



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf

Faculté des Science

MÉMOIRE

En vue de l'obtention du

Diplôme de Magistère

Présenté et Soutenu par :
M^{me} BOURAS Noria épouse AZZOUG

Intitulé
***Etude d'association entre le polymorphisme
du gène MICA (met 129 val) et la
spondylarthrite ankylosante dans un
échantillon de la population de l'Ouest
Algérien.***

Département : *Génétique moléculaire appliquée*
Spécialité : *Biologie Moléculaire et Génétique*

Le jury est composé de :

Présidente: BENHAMAMOUCH Soraya	Professeur	Université d'Oran ES SENIA
Examineur: SAHRAOUI Toufik	Maitre de conférences	Université d'Oran ES SENIA
Examineur: BENZAOU Ahmed	Professeur au service Rhumatologie	C.H.U ORAN
Rapporteur : BOUDJEMA Abdellah	Maitre de conférences	UST d'Oran

2009/2010



Chapitre I

I.1 Introduction : 1

Chapitre II

II. Aspect clinique :..... 3

II.1 Définition de la maladie: 3

II.2 Manifestation clinique et évolution de la maladie :..... 3

II.3 Epidémiologie :..... 5

 1°) Sexe..... 5

 2°) Age 5

 3°) fréquence 6

II.4 Etiologie :..... 6

 A/ Facteurs génétiques 6

 B/ Facteurs environnementaux :..... 6

II.5 Diagnostic :..... 7

 Examen clinique 7

 Examen Biologique 8

 Imagerie 8

 Autres examens 8

II.6 Traitement 10

Chapitre III

III. Aspect immunogénétique : 12

III.1 Immunogénétique du système HLA : 12

 III.1.1 Système HLA classe I : 12

 HLA classe I classiques 12

 HLA de classe I dits non classiques 13

 Molécules et gènes apparentés aux molécules HLA 14

 de classe I

 III.1.2 HLA classe II 18

 III.1.3 Les gènes de classe III : 19

III.2 Génétique de la Spondylarthrite Ankylosante :	19
III.2.1 Association HLA-B27 avec SA :	19
III.2.2 Association MIC A maladies:	21
Association MICA et Spondylarthrite ankylosante.....	21
Association MICA et maladie de BEHCET	21
Association MICA fièvre méditerranéenne familiale (FMF).....	22
Association MICA et maladie de Crohn	22
Association MICA et maladie cœliaque	23
Association MIC A et diabète	23
Association MICA et psoriasis	23
Association MICA et Lupus Erythémateux Disséminé (LED)..	24
Association MICA et PR	24
Association MIC A et tumeurs	24
III.2.3 Association autres gènes avec SA :	26
HLA-DRB1	26
HLA-DQ et HLA-DP.....	26
Le gène de l'IL-1	26
ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1)	27
IL-23 et IL-17	27
TNF α (Tumor Necrosis Factor)	28
CARD15.....	28
Bât du travail :	30

Chapitre IV

IV. Matériels et Méthodes :	31
IV. 1 Population d'étude	31
IV. 2 Méthode	31

Extraction et dosage de l'ADN :	31
Amplification par PCR Nichée/RFLP	33
Test de contrôle d'amplification et test de digestion :	35
Digestion par l'enzyme de restriction RsaI	36
Protocole de digestion :	37
IV.3 Tests statistiques	37
Le test du χ^2 :	37
Odds Ratio(OR) et Risque Relatif (RR) :	38
Déséquilibre de liaison :	39

Chapitre V

V. Résultats et discussions :	40
V.1 Résultats des tests d'amplification :	40
Résultats de la première PCR :	40
Résultats de la seconde PCR :	40
V.2 Résultats du test de digestion par l'enzyme RsaI :	41
V.3 Analyse des résultats :	42
Distribution des allèles MICA 129 met/val en fonction de HLAB-27	46
Distribution du polymorphisme en fonction de l'âge chez les cas	48
Conclusion :	50
Références bibliographique	52

Glossaire

AA : Acide aminé	val : Valine
AC : Anticorps	LTC : Lymphocyte T cytotoxique
ADN : Acide désoxyribonucléique	CRP : C-réactive Protéine
Ag : Antigène	VS : Vitesse de sédimentation
AR : Arthrite réactionnelle	IGG : Immunoglobuline gamma
ARN : Acide ribonucléique	IGA : Immunoglobuline alpha
BET : Bromure d'éthidium	IRM : Imagerie à résonance magnétique
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien
CD : Classe de différenciation	HSP : heat shock protein
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	CMV : cytomégalo virus
dNTP : 2' desoxynucleotide 5'-triphosphate	Bf : Properdine facteur B
EDTA : Acide éthylène diaminé tétracéptique	FMF : Fièvre méditerranéenne familiale
HLA : Human leucocyte antigène	LED : Lupus érythémateux disséminé
Ig : Immunoglobine	CHU : Centre hôpitalo- universitaire
IL : Interleukine	TRIS : trishydroxyméthylamino méthane
IFN : Interféron	SLB : Solution de lyse des lymphocytes B
Kb : Kilo base	PH : potentiel hydrogène
LB : Lymphocyte B	TBU : Tris, Borate, EDTA
LT : Lymphocyte T	BSA : Bovin Serum Albumin
µg : Microgramme	
µl : Microlitre	
MAI : Maladie auto-immune	
MIC : MHC class I chain-related	
ml : millilitre	
mM : milli-molaire	
mn : Minutes	
MT : Marqueur de taille	
NK : Natural killer	
NKG2D : Natural killer 2D	
OR : Odds ratio	
PCR : Polymerisation chain reaction	
pb Paire de base	
PR : Polyarthrite rhumatoïde	
RFLP : Reaction fragmen lenght polyamorphism	
RR : Risque relatif	
SA : Spondylarthrite ankylosante	
SNP : Single nucleotid polymorphism	
SpA : spondylarthropathies	
Taq : Thermus aquaticus	
TBE : Tris/Borate/EDTA	
TCR : T cell receptor	
Tm : Temperature melting	
TNF : Tumor necrosis factor	
U : Unité	
UV : Ultra violet	
Vlt : Volt	
Vs : Versus	
DAP-10 : adapter proteins	
met : Méthionine	

Liste des Figures

- Figure 1 : Les localisations prédominantes de la spondylarthrite ankylosante
- Figure 2 : Concept des spondylarthrites
- Figure 3 : Carte simplifiée des gènes du système HLA
- Figure 4 : Molécule HLA classe I et classe II
- Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation des gènes HLA classe I
- Figure 6 : Organisation des exons et introns du gène MICA et correspondance entre exons et domaine de la protéine MICA
- Figure 7 : Structure de la molécule MICA
- Figure 8 : Structure des molécules MICA et NKG2D
- Figure 9 : Interaction entre NK et cellule cible
- Figure 10 : Régulation de l'activation des cellules NK
- Figure 11 : Gènes appartenant à HLA classe II
- Figure 12 A et 12 B : Mimétisme moléculaire
- Figure 13 : Protocole de la PCR nichée
- Figure 14 : Séquence nucléotidique du gène MICA
- Figure 15 : Les polymorphismes existant dans les exons du gène MICA
- Figure 16 : Résultat du test de la première amplification des échantillons étudiés par PCR nichée
- Figure 17 : Résultat du test de la deuxième amplification des échantillons étudiés par PCR nichée
- Figure 18 : Résultat des trois profils du test de digestion par l'enzyme RsaI
-

Liste des tableaux

Tableau 1 : Conditions de l'amplification du grand et petit fragment

Tableau 2 : Programme de l'amplification du gène MICA

Tableau 3 : Correspondance entre les fragments de restriction obtenus et les génotypes MICA 129

Tableau 4 : Répartition du polymorphisme 129 met/val entre cas et témoins de l'Ouest Algérien

Tableau 5 : Distribution de l'allèle MICA en fonction su statut HLA-B27

Tableau 6 : La distribution du génotype MICA-129 selon deux tranches d'âge

Résumé

La Spondylarthrite Ankylosante (SA) est un rhumatisme inflammatoire chronique caractérisé par une localisation prédominante axiale (colonne vertébrale), suivie par des atteintes articulaires et des enthèse.

La SA peut être associée à d'autres affections telles que l'arthrite réactionnelle, rhumatisme psoriasique, inflammation chronique de l'intestin et manifestation pulmonaire. On parle dans ce cas de Spondylarthropaties (SPA).

L'étiologie de la SA n'est pas bien connue, cependant, des facteurs génétiques ainsi que des facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle très important à la survenue de la maladie.

Bien que plusieurs gènes semblent être associés à la SA, le concept de terrain génétique reposait en grande partie sur l'association avec la spécificité HLA-B27.

Récemment, le gène MICA a suscité l'intérêt de plusieurs études d'associations MICA et maladies autoimmunes (MAI), en particulier, l'association MICA et SA.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés au polymorphisme existant au niveau de l'exon 3 et qui code pour le domaine $\alpha 2$ de la protéine MICA. Ce polymorphisme possède à la position 129 soit l'allèle méthionine (met), soit l'allèle valine (val).

Les protéines MICA avec résidu méthionine, à la position 129, réagissent fortement avec ses récepteurs NKG2D trouvés à la surface des NK et des LT, augmentant ainsi le seuil de cytotoxicité. En revanche, les protéines MICA qui possèdent un résidu valine à la même position, ont une faible affinité avec les NKG2D. Ceci affaiblit le seuil de cytotoxicité.

Le but de notre travail, est de chercher des associations entre le polymorphisme MICA met129val et la SA dans un échantillon de 90 cas souffrant de la SA et 78 témoins, au sein de la population de l'Ouest Algérien. Ensuite, nous avons testé l'effet de ce polymorphisme par rapport au statut HLA-B27. Et enfin, nous avons cherché une éventuelle association entre le génotype MICA-129 et la survenue précoce de la SA.

Les résultats ont montré que l'allèle MICA-129met est fortement associé à la SA chez les malades par rapport aux témoins puisqu'il est retrouvé à une fréquence allélique de 0,54 vs 0,30 ($p=11.10^{-6}$). En revanche, l'allèle MICA-129val est fortement retrouvé chez les témoins que chez les cas, avec une fréquence 0,70 vs 0,46 ($p=11.10^{-4}$).

Cependant, Le polymorphisme MICA met129val n'a montré aucun effet, ni synergique, ni indépendant, sur la distribution de la spécificité HLA-B27 que ce soit chez les cas ou les malades. Il est intéressant dans ce cas d'étudier d'autres associations entre ce polymorphisme et autres gènes ou allèles déjà associés à la SA.

Dans notre travail, nous n'avons pas pu déterminer l'effet des génotypes MICA-129 sur la survenue précoce de la maladie, contrairement à ce qui a été rapporté par une autre étude similaire sur une population Algéroise.

I.1 Introduction

La Spondylarthrite Ankylosante (SA) ou pelvispondylite rhumatismale est le deuxième rhumatisme inflammatoire chronique après la polyarthrite rhumatoïde. La SA touche essentiellement la colonne vertébrale (rachis cervical, rachis dorsal et rachis lombaire) ainsi que les articulations périphériques.

La Spondylarthrite Ankylosante est une maladie inflammatoire systémique d'origine multifactorielle, à la fois polygénique et environnementale.

Le principal facteur de prédisposition génétique est localisé dans la région HLA. La maladie est, en effet, significativement associée à l'antigène HLA-B27 dans différents groupes ethniques.

Les gènes MIC, gènes appartenant au CMH et voisins du locus HLA-B code pour des protéines MICA et MICB, à distribution restreinte. A la différence des molécules de classe I, dont l'expression est ubiquitaire, les molécules MIC sont exprimées préférentiellement sur des lignées de cellules épithéliales et fibroblastiques (*Bahram S., 2000*), sur des lignées de cellules tumorales d'origine épithéliale ainsi que sur certaines tumeurs fraîchement isolées (*Groh V et al., 1999*). Son expression normale est restreinte à l'épithélium gastro-intestinal et sur l'épithélium thymique cortical (*Groh V., 1996*).

Les molécules MIC n'ont pas un rôle connu dans la présentation antigénique mais semblent augmenter la réponse immune et ce à travers un complexe déclencheur entre ses récepteurs DAP-10 et leurs ligands NKG2D exprimés sur les lymphocytes NK (Natural Killer) et certaines populations activées de lymphocytes T alpha/beta (LT qui possèdent un TCR composé de deux glycoprotéines α et β) et les LT gamma/delta (des LT avec un TCR composé de glycoprotéines γ et δ). Ces LT sont moins abondants que les LT $\alpha\beta$ puisqu'ils sont retrouvés à 5% du total des LT et plus précisément dans la muqueuse intestinale) (*Wu et al., 1999 ; Das H et al., 2001*).

À l'état normal, l'expression de MICA est faible à la surface de la cellule épithéliale et ne suffit pas à aboutir à l'activation des NK et des lymphocytes T. En cas de stress cellulaire (infection, tumeur, choc thermique), l'augmentation d'expression de MICA délivre un signal de costimulation permettant l'activation des NK et des LT. Les lymphocytes T effecteurs sont activés par la reconnaissance antigénique (interaction CMH/peptide antigénique/TCR), et co-stimulés par l'interaction entre récepteur NKG2D et molécules MICA. Cette conjonction d'évènements conduit à la prolifération des cellules T spécifiques, ainsi qu'à l'activation des fonctions cytotoxiques et de production de cytokines. Les molécules MICA et MICB, décrites par l'équipe de T. Spies en 1994, (Spies *et al.*, 1994) ne partagent avec les molécules HLA de classe I classiques qu'environ 30 % d'homologies de séquence protéique dans leur partie extracellulaire (Bahram S. ,2000). A ce jour, il n'existe aucune différence fonctionnelle connue entre MICA et MICB.

On dénombre à ce jour 68 allèles MICA (MICA*001 à MICA*068), dont 57 codent pour des glycoprotéines distinctes, et 30 allèles MICB (MICB*001 à MICB*030) dont 19 codent pour des glycoprotéines MICB (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. mise à jour 9-10-2009).

Un polymorphisme des molécules MICA a récemment été décrit et qui concerne un dimorphisme en position 129 du domaine alpha2. Les protéines possédant l'acide aminé méthionine (met) à la position 129, ont une forte affinité de liaison à NKG2D, alors que les protéines avec un acide aminé valine (val) à la même position, ont une faible affinité. Ceci affecte le seuil d'activation des cellules NK et la modulation des cellules T (Steinle A *et al.*, 2001).

Ayant pris ces données comme base, nous supposons que ce polymorphisme difonctionnel pourrait influencer le cours du développement de la SA. Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier l'implication du polymorphisme MICA met 129 val dans la survenue de la SA dans un échantillon de la population de l'Ouest Algérien.

II. Aspect clinique

II.1 Définition de la maladie:

Spondylarthrite vient du grec spondylos (spondyl) qui veut dire vertèbre et de « arthrite ». Ankylosante vient de Ankylose, qui signifie « se solidifie, se consolide ». La Spondylarthrite Ankylosante ou pelvispondylite rhumatismale est un rhumatisme inflammatoire chronique caractérisé par une localisation prédominante à la colonne vertébrale (rachis cervical, rachis dorsal, rachis lombaire), ainsi qu'aux articulations périphériques et les articulations sacro-iliaques (articulations du bassin) (**figure 1**).

II. 2 Manifestations cliniques et évolution de la maladie :

La spondylarthrite ankylosante se manifeste par un ensemble de signes cliniques tels que :

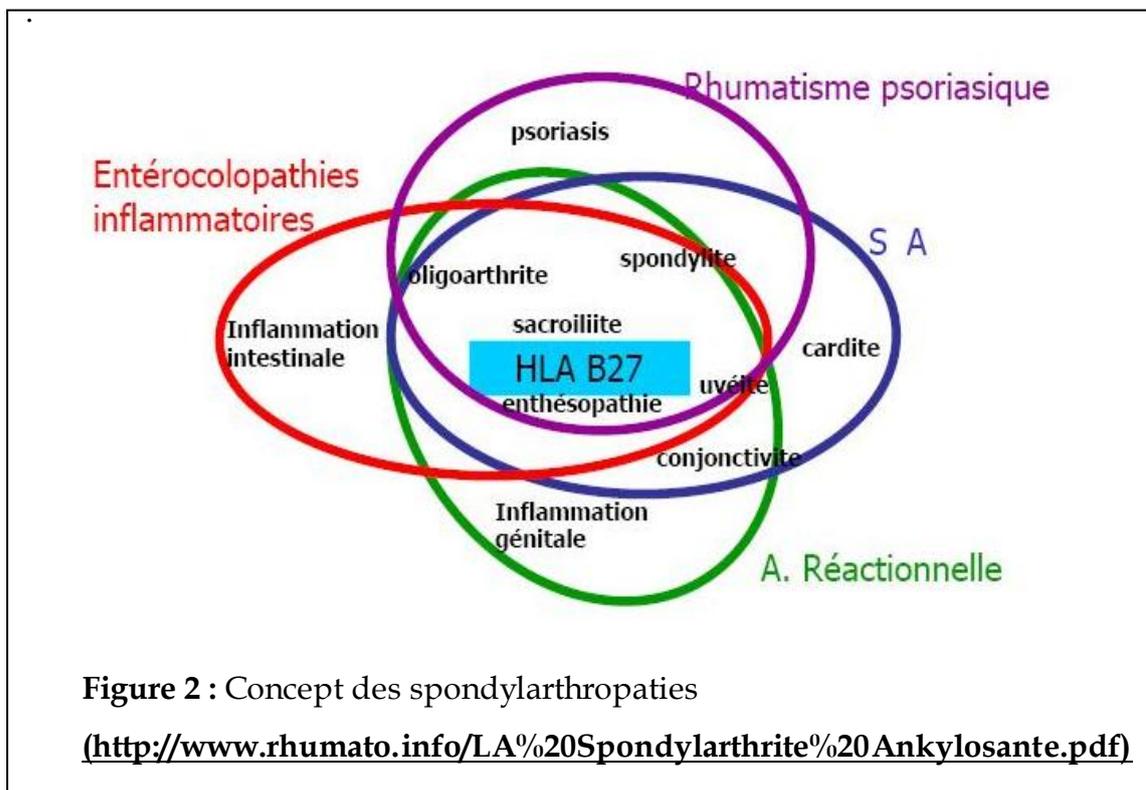
- L'atteinte rachidienne se manifeste par des douleurs lombaires, dorsales ou cervicales (à prédominance nocturne, avec un enraidissement progressif).
- L'atteinte des sacro-iliaques (articulations constituées par l'os iliaque et le sacrum) se manifeste par des douleurs inflammatoires des fesses, uni ou bilatérale, pouvant être irradiées à la face postérieure des cuisses et augmentées à la simple pression.
- L'atteinte des articulations sterno-costales (articulation entre le sternum et la côte) se manifeste par des douleurs inflammatoires de la paroi antérieure du thorax pouvant diminuer la capacité respiratoire.
- L'atteinte des articulations périphériques ou arthrites désigne l'inflammation de la membrane synoviale qui recouvre les articulations. Elle est rencontrée chez 60% des patients souffrant de SA et est révélatrice de la maladie dans 30% des cas. L'atteinte de la hanche (ou coxite) est la plus fréquente mais toutes les articulations peuvent être atteintes. Elle induit des douleurs inguinales ou crurales (face antérieure de la cuisse)
- Atteinte des enthèses (insertion des tendons et des ligaments sur un os).

D'autres manifestations extra-rhumatologiques sont fréquentes mais restent rares telle que l'uvéite qui est une inflammation de la partie antérieure de l'œil et qui se manifeste par un œil rouge et douloureux pouvant entraîner des troubles de la vision, ainsi que les manifestations cardiaques (insuffisance aortique)

La spondylarthrite peut être associée ou secondaire à d'autres maladies :

- Arthrite réactionnelle qui regroupe des manifestations cliniques associant conjonctivite, urétrite et arthrite apparaissant 2 à 3 semaines après une infection.
- Psoriasis cutané : C'est une maladie de la peau assez fréquente puisqu'elle touche 3 à 5% de la population. Dans 5 à 7% des cas, le psoriasis peut être accompagné d'une atteinte articulaire. On parlera dans ce cas de rhumatisme psoriasique (Dougados et al., 1996).
- Entérocolopathies inflammatoires : colon irritable (maladie du Crohn, rectocolite hémorragique), diarrhées pouvant être glairo-sanglantes. (Purmann et al., 1988).

Toutes ces affections ont été regroupées sous le terme de spondylarthropathies (**figure 2**).



Le regroupement de ces maladies est tout d'abord le partage de nombreuses caractéristiques cliniques et radiologiques, d'un terrain génétique commun (antigène HLA B27) et des formes de passage de l'une à l'autre

A terme (plusieurs années d'inflammation), les enthèses, c'est-à-dire les tendons, les ligaments, les capsules (ce qui est autour de l'articulation), vont se calcifier jusqu'à s'ossifier. Dans les formes extrêmes, cela peut constituer des ponts osseux entre les vertèbres, Ces ossifications sont appelées des syndesmophytes vertébraux.

A un stade avancé, les vertèbres peuvent se fusionner donnant un rachis raide. On parle alors d'ankylose vertébrale. Ce type d'atteinte est qualifié d'historique car il était retrouvé surtout avant les années 1960. Néanmoins il arrive de voir ce type d'atteinte encore de nos jours.

Au niveau des sacro-iliaques également, il y a une fusion entre les deux os (le bassin et le sacrum). Dans ce cas, on peut aboutir à une forme ankylosante c'est-à-dire à une inflammation suffisamment sévère pour occasionner des enraidissements.

Dans certaines zones de l'organisme, telles que les sacro-iliaques, lorsque l'ankylose apparaît, les douleurs disparaissent.

Dans 30% des cas il existe une ostéoporose, avec des risques de fracture transdiscale instable se compliquant parfois de compression médullaire.

II. 3 Epidémiologie

❖ Sexe :

C'est une maladie, avec une prédominance masculine nette (3 hommes pour une femme), atteignant préférentiellement l'adulte jeune (*Camus et al., 1985*).

Les formes féminines ne diffèrent pas des formes masculines classiques

❖ Age :

L'âge de début se situe dans la troisième décennie, généralement entre 20 et 30 ans (*Feldtkeller et al., 2003*). Les formes à début juvénile (avant 16ans) représentent entre 10 et 20% des cas mais sont difficilement diagnostiquées.

Elles sont connues pour être plus sévères avec plus d'atteinte enthésique, périphériques et une fréquence plus élevée de coxites (l'inflammation de l'articulation de la hanche).

Les formes à début tardif au-delà de 50 ans sont exceptionnelles.

❖ **Fréquence :**

Les enquêtes épidémiologiques trouvent une prévalence de 0,2% (un cas sur 200) à 0,3% (*Guillemin et al., 2003*). Cependant, cette prévalence est très variable, la SA est fréquente dans les populations blanches et beaucoup plus rares dans les populations d'Afrique noire et d'Asie, de même que dans les populations afro-américaines non métissées. La proportion d'antigène HLA-B27 retrouvée dans le monde est assimilable à cette répartition. Il a été également constaté une très forte agrégation familiale n'intéressant que les SA HLA B27+. En effet plus d'un tiers des SA sont familiales.

II.4 Etiologie

L'étiopathogénie de la SA n'est pas bien connue mais il a été constaté que des facteurs génétiques ainsi qu'à des facteurs environnementaux jouent un rôle très important.

❖ **Facteurs génétiques :**

La SA est liée à la présence de la spécificité HLA-B27. Environ 90 % des malades blancs européens sont porteurs de cette spécificité alors que sa fréquence dans la population globale est de 5 à 14 % selon les pays d'Europe (*Braun et al., 2007*).

❖ **Facteurs environnementaux :**

Selon la théorie dite « hypothèse du peptide arthritogène », la présentation aux lymphocytes T d'un peptide d'origine bactérienne de séquence

similaire ou identique à certaines séquences du sujet malade pourrait induire une réaction immunitaire cytotoxique dirigée contre des protéines de l'hôte. Il est donc probable que des facteurs environnementaux interviennent aussi, notamment des infections microbiennes pouvant donner des arthrites réactionnelles associées à l'antigène HLA-B27. Il a été retrouvé chez des personnes atteintes de SPA, des anticorps anti *klebsiella pneumoniae*, ce qui explique la présence d'une infection par cette bactérie lors de la maladie ((*Baines et al.*, 1990).

D'autres germes intervenant dans la survenue des arthrites réactionnelles comme *shigella flexneri*, *yarsinia enterocolitica* (*Van et al.*, 1984).

Les expériences menées dans le modèle animal du rat transgénique HLA-B27 viennent renforcer ces hypothèses. En effet, il a été montré que les rats transgéniques élevés en atmosphère stérile ne développent pas la maladie alors qu'ils débutent l'affection lorsqu'ils sont remis en milieu extérieur, les rats présentaient des signes de SA.

II. 5 Diagnostic

Le diagnostic de cette maladie repose sur un ensemble d'examens :

❖ Examen clinique :

- Douleurs fessières provoquée par une sacro-illite.
- Douleurs rachidiennes : initialement intermittentes, elles sont souvent plus durables, évoluant par périodes de plusieurs semaines ou mois.
- Arthrites périphériques : elles s'observent au cours de l'évolution chez 50 à 70% des malades. Il s'agit surtout d'atteinte inflammatoire proximale, des épaules et coxo-fémorales, plus rarement d'une atteinte des genoux ou des pieds.
- Talalgies : douleurs des talons
- Manifestations viscérales : elles sont d'inégale fréquence. L'œil est l'organe le plus touché (uvéite antérieure). Mais d'autres manifestations viscérales sont propres à la SA : insuffisance ventilatoire restrictive, liée à la rigidité de la paroi

thoracique, insuffisance aortique et troubles de la conduction auriculo-ventriculaire.

❖ **Examen Biologique :**

- Un examen biologique est présent de manière inconstante avec une élévation du taux sanguin de CRP (C réactive protéine) et une VS (vitesse de sédimentation) augmentée (*Spoorenberg A et al., 1999*).
- La recherche de l'antigène HLA-B27 est un élément important du diagnostic en l'absence d'antécédent familial.

❖ **Imagerie**

Le diagnostic repose sur la visualisation de différentes atteintes par :

- Les radiographies du bassin permettent de visualiser un contour estompé de l'articulation sacro-iliaque, voire un élargissement de la jonction.
- La scintigraphie osseuse permet de repérer les zones inflammatoires, mais cet examen a beaucoup de limites car il est peu spécifique. Il est souvent peu informatif.
- L'IRM (imagerie par résonance magnétique) permet aussi de repérer les zones inflammatoires de manière précoce.
- Le scanner est utile pour montrer les conséquences à long terme en visualisant les ossifications débutantes.
- L'échographie peut aider au diagnostic des atteintes des entheses.

❖ **Autres examens :**

D'autres manifestations sont systématiquement recherchées :

- Fond d'œil : rechercher une uvéite (un œil rouge et douloureux avec un trouble de la vision).
- échocardiographie à la recherche d'une insuffisance aortique et électrocardiogramme à la recherche de troubles de la conduction cardiaque.
- Exploration Fonctionnelle Respiratoire(E.F.R) : en cas d'atteinte respiratoire.

- Critères de diagnostic :

Les premiers critères ont été publiés en 1962 (*Kellgren JH, 1962*) Ils ne comportaient alors aucun paramètre radiologique. A la fin des années 1970, ils ont été révisés, incorporant cette fois-ci la radiologie comme élément, et appelés également Critères de New York dont la dernière version date de 1984(*Van der Linden S et al., 1984*) Une autre série de critères est également utilisée : ceux de l'ESSG (European Spondylarthropathy Study Group) ayant une sensibilité respective de 85 % et de 87 %et une spécificité de 90 % et de 87%(*Dougados M et al., 1991*).

Les critères d'Amor restent aujourd'hui le système le plus sensible et le plus spécifique, car ils tiennent compte des manifestations extra articulaires.

12 critères sont donc à respecter :

- 1- Douleurs nocturnes ou raideur matinale de siège lombaire ou dorsal : 1point
- 2- Oligoarthritis asymétrique : 2points
- 3- Douleurs fessières sans précision : 1 ou 2 points
Douleurs fessières à bascule : 2 points
- 4- Doigt ou orteil en saucisse : 2 points
- 5- Talalgies ou autre enthésopathie : 2 points
- 6- Iritis : 2 points
- 7- Utérilité non gonococcique ou cervicite (<1 mois avant arthrite) : 1 point
- 8- Diarrhée moins d'un mois avant une arthrite : 1 point
- 9- Présence ou antécédents : psoriasis et/ou balanite et/ou entérocolopathie : 2 points
- 10- Sacro-iliite radiologique unilatérale (stade 3) ou bilatérale (stade 2) (ou IRM) : 3 points
- 11- Présence de l'antigène HLA-B27 et/ou antécédent familial : SPA, Reiter, psoriasis, uvéite, enterocolopathie : 2 points
- 12- Efficacité rapide (48 h) des AINS ou rechute rapide (48 h) après arrêt : 2 points
La Spondylarthrite est déclarée si le patient accumule un nombre de point ≥ 6 points.

II.6 Traitement

Le traitement de la SA peut être symptomatique (AINS, antalgiques et corticoïdes) qui vise à diminuer l'inflammation articulaire et à soulager la douleur, comme il peut être un traitement de fond (Salazopyrine, inhibiteurs du TNF α) qui ont pour objectif de ralentir l'évolution de la maladie :

- ❖ Le repos complet est préconisé lors des poussées douloureuses ainsi que des siestes de préférence à plat-ventre.
- ❖ Le traitement de référence demeure les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), pris de façon discontinue ou continue selon la sévérité. Ils sont généralement très efficaces, au point que la sensibilité à ces traitements fait partie des critères de diagnostics de la maladie. Ils ont par ailleurs, d'importants effets secondaires.
- ❖ Les antalgiques sont également utiles.
- ❖ Les Corticoïdes sont moins efficaces mais sont parfois utilisés lors de traitements locaux comme des infiltrations locales au niveau du genou en cas d'arthrites.
- ❖ La salazopyrine (Anti-inflammatoire salicylé utilisé dans la colite hémorragique et la maladie de Crohn) et le méthotrexate (10 mg 1 jour/semaine) auraient une certaine efficacité sur les arthrites périphériques.
- ❖ Les inhibiteurs du TNF α (Tumor Necrosis Factor) : ils constituent la grande et vraie innovation thérapeutique puisqu'ils ont montré un effet spectaculaire sur toutes les atteintes et toutes les formes de SPA. Ils en existent deux types :
 - L'infliximab (Remicade) est un anticorps monoclonal chimérique, constitué d'une partie Fab murine dirigée spécifiquement contre le TNF α humain et d'une portion Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine.

-L'adalimumab (Humira) est un anticorps monoclonal totalement humain. Il est en cours d'évaluation dans l'indication dSA.

- ❖ Les récepteurs du TNF α : L'etanercept (Enbrel) est une protéine de fusion du récepteur P75 du TNF α .
- ❖ Hygiène de vie : Exercices de posture et de gymnastique régulière, si possible quotidienne à effectuer afin de maintenir le rachis en rectitude. Des séances de kinésithérapie sont recommandées.
- ❖ Appareillage permettant de réduire les déformations : orthèses plantaires corsets plâtrés, attelles de postures.
- ❖ Chirurgie : Les traitements chirurgicaux sont rarement utilisés dans la spondylarthrite ankylosante. La prothèse articulaire peut être pratiquée lors d'une ankylose évoluée d'une grosse articulation (hanche ou genou).
- ❖ Kinésithérapie respiratoire : même si l'insuffisance respiratoire par ankylose de la cage thoracique est rarement observée, il est recommandé des mouvements pour prévenir cette complication.

III. Aspect immunogénétique

La spondylarthrite ankylosante est une maladie multi factorielle, à la fois polygénique et environnementale. Il est intéressant donc de spécifier les gènes ou allèles, le plus souvent du système HLA, qui puisse être associés. La spécificité HLA-B27, codée par le gène du système HLA classe I, est le facteur le plus étudié et qui montre une association significative avec la maladie.

III. 1 Immunogénétique du système HLA :

Le CMH (Complexe Major d'Histocompatibilité) est un complexe génique d'environ 3,5 mégabases situé sur le bras court du 6e chromosome (6p21) comprenant de son extrémité télomérique vers le centromère, des gènes codant pour les molécules de classe I ou apparentées, des gènes codant pour les molécules de classe III sans lien direct avec le CMH et gènes codant pour des molécules de classe II (HLA-DR, DQ, DP). Ce complexe étant en fort déséquilibre de liaison avec de nombreux gènes extérieurs au CMH, il est impliqué dans l'inflammation ou les réactions immunes, expliquant sans doute en partie les fortes associations observées entre le CMH et les maladies à composante auto-immune (**figure 3**) (Bensa J. C., 2007).

III. 1.1 Système HLA classe I :

❖ HLA classe I classiques :

La structure des gènes de HLA classe I, organisés en introns et en exons, a pu être déterminée à partir du premier gène HLA séquencé. Les gènes HLA-A, B et C sont constitués de 8 exons séparés par 7 introns. L'exon 1 code la

séquence signal, les exons 2, 3 et 4 codent respectivement les domaines extracellulaires de la molécule HLA, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. L'exon 5 code la partie transmembranaire de la molécule, et les exons 6, 7 et 8 la partie intracytoplasmique.

Les gènes HLA-A, -B, et -C codent la chaîne lourde (α) des molécules de classe I (44 kDa), associée de manière non covalente, à la surface de la quasi-totalité des cellules, à la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$), chaîne dite légère de 11,5 kDa non codée par le CMH (**figure 4**). La structure tridimensionnelle des molécules HLA de classe I classiques est connue depuis 1987 (*Bjorkman PJ et al., 1987*) et explique le rôle fonctionnel de ces molécules dans la présentation de peptides aux lymphocyte T.

Les gènes HLA de classe I classiques se composent de huit parties codantes (exons) séparées par sept introns non codants (*Bignon JD., 2000*) Ces gènes et donc les molécules correspondantes sont extrêmement polymorphes pour chacune des trois séries alléliques A, B et C. On dénombre à ce jour, 893, 1431 et 569 allèles pour ces trois séries respectivement (<http://www.hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. mise à jour 9-10-2009).

Ce polymorphisme de séquence est concentré dans trois zones, dites hypervariables, localisées dans les exons 2 et 3 et donc dans les parties correspondantes distales $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule.

❖ HLA de classe I dits non classiques

Les gènes HLA-E, -F et -G, identifiés à la fin des années 1980, codent des structures moléculaires très proches des molécules HLA classe I classiques. La distribution tissulaire restreinte, la régulation d'expression différente et le polymorphisme beaucoup plus limité les différencient des molécules HLA de classe I classiques (*Braud VM et al., 1999*). L'architecture de ces molécules, également associées à la $\beta 2m$, est pourtant identique. Les différences structurales se situent au niveau des liaisons à l'antigène pour les molécules HLA-E et -G (*Clements CS and al., 2005*). Contrairement aux autres molécules

HLA, la molécule HLA-F est exprimée à la surface cellulaire non associée à un peptide antigénique. Néanmoins, quelques modifications dans la structure des gènes E, F et G conduisent à quelques différences structurales, dont un raccourcissement plus ou moins important de la partie intracytoplasmique de ces trois molécules. De plus, l'existence possible d'épissages alternatifs d'un ou deux exons conduit à la transcription de plusieurs isoformes différentes.

❖ **Molécules et gènes apparentés aux molécules HLA de classe I :**

a) Les gènes MIC :

Les gènes MIC (major histocompatibility complex class I chain related gene), constituent une famille de gènes localisés dans la région HLA de classe I, centromériques au gène HLA-B (**figure 5**), et codent pour une série de molécules. Cinq gènes MIC ont été identifiés, dont MIC-A et MIC-B, localisés à 46 et 141 kb respectivement de HLA-B et 3 pseudogènes (MIC-C, MIC-D et MIC-E) (*Shiina et al., 1999 ; Stephens 2001*). Seuls les gènes MICA et MICB sont fonctionnels et codent pour un polypeptide de 383 acides aminés dont la structure générale est similaire à celle d'une chaîne lourde α de classe I (*Shiina T et al., 1999*).

La protéine MICA, comme la protéine MICB, est formée de 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Les domaines extracellulaires sont codés respectivement par l'exon 2, l'exon 3 et l'exon 4. L'exon 5 code pour la partie transmembranaire et l'exon 6 pour la partie cytoplasmique (**figure6**).

Contrairement aux molécules de classe I classiques, la protéine MICA ou MICB n'est pas associée à la $\beta 2$ microglobuline à la surface cellulaire, mais présente a priori une structure tridimensionnelle similaire à celle des molécules de classe I (**figure 7**). Il n'existe qu'environ 30 % d'homologie de séquence entre les molécules HLA de classe I classiques et les molécules MIC au niveau des

domaines extracellulaires qui constituent le site de fixation peptidique sur les molécules de classe I, ce qui fait penser que les molécules MIC ne fixent pas de ligands peptidiques conventionnels (*Li et al., 2001*).

Les données concernant la distribution cellulaire et tissulaire de ces molécules sont discordantes. Alors que les ARN messagers de MICA sont présents dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, ils ne le sont ni dans les lymphocytes T α/β ni dans les lymphocytes B. La protéine MICA semble avoir une expression membranaire restreinte à la surface de l'épithélium intestinal et thymique (*Koning et al. 1989, Groh et al. 1998*). À la différence des molécules HLA classiques, l'expression des molécules MIC n'est pas induite par l'interféron, mais par le stress cellulaire. Ce phénomène est lié à la présence dans la région promotrice des gènes MIC d'éléments régulés par le choc thermique (heat shock responsive elements) similaires à ceux présents dans le promoteur du gène HSP (Heat shock protein) (*Groh et al., 1996*). Cela suggère que les protéines MIC pourraient se comporter comme des antigènes de stress.

Les molécules MIC sont les ligands des récepteurs NKG2D (**figure 8**) (*Bauer et al. 1999*). Les récepteurs NKG2D sont présent de manière constitutive sur les NK et également exprimés à la surface de 70% à 90% des lymphocytes T γ/δ (*Koning et al., 1989 ; Groh et al., 1998*). Ils sont aussi exprimés sur les LT CD8 (*Bauer S et al., 1999*). L'interaction entre NK et cellule cible se fait donc grâce aux récepteurs NKG2D et protéines MIC respectivement (**figure 9**).

La protéine MICA possède en position 129 du domaine alpha2, soit un résidu méthionine (met), soit un résidu valine (val).

Les molécules MICA avec un résidu met ont une forte affinité de liaison à NKG2D alors que les molécules MICA avec un résidu val, ont une faible affinité de liaison avec NKG2D (*Steinle et al., 2001*).

A la suite de l'interaction MICA/NKG2D, les cellules NK sont activées grâce à la protéine DAP10 couplée à NKG2D (*Wu et al. 1999*). Ce signal d'activation des cellules NK domine le signal inhibiteur induit par la

reconnaissance de NKG2D par les protéines CMH classe I (**figure 10**) (*Bauer et al., 1999*). Ainsi, alors que les protéines CMH classe I indiquent l'intégrité cellulaire aux TCR des LT et aux récepteurs des cellules NK, la protéine MICA informe d'un stress cellulaire et induit ainsi une réponse immunitaire même lorsque les protéines CMH classe I sont exprimées correctement.

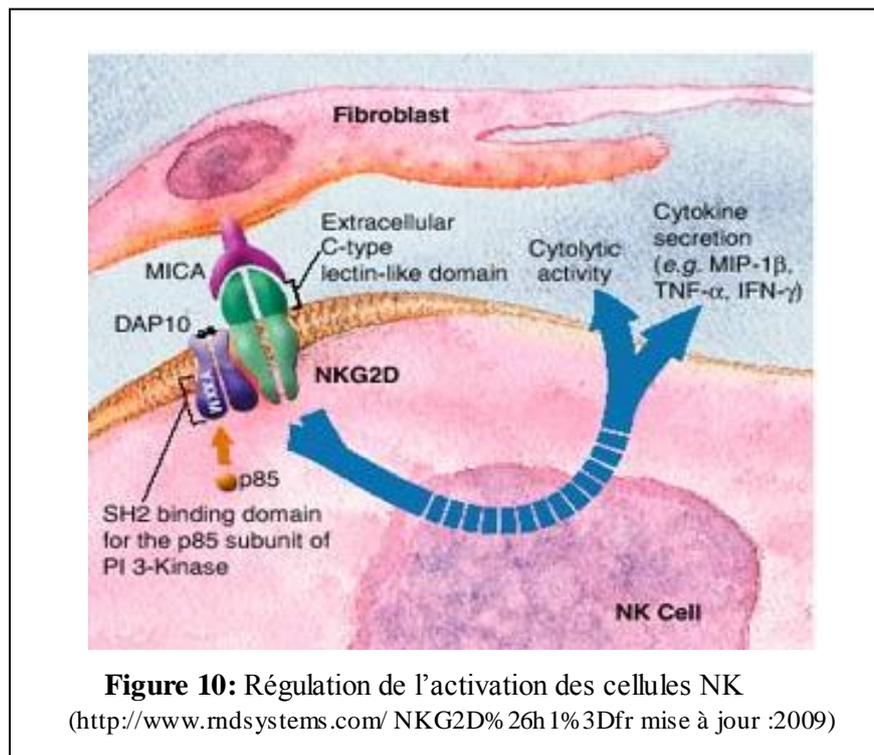


Figure 10: Régulation de l'activation des cellules NK
(<http://www.rnidsystems.com/NKG2D%26h1%3Dfr> mise à jour :2009)

La protéine MICA joue ainsi un rôle essentiel dans l'immunosurveillance anti-tumorale et anti-virale médiée par les cellules T et NK et dans le maintien de l'intégrité des épithéliums. Cette protéine est également exprimée par les tissus greffés en cours de rejet (*Hankey et al., 2002*).

L'équipe de Groh (*Groh et al., 2001*) s'est orientée vers l'étude du cytomégalo virus (CMV), connu pour échapper au système immunitaire par différents mécanismes interagissant avec la présentation antigénique et l'expression des molécules HLA de classe I. L'infection de lignées de cellules endothéliales et de fibroblastes par le cytomégalo virus (CMV) provoque une augmentation des molécules MIC à la surface cellulaire au bout de 24 à 72 h

parallèlement à une diminution d'expression des molécules de classe I (*Groh et al., 2001*). L'expression de MIC est aussi observée in vivo sur des biopsies pulmonaires de patients infectés par le CMV. L'interaction MIC/NKG2D délivre un signal de costimulation à des lymphocytes T α/β , spécifiques d'un peptide de CMV.

En résumé, le signal 1 de reconnaissance provient de l'interaction du TCR avec les molécules CMH classe I classique présentant un peptide CMV, et le signal 2 est un signal de costimulation issu de l'engagement de NKG2D vis-à-vis de MIC. A côté d'infections virales, des infections bactériennes sont aussi capables d'induire l'expression des molécules MICA sur différents types cellulaires. L'infection de cellules dendritiques et épithéliales par *mycobacterium tuberculosis* provoque une augmentation des molécules MICA à la surface cellulaire pouvant interagir avec le récepteur NKG2D présents sur les lymphocytes T γ/δ . L'interaction MICA-NKG2D conduit à une amplification de la réponse dépendante du TCR des lymphocytes T (*Das H et al., 2001*).

La distribution des allèles MICA chez deux populations, Euro-américaine et Afro-américaine a montré que les allèles MICA * 00201 *, 004, et * 00801 ont été les trois principaux allèles communs chez les deux populations avec une fréquence supérieure à 10%.

b) D'autres molécules ont pour particularité de présenter des similitudes structurelles et fonctionnelles avec les molécules HLA de classe I classiques, mais les gènes ne sont pas localisés dans le CMH. Ce groupe comprend notamment les molécules CD1, ULB-P (*UL16 binding protein*) et MR1 (*MHC class I related-1*) impliquées dans les réponses immunitaires à médiation cellulaire, mais aussi d'autres protéines impliquées dans des processus non immunitaires comme ZAG (Zn-a2-glycoprotéine), FcRn (récepteur néonatal pour le fragment Fc) et EPCR (endothelial cell protein C receptor).

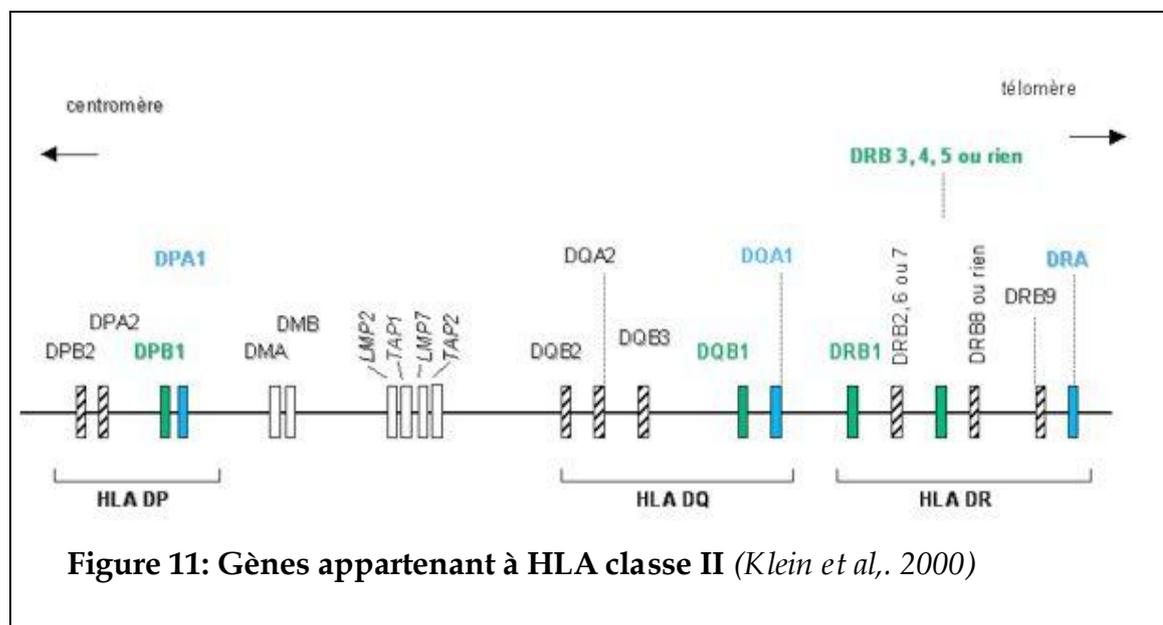
III. 1.2 HLA classe II :

Les gènes HLA classe II sont situés en position centromérique du chromosome 6. Ils comprennent principalement trois familles de gènes : DR, DP, DQ.

La région de classe II contient 23 à 25 gènes ou pseudo-gènes. Les gènes DRA, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 sont fonctionnels et produisent des molécules de classe II.

Les autres gènes de classe II sont soit des pseudogènes (DRB2, DPA2, DPB2, DQB3) soit des gènes sans défaut apparent mais non transcrits (DQA2, DQB2) (**Figure 11**). Il existe aussi des gènes de classe II dites « non classiques ». Ces gènes, appelées HLA-DM et HLA-DO, comportent des signaux de ciblage vers la voie endocytaire (Karlsson L. *DM and DO*, 2005).

Ces molécules non classiques ne fixent pas de peptides mais jouent plutôt un rôle dans le chargement des antigènes sur les molécules classiques afin de donner naissance à des complexes stables.



III. 1.3 Les gènes de classe III :

Outre les gènes de classe I et II, le CMH compte de nombreux gènes codant des produits aussi divers que les « facteurs de nécrose des tumeurs » TNF α et TNF β , les composants du complément C4, C2 et Bf, les transporteurs de peptides TAP1 et TAP2, des protéines de choc thermique HSP70, une vany1-tRNA synthétase, des cytochromes P450 (**figure 3**). Malgré leur grande diversité, ces gènes sont pour la plupart impliqués dans des phénomènes immunitaires (Klein, 1997).

III. 2 Génétique de la Spondylarthrite Ankylosante :

III. 2.1 Association HLA-B27 avec SA :

La spécificité HLA-B27 est directement impliquée dans la spondylarthrite ainsi que dans les spondylarthropathies. Plus de 90% des malades diagnostiqués spondylarthrite ankylosante sont porteur du gène (Brewerton *et al.*, 1973 ; Toussiot *et al.*, 2006).

La présence du gène ne permet pas de réaliser le diagnostic, car 6% de la population française est porteuse du gène, mais qui ne sont pas malades (Brebant *et al.*, 2002.)

L'association entre HLAB27 et SA, connue depuis 1973, a été amplement documentée dans différentes populations avec un risque relatif de 80 à 90 dans les populations caucasienne. La spécificité HLA-B27 est codée par différents allèles (HLA-B*2701 à HLA-B*2725) dont l'intensité de l'association à la maladie est sans doute différente : l'allèle majoritaire, associé à la SA, est l'allèle HLA-B*2705. On retrouve également les allèles HLA-B*2702, HLA-B*2704 et HLA-B*2707 sont fortement associés aux SA chez la population caucasienne et la population d'Asie respectivement. En revanche, les allèles HLA-B*2706 et HLA-B*2709 semblent moins associés (Khan, 1995).

Deux hypothèses scientifiques visant à expliquer le mécanisme de la SPA avec un rôle pathogène lié à HLA-B27:

1. le peptide arthritogène: le HLA-B27 présenterait des peptides intracellulaires provenant de bactéries, qui vont stimuler une réponse du système immunitaire qui va engendrer la maladie. Selon ce concept dit du "peptide arthritogène", c'est à dire d'une petite protéine qui déclenche une arthrite ou inflammation de l'articulation.

2. Mimétisme moléculaire: S'il y a réaction croisé entre les antigènes HLA et ceux des bactéries, alors l'infection par ces microorganismes va conduire à la production d'anticorps, qui auront simultanément une activité antimicrobienne, auto immune. Seulement une petite proportion, ou un sous ensemble de ces anticorps antibactériens auront une activité anti soi. Les antigènes bactériens apportant des séquences partagées avec les antigènes HLA-B27, seront immunogènes, particulièrement sur les bords des séquences partagées, parce que c'est à cet endroit que le système immunitaire ne saura pas faire la différence avec ses propres antigènes. Si les auto-anticorps sont produits mais en petite quantité, cela n'activeraient pas la cascade du complément, et donc, aucun événement cytotoxique et aucune inflammation ne s'en suivrait (**figure 12A**).

Quand de tels anticorps sont présents dans des concentrations élevées, ils activeraient la cascade du complément avec la stimulation de l'inflammation qui par la suite peut avoir comme conséquence des dommages et la fibrose localisées de tissu (**figure 12B**), particulièrement dans les anthèses autour des articulations de colonne lombaire et des sacro-iliaques.

Si les bactéries sont présentes dans l'intestin ou le mucus intestinal, on peut prévoir que les ganglions de lymphes relatifs, qui sont présents dans le mésentère de l'intestin et du bassin, seront étroitement liés anatomiquement aux articulations de colonne lombaire et des sacro-iliaques, et donc, que des titres élevés d'anticorps seront présents dans ces secteurs, qui sont les emplacements pathologiques principaux de l'expression de la SPA. La

production continue des concentrations élevés de ces auto-anticorps mènerait à l'inflammation autour de la colonne lombaire et des sacro-iliaques, et donc, la présence des signes cliniques et des symptômes liés à cette pathologie.

Dans les situations d'infections persistantes, ces anticorps passeraient des nœuds de lymphes mésentérique et pelvienne à la circulation générale, et de tels anticorps devraient non seulement être discernables dans le sang, mais affecteraient également des emplacements plus distaux, tels que le cou, l'uvéa (iritis), et les autres grandes articulations périphériques.

III. 2.2 Association MIC A maladies :

❖ Association MICA et Spondylarthrite Ankylosante :

Une étude sur une population de Sardaigne montre que la fréquence de l'allèle MIC A4 est plus élevée (53,2%) chez les patients souffrants de SA que dans les autres populations caucasiennes (environ 20%); cet allèle est fortement associé à la pathologie.

En plus, MICA-A4 a été trouvé chez 16 patients sur 20 qui sont HLA-B27 négatifs, avec une fréquence de 80%. Cela suggère que l'allèle MICA-A4 peut également être un facteur de susceptibilité (*Ricci-Vitiani et al., 2000*).

❖ Association MICA et maladie de BEHCET :

L'étude de ce microsatellite transmembranaire chez 77 patients japonais atteints de maladie de Behçet a récemment mis en évidence une association significative avec l'allèle MICA-A6 : 74 % des patients expriment l'allèle MICA-A6 qui n'est présent que chez 47 % des sujets-contrôles. Cette association semble supérieure à l'association avec HLA-B51, exprimé chez 57 % des patients japonais. De plus, tous les patients HLA-B51 portent l'allèle MICA-A6 (*Amoura et al., 2006*).

❖ Association MICA fièvre méditerranéenne familiale (FMF) :

La fièvre méditerranéenne familiale (FMF), maladie héréditaire à transmission autosomique récessive. Elle est caractérisée par des attaques fiévreuses de courte durée, à rémission spontanée, récurrentes à des intervalles variables. La fièvre est souvent accompagnée par une péritonite, une pleurite et/ou une synovite. Le gène responsable de la maladie est le gène MEFV, composé de 10 exons, localisé sur le bras court du chromosome 16. Plus de 35 mutations ont été identifiées à ce jour, parmi lesquelles 5 sont les plus fréquentes (M694V, M694I, M680I, V726A et E148Q). La mutation M694V a été, à plusieurs reprises, corrélée à des phénotypes sévères.

Le gène MICA semble avoir un effet sur le cours de la maladie, mais pas sur le type de manifestations cliniques. Cet effet de MICA a été noté uniquement chez les homozygotes pour la mutation M694V. Chez eux, la présence au locus MICA de l'allèle MICA-A9 se traduit par un début plus précoce de la maladie, alors que celle de l'allèle MICA-A4 adoucit la sévérité du génotype homozygote M694V en diminuant la fréquence des crises (*Cazeneuve et al., 2000 et Touitou et al., 2001*).

❖ Association MICA et maladie de Crohn :

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH), sont caractérisées par une réponse immunitaire non contrôlée vis à vis de la flore intestinale. Les cellules épithéliales intestinales et les composants de l'immunité innée sont impliqués dans la pathogénèse de la MC. Les molécules MICA sont présentes en grande quantité sur les tissus intestinaux dont l'expression est induite par certaines souches bactériennes adhérentes. Cette expression semble être augmentée au cours de la MC. L'expression de NKG2D est augmentée à la fois à la surface de cellules T CD8 sous l'effet de l'IL-15, cytokine produite par l'épithélium intestinal lors d'un stress inflammatoire (*Roberts AI et al., 2001*) et aussi sur les NK. Ces données permettraient d'expliquer certains aspects de la pathogénie de la maladie de

Crohn, en particulier le rôle des facteurs bactériens d'environnement dans le déclenchement ou l'entretien du processus auto-immun. Par exemple, l'infection de lignées cellulaires épithéliales par certaines souches adhérentes d'E. coli élève de façon très rapide l'expression de surface de ces molécules et la possibilité d'activation des lymphocytes via NKG2D.

❖ **Association MICA et maladie cœliaque :**

Une étude espagnole suggère que l'allèle MICA A5.1 est associé à la maladie cœliaque indépendamment de l'allèle HLA-DQ2 qui reste l'allèle prédisposant des formes cliniques de cette maladie (*Rueda et al., 2003*).

❖ **Association MIC A et diabète :**

Chez 119 patients coréens atteints de diabète de type I et 134 sujets, l'allèle MICA-A6 était présent à une fréquence significativement plus faible dans le groupe de patients diabétiques que dans la population témoin. Par contre l'allèle MICA-A4 était présent à une fréquence plus élevée chez les patients diabétiques indépendamment des gènes HLA (*Van Autreve et al., 2006*).

❖ **Association MICA et psoriasis :**

Une étude sur 45 patients atteints de psoriasis, 65 avec arthrite psoriasique, et 177 sujets témoins révèle qu'en plus de l'allèle HLA-Cw* 0602 qui est augmenté dans les deux groupes de patients, l'allèle MICA-A9 était présent à une fréquence significativement plus élevée chez les patients atteints d'arthrite psoriasique. L'augmentation du MICA-A9 chez les patients atteints d'arthrite psoriasique est indépendante de déséquilibre de liaison avec Cw * 0602. Cet allèle semble conférer un risque relatif supplémentaires développement de l'arthrite psoriasique et est indépendante de l'association des Cw * 0602 dans le psoriasis (*Gonzalez et al., 1999*).

❖ Association MICA et Lupus Erythémateux Disséminé (LED) :

Une étude sur un échantillon de 48 patients Italiens et 158 sujets témoins sains montre qu'en plus des associations des haplotypes HLA de classe II, DRB1 * 03-DQA1 * 0501-DQB1 * 0201 (DR3-DQ2), les allèles MICA-A5 et MICA-A5.1 sont fortement associés au LED, alors que l'allèle MICA-A9 n'en est pas associé (*Gambelunghe et al., 2005*).

❖ Association MICA et PR :

Une étude cas témoins réalisée chez 144 patients atteints de PR et 297 témoins en Corée a montré que la fréquence de l'allèle MICA-A9 est significativement diminuée chez les patients atteints de PR par rapport aux témoins, tandis que la fréquence de l'allèle MICA -A4 et MICA-A5.1 sont significativement augmentées chez les cas. En plus, une forte association entre l'allèle HLA-DRB1 * 0405 et MICA-A4 a été observée chez les témoins ainsi que dans les patients atteints de PR (*Won Mok et al., 2003*).

❖ Association MICA et tumeurs :

Dans les modèles murins, l'activation de cellules NK ou des LT γ/δ via NKG2D reconnaissant Rae1 ou H-60, ligand du récepteur NKG2D, équivalent aux molécules MIC chez l'homme, suffit à induire une cytotoxicité antitumorale (*Tieng et al., 2002*). Chez l'homme, les molécules MICA exprimées sur certaines lignées tumorales d'origine épithéliale ainsi que sur certaines tumeurs fraîchement isolées de carcinomes pulmonaires, rénaux, du sein, de la prostate et du côlon, sont la cible de cellules T cytotoxiques gamma/delta Vdelta1 infiltrant ces tumeurs (*Groh V et al., 1999*).

Cependant toutes les tumeurs d'origine épithéliale n'expriment pas MICA. L'impact de la reconnaissance des molécules MICA in vivo par des effecteurs de la réponse immunitaire exprimant le récepteur NKG2D reste

encore à définir. L'induction de MICA sur les cellules épithéliales tumorales, peut-elle être un moyen de contrôler la croissance et de permettre l'éradication tumorale ou bien au contraire est-elle un moyen d'échapper au contrôle du système immunitaire. La dernière hypothèse est renforcée par le fait que l'expression des molécules MIC est surtout détectée sur des tumeurs à fort potentiel de progression (Groh et al.,2002) et que celles-ci ont la possibilité de sécréter des molécules MICA solubles (Groh et al.,2002, Salih et al., 2002). L'échappement tumoral à la surveillance immunitaire serait due à la sécrétion de ces molécules, qui une fois liées aux récepteurs NKG2D exprimés sur les T CD8+, entraîneraient leur endocytose et leur dégradation. Cette hypothèse a été validée expérimentalement en montrant que le sérum de patients contenant des molécules MIC solubles diminue l'expression de NKG2D à la surface de lymphocytes T CD8 (Groh et al.,2002). La diminution de l'expression de NKG2D observée sur les lymphocytes T infiltrant les tumeurs ainsi que sur les lymphocytes T circulants du sang périphérique pourrait contribuer à l'absence de réponse antitumorale spécifique et compromettre de façon plus globale les fonctions immunitaires de ces patients (Tieng et al., 2002).

Un travail récent a évalué l'impact potentiel des polymorphismes HLA-E et MICA-129 sur l'évolution du cancer du nasopharynx en Tunisie. Un échantillon de 130 patients présentant un cancer du nasopharynx et 180 sujets sains, ont été inclus dans cette étude. Les analyses statistiques ont montré que la présence de l'allèle MICA-129 val est associée à un plus fort taux de ce cancer alors que celle de l'allèle MICA-129 met est significativement plus importante chez les sujets sains. Par ailleurs, le génotype MICA-129met/val est associé à une meilleure survie à 10 ans par rapport au génotype MICA-129val/val. Enfin, l'analyse des associations haplotypiques entre HLA-E et MICA montre que les associations HLA-E*0101/MICA-129met et HLA-E*0103/MICA-129met sont protectrices en retardant la survenue de ce cancer. L'haplotype HLA-E*0103/MICA-129val est par contre associé à une survenue plus précoce de la tumeur (Douik et al., 2006).

III. 2.3 Association d'autres gènes avec SA :

❖ HLA-DRB1 :

Breban et son équipe ont étudié 188 patients de 70 familles multiplex souffrant de SA. Ils ont observé que l'allèle HLA DR4 contribuait à la survenue de SA et la présence de cet allèle multipliait par 2,8 le risque de développer une SA chez les patients porteurs de HLA-B27 (Breban M., 2004 ; Said-Nahal et al., 2002)

❖ HLA-DQ et HLA-DP :

Un allèle est retrouvé chez des malades SA avec une fréquence très élevée, il constitue donc un facteur de risque, il s'agit de l'allèle DQB1*0503. En revanche d'autres allèles présentent une fréquence plus faible et confèrent une protection. Il s'agit de l'allèle HLA-DQA*01 pour le locus HLA-DQA1 et de l'allèle DPB1*0401 pour le locus HLA-DPB1.

❖ Le gène de l'IL-1 :

Le gène de l'IL1 est situé au niveau du cluster IL1 (chromosome 2). Une étude sur une populations anglaises et nord-américaines a apporté une association entre les spondylarthropathies et l'IL-1 β avec des fréquences augmentées (Kim et al., 2005; Kim et al., 2008 ; Maksymowych et al., 2006; Sims et al., 2008).

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire qui est principalement produite par les macrophages activés. Chez la souris, son hyperexpression est responsable d'une arthrite sévère proliférative chronique. Son rôle n'a pas été étudié dans des modèles animaux de SA, ni élucidé chez l'homme (Niki et al., 2004). Deux essais thérapeutiques menés avec l'anakinra, un inhibiteur de l'IL-1, ont montré une efficacité du traitement, suggérant une implication de l'IL-1 dans la SA.

❖ **ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) :**

L'aminopeptidase endoplasmique associée au réticulum, est une enzyme qui présente deux fonctions connues : la première est de cliver les récepteurs de cytokines (IL-1, IL-6, TNF) de la surface cellulaire (*Cui et al., 2002 ; Cui et al., 2003*), la seconde est de tailler les peptides à la bonne longueur pour la présentation par les molécules HLA de classe I, en coupant la partie N terminale des précurseurs dans le réticulum endoplasmique (*Serwold et al., 2002*).

La perte de fonction des variants d'ERAP1 pourrait ainsi avoir des effets pro-inflammatoires via ce mécanisme de clivage des récepteurs. Chez les souris knock-out ERAP1, on observe une réduction de l'expression des molécules du CHM de classe I de surface, une augmentation significative de l'altération des marqueurs de surface de classe I, une diminution de la stabilité et une présentation défectueuse des antigènes sur la surface des cellules (*Yan et al., 2006 ; Hammer et al., 2007*). La découverte d'ERAP1, plaide en faveur de l'hypothèse d'un groupe de peptides arthritogènes, qui n'auraient peut-être pas un type de séquence commune, mais plutôt une forme similaire, cela reste à démontrer.

❖ **IL-23 et IL-17 :**

Les deux cytokines pro-inflammatoires, IL-23 et IL-17, peuvent être associées aux maladies autoimmunes. En effet, la production d'IL-23 et surtout d'IL-17, une interleukine connue pour être impliquée dans la pathogénie de plusieurs affections inflammatoires, serait très augmentée chez les patients atteints de la SA (*Wendling et al., 2007 ; Jandus et al., 2008*).

L'étude suggère que l'anomalie de repliement de la molécule HLA-B27 serait responsable d'un stress du réticulum endoplasmique. Un des éléments de cette anomalie, serait une surproduction d'IL-23 dont une des conséquences est

la différenciation des T CD4⁺ en lymphocytes Th17, lymphocytes qui sont à l'origine de la synthèse d'IL-17 (*Layh-Schitt et al., 2008 ; Acosta-Rodriguez et al., 2007*).

Sur cette base, empêcher les lymphocytes T de se différencier en cellules Th17 pourrait supprimer ou réduire fortement le développement des maladies inflammatoires comme les spondylarthropathies.

❖ **TNF α (Tumor Necrosis Factor) :**

L'expression d'ARNm codant pour le TNF α a été retrouvée en quantité abondante sur des biopsies d'articulations sacro-iliaques. (*Braun et al., 1995*).

Une analyse des résultats du gène TNF α a montré que l'allèle

TNF α 6 est fortement associé à des patients de SA (*Djouadi et al., 2007*).

Le traitement par les inhibiteurs du TNF α a bien montré son efficacité lors de la SA, cela suggère que le gène codant pour le TNF α est bien associé à la maladie.

❖ **CARD15 :**

Le gène CARD15 (Caspase recruitment domain) code pour une protéine portant au moins 4 domaines. Un domaine fait de répétition de zones riches en leucine permet l'interaction avec des composants bactériens dont le Lipopolysaccharide (LPS). Un domaine liant les nucléotides (NBD) permet sans doute l'oligomérisation de la protéine. Enfin deux domaines CARD servent d'effecteurs en permettant une liaison à d'autres protéines activant l'apoptose. Le gène est préférentiellement exprimé dans le monocyte (*Hugot et al., 1996*).

L'étude du polymorphisme du gène CARD15 chez les patients souffrants de spondylarthropathies a permis d'identifier un phénotype spécifique déjà observé dans la maladie de Crohn. La fréquence rapportée des trois variants du gène CARD15 (R702W, G908R et 1007fs) dans la population SPA (20%) est similaire à la population témoin (17%), mais monte à 38% dans le sous groupe de patients SPA présentant une inflammation intestinale chronique. Ceci est significativement plus élevé que dans les autres sous-groupes de SPA et le

groupe témoin mais la fréquence est presque similaire chez les patients souffrant de la maladie de Crohn (49%). Ces observations indiquent que le polymorphisme du gène CARD15 est associé avec un plus grand risque de développer une inflammation intestinale chronique. (*Kim et al., 2004*).

IV. Matériels et Méthodes

IV. 1 Population d'étude :

Nous avons réalisé une étude cas/témoin qui a portée sur deux populations :

- ❖ Population témoins : composée de 78 individus non apparentés, originaires de l'Ouest Algérien et ne souffrant d'aucune maladie auto-immune.
- ❖ Population de sujets atteints de la Spondylarthrite Ankylosante, composée de 65 femmes et de 25 hommes, non apparentés, originaires tous de l'Ouest Algériens et recrutés au niveau du service Rhumatologie, CHU Oran, selon les critères d'Amor.

IV. 2 Méthodes :

Afin de réaliser notre étude, nous avons suivis trois étapes :

- Extraction d'ADN par la technique Salting Out
- Amplification de l'Exon 3 du gène MICA par la PCR nichée
- Digestion par l'enzyme de restriction RsaI

❖ Extraction et dosage de l'ADN :

-Extraction de l'ADN à partir du sang total :

L'ADN est extrait à partir du sang total selon la technique utilisant le NaCl. (Miller et al, 1989).

Un volume de 10 à 20 ml de sang est prélevé, par individu, sur une solution d'EDTA 0,5M (1/10^e du volume total) puis congelé à -20°C.

Cette extraction a été réalisée sur un total de 90 prélèvements appartenant aux individus atteints de Spondylarthrite Ankylosante de et de 78 prélèvements appartenant aux témoins non apparentés. Elle comprend les étapes suivantes :

- a. Lyse des globules rouges : Le sang est décongelé et les globules rouges sont détruits par choc hypotonique ménagé. Le volume est ajusté à 45 ml par addition d'une solution hypotonique de TE 10/10 (Tris/HCl 10mM ; EDTA 10mM pH 8) et le mélange est agité délicatement, mis dans de la glace pendant 30 minutes puis centrifugé à 3000rpm pendant 15 minutes. Ce traitement est effectué au minimum 2 fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre correspondant aux globules blancs.
- b. Lyse des globules blancs : Le culot est resuspendu dans un volume de 5ml d'une solution de lyse des globules blancs (SLB) (Tris/HCl 10 mM ; EDTA 0,1mM pH 8 et SDS 0,5 %) et la protéinase K 20mg/ml. Ce traitement a pour but de détruire les membranes cellulaires libérant ainsi l'ADN génomique. Les protéines sont dégradées par l'action de la protéinase K à 37°C, pendant une nuit sous agitation douce.
- c. Précipitation de l'ADN à l'éthanol : Un volume de 2ml de la solution de NaCl 5M est ajouté au culot, celui-ci est mélangé puis centrifugé à 4000rpm pendant 10 minutes. L'ADN est précipité sous forme de méduse par addition de 2 volumes d'éthanol absolu froid. Il est ensuite lavé dans de l'éthanol à 70%.

La méduse est récupérée avec une pipette pasteur puis séchée à l'air libre et resuspendue dans 200 à 500µl de tampon TE 10/1 (Tris/HCl 10mM ; EDTA 1mM ; pH 8) selon la taille de la méduse. La dissolution complète de l'ADN est réalisée sous agitation lente pendant plusieurs jours à température ambiante.

-Détermination de la concentration et contrôle de la qualité de l'ADN :

La concentration de l'ADN est estimée par la densité optique à 260nm sachant qu'une unité de densité optique à 260nm correspond à 50µg d'ADN/ml. La pureté de l'ADN extrait est évaluée par le rapport de sa densité optique DO260nm/DO280nm qui doit être compris entre 1,8 et 2,0. Une valeur supérieure témoigne d'une contamination par le sel et une valeur inférieure, d'une contamination protéique.

❖ **Amplification par PCR Nichée/RFLP :**

Principe de la PCR nichée :

La PCR nichée (Nested PCR), PCR gigogne ou PCR emboîtée est une PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorce différents, le second liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. Cette technique était initialement utilisée pour réduire le risque de contamination (le produit final devait pouvoir interagir avec deux couples d'amorces, afin d'augmenter le nombre de copies cibles). Elle est maintenant très utilisée en virologie et notamment dans l'étude de virus à ARN qui peuvent avoir une haute mutabilité. Le premier couple d'amorces est conçu pour pouvoir accrocher les quelques parties stables du génome viral, le deuxième pour identifier le sous-type. Elle permet aussi une meilleure sensibilité du résultat de la digestion.

Protocole de la technique PCR nichée :

Le polymorphisme à étudier est localisé au niveau de l'exon 3 du gène MICA, plus précisément, à la position nucléotidique 454.

Nous avons amplifié en premier lieu un grand fragment de 2Kb, à partir du premier intron jusqu'au cinquième. Ensuite, en deuxième lieu, nous avons amplifié l'exon 3 englobant le polymorphisme met 129 val, en utilisant le produit d'amplification de la première PCR (**figure 13**).

Afin de réaliser ces deux amplifications, nous avons disposé de deux couples d'amorces :

- un couple d'amorce spécifique aux séquences qui sont à l'extrémité du grand fragment (2Kb)
- un couple d'amorce spécifique aux séquences qui encadre l'exon 3 (127pb).

Les séquences et les conditions d'amplification pour les deux couples d'amorces sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Conditions de l'amplification du grand et petit fragment

Couple d'Amorces	Noms des Amorces	La séquence 5' → 3'	Température d'hybridation
Premier couple d'amorce	Amorce 1	5'-CGTTCTTGTCCCTTTGCCCCGTG-3'	68°
	Amorce 2	5'-GATGCTGCCCCCATTCCCTTCC-3'	
deuxième couple d'amorce	Amorce 3	5'-GGGTCTGTGAGATCCATGA-3'	58°
	Amorce 4	5'-TGAGCTCTGGAGGACTGGGGTA-3'	

La température d'hybridation pour le deuxième couple d'amorces a été réduite de 68° à 58° pendant 30mn, afin d'obtenir des amplifications de bonne intensité.

L'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25µl constitué de 2,5 mM de MgCl₂, 1X de tampon (Biolabs, New England), 0,2mM du dNTP, 0,7mM d'amorces, 200ng d'ADN et enfin 2,5 d'unité de Taq polymérase est ajoutée. L'amplification se fait dans un thermocycleur (Techne Flexigène).

Le programme d'amplification du gène MICA est détaillé dans le tableau 2

Tableau 2 : Programme de l'amplification du gène MICA

Phase	Phases	Température	Durée
Phase 1	Dénaturation	95°C	5mn
Phase 2 (35 cycles)	Dénaturation de l'ADN	94°C	30s
	Hybridation des amorces	68° 58°	30s
	Elongation des amorces	72°C	45s
Phase 3	Elongation finale	72°C	10mn

Test de contrôle d'amplification et test de digestion :

Le contrôle de la première amplification est effectué par électrophorèse sur gel d'agarose dosé à 0.8%, alors que pour la seconde amplification d'effectue sur un gel d'agarose dosé à 2.5%.

Le gel d'agarose est fait à partir d'un mélange d'agarose et du TBE1X. Ce même gel a été également utilisé pour révéler les digestions des ADN par l'enzyme RsaI.

Le TB1X à PH=8, est constitué du Tris à 0.089M, EDTA à 0.25mM et acide Borique à 0.089M. Le mélange Agarose-TBE1X est ensuite chauffé dans un micro-onde jusqu'à obtention d'une solution limpide à laquelle on rajoute 8 Ml du BET (Bromure d'ETHidium à 100ng/MI) qui est un agent intercalent

Après que le gel soit polymérisé, 5ML de chaque ADN est ensuite déposé après l'avoir mélangé à 3ML du Tampon de charge (Bleu de Bromophenol à 6X, Sucrose 40%)

Le Rôle de ce Tampon de charge est d'alourdir l'ADN et d'indiquer le front de migration. Une migration est ensuite lancée à 100V pendant 30mn pour permettre aux ADN de migrer du moins vers le plus. Après migration, une visualisation des produits amplifiés est faite sous UV

❖ Digestion par l'enzyme de restriction RsaI :

Après amplification de l'exon 3 du gène MICA, une digestion est effectuée afin de déterminer la présence ou l'absence du polymorphisme qui est localisé au niveau du codon129.

En effet, la présence de l'allèle MICA-129 val se traduit par la présence du site de restriction, par contre, la présence de l'allèle MICA-129 met se traduit par son abolition. Ainsi, l'identification de ce polymorphisme est réalisée par l'absence ou la présence du site de coupure de l'enzyme de restriction RsaI. L'enzyme RsaI possède le site de restriction 5'-GT↓AC-3' au niveau du codon 129 de l'exon 3 portant le polymorphisme. Une variation d'un seul nucléotide abolit ce site. En effet, la perte du site est liée à la substitution du nucléotide Guanine par le nucléotide Adénine à la position nucléotidique 454 qui correspond au codon 129 de l'exon3 (**figure 14**).

Ce polymorphisme fait partie d'autres polymorphismes trouvés au niveau des trois exons, 2, 3 et 4 du gène MICA (**figure 15**).

Dans le cas où le site est présent, l'enzyme génère deux fragments d'ADN, l'un de 104pb et l'autre de 23pb.

Dans le cas où le site est absent, l'ADN amplifié gardera la même taille de 127pb, cela veut dire que l'enzyme n'a pas générer de coupure (**tableau3**).

Ainsi, nous pourrons distinguer les trois types du génotypage MICA-129met/met, met/val et val/val

Tableau 3: correspondance entre les fragments de restrictions obtenus et les génotypes MICA-129

	MICA-129 met/met	MICA-129 met/val	MICA-129 val/val
RsaI	127	127	
		104	104
		23	23

Protocole de digestion :

La digestion a été réalisée dans un volume final de 15ML, contenant le tampon 1X (10X L Boehringer Mannheim GmbH, W-Germany), de BSA (Bovin Serum Albumin), 5 unités de l'enzyme de restriction RsaI (Boehringer Mannheim GmbH, W-Germany) et 5 µl d'ADN amplifié. Ensuite le mélange est mis dans une étuve à 37°C pendant toute la nuit.

IV.3 Tests statistiques

❖ **Le test du χ^2 :**

Le test du χ^2 (prononcer « khi-deux » ou « khi carré », qu'on écrit également à l'anglaise « chi-deux » ou « chi carré ») permet, partant d'une hypothèse et d'un risque supposé au départ, de rejeter l'hypothèse si la distance entre deux ensembles d'informations est jugée excessive.

La signification statistique d'une association entre un polymorphisme et une maladie est testée par le calcul du χ^2 .

Le χ^2 de conformité permet d'apprécier la signification ou non d'une différence de distribution, pour un marqueur donné entre les populations de malades et de témoins.

L'évaluation du χ^2 dans cette étude a été réalisée par l'utilisation du logiciel EpiInfo5.01. Ce logiciel permet également de déduire le degré de signification p , qui correspond à la probabilité de store que l'écart global soit imputable seulement aux fluctuations du hasard. Lorsque la probabilité p est égale ou inférieure à 0.05 (5%), il y a au moins de 5 chances sur 100 que la distribution résulte du hasard. Ainsi, la différence de distribution entre les populations de malades et de témoins, pour un marqueur donné, est donc statistiquement significative et le marqueur peut être considéré comme associé à la maladie.

Cette évaluation classique du χ^2 est possible lorsque les effectifs sont supérieurs à 5. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'utiliser un χ^2 correction de Yates (effectif inférieur à 5), soit avec la correction de Fisher (effectif inférieur à 3) (Svejgaard et al 1974 ; Clerget-Darpoux et al, 1988).

❖ **Odds Ratio(OR) et Risque Relatif (RR) :**

L'Odds Ratio (OR) est utilisé dans les enquêtes de cohorte et de type cas/témoins. Il permet d'apprécier l'intensité d'une association entre un marqueur et une maladie.

L'OR est une estimation du risque relatif dans le cas où il est impossible de mesurer les risque de la maladie chez les sujets exposés et non exposés (Svejgaard et al., 1974 ; Clerget-Darpoux et al., 1988).

L'OR est toujours supérieur au RR, mais dans les cas des maladies rares et lorsque le RR n'est pas très élevé, les deux mesures sont très voisines (Rumeau-Rouquette et al., 1993). L'évaluation du RR dans cette étude a été obtenue en utilisant le logiciel EpiInfo 5.01.

❖ **Déséquilibre de liaison :**

Le terme déséquilibre de liaison se réfère à l'association non aléatoire d'allèles pris à des loci différents. Soit deux gènes, A et B, comportant respectivement n et m allèles, notés a et b, de fréquences P_a et P_b . Il y a équilibre gamétique si la fréquence du gamète ab notée P_{ab} est égale aux produits des fréquences des allèles a et b.

On estime le déséquilibre de liaison par la différence entre la fréquence haplotypique et le produit des fréquences des allèles :

$D = P_{ab} - P_a \cdot P_b$. Si D est positive cela signifie que les allèles a et b sont plus souvent ensembles qu'ils ne le seraient sous l'effet du hasard.

V. Résultats et discussions

V.1 Résultats des tests d'amplification :

❖ Résultats de la première PCR :

L'amplification a été réalisée sur 90 ADN qui correspondent aux ADN des malades, et 78ADN correspondant aux témoins. Nous avons pour cela utilisé un premier couple d'amorce qui reconnaît les deux extrémités de l'intron 1 et l'intron 5, ce qui nous permet d'obtenir un grand fragment d'une taille de 2Kb. Pour l'ensemble des ADN, nous avons obtenus une bande de même taille (2Kb) avec une forte intensité. Il est à noter que nous n'avons eu, au niveau du gel, aucunes bandes non spécifiques (**figure 16**).

Cette première amplification a pour bût d'augmenter l'efficacité de la seconde PCR pour amplifier l'exon 3 qui englobe le polymorphisme étudié (MICA met 129 val).

❖ Résultats de la seconde PCR :

Les produits de la première PCR, c'est-à-dire, les amplimères correspondant aux 90 ADN des cas et 78ADN des témoins, ont été ensuite amplifiés en utilisant un second couple d'amorce capable de reconnaître les extrémités de l'exon 3. Cette seconde PCR nous permet d'obtenir un petit fragment de 127pb où siège le polymorphisme MICA met 129 val.

Les résultats obtenus après révélation par électrophorèse montrent une bande de forte intensité correspondant à la taille de l'amplimère attendu (127 pb) (**figure 17**).

A partir de cette seconde PCR, nous obtenons des amplimères qui subiront par la suite une digestion par l'enzyme de restriction RsaI afin de rechercher le polymorphisme MICA met 129 val.

V. 2 Résultats du test de digestion par l'enzyme RsaI :

Le test de digestion révèle trois profils électrophorétique :

- un profil avec une bande intense de 127pb : c'est une bande qui correspond à l'ADN non digéré, dans ce cas, le site de restriction est absent. L'ADN testé est donc homozygote pour l'allèle MICA-129met : Il porte le génotype MICA-129met/met,
- un profil avec une bande intense de 104pb : c'est une bande correspondant à l'ADN digéré, présence d'un site de restriction pour l'enzyme RsaI, l'ADN est donc homozygote pour l'allèle 129val. Le génotype est : MICA129val/val,
Il est à noter que la digestion du fragment 127pb génère un fragment de 104pb et un autre petit fragment de 23pb. Ce dernier n'est pas visible sur le gel d'agarose utilisé qui n'a pas une grande résolution.
- concernant le troisième type de profil, nous observons deux bandes moins intenses de 127pb et 104 pb, la première correspond à l'allèle non digéré et la seconde à l'allèle digéré. Ceci indique que le sujet est hétérozygote pour l'allèle MICA129. Le génotype est : MICA-129met/ 104val (**figure 18**).

La lecture de l'électrophorèse et après digestion des ADN des malades a montré les résultats suivants :

- 27/90 ADN des malades présentent une seule bande de 127pb, ils portent donc le génotype MICA-129met/met,
- 20/90 ADN des malades présentent une seule bande de 104pb, ils portent donc le génotype MICA-129val/val,
- Enfin 43/90 ADN des malades présentent deux bandes de 127pb et 104pb, ils portent le génotype MICA-129met/val.

La lecture de l'électrophorèse des ADN des témoins digérés a montré les résultats suivants :

- 7/78 ADN des témoins présentent une seule bande de 127pb, ils portent donc le génotype MICA-129met/met,

- 38/78 ADN des témoins présentent une seule bande de 104pb, ils portent donc le génotype MICA-129val/val,
- Enfin, 33/78 ADN des témoins présentent deux bandes de 127pb et 104pb, ils portent le génotype MICA-129met/val.

V. 3 Analyse des résultats :

L'analyse des résultats du génotypage MICAm₁₂₉val, a montré une prédominance de l'allèle MICA-129met chez les cas par rapport aux contrôles. Sa fréquence allélique retrouvée chez les cas est de 0,54 alors qu'elle est de 0,30 chez les témoins ($p=11.10^{-6}$) (**tableau 4**).

Il semblerait que l'allèle MICA-129met soit de susceptibilité en apportant un risque supérieur à 1 (OR=2,71).

Nos résultats sont parfaitement concordants à ceux trouvés par Amroun et son équipe dans une population algéroise de 129 cas et 76 témoins. Celle-ci suggère une association significative entre le génotype MICA-129met et la maladie avec des fréquences génotypiques de 0,81 chez les malades et de 0,62 chez les témoins (Amroun et al., 2005).

Le risque trouvé dans cette dernière étude est de 2,57. Il est très proche de celui obtenu dans notre présente étude.

Il apparaît également que l'allèle MICA-129 val serait l'allèle « normal » (non susceptible) dans la population de l'Ouest Algérien, puisqu'il est retrouvé à une fréquence allélique de 0,70 chez les témoins contre 0,46 chez les cas.

L'analyse de la distribution des génotypes met/met, met/val et val/val chez les deux groupes, montrent une augmentation significative du génotype met/met chez les cas par rapport aux contrôles (0,30 vs 0,09) (**tableau 4**).

Tableau 4 : Répartition du polymorphisme 129 met/val entre cas et témoins de l'ouest Algérien

Allèles	CAS n=180	TEMOINS n=156	OR	P	IC
met	97 (0,54)	47 (0, 30)	2,71	0,000011	IC (1,69<OR>4 ,36)
val	83 (0, 46)	109 (0, 70)			
Génotypes	n=90	n=78			
met/met	27 (0, 3)	7 (0, 09)		0,0011	
val/val	20 (0, 22)	38 (0, 49)			
met/val	43 (0,48)	33 (0, 42)			

A partir des résultats obtenus dans l'étude de Amroun et ceux de notre présent travail, il apparaît que la présence de l'allèle MICA-129met est un facteur de susceptibilité à la survenue de la SA. L'expression de cet allèle pourrait jouer un rôle très important dans l'interaction MICA-NKG2D. En effet, une personne portant l'allèle MICA-129met, et subissant un stress cellulaire, va développer une cytotoxicité causée par les NK et les LT γ/δ , et ceci dans les cellules épithéliales gastro-intestinales, les cellules endothéliales ou les fibroblastes tumoraux ou infectés par des virus (Bahram et al. 1994, Groh et al. 1996, Stephens 2001). Cet événement activerait les macrophages et 70 à 90% des lymphocytes T γ/δ dans l'épithélium intestinal grâce à leur récepteur NKG2D (Koning et al., 1989 ; Groh et al., 1998). Ainsi, un sujet génétiquement prédisposé, et en présence d'un agent causal (stress), va déclencher une maladie auto-immune telle que la spondylarthrite ou les spondylarthropaties.

Le signal d'activation des cellules NK, en présence de l'allèle MICA-129met et en présence de stress, domine le signal inhibiteur induit par la reconnaissance de NKG2D par les protéines du CMH classe I (Bauer et al. 1999). Ainsi, alors que les protéines CMH classe I indiquent l'intégrité cellulaire aux TCR et aux

récepteurs des cellules NK, la protéine MICA pour sa part, informe d'un stress cellulaire et induit ainsi une réponse immunitaire même lorsque les protéines CMH classe I sont exprimées correctement. L'association NKG2D -MICA dépend d'une simple substitution d'acide aminé à la position 129 dans le domaine alpha2. Les affinités variables des allèles de MICA pour NKG2D peuvent affecter le seuil d'activation des cellules NK et la modulation des cellules T.

En effet, les molécules MICA qui portent à leur position 129 une méthionine à la place d'une valine, ont une forte affinité avec les récepteurs NKG2D. Ainsi, elles augmenteront le seuil d'activation des NK induisant une cytotoxicité. En revanche, les molécules qui portent à la position 129 l'acide aminé valine, ont une faible affinité aux NKG2D diminuant ainsi l'activation des NK (Steinle et al., 200).

A partir de ces données, nous pouvons comprendre l'effet du polymorphisme MICA-129met sur la SA en déclenchant une cytotoxicité et une autoimmunité chez les personnes génétiquement prédisposés et subissant des facteurs de stress cellulaire.

Une autre étude concernant le polymorphisme MICA-129 a été décrit récemment par une équipe tunisienne sur le cancer du nasopharynx. Celle-ci a montré en revanche, une forte association entre MICA 129val et la maladie (Douika et al., 2009). Ceci explique que la prolifération tumorale peut être due à la faible affinité entre MICA-129val et NKG2D. Par conséquent, une résistance cellulaire s'installe évitant ainsi leur élimination par les NK et les LT.

Cette observation semble être contradictoire avec les résultats observés dans l'étude de l'effet de ce polymorphisme dans la survenue des maladies autoimmunes. En effet, dans les MAI, c'est la présence de l'allèle MICA-129met qui est susceptible de la survenue de ces maladies par l'activation de cytotoxicité induites par les NK et les LT. En revanche, dans le cas des cancers, l'absence de l'activation des NK chez les sujets présentant l'allèle MICA-129val,

entraîne l'échappement de ces cellules cancéreuses à l'action destructive des NK.

L'étude sur le cancer nasopharynx en Tunisie a bien déterminé l'association MICA-129val et l'évolution de ce cancer. Cette association dépend également du gène HLA-E. En effet l'haplotype HLA-E*0103/MICA-129Val est associé à une survenue plus précoce de cette tumeur, alors que les haplotypes HLA-E*0101/MICA-129met et E*0103/MICA-129met sont protecteurs en retardant la survenue de ce cancer (*Douika et al., 2009*). L'allèle MICA-129val peut avoir dans ce cas un rôle additif à la survenue de la maladie et que l'allèle MICA-129met pourrait jouer un rôle protecteur en augmentant la cytotoxicité même en présence du HLA-E, puisque ce dernier être représenter le ligand du récepteur inhibiteur CD49/NKG2A exprimé sur les NK (*Moretta A and al., 2001*). Dans ce cas là, l'expression des molécules MICA est un moyen de contrôler la croissance des cellules tumorales et d'échapper au système immunitaire (*Steinle, A and al., 2001*).

A présent, mis à part ces deux études publiées, il y a un manque d'informations concernant l'importance du polymorphisme de l'allèle MICA-129 dans les maladies inflammatoires et auto immunes incluant la SA. Mais ce qui est intéressant de noter, que ce polymorphisme fait partie d'autres polymorphismes qui déterminent les différents allèles MICA (MICA01...MICA56). La plupart des études des associations MICA/MAI, se sont intéressées au départ qu'aux associations allèles corrélés à ces maladies. Par exemple, l'étude sur la population Sardaigne (Italie) qui a montré une association significative entre l'allèle MICA-A4 et la SA (*Ricci-Vitiani et al., 2000*).

D'autres associations ont été décrite avec d'autres MAI : Allèle MICA-A6/Behçet chez les Japonais, MICA-A5.1/Cœliaque chez les Espagnols, MICA-4/Diabète de type I chez les Coréens, MICA-A9/Psoriasis, MICA-A5, MICA-A5.1/LED chez les italiens et MICA-A4/PR. Il est intéressant de préciser que tous ces allèles possèdent l'acide aminé méthionine à la position 129.

D'autre part, sachant que l'antigène HLA-B27 est le facteur le plus important dans la survenue de la SA, il est intéressant d'écarter l'effet de cette spécificité afin de révéler l'effet indépendant de l'allèle MICA. En effet, le gène MICA est en fort déséquilibre de liaison avec le gène HLAB. Cette forte association entre MICA et HLA-B27 pourrait masquer l'effet du polymorphisme MICA. Pour cela, nous avons élaboré une stratification pour tester l'effet de ce polymorphisme indépendamment du gène HLA-B27.

Pour évaluer si l'association SA/MICA est indépendante ou non du gène HLAB27, nous avons stratifié nos résultats de génotypage MICA met129val en fonction du statut HLA-B27 (*Messal, communication personnelle*). La stratification a concerné un échantillon de 33 cas et 30 témoins au sein de la même population étudiée.

L'analyse de la distribution du polymorphisme met129val du gène MICA a été réalisée aussi bien en présence du HLA-B27 qu'en son absence.

En présence du HLA-B27, l'analyse permettra d'attester d'un effet synergique entre le polymorphisme et la spécificité HLA-B27. En absence du HLA-B27, cette stratification pourrait montrer un effet indépendant du polymorphisme étudié par rapport à HLA-B27.

Distribution des allèles MICA 129 met/val en fonction de HLAB-27:

Dans les deux cas, nos résultats n'ont montré aucune différence statistiquement significative, c'est-à-dire que le polymorphisme n'est corrélé ni à la présence de la spécificité HLA-B27, ni à son absence.

En effet, en présence du HLAB-27, les fréquences alléliques du MICA-129met et du MICA-129val retrouvées chez les cas, sont identiques, soit 0, 5 pour les deux fréquences. En absence du HLAB27, la fréquence allélique du MICA-129met est faible par rapport à celle de l'allèle MICA-129val, aussi bien chez les cas que chez les témoins, ceci rend l'analyse non significative (tableau 5).

Dans notre étude, cette absence de signification peut être due au faible nombre de sujets concernés par la stratification HLA-B27. Effet, sur 90 cas et 78 témoins, seuls 33 cas et 30 témoins ont été concernés par cette stratification, car ces ADN représentent les seuls ADN dont le statut HLA-B27 a été déterminé (tableau 5). Il est donc nécessaire de stratifier l'ensemble des cas et témoins en fonction de HLA-B27.

Tableau 5 : Distribution de l'allèle MICA en fonction du statut HLA-B27

	B27+		OR	P	B27-		OR	P
	met	val			met	val		
CAS n=66	25(0, 38)	25 (0, 38)	NS	NS	6 (0, 09)	10 (0, 15)	NS	NS
TEMOINS n=60	7 (0, 12)	11 (0, 18)			11(0, 18)	31 (0, 52)		

L'étude réalisée par Amroun sur la population algéroise de 129cas et 76 témoins, tous typés pour HLAB27, n'a montré aucun effet synergique ou complètement indépendant du polymorphisme MICA met129val (Amroun et al., 2005).

A partir de ces données bibliographique et à partir de nos résultats, nous ne pouvons pas exclure l'effet du polymorphisme MICA met 129 val par rapport à HLA-B27, puisque ce dernier présente un rôle physiologique très important dans la survenue de la SA. Néanmoins, nous pouvons prédire l'effet de ce polymorphisme sur d'autres gènes et allèles déjà associés à la SA

Distribution du polymorphisme en fonction de l'âge chez les cas :

La Spondylarthrite Ankylosante est une maladie qui peut survenir à un âge précoce chez l'enfant entre 4 à 16 ans. Cependant, la majorité des études montrent que le diagnostic est posé avant l'âge de 40 ans que ce soit chez les malades HLAB27+ ou B27- (Van der Linden SM et al., 1984).

Dans ce présent travail, nous avons essayé de chercher une association entre le polymorphisme étudié et l'âge précoce de la maladie. Ainsi, nous avons regroupés les malades selon deux tranches d'âges : les malades moins de 40 ans et ceux de plus de 40ans.

Puis, nous avons étudié la distribution du génotype MICA-129 selon ces deux tranches d'âge.

Tableau 6 : La distribution du génotype MICA-129 selon deux tranches d'âge

	MICA-129met/129met	MICA-129met/129val ou MICA-129val/129val	OR	P
Moins de 40ans n=36	9	27	NS	NS
40 ANS ET PLUS n=54	18	36		

Les résultats obtenus ne montrent aucune association entre les trois génotypes trouvés chez les cas et les deux tranches d'âges (**tableau 6**).

En revanche, les résultats obtenus par l'équipe de Amroun montrent une importante association entre l'allèle MICA-129met à l'état homozygote et la forme précoce de la maladie, puisque 60% des cas, qui portent le génotype met/met, ont eu leur première attaque à un âge précoce (15ans), indépendamment du HLA B27.

Nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du polymorphisme sur le déclenchement précoce de la maladie puisque nous ne savons pas si les

malades suivis par le service de rhumatologie au CHU ORAN, se sont présentés dès leur première attaque.

Il est probable de penser que des personnes ayant une homozygotie de l'allèle MICA-129met, présentent leur première attaque à un âge précoce. En effet, l'expression des protéines MICA 129met chez les personnes homozygotes pour cet allèle est plus importante que chez les patients hétérozygotes et par conséquent, il y aura une forte affinité avec le NKG2D augmentant ainsi le seuil d'activation des NK, et par conséquent, la cytotoxicité.

Conclusion :

Les travaux immunogénétiques réalisés sur les maladies auto-immunes ne s'intéressaient auparavant qu'aux gènes HLA classiques. Ils ont pu déterminer plusieurs associations entre celle-ci et différents allèles. La spondylarthrite ankylosante en fait partie, puisque la spécificité HLA-B27 est le facteur de risque le plus important dans la survenue de la maladie, car il en est fortement associé.

Récemment, beaucoup d'études se sont intéressés à d'autres gènes pour d'éventuelles associations aux MAI. Le gène MICA, gènes apparentés aux molécules HLA de classe I, a fait l'objet de plusieurs études d'associations avec différentes MAI et cela à travers ses différents allèles. Un peu plus tard, deux études récentes viennent décrire un polymorphisme fonctionnel au niveau de l'exon 3 du gène MICA qui code pour le domaine extracellulaire $\alpha 2$ engendrant soit une méthionine soit une valine à la position 129. Le polymorphisme semble affecter la survenue de la SA ainsi que l'évolution de certains cancer.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'implication de ce polymorphisme MICA met129val dans le développement de la SA dans un échantillon de la population de l'Ouest Algérien. Nous avons constaté une association significative entre l'allèle MICA-129met et la SA. Cette association est parfaitement corrélée aux résultats des travaux réalisés dans une population algéroise.

En effet, la présence de l'acide aminé méthionine à la position 129 du domaine $\alpha 4$ semble affecter l'activation des NK et des $LT\gamma/\delta$. Ainsi, la présence des molécules MICA-129met sur des cellules subissant un stress cellulaire, ont une forte affinité avec les NKG2D portées par ces lignées lymphocytaires, ceci peut déclencher la cytotoxicité engendrant par la suite des maladies auto-immunes.

En revanche, l'allèle MICA-129 val ne semble pas être associé ni à la SA, ni aux MAI, cependant, il est corrélé au développement des cancers.

La présence de l'allèle MICA-129 met peut être associé à la survenue de la SA et peut également protéger de l'évolution de certains cancers et ceci, en déclenchant une cytotoxicité via le complexe MICA-NKG2D.

Il serait intéressant d'étudier le polymorphisme MICA met129val dans d'autres maladies auto-immunes, notamment les maladies intestinales chroniques telles que la maladie de crohn et la maladie cœliaque, pour rechercher d'éventuelle association. En effet, la distribution des molécules MICA reste restreinte et retrouvée surtout sur l'épithélium intestinal, il est donc nécessaire de s'intéresser à ce polymorphisme pour déterminer le quel des deux polymorphismes coderont pour ces protéines restreintes en temps normal, et en cas de stress qui aboutit le plus souvent aux maladies inflammatoires de l'intestin.

Nous nous sommes intéressés également à l'effet de ce polymorphisme dans le développement de la SA par rapport au statut HLA-B27 qui représente le facteur génétique le plus important à la survenue de la SA. Les résultats obtenus n'ont montré aucun effet, ni synergique ni indépendant du polymorphisme étudié par rapport à la spécificité HLA-B27.

Il reste intéressant d'étudier l'influence de ce polymorphisme sur d'autres gènes HLA ou non HLA, associés déjà à la SA, tels que l'allèle HLA-DR4 du gène HLADRB1, le gène HLA-DQB1, HLA-DPB1, aux clusters de l'IL-1, au gène du TNF α ou également au gène CARD15.

1. Amroun H, Djoudi h, Busson M, Allat R, El Sherbini M, Sloma I, Ramasawmy R, Brun M, Dulphy N, Krishnamoorthy R, Toubert A, Charron D, Chérif Abbad M, Tamouza R. Early-Onset Ankylosing Spondylitis Is Associated With a Functional MICA Polymorphism. *Human Immunology* 2005; 66: 1057-1061.
2. Bahram S. MIC genes from genetics to biology. *Adv Immunol* 2000 ; 76 : 1-60
3. Baines M, Ebringer A, Avakian H. The use of enzyme immunoassay (EIA) and radiobinding assay to investigate the crossreactivity of Klebsiella antigens and HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients and healthy controls. *Rheumatol* 1990; 19:341-349.
4. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999 ; 285 : 727-9.
5. Bensa J. C, Présentation des antigènes aux lymphocytes T : Le complexe majeur d'histocompatibilité et les cellules présentatrices d'antigène Septembre *Human Immunology* 2007 ;6 : 45-56.
6. Bignon JD. Système HLA. *EMC Hématologie* 2000 ; 13 :16-20.
7. Braud VM, Allan DS, McMichael AJ. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1999; 75: 89-97.
8. Braun J, Bollow M, Neure. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:499-505.
9. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007; 369:1379-1390.
10. Breban M, Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, Tamouza R, Borot N, Porcher R, Charron D, Dougados M, Breban M. The role of HLA genes in familial spondylarthropathy : a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:201-206.
11. Brewerton D, Hart F, Nicholls A, Caffrey M, James D, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 301:904-907.

12. Camus JP, Koeger AC. Spondylarthritis Ankylosante et entéropathie chronique. *Revmed* 1985 ; 6 :5-7.
13. Clements CS, Kjer-Nielsen L, Kostenko L, Hoare HL, Dunstone MA, Moses E, et al. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:3360-5.
14. Clerget-Darpoux F, Babron MC, Prum B, Lathrop GM, Deschamps I, Hors J. A new method to test genetic models in HLA associated diseases: the MASC method. *Ann Hum Genet* 1988; 52:247-58.
15. Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs C.A, Geng W, Rouhani F.N, Miskinis D, Levine S.J. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:515-526.
16. Cui X, Rouhani F.N, Hawari F, Levine S.J. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J. Immunol.* 2003; 171:6814-6819.
17. Dana-Farber. Second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Sci USA* 1994; 14:6259-63.
18. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T-cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001 ; 15 : 83-93.
19. *Dermatol Br J.* HLA-A in psoriasis vulgaris and in pustular psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2005; 14: 56-64.
20. Djouadi K, Delpech M. Search for susceptibility genes in spondyloarthropathies and ankylosing spondylitis : study of candidate genes. *INIST* 2007; 4: 102-8.
21. Dougados M, Godeau P, Herson S, Piette JC. Spondylarthritis en 100 questions. *Traité de Médecine* 1996; 3: 2056-58.
22. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R et al., The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthropathy [archive], *Arthritis Rheum* 1991;34:1218-1227.

23. Douika H, Arij Ben Chaabena B, Romdhanec A, Ben Romdhaned h, Mamoghlib T, e Fortiera C, Boukouacia W, Harzallahb L, Ghanemb A, Gritlie S, Maknif M, e Charrona D, Krishnamoorthyg R, Guemirab F, Tamouzaa F. Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population. *Human Immunology* 2009; 70: 45-48.
24. Feldtkeller E, Khan M, van der Heijde D, van der LindenS, J Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003; 23:61-66.
25. Gambelunghe G, E Bartoloni, P Bocci², Sindaco D, Ghaderi M, Sanjeevi C, Bistoni O, Bini V, Falorni A. Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005; 44 :287-292
26. Gonzalez S, Brautbar C, Martinez-Borra J, et al: Polymorphism in MICA rather than HLAB/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Hum Immunol* 2001; 62:632-45.
27. Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1010-6.
28. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12445-50.
29. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH and Spies T. Broad
30. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Fardellone P, Fautrel B, Masson C. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondylarthropathies in France. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:190-98.
31. Hammer G, Kanaseki T, Shastri N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 2007 ;26: 397-406.
32. Falk, K., O. Rötzschke, H. G. Rammensee. 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348: 248-251.

33. Hofman I. Spondylarthropaties et maladie de Crohn. *ARD* ; 2003;62 :455-9.
34. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Le gène NOD2 dans la maladie de Crohn. *Nature* 1996; 379:821-3.
35. Jandus C, Bioley G, Rivals J.P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2008 ; 58 : 2307-2317.
36. Karlsson L. DM and DO shape the repertoire of peptide-MHC-class-II complexes. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 65-70.
37. Kellgren JH, Diagnostic criteria for population studies, *Bull Rheum Dis* 1962;13:291-292.
38. Khan MA, Ball E. Genetic aspects of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002; 6:675-9.
39. Kim TH, Rahman P, Jun JB, Lee HS, Park YW, Im HJ. Analysis of CARD15 polymorphisms in Korean patients with ankylosing spondylitis reveals absence of common variants seen in western populations. *J Rheumatol* 2004; 31:1959-61.
40. Koning F, Knot M, Wassenaar F, Van den Elsen P. Phenotypical heterogeneity among human T cell receptor gamma/delta-expressing clones derived from peripheral blood. *Eur J Immunol* 1989 ; 11 :19-23.
41. Laukens D, Peeters H, Cruyssen BV, Boonefaes T, Elewaut D, De Keyser F, Mielants H, Cuvelier C, Veys EM, Knecht K, Van Hummelen P, Remaut E, Steidler L, De Vos M, Rottiers P. Altered gut transcriptome in spondyloarthritis. *Ann Rheum* 2006 ; 10:1293-300.
42. Laukens D, Peeters H, Marichal D, Vander Cruyssen B, Mielants H, Elewaut D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Berghe M, Rottiers P, Veys EM, Remaut E, Steidler L, De Keyser F, De Vos M. DMBR, Ghent University - VIB, Ghent, Belgium. CARD 15 gene polymorphisms in patients with spondylarthropathies identify a specific phenotype previously related to Crohn's disease. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 930-5.

43. Li Y, Xia B, Lü M, Ge L, Zhang X. An association between MICB 0106 allele and Ulcerative colitis in Chinese Han in Hubei province. *Zhonghua Nei Ke Zhi* 2008Mar; 47:213-6.
44. Messal I communication personnelle. Implication de la spécificité HLA-B27 dans la Spondylarthrite Ankylosante, 2009.
45. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, Toth MV, Marshall GR, Clawson L, Selk L, Kent SB, Wlodawer A. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate. *Science* 1989; 12:1149-52.
46. Mok JW, Lee YJ, Kim JY, Lee EB, Song YW, Park MH, Park KS. Association of Mica polymorphism with rheumatoid arthritis patients Koeans. *Hum immunol* 2003; 12:1190-4.
47. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223.
48. PMID: 4137713 [PubMed - indexed for MEDLINE].
49. Purrmann J, Zeidler H, Bertrams J. HLA antigens in ankylosing spondylitis associated with Crohn's disease. *Rheumatol* 1988; 15:1658-166.
50. Ricci-Vitiani L, Vacca A, Potolicchio I, Scarpa R, Bitti P, Sebastiani G, Passiu G, Mathieu A, Sorrentino R. MICA gene triplet repeat polymorphism in patients with HLA-B27 positive and negative ankylosing spondylitis from Sardinia *J Rheumatol*. 2000; 9:2193-7.
51. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, Jabri B. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 2001; 167: 5527-30.
52. RUEDA B, PASCUAL M, LOPEZ-NEVOT M, KOELEMAN B, ORTEGA E, MALDONADO J, LOPEZ M, MARTIN J. Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *The American journal of gastroenterology* 2003; 4: 359-362.
53. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002 ; 419: 480-483.

54. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 9 :13282-7.
55. Spies T, Bahram S, Bresnahan M, Geraghty D.E. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91:6259-6263.
56. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. Immunogenetics 2001; 53: 279-87.
57. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. Science. 2001; 7:489-93.
58. Stephens LA, Mason D. Characterisation of thymus-derived regulatory T cells that protect against organ-specific autoimmune disease. Microbes Infect 2001; 11:905-10.
59. Svejgaard A, Nielsen LS, Svejgaard E, Nielsen FK, Hjortshoj A, Zachariae H. HLA In psoriasis vulgaris and in pustular psoriasis – population and family studies. Br J Dermatol 1974; 9:145-53.
60. Tieng V, Tamouza R, Dulphy N, Allez M, Janin A, Charron D, Toubert A. Le récepteur NKG2D et ses ligands (MIC et autres molécules) : un mécanisme d'activation de la réponse immune au cours de processus tumoraux ou infectieux. Hématologie 2003 ; 1 : 37-42.
61. Toussirot E, Wenliang D. Immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante. Revmed 2006 ; 27 : 762-771.

62. Valés Gómez M, Chisholm SE, Cassady-Cain RL, Roda-Navarro P & HT Reyburn. Selective induction of NKG2D ligand expression by proteasome inhibitors. *Cancer Res* 2008; 68:1546-54.
63. Van Bohemen ChG, Grumet FC, Zanen HC: Identification of HLA-B27 M1 and M2 cross-reactive antigens in *Klebsiella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Immunology* 1984; 52:607-609.
64. Van der Linden SM, Valkenburg HA, Cats A, Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria, *Arthritis Rheum* 1984;27:361-368.
65. Van der Linden SM, Valkenburg HA, Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum* 1984; 27:241-9.
66. Wendling D, Cedoz J.P, Racadot E. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2007 ; 74 : 304-305.
67. Won Mok J, Lee J, Yonj, BongLee, Wook Song Y, Hee Park ; Sook Park M. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. *Human immunology* 2003; 5: 1190-1194.
68. Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kaklamani E, Inoko H, Ohno S. Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behçet's disease in Greece. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 9:1921-6.
69. Yan J, Parekh V, Mendez-Fernandez Y, Olivares-Villagomez D, Dragovic S, Hill T, Roopenian C, Joyce S, Van Kaer L. In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *2006 J. Exp. Med*; 203: 647-659.