	Extension	72°C	30 sec	

Tableau VII : Réglage de fluorescence de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).

Réglage de fluorescence	
Cible	Appareil ABI 7500
HLA-B*51	FAM
Contrôle interne (IC)	ROX

Analyse de réglage

Les valeurs de la fluorescence émises par les sondes spécifiques et par la sonde spécifique de contrôle interne dans les réactions d'amplification devraient être analysées par le logiciel de l'appareil.

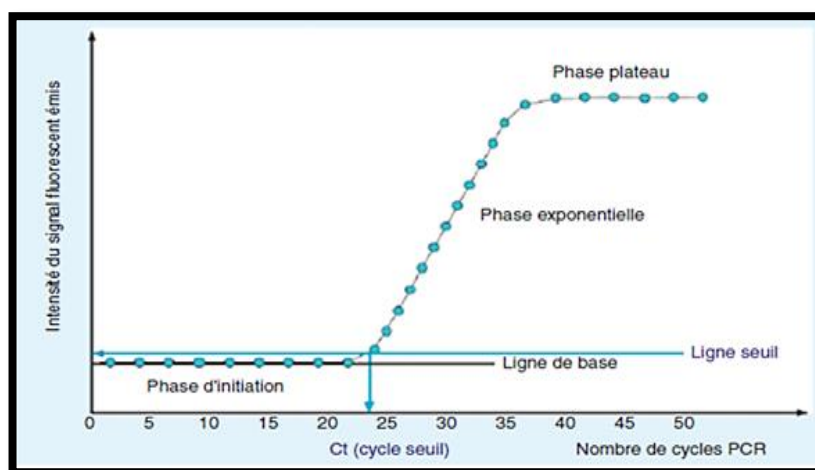
- 1- Avant l'analyse des résultats, placez la ligne de base et le seuil conformément au tableau VIII,
- 2- Commencer à analyser les résultats.

Tableau VIII : Analyse de fluorescence de la PCR en temps réel.

	Réglage de base		Paramètre Seuil	
	B*51	IC	B*51	IC
ABI 7500	6~15		30,000	20,000

d. Interprétation des résultats

Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil, dénommé cycle seuil ou Ct (cycle threshold) (**figure24**), est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR (Anonyme, 2010). Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR (Tse et Capeau, 2003).

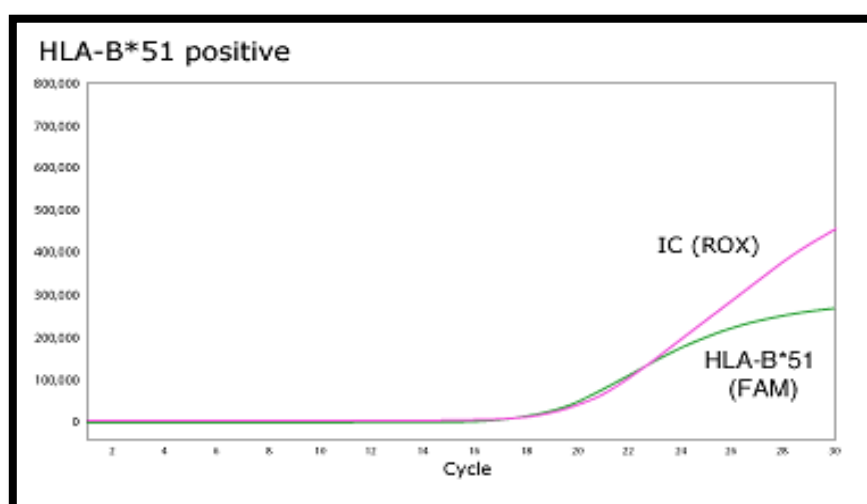
**Figure 24** : Profil d'une courbe de PCR en temps réel (Tse et Capeau, 2003).

Des exemples pour l'interprétation des résultats si l'échantillon est positif / négatif (**Tableau IX**).

Tableau IX : Interprétation des résultats de de la PCR en temps réel (Taqman 7500 Real-Time PCR).

Valeur Ct		Résultat	Remarque
B*51 (FAM)	IC (ROX)		
16-26	<28	B*51 positive	-
16-26	16> or 28<	B*51 positive	Si la valeur Ct de l'IC est en dehors des critères et la valeur cible Ct est dans les critères, un échantillon est positif pour l'allèle B*51.
16-26	UD	B*51 positive	-
UD	<28	B*51 négative	-
UD	UD	Non valide	Répéter le test de l'étape d'extraction d'ADN.

UD : Indéterminé

Modèle graphique de la PCR en temps réel (Figure 25)

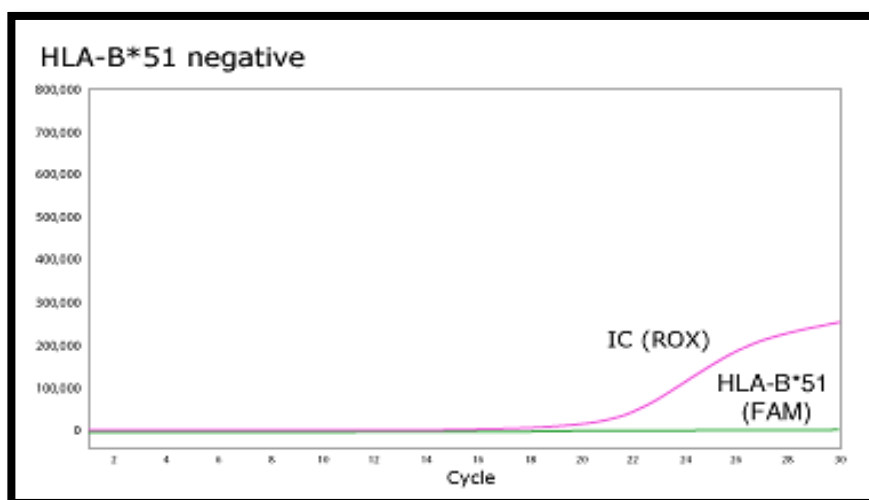


Figure 25 : Profils de la PCR en temps réel HLA-B51 (+) et HLA-B51 (-).

II.4 Méthode analytique :

L'analyse statistique a été effectuée au moyen du logiciel COMPARE (teste Chi 2). Les fréquences de l'allèle HLA-B51 des patients et celles des témoins ont été comparées. Le rapport Odd's ratio et les intervalles de confiance (IC) de 95 % ont été calculés. Les valeurs « p » inférieures à 0,05, ont été considérées statistiquement significatives. La correction de Yates pour les faibles échantillons a été utilisée.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

III- Résultats et discussion

III-1 Données épidémiologiques

III-1-1 Répartition des patients atteints de la MB selon leur sexe :

Dans notre série, les 21 patients se répartissaient en 13 femmes (61,90%) et 8 hommes (38,10%), soit un sexe ratio F/H de 1,63 (Voir figure 26).

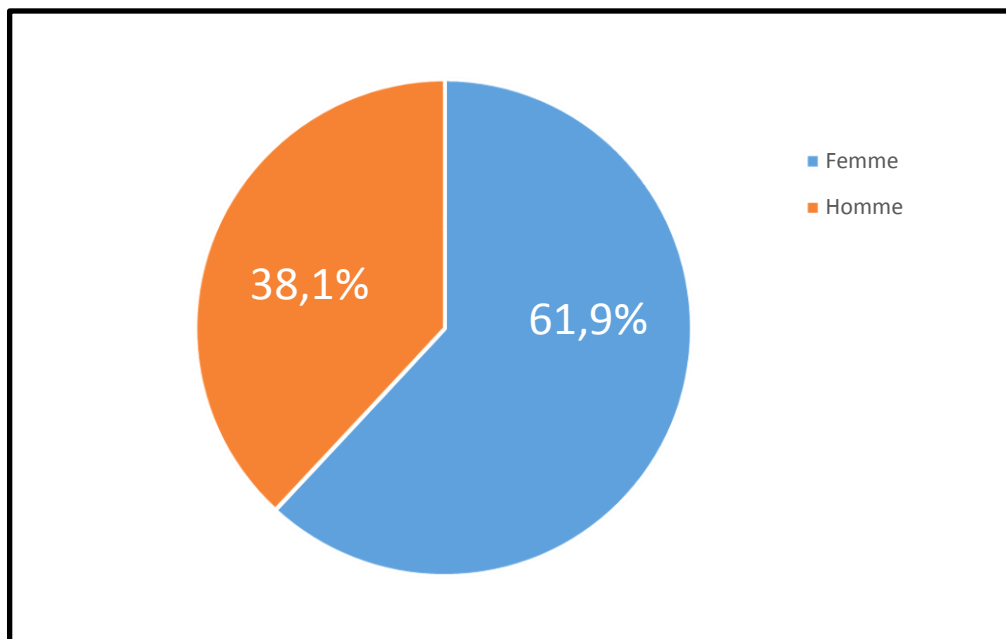


Figure 26 : Représentation de la répartition des patients selon leur sexe.

Les deux sexes peuvent être affectés, avec un équilibre de répartition entre hommes et femmes. Le sexe ratio de notre série (1,63) se rapproche des résultats obtenus par (B'chir-Hamzaoui et al., 2009) qui estime un sexe ratio de 1,93 en Algérie. D'autres études au pays Maghreb rapportent une légère prédominance masculine, ces études ont montré un sex-ratio de 2,54 en Tunisie et 3,07 au Maroc. Le sexe ratio varie avec l'origine ethnique des patients. La MB est plus fréquent parmi les femmes en Extrême-Orient. Par contre, les résultats sont opposés au Moyen-Orient et en Turquie avec une fréquence plus importante chez les hommes (Gabay, 2008).

III-1-2 Répartition des patients par tranches d'âge :

La moyenne d'âge dans notre série au moment du diagnostic de MB est de $31,3 \pm 11,1$ ans avec des extrêmes allant de 5 ans à 59 ans.

Nous avons effectué une répartition des malades selon les trois classes d'âge suivantes :

<18 ans, 18-40 ans et >40 ans (**Voir tableau X en Annexe 2**).

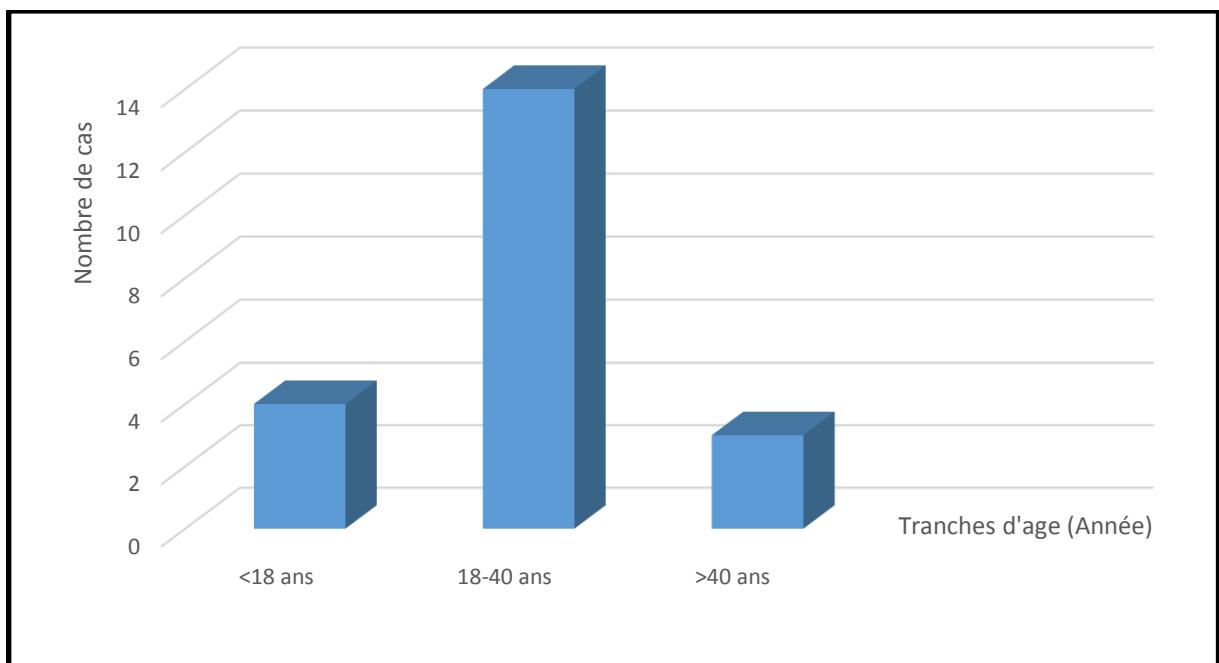


Figure 27 : Histogramme montrant la répartition des patients en fonction de l'âge.

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par (B'chir-Hamzaoui et al., 2009) qui estime une moyenne d'âge au moment du diagnostic de $32,6 \pm 9,5$ ans aux pays du Maghreb. Ces études montrent une moyenne de 31,7 ans en Algérie, 33 ans en Tunisie et 33,4 ans au Maroc.

La catégorie la plus concernée dans notre étude est celle dont la tranche d'âge est comprise entre 18 et 40 ans et donc chez les adultes jeunes (14 patients) avec un pourcentage de 66,66%, suivie des patients dont l'âge est moins de 18 ans (4 patients) avec un pourcentage de 19,05%, puis ceux dont l'âge est plus de 40 ans (3 patients) avec 14,29% (**Figure 27**). D'après (Jaziri et al., 2010), la MB survient le plus souvent entre la deuxième et la quatrième décade de la vie et elle est rarement retrouvée chez les enfants et après l'âge de 40 ans (Saadoun et al., 2010). Une étude faite en Tunisie par (Hamzaoui et al., 2014), a montré que le jeune adulte est le plus touché, avec une apparition typique entre l'âge de 20 et 40 ans.

Cependant, des cas ont été décrits au cours des premier mois de la vie et d'autres après 70 ans (Jaziri et al., 2010).

III-1-3 Répartition des patients en fonction de leur sexe et leurs classes d'âge :

La répartition des patients en fonction de leur sexe et leurs classes d'âge est présentée dans le (tableau XI en Annexe 2).

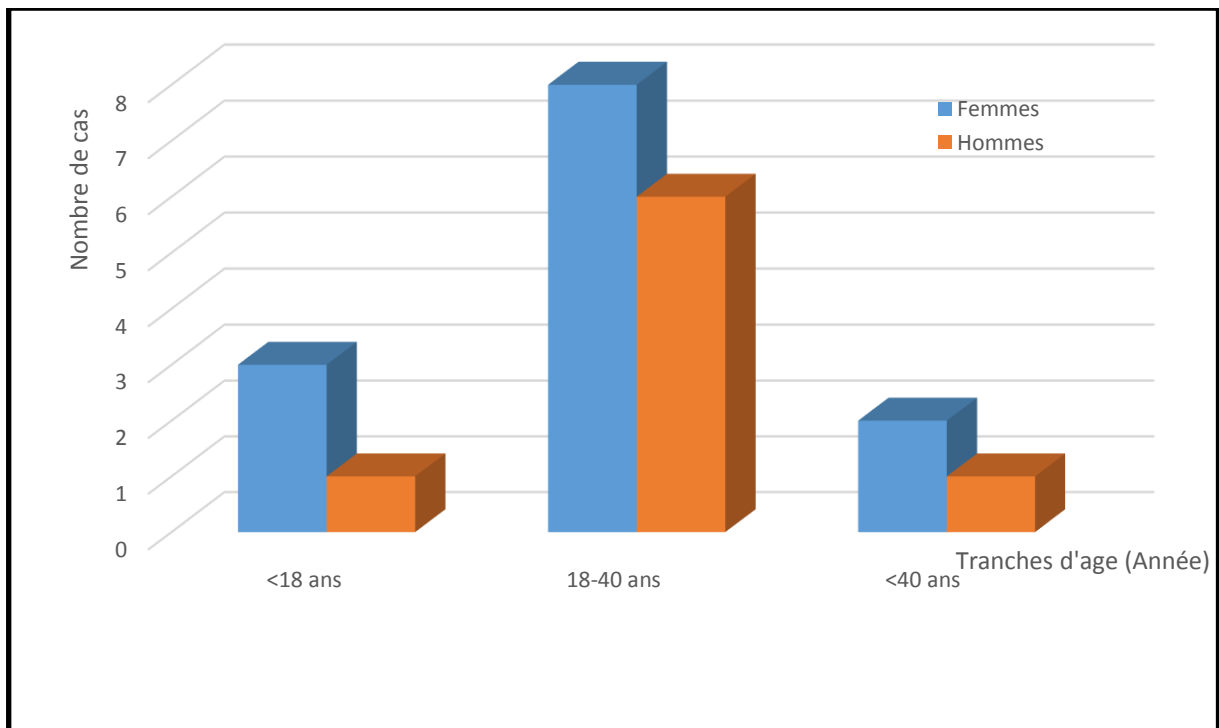


Figure 28 : Histogramme montrant la répartition des patients selon leur sexe et leurs classes d'âge.

Les résultats de la répartition des patients atteints de MB selon le sexe et leurs classes d'âge (**Figure 28**) a montré un équilibre entre les deux sexes et plus particulièrement dans la tranche d'âge comprise entre 18 et 40 ans. L'âge moyen des hommes est de 33,75, alors que l'âge moyen des femmes est de 29,86 (**P >0.05**).

Il semble d'après des études, que le sexe module l'expression et même la sévérité de la MB. En effet, Les formes féminines se caractérisent par la survenue plus tardive de la maladie et le caractère moins sévère que les formes masculines (Fahsi, 1994). Les facteurs hormonaux peuvent avoir une place dans la physiopathologie de la maladie de Behçet. Bien que le nombre de patients de sexe féminin soient presque équivalent à ceux de sexe masculin dans beaucoup de séries, la maladie de Behçet donne plus de manifestations sévères chez les hommes. Il peut être discuté que les hormones femelles peuvent avoir un rôle protecteur de

l'activation endothéliale et peuvent prévenir la progression de la maladie de Behçet (Sharquie et al., 2002).

III-2 Données cliniques

III-2-1 Répartition des patients en fonction des manifestations cliniques :

La répartition des patients selon leurs signes cliniques est déterminée comme suit (Atteinte cutanéomuqueuse) (Atteinte ophtalmologique) (Atteinte articulaire) (Neuro-Behçet) (Entéro-Behçet) (Angio-Behçet) (**Voir tableau XII et figure 29**).

Tableau XII : Représentation de la répartition des patients en fonction des manifestations cliniques de la maladie

Manifestations Cliniques	Nombre Total (n=21)	Fréquence totale (%)
Atteinte cutanéomuqueuse :	17	81%
- Aphtes buccaux	17	81%
- Aphtes génitaux	11	52%
- Pseudo folliculite	7	33%
Atteinte ophtalmologique	7	33%
- Uvéite antérieure	5	24%
- Uvéite postérieure	4	19%
- Uvéite totale	2	10%
Atteinte articulaire	9	43%
Neuro-Behçet	4	19%
Entéro-Behçet	1	5%
Angio-Behçet	0	0%

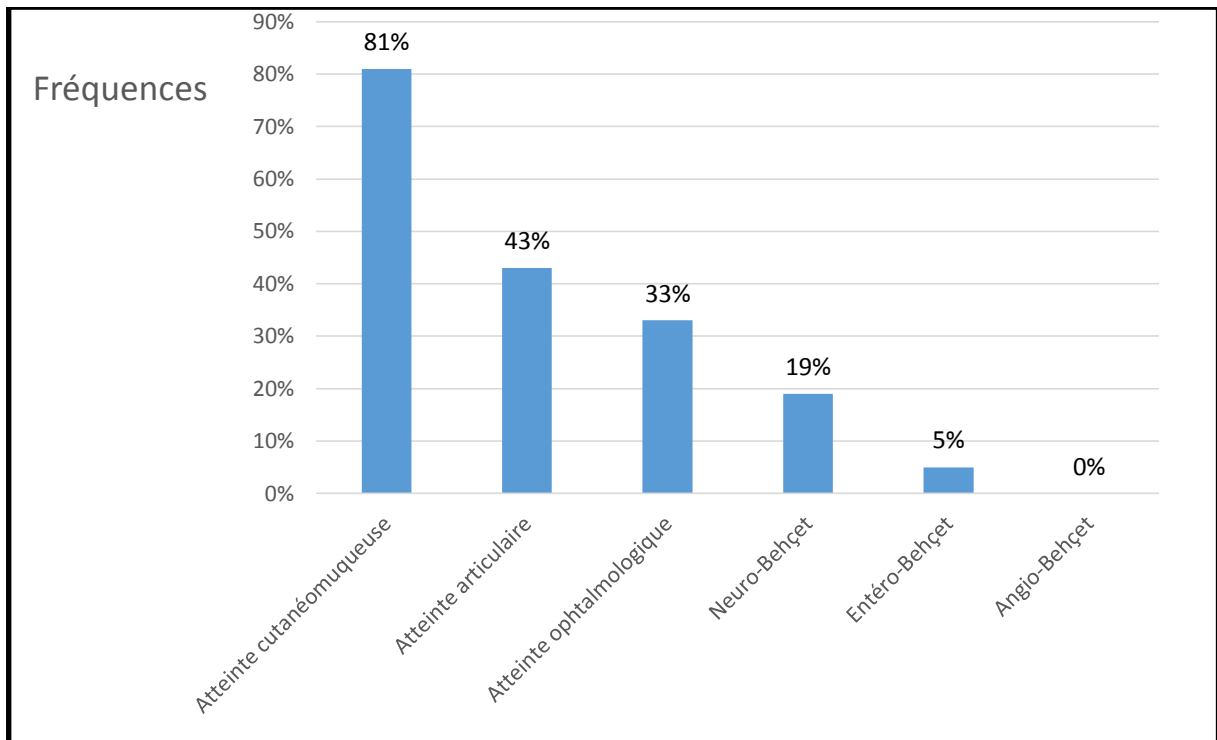


Figure 29 : Histogramme montrant la répartition des patients atteints de la MB en fonction des manifestations cliniques.

L'analyse des données cliniques de notre population de patients a retrouvé une fréquence de 81% d'atteintes cutanéomuqueuses (81% d'Aphtes buccaux ; 52% d'Aphtes génitaux, puis la Pseudo folliculite avec 33%). La présence constante des aphtes buccaux au cours de la MB a suggéré que la flore microbienne orale, notamment streptococcique, pouvait être impliquée dans la pathogénie de la maladie. KTH-1, antigène de *Streptococcus sanguis*, peut activer les LT des malades, notamment les $LT\gamma\delta$, qui produisent des cytokines pro inflammatoires comme le $TNF-\alpha$, l' $IFN\gamma$, l' $IL-6$ et l' $IL-8$ (Amoura et al., 2006).

Vient en 2eme position l'Atteinte articulaire à 43%, puis des atteintes ophtalmologiques à 33% (L'Uvéite antérieure à 24%, L'Uvéite postérieure à 19% et totale à 10%), puis Neuro-Behçet à 19% et Entéro-Behçet à 5%. l'atteinte Angio-Behçet est absente dans notre série (0%). La fréquence des différentes manifestations cliniques telles que les ulcères oraux ou génitaux, les atteintes oculaires, cutanées et articulaires varie peu dans les différentes séries (Gabay, 2008). Nos résultats rejoignent les principales études cliniques. D'après (B'chir-Hamzaoui et al., 2009), la fréquence était comme suit au pays du Maghreb (aphtose buccale 99,7%, aphtose génitale 83%, pseudofolliculite 65,6%, atteinte articulaire 53,2%, atteinte oculaire 39%, atteinte neurologique 11,7 %). La fréquence de l'atteinte vasculaire au cours de la MB varie de 7 à 40% selon les groupes ethniques étudiés. Dans notre série cette fréquence ne rejoint pas celle des pays de l'Ouest du bassin méditerranéens ou elle est la plus élevée.

Dans une autre étude sur les Atteints vasculaires au cours de la MB en Tunisie, (Braham et al., 2008) a noté une fréquence de 32%.

III-3 Recherche de l'allèle HLA-B51 dans les patients atteints de MB

III-3-1 Calcul des fréquences alléliques :

Pour déterminer les fréquences alléliques (**Tableau XIII**), les 21 patients atteints de la MB ont été comparé à 50 témoins sains (**Tableau XIV**).

Tableau XIII : Calcul des fréquences de HLA-B51(+) des patients et des témoins sains.

	Patients (n=21)	Témoins sains (n=50)
HLA-B51(+)	11	8
Pourcentage		
B51(+)	52,38%	16 %

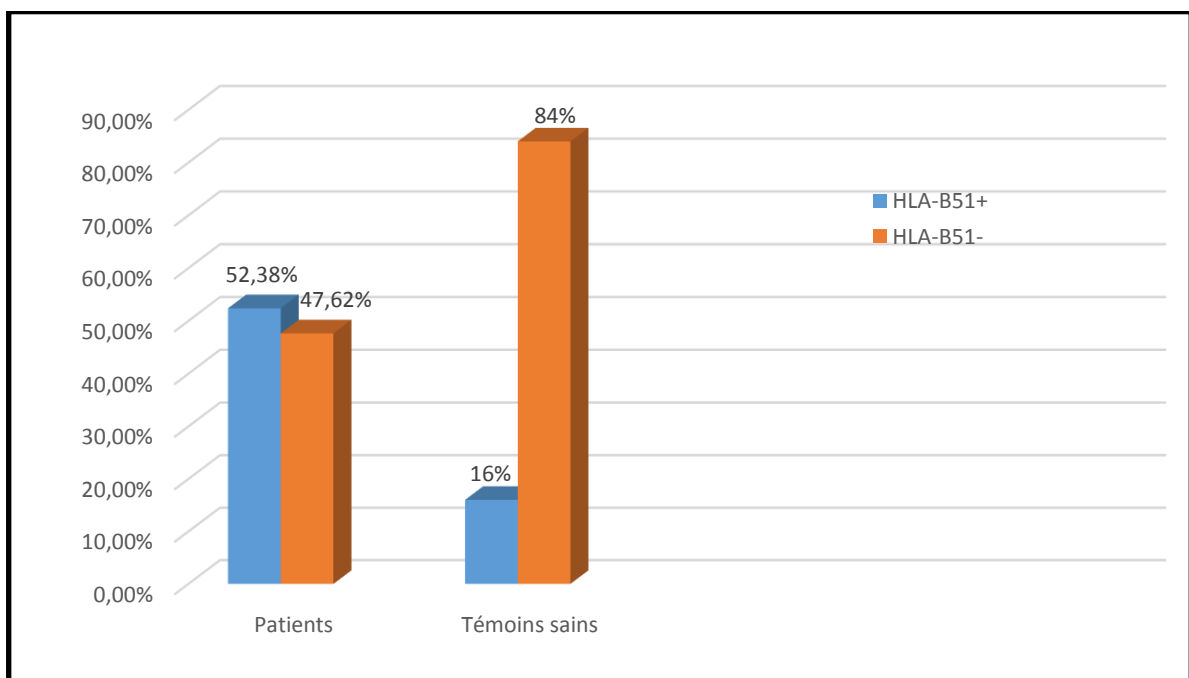


Figure 30 : Histogramme montrant les fréquences phénotypiques de HLA-B51 (+) des patients et des témoins sains.

Tableau XIV : Comparaison des fréquences phénotypiques de HLA-B51(+) des patients et des témoins sains

Phénotype	P	Odd's ratio	IC (95%)
HLA-B51+	0.002	5,78	1.54-6.96

L'allèle HLA-B51 est exprimé chez **(52,38%)** des patients (n=11) et seulement chez **(16%)** des témoins (n= 8) (**Figure 31**). Il est donc significativement associé à la maladie de Behçet (**P=0.002 ; Odd's ratio = 5.78 ; IC 95% = 1.54-6.96**).

La présence de l'antigène HLA-B51 est plus fréquente chez les patients (en moyenne de 40-80 %, soit deux à trois fois sa prévalence chez les témoins, ce qui correspond à un risque relatif de 3 à 15 selon les groupes ethniques) (Guichard et al., 2010). Nos résultats se rapprochent des résultats obtenus par (Moudatir, 2008) dans une étude au Maroc qui montre que HLA-B51 représentait l'allèle le plus fréquemment associé à la MB : (52,85%) versus (17,14%) pour le groupe témoin. Dans une autre étude en Tunisie faite par (Messaoudia et al., 2010), l'allèle HLA-B51 était significativement plus fréquent chez les patients atteints de MB (47,5%) par rapport au groupe témoin (20,8%) p<0,001. L'association avec l'antigène majeur d'histocompatibilité HLA-B51 est plus particulièrement retrouvée chez les patients du Moyen-Orient avec des pourcentages allant de 25% à 80% (Al-Dalaan et al., 1994).

L'Ag HLA-B51 joue un rôle potentiel dans le dysfonctionnement des neutrophiles observé au cours de la maladie de Behçet (Amoura et al., 2006). De manière intéressante, une augmentation de production d'H₂O₂ par les neutrophiles après stimulation par N-formyl-méthionine leucine phénylalanine (fMLP) est également observée chez les souris transgéniques HLA-B51 mais non chez les souris transgéniques HLA-B35. Cette hyperproduction semble donc spécifique de l'expression de B51 chez la souris (Lemoine et al., 1999). La structure de la molécule HLA-B51 elle-même peut également être directement associée à l'induction de l'inflammation (Ahmet-Gul et Shigeaki-Ohno, 2012). HLA-B51 peut interagir avec les récepteurs tueurs de type immunoglobuline (KIR) des cellules tueuses naturelles (NK), des Lymphocytes T CD8⁺ et des LT $\gamma\delta$ grâce à son épitope HLA-Bw4 (Ahmet-Gul et Shigeaki-Ohno, 2012) ; engendrant une inhibition du pouvoir cytotoxique de ces cellules tueuses (Takeno et al., 2004).

III-3-2 Répartition de l'allèle HLA-B51+ en fonction du sexe :

La répartition de l'allèle HLA-B51(+) en fonction du sexe est présentée dans le (tableau XV)

Tableau XV : Répartition de l'allèle HLA-B51+ selon le sexe

	Hommes (n=8)	Femmes (n=13)	P
HLA-B51+	6	5	Ns
Pourcentage	75%	38,46%	

Ns : Non significatif

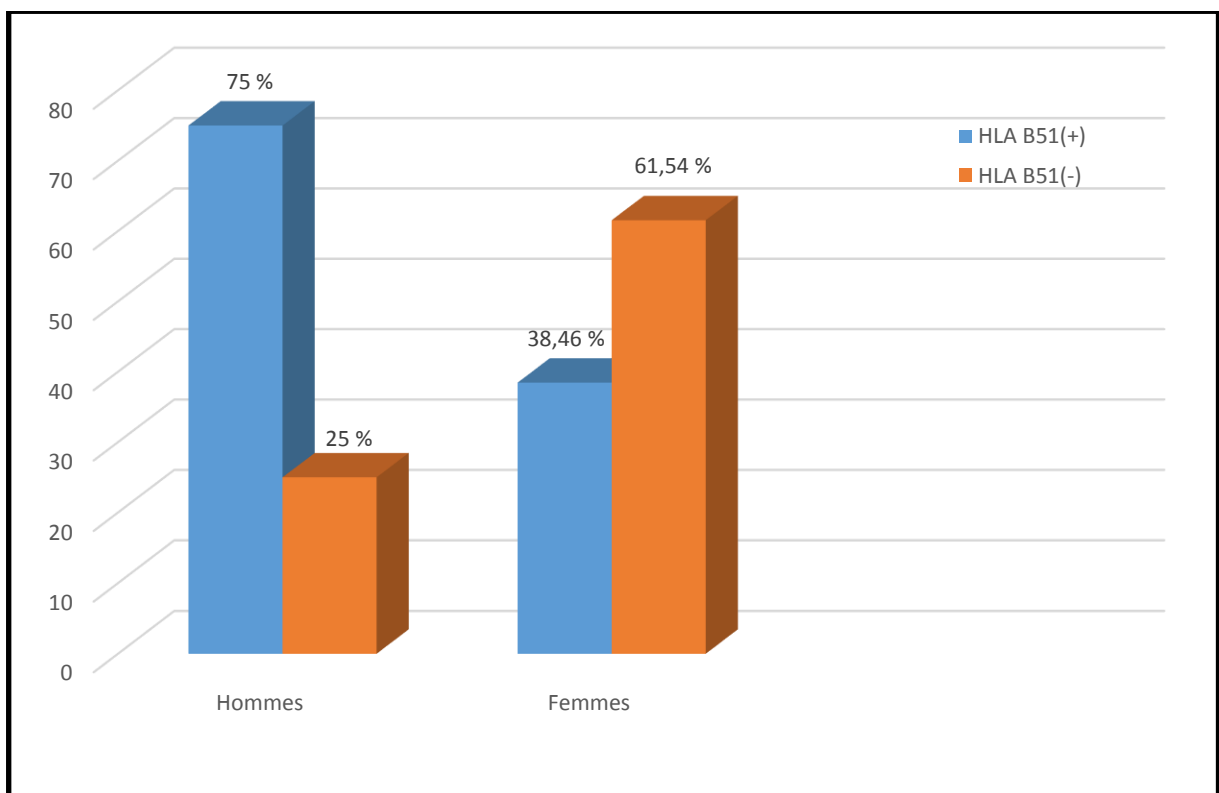


Figure 31 : Histogramme montrant la répartition de l'allèle HLA-B51(+) en fonction du sexe.

Parmi les 21 patients au diagnostic fortement suspectés, (52,38%) sont porteurs de l'allèle HLA-B51, la différence entre les deux sexes est non significative ($P>0,05$), 75% du sexe masculin avec un allèle HLA-B51(+) (n= 8 patients hommes) vs 38,46% du sexe féminin qui porte l'allèle HLA-B51(+) (n= 13 patients féminine) (figure 31). Par contre (Maldini et al., 2009), ont montré que la présence de HLA-B51 est plus fréquente chez les hommes ($P<0,001$).

III-3-3 Etude d'association de l'allèle HLA-B51 et les manifestations cliniques de la MB :

Pour étudier l'implication de l'allèle HLA-B51 dans l'expression des manifestations cliniques de la maladie, une comparaison des manifestations cliniques présentées par le groupe des patients porteurs de l'antigène HLA-B51 et les non porteurs de HLA-B51 a été réalisé (Tableau XVI).

Tableau XVI : Comparaison des manifestations cliniques présentées par le groupe des patients porteurs de l'antigène HLA-B51 et les non porteurs de HLA-B51.

Manifestations Cliniques	HLA-B51+ (n= 11 patients)	HLA-B51- (n=10 patients)	P
Atteinte cutanéomuqueuse	9--- (82%)	8--- (80%)	Ns
- Aphtes buccaux	9--- (82%)	8--- (80%)	
- Aphtes génitaux	6--- (55%)	5--- (50%)	
- Pseudo folliculite	4--- (36%)	3--- (30%)	
Atteinte ophtalmologique	5--- (45%)	2--- (20%)	Ns
- Uvéite antérieure	4--- (36%)	1--- (10%)	
- Uvéite postérieure	3--- (27%)	1--- (10%)	
- Uvéite totale	2--- (18%)	0--- (10%)	
Atteinte articulaire	4--- (36%)	5--- (50%)	Ns
Neuro-Behçet	4--- (36%)	0--- (0%)	P = 0,03
			PC= 0,118
Entéro-Behçet	0--- (0%)	1--- (10%)	Ns

Ns : Non significatif

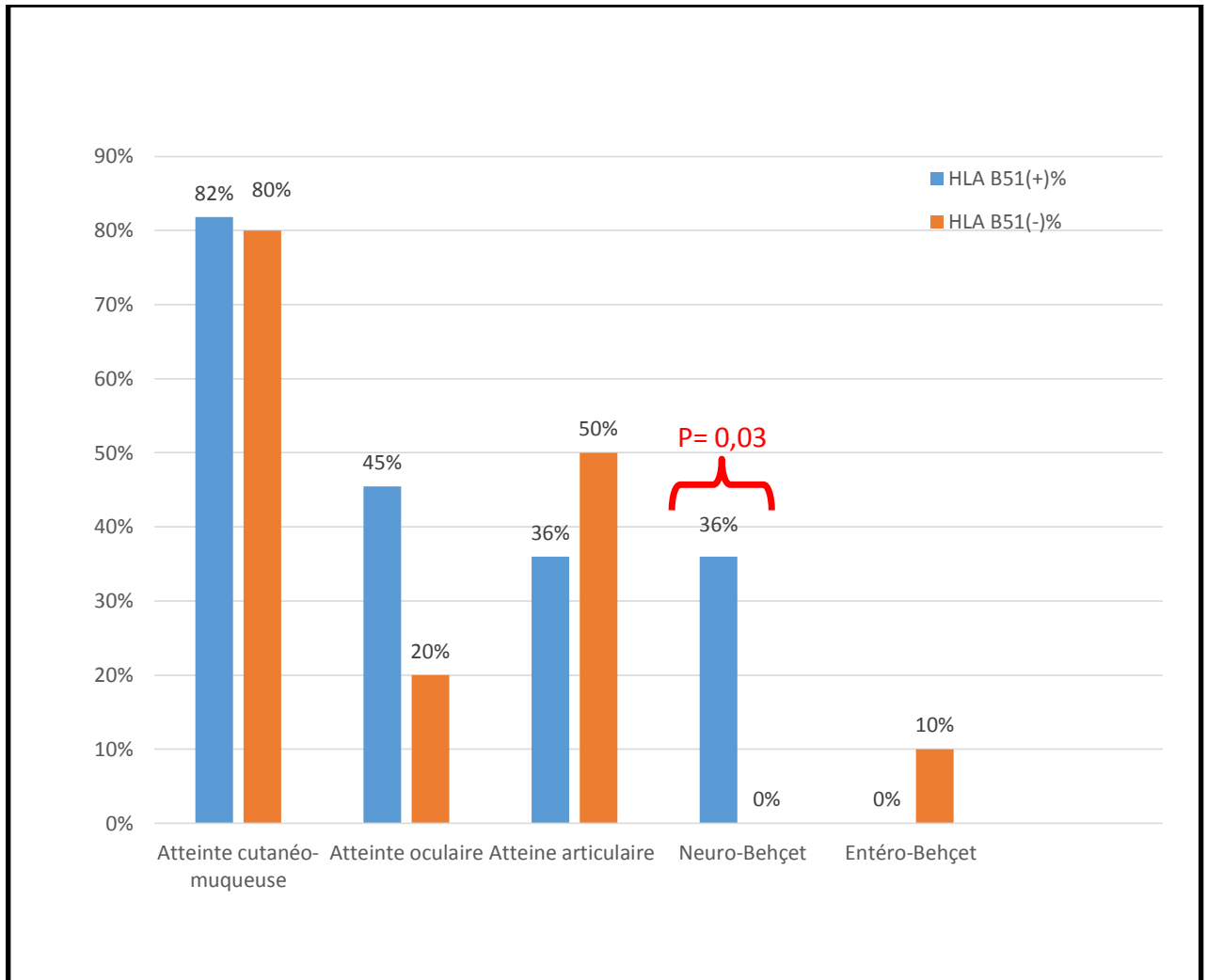


Figure 32 : Histogramme montrant la comparaison des manifestations cliniques présentées par le groupe des patients HLA-B51 (+) et HLA-B51 (-).

Les fréquences de certaines des manifestations cliniques observées chez les patients HLA-B51(+) étaient élevées par rapport à celles exprimées par le groupe des patients HLA-B51(-). Par conséquent, nous avons trouvé une association entre l'antigène HLA-B51 et l'expression clinique de la MB dans notre série en particulier chez les patients atteints des manifestations neurologiques ($P=0,03$). Cette association devient non significative après correction (PC de Yates pour les faibles échantillons $=0,05$). La maladie de Behçet compliquée d'atteinte neurologique (NB) implique des lésions du système nerveux central dans 5 à 50 % des cas et constitue l'une des principales causes de mortalité (Daoudi et al., 2014).

L'HLA-B51 est plus fréquemment retrouvé chez les patients avec maladie sévère atteinte oculaire et du système nerveux central (Gabay, 2008). (Moudatir, 2008) estime que l'allèle HLA-B51 était associé à l'atteinte oculaire dans 61,76 %, à l'atteinte neurologique dans 46,66% et à l'atteinte vasculaire dans 36,36 %. Par contre d'après une étude faite en Tunisie

par (B'chir Hamzaoui et al., 2006), Ils ont trouvé une différence non significative de la fréquence de l'atteinte oculaire, neurologique et de l'angioBehçet entre les patients HLA-B51(+) et HLA-B51(-).D'après (B'chir-Hamzaoui et al., 2009), la différence des atteints neurologiques est non significative entre les patients HLA-B51(+) et HLA-B51(-) au pays Maghreb. En revanche ils ont trouvé une association avec l'atteinte oculaire ($P < 0,0001$). Une hypothèse pouvant expliquer les lésions de la MB, notamment oculaires, est celle de la réactivité croisée entre certains peptides dérivés des molécules HLA de classe I et l'antigène S rétinien [AgS]. L'AgS est une protéine de la rétine, à l'abri du système immunitaire [sanctuaire immunologique].Des réponses cellulaires T contre cet AgS ont été décrites chez l'homme, au cours d'uvéites parmi lesquelles l'uvéite du Behçet. Un des peptides immunodominants issus de l'AgS, le peptide PDS-Ag [acides aminés 342-355], a une homologie avec un peptide de la région conservée de certaines molécules HLA-B51 [peptide B27PD, aa 125-138]. En présence du peptide Ag-S, les LT des patients atteints de MB avec une uvéite prolifèrent et se différencient en lymphocytes effecteurs (Kurhan-Yavuz et al., 2000).

CONCLUSION

Conclusion

Au terme de ce travail nous concluons que :

Nous avons retrouvé un équilibre de répartition de la MB avec un sexe ratio Femme /Homme de 1/1, contrairement aux pays du pourtour méditerranéen ou une légère prédominance masculine a été notée.

En revanche, la moyenne d'âge dans notre série est de $31,3 \pm 11,1$ et la catégorie la plus concernée est celle dont la tranche d'âge est comprise entre 18 et 40 ans chez les adultes jeunes avec un pourcentage de 66.66% %, ce qui confirme nos résultats avec ceux des pays Maghreb.

Notre étude montre aussi que la majorité des patients ont des Atteintes cutanéomuqueuses à (81%), des atteintes articulaires à (43%), atteintes ophtalmologiques à (33%), puis Neuro-Behçet à (19%), Entéro-Behçet à (4,76%) et à la fin Angio-Behçet à (0%).

La recherche de l'allèle HLA-B51 dans la maladie de Behçet chez 21 patients algériens, confirme la fréquence élevée de cet allèle en comparant aux études internationales de cette maladie avec (52,38%) de cas positif par rapport au groupe témoin avec (16%).

Nous n'avons pas trouvé la prédominance masculine chez les porteurs de l'allèle HLA-B51 dans notre série.

L'étude d'association de l'allèle HLA-B51 et différentes manifestations cliniques de la MB a révélé que les fréquences de la plupart des manifestations observées chez les patients HLA-B51(+) étaient tous élevés par-rapport à ceux exprimés par le groupe des patients HLA-B51(-). Par conséquent, nous avons trouvé une association entre l'antigène HLA-B51 et l'expression clinique de la MB dans notre série en particulier chez les patients atteints des manifestations neurologiques.

Enfin, en termes de perspective, afin de mieux montrer la forte présence de l'allèle HLA-B51 dans la MB, il faut augmenter encore le nombre des patients, et d'évaluer son impact sur le pronostic mais aussi la recherche d'éventuels allèles qui peuvent y être associés et d'étudier les allèles spécifiques et d'évaluer leur rôle dans la prédisposition à la MB. Il serait intéressant d'élargir les études expérimentales pour mieux comprendre les mécanismes qui président à l'émergence de la maladie.

Références bibliographiques

Références « Maladie de Behçet » :

AHMET-GUL M.D., SHIGEAKI-OHNO P.H.D. (2012): HLA-B*51 and Behçet Disease. *Ocular Immunology & Inflammation*, 20(1), 37-43.

ALAMI B. (2011) : Les manifestations ophtalmologiques au cours de la maladie de Behçet .Thèse de Doctorat, Université sidi mohammed ben abdellah. 300 P.

AL-DALAAAN A., AL BALAA S., EL RAMAHI K., AL-KAWI Z., BOHELGA S., ET BAHABORI S ET AL. (1994): Behçet's Disease In Saudi Arabi. *J rheumatol*, 21(4), 658-661.

AMBROSE N.L., HASKARD D.O. (2013): Differential diagnosis and management of Behçet syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 9:79-89.

AMOURA Z., GUILLAUME M., CAILLAT-ZUCMAN S., WECHSLER B., PIETTE J.C. (2006): Pathophysio-logy of Behcet's disease. *Rev Med Interne*. 27(11), 843–853.

ANTHONY L. (2009) : Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Boeck Université, 215p, Belgique.

ARA L. (2000) : Imagerie médicale. Estem, 644p, Paris.

BAUER S., GROH V., WU J., STEINLE A., PHILLIPS J.H., LANIER L.L ET AL. (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285, 727–9.

B'CHIR HAMZAOUI S., HARMEL A., BOUSLAMA K., ABDALLAH M., ENNAFAA M., M'RAD S., BEN DRIDI M. (2006) : La maladie de Behçet en Tunisie. Etude clinique de 519 cas. *La Revue de Médecine Interne*, 27, 742-750.

B'CHIR-HAMZAOUI S., LARBI T., ABDALLAH M., HARMEL A., ENNAFAA M., BOUSLAMA K., BEN DRIDI M., M'RAD S. (2009) : La maladie de Behçet au Maghreb. Étude Behçet Maghreb à propos de 1460 patients. *La Revue de médecine interne*, 30, 229-231.

BEHÇET H. (1937): Über rezidivierende, Aphthose, durch ein Virus verursachte geshwure am Munde, am Auge und an den Genitalien. *Dermatologische Wochenschr*, 36, 1152-1157.

BENNANI A., ATOUF O., BENSEFFAJ N., BRICK C., ESSAKALLI M. (2009) : Polymorphisme HLA et maladie de Behçet dans la population marocaine HLA polymorphism and Behçet's disease in Moroccan population. *Pathologie Biologie*, 57, 403-409.

BERREBI A. (2008) : Maladies rares et grossesse de A à Z. Flammarion SA, 636 p, Paris.

BOUKANTAR I. (2011) : La maladie de Behçet révélée par un syndrome de budd chiari .Thèse de Doctorat, Université sidi Mohamed ben Abdellah, Maroc.72 p.

BRAHAM A., BEN SALEM T., OUERTANI D., KHANFIR M., BEN GHORBEL I., LAMLOUM M., HOUMAN M.H. (2008) : Atteinte vasculaire au cours de la maladie de Behçet : aspects démographiques et cliniques chez 105 patients tunisiens. *Médecine interne*, 10, 289.

CAMILLE F. (1999) : Manifestations cutanéomuqueuses de la maladie de Behçet. *Ann Med Int*, 150(7), 535-41.

CHATENOUD B. (2012) : Immunologie - 6e édition. Brigitte Peyrot, 469p, Paris.

CHRISTOPH M.E.D., KOTTER I., Graham R., WALLACE G.R., MURRAY P.I., STUBIGER N., ZIERHUT M. (2008): Behçet's disease: Ocular effects and treatment, *Progress in Retinal and Eye Research*, 27, 111–136.

COULON J.P., PIETTE E. (2007) : Aphtes banals, aphtose buccale récidivante et maladie de Behçet. *Encycl Méd Chir*, 10, 21, 22-50.

DAOUDI S., LOUNIS M., AIT-KACI AHMED M. (2014) : Neuro-Behçet dans sa forme parenchymateuse. Caractéristiques cliniques et paracliniques (40 cas). Elsevier Masson SAS, 43, 119–125.

DESBOIS A.C., WECHSLER B., CLUZEL P., HELFT G., BOUTIN D., PIETTE G.C., CACOUB P., SAADOUN D. (2014) : Atteintes cardiovasculaires de la maladie de Behçet. *La Revue de médecine interne*, 35, 103–111.

DIRESKENELI H., EKSIUGLU-DEMIRALP E., YAVUZ S., ERGUN T., SHINNICK T., LEHNER T ET AL. (2000): T cell responses to 60/65 kDa heat shock protein derived peptides in Turkish patients with Behçet's disease, *J. Rheumatol*, 27(3), 708-13.

DIRESKENELI H., SARUHAN-DIRESKENELI G. (2003): The role of heat shock proteins in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*, 21, 44-8.

DU-BOUTIN L.T.H., WECHSLER B. (2009) : Neuro-Behçet .Elsevier Masson SAS, 10, 17-169.

EDOUARD P. (2009) : La maladie de Behçet en 2009. *Revue de la Fédération Française de Rhumatologie*, 69.

ELIAOU F. (2002) : Région HLA et pathologies ostéoarticulaires. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 14, 1-10.

EMMI G., SILVES TRI E., SQUATRITO D ET AL. (2014): Behçet's syndrome pathophysiology and potential therapeutic targets. *Intern Emerg Med*. [Epub ahead of print].

ERGUN T., INCE U., EKSIUGLU-DEMIRALP E., DIRESKENELI H., GURBUZ O., GURSES L ET AL. (2001): HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease. *J Am Acad Dermatol*, 45:904-9.

FAHSI O. (1994) : Les complications artérielles de la maladie de behçet (à propos de 13 cas. Thèse médecine n 229, Rabat, 223p.

FALK K., ROTZSCHKE O., TAKIGUHI M., GNAU V., STEVANOVIE S., JUNG G ET AL. (1995): Peptide motifs of HLA-B51. –B52 and implications for Behcet's disease Int Immunol, 7, 223-8.

GABAY C. (2008) : Syndrome de Behçet. Rev Med Suisse, 149, 728-733.

GILBERT S., ERWANN Q. (2002) : Exploration du système HLA : Pratiques et indications. Revue Française des Laboratoires, 341, 53-62.

GROH V., RHINEHART R., RANDOLPH-HABECKER J., TOPP M.S., RIDDELL S.R., SPIES T. (2001): Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. Nat Immunol, 2, 255-60.

GUICHARD I., DEBARD A., CATHEBRAS P. (2010) : La maladie de Behçet : une vascularite fréquente aux multiples facettes. Médecine thérapeutique, 16-1.

GUILLEVIN L. (2014) : Livre de l'interne en médecine interne - 2e édition. Béatrice Brottier, 1064p, Paris.

GUL A., OHNO S. (2012): HLA-B*51 and Behçet's disease. Ocular Immunol Inflamm. 20(1), 37-43.

GUL A. (2015): Pathogenesis of Behçet's disease: autoinflammatory features and beyond. Semin Immunopathol, 015, 0502-8.

HOUMAN M.H., NEFFATI H., BRAHAM A ET AL. (2007): Behçet's disease in Tunisia. Demographic, clinical and genetic aspects in 260 patients. Clin Exp Rheumatol, 25, 58-64.

HAMZA M. (1989) : La maladie de Behçet. Rev Med Interne. 10, 299-301.

HAMZA M. (2001) : Maladie de Behçet : Les maladies et syndromes systémiques. 4th ed. Paris. Flammarion Médecine, 30:883-924.

HAMZAOUI A., JAZIRI F., BEN SALEM T., SAID F ET AL. (2014): Comparison of Clinical Features of Behcet Disease; According to Age in a Tunisian Cohort. Acta Medica Iranica, 52(10), 748-751.

HAMZAOUI A., KLII R., HARZALLAH O., ATTIG C., MAHJOUB S. (2012) : La maladie de Behçet chez la femme. La Revue de médecine interne, 33, 552-555.

HATEMI G., SILMAN A., BANG D., BODAGHI B., CHAMBERLAIN A.M., GUL A ET AL. (2008): EULAR recommendations for the management of Behçet disease. Ann Rheum Dis, 67(12):1656-62.

HOUMAN M.H., BEL FEKI N. (2014) : Physiopathologie de la maladie de Behçet, 35,90-96.

HUGHES E.H., COLLINS R.W., KONDEATIS E., WALLACE G.R., GRAHAM E.M., VAUGHAN R.W., ET AL. (2005): Associations of major histocompatibility complex class I

chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients. *Tissue Antigens*, 66:195-9.

JAZIRI F., BEN SALEM T., MESSAOUDIA M., BEL EKI N., BEN GHORBEL I., KHANFIR M., LAMLOUM M., HOUMAN M.H. (2010) : Influence de l'âge sur l'expression clinique de la maladie de Behçet. *Médecine interne*, 10, 257.

KAMOUN A., MAHFOUDH N., FRIGUI M., BAHLOUL Z., MAKNI H. (2012) : Etude d'association des antigènes HLA classe I avec la maladie de Behçet dans le sud tunisien. *Pathologie Biologie*, 60, 59-64.

KANEKO F., OYAMA N., YANAGIHORI H., ISOGAI E., YOKOTA K, and K. OGUMA K. (2008): The role of streptococcal hypersensitivity in the pathogenesis of Behçet's disease, *European Journal of Dermatology*, 18(5), 489-498.

KELLER M., SPANOU Z., SCHAERLI P., BRITSCHGI M., YAWALKAR N., SEITZ M ET AL. (2005): T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases, *J. Immunol*, 175(11), 7678-86.

KEOGAN M.T. (2009): Clinical immunology review series: an approach to the patient with recurrent orogenital ulceration, including Behcet's syndrome *Clin Exp Immunol*, 156, 1-11.

KIRINO Y., BERTSIAS G., ISHIGATSUBO Y., MIZUKI N., TUGAL-TUTKUN I., SEYAH E et al. (2013): Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet*; 45(2), 202-207.

KURAUCHI T., YOKOTA K., MATSUO T., FUJINAMI Y., ISOGAI H ET AL. (2005): Neutrophil and lymphocyte responses to oral Streptococcus in Adamantiades- Behçet's disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43, 125-31.

KURHAN-YAVUZ S., DIRESKENELI H., BOZKURT N., OZYAZGAN Y., BAVBEK T., KAZOKOGLU H, ET AL. (2000): Anti-MHC autoimmunity in Behçet's disease: Tcell responses to an HLA-B-derived peptide cross-reactive with retinal- S antigen in patients with uveitis. *Clin Exp Immunol*, 120, 162-6.

LEMOINE H., AMOURA Z., WECHSLER B., PIETTE J.C., ZUCMAN C. (1999) : Aspects récents de la génétique de la maladie de Behçet. *Ann. Med. Interne*, 150(6), 499-503.

MAHR A., BELARBI L., WECHLER B ET AL. (2008): Population-based prevalence study of Behçet's disease: differences by ethnic origin and low variation by age at immigration. *Arthritis Rheum*, 58(12), 3951-9.

MAHR A., MALDINI C. (2014) : Épidémiologie de la maladie de Behçet. *La Revue de médecine interne*, 35, 81-89.

MALDINI C., CHEMINANT M., GUILLEVIN L., LAVALLEY P.M., MAHR A. (2009) : Impact de HLA-B5/B51 sur le phénotype clinique de la maladie de Behçet : revue méthodique de la littérature et méta-analyses des corrélations génotype-phénotype. *Service de médecine interne*, 3, 106.

MARK G. (2004) : *Peau et maladies systémiques*. Elsevier Limited, 223p, Paris.

MARSHALL S.E. (2004): Behçet's disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 18, 3, 291-311.

MASATLIOGLU S., SEYAHİ E., TAHİR-TURANLI E., ET AL. (2010): A twin study in Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 28, 62- 6.

MC CLUSKEY J., PEH C.A. (1999): The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet*, 1, 3-20.

MEYER J. (2008) : *Traité des maladies et syndromes systémiques-5° Edition.* Flammarion Médecine-Sciences, 804 p, Paris.

MIZUKI N., MEGURO A., OTA M., OHNO S., SHIOTA T., KAWAGOE T., ET AL. (2010): Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42,703-6.

MIZUKI N., OTA M., KATSUYAMA Y., YABUKI K., ANDO H., PALIMERIS G.D., KAKLAMAN E., ITO D., OHNO S., INOKO H. (2002): Sequencing-Based Typing of HLA-B*51 alleles and the significant association of HLA-B*5101 and -B*5108 with Behçet's Disease in greek patients. *Tissu antigens*, 59:118-121.

MOCHIZUKI M., SUZUKI N., TAKENO M., NAGAFUCHI H., HARADA T., KANEOKA H ET AL. (1994): Fine antigen specificity of human $\gamma\delta$ T cell lines (V gamma 9+) established by repetitive stimulation with a serotype (KTH-1) of a Gram-positive bacterium, *Streptococcus sanguis*. *Eur J Immunol*, 2, 1536-43.

Moudatir M. (2008): HLA et maladie de Behçet au Maroc. *Médecine interne*, 10, 291.

OHNO S., OHGUCHI M., HIROSE S., MATSUDA H., WAKISAKA A., AIZAWA M. (1982): Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol*, 100(9), 1455-8.

OTMANI F. (2009) : Maladie de Behçet ; les nouvelles thérapeutiques. Société nationale française de médecine interne (SNFMI). *La Revue de Médecine Interne*, 30, 243-252.

OMBRELLO M.J., KIRINO Y., BAKKER P.I., GUL A., KASTNER D.L., REMMERS E.F. (2014): Behçet's disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (24), 8867-8872.

PAMIR M.N et al. (1981): Papilledema in Behçet's syndrome. *Arch Neurol*, 38: 643-645.

PARENT D., VAILLANT L. (2008) : Aphthes, aphtoses, maladie de Behçet. Elsevier Masson SAS, 10, 98-838.

PERTUISET E. (2009) : La Maladie De Behçet En 2009. *Le Rhumatologue*, 15-21.

PETRUSHKIN H., SAMIUL HASAN M.D., STANFORD M.R., FORTUNE F ET WALLACE G.R. (2015): Behçet's disease: do natural killer cells play a significant role?. *Frontiers in immunology*, 10.

PINTO C., CARRASCO M., HERNANDEZ M. (2010): Cesar Jiménez Hernández et al; Etiopathogenesis of Behçet's disease. *Autoimmunity Reviews* .9, 241–245.

PRIEUR A.M., QUARTIER P., BADER MEUNIER B., GLORION C. (2009) : Maladies systémiques et articulaires en rhumato pédiatrique - 2e ed. Lavoisier SAS, 572p, Paris.

REMMERS E.F., COSAN F., KIRINO Y., OMBRELLO M.J., ABACI N., SATORIUS C., ET AL. (2010): Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10 and IL-23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. *Nat Genet*, 42,698-702.

SAADOUN D., CASSOUX N., WECHSLER B ET A.L. (2010) : Manifestations oculaires de la maladie de Behçet. *Rev Med Interne*, 31(8), 545-550.

SAHIN S., LAWRENCE R., DIRESKENELI H., HAMURYUDAN V., YAZICI H., AKOGLU T. (1996) : Monocyte activity in Behçet's disease. *Br J Rheumatol*, 35, 424-9.

SAKANE T., TAKENO M., SUZUKI N ET AL. (1999): Behçet's disease. *New Engl J Med*. 341, 1284-91.

SEDRATI A. (2012) : La maladie de Behçet chez l'enfant. Thèse de Doctorat en Médecine, Université Mohammed V- Souissi, Rabat, 124 p.

SEVE P., KODJIKIAN L. (2014) : Œil et Maladies systémiques. Lavoisier, 538p, Paris.

SHARQUIE K.H., PHD M., AL-RAWI Z., MBCHB A., ADNAN A.F. (2002): The influence of age of onset and patient's sex on the prevalence of clinical manifestations of Behçet's disease in Iraqi pateints. *Annals of Saudi Medicine*, 22, 3 -4.

TAKENO M., SHIMOYAMA Y., KASHIWAKURA J., NAGAFUCHI H., SAKANE T., SUZUKI N. (2004): Abnormal killer inhibitory receptor expression on natural killer cells in patients with Behçet's disease. *Rheumatol Int*, 24, 212-6.

TURSEN U. (2012): Pathophysiology of the Behçet's Disease. *Pathology Research International*.11.

VERITY D.H., MARR JE., OHNO S., WALLACE G.R., STANFORD M.R. (1999): Behçet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*, 54, 213–20.

VERITY D.H., WALLACE G.R., VAUGHAN R.W., STANFORD M.R. (2003): Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol*, 87:1175-1183.

VERITY D.H, WALLACE G.R, SEED P, et al. (1998): Soluble adhesion molecules in Behçet's disease. *Ocul Immunol Inflamm*, 6, 81-92.

WEBER M. (2012) : Inflammation (volume 4 - coffret rétine). Lavoisier SAS, 234p, Paris.

YAZICI Y., YAZICI H. (2010) : Behçet's Syndrome. Springer Science and Business Media, 274p, USA- Turkey.

YURDAKUL S., YAZICI H. (2008) : Behçet's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22, 793-809.

YOSHIDA A et al. (2004): Comparison of patients with Behcet's disease in the 1980s and 1990s. *Ophthalmology*, 111 : 810-815.

ZUBER J., BART P., LEIMGRUBER A., SPERTINI F. (2008) : Maladie de Behçet : d'Hippocrate aux antagonistes du TNF-A. *Revue Médicale Suisse*, 154(04) :1045-1054.

Références «PCR» :

ANONYME. (2010) : Biosystems StepOne™ Système de PCR en temps réel. Guide des réactifs.

ELYSE P. (2002) : La PCR en temps réel : principes et applications. *Biology and Biotechnology*, 2-11.

DUBOSSON M. (2011) : Mise au point d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba* spp. Thèse, Université Joseph Fourier. Grenoble, 128 p.

HAMIDINE I. (2007) : Introduction de la charge virale dans le suivi biologique des patients vivant avec le VIH au Niger : résultats préliminaires à propos de 83 cas. Thèse de médecine Niamey, 1503 p.

JACQUES C., FRANCIS R., PASCAL B ET AL. (2011) : Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Editions John Libbey Eurotext, 318 p, Paris.

KAPLAN J.C, DELPECH M. (1989) : Biologie moléculaire et médecine. Médecine-Sciences Edition Flammarion. 610.

LE MORVAN V., FORMENTO J.L., MILANO G., BONNET J., ROBERT J. (2005) : Techniques de recherche des polymorphismes génétiques. *Oncologie*, 7, 7-16.

MACKAY I.M., ARDEN K-E., NITSCHKE A. (2002): Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 1292-1305.

MONSONEGO J. (2007) : Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus. Springer, 527 p, Paris.

NGOC UYEN T. (2008) : Mise au point d'une technique de quantification des populations Bactériennes et Archaea de L'écosystème caecal du Lapin par PCR en temps réel. Mémoire bibliographique, Ecole Nationale vétérinaire. Toulouse, 25 p.

PASTERNAK J. (2003) : Génétique moléculaire humaine : Une introduction aux mécanismes des maladies. Boeck Université, 502 p, Paris.

PRIMROSE S., TWYMAN R., Old RW. (2001) : Principes de génie génétique. Editions de Boeck Université, 359p, Bruxelles.

RONVIN C. (2005) : L'Histoire de la biologie moléculaire. Boeck Université, 92 p, Bruxelles.

THELWELL N., MILLINGTON S., SOLINAS A., BOOTH J. AND BROWN T. (2000): Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research*, 28, 3752-3761.

TSE C., CAPEAU J. (2003) : Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*, 61,3.

VASSIAS I. (2003) : PCR (polymerase chain reaction). EMC - Biologie médicale. 60-90.

WHITCOMBE D., THEAKER J., GUY S-P., BROWN T., LITTLE S. (1999): Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, 17, 804-807.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

Fiche de renseignement pour un patient atteint de la maladie de behçet :

FICHE DE RENSEIGNEMENT DU BEHÇET

Nom : Prénom : Sexe : F M
Age : Origine : Adresse /N° de téléphone :
Service /médecin traitant : Date du prélèvement :/...../.....
Antécédents personnels : Non Oui
Antécédents Familiaux : Non Oui
Année de début des troubles :

Principales manifestations cliniques :

Manifestations cutané-muqueuses

Aphthose buccale Aphthose génitale Aphthose péri anale Pseudo folliculite
Nodules dermohypodermiques Lésions papulo nodulaires acnéiformes

Hypersensibilité aux points de piqure

Point de prélèvement veineux :
Teste pathergique : Positif Négatif Non fait

Manifestations Articulaires

Arthralgies Siège :
Arthrites Siège :

Manifestations ophtalmologiques

Uvéite : Oui Non
Uvéite antérieure : Uvéite postérieure : Uvéite totale :

Manifestations Neurologiques : Non Oui

Thromboses veineuses : Non Oui Type :

Atteintes Artérielles : Non Oui

Atteintes cardiaques : Non Oui

Manifestations digestive : Non Oui

Autres manifestations :

Examen demandé :

Typage HLA : HLAB51+ HLAB51-

Signature du médecin :

Matériel non biologique :

Appareillage utilisé

Bain marie

Centrifugeuse de type 5810 R - Eppendorf

Congélateur réglé à -20°C

Hotte chimique

Réfrigérateur

Thermocycleur de type Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Taqman 7500 Real-Time PCR)

Vortex de type LABINCO

Matériel utilisé :

Colonne cartridges et Poubelle d'élution et de lavage

Coton

Embouts à usage unique

Epicrâniennes

Eppendorfs stériles

Gants à usage unique

Pipettes réglables

Plaque à 96 puits

Portoirs en plastiques

Tubes à déchets

Tubes EDTA.

Un garrot

Réactifs utilisés :

Eau distillée

L'éthanol

Protéinase K

Réactifs TaqMan

Ribonucléase A (RNase A)

Solution d'élution (Pure Link Génomic Elution Buffer) 2

Solution de lyse (Pure Link Genomic Lysis/ Binding Buffer)

Tampon de lavage 1 (Wash Buffer 1)

Tampon de lavage 2 (Wash Buffer 2)

Tampon de PCR

Taq-polymerase.



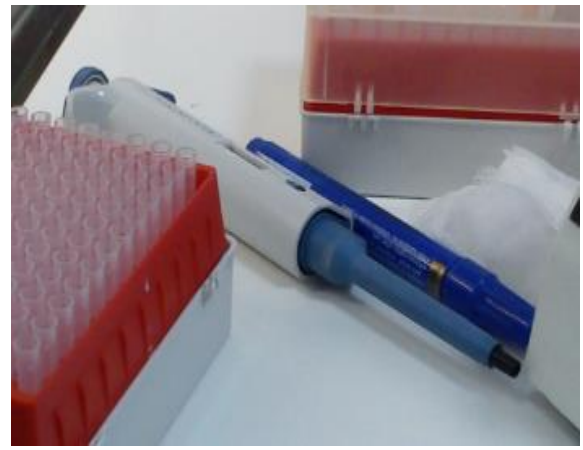
Centrifugeuse de type 5810 R – Eppendorf



Bain marie



Vortex de type LABINCO



Pipettes réglables



Eau distillée



Tubes EDTA.



Hotte chimique



Kit Gene Finder HLA-B*51 Real Amp.

Annexe 2

Tableau X : Représentation des patients selon les classes d'âge

Classe d'âge	<18 ans	18-40 ans	>40 ans
Nombre total	4	14	3
pourcentage	19.05%	66.66%	14.29%

Tableau XI : Représentation de la répartition des patients atteint de la MB selon le sexe et les classe d'âge

Classe d'âge	<18 ans	18-40 ans	>40 ans
Nombre de cas féminin	3	8	2
Nombre de cas masculin	1	6	1
Nombre total	4	14	3

