

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB-Blida 1



Faculté des Sciences de Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème :

Association de gène HLA-B51 et la maladie de Behçet :
confrontation de la clinique aux techniques de détection

Présenté par :

Date de soutenance : 14/07/2022

*ACHOU Sara

* ZOUAOUI Ahlem

Devant le jury :

Nom	Garde	Lieu	Qualité
Mme ZEROUTI K.	MCB	UB-1-	Présidente
Mme MOKRANE A.	MCA	UB-1-	Examinatrice
Mme SAYAD M.	MCB	UB-1-	Promoteur

Promotion : 2021-2022

Remerciements

Avant tout au bon Dieu de m'avoir donnée la force et la patience pour mener à terme mon travail.

Mr Mohamed Saïd chef d'option de génétique de la faculté science biologique de l'université Saad Dahleb de nous avoir offert une formation complète, tout au long de ces dernières années, tout d'abord en licence de génétique, puis en master de génétique, qui nous a permis d'acquérir les connaissances nécessaires afin d'entreprendre notre travail de fin de cycle

C'est avec une profonde gratitude et un grand respect que nous commencerons par remercier notre promotrice **Mme SAYAD** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Les mots les plus distingués et les phrases les plus respectueuse ne peuvent expriment notre profond respect pour lui. Un grand merci pour son soutien, sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

On tient à témoigner toute notre reconnaissance a **Mme ZEROUTI** d'abord pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce jury mais aussi pour le partage de son savoir au cours de notre parcours universitaire et de nous avoir inspiré par sa passion pour les sciences. Nous vous remercions pour vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre gratitude a **Mme MOKRANE** pour avoir d'examiner notre travail et de faire partie du jury.

Nos remerciements s'adressent également a toute l'équipe pédagogique du département de BPC, merci a ceux qui ont enseignés au cours de ces cinq ans d'études et qui nous ont aussi préparés pour affronter la suite.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A Mes chers parents, qui m'ont soutenue et encouragée et qui, sans leur Compréhension, leurs conseils et leur tolérance, Je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.

Maman, papa je vous dis merci, et que Dieu vous protège.

A moi-même, qui lutté avec détermination, force et volonté malgré les frustrations, les déceptions et les obstacles pour arrive a ce que je suis aujourd'hui.

A mes chers sœur Yasmine, Sara, Meriem et mon frère Souhaib qui n'ont pas cessée mes conseillers, encourager et soutenir tout au long de mes études

A qui nous avons parcouru ensemble le chemin du succès, mon amie SARAH et je lui souhaite du succès dans sa carrière.

A Tarek pour sa disponibilité à entendre mes frustrations et les sources de mon stress

A Dounia, je vous adresse mes sincères remerciements pour vos précieux efforts qui m'ont ouvert les portes de la connaissance et tu m'as donné l'énergie à la fin de l'étude.

A ma tante Nabila et mes cousine Samira et Rania.

A tous mes amis Ikrem, Khadidja, Maria, ... qui occupent une place important dans mon cœur.

A tous mes camarades de promotion Master II 2021-2022 option Génétique.

AHLEM

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher papa.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non a mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: mon adorable mama.

A mes chères sœurs Amina, Meriem Amel qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mon adorable petite sœur Malek qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A Mon fiancé Fatah pour sa disponibilité à entendre mes frustrations et les sources de mon stress. Et son soutien constant pour moi, Que Dieu le protège et j'espère que tous ses rêves se réaliseront.

A mes nièces Sirine et Hala, mes neveux Haithem et Abd Errahmen que j'adore.

A ma chère amie Ahlem qui a partagé avec moi un chemin difficile et épuisant pour arriver aujourd'hui, je te souhaite le succès et bonheur dans ta vie.

Je dédie ce travail à ma collègue Dounia pour nous avoir donné beaucoup de conseils et nous avoir apporté son aide quand nous en avions besoin.

A tous mes enseignants qui ont participé à ma formation durant mes Cinq' ans.

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment à moi-même.

SARA

Résumé

La MB est une vascularite systématique, L'étiologie de la maladie reste inconnue, des facteurs environnementaux et des anomalies immunologiques, le facteur génétique inducteur principal de MB est le gène HLA-B51.

Très fréquemment Pays du bassin méditerranéen, du Moyen et de l'Extrême-Orient.

Le spectre clinique comprend les aphtes buccaux et génitaux, des atteints oculaires, neurologiques, cardiaque, digestive, rénale, articulaire et des vaisseaux. Le traitement du MB dépend des manifestations cliniques.

Il existe des techniques pour la détection notamment, technique de PCR (polymérase Chain réaction notamment PCR classique, PCR SSP et PCR en temps réel), typage HLA, des examens complémentaires (biologiques et radiologique), le teste pathergique et le diagnostic différentiel de la MB.

Notre étude théorique est basé de comparer ces différentes techniques afin de déterminer la meilleur technique, la plus rapide, la moins couteuse et la plus fiable.

Mots clés : maladies de Behçet(MB), Diagnostic, HLA-B51, PCR.

Summary

BD is a systematic vasculitis, the etiology of the disease remains unknown, environmental factors and immunological abnormalities, the main BD inducing genetic factor is the HLA-B51 gene.

Very frequently Mediterranean countries, Middle and Far East.

The clinical spectrum includes mouth and genital ulcers, ocular, neurological, cardiac, digestive, renal, articular and vessel patients. The treatment of BD depends on the clinical manifestations.

There are techniques for detection such as PCR (polymerase chain reaction including conventional PCR, SSP PCR and real-time PCR), HLA typing, complementary examinations (biological and radiological), pathergic testing and differential diagnosis of BD.

Our theoretical study is based on comparing these different techniques in order to determine the best, fastest, least cheap and most reliable technique.

Keywords: Behçet disease (BD), Diagnostic, HLA-B51, PCR.

ملخص

مرض بهجت هو التهاب الأوعية الدموية في جميع أنحاء الجسم ، مجهول السبب ، و لكن أقر الأبحاث تشير إلى العوامل البيئية والتشوهات المناعية ، و السبب الرئيسي المحرض له هو العامل الوراثي HLA-B51.

شائع جدا في دول حوض البحر الأبيض المتوسط والشرق الأوسط والشرق الأقصى.

يشمل النطاق السريري تقرحات الفم والأعضاء التناسلية ، واضطرابات العين ، والعصبية ، والقلبية ، والجهاز الهضمي ، والكلوي ، والمفصلي ، والأوعية الدموية. يعتمد علاج على المظاهر السريرية.

هناك تقنيات للكشف ، حيث نجد تقنية PCR (تفاعل البلمرة المتسلسل بما في ذلك PCR التقليدي و SSP PCR و PCR في الوقت الحقيقي) ، و تنقية تنميط الجزيئات للHLA ، والفحوصات الإضافية (البيولوجية والإشعاعية) ، والتشخيص المتباين للأمراض .

تعتمد دراستنا النظرية على مقارنة هذه التقنيات المختلفة من أجل تحديد التقنية الأفضل والأسرع والأقل تكلفة والأكثر موثوقية.

الكلمات المفتاحية: مرض بهجت ، كشف ، HLA-B51 ، تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR .

Sommaire

Introduction	1
I. Généralité sur la maladie de Behçet	
I.1- Historique	2
I.2- Épidémiologie	2
I.3- Etiologie	3
I.4- Mécanismes physiopathologiques de la maladie de Behçet	4
I.4.1- Facteurs génétiques	4
I.4.1.1- Gène HLA-B51.....	4
a- Rappel sur les gènes et structure des molécules HLA de classe I.....	4
I.4.1.2- Gènes proches de HLA B.....	5
a- Gènes MIC.....	5
b- Gène TNF.....	5
I.4.1.3- Gènes en dehors du CMH	6
I.4.1.4- Association de la maladie de behçet et l'allèle HLA-B51.....	6
I.4.2- Facteur environnement.....	7
I.4.2.1- Facteurs environnementaux infectieux.....	7
a- Bactérien	7
b- Viraux.....	7
I.4.2.2- Facteurs environnementaux non infectieux	7
a- Vitamine D	7
b- Sélénium.....	7
c- Tabac	7
I.5- Manifestations cliniques	8
I.5.1- Aphtes buccaux.....	8
I.5.2- Aphtes génitaux.....	8
I.5.3- Atteints oculaires.....	9
I.5.4- Atteinte neurologiques.....	9
I.5.5- Atteinte cardiaque.....	10
I.5.6- Atteintes digestive	10
I.5.7- Atteinte rénale.....	11

I.5.8- Atteinte articulaire	11
I.5.9- Les atteintes des vaisseaux.....	12
I.5.10- Type de maladies de Behçet	13
I.6- Diagnostic de la maladie de Behçet.....	14
I.6.1- Diagnostic moléculaire.....	15
I.6.1.1- Réaction en chaîne par polymérase (PCR).....	15
I.6.1.2-Typage HLA.....	15
I.6.2-Examens complémentaires.....	15
I.6.2.1-Biologie.....	15
I.6.2.2-Examens radiologiques.....	15
I.6.2.3-Teste pathergique.....	16
I.7-Diagnostic différentiels.....	17
I.8- Traitement de la maladie de Behçet	18
II .Matériels et Méthodes.....	19
I-Matériels.....	19
II-Méthodes.....	23
II.1- Article Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet.....	23
II.1.1- Typage HLA classe I.....	23
II.1.1.1- Mode opératoire.....	23
II.1.2- Polymorphisme de gène MIC-I.....	23
II.1.2.1- Mode opératoire.....	23
II.2- Mémoire Recherche de l'allèle HLA-B51 par PCR en temps réel dans la maladie de behçet.....	24
II.2.1- Extraction d'ADN par techniques de KIT INVITROGENE.....	24
II.2.1.1- principe.....	24
II.2.1.2- Mode opératoire.....	24
II.2.2- PCR en temps réel.....	25
II.2.2.1- Principe.....	25

II.2.2.2 - Mode opératoire.....	26
II.3- Mémoire Association HLA-B51 et la maladie de Behçet.....	27
II.3.1- Extraction d'ADN.....	27
II.3.1.1- principe	27
II.3.1.2 - Mode opératoire.....	27
II.3.2- Typage par ssp (polymérase chain reaction-spécifique séquence primers).....	28
II.3.2.1- Principe.....	28
II.3.2.2- Mode opératoire.....	28
II.4- Mémoire Etude épidémiologique de la maladie de Behçet.....	30
II.4.1- Typage HLA.....	30
II.4.1.1. Principe.....	30
II.4.1.2- Mode opératoire.....	30
III-Résultats et Discussion.....	35
III.1-Extraction d'ADN.....	35
III.2- La PCR (Polymérase Chain Réaction).....	38
III.3- Typage HLA.....	42
Conclusion	44

Liste des Figures

Figure 1 : Hulusi Behçet

Figure 2 : Répartition de la prévalence la maladie de Behçet, et dans le monde. Les chiffres représentent des taux de prévalence pour 100 000 habitants

Figure 3 : Organisation génétique du complexe HLA

Figure 4 : Gènes HLA, MIC et TNF

Figure 5 : Ulcérations buccales médicamenteuses (méthotrexate)

Figure 6 : Maladie de Behçet : aптоse génitale du pénis (collection professeur D. p Parent)

Figure 7 : Uvéite antérieure associée à la maladie de Behçet

Figure 8 : types de Neuro-Behçet

Figure 9 : Multiples lésions apthoïdes situées au niveau de l'iléon chez une patiente présentant un entéro-Behçet

Figure 10 : Image représentative des lésions artérielles chez les patients atteints de la maladie de Behçet C. Aortique abdominale anévrismes

Figure 11 : Thrombose cave supérieure

Figure 12 : organigramme résumant les types de MB

Figure 13 : Principe de La PCR-SSP

Figure 14 : Image du test de pathergie dans le diagnostic du syndrome de Behçet

Figure 15 : Histogramme représente la quantité des réactifs et solution dans chaque protocole

Figure 16 : Programme de PCR classique

Figure 17: Programme de PCR en temps réel

Figure 18 : Programme de PCR SSP

Liste des Tableaux

Tableau I: Critères de classification de la maladie de Behçet

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

Tableau III: Les différentes Examens radiologiques selon les atteintes

Tableau IV. Diagnostics différentiels de la maladie de Behçet

Tableau V. Matériel biologiques et non biologiques utilisé dans les études que nous avons traité

Tableau VI : Tableau comparatif de technique d'extraction d'ADN utilisées dans les études que nous avons traité

Tableau VII : Tableau comparatif de technique de PCR utilisées dans les études que nous avons traité

Tableau VIII: des prix et de quantités des réactifs utilisées dans les deux protocoles que nous avons traité

Tableau IX : la durée de chaque protocole

Tableau X : Les avantages et les inconvénients de différentes techniques de PCR

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdiens

ANS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

BET : Bromure d'éthidium

Ca : Calcium

CD 8+ : cluster de différenciation 8

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRP : C-Réactive protéine

dNTP :désoxyribonucléotide triphosphate

ECG : Electrocardiogramme

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

HLA : Antigène des leucocytes humains (Human leucocyte Antigen)

HSV : L'herpes simplex virus

ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire (Intercellular adhesion molécule)

IL : Interleukines

KOH : Hydroxyde de potassium

LDB : Lysis dilution buffer

LTC : microlymphocytotoxicité

MB : Maladie de Behçet

Mg : Magnésium

NaOH : Hydroxyde de sodium

PBS : Phosphate Bufferd Salin

PCR : Polymérase chaîne réaction

PH : Potentiel hydrogène

SSP : Spécifique séquence primer

TAE : Tris acétate EDTA

Th1 : Lymphocytes de type T helper 1

TNF : Facteur de nécrose tumorale

UV : Ultra violet

VS : Vitesse Sédimentation

WTS : Waste tube

Introduction

La maladie de Behçet (MB) est une vascularite systématisque primaire qui affecte les petits et gros vaisseaux veineux et artériels systèmes. Elle est incluse parmi les maladies auto-inflammatoires (**Rodríguez-Carrío et al., 2021**) de pathogénie inconnue (**Ksiaa et al., 2019**) ; caractérisée par des aphtes buccaux et génitaux, des atteints oculaires, neurologiques, cardiaque, digestive, rénale, articulaire et des vaisseaux.

Il existe plusieurs facteurs environnementaux et infectieux, (tels que les virus HSV= Herpès Simplex Virus...etc et les bactéries Streptococcus...etc), et des factures génétiques pouvant être impliqués dans cette maladie. En effet, il existe une forte association génétique entre la MB et le gène HLA-B51 (**Houman et Bel Feki, 2014**), dans ce cas il faut rechercher cette association chez ces patients en utilisant des techniques de détections. Il faut savoir qu'il n'y a aucun test de laboratoire spécifique pour détecté la MB (**Zuber et al., 2008**), mais il existe des techniques pour la détection notamment, technique de typage par ssp (polymérase chain reaction-spécifique sequence primers), typage HLA, des examens complémentaires (biologiques et radiologique), le teste pathergique et le diagnostic différentiel de la MB.

Le but de notre travail est de comparer ces différentes techniques afin de déterminer la meilleure d'entre elles, la plus rapide, la moins couteuse et la plus fiable. Pour cela, nous avons fait une étude comparative entre plusieurs travaux portant sur ces techniques de détection en utilisant les mots clés suivants : maladies de Behçet (MB), détection, HLA-B51, PCR et extraction d'ADN.

Donc au final nous avons choisis l'article de **Noubuhisa, et al 1999** (Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet) et trois autres mémoires de PFE. Mémoire de **Brahiti Milila et MoktarNarimene (2015)** (Recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps reel dans la maladie de behçet), de **AMAR SETTI Asma (2012)** (Association HLA-B51 et la maladie de Behçet), et de **Nourreddine Rayene, Kellali Nour El imene et Bennacef Rayene (2021)** (Etude épidémiologique de la maladie de Behçet).

Généralité sur la maladie de Behçet

I.1- Historique

La première description de ce que nous appelons aujourd'hui MB a probablement été donnée il y a 2500 ans par Hippocrate, qui dans son livre «Epidemion» (le troisième livre) décrit une maladie endémique à l'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 (**Hippocrate, 1815; Feigenbaum, 1956**).

En **1931**, L'ophtalmologiste Benedicktos Adamantiades a émis l'observation de certaines associant symptomatique entre la triade classique, une phlébite et une hydarthrose, selon ce médecin ces associations sont soit au hasard soit à d'autres maladies (**Ghita, 2020**).

En **1937**, Hulusi Behçet (voir figure 1), un dermatologue turc, acquiert la certitude de l'individualité de cette affection après avoir observé trois patients chez lesquels se sont associés une athétose bucco-génitale et une atteinte oculaire (**Pretorius et al., 2022**).

En France, Touraine décrit en **1941** un cadre nosologique en introduisant le terme de grande aphtose systémique chez 343 cas de patients atteints de cette pathologie (**Hamza, 2011**).



Figure 1 : Hulusi Behçet

I.2- Épidémiologie

Plus de 30 estimations de la prévalence du Behçet ont été publiées dans la littérature. Ces études publiées en Europe, en Asie, au Moyen-Orient et en Amérique du Nord (**Mahr et Maldini, 2014a**). La Turquie avait la prévalence la plus élevée de 20 à 420 pour 100 000 habitants, tandis que le Royaume-Uni avait la prévalence la plus faible de 0,64 (**Shunmugavelu et Cynthia Dhinakaran, 2022**). La MB est moins fréquent en Europe et aux États-Unis (0,1 à 7,5 cas pour 100 000 habitants). Le Japon a signalé 0,9 nouveau cas pour 100 000 habitants et

l'Iran 0,57 nouveau cas pour 100 000 habitants (voir figure 2). La MB est généralement plus fréquente et plus grave chez les hommes que chez les femmes (Ksiaz et al., 2019). Le début de MB survient généralement chez la troisième ou quatrième décennie de la vie, et très peu observé chez les enfants ou les patients de plus de 50 ans (Cho et al., 2012).

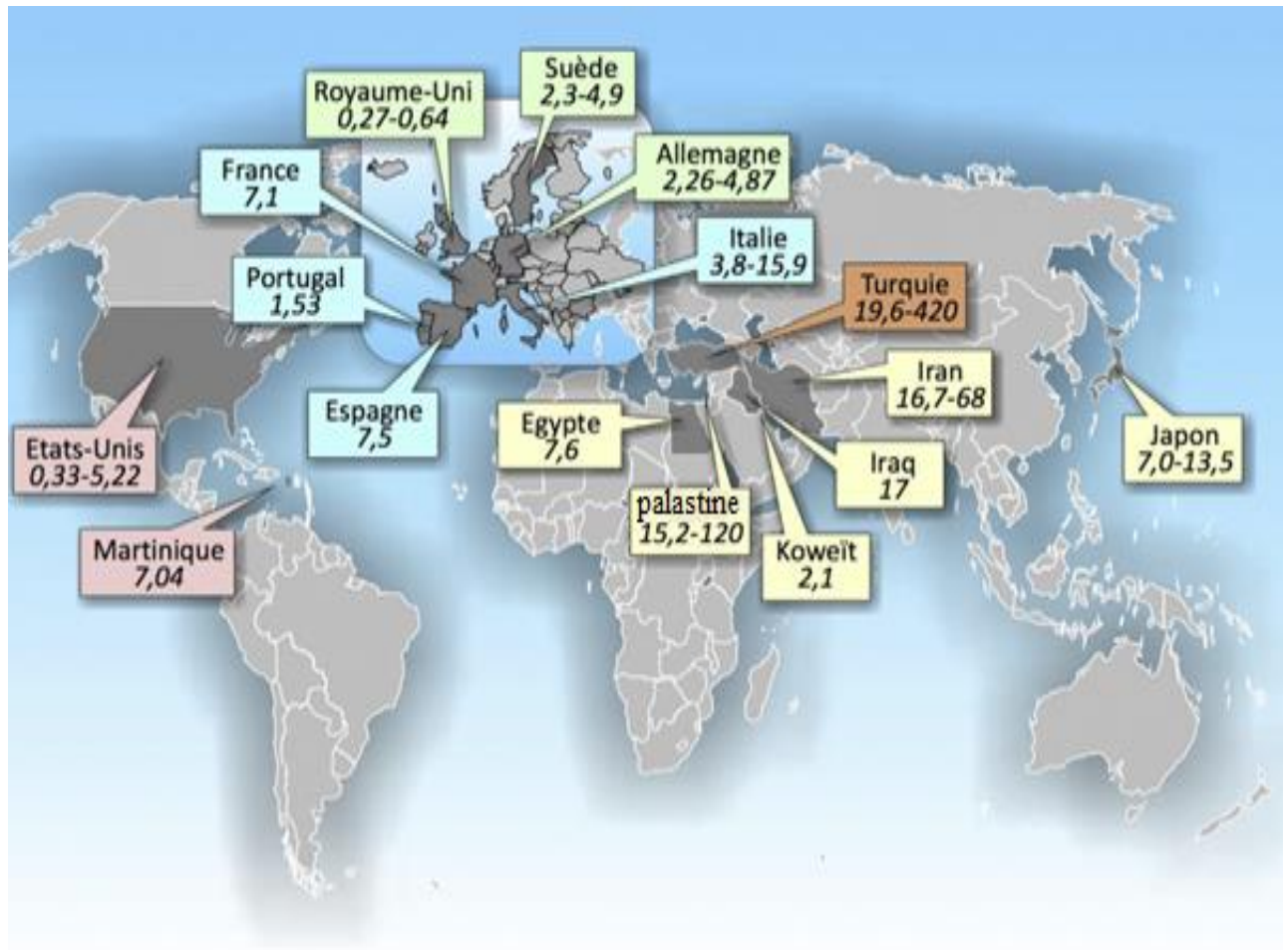


Figure 2 : Répartition de la prévalence la maladie de Behçet, et dans le monde. Les chiffres représentent des taux de prévalence pour 100 000 habitants (Mahr et Maldini, 2014b).

I.3- Etiologie

Comme pour la plupart des maladies, la MB est considérée comme une maladie complexe dont l'apparition implique à la fois des facteurs génétiques et non génétiques.

Le facteur de risque génétique le plus fortement associé au MB est l'allèle HLA-B51 de l'antigène leucocytaire humain. Bien que des facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans le développement de certaines caractéristiques du MB, il existe un consensus général sur le fait que des stimuli environnementaux encore non identifiés sont nécessaires pour l'initiation de la maladie. Les déclencheurs exogènes proposés comprennent à la fois les infections bactériennes

et virales, qui peuvent alors conduire à une dérégulation du système immunitaire, conduisant finalement à l'expression phénotypique de la maladie (Dalvi et al., 2012).

I.4- Mécanismes physiopathologiques de la maladie de Behçet

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

I.4.1- Facteurs génétiques

La présence de formes familiales et la prépondérance de la maladie dans le bassin méditerranéen indiquent la présence d'une susceptibilité génétique (Amoura et al., 2006a).

I.4.1.1- Gène HLA-B51

a-Rappel sur les gènes et structure des molécules HLA de classe I

Le système antigène leucocytaire humain (HLA), 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).

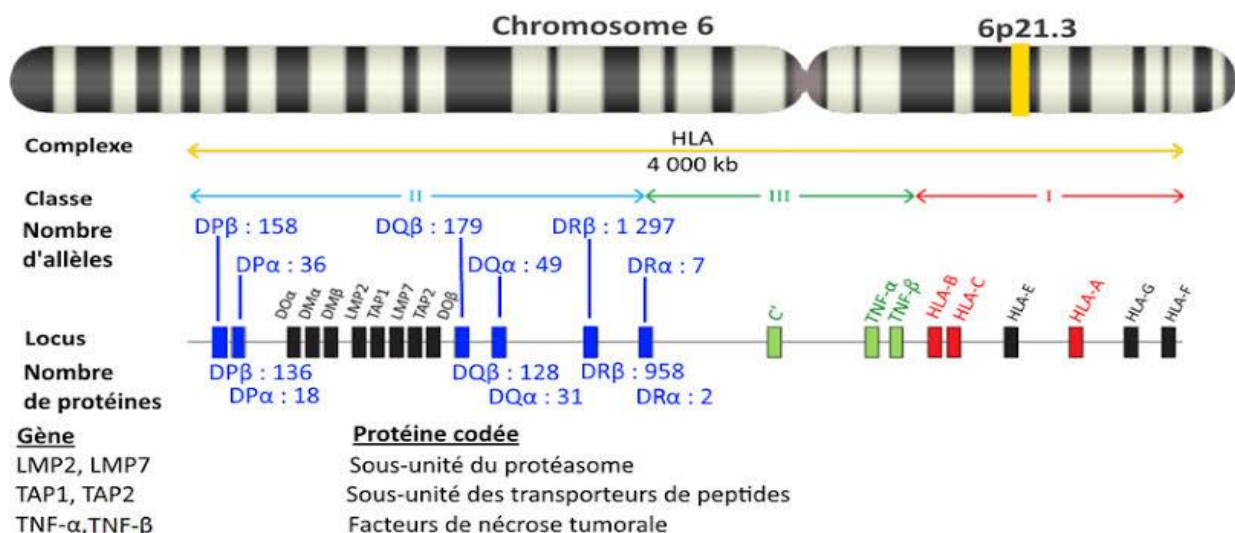


Figure 3 : Organisation génétique du complexe HLA (Azam, 2018).

La région HLA de classe I contient les gènes codant pour les antigènes HLA de classe I classiques : HLA-A, HLA-B et HLA-c et les trois gènes HLA de classe I non classiques HLA-E, HLA-F et HLA-G.

Les gènes HLA A, B et C se composent de 8 exons séparés par 7 introns (Moalic, 2008). Chacun code pour la chaîne α appartient respectivement à la molécule HLA-A, B ou C. Le premier exon code pour le peptide de signalisation qui est coupé lors du transport intracellulaire de la molécule, les exons 2, 3 et 4 codent respectivement pour les $\alpha 1$, $\alpha 2$ et les domaines $\alpha 3$, les exons 5, 6, 7 et 8 codent pour la liaison peptidique, le domaine transmembranaire, le domaine intracytoplasmique et la région 3' non transcrite (Semana et Quelvennec, 2002).

I.4.1.2- Gènes homologues à HLA B

L'absence de rôle fonctionnel précis de HLA-B51 dans la physiopathologie de la MB a fait évoquer la possibilité qu'il soit un marqueur génétique en déséquilibre de liaison avec un autre gène proche, qui serait lui-même le gène impliqué dans la physiopathologie de la MB (Amoura et al, 2006b).

a- Gènes MIC

La proximité des gènes MIC (gènes liés au CMH de classe 1) au locus B (voir figure 4) soulève la possibilité que les MIC soient associés au MB. Les gènes MIC ne partagent qu'environ 30 % d'homologie de séquence avec les gènes HLA classiques de classe 1. Une étude japonaise a montré que MB était significativement associé à l'allèle MICA-A6. D'autres études de cohorte plus importantes n'ont pas confirmé ces résultats.

L'association de MB avec l'allèle MICA-A6 n'est en réalité due qu'au déséquilibre de liaison entre les populations HLA-B5 et MICA-A6, ce qui est une bonne démonstration que HLA-B51 a la plus forte association avec MB. Les autres gènes étudiés seraient alors en déséquilibre de liaison avec HLA-B51. L'exception concerne le HLA-A26, apparenté au MB et indépendant du HLA-B51 (Houman et Bel Feki, 2014a).

b- Gène TNF

Le gène TNF-, codant pour une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les monocytes, est localisé sur le chromosome 6p21.33, proche du locus HLA-B (voir figure 4). Il a été démontré que le TNF-a est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes, telles que la MB (Kapoor et al., 2011). Des taux sériques élevés de TNF-a et de son récepteur soluble ont été observés chez les patients MB (Radouane et al., 2012). Ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de TNF-a par les cellules mononucléaires du sang périphérique stimulées (Akman et al., 2006). Les thérapies anti-TNF-a ont prouvé leur efficacité, notamment chez les patients atteints d'uvéite (Benitah et al., 2011).

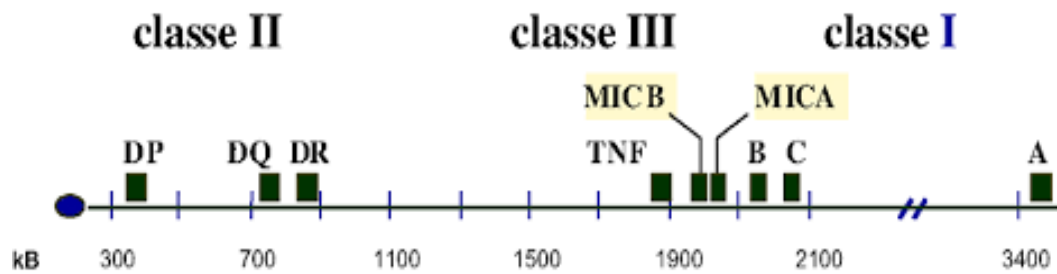


Figure 4 : Gènes HLA, MIC et TNF.(Amoura et al, 2006b)

I.4.1.3- Gènes en dehors du CMH

L'IL-10 est une cytokine inhibitrice avec une puissante activité inhibitrice contre les cytokines pro-inflammatoires. Il inhibe la production de cytokines par les cellules Th1 et l'expression de molécules Co-stimulatrices par les macrophages, entraînant une réponse immunitaire réduite. Il est codé par un gène situé sur le chromosome 1. L'IL-23 est une cytokine pro-inflammatoire qui stimule la production d'IL-1, IL-6, IL-17 et TNF-. Ces cytokines sont des acteurs de la pathogenèse de la MB. Deux grands GWAS révèlent une association entre les polymorphismes des récepteurs IL-23 et MB. Plusieurs codant pour d'autres cytokines, chimiokines, récepteurs de type TLR, ICAM, MMP-2-9, gènes oxydatifs pour les protéines de stress, mais avec des résultats contradictoires (Houman et Bel Feki, 2014b).

I.4.1.4- Association de la maladie de behçet et l'allèle HLA-B51

Il ya une forte association génétique entre la MB et HLA-B51 a été décrite, pour la première fois en 1982, par Ohno dans la population japonaise. Cette association a été confirmée depuis dans de nombreuses autres populations d'origine géographique et ethnique différentes. La fréquence de l'antigène HLA-B51 varie de 40 à 80 % chez les malades. L'antigène HLA-B51 serait plus fréquent chez les malades ayant une uvéite postérieure, une atteinte du système nerveux central ou une thrombophlébite. Ces associations phénotype-génotype sont toutefois controversées car elles varient en fonction de l'origine ethnique (Amoura et al., 2006a) .

Le rôle principal du HLA-B51 dans la pathogénie de la MB n'est pas connu. La fonction principale du système HLA de classe 1 est la présentation d'une multitude de peptides aux lymphocytes CD8+. L'association du HLA-B51 aux manifestations cliniques de la MB a été largement analysée. Une récente méta-analyse colligeant 72 études représentant 74 populations a montré que la fréquence des aphtes génitaux, atteintes cutanées et oculaires et du sexe masculin était significativement plus élevée chez les patients porteurs du HLA-B51/B5. Dans une récente étude tunisienne, on a trouvé que la sévérité de la MB, les atteintes vasculaires et neurologiques étaient inversement associées à la présence du HLA-B51 (Houman et Bel Feki, 2014b).

I.4.2- Facteur environnement

I.4.2.1- Facteurs environnementaux infectieux

a- Bactériens

Plusieurs agents infectieux ont été étudiés, dont les bactéries telles que le Streptocoque, les mycobactéries, *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ou *Mycoplasma*. Le streptocoque, en particulier sanguis, a été le plus incriminé (Houman et Bel Feki, 2014c).

b- Viraux

Différents virus comme l'herpes simplex virus (HSV), le parvovirus B19, le virus de l'hépatite C (Thubert et al., 2011), cytomégalovirus, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), toxoplasmose, et syphilis (Renard et al., 2009).

I .4.2.2- Facteurs environnementaux non infectieux

a- Vitamine D

En 2011, Karatay saliha et ces collègues ont mis en évidence une association entre hypovitaminose D et déclenchement de la MB. (Karatay et al., 2011).

En 2017, Aslan Nurşad et son équipe montre qu'il n'y a pas de lien entre le niveau de vitamine D et l'activité de la MB (Aslan et al., 2017).

b- Sélénium

Il existe diverses études montrant que les taux sériques de sélénium (antioxydant) chez les patients atteints de MB sont inférieurs à ceux des sujets sains (Delilbaşı et al., 1991; Esalatmanesh et al., 2011).

c- Tabac

Plusieurs recherches ont rapporté le concept d'expression phénotypique de la maladie par le tabagisme, mais il n'y a actuellement aucune preuve qu'il soit directement impliqué (Lee et al., 2019).

I.5- Manifestations cliniques

I.5.1- Aphtes buccaux

Les aphtes sont des ulcérations douloureuses, de taille variable, rondes ou ovalaires à bords nets. Leur fond est nécrotique, recouvert d'un enduit fibrineux blanc jaunâtre, leur base est ferme à la palpation sans être indurée et leur périphérie est soulignée d'un liseré ou d'un halo rouge secondaire à l'hyperhémie sous-jacente. Les adénopathies satellites sont absentes (voir figure 5). Un stade prodromique, long de 2 à 48 heures, avec sensation de brûlure ou de picotement précède généralement l'apparition d'une tache rouge puis d'une ulcération. La localisation la plus fréquente est la muqueuse orale libre : versant muqueux des lèvres, face interne des joues, face inférieure de la langue, plancher buccal. (Parent et Vaillant, 2008a).



Figure 5 : Ulcérations buccales médicamenteuses (méthotrexate) (Vaillant et Samimi, 2016).

I.5.2- Aphtes génitaux

Elles touchent 65.7% des patients atteints de la MB (Davatchi et al., 2016).

Les aphtes génitaux sont plus grands et plus profonds que les aphtes buccaux et laissent des cicatrices à leur décours (Piram et Koné-Paut, 2014).

Chez les femmes, les lésions vulvaires, vaginales et cervicales sont particulièrement fréquentes. Rarement, des lésions vaginales profondes peuvent perforer la vessie entraînant des fistules (MAMOUCHE, 2022).

Chez l'homme, ces lésions impliquent le plus souvent le scrotum et laissent une cicatrice qui aidera au diagnostic rétrospectif. Elles peuvent aussi être retrouvées au niveau l'épididyme; les

lésions péniennes sont moins fréquentes (voir figure 6). Les mâles et les femmes peuvent développer des lésions périnéales, périanales et inguinales (Zeidan *et al.*, 2016).

Les ulcérations génitales sont aussi présentes chez l'enfant dans 60 à 83%. Elles apparaissent principalement après la puberté (Piram et Koné-Paut, 2014).



Figure 6 : Maladie de Behçet : aphtose génitale du pénis (collection professeur D. p Parent) (Parent et Vaillant, 2008b).

I.5.3- Atteints oculaires

L'œil est l'organe noble le plus fréquemment atteint au cours de MB (Ksiasa *et al.*, 2019) . Sa fréquence varie de 30 à 80 %. L'évolution et le pronostic de l'atteinte oculaire dépendent de la précocité du diagnostic et du traitement (voir figure 7). Bien que l'avènement des nouveaux biologiques ait permis d'améliorer significativement les résultats, notamment pour les formes sévères et réfractaires, la cécité reste la complication la plus redoutée (Saadouli *et al.*, 2021).

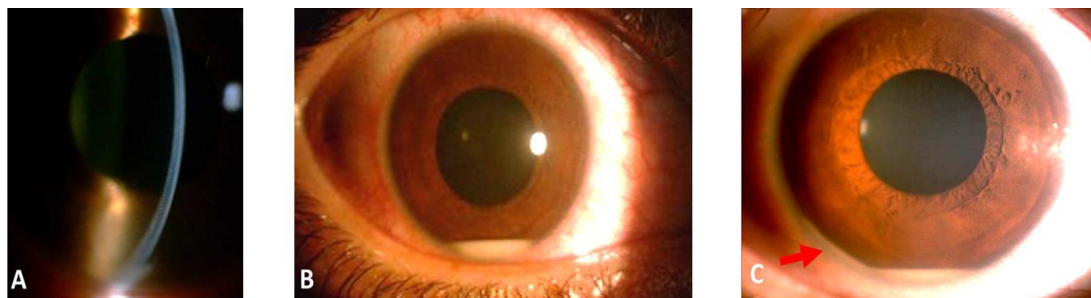


Figure 7 : Uvéite antérieure associée à la maladie de Behçet (Ksiasa *et al.*, 2019).

I.5.4- Atteinte neurologiques

Les manifestations neurologiques de MB sont observées chez 5,3 à plus de 50 % des cas (voir figure 8). Elles se divisent en deux grands types de lésions : les formes « parenchymateuses », qui classent les lésions intracérébrales (méningo-encéphalites), myélite et les formes pseudo-tumorales. Par opposition aux formes « extra-parenchymateuses », qui regroupe les thromboses veineuses cérébrales et les anévrismes artériels. Les atteintes médullaires et les atteintes périphériques sont exceptionnelles (Noel *et al.*, 2014; Yahyaoui *et al.*, 2019).

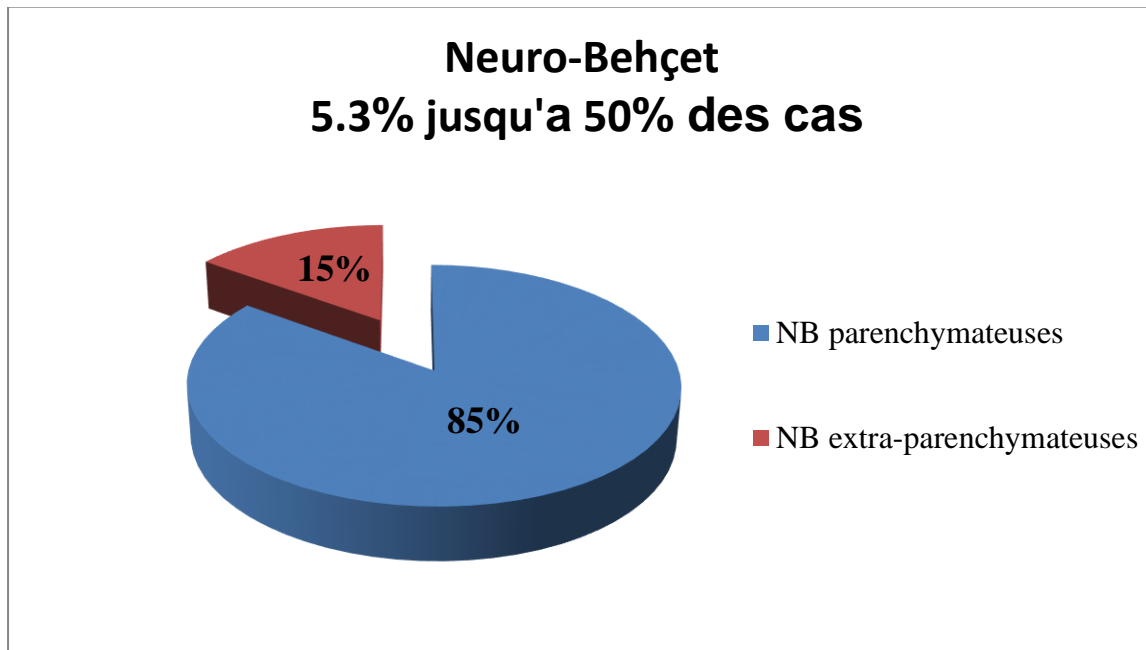


Figure 8 : types de Neuro-Behçet

I.5.5- Atteinte cardiaque

L'atteinte cardiaque est rare mais sévère dans la MB. La mortalité chez les patients MB était 15,4% et 5,4%, respectivement selon la présence ou de l'absence d'atteinte cardiaque. L'atteinte cardiaque peut prendre différentes formes : péricardite, myocardite, endocardite, thrombus intracardiaque, fibrose endomyocardique, infarctus du myocarde, anévrisme coronaire (Comarmond *et al.*, 2014).

I.5.6- Atteintes digestive

Ils touchent 7 % des personnes atteintes de la MB. Ce groupe de manifestations gastro-intestinales est appelé entéro-béthémie (voir figure 9). Ce dommage se produit dans 4,5 à 6 ans en moyenne après le premier aphte, plus fréquent au Japon. Inflammation et ulcération des muqueuses dans tout le tractus gastro-intestinal, la plupart Souvent dans l'angle mort. L'œsophage, le côlon ascendant et le côlon transverse sont zones les moins touchées. Les

principaux symptômes sont l'anorexie, les vomissements, indigestion, diarrhée, selles noires, douleurs abdominales et moins fréquemment. La forme gastro-intestinale touche 14 % des enfants atteints de la MB. Les ulcères peptiques sont rares (Daphné, 2017).



Figure 9 : Multiples lésions apthoïdes situées au niveau de l'iléon chez une patiente présentant un entéro-Behçet (Zuber et al., 2008).

I.5.7- Atteinte rénale

Elle est exceptionnelle et n'a fait l'objet que de quelques publications rapportant des lésions de glomérulopathie proliférative ou de dépôts amyloïdes (Emmerich et al., 2005).

I.5.8- Atteinte articulaire

Les lésions articulaires surviennent dans 45 % des cas, se caractérisent par une arthralgie, une monoarthrite ou une polyarthrite (voir figure 10).

L'Oligoarthralgie non érosive et non déformante impliquant les genoux, les chevilles, les coudes et les poignets est la plus manifestations fréquentes (Zeidan et al., 2016).



Figure 10 : Image représentative des lésions artérielles chez les patients atteints de la maladie de Behçet C. Aortique abdominale anévrismes (**Saadoun et al., 2012**).

I.5.9- Les atteintes des vaisseaux

L'atteinte vasculaire a une évolution plus sévère, en particulier chez les patients de sexe masculin avec un jeune âge d'apparition. Les vaisseaux veineux sont plus souvent touchés que les vaisseaux artériels. Le processus inflammatoire au niveau des vaisseaux artériels conduit généralement à des anévrismes dus à une vascularité aiguë et destructrice. Le saignement est un symptôme d'anévrismes artériels plutôt que de thrombose veineuse.

D'autre part, la formation étendue de thrombus adhérent est la constatation typique de l'atteinte des vaisseaux veineux sans augmentation de la thromboembolie. La pathogenèse de la thrombose (voir figure 11), dans le MB semble être causée par une inflammation de la paroi vasculaire plutôt que par un état procoagulant.⁷⁶ L'atteinte des artères veineuses et pulmonaires survient généralement dans les 5 ans suivant l'apparition de la maladie, et l'atteinte artérielle a tendance à se développer plus tard au cours de l'évolution de la maladie (**Esatoglu et al., 2017**).



Figure 11 : Thrombose cave supérieure (258x417 px) (Wechsler *et al.*, 2005)

I.5.10- Type de maladies de Behçet

Selon les manifestations cliniques de la MB, nous pouvons classer ces types dans la figure suivant :

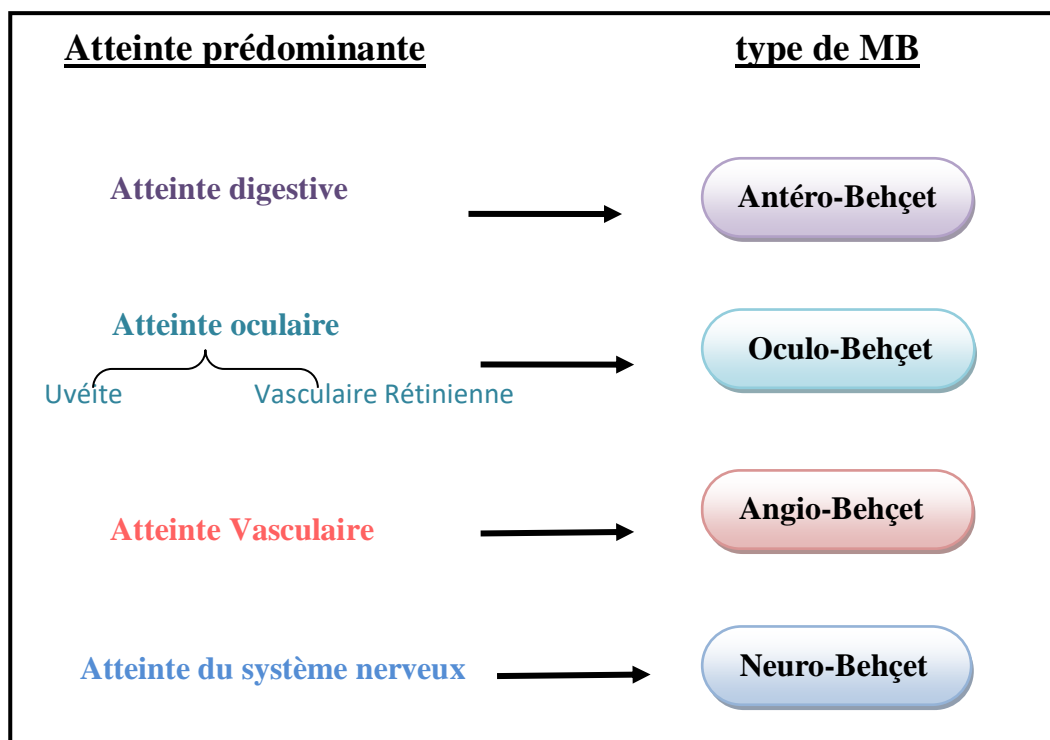


Figure 12 : organigramme résumant les types de MB.

I.6- Diagnostic de la maladie de Behçet

Il n'y a aucun test de laboratoire spécifique pour détecter la MB et cette affection repose sur une base clinique. Donc pour le diagnostic de la maladie on se réfère aux critères internationaux publiés en 1990 (**Tableau I**). Ces critères requièrent comme critère obligatoire mais ces critères de classification sont révisé et modifiée (**Tableau II**). Ces nouveaux critère permettent d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité du diagnostic de la maladie de Behçet (**Zuber et al., 2008**).

Tableau I: Critères de classification de la maladie de Behçet.

Critères de classification de la maladie de Behçet
<ul style="list-style-type: none">• Aphthose buccale récidivante<ul style="list-style-type: none">✓ 3 types : majeur, mineur, herpétiforme✓ ≥ 3 poussées/an✓ observée par un médecin ou le patient+ au moins deux des critères suivants :• Ulcérations génitales récidivantes ou lésions cicatricielles<ul style="list-style-type: none">✓ observées par un médecin ou le patient• Lésions oculaires<ul style="list-style-type: none">✓ uvéite antérieure, uvéite postérieure, hyalite à la lampe à fente ou vasculite rétinienne observées par un ophtalmologue.• Lésions cutanées<ul style="list-style-type: none">✓ érythème noueux, pseudofolliculite, lésions papulo-pustuleuses ou nodules acnéiformes observés par un médecin en dehors de l'adolescence ou d'un traitement corticoïde.• Test pathergique cutané positif<ul style="list-style-type: none">✓ lu par un médecin après 24-48 heures.

(Zuber et al., 2008).

Tableau II: Nouveaux critères de classification de la maladie de Behçet.

Modification des critères de classification	
Aphtes oraux	1 point (obligatoire)
Aphtes génitaux	2 points
Lésions cutanées	1 point
Atteintes oculaires	2 points
Test pathergique positif	1 point

(Gabay, 2008).

I.6.1- Diagnostic moléculaire**I.6.1.1- Réaction en chaîne par polymérase (PCR)**

On peut détecter la MB à l'échelle moléculaire par la technique de PCR, qui nous parlerons dans le chapitre suivant.

I.6.1.2-Typage HLA

En 2018, Saeedeh Shenavandeh et ses collaborateurs ont réalisé une étude prouvant que le typage HLA-B51 est positive (Shenavandeh et al., 2018).

I.6.2-Examens complémentaires

Divers examens complémentaires peuvent être effectués en fonction des symptômes présentés par le malade, afin d'évaluer l'ampleur de l'atteinte des différents organes.

I.6.2.1- Biologie

Les examens biologiques ne sont pas spécifiques: on retrouvera en général une anémie, une hyperleucocytose, un syndrome inflammatoire (augmentation de la CRP/VS) dans la phase aigüe de la maladie. Les anticorps antinucléaires étaient négatifs (Lamzaf et al., 2014).

I.6.2.2-Examens radiologiques

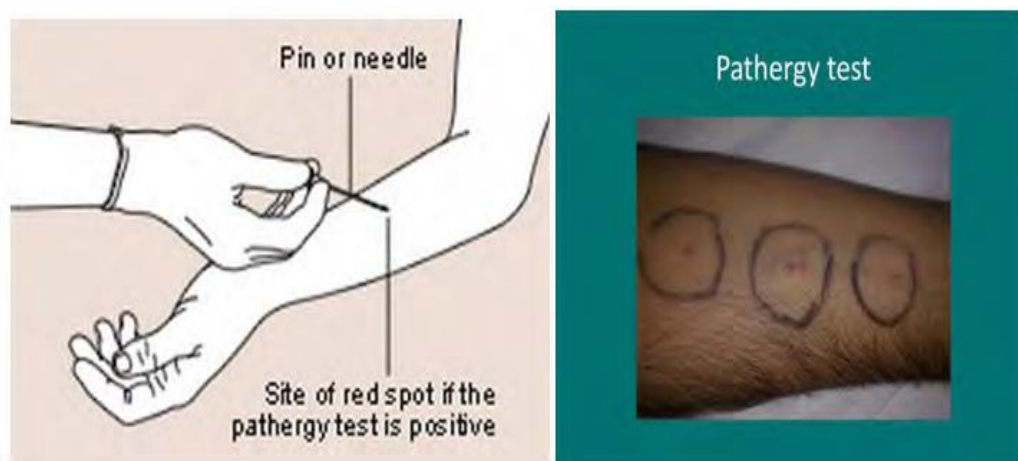
En cas de manifestations particulières, les examens seront orientés afin de faire un bilan complet de l'atteinte comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau III: Les différents examens radiologiques selon les atteintes.

Les atteintes	Examens radiologiques
Atteintes neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> • l'imagerie par résonance magnétique (IRM) • l'étude du liquide céphalorachidien (LCR) • Angio –scanner/Angio-IRM • La tomodensitométrie (TDM)
Atteintes oculaires	<ul style="list-style-type: none"> • l'examen ophtalmologique initial (mesure de l'acuité visuelle, examen à lampe à fente, fond d'oeil). • Photométrie automatisée du Tyndall • Angiographie rétinienne à la fluorescéine • Angiographie au vert d'indocyanine (ICG) • Tomographie en cohérence optique (OCT) • Écho-Doppler • Ultra-biomicroscopie (UBM)
Atteintes pulmonaires	<ul style="list-style-type: none"> • Angioscanner thoracique
Atteintes cardiovasculaires	<ul style="list-style-type: none"> • Echocardiographie • ECG

I.6.2.3- Teste pathergique

Les tests pathergiques consistent en une réaction intradermique Aiguille stérile de gros calibre (20 à 22 G) en avant-bras, sans Infusion de solutions. Considérez 24 à 48 heures de lecture Positif lorsque des lésions pustuleuses ou des nodules se forment. Le test est souvent positif pendant MB (30 à 75 p. 100), Mais il semble être moins sensible aux populations occidentals (Voir figure 14) (Loïc, 2014).

**Figure 14 :** Image du test de pathergie dans le diagnostic du syndrome de Behçet (Asadi, 2020).

I.7- Diagnostic différentiels

Le diagnostic différentiel varie en fonction de la présentation clinique qui est résumée dans le tableau suivant :

Tableau IV. Diagnostics différentiels de la maladie de Behçet.

Symptomatologies	Diagnostics différentiels
Devant les ulcérations buccales	l'hémopathie, au VIH, Maladie de Crohn, lupus, dermatose bulleuse ou carences vitaminiques, Stomatite aphteuse récurrente, syndrome de Steven-Johnson, nécrolyse toxique épidermique, lichen plan érosif.
Devant les Ulcères génitaux	Chancre syphilitique, infection à HSV.
Devant l'association d'une aphtose éventuellement bipolaire et de manifestations inflammatoires oculaires et/ou articulaires	Syndrome de Reiter, maladie de Crohn, lupus systémique, syndrome de Sweet, fièvres héréditaires. Un chevauchement entre polychondrite et maladie de Behçet a été décrit sous l'acronyme MAGIC syndrome.
Devant des lésions aphtoïdes digestives	Maladie de Crohn.
Devant une uvéite antérieure avec ou sans hypopion	Uvéites liées à HLA-B27, uvéites infectieuses.
Devant une uvéite postérieure avec vascularite rétinienne	Autres vascularites primitives (maladie de Horton, panartérite noueuse, maladie de Wegener, etc.), sarcoïdose, infections (tuberculose, toxoplasmose, syphilis, herpès, toxocarose, etc.), sclérose en plaques.
Devant des manifestations neurologiques (hors thrombophlébite cérébrale)	Sclérose en plaques, neurolupus, neurosarcoïdose, vascularites cérébrales, neuroSweet, tumeurs cérébrales, accidents ischémiques, méningites, syndrome de Susac
Devant des thromboses veineuses	Thrombophilies congénitales ou acquises (antiphospholipides, thrombocytémie essentielle).
Devant des manifestations vasculaires artérielles	Maladie de Buerger, maladie de Takayasu, panartérite noueuse
Atteintes pédiatriques	Arthrite chronique juvénile (première cause d'uvéite chez l'enfant).

(Guichard *et al.*, 2010; Streho et Aouba, 2010; Greco *et al.*, 2018).

I.8- Traitement de la maladie de Behçet

Le traitement des différentes manifestations de la maladie de Behçet demeure controversé du fait de la rareté des essais thérapeutiques contrôlés et de l'absence de critères standardisés de mesure de l'évolution de la maladie (**Houman et al., 2008a**).

Le choix du traitement dépend de la présentation clinique, du siège des lésions et de la sévérité des atteintes systémiques. Il devra être individualisé pour chaque patient. Ce traitement a pour but la suppression des phénomènes inflammatoires, la récupération fonctionnelle d'une atteinte viscérale, notamment oculaire et /ou neurologique et la prévention des rechutes. Le traitement ne permet une amélioration que s'il est prescrit rapidement et à des doses efficaces (**Otmani, 2009**).

Bien que la colchicine, les anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les traitements topiques corticoïdes soient souvent suffisants pour contrôler les manifestations cutanées muqueuses et articulaires, une stratégie d'emblée plus agressive avec des immunosuppresseurs est justifiée pour traiter les manifestations sévères qui mettent en jeu le pronostic vital ou fonctionnel, telles que l'uvéite postérieure, la vascularite rétinienne, les atteintes vasculaires, neurologique et gastro-intestinale (**Comarmond et al., 2014**) et parfois un traitement endovasculaire ou chirurgical si l'anévrisme est menaçant.

Le choix du type de la prise en charge endovasculaire ou chirurgicale est à discuter au cas par cas, en fonction de l'expérience de l'équipe, des conditions anatomiques et de la présentation clinique (**Desbois et al., 2016**).

Quels que soient la forme clinique et le traitement utilisé, le but est jusqu'à ce jour de diminuer la fréquence et la sévérité des poussées de la maladie et de minimiser le risque de séquelles définitives en particulier oculaires et neurologiques (**Houman et al., 2008b**).

Matériels et méthodes

Notre étude théorique portant sur l'association du gène HLA-B51 et la maladie de Behçet en confrontant la clinique aux techniques de détection a aboutit au choix d'un article (**Noubuhisa, et al 1999** : Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet) et trois autres mémoires de PFE (mémoire de **Brahiti Milila et Moktar Narimene de 2015** portant sur la recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps reel dans la maladie de behçet ; mémoire de **AMAR SETTI Asma de 2012** portant sur l'association HLA-B51 et la maladie de Behçet ; et le mémoire de **Nourreddine Rayene, Kellali Nour El imene et Bennacef Rayene de 2021** portant sur l'étude épidémiologique de la maladie de Behçet). La comparaison de ces différents travaux a pour objectif la comparaison des techniques de détection afin de déterminer la meilleure d'entre elles, la plus rapide, la moins couteuse et la plus fiable.

I-Matériel

Tableau V : Matériel biologiques et non biologiques utilisé dans les différentes études traitées.

Articles et auteures	Matériels biologiques		Matériels non biologiques
Article: Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet. Auteur : Noubuhisa, et al 1999	Patients	95	- PCR GeneAmp 9600 (PE Biosystems) - Microcon 100 (Millipore, MA) - ABI PRISM BigDye Kit de séquençage - Un séquenceur d'ADN automatisé ABI377 (PESystème)
	Témoins	116	
	sexe		
	Age		
Mémoire : Recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps reel dans la maladie de behçet. Auteur : Brahiti Milila MoktarNarimene En (2015).	Patients	21 8 H / 13F	Réactifs et solutions <ul style="list-style-type: none"> • L'éthanol • Eau distillée • Protéinase K • Réactifs TaqMan • Ribonucléase A (RNase A) • Solution d'éluion (Pure Link Génomic Elution Buffer) 2 • Solution de lyse (Pure Link GenomicLysis/ Binding Buffer) • Tampon de lavage (Wash Buffer) • Tampon de PCR
	Age	Entre 5 et 59ans	

	Sexe R	F/H de 1,63	<ul style="list-style-type: none"> • Taq-polymerase Appareillages et Equipements <ul style="list-style-type: none"> • 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 Petits matériels et verreries <ul style="list-style-type: none"> • Colonne cartridges et Poubelle d'éluion 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 garro
	Témoins	50	
	Age	Age moyenne de 34ans	
	Sexe R	1/1	
Mémoire Association HLA-B51 et la maladie de Behçet Auteur AMAR SETTI Asma (2012)	Patients	25	Réactifs et solutions <ul style="list-style-type: none"> • Protéinase K • Solution de lyse LDB (lysis dilution buffer) • Ethanol • Solution de lavage WDB (Wash dilution buffer) • Kit INNO-TRAIN/HLA-Ready gene B low

	Témoins		<ul style="list-style-type: none"> • Tampon PCR • La taq-polymerase • Tampon tris Acétate EDTA (TAE) • Gel d'agarose • Eau distillée • Des pastilles de KOH ou Naoh • BET (Bromure d'éthidium)
	Sexe		<p>Appareillages et Equipements</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugeuse • Réfrigérateur • Congélateur (-20°C) • Vortex (whili mixer) • Le thermocycleur (Applied biosysteme 9700) • Micro-onde • Hotte à flux laminaire (flufrance) • Capture de photo (GEL DOC XR biorad) • Une colonne CAS (cartridges)
	Age	Entre 2 et 64ans	<p>Petits matériels et verreries</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les gants • Tubes secs à usage unique • Portoir • Micropipette de volume réglable • Embouts à usage unique • Eau physiologique • Minuterie • Tubes coniques de 10 ou 15ml avec bouchon • Tubes EDTA • Tube à déchets WTS (waste tube) • Tube oppendorff • Les plaques à 42 puits

Mémoire Etude épidémiologique de la maladie de Behçet Auteur Nourreddine Rayene Kellali Nour El imene Bennacef Rayene (2021)	Patients	454	Réactifs et solutions <ul style="list-style-type: none"> • PBS (phosphate Buffred Salin) sans Mg²⁺, sans Ca²⁺, solution prête à l'emploi • Ficoll-triosyl : solution prête à l'emploi • Bleu acétique, il se prépare avec <ul style="list-style-type: none"> - Acide acétique pure (CH₃COOH) : 2ml. - Bleu de méthylène : 3gouttes. - Eau distillée : 100ml. Durée de conservation un mois. <ul style="list-style-type: none"> • Eosine : solution à 5% : 5g d'éosine plus 100 ml d'eau distillée ; • Formol : <ul style="list-style-type: none"> - Soit 5.37g de NaHPO₄ pour 100ml d'eau distillée. - Au moment de l'utilisation amener le formol à pH=7.2 par un ajustement avec le Formol à 40%. Appareillages et Equipements <ul style="list-style-type: none"> • Une étuve à 37°C. • Un congélateur à -80°C et à -30°C • Un réfrigérateur. • Un microscope en phase inversée. • Une centrifugeuse réfrigérée. • Un agitateur. Petits matériels et verreries <ul style="list-style-type: none"> • Des microseringues de type "Hamilton" : <ul style="list-style-type: none"> - à 1µl (aiguille simple).à 5 µl (6 aiguilles). • Des poires d'aspiration en caoutchouc pour pipettes. • Des pipettes graduées. • Des pipettes de type "Pasteur".
	Témoins		
	Sexe	298 F 156 H	
	Age	35	

			<ul style="list-style-type: none"> • Une micropipette (100µl). • Des cellules de Mallassez et lamelles. • Des plaques micro-test à 60 alvéoles de type « TERASAKI » et lamelles. • Des tubes à hémolyse. • Des tubes herlen et des billes en verre. • Des cupules en verre ou plastique. • Des filtres en papier. • Des gants à usage unique
--	--	--	--

II-Méthodes

Dans notre étude nous avons traité différentes techniques utilisées dans chaque étude de manière à comparer technique par technique.

II.1- Techniques utilisés dans l'article « Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet », **auteur Noubuhisa, et al 1999.**

II.1.1- Typage HLA classe I

II.1.1.1- Mode opératoire

Le typage sérologique HLA de classe I était réalisé par une technique standard de microlymphocytotoxicité, à l'aide de lymphocytes du sang périphérique. Typage HLA/ADN pour le groupe HLA-B5 a été réalisée chez tous les patients B51-positifs et contrôles par la méthode d'amorce spécifique à la séquence PCR.

II.1.2- Polymorphisme de gène MIC-I

II.1.2.1- Mode opératoire

Deux amorces génériques flanquant les exons 2, 3, 4 et 5 du gène MIC-A, donnant un fragment amplifié de 2 073 paires de bases, ont été conçus dans l'intron 1 et 5 (amorce 59 ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG, 39 amorces CTA CTG CCC AGA CAG GGG CCT TA). La 50 l de mélange réactionnel d'amplification comprenant 100 ng d'ADN matrice, 10nmoles de chaque dNTP, 0,5 unité d'AmpliTaq Or (PE Biosystems, Foster City, CA) et 20 pmoles de

chaque des amorces ci-dessus. L'amplification par PCR a été réalisée dans un Système de PCR GeneAmp 9600 (PE Biosystems).

La PCR les conditions de cyclage étaient les suivantes : dénaturation initiale à 96°C pendant 10 minutes, suivi immédiatement de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, recuit à 61°C pendant 1 minute, extension à 72°C pendant 2 minutes, et allongement final à 72°C pendant 10 minutes, avant de refroidir à 4°C. Le produit PCR était purifié à l'aide de Microcon 100 (Millipore, MA). Produit PCR (100 ng dans 1 l) a été soumis à la détermination de la séquence nucléotidique à l'aide du cycle de terminaison ABI PRISM BigDyakit de séquençage et un séquenceur d'ADN automatisé ABI377 PE Biosystèmes). Les amorces de séquence étaient les suivantes: exon 2, amorce avant ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG amorce inverse GTG CCG GCT CAC CTC CCC TGCT; exon 3, amorce avant GTG AGG AAT GGG GGT CAG TGG AA, amorce inverse CAA CTC TAG CAG AAT TGG AGG GAG; et exon 4, amorce sens AAG AGA AAC AGC CCT GTT CCT CTC C, amorce inverse TCC CTG CTG TCC CTA CCC TG.

II.2- Mémoire Recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps réel dans la MB.

Auteur Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)

II.2.1- Extraction d'ADN par techniques de KIT INVITROGENE

II.2.1.1- 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.

II.2.1.2- Mode opératoire

L'ADN utilisé comme matrice d'amplification pour les réactions PCR en temps réel a été extrait par la technique « de KIT INVITROGENE » par les étapes suivantes :

a- La lyse des globules blancs

Le sang est prélevé sur anticoagulant. S'il est congelé laisser décongeler une nuit à +4 Ou 20 à 30 mn à T ambiante. 200µl de sang total est ajoutées à 30µl de protéinase K et 20 µl de RNase A dans un eppendorf stérile le tous est vortaxé 2min à Température ambiante, Ainsi que

200µl de Pure Link GenomicLysis/ Binding Buffer est ajoutée à ces derniers, l tout est vortexé .une incubation est poursuivie à 55°C pendant 10 mn pour une lyse optimale.

Après 200µl d'éthanol (96-100%) est ajoutés à notre mélange, le tout est vortexé 5s.le lysat obtenu est transférée dans une colonne stérile et Centrifuger à 10000g pendant 1 mn à T ambiante

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

Placer la colonne dans la première poubelle et ajouter 500ul Du Tampon 1 (Wash Buffer 1) en Centrifugeant à 10000 g pendant 1mn à T ambiante, Pour le deuxième lavage placer la colonne dans la deuxième poubelle et ajouter 500ul du tampon 2 (Wash Buffer 2) en Centrifugeant à 14000g (vitesse maximale) pendant 3 mn à T ambiante.

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

A la fin notre colon est placé sur un eppendorf stérile pour que 25-100ul de solution d'élution (Le volume de solution d'élution à rajouter est fonction de la concentration d'ADN voulu) soit ajoutée et le tout est Incuber pendant 1 mn à T ambiante puis en Centrifugeant à 14000 g pendant 1 mn à T ambiant alors L'eppendorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne).

Pour augmenter le rendement de l'extraction, il est recommandé de faire deux éluions sur la même colonne en utilisant deux tubes différents (pour prévenir la dilution de l'ADN). Après ils ont déterminé 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/µl. 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.

II.2.2- PCR en temps réel

II.2.2.1- 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.

II.2.2.2- Mode opératoire**a- 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.

Mélanger 5 μ L de B51 2X Rxn et 1 μ L de B51 ADN pol. Pour préparer le mélange pour chaque réaction. Préparer assez de volume de mélange pour toutes les réactions et un peu plus pour prévenir toute erreur. Après avoir bien mélangé, placer 6 μ L de mélange dans la plaque de 96 puits. Ajouter ensuite 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). Fermer avec précision le sceau de la plaque de 96 puits, puis Transférer la plaque de 96 puits pour un test dans la PCR en temps réel et procéder à L'amplification.

b- 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 :

1-dénaturation pendant 5min en température de 95° (1 cycle)

2- dénaturation pendant 25S en température de 96° (5 cycle)

Hybridation pendant 45S en température de 70° (5 cycle)

Extension pendant 30S en température de 72° (5 cycle)

3- dénaturation pendant 25S en température de 96° (30cycle)

Hybridation pendant 45S en température de 65° (30 cycle)

Extension pendant 30S en température de 72° (30 cycle).

Et de la fluorescence, puis cliquer sur le bouton de démarrage "Exécuter".

II.3- Mémoire portant sur l'association HLA-B51 et la MB, auteur AMAR SETTI Asma (2012)**II.3.1- Extraction d'ADN****II.3.1.1- principe**

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules
- Élimination des protéines
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

II.3.1.2- Mode opératoire**a- Etape de lyse (la lyse des globules blancs)**

Le sang total, conservé à -20°C, dans des tubes EDTA est décongelé à température ambiante au moment de l'utilisation. 200µl de sang total est ajoutés à 30µl de protéinase K aliquotés au préalable ainsi que 250µl de solution de lyse LDB (lysis dilution buffer) est ajoutée à ces derniers dont un pipetage rapide et immédiat était nécessaire, le tout est vortexé 15s et placé au flash spin down. Une incubation est poursuivie à 56°C pendant 5 mn au bain marie.

Après 250µl d'éthanol absolu sont ajoutés à notre mélange, le tout est vortexé 15s puis placé au flash spin down. Le lysat obtenu est transféré dans une colonne CAS (cartridges) posé sur un tube à déchets WTS (waste tube) et centrifugé à 8000rpm (Rq. le tube à déchets (WTS) est remplacé à chaque centrifugation),

b- Etape de lavage (élimination des contaminants de l'ADN)

Afin d'effectuer deux lavages on ajoutait 750µl de solution de lavage WDB (Wash dilution buffer) en centrifugeant à la suite à 8000 rpm.

c- Etape d'éluion (la solubilisation de l'ADN pure)

A la fin notre colon est placé sur un tube oppendorff de 1,5ul pour que 200µl de solution d'éluion soit ajoutée et le tout est centrifugé à 8000 rpm ; ainsi un volume final de 200µl d'ADN génomique est obtenu.

II.3.2- Typage par SSP (polymérase chain reaction-spécifique sequence primers)

Le kit utilisé est : INNO-TRAIN/HLA-Readygene B low (conservée à -20°C et retirée juste avant utilisation). Pour chaque patient, une plaque de 42 puits est préparée.

II.3.2.1- Principe

Le principe de cette technique que l'amplification par la taq polymérase n'est effective que lorsque l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence de l'ADN cible. Les couples d'amorces sont définis pour être spécifique d'une séquence d'un ou plusieurs allèles .dans des conditions optimales de la PCR, le couple d'amorces spécifiques permet l'amplification des séquences cibles (résultats positif), après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont met en évidence par électrophorèse sur un gel d'agarose incorporé de BET.

L'interprétation des résultats PCR SSP est basée sur la présence ou l'absence de bandes spécifiques. Un contrôle positif interne est intégré .il permet de vérifier l'amplification de la réaction PCR

II.3.2.2- Mode opératoire**a- Pré amplification**

Dans un tube eppendorff 200µl d'eau distillée stérile et 100µl de tampon PCR (conservé a -20°C) et 4 ul de la taq sont ajoutés. Le tube est vortexé pendant 15secondes et 10µl de ce mélange sont déposés dans le premier puits de contrôle négatif. Après cela, 60µl d'ADN génomique (50ng /µl) préalablement vortexé pendant 20s (5U/µl) sont ajoutés. Le tout est vortexé pendant 20 secondes et 10µl de ce mélange sont déposés dans chaque puits a l'exception du puits contrôle négatif .les puits sont bien fermés a l'aide de couvercle afin d'éviter l'évaporation.

b- Amplification

Une fois que les plaques sont prêtes, elles sont placées dans le thermocycleur (Appliedbiosysteme 9700), préalablement préchauffé pour l'amplification. Un programme spécifique INNOTRAIN-Ready est lancé et l'amplification dure 1heure 35minute

Programme de la PCR-SSP :

- 1- Dénaturation pendant 2min en température de 96°C
- 2- Dénaturation pendant 15sec en température de 96°C (10 cycle)
- 3- Hybridation pendant 1min en température de 65°C (10cycle)
- 4- Dénaturation pendant 15sec en température de 96°C (20 cycle)
- 5- Hybridation pendant 50sec en température de 61°C (20cycle)
- 6- Elongation pendant 30sec en température de 72°C (20cycle)
- 7- Elongation pendant 5min en température de 72°C

Conservation ∞ en température de 4°C

c- Révélation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

En parallèle à l'amplification, la préparation du tampon tris Acétate EDTA (TAE) et du gel d'agarose à 2% est effectuée .pour le tampon TAE ,242 gr de tris base, 57,1ml d'acide acétique et 100ml d'EDTA sont mélangés et ce mélange est ajouté à 100 ml d'eau distillée. Le Ph de la préparation est ajusté à 8.5 en utilisant des pastilles de KOH ou NaOH. La solution obtenue est concentrée 50X elle est donc diluée afin d'obtenir une solution concentrée 1X. Après cela le gel d'agarose à 2% est préparé en mélangeant 6gr d'agarose (genagarose) a 300ml de tampon TAE dans un bécher et en mettant le tout au micro-onde pendant 5min ou jusqu'à dissolution totale. Entre temps le porte gel et les applicateurs sont préparés et déposés sous la hotte à flux laminaire (flufrance).

Quand le gel est prêt, il est met sous la hotte ou 20µl de BET lui sont ajoutés, le gel est versé délicatement dans le porte gel et les applicateurs y sont placés tous doucement. Le gel doit reposer pendant 15 minutes sous la hotte chimique. Des que l'amplification s'achève le gel est déjà prêt et il est déposé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X et les applicateurs sont délicatement retirée pour ne pas créer de brèches .les plaques sont retirée de termocycleure et à l'aide de micropipette à 8 canaux, les amplicons sont déposés dans les puits de gel d'agarose à 2%. Les fragments d'ADN amplifiés migrent 25 minutes à 60V et les bandes d'ADN ainsi formées sont révélées et visualisées par marquage au bromure d'ethidium BET et

observées sous lumière UV à l'aide d'un équipement de capture de photo (GEL DOC XR biorad) et des logiciels quantity one.

d- Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats PCR-SSP nécessite l'utilisation du logiciel INNO-TRAIN des tableaux de résultats fournis dans le kit. Elle est basée sur la présence ou non .dans chaque puits des fragments amplifiés spécifiques aux allèles.

II.4- Mémoire Etude épidémiologique de la MB, auteur Nourreddine Rayeneet Kellali Nour El imene et Bennacef Rayene En (2021)

II.4.1- Typage HLA

1.4.1.1. Principe

Cette technique, développée et introduite en 1964 par TERASAKI, est adoptée par presque tous les laboratoires. Elle étudie les anticorps anti-HLA et l'application dans la greffe in vitro (CROSS-MATCH).

Le principe de cette technique est que les anticorps cytotoxiques HLA peuvent lyser, en présence du complément, les lymphocytes portant les antigènes HLA correspondants, nécessitant:

- les antigènes : suspension lymphocytaire ;
- les anticorps : immuns-sérum anti-HLA ;
- le complément : sérum du lapin.

Le résultat est soit négatif lorsque les lymphocytes sont vivants, soit positif lorsque les lymphocytes sont lysés.

II.4.1.2- Mode opératoire

a- Le prélèvement sanguin

Le prélèvement se fait au pli du coude à l'aide d'une aiguille de calibre suffisant pour assurer un bon débit. La quantité de sang prélevée (10ml) est mise dans un herlen contenant des billes en verre, une agitation manuelle doit être faite immédiatement durant 10min pour réaliser une défibrination. Le prélèvement doit se faire en dehors de traitement anti-inflammatoire non stéroïdien (ANS) et de corticoïdes, car ils diminuent l'expression antigénique.

b - Instruction pour le test

La plaque de TERASAKI est de forme rectangulaire, munie d'une soixantaine de puits (cupules), dans lesquelles sont injectés la solution lymphocytaire et l'immun-sérum pour la réalisation de la réaction de lymphocytotoxicité. La préparation de la plaque nécessite d'abord un huilage de tous les puits (huile de paraffine) à l'aide d'une pipette pasteur calibrée à 3 μ l. L'huilage est nécessaire pour la conservation du produit injecté dans la plaque.

Après injecter des immuns-sérums prélevés des savonnettes ayant la même configuration que la plaque test de Terasaki et mise en congélation des plaques à -80°C.

c - La séparation des lymphocytes

Isoler les lymphocytes du reste des éléments figurés du sang puis Déposer 2.5ml de sang défibriné dans un tube en verre à fond conique et ajouter 5ml de PBS (dilution 1/2), ce mélange est déposer sur 4ml de Ficoll dans 2 tubes, le tous est centrifugé à 2000 tours/min et à 18°C pendant 20min.

Après Récolter par aspiration la couche inter-faciale (à l'aide d'une pipette pasteur). Ne pas aspirer le Ficoll mais seule la couche lymphocytaire (aussi appelé annaux cellulaire ou couronne). La suspension recueillie est mise dans un tube en verre et lavée 2 fois avec du PBS (pour se rassurer qu'il n'y a pas de reste du Ficoll). Après chaque lavage, la suspension sera centrifugée pendant 10min à 3000 tours /min. puis Remettre le culot en suspension, l'ajuster dans 0.5ml de PBS.

d - L'expression HLA : La lymphocytotoxicité

Sortir la plaque TERASAKI du congélateur et Laisser décongeler à température ambiante pendant 10 minutes environ, puis Injecter 1 μ l de la solution lymphocytaire dans chacun des puits (au fond) avec une micro seringue de type Hamilton et Laisser incuber 30min (25-37°C) dans l'étuve.

Après Retirer le complément lyophilisé du réfrigérateur et le préparer en ajoutant 1ml d'eau distillée , Injecter 5 μ l du complément dans chaque puits et Laisser incuber de nouveau pendant une heure et trente minutes (25-37°C), 10min avant la fin de l'incubation sont préparés l'éosine et le formol tamponné à 7.2 de pH puis les filtrés.

En fin d'incubation, injecter 3µl de l'éosine au fond de chaque puits de la plaque. Après 10min, injecter 6µl de formol tamponné au fond des puits, puis Mettre une lamelle sur la plaque de TERASAKI et conserver à plus de 4°C jusqu'au lendemain pour faire la lecture.

e - La lecture

La lecture de la réaction lymphocytaire s'effectue à l'aide du microscope en phase inversée, le principe de la lecture est le suivant : Elle consiste à démontrer dans les champs microscopiques les lymphocytes morts (réaction positive), ces cellules lysées s'imprègnent de colorant (orange pour l'éosine), alors que les cellules vivantes demeurent réfringentes (réaction négative)

Tableau VI : Tableau comparatif de technique d'extraction d'ADN utilisées dans les études traitées.

Mémoire Technique	Association HLA-B51 et la maladie de Behçet	Recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps reel dans la maladie de behçet.
Extraction d'ADN	- Extraction d'ADN Etape de lyse 30µl Protéinase K Pas de RNase A 250µl de Solution de lyse LDB vortexé 15s incubation à 56°C pendant 5 mn 250µl d'éthanol vortexé 15s centrifugé à 8000rpm Etape de lavage Lavage1 : 750µl de solution de lavage WDB centrifugeant à 8000 rm pendant 1 mn lavage 2 : Les mêmes conditions que le premier lavage Etape d'élution	- Extraction d'ADN par techniques de KIT INVITROGENE Etape de lyse 20µl Protéinase K 20µl Ribonucléase A (RNase A) Vortexé 2min 200µl de Solution de lyse LDB vortexé incubation à 55°C pendant 10 mn 200µl d'éthanol vortexé 5s centrifugé à 14000g Etape de lavage Lavage 1 : 500µl de solution de lavage WDB centrifugeant à 10000 g pendant 1mn lavage 2 : 500µl de solution de WDB centrifugeant à 14000 g pendant 3mn

	200 µl de solution d'élution Pas d'incubation centrifugé à 8000 rpm	Etape d'élution 25 à 100 µl de solution d'élution Incuber a pendant 1 mn centrifugé à 14000 g
--	--	---

A partir du tableau IV, nous avons constaté que :

- La quantité des réactifs et solutions tel que Protéinase K, LDB, éthanol, WDB et solution d'élution est plus important (élevé) dans le protocole de **AMAR SETTI Asma (2012)** que le protocole de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)**.
- la durée de vortex et d'incubation est plus long dans le protocole de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)** que le protocole de **AMAR SETTI Asma (2012)**.
- centrifugé à 8000rpm dans le mémoire de **AMAR SETTI Asma (2012)** et à 14000g dans le mémoire de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)**.
- l'ajout de réactif RNase A dans le protocole de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)**

Tableau VII : Tableau comparatif de technique de PCR utilisées dans les études traitées.

/	Association HLA-B51 et la maladie de Behçet	Recherche de l'allele HLA-B51 par PCR en temps reel dans la maladie de behçet.	Analyse d'association entre les allèles MIC-A et HLA-B chez les patients japonais atteints de la maladie de Behçet.
PCR	PCR SSP utilisé Le kit de INNO-TRAIN/HLA-Readygene B low plaque de 42 puits Le thermocycleur (Appliedbiosysteme 9700)	PCR en temps reel utilisé Le kit de HLA-B51 Real Amp plaque de 96 puits Thermocycleur de type Applied Biosystems 7500	PCR Classique / / Système de PCR GeneAmp 9600 (PE Biosystems)

A partir de tableau VII nous avons constaté que

- Dans le première mémoire De **AMAR SETTI Asma (2012)** ils ont utilisée la PCR SSP a l'aide de kit INNO-TRAIN/HLA-Readygene B low par contre dans le 2éme mémoire de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)**. ils ont utilisée la PCR en temps reel a l'aide de kit de HLA-B51 Real Amp, Alors que dans l'article de **Noubuhisa, et al 1999** utilisé un PCR classique.
- Préparation d'un plaque de 42 puits dans le protocole de **AMAR SETTI Asma (2012)**, et un plaque de 96 puits dans le protocole de **Brahiti Milila et Moktar Narimene (2015)**.
- Les types d'appareil utilisée dans la PCR est différent.

Résultats et Discussion

III-Résultats et Discussion

III.1-Extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléiques est le point de départ de toute étude de biologie moléculaire et est donc considérée comme un processus crucial. Il ya plusieurs techniques d'extraction d'ADN : la technique classique tel que utilisé le phénol chlorophorme qui consistent une toxique pour l'homme. De nombreux techniques plus récents comme l'extraction à l'aide des billes magnétiques, extraction d'ADN basé sur la chromatographie, extraction alcaline (Shetty, 2020). Il existe différents protocoles pour extrait l'ADN (Ghaheri et al., 2016, AMAR SETTI Asma en (2012), Brahiti Milila et Moktar Narimene en (2015), qui suivant approximativement les même étapes. Dans les études que nous avons traitées, ils ont utilisé le protocole de protéinase K. Le premier protocole à été appliqué est celui de Amar Setti Asma (2012), il ont utilisé 30ul Protéinase K tel que le protéinase K est une sérine protéase à large spectre couramment utilisé pour digérer les protéines et éliminer les contamination des préparation des acides nucléiques et aussi sont centrifuger le mélange à 8000 Rpm. Dans le deuxième protocole de Brahiti Milila et Moktar Narimene en (2015), ils ont utilisé 20ul de protéinase K donc ils ont diminué la quantité car nous constatons qu'ils ont un moins nombre de patients par rapport à le premier protocole. Alors nous comparons les deux études la quelle est le prix de protéine K consommé est différent et plus couteux dans une des études.

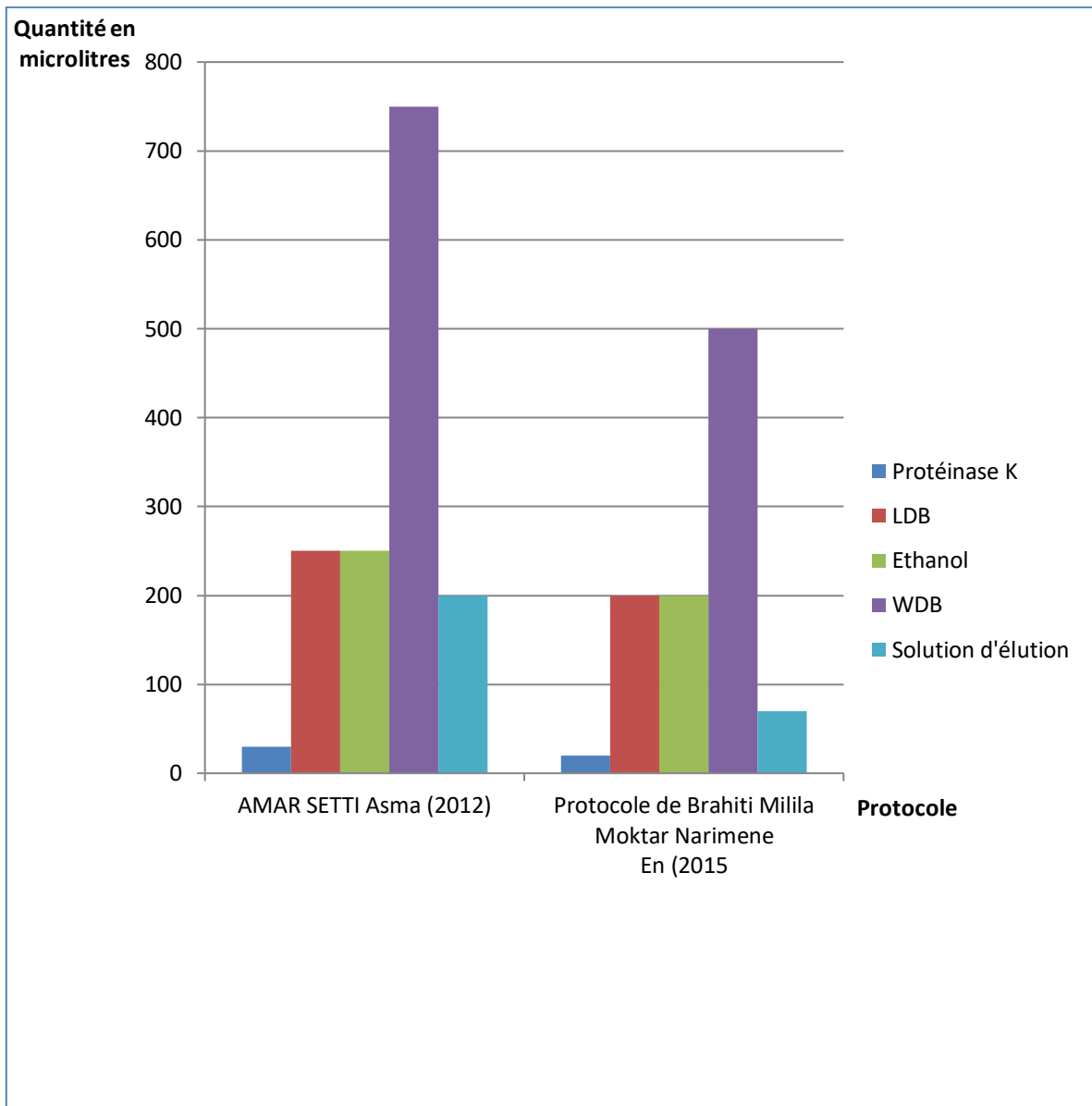


Figure 11 : Histogramme représente la quantité des réactifs et solution dans chaque protocole

D'après les quantités utilisées dans deux études (Figure 11) nous constatons que le protocole à été appliqué est celui de **Amar Setti Asma (2012)** a consommées plus de quantité de réactif que le deuxième protocole de **Milila et Moktar Narimene en (2015)**, qui prouve que le premier protocole est plus couteux. Nous avons donc voulu vérifier les résultats obtenues d'après les deux études, nous avons donc recherché les prix des réactifs pour trouver ce qui suit :

Tableau VIII: des prix et de quantités des réactifs utilisées dans les deux protocoles que nous avons traité

Produits	Prix (DA)	Protocole de Amar Setti Asma (2012)		Protocole de Milila et Moktar Narimene en (2015)	
		Quantité	Prix (DA)	Quantité	Prix (DA)
Protéinase K(1ml 1000µl)	55911,91	30	167,220	20	111,84
RNase A(100µl)	15090,58			20	3018,12
LDB (15ml)	13346,94	250	222,45	200	177,96
Ethanol (2,5L)	2800,00	250	0,7	200	0,56
WDB (15ml)	46089,22	750	2304,45	500	1536,31
Solution d'éluion (1ml 1000µl)	2300,39	200	46,08	70	161,03
Total		2740,91		5005,82	

Après notre étude, nous remarquons que le deuxième protocole est plus couteux que le premier protocole, contrairement à notre attente, car ils utilisent la RNase A, qui est estimée à 3018,12DA, Ce qui lui donne un avantage, c'est que son utilisation nous donne des résultats fiables et corrects.

Les deux études suivie les même étapes sauf qu'il ya des changements de concentration de certains réactif et la duré d'incubation et on remarqué que dans le premier protocole l'absence de RNase A qui est un rôle dans la dégradation, donc l'élimination de tous les ARN de la molécule d'ADN pour devient pure. Alors que dans ce protocole, il y a un risque à la fin d'extraction l'ADN obtenue n'est pas pure à 100% et à partir de ça nous constatons que la technique de Protocole de **Amar Setti Asma (2012)** est moins fiable.

Dans le premier protocole, le contenu est mélangé par le vortex pendant 15s par contre dans le deuxième protocole pendant 10 min, cette action permet d'accélérer l'action de lyse (**Marilia et al, 2019**).

Et des changements dans le temps d'incubation où cette étape permet d'homogénéiser et solubilisé les réactifs du milieu réactionnel et devient clair en quelque secondes ce qui augmenter l'interaction entre les différents réactifs avec les protéines, les composées phénoliques et les polysaccharides (**Ghaffari et al, 2011**).

Alors nous notons que d'après les résultats obtenue le premier protocole de **AMAR SETTI Asma en (2012)** a consommé beaucoup de protéinase.

Tableau IX : Duré de chaque protocole

Duré Protocole	Duré d'application			Totale
	Etape de lyse	Etape de lavage	Etape d'éluion	
Protocole de Amar Setti Asma (2012)	5 min et 30 s	2 min	1 min	8 min et 30 s
Protocole de Milila et Moktar Narimene en (2015)	10 min et 25 s	4 min	2 min	16 min et 25 s

D'après notre étude, nous notons que le protocole de **Amar Setti (2012)** est plus rapide que le protocole de Milila et Moktar **(2015)**.

De manière générale, après l'extraction des acides nucléiques, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés. Nous allons donc brièvement rappeler les techniques d'amplification. Celles-ci sont classiquement séparées en techniques d'amplification par répétition de cycles thermiques, par amplification isotherme ou par amplification de signal.

III.2- La PCR (Polymérase Chain Réaction)

L'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre (facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'acides nucléiques connue à partir d'une faible quantité d'acide nucléique servant de matrice. La PCR est une technologie qui a bouleversé la biologie moléculaire et s'est implantée très rapidement dans les laboratoires (**Frenkian-Torres et Toledo, 2014**). La PCR a été déclinée de différentes manières. Nous donnerons quelques exemples sans être exhaustifs :

- La PCR classique : il s'agit de la PCR telle qu'elle a été initialement décrite. Après amplification, la cible est détectée sur un gel d'agarose après addition d'un agent intercalant (cf. BET, bromure d'éthidium) et exposition aux UV (**Lamoril et al., 2007**). Dans l'article de **Noubuhisa, et al 1999** que nous avons traité est réalisé l'amplification

par PCR dans un système GeneAmp 9600. Les conditions de PCR utilisé dans cette article sont similaire que les conditions de la littérature en terme des étapes et températures. En plus la technique classique il y'a la technique de PCR en temps réel qu'est utilisé dans l'étude de **Brahiti Milila et Moktar Narimene en (2015)**. La technique de PCR SSP qui utilisé dans l'étude de **AMAR SETTI Asma en (2012)**.

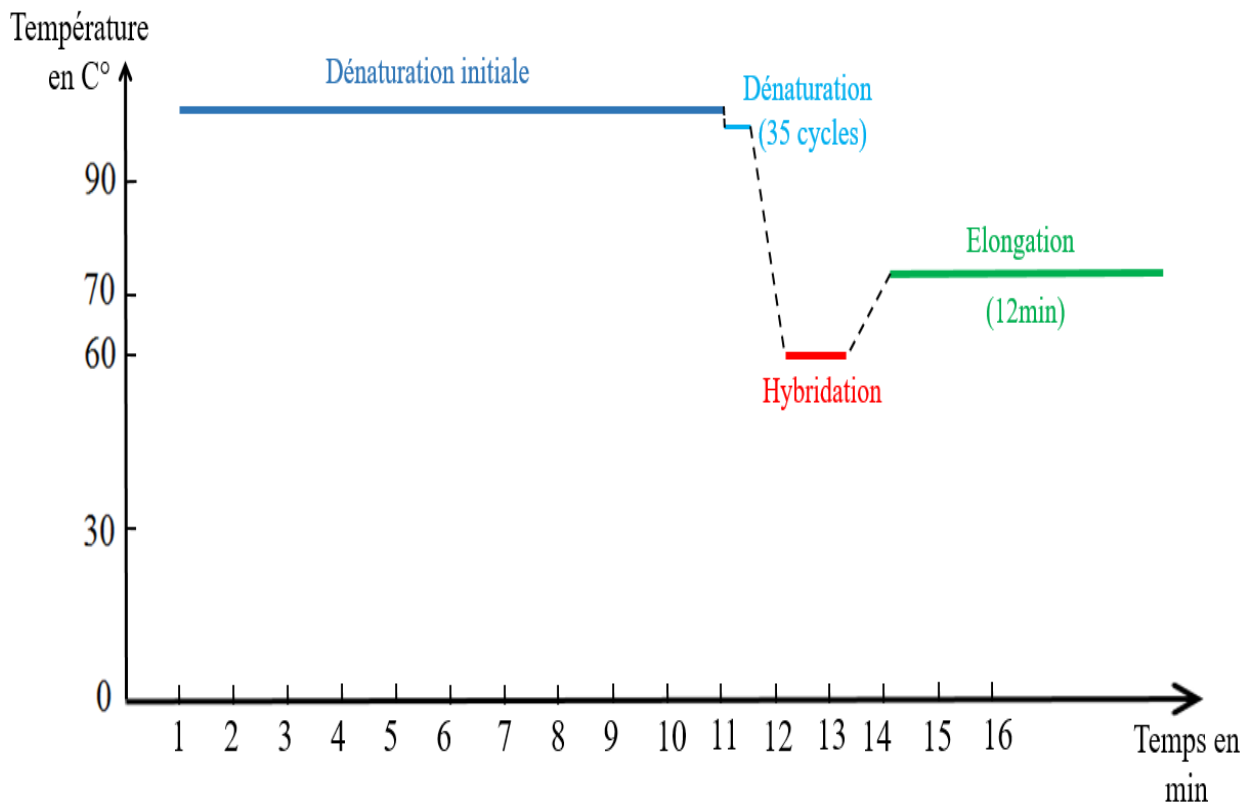


Figure 12 : Programme de PCR classique

Cette courbe représente le programme de PCR classique, où l'axe de l'intervalle représente la température et l'axe des ordres représente le temps. Nous avons suivi l'échelle suivante, où chaque centimètre dans les intervalles représente une minute et chaque 3,5 centimètre dans l'axe ordinal représente 30°C. Constitué de trois étapes définies : la première étape correspond à dénaturation initiale à 96°C pendant **10 min** et dénaturation à 95°C pendant **30 s (35 cycles)**, la seconde est l'hybridation à **61°C** pendant **1 min** et la troisième une élancement à **72°C** pendant **2 min**.

La PCR en temps réel dans la littérature c'est une technique avec l'utilisation de sonde fluorescente(Tournamille, 2013) qui est appariée avec l'étude de **Brahiti Milila et Moktar Narimene en (2015)** parce que sont utilisé la fluorescence.

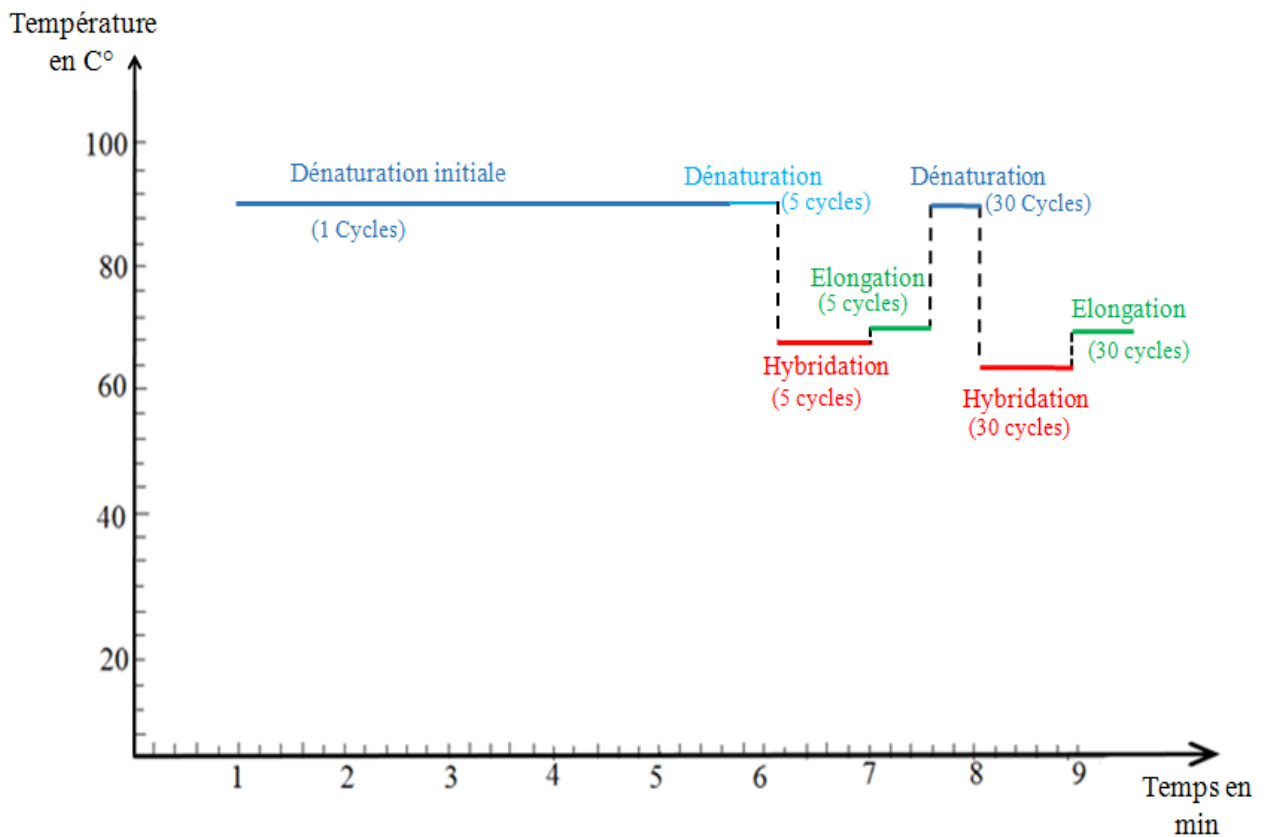


Figure 13 : Programme de PCR en temps réel

Cette courbe représente le programme de PCR en temps réel, où l'axe Y représente la température et l'axe X représente le temps. Nous avons suivi l'échelle suivante, où chaque centimètre dans les intervalles représente une minute et chaque centimètre dans l'axe ordinal représente 20°C. Les étapes de PCR sont les suivantes : dénaturation pendant **5min** en température de 95° (1 cycle) après une deuxième dénaturation pendant **25S** en température de 96° (**5 cycle**), Hybridation pendant **45s** en température de 70° (**5 cycle**) après l'étape de l'**Extension** pendant **30S** en température de 72° (**5 cycle**) et **dénaturation** pendant **25S** en température de 96° (30cycle), suivie par **Hybridation** pendant **45s** en température de 65°C de (**30 cycle**) et en dernière étape l'**Extension** pendant **30S** en température de 72° (30 cycle).

Dans la deuxième étude de **AMAR SETTI (2012)** sont utilisées la PCR SSP qui est une méthode extrêmement flexible qui peut être réalisée dans les laboratoires déposant un équipement de biologie moléculaire minimale (cycleur thermique, unité d'électrophorèse sur gel agarose, transilluminateur ultraviolet et système de documentation de l'image de gel). Et dans la littérature disons que pour réussir la PCR SSP il faut utiliser plusieurs tampons et après l'échantillon

d'ADN testé, sont visualisé après l'électrophorèse sur gel d'agarose et coloration avec de bromure d'éthidium (Dalva et Beksac, 2007) comme nous l'avons trouvé donne l'étude de AMAR SETTI (2012).

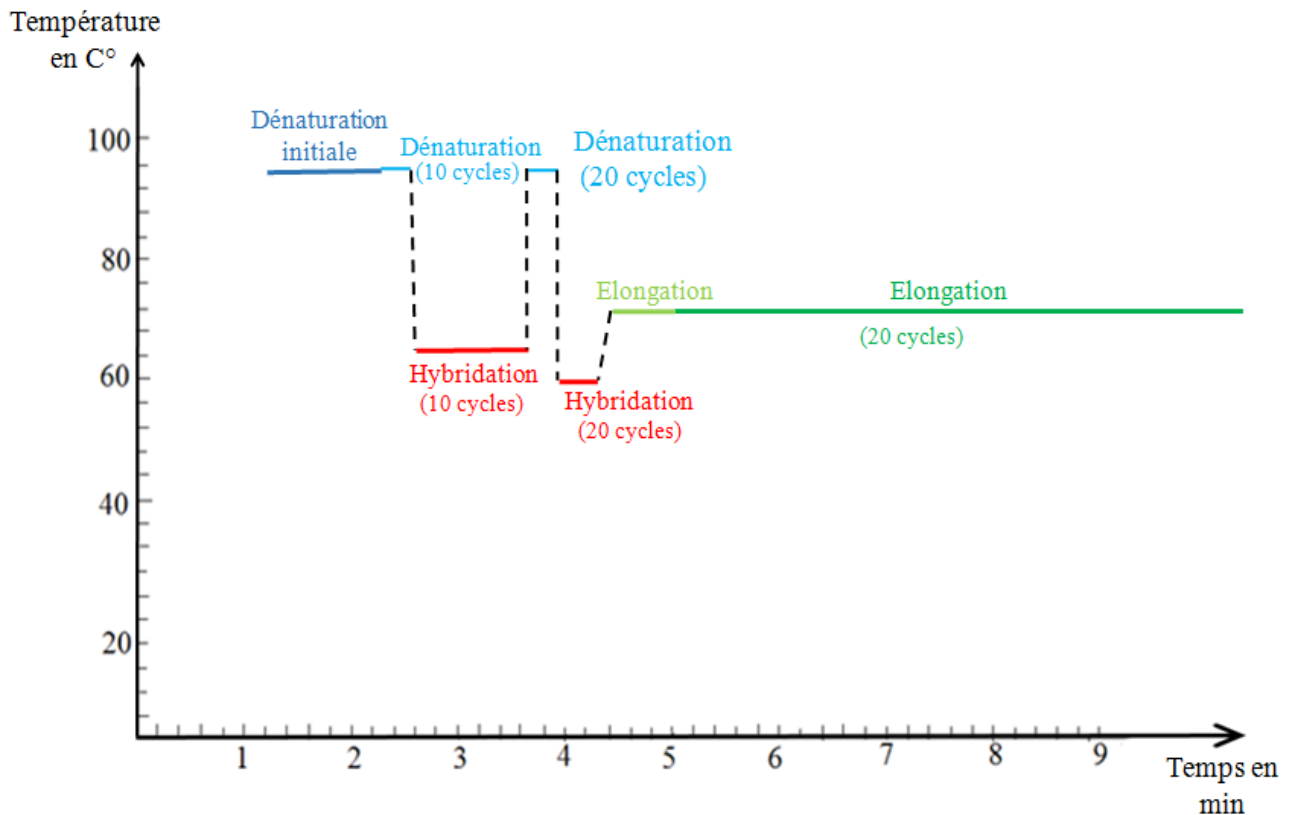


Figure 14 : Programme de PCR SSP

Cette courbe représente le programme de PCR SSP, où l'axe Y représente la température et l'axe X représente le temps. Nous avons suivi l'échelle suivante, où chaque centimètre dans les intervalles représente une minute et chaque centimètre dans l'axe ordinal représente 20°C. les étapes de PCR sont les suivantes : Dénaturation pendant **2min** en température de 96°C qui suivie avec autre dénaturation pendant **15sec** en température de 96°C (**10 cycle**) après Hybridation pendant **1min** en température de 65°C (**10cycle**), Dénaturation pendant **15s** en température de 96°C (**20 cycle**) qui suivie par l'étape de l'Hybridation pendant **50s** en température de 61°C (**20cycle**), Elongation pendant **30s** en température de 72°C (**20cycle**) et Elongation pendant **5min** en température de 72°C .

Alors d'après les trois courbes précédentes qui représentent les étapes de PCR, on remarque que dans la dénaturation ils ont utilisé la même température avec un temps différent, par contre dans l'étape d'hybridation et élongation ils ont utilisé des températures. Donc on déduire que la PCR classique prend un long temps par rapport aux autres techniques.

Tableau X : Les avantages et les inconvénients de différentes techniques de PCR

Technique	Avantages	Inconvénients
PCR classique	<ul style="list-style-type: none"> • la PCR est directement applicable sur un échantillon de terrain. • La PCR présente aussi l'avantage de rester efficace quel que soit l'état de l'échantillon (dégradé, contaminé ou prélevé après traitement aux antibiotiques) 	<ul style="list-style-type: none"> • travailler avec beaucoup de précautions pour éviter tout risque de contamination des solutions ou des échantillons avec de l'ADN exogène. • Existence d'inhibiteurs dans certains échantillons : faux Négatifs.
PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none"> • Une grande sensibilité • Détection similaire de plusieurs cibles (standard interne de quantification) 	<ul style="list-style-type: none"> • Prise d'essai importante d'environ 1ml • Appareillage spécifique
PCR SSP	<ul style="list-style-type: none"> • Technique rapide (le résultat peut être rendu le jour même) • Ne pas générer de résultats ambigus si le choix des amorces est judicieux 	<ul style="list-style-type: none"> • Elle a l'inconvénient de ne pas détecter les nouveaux allèles. • Elle n'est pas utilisée pour le type HLA à grande échelle

III.3- Typage HLA

Le typage HLA peut être réalisé par une technique sérologique de micro-lymphocytotoxicité, communément appelée LCT (Moalic, 2008a).

Dans les deux études qui nous ont traités tel que l'article de Noubuhisa, *et al* (1999) et le mémoire de Nourreddine Rayene, Kellali Nour El imene et Bennacef Rayene 2021, sont utilisées la même technique que dans la littérature (Moalic, 2008b), mais dans l'article il n'est pas donné le protocole expérimental par contre dans le mémoire sont données toutes les détails de protocole.

Le protocole expérimental qui a été réalisé par le mémoire de Nourreddine Rayene, Kellali Nour El imene et Bennacef Rayene 2021 est similaire au protocole qui a été réalisé dans la littérature, Sauf qu'il manque quelques détails dans le mémoire (comme le nom de Ficoll etc...) et d'autres dans la littérature (comme le nom de la plaque de typage etc...)

Dans la littérature, La lecture des puits de la plaque a lieu au microscope inversé. S'il y a eu reconnaissance dans un puits de la plaque, entre l'anticorps fixé au fond du puits et l'antigène HLA situé à la surface des lymphocytes du patient, le complexe antigène-anticorps formé active le complément, qui lyse ainsi les cellules. Les cellules mortes sont marquées d'une fluorescence rouge par le bromure d'éthidium. S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène de la cellule du patient et l'anticorps fixé au fond de la plaque, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange (**Moalic, 2008b**), Quant à le mémoire PFE le principe de la lecture est le même sauf les cellules lysées s'imprègnent de colorant (orange pour L'éosine).

Conclusion

Au terme de notre étude comparative, portant sur les différentes techniques de détection de la MB, nous avons fait ressortir les conclusions suivantes:

- Nous avons deux types de techniques d'extraction d'ADN : l'extraction d'ADN celui-ci utilisé par AMAR SETTI Asma (2012) et l'extraction par « KIT INVITROGENE » utilisé par Brahiti Milila et MoktarNarimene En (2015).

- Par rapport a la première technique nous constatons que peut être donné des résultats moins fiable a cause de l'absence de l'utilisations de RNase qui joue un rôle important au cours de l'extraction, donc cette technique est moins couteuse par rapport à la deuxième technique de Brahiti Milila et MoktarNarimene En (2015) qui donne des résultats fiable. Donc vous avez deux choix, si vous voulez des bonne résultats mais avec plus de temps et d'argent utilisé cette techniques et si vous voulez des résultats moins fiable en temps record et moins couteuse utilisé la technique de AMAR SETTI Asma (2012).

- Concernant la deuxième étape de détection nous avons trois choix de PCR tel que la PCR classique, nous avons remarqué que cette technique prend beaucoup de temps.

- Par rapport au deux autre technique nous avons trouvez dans la littérature qu'il ya une relation inverse entre le temps et le nombre des puits utilisées dans la technique, car plus le nombre des puits est élevé plus le temps démunie, dans les études que nous avons traité nous constatons qu'il sont utilisé 42 puits dans la technique de PCR SSP et par contre dans la PCR en temps réel ils ont utilisé 96 puits, donc cette dernière et plus rapide que la PCR SSP. Il est connu que, tant que la PCR en temps réel utilise plus de puits ; elle sera certainement plus couteuse. Donc en conclusion, si vous avez le temps utilisée la technique de PCR SSP qui est moins couteuse mais moins fiable. Si l'on veut utiliser une technique plus fiable et plus rapide mais plus couteuse utilisons alors la PCR en temps réel.

Références bibliographiques

- Akman, A., Sallakci, N., Coskun, M., Bacanli, A., Yavuzer, U., Alpsoy, E., & Yegin, O. (2006). TNF- α gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. *British Journal of Dermatology*, 155(2), 350-356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07348.x>
- ALAMI, B. (2011). *LES MANIFESTATIONS OPHTALMOLOGIQUES AU COURS DE LA MALADIE DE BEHCET (A propos de 33 cas)*. UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH.
- Amoura, Z., Guillaume, M., Caillat-Zucman, S., Wechsler, B., & Piette, J.-C. (2006a). Physiopathologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 27(11), 843-853. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2006.02.014>
- Amoura, Z., Guillaume, M., Caillat-Zucman, S., Wechsler, B., & Piette, J.-C. (2006b). Physiopathologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 27(11), 843-853. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2006.02.014>
- Asadi, S. (2020). The Role of Mutations on Genes GIMAP1, GIMAP2, GIMAP4, HLA-B27 in Behçet's Syndrome. *Journal of Genetics and Genomics*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.24966/GGS-2485/100017>
- Aslan, N., Demirci, K., Güler, T., Dörtbaşı, F., & Kale, E. (2017). The effect of vitamin D on clinical manifestations and activity of Behçet's disease. *Advances in Dermatology and Allergology*, 1, 15-20. <https://doi.org/10.5114/pdia.2016.57222>
- Azam, A. (2018). *Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H2-relaxine et de modifications non-naturelles : Perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques* [Phdthesis, Université Paris-Saclay]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02426003>

- Benitah, N. R., Sobrin, L., & Papaliadis, G. N. (2011). The Use of Biologic Agents in the Treatment of Ocular Manifestations of Behçet's Disease. *Seminars in Ophthalmology*, 26(4-5), 295-303. <https://doi.org/10.3109/08820538.2011.588665>
- Cho, S. B., Cho, S., & Bang, D. (2012). New Insights in the Clinical Understanding of Behçet's Disease. *Yonsei Medical Journal*, 53(1), 35. <https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.1.35>
- Comarmond, C., Wechsler, B., Cacoub, P., & Saadoun, D. (2014). Traitement de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.12.003>
- Dalva, K., & Beksac, M. (2007). Sequence-Specific Primed PCR (PCR-SSP) Typing of HLA Class I and Class II Alleles. In M. Beksac (Éd.), *Bone Marrow and Stem Cell Transplantation* (Vol. 134, p. 51-60). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-223-6_4
- Dalvi, S. R., Yildirim, R., & Yazici, Y. (2012). Behçet's Syndrome: *Drugs*, 72(17), 2223-2241. <https://doi.org/10.2165/11641370-000000000-00000>
- Daphné, D. (2017). *La maladie de Behçet: connaissances actuelles et prise en charge au cabinet dentaire*. Aix Marseille Université.
- Davatchi, F., Chams-Davatchi, C., Shams, H., Nadjji, A., Faezi, T., Akhlaghi, M., Sadeghi Abdollahi, B., Ashofteh, F., Ghodsi, Z., Mohtasham, N., & Shahram, F. (2016). Adult Behçet's disease in Iran : Analysis of 6075 patients. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 19(1), 95-103. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12691>
- Delilbaşı, E., Turan, B., Yücel, E., Şaşmaz, R., Işimer, A., & Sayal, A. (1991). Selenium and Behçet's disease. *Biological Trace Element Research*, 28(1), 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF02990459>
- Desbois, A.-C., Wechsler, B., Cacoub, P., & Saadoun, D. (2016). Atteintes aortiques inflammatoires associées à la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 37(4), 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.10.351>

- Emmerich, J., Mourad, J.-J., & Perdu, J. (2005). *Maladies rares des vaisseaux*. John Libbey Eurotext.
- Esalatmanesh, K., Jamshidi, A., Shahram, F., Davatchi, F., Masoud, S. A., Soleimani, Z., Salesi, M., & Ghaffarpasand, I. (2011). Study of the correlation of serum selenium level with Behcet's disease : Correlation of serum selenium level with Behcet's disease. *International Journal of Rheumatic Diseases*, *14*(4), 375-378.
<https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01649.x>
- Esatoglu, S. N., Kutlubay, Z., Ucar, D., Hatemi, I., Uygunoglu, U., Siva, A., & Gulen Hatemi, G. (2017). Behçet's syndrome : Providing integrated care. *Journal of Multidisciplinary Healthcare, Volume 10*, 309-319.
<https://doi.org/10.2147/JMDH.S93681>
- Feigenbaum, A. (1956). DESCRIPTION OF BEHÇET'S SYNDROME IN THE HIPPOCRATIC THIRD BOOK OF ENDEMIC DISEASES*. *The British Journal of Ophthalmology*, *40*(6), 355-357.
- Frenkian-Torres, A., & Toledo, M. (2014). La biologie moléculaire en diagnostic infectieux. *IRBM News*, *35*(2), 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.irbmnw.2014.02.005>
- Ghita, A. H. (2020). *CHOC HEMORRAGIQUE SUR RUPTURE SPONTANEE DU FOIE AU COURS DE LA MALADIE DE BEHÇET* [Thèse de Docteur en Médecine]. UNIVERSITE MOHAMMED V.
- Greco, A., De Virgilio, A., Ralli, M., Ciofalo, A., Mancini, P., Attanasio, G., de Vincentiis, M., & Lambiase, A. (2018). Behçet's disease : New insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. *Autoimmunity Reviews*, *17*(6), 567-575.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.12.006>
- Guichard, I., Debard, A., & Cathébras, P. (2010). La maladie de Behçet : Une vascularite fréquente aux multiples facettes. *Médecine thérapeutique*, *16*(1), 25-33.
<https://doi.org/10.1684/met.2010.0234>

- Hamza, M. (2011). La maladie de Behçet. *Hegel*, N° 3(3), 27.
<https://doi.org/10.4267/2042/44370>
- Hippocrate (0460-0377 av. J.-C.). Auteur du texte. (1815). *Epidémies d'Hippocrate, premier et troisième livre ; des crises et des jours critiques ; traduits sur le texte grec... Par M. le chevalier de Mercy*,... <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9672512r>
- Houman, M. H., & Bel Feki, N. (2014a). Physiopathologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.012>
- Houman, M. H., & Bel Feki, N. (2014b). Physiopathologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.012>
- Houman, M. H., & Bel Feki, N. (2014c). Physiopathologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.012>
- Houman, M. H., Smiti-Khanfir, M., & Hamzaoui, K. (2008a). Traitements actuels et perspectives thérapeutiques dans la maladie de Behçet. *La Presse Médicale*, 37(2), e25-e35. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.03.037>
- Houman, M. H., Smiti-Khanfir, M., & Hamzaoui, K. (2008b). Traitements actuels et perspectives thérapeutiques dans la maladie de Behçet. *La Presse Médicale*, 37(2), e25-e35. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.03.037>
- J Shetty, P. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 8(1), 39-45. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), 33-42. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>
- Karatay, S., Yildirim, K., Karakuzu, A., Kiziltunc, A., Engin, R. I., Eren, Y. B., & Aktas, A. (2011). Vitamin D status in patients with Behçet's Disease. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(5), 721-723. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000500002>

- Ksiao, I., Abroug, N., Kechida, M., Zina, S., Jelliti, B., Khochtali, S., Attia, S., & Khairallah, M. (2019a). Œil et maladie de Behçet. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 42(6), 626-641. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.09.027>
- Ksiao, I., Abroug, N., Kechida, M., Zina, S., Jelliti, B., Khochtali, S., Attia, S., & Khairallah, M. (2019b). Œil et maladie de Behçet. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 42(6), 626-641. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.09.027>
- Lamoril, J., Bogard, M., Ameziane, N., Deybach, J.-C., & Bouizegarène, P. (2007). Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 22(1), 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.11.003>
- Lamzaf, L., Harmouche, H., Alaoui-Bennesser, H., Mezalek, Z. T., adnaoui, M., & Aouni, M. (2014). Méningite récurrente révélant une maladie de Behçet : À propos de deux cas. *Pan African Medical Journal*, 19. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.14.1579>
- Lee, Y. B., Lee, J. H., Lee, S. Y., Lee, J. H., Yu, D. S., Han, K. D., & Park, Y. G. (2019). Association between smoking and Behçet's disease : A nationwide population-based study in Korea. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(11), 2114-2122. <https://doi.org/10.1111/jdv.15708>
- Loïc, G. (2014). *Médecine interne* (2e édition).
- Mahr, A., & Maldini, C. (2014a). Épidémiologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.12.005>
- Mahr, A., & Maldini, C. (2014b). Épidémiologie de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.12.005>
- MAMOUCHE, A. (2022). *Faux anévrisme de l'artère carotide révélant une maladie de behcet* [Thèse de Docteur en Médecine]. UNIVERSITE MOHAMMED V.
- Moalic, V. (2008a). Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation*, 17(4), 407-411. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.03.006>

Moalic, V. (2008b). Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation*, 17(4), 407-411.

<https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.03.006>

Noel, N., Drier, A., Wechsler, B., Piette, J.-C., De Paz, R., Dormont, D., Cacoub, P., & Saadoun, D. (2014). Manifestations neurologiques de la maladie de Behçet. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.332>

Otmani, F. (2009). Maladie de Behçet : Les nouvelles thérapeutiques. *La Revue de Médecine Interne*, 30, S243-S252. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.09.023>

Parent, D., & Vaillant, L. (2008a). Aphtes, aphtoses, maladie de Behçet. *EMC - Dermatologie*, 3(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/S0246-0319\(07\)26409-X](https://doi.org/10.1016/S0246-0319(07)26409-X)

Parent, D., & Vaillant, L. (2008b). Aphtes, aphtoses, maladie de Behçet. *EMC - Dermatologie*, 3(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/S0246-0319\(07\)26409-X](https://doi.org/10.1016/S0246-0319(07)26409-X)

Piram, M., & Koné-Paut, I. (2014). Maladie de Behçet de l'enfant. *La Revue de Médecine Interne*, 35(2), 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.013>

Pretorius, J. J., Hiesgen, J., Myburgh, M., & Suleman, F. E. (2022). Neuro-Behçet – Clinical and radiological findings in a Patient of Sub-saharan African origin. *Radiology Case Reports*, 17(3), 592-598. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2021.11.046>

Radouane, A., Oudghiri, M., Chakib, A., Bennani, S., Touitou, I., & Barat-Houari, M. (2012). SNPs in the TNF- gene promoter associated with Behçet's disease in Moroccan patients. *Rheumatology*, 51(9), 1595-1599. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes141>

Renard, E., Chiquet, C., Bouillet, L., & Romanet, J.-P. (2009). Angéite givrée révélatrice d'une maladie de Behçet. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 32(9), 664-668.

<https://doi.org/10.1016/j.jfo.2009.04.030>

Rodríguez-Carrio, J., Nucera, V., Masala, I. F., & Atzeni, F. (2021). Behçet disease : From pathogenesis to novel therapeutic options. *Pharmacological Research*, 167, 105593.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105593>

- Saadouli, D., Lahmar, A., Ben Mansour, K., El Afrit, N., Yahyaoui, S., & El Afrit, M. A. (2021). Les manifestations oculaires au cours de la maladie de Behçet. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 44(2), 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2020.04.058>
- Saadoun, D., Asli, B., Wechsler, B., Houman, H., Geri, G., Desseaux, K., Piette, J.-C., Huong, D. L. T., Amoura, Z., Salem, T. B., Cluzel, P., Koskas, F., Resche-Rigon, M., & Cacoub, P. (2012). Long-Term Outcome of Arterial Lesions in Behçet Disease : A Series of 101 Patients. *Medicine*, 91(1), 18-24. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182428126>
- Semana, G., & Quelvennec, E. (2002). Exploration du SYSTÈME HLA : Pratiques et indications. *Revue Française des Laboratoires*, 2002(341), 53-62. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(02\)80181-0](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(02)80181-0)
- Shenavandeh, S., Jahanshahi, K. A., Aflaki, E., & Tavassoli, A. (2018). Frequency of HLA-B5, HLA-B51 and HLA-B27 in patients with idiopathic uveitis and Behçet's disease : A case-control study. *Reumatologia/Rheumatology*, 56(2), 67-72. <https://doi.org/10.5114/reum.2018.75516>
- Shunmugavelu, K., & Cynthia Dhinakaran, E. (2022). A Short Overview of Behçet's Disease. In *Behçet's Disease—Recent Advances and New Perspectives [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103693>
- Streho, M., & Aouba, A. (2010). Maladie de Behçet. In *Les Uvéïtes* (p. 369-393). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-71107-7.50030-5>
- Thubert, T., Donnadiou, A.-C., Dupont-Bernabe, C., Even, M., Fior, R., Pasquali, J.-L., Frydman, R., Benachi, A., & Picone, O. (2011). Maladie de Behçet en gynécologie-obstétrique. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 40(4), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2010.06.012>
- Tournamille, C. (2013). Les technologies de biologie moléculaire en immunohématologie. *Transfusion Clinique et Biologique*, 20(2), 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2013.02.012>

- Vaillant, L., & Samimi, M. (2016). Aphthes et ulcérations buccales. *La Presse Médicale*, 45(2), 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2016.01.005>
- Yahyaoui, M., Jerradi, N., Bassit, C., Abouothman, S., Benjilali, L., Zahlane, M., & Essaadouni, L. (2019). Le neuro-Behçet parenchymateux. *La Revue de Médecine Interne*, 40, A52. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.10.045>
- Zeidan, M. J., Saadoun, D., Garrido, M., Klatzmann, D., Six, A., & Cacoub, P. (2016). Behçet's disease physiopathology : A contemporary review. *Autoimmunity Highlights*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s13317-016-0074-1>
- Zuber, J.-P., Bart, P.-A., Leimgruber, A., & Spertini. (2008). *Maladie de Behçet : D'Hippocrate aux antagonistes du TNF- α* .
- Zuber, J.-P., Leimgruber, A., . Spertini, F., & Bart. (2008). *Maladie de Behçet : D'Hippocrate aux antagonistes du TNF- α* .

Annexe

ASSOCIATION ANALYSIS BETWEEN THE MIC-A AND HLA-B ALLELES IN JAPANESE PATIENTS WITH BEHÇET'S DISEASE

NOBUHISA MIZUKI, MASAO OTA, YOSHIHIKO KATSUYAMA, KAZURO YABUKI, HITOSHI ANDO, KAORI GOTO, SATOSHI NAKAMURA, SEIAMAK BAHRAM, SHIGEAKI OHNO, and HIDETOSHI INOKO

Objective. Behçet's disease is known to be strongly associated with HLA-B51 in many different ethnic groups. Recently, by association analysis using refined microsatellite mapping, the critical region for Behçet's disease was identified as a 46-kb segment centromeric to the HLA-B gene. No expressed gene has been detected in this segment to date except the MIC-A (major histocompatibility complex class I chain-related gene A) and HLA-B genes. The present study was undertaken to analyze allelic distribution of the MIC-A gene among Japanese patients with Behçet's disease.

Methods. Ninety-five Japanese patients with Behçet's disease and 116 ethnically matched healthy controls were enrolled in this study. MIC-A genotyping was performed by direct sequencing of polymerase chain reaction products from exons 2, 3, and 4 of the MIC-A gene, using an automated DNA sequencer.

Results. The MIC-A009 allele was significantly more frequent in the patient group (69.5%) compared with the healthy controls (31.0%) (relative risk 5.06,

corrected $P = 0.0000024$). In stratification analysis on the confounding effect of MIC-A009 on HLA-B*51 association and vice versa, Behçet's disease was distinctively associated only with HLA-B*51. Further, MIC-A009 was found to be strongly associated not only with HLA-B51, but also with HLA-B52, which was not increased in the patient group to any degree.

Conclusion. These results imply that the real disease susceptibility gene involved in the development of Behçet's disease is the HLA-B*51 allele itself and that the significant increase of the MIC-A009 allele in the patient group results secondarily from a strong linkage disequilibrium with HLA-B*51.

Behçet's disease is a chronic inflammatory disorder whose symptoms include recurrent oral and genital ulcers, uveitis, vasculitis, and mucocutaneous, arthritic, and neurologic manifestations. Behçet's disease has a worldwide distribution but is found with higher prevalence in the countries along the ancient "Silk Route" from Japan to the Middle East and the Mediterranean basin. We and others have presented evidence for an HLA association with Behçet's disease, and HLA-B51 has been found to be the most strongly associated genetic marker in different ethnic groups in these countries (1).

Although the etiology and pathogenesis of Behçet's disease are still uncertain, its onset is believed to be triggered by the same external environmental factors in individuals with a particular genetic background. Most patients with Behçet's disease, especially those with severe cases, are male. The mean age at onset is the third decade, children are rarely affected, and few neonatal cases have been reported. In a recent study, an increased number of $\gamma/6$ T cells in the peripheral blood and the involved tissues, and a phenotypically distinct subset of $\gamma/6$ T cells at sites of inflammation, were reported (2-4). Furthermore, significant $\gamma/6$ T cell proliferative responses to mycobacterial 65-kd heat shock

Supported by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (nos. 07041166 and 08457466), a grant from the Ministry of Health and Welfare, Japan, and a grant from Kanagawa Academy of Science and Technology Research. Drs. Bahram and Inoko's work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Japan Society for the Promotion of Science.

Nobuhisa Mizuki, MD, Kazuro Yabuki, MD, Kaori Goto, MD: Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, and Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan; Masao Ota, PhD, Yoshihiko Katsuyama, PhD: Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan; Hitoshi Ando, PhD: Japanese Red Cross, Kanagawa Shonan Blood Center, Atsugi, Japan; Satoshi Nakamura, MD, Shigeaki Ohno, MD: Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan; Seiamak Bahram, MD, PhD: Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Strasbourg, France; Hidetoshi Inoko, PhD: Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan.

Address reprint requests to Hidetoshi Inoko, PhD, Department of Genetic Information, Division of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan.

Submitted for publication March 4, 1999; accepted in revised form May 4, 1999.

protein (HSP) peptides and their homologous peptides derived from the human 60-kd HSP were observed in Behçet's disease patients (5,6). Therefore, Behçet's disease is probably not a simple hereditary disorder, and its onset might be triggered by some exogenous antigen(s) such as bacteria, virus, or another microorganism.

A highly divergent major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related gene family, MIC, has been identified within the class I region (7). The MIC-A gene, located only 46 kb centromeric of HLA-B, is a highly polymorphic member of this family, with more than 20 alleles in terms of amino acid variation in the $\alpha 1$ (exon 2), $\alpha 2$ (exon 3), and $\alpha 3$ (exon 4) domains (8,9). MIC-A encodes a cell surface glycoprotein that is not associated with β_2 -microglobulin, lacks a CD8 binding site, and is conformationally stable independent of conventional class I peptide ligands (10). Expression of MIC-A has been detected in fibroblast and epithelial cell lines, gastrointestinal epithelium, keratinocytes, endothelial cells, and monocytes (7,10,11). Further, the MIC-A gene is regulated by promoter heat shock elements similar to those of hsp70 genes, and so the steady-state levels of MIC-A messenger RNA and protein are increased by exposure to heat shock (10). Recently, it was found that the MIC-A molecule was recognized by particular T cells expressing diverse V β 1 γ /6 T cell receptors extracted from intestinal epithelial tumors (12). Thus, it has been suggested that this molecule may play an important role as a stress-induced self antigen and may broadly regulate the protective response mediated by V β 1 γ /6 T cells in the epithelium (12). Previously, we reported a strong association of 6 GCT repetitions (MICA-A6 allele) in microsatellite polymorphism in the transmembrane (TM) region (exon 5) of the MIC-A gene (13).

We have recently investigated repeat polymorphisms of 8 microsatellites distributed over a 1,000-kb segment surrounding the MIC-A and HLA-B genes in Japanese patients with Behçet's disease. On the basis of this refined mapping by association analysis, the critical region for Behçet's disease in the human MHC could be pinpointed to a 46-kb segment between the MIC-A gene and the HLA-B gene (14). No expressed gene has thus far been detected in this critical segment except MIC-A and HLA-B. Therefore, in order to elucidate which is the real pathogenic gene related to Behçet's disease (MIC-A or HLA-B), we analyzed allelic distribution of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ domains in the MIC-A gene among Japanese patients with Behçet's disease, by the polymer-

ase chain reaction-sequencing based typing (PCR-SBT) method.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls. Ninety-five Japanese patients with Behçet's disease and 116 ethnically matched healthy controls were enrolled in this study. The patients were diagnosed at the uveitis clinic of Yokohama City University School of Medicine, according to the standard criteria proposed by the Japan Behçet's Disease Research Committee (15). Behçet's disease was classified as complete-type or incomplete-type also according to these criteria. The research methods were in compliance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Peripheral blood cells were collected after the details of this study were explained to every subject and consent to genetic screening was obtained.

HLA class I typing. Serologic HLA class I typing was performed by a standard microlymphocytotoxicity technique, using peripheral blood lymphocytes. HLA/DNA typing for the HLA-B5 group was performed in all B51-positive patients and controls by the PCR-sequence-specific primer method as described previously (16).

MIC-A gene polymorphism. Two generic primers flanking exons 2, 3, 4, and 5 of the MIC-A gene, giving a 2,073-basepair amplified fragment, were designed in introns 1 and 5 (5' primer ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG, 3' primer CTA CTG CCC AGA CAG GGG CCT TA). The 50- μ l amplification reaction mixture included 100 ng of template DNA, 10 nmoles of each dNTP, 0.5 units of AmpliTaq Gold (PE Biosystems, Foster City, CA), and 20 pmoles of each of the above primers. PCR amplification was carried out in a GeneAmp PCR system 9600 (PE Biosystems). The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 96°C for 10 minutes, followed immediately by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 61°C for 1 minute, extension at 72°C for 2 minutes, and final elongation at 72°C for 10 minutes, before cooling to 4°C. PCR product was purified using Microcon 100 (Millipore, MA). PCR product (100 ng in 1 μ l) was subjected to nucleotide sequence determination using the ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit and an automated ABI377 DNA Sequencer (PE Biosystems). Sequence primers were as follows: exon 2, forward primer ATT TCC TGC CCC AGG AAG GTT GG, reverse primer GTG CCG GCT CAC CTC CCC TGC T; exon 3, forward primer GTG AGG AAT GGG GGT CAG TGG AA, reverse primer CAA CTC TAG CAG AAT TGG AGG GAG; and exon 4, forward primer AAG AGA AAC AGC CCT GTT CCT CTC C, reverse primer TCC CTG CTG TCC CTA CCC TG.

Sequencing data analysis. The raw sequence data were assembled with ABI Factura software (PE Biosystems) and analyzed using the ABI sequence analysis program. In order to detect and edit heterozygous positions, these preliminary data from each exon were assembled and reanalyzed using the ABI Sequence Navigator program (PE Biosystems). Then, to define MIC-A alleles, the final data from homozygous and heterozygous samples were subjected to our local genotyping software, in which all 20 MIC-A alleles were enrolled with their nucleotide sequences to be compared with tested samples.

Table 1. Phenotype frequencies of MIC-A and HLA-B51 alleles among Japanese Behçet's disease patients and controls*

	Controls (n = 116)	Behçet's disease patients				No ocular manifestations (n = 18)
		All patients (n = 95)	Complete Behçet's disease (n = 41)	Incomplete Behçet's disease (n = 54)	Ocular manifestations (n = 77)	
MIC-A allele						
MIC-A002	26 (22.4)	21 (22.1)	11 (26.8)	10 (18.5)	19 (24.7)	2 (11.1)
MIC-A004	24 (20.7)	3 (3.2)	1 (2.4)	2 (3.7)	2 (2.6)	1 (5.5)
		(RR 0.13, $P_{\text{corr}} = 0.00068$)	(RR 0.096, $P_{\text{corr}} = 0.026$)	(RR 0.14, $P_{\text{corr}} = 0.018$)	(RR 0.10, $P_{\text{corr}} = 0.0012$)	
MIC-A007	5 (4.3)	2 (2.1)	0 (0.0)	2 (3.7)	2 (2.6)	0 (0.0)
MIC-A008	60 (51.7)	27 (28.4)	11 (26.8)	16 (29.6)	24 (31.2)	3 (16.7)
		(RR 0.37, $P_{\text{corr}} = 0.0056$)	(RR 0.34, $P_{\text{corr}} = 0.053$)	(RR 0.39, $P_{\text{corr}} = 0.063$)	(RR 0.42, $P_{\text{corr}} = 0.045$)	(RR 0.19, $P_{\text{corr}} = 0.042$)
MIC-A009	36 (31.0)	66 (69.5)	27 (65.9)	39 (72.2)	53 (68.8)	13 (72.2)
		(RR 5.06, $P_{\text{corr}} = 0.00000024$)	(RR 4.29, $P_{\text{corr}} = 0.00083$)	(RR 5.78, $P_{\text{corr}} = 0.0000043$)	(RR 4.91, $P_{\text{corr}} = 0.0000023$)	(RR 5.78, $P_{\text{corr}} = 0.0067$)
MIC-A010	20 (17.2)	18 (18.9)	11 (26.8)	7 (13.0)	15 (19.5)	3 (16.7)
MIC-A012	34 (29.3)	17 (17.8)	8 (19.5)	9 (16.7)	10 (13.0)	7 (38.9)
MIC-A018	0 (0.0)	1 (1.1)	1 (2.4)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)
MIC-A019	11 (9.5)	9 (9.5)	1 (2.4)	8 (14.8)	8 (10.4)	1 (1.1)
HLA-B51	16 (13.8)	56 (58.9)	25 (61.0)	31 (57.4)	47 (61.0)	9 (50.0)
		(RR 9.0, $P_{\text{corr}} = 0.0000000015$)	(RR 9.77, $P_{\text{corr}} = 0.000000088$)	(RR 8.42, $P_{\text{corr}} = 0.00000016$)	(RR 9.79, $P_{\text{corr}} = 0.0000000018$)	(RR 6.25, $P_{\text{corr}} = 0.0060$)

* Values are the number (%). RR = relative risk.

Table 2. Association of HLA-B*5101 with Behçet's disease after stratification for the effect of MIC-A009*

HLA-B*5101	MIC-A009 negativity		MIC-A009 positivity		Weighted OR	χ^2	<i>P</i>	95% CI
	Controls	Patients	Controls	Patients				
Present, no.	0	0	16	56	7.00	16.26	0.000055	2.73–17.93
Absent, no.	80	29	20	10				

* OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval.

Statistical analysis. The significance of the differences in distribution of alleles between Behçet's disease patients and normal controls were estimated by the chi-square method with continuity correction and Fisher's exact probability test. *P* values were corrected by multiplication by the number of MIC-A alleles. To control for the effect of linkage disequilibrium between MIC-A and HLA-B, the Mantel-Haenszel weighted odds ratio (OR) was calculated.

RESULTS

The phenotype frequencies of the MIC-A alleles are shown in Table 1. Among 20 MIC-A alleles, 9 different alleles were found to be present in the control subjects and Behçet's disease patients. Of 95 Behçet's disease patients, 66 were homozygous or heterozygous for the MIC-A009 allele (69.5%), while 36 of 116 healthy controls had the MIC-A009 allele (31.0%). Thus, the MIC-A009 allele was found to be strongly associated with Behçet's disease in a Japanese population (relative risk [RR] 5.06, $P_{\text{corr}} = 0.00000024$). In contrast, the phenotype frequencies of MIC-A004 and MIC-A008 were significantly decreased in the patient group (MIC-A004 RR 0.13, $P_{\text{corr}} = 0.00068$; MIC-A008 RR 0.37, $P_{\text{corr}} = 0.0056$). This strong association of MIC-A009 was observed for both the complete and incomplete types of Behçet's disease, and also for Behçet's disease with and without ocular manifestations. No specific association was found between the MIC-A009 allele and any of several disease features tested, including uveitis and erythema nodosum (data not shown).

Fifty-six of the 95 Behçet's disease patients (58.9%) were HLA-B51 positive (55 with B*5101 and the remaining 1 with B*5102), as compared with 16 of the 116 controls (13.8%) (all of them with B*5101) (RR 9.0, $\chi^2 = 47.37$, $P_{\text{corr}} = 0.0000000015$) (Table 1). Therefore, in order to elucidate which allele, MIC-A009 or HLA-B*51, is the pathogenic gene related to Behçet's disease, the association of MIC-A009 with Behçet's disease after stratification of the patients for the possible confounding effect of HLA-B51 was estimated by calculation of the Mantel-Haenszel weighted

odds ratio. No association with the disease was observed for the MIC-A009 allele (data not shown). In contrast, when an association of HLA-B51, after stratification of Behçet's disease patients for the possible confounding effect of MIC-A009, was estimated, a distinctively significant association of B51 with the disease was still observed (weighted OR 7.0, $\chi^2 = 16.26$, $P = 0.000055$, 95% confidence interval 2.73–17.93) (Table 2).

Association of the MIC-A009 allele with serologically defined HLA-B antigens was then analyzed in the patient and control groups. All of the B51-positive patients (56 of 56) and B51-positive healthy controls (16 of 16) possessed MIC-A009, demonstrating a strong linkage disequilibrium between MIC-A009 and HLA-B51. Furthermore, all of the B52-positive patients (12 of 12) and B52-positive healthy controls (20 of 20) also possessed MIC-A009, showing a strong linkage disequilibrium of MIC-A009 with HLA-B52. Conversely, of 83 MIC-A009-bearing chromosomes in the Behçet's disease patients, 64 were associated with B51 (77.1%) and 12 with B52 (14.5%) (the remaining 7 were associated with other HLA-B antigens) (Table 3). On the other hand, of 37 MIC-A009-bearing chromosomes in the control group, only 16 were associated with B51 (43.2%), but as many as 20 with B52 (54.1%) (the remaining 1 was associated with another HLA-B antigen) (Table 3). Thus, the MIC-A009/HLA-B51 haplotype was significantly increased ($\chi^2 = 13.21$, OR 4.42, *P*

Table 3. Association of MIC-A009 with HLA-B antigens in Japanese Behçet's disease patients and controls*

	B51/MIC-A009	B52/MIC-A009	Other HLA-B/ MIC-A009
Controls	16/37 (43.2)	20/37 (54.1)	1/37 (2.7)
Patients	64/83 (77.1)	12/83 (14.5)	7/83 (8.4)
<i>P</i>	0.00028	0.0000059	0.25
χ^2	13.21	20.52	1.32
RR	4.42	0.14	3.32

* Values are the number (%) of chromosomes bearing the respective MIC-A alleles or HLA-B antigens. RR = relative risk.

= 0.00028), whereas the MIC-A009–HLA–B52 haplotype was significantly decreased ($\chi^2 = 20.52$, OR 0.14, $P = 0.0000059$), in the patient group as compared with the control group.

DISCUSSION

In this study, in order to clarify which is the real pathogenic gene related to Behçet's disease, HLA–B or MIC–A, we performed MIC–A genotyping by the PCR–SBT method. We found that the allelic distribution of the MIC–A gene in Behçet's disease patients was significantly different from that in healthy controls, and the frequency of the MIC–A009 allele was greatly increased in Behçet's disease patients regardless of disease features or severity (Table 1). In a recent study of Canadian patients, we have demonstrated a strong association of MIC–A007, as opposed to MIC–A009, with both acute anterior uveitis and ankylosing spondylitis, 2 diseases that have ocular manifestations similar to those of Behçet's disease (Mizuki N et al: unpublished observations). This indicates that the strong association of MIC–A009 found in Behçet's disease is not generally observed in inflammatory diseases with uveitis.

However, it is not certain whether these results simply reflect a linkage disequilibrium with HLA–B51 or whether the MIC–A009 allele itself is the pathogenic gene involved in the development of Behçet's disease. The MIC–A gene is located very close to the HLA–B gene, and there is a strong linkage disequilibrium between the MIC–A and HLA–B loci (13). In fact, stratification analysis of the MIC–A009–positive Behçet's disease patients for the possible confounding effect of HLA–B51 and vice versa (Table 2) clearly suggested that the significant increase of MIC–A009 in the patient group could be explained by linkage disequilibrium with HLA–B51 and that HLA–B51 is a primary susceptibility locus for Behçet's disease. This notion was strengthened by findings in the haplotype analysis between MIC–A and HLA–B (Table 3), i.e., the HLA–B antigens associated with MIC–A009 differed significantly between the Behçet's disease and control groups. If the MIC–A009 allele is the pathogenic gene for Behçet's disease, the frequencies of both the HLA–B52 and HLA–B51 alleles in linkage disequilibrium with MIC–A009 should be higher in the patient group along with the increase of this MIC–A allele. However, only HLA–B51 was in fact greatly increased in frequency, whereas HLA–B52 was not increased in the patient group. These findings also suggest that a significant increase in frequency of the MIC–A009 allele in the Behçet's disease patient group is

merely due to strong linkage disequilibrium with HLA–B51.

Previously, we suggested the possibility of a primary association of MIC–A with Behçet's disease, based on its chromosomal localization, its predicted immunologic function, and a strong association of a certain MICA–TM allele, MICA–A6, with Behçet's disease (13). However, in more extensive analyses on genetic polymorphism in the extracellular domains of MIC–A and also on confounding effects and linkage between the MIC–A and HLA–B genes, the MIC–A gene (MIC–A009 allele) was found not to be directly involved in the pathogenesis of Behçet's disease. The possibility that the MIC–A009 allele is an additional risk factor or further amplifies risk for developing Behçet's disease cannot, however, be excluded at present.

In conclusion, we have performed MIC–A genotyping on 95 Japanese patients with Behçet's disease and showed a strong association of MIC–A009 with Behçet's disease. However, stratification and linkage analyses between MIC–A009 and HLA–B51 clearly indicated that the real pathogenic gene for Behçet's disease is the HLA–B gene itself and that the HLA–B*51 allele is the major susceptibility gene responsible for the development of Behçet's disease. Finally, there is a distinct possibility that the mini-haplotype formed by MIC–A009/HLA–B*51 contributes as a whole to the pathogenesis of Behçet's disease.

REFERENCES

- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA–Bw51 with Behçet's disease. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1455–8.
- Suzuki Y, Hoshi K, Matsuda T, Mizushima Y. Increased peripheral blood $\gamma 6+$ T cells and natural killer cells in Behçet's disease. *J Rheumatol* 1992;19:588–92.
- Hamzaoui K, Hamzaoui A, Hentati F, Kahan A, Ayed K, Chabbou A, et al. Phenotype and functional profile of T cells expressing $\gamma 6$ receptor from patients with active Behçet's disease. *J Rheumatol* 1994;21:2301–6.
- Esin S, Gul A, Hodara V, Jeddi–Tehrani M, Dilsen N, Konice M, et al. Peripheral blood T cell expansions in patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 1997;107:520–7.
- Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y, et al. Role of $\gamma 6$ T cells in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1996;347:789–94.
- Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, Nagafuchi H, Nakajima T, Wakisaka S, et al. Characterization of T cells specific for an epitope of human 60–kD heat shock protein (hsp) in patients with Behçet's disease (BD) in Japan. *Clin Exp Immunol* 1997;108:204–12.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6259–63.
- Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N,

- et al. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44:351-7.
9. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics*. In press.
 10. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress regulated human MHC class I gene expressed in gastrointestinal epitheliums. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12445-50.
 11. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998;47:139-48.
 12. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1998;279:1737-40.
 13. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1298-303.
 14. Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Takashi S, Oka A, et al. The critical region for Behçet's disease in the human MHC is reduced to a 46 kb segment centromeric of HLA-B by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am J Hum Genet* 1999;64:1406-10.
 15. Mizushima Y. Recent research into Behçet's disease in Japan. *Int J Tissue React* 1998;10:59-65.
 16. Mizuki N, Ohno S, Ando H, Palimeris GD, Stavropoulos-Gikas C, Ishihara M, et al. A strong association of HLA-B*5101 with Behçet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens* 1997;50:57-60.