

THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

Présenté par : Mme DAHMANI Chahinez Amira

Intitulé

Contribution à l'étude immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante dans l'Ouest Algérien par l'exploration de polymorphismes nucléotidiques simples et de variations de nombre de copies

Faculté : Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Génétique Moléculaire Appliquée
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Biologie
Intitulé de la Formation : Génétique moléculaire et cellulaire

Devant le Jury Composé de :

<i>Membres de Jury</i>	<i>Grade</i>	<i>Qualité</i>	<i>Domiciliation</i>
<i>Mme. Saidi-Mehtar Nadhira</i>	<i>Professeur</i>	<i>Président</i>	<i>USTO-MB, Algérie</i>
<i>Mr. Boudjema Abdallah</i>	<i>Professeur</i>	<i>Encadrant</i>	<i>USTO-MB, Algérie</i>
<i>Mme. Zemani-Fodil Faouzia</i>	<i>Professeur</i>	<i>Co-Encadrant</i>	<i>USTO-MB, Algérie</i>
<i>Mme. Saidi-Ouahrani Nadjia</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineurs</i>	<i>USTO-MB, Algérie</i>
<i>Mme. Aberkane Meriem Samia</i>	<i>Professeur</i>		<i>Université d'Oran 1, Algérie</i>
<i>Mr. Benzaoui Ahmed</i>	<i>Professeur</i>	<i>Invité(e)</i>	<i>CHU d'Oran, Algérie</i>
<i>Mme. Petit-Teixeira Elisabeth</i>	<i>Professeur</i>	<i>Invité(e)</i>	<i>Université d'Evry Val</i>

Année Universitaire : 2017-2018

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Un grand merci au **Pr. SAIDI-MEHTAR Nadhira** ; qui me fait l'honneur d'accepter d'être présidente de ce jury de soutenance, je reste convaincue que votre présence m'assurera la valorisation de mon travail de thèse. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC-USTO-MB) et je vous adresse ici, l'expression de mon éternel respect et ma sincère gratitude.

Je remercie très vivement **Pr. SAIDI-OUAHRANI Nadja** ; d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury afin de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je vous remercie pour vos qualités humaines et vos nombreux encouragements. Je vous adresse toute ma gratitude madame. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

Mes remerciements les plus sincères vont au **Pr. ABERKANE Meriem Samia** ; qui me fait l'honneur d'examiner ce travail de thèse et de l'enrichir avec ses expériences et compétences scientifiques. Je vous dois un grand respect et une profonde reconnaissance pour votre générosité et tous vos encouragements durant ces dernières années.

Je remercie également **Pr. BENZAOUI Ahmed** ; de faire partie de ce jury et de m'avoir fait l'honneur de sa présence à ma soutenance. Vous m'avez fait découvrir votre discipline « rhumatologie » et vous m'avez permis et facilité de réaliser le recrutement des patients atteints de la spondylarthrite ankylosante au service de rhumatologie au centre hospitalo-universitaire d'Oran (CHUO). Veuillez accepter ce travail, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance. Je remercie chaleureusement tous les membres de votre équipe pour leur grande disponibilité qui m'a facilité cette tâche.

Je remercie tout particulièrement **Pr. PETIT-TEIXEIRA Elisabeth** ; pour son attention de tout instant sur mes travaux durant mes séjours au sein de son laboratoire de recherche de la polyarthrite rhumatoïde, GenHotel EA3886, Université d'Evry Val

d'Essonne, France. Je vous suis reconnaissante pour toutes vos remarques et conseils avisés et surtout votre écoute et votre confiance qui ont été un élément moteur pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous madame. Je serai honorée par votre présence à ma soutenance.

J'exprime tous mes remerciements à mon directeur de thèse **Pr. BOUDJEMA Abdallah** ; qui était un encadreur attentif et disponible, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris durant toutes ces années de thèse. Il a cru en mes capacités et m'a accordé sa confiance en acceptant d'encadrer ce travail de doctorat ; je lui exprime ici toute ma reconnaissance pour ses encouragements et ses corrections continues qui m'ont permis de mener à bien cette étude. Travailler avec vous fut pour moi un grand plaisir.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au **Pr. ZEMANI-FODIL Faouzia** ; mon co-directeur de thèse ; pour ses compétences, son incroyable polyvalence, son dynamisme et pour son ardeur au travail. Je vous remercie de m'avoir encouragé au cours de ce travail de thèse et de votre disponibilité continue. Ma sincère gratitude et un grand respect vous sont personnellement adressés.

Un Grand merci au **Pr. AMROUN Habiba** ; qui a accepté chaleureusement de nous recevoir au laboratoire d'Immunogénétique et de Transplantation au Département d'Immunologie à l'institut Pasteur d'Algérie à Alger. Je vous suis personnellement reconnaissante ainsi que vos collègues pour l'aide généreuse que vous nous avez fourni au sein de ce laboratoire. Je vous adresse ici, l'expression de ma sincère gratitude.

Mes remerciements les plus profonds s'adressent à toute l'équipe du LGMC-USTO-MB, ou j'ai rencontré de **vrais amis**, qui sauront se reconnaître ; sans eux je n'aurais pu résister aux moments de doutes. Ils m'ont apporté beaucoup de joie, de soutien et d'encouragements.

Je remercie finalement les personnes formidables ; Dr.Valérie Chaudru, Pr.Javier Perea, Dr.Anna Niarakis, Maeva, et Vidisha ; que j'ai rencontrées durant mes séjours au laboratoire de GenHotel EA3886.

Je dédie ce mémoire tout simplement à :

Mes deux PARENTS, qui m'ont transmis l'éducation et l'envie du savoir

Mon seul petit FRERE, qui a toujours adoré me débattre avec sa philosophie

Mon cher EPOUX, qui m'a tendrement soutenu toutes ces longues années

Ma meilleure AMIE, qui a su apaiser mes souffrances et accentuer ma joie

Mes AMIES, qui étaient toutes là pour le meilleur et pour le pire

Ma FAMILLE, qui a partagé toutes mes joies et mes peines

Ma BELLE-FAMILLE, qui m'a généreusement accueillie, encouragée et rassurée

Christine D. qui m'a gentiment aidée, reçue et hébergée à Paris

A mon cher pays, l'Algérie

Résumé

La spondylarthrite ankylosante (SA) est un rhumatisme inflammatoire chronique. Plus d'une vingtaine de locus de susceptibilité à la SA ont été identifiés à ce jour, mais le *HLA-B27* reste le facteur de risque génétique majeur.

L'objectif de ce travail était de rechercher les associations entre des gènes-candidats et la susceptibilité à la SA. Nous avons tout d'abord, vérifié l'association entre l'antigène HLA-B27 et la maladie dans la population de l'Ouest Algérien. Ensuite, nous avons recherché l'association entre les polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C), [*ACE*] rs4340 (I/D) et la SA. Nous nous sommes également intéressé à étudier l'impact des variations de nombre de copies (CNVs) au niveau des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *CCL3L1* sur la survenue de cette maladie.

La présente étude a été réalisée sur deux échantillons, 83 patients atteints de la SA et 131 contrôles, tous originaire de l'Ouest Algérien. Le génotypage a été réalisé par la technique de discrimination allélique en temps réel (TaqMan) pour l'exploration des SNPs [*CTLA4*] rs3087243, [*REL*] rs13031237, [*CD40*] rs4810485 et [*PRKCQ*] rs4750316. Par ailleurs, nous avons utilisé la technique de la PCR multiplex pour le génotypage du polymorphisme [*ACE*] rs4340. Enfin, les marqueurs CNVs ont été explorés par la *Droplet Digital PCR* (ddPCR).

Nous avons confirmé l'association entre la spécificité *HLA-B27* et la survenue de la SA dans la population de l'Ouest algérien. De plus, nos résultats suggèrent que l'allèle *G* du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 semble être associé à la susceptibilité de développer la SA. Après stratification selon l'âge et le sexe, ce polymorphisme a été associé à la SA dans le groupe de femmes et le groupe de sujets ayant un âge > 30 ans. Par ailleurs, notre étude a montré que les CNVs < 2 copies du gène *FCGR3A* semblent être associés à la survenue de la SA dans la population Algérienne. Après stratification selon l'âge et le sexe, les délétions du gène *FCGR3A* ont été associé à la SA dans le groupe de femmes et celui des sujets ayant plus que 30 ans.

Pour conclure, cette étude suggère que le polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 et les CNVs < 2 copies du gène *FCGR3A* auraient un effet indépendant de l'antigène HLA-B27 dans la contribution génétique de la SA dans la population de l'Ouest algérien. Cependant, les CNVs > 2 copies du gène *CCL3L1* auraient plutôt, un effet additif.

En perspectives, il serait nécessaire de confirmer nos résultats sur un échantillon plus large et d'explorer d'autres polymorphismes de nouveaux gènes candidats.

Mots-clés : Spondylarthrite ankylosante, *HLA-B27*, SNPs, CNVs, Ouest algérien.

Abstract

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory rheumatism. Until now, more than twenty susceptibility loci to AS disease have been identified, but HLA-B27 remains the major genetic risk factor.

The aims of this work were to investigate associations between candidate genes and the susceptibility to AS. We first checked the association between the HLA-B27 antigen and the disease in the population of western Algeria. Next, we looked for the association between polymorphisms [*CTLA4*] rs3087243 (A> G), [*REL*] rs13031237 (G> T), [*CD40*] rs4810485 (G> T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G> C), [*ACE*] rs4340 (I / D) and the AS risk. We have also studied the impact of copy number variations (CNVs) on the *FCGR3A*, *FCGR3B* and *CCL3L1* genes on the occurrence of this disease.

The present study was performed on two samples, 83 patients with AS and 131 controls, all from western Algeria. Genotyping for SNPs [*CTLA4*] rs3087243, [*REL*] rs13031237, [*CD40*] rs4810485 and [*PRKCQ*] rs4750316 was performed by the real-time allelic discrimination (TaqMan). In addition, we used the multiplex PCR technique for genotyping the [*ACE*] rs4340 polymorphism. Finally, CNVs polymorphisms have been explored by the *Droplet Digital PCR* (ddPCR).

We confirmed the association between the HLA-B27 specificity and the onset of AS disease in the population of western Algeria. Our results suggest that the G allele of the [*CTLA4*] polymorphism rs3087243 seems to be associated with the development of AS. After stratification by age and gender, this polymorphism was associated with AS in the group of women and the group of subjects > 30 years of age. Our study also shows that CNVs less than 2 copies (<2 copies) of the *FCGR3A* gene appear to be associated with the onset of AS.

In addition, this study suggested that the [*CTLA4*] rs3087243 polymorphisms and the CNVs < 2 copies of the *FCGR3A* gene have an HLA-B27 antigen-independent effect in susceptibility to AS in the western Algerian population. However, CNVs > 2 copies of the *CCL3L1* gene have an additive effect.

Our results need to be confirmed on a larger sample and other candidate genes polymorphisms should be explored.

Keywords: Ankylosing spondylitis, HLA-B27, SNPs, CNVs, West Algerian.

الملخص

التهاب المفاصل اللاصق هو روماتيزم التهابي مزمن. تم التعرف على أكثر من 20 موقع قابلية للإصابة بالمرض حتى الآن، لكن يبقى عامل الخطر الجيني الرئيسي المتمثل في *HLA-B27*.

الهدف من هذه الدراسة هو التحقق من الارتباطات بين الجينات المرشحة والقابلية للإصابة بمرض التهاب المفاصل اللاصق. فحصنا أولاً الارتباط بين المرض في سكان غرب الجزائر والمستضد *HLA-B27*. ثم بحثنا على العلاقة بين الأشكال: *[CTLA4] rs3087243 (A>G)*, *[REL] rs13031237 (G>T)*, *[CD40] rs4810485 (G>T)*, *[PRKCQ] rs4750316 (G>C)*, *[ACE] rs4340 (I/D)*

لقد درسنا أيضاً تأثير التغيرات في عدد النسخ (التنوعات) في الجينات *CCL3L1* و *FCGR3A* و *FCGR3B* على حدوث هذا المرض. تم إجراء هذه الدراسة على عينتين، 83 مريض مع ضوابط المرض و 131 أصحاء، كل الأشخاص من غرب الجزائر. وقد أجري التنميط الجيني بتقنية تمييز أليلية في الوقت الحقيقي (TaqMan) للتحقق عن تعدد الأشكال:

[CTLA4] rs3087243، *[REL] rs13031237*، *[CD40] rs4810485* و *[PRKCQ] rs4750316* بالإضافة إلى ذلك، استخدمنا تقنية *PCR* متعددة لقياس التنميط الجيني للشكل الوراثي *[ACE] rs4340*. وأخيراً، تم استكشاف تعدد الأشكال *CNV* بواسطة *PCR Droplet (ddPCR)*.

لقد أكدنا العلاقة بين خصوصية *HLA-B27* وبداية *AS* في سكان غرب الجزائر. نتائجنا تشير إلى أن تعدد الأشكال *[CTLA4] rs3087243 G* يبدو أن تترافق مع تطور *AS*. بعد تقسيم عينة الدراسة حسب الدرجة العمرية و حسب الجنس اتضح انه هاد الشكل الجيني مرتبط مع المرض في مجموعة الإناث و مجموعة الأشخاص الذين يتجاوز سنهم < 30 عاماً.

وقد أظهرت دراستنا أيضاً أن التنوعات > 2 نسخ من الجين *FCGR3A* تتوافق مع حدوث المرض. بعد التقسيم الطبقي حسب العمر والجنس، ارتبط حدوث المرض في مجموعة النساء والأشخاص الفائقين 30 عاماً مع اليات حذف الجين *FCGR3A*

وعلاوة على ذلك، أشارت هذه الدراسة إلى أن التعدد *[CTLA4] rs3087243* ونسخ < 2 *CNVs* من الجين *FCGR3A* الشكل الجيني

لها تأثير مستقلة عن المستضد المدروس في التعرض لمرض المفاصل اللاصق في عدد السكان في غرب الجزائر. ومع ذلك، فإن نسخ > 2 *CNVs* من الجين *CCL3L1* سيكو له تأثير مضافة إلى حد ما.

يجب تأكيد نتائجنا على عينة أكبر، وينبغي علينا التحقق في الأشكال الأخرى من جينات المرشح

الكلمات المفتاحية: *SNPs*، *HLA-B27*، التهاب المفاصل اللاصق، غرب الجزائر.

Production scientifique

Ce travail de thèse a fait l'objet de la publication et les communications suivantes :

1- Publication :

Dahmani Chahinez.A., Benzaoui A, Amroun H, Mecabih F, Sediki FZ, Zemani-Fodil F, Fodil M, Boughrara W, Mecheti B, Attal N, Mehtar N, Petit-Teixeira E, Boudjema A. (2018) "Association of the HLA-B27 antigen and the CTLA4 gene CT60/rs3087243 polymorphism with ankylosing spondylitis in Algerian population: A case-control study". *Int J Immunogenet* 45(3):109-117.

2- Communications

2-1. Communications internationales :

Affichées :

DAHMANI Chahinez.Amira, BENZAOUI A, BOUGHRARA W, SEDIKI F.Z, PETIT-TEIXEIRA E, BOUDJEMA A. Genetic association between CT60 A/G polymorphism of CTLA4 gene and the occurrence of ankylosing spondylitis in the Algerian population. *8èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale. Cité internationale 3,4 et 5 Février 2016.*

Chahinez Amira Dahmani, A. Benzaoui, F.Z. Sediki, L. Adda Neggaz, F. Zemani Fodil, E. Petit-Teixeira, A. Boudjema. The rs3087243 polymorphism is associated with the occurrence of ankylosing spondylitis in West Algerian population. *International Conference on Health Sciences and Medical Technologies ICHSMT'16, Tlemcen, Algeria 27-29 September 2016.*

DAHMANI Chahinez Amira, Benzaoui Ahmed, Adda Neggaz Leila, Sediki F.Z, Boughrara W, Rahmoun N, Zemani-Fodil F, Fodil, Petit-Teixeira E, BOUDJEMA A. Etude d'association génétique entre les polymorphismes rs4810485 du gène CD40 et rs13031237 du gène REL et la survenue de la spondylarthrite ankylosante dans la population de l'Ouest Algérien. *1^{er} colloque international ; Bioscience 2017. Oran : 28-29 Octobre 2017.*

2-2. Communications nationales :

Orales :

Dahmani Chahinez.A, Zemani-Fodil Faouzia, Boudjema Abdallah. Fabrication de la « Taq Polymérase » dans « Biologie Moléculaire Entreprise » (BME). *Doctoriales Boumerdès 1^{ère} édition du 29-14 mars 2014. Université M'Hamed Bougara.*

Dahmani Chahinez.A, Benzaoui Ahmed, Fodil Mostéfa, Boughrara Wefa, Sediki Fatima Zohra, Petit-Teixeira Elisabeth, Boudjema Abdallah. Association génétique entre le polymorphisme CT60A/G du gène CTLA4 et la survenue de la spondylarthrite ankylosante dans la population algérienne. *11^{ème} congrès de la Société Algérienne des rhumatologues SAR. Alger : 09-11 Octobre 2015.*

Dahmani Chahinez.A, Benzaoui Ahmed, Fodil Mostéfa, Boughrara Wefa, Sediki Fatima Zohra, Petit-Teixeira Elisabeth, Boudjema Abdallah. Rôle de l'association génétique entre le polymorphisme 6230 A>G et la survenue de la spondylarthrite ankylosante dans la population algérienne. *1^{er} Colloque International de Biologie Appliquée, Faculté SNV, Université USTOMB, Oran, Algérie : 29 nov-1 déc. 2015.*

Table des matières

Liste de figures	I
Liste de tableaux	IV
Liste des annexes	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction	02
Revue Bibliographique	04
I. Epidémiologie de la Spondylarthrite	05
I.1. Age de survenue de la spondylarthrite ankylosante.....	05
I.2. Sexe ratio dans la spondylarthrite ankylosante.....	05
I.3. Prévalence de la spondylarthrite ankylosante.....	06
II. Concept des Spondylarthropathies	08
II.1. Description de la spondylarthrite ankylosante.....	09
II.2. Diagnostic de la spondylarthrite ankylosante.....	09
II.2.1. Critères de diagnostic.....	09
II.2.2. Critères biologiques.....	10
II.2.3. Critères d'activité et de sévérité.....	11
II.3. Manifestations articulaires de la spondylarthrite ankylosante.....	12
II.4. Manifestations extra-articulaires de la spondylarthrite ankylosante.....	14
II.4.1. Atteintes ophtalmiques.....	14
II.4.2. Atteintes cutanées et digestives.....	14
III. Traitements de la Spondylarthrite Ankylosante	15
III.1. Traitements médicamenteux symptomatiques.....	15
III.1.1. Les Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS)	15
III.1.2. Les antalgiques.....	16
III.1.3. Les corticoïdes.....	16
III.2. Les traitements de fond classiques.....	16
III.3. Les biothérapies.....	17
III.5. La kinésithérapie et l'hygiène de vie.....	18
III.6. Le traitement chirurgical.....	18

IV. Etiologie de la spondylarthrite ankylosante.....	19
V.1. Facteurs environnementaux.....	19
I.2. Facteurs génétiques.....	20
V. Immunopathologie de la spondylarthrite ankylosante.....	22
VI. Association et liaison génétique avec la spondylarthrite ankylosante.....	28
VI.1. Impact des gènes-HLA sur la susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante.....	28
VI.2. Impact des gènes-non HLA sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante.....	31
VI.2.1. Les études de liaison génétique.....	31
VI.2.2. Les études d'association génétique.....	32
VI.3. Association entre la molécule CTLA-4 et la survenue de la spondylarthrite ankylosante	37
VI.3.1. Rôle de CTLA-4 dans l'activation des lymphocytes T.....	37
VI.3.2. La protéine CTLA-4.....	38
VI.3.3. Le gène CTLA4.....	38
VI.3.4. Les polymorphismes du gène CTLA4.....	39
VI.3.5. Le polymorphisme A6230G (CT60 ou rs3087234).....	40
VI.4. Association entre la molécule c-REL et la survenue de la spondylarthrite ankylosante.....	41
VI.4.1. Les protéines NF-kB/Rel.....	41
VI.4.2. La protéine c-Rel.....	42
VI.4.3. Le gène REL.....	43
VI.4.4. Les polymorphismes du gène REL.....	43
VI.5. Association entre la molécule de surface CD40 et la spondylarthrite ankylosante.....	44
VI.5.1. La molécule CD40.....	46
VI.5.2. Le gène CD40.....	46
VI.5.3. Les polymorphismes du gène CD40.....	47
VI.6. Association entre l'enzyme PKC-thêta et la spondylarthrite ankylosante.....	48
VI.6.1. La famille PKC.....	48
VI.6.2. La PKC-thêta.....	49
VI.6.3. Le gène PRKCQ.....	50
VI.6.4. Les polymorphismes du gène PRKCQ.....	51

VI.7. Association de l'enzyme ACE avec la spondylarthrite ankylosante.....	52
VI.7.1. Le système rénine-angiotensine (SRA).....	52
VI.7.2. Les voies de signalisation du SRA.....	53
VI.7.3. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE).....	54
VI.7.4. Structure du gène ACE.....	54
VI.7.5. Polymorphismes du gène ACE.....	54
VI.8. Association entre les récepteurs Fc Gamma et la spondylarthrite ankylosante.....	57
VI.8.1. Les récepteurs FcγRIII.....	58
VI.8.2. Les variants de nombre de copie des gènes FCGR.....	58
VI.9. Association entre la molécule CCL3L1 et la spondylarthrite ankylosante.....	59
VI.9.1. La chimiokine CCL3L1.....	59
VI.9.2. Les variations de nombre de copie du gène CCL3L1.....	60
Objectifs de la thèse.....	63
Matériel et Méthodes.....	65
I. Population d'étude.....	66
I.1. Le groupe des Cas.....	66
I.2. Le groupe des Témoins.....	66
II. Extraction d'ADN.....	67
III. Génotypage moléculaire.....	67
III.1. Technique de discrimination allélique en temps réel (TaqMan)	67
III.1.1 Génotypage de l'allèle HLA-B27.....	69
III.1.2. Génotypage des SNPs.....	69
III.2. Technique d'amplification par PCR multiplex.....	70
III.2.1. Identification du polymorphisme Insertion/Délétion.....	70
III.3. Technique de la PCR QX200 Droplet Digital (ddPCR)	71
III.3.1. Caractérisation des CNVs du gène CCL3L1.....	72
III.3.2. Caractérisation des CNVs des gènes FCGR3A et FCGR3B.....	73
IV. Les tests de stratifications.....	74
IV.1. Stratifications selon les paramètres anthropologiques.....	74
IV.2. Stratifications selon les paramètres cliniques.....	74

V. Etude Statistique	74
V.1. L'équilibre d'Hardy-Weinberg (HWE).....	74
V.2. Etude d'association gène-candidat.....	74
Résultats et Discussion	76
I. Description de la population d'étude	77
II. Résultats de l'étude d'association de <i>HLA-B27</i> avec la spondylarthrite ankylosante	77
III. Résultats de l'étude d'association entre les polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) et la spondylarthrite ankylosante	78
III.1. Recherche des fréquences des allèles mineurs dans notre population d'étude.....	78
III.1.1. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs3087243 du gène CTLA4.....	78
III.1.2. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs13031237 du gène REL.....	78
III.1.3. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs4810485 du gène CD40.....	79
III.1.4. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs4750316 du gène PRKCQ.....	79
III.1.5. Fréquence de l'allèle mineur MAF du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D)	79
III.2. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	80
III.2.1. Impact du polymorphisme rs3087243 du gène CTLA4 sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	80
III.2.2. Impact du polymorphisme rs13031237 du gène REL sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	82
III.2.3. Impact du polymorphisme rs4810485 du gène CD40 sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	83
III.2.4. Impact du polymorphisme rs4750316 proche du gène PRKCQ sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	84
III.2.5. Impact du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	85
IV. Résultats de l'étude d'association des CNVs des gènes <i>CCL3L1</i>, <i>FCGR3A</i> et <i>FCGR3B</i> avec la spondylarthrite ankylosante	87
IV.1. Impact des CNVs du gène <i>CCL3L1</i> sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante.....	88
IV.1.1. Fréquence des CNVs du gène <i>CCL3L1</i> chez la population témoin.....	88

IV.1.2. Impact des CNVs du gène <i>CCL3L1</i> sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	89
IV.2. Impact des CNVs des gènes FCGR3A et FCGR3B sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante.....	90
IV.2.1. Fréquence des CNVs de FCGR3A et FCGR3B chez la population Témoin.....	90
IV.2.2. Impact des CNVs des gènes FCGR3A et FCGR3B sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante.....	91
V. Stratifications des résultats selon le statut HLA-B27.....	94
V.1. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T) et [PRKCQ] rs4750316 (G>C) sur la survenue de la SA selon le statut HLA-B27.....	94
V.2. Impact des CNVs de gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B sur la survenue de la SA selon le statut HLA-B27.....	94
VI. Stratifications des résultats selon le sexe et l'âge.....	96
VI.1. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la survenue de la SA selon le sexe et l'âge.....	96
VI.2. Impact des CNVs de gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B sur la survenue de la SA selon le sexe et l'âge.....	98
VII. Stratifications des résultats selon les facteurs d'activité.....	99
VII.1. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la survenue de la SA selon les facteurs d'activité et de sévérité.....	99
VI.2. Impact des CNVs de gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B sur la survenue de la SA selon facteurs d'activité et de sévérité	99
Conclusion et Perspectives.....	101
Annexes.....	105
Références Bibliographiques.....	137

Liste des Figures

Figure 1 : Gradient décroissant Nord/Sud de la prévalence de la SA et de la fréquence du HLA-B27 (<i>Zochling J. 2010</i>), (<i>Sieper J et al. 2006</i>), (<i>Pertuiset E. 2008</i>).....	6
Figure 2 : Le concept des spondyloarthrites et ses différentes formes (<i>d'après Sibia J et al. 2005</i>).....	8
Figure 3 : Schéma de l'atteinte d'une articulation sacro-illiaque, Rachidienne et du costo-sternum (www.rhumatismes.net mise à jour septembre 2005).....	12
Figure 4 : Schéma d'une articulation normale et arthritique (http://www.euroas.org mise à jour septembre 2015).....	13
Figure 5 : Localisation anatomique de l'enthèse au cours d'une talalgie (<i>Benokba K. 2017</i>).....	23
Figure 6 : Phase d'inflammation de l'enthèse, l'enthésite (<i>Taurog JD et Lipsky PE. 1994</i>).....	23
Figure 7 : L'articulation sacro-iliaque au cours d'une spondylarthrite (<i>d'après Dougados M et al. 2005</i>).....	24
Figure 8 : Différenciation des lymphocytes Th0 en Th17 (destruction osseuse de la spondylarthrite ankylosante) (<i>Samson M et al. 2011</i>).....	26
Figure 9 : Formation d'une colonne en bambou (<i>Samson M et al. 2011</i>).....	27
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B27 (<i>Miceli-Richard C. 2010</i>).....	29
Figure 11 : Les microremaniements affectant les segments d'ADN (<i>d'après Estivill X & Armengol L. 2007</i>).....	35
Figure 12 : Rôle des molécules de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes T (LTs).....	37

Figure 13 : Localisation des polymorphismes du gène CTLA4 (<i>d'après Harper et al, 1991 ; Ling et al, 1999</i>).....	39
Figure 14 : Synthèse des rôles que joue le facteur NF- κ B (<i>Jane de Lartigue. 2013</i>).....	41
Figure 15 : structure de la protéine REL humaine (<i>Gilmore et Gerondakis. 2011</i>).....	42
Figure 16 : La voie de signalisation du complexe CD40-CD40L via les voies classique et alterne du NF- κ B dans les LB (<i>D'après Corinti et al. 1999</i>).....	44
Figure 17 : Structure du gène CD40 et de la protéine CD40 humaine (<i>Van Kooten et Banchereau J. 2000</i>).....	46
Figure 18 : Structure et réglementation du recrutement de la PKC θ (<i>d'après Arendt CW et al. 2002</i>).....	48
Figure 19 : Recrutement de la PKC-thêta à la synapse immunologique (<i>Vedran B et al. 2015</i>).....	49
Figure 20 : Positionnement des SNPs sur les gènes PRKCQ, IL-2RA et LOC399716 (<i>d'après Barrett JC et al. 2009</i>).....	50
Figure 21 : Le système rénine-angiotensine (SRA) (http://master.univ-paris-diderot.fr , mise à jour 11/2002).....	51
Figure 22 : Schéma simplifié du métabolisme des angiotensines et de leurs effets physiologiques médiés par les récepteurs AT (<i>Jean-Baptiste M. 2004</i>).....	52
Figure 23 : Représentation schématique du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine humaine (<i>Sayed-Tabatabaei F.A et al. 2006</i>).....	54
Figure 24 : Structure des classes de Fc γ R humains (<i>Li X. et al. 2009</i>).....	56
Figure 25 : Cluster des gènes Fc γ Rs au niveau du chromosome 1 (<i>d'après Marques R.B. et al. 2010</i>).....	57

Figure 26 : Le cluster du gène <i>CCL3L1</i> (<i>Shrestha S. et al. 2010</i>).....	58
Figure 27 : Hydrolyse de sondes (TaqMan assay) (<i>Poitras E et Houde A. 2002</i>).....	66
Figure 28 : Tests d'interférence des sondes des gènes <i>CCL3L1</i> vis à vis le gène de référence <i>RPP30</i>	87
Figure 29 : Distribution des CNVs du gène <i>CCL3L1</i> chez les 99 contrôles de l'Ouest Algérien.....	88
Figure 30 : Distribution des CNVs des gènes <i>FCGR3A</i> et <i>FCGR3B</i> chez les contrôles de l'Ouest Algérien.....	90
Figure 31 : Photo d'une cassette DG8 QX200 pour la ddPCR.....	124
Figure 32 : Photo d'une cassette DG8 placée dans le générateur de <i>droplets</i> QX200.....	125
Figure 33 : Photo de lecteur de <i>droplets</i> QX200 et ses consommables (BioRad).....	125
Figure 34 : Photo prise sur les caractéristiques d'une plaque de ddPCR sur la plateforme du logiciel <i>QuantaSoft</i> TM	126

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Critères de classification des SpA d'Amor et d'ESSG (*Amor et al, 1990*) (*Dougados et al, 1991*).

Tableau 2 : Récapitulatif des hypothèses pouvant expliquer le rôle joué par le HLA-B27 dans la SA (*Breban M. 2004*).

Tableau 3 : Résultats des études d'association GWAS dans la SA (*IGAS. 2013*).

Tableau 4 : Résultats des études d'association gènes-candidats dans la SA.

Tableau 5 : Caractéristiques de la population d'étude Cas-Témoins 1

Tableau 6 : Caractéristiques de la population d'étude Cas-Témoins 2

Tableau 7 : Les SNPs sélectionnés pour le génotypage par la technologie TaqMan

Tableau 8 : Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification du polymorphisme I/D du gène de l'*ACE*

Tableau 9 : Caractéristiques des amorces d'amplification et de la sonde spécifique du gène cible *CCL3L1* et du gène de référence *RPP30*

Tableau 10 : Caractéristiques des sondes spécifiques des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*

Tableau 11 : Caractéristiques anthropologiques et cliniques des patients et des témoins de la population de l'Ouest Algérien

Tableau 12 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles dans la population de l'Ouest Algérien

Tableau 13 : Distribution des fréquences alléliques des quatre polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) dans la population Témoins de l'Ouest Algérien.

Tableau 14 : Distribution allélique de l'allèle I du polymorphisme [*ACE*] rs4340 (I/D) dans les différentes populations « contrôles ».

Tableau 15 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 (A>G) entre les patients SA et les contrôles.

Tableau 16 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*REL*] rs13031237 (G>T) entre les patients SA et les contrôles.

Tableau 17 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*CD40*] rs4810485 (G>T) entre les patients SA et les contrôles.

Tableau 18 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme rs4750316 (G>C) proche du gène *PRKCQ* entre les patients SA et les contrôles.

Tableau 19 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*ACE*] rs4340 (I/D) entre les patients SA et les contrôles de l'Ouest Algérien.

Tableau 20 : Distribution des CNVs du gène *CCL3L1* chez les contrôles de différentes origines ethniques

Tableau 21 : Analyse de la distribution des CNVs du gène *CCL3L1* entre les cas et les témoins dans la population de l'Ouest Algérien

Tableau 22 : Distribution des CNVs du gène *FCGR3A* chez les contrôles de différentes origines ethniques

Tableau 23 : Distribution des CNVs du gène *FCGR3B* chez les contrôles de différentes origines ethniques

Tableau 24 : Analyse de la distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* entre les cas et les témoins dans la population de l'Ouest Algérien.

Tableau 25 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les quatre polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C).

Tableau 26 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les CNVs du gène *CCL3L1*.

Tableau 27 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* respectivement.

Tableau 28 : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G) et [*ACE*] rs4340 (I/D) entre les cas et témoins selon le genre et l'âge.

Tableau 29 : Distribution des fréquences des CNVs des gènes *CCL3L1* et *FCGR3A* entre les cas et témoins selon le genre et l'âge.

Liste des Annexes

Annexe 1 : Les indices d'activité BASDAI et de sévérité BASFI.....	105
Annexe 2 : Consentements en français et en arabe des prélèvements sanguins des sujets recrutés.....	109
Annexe 3 : La fiche de renseignement clinique du patient atteint de la SA.....	111
Annexe 4 : Typage HLA-B27 par le kit Genfender.....	117
Annexe 5 : Protocole de génotypage par PCR en temps réel (<i>TaqMan</i>).....	120
Annexe 6 : Protocole de la PCR classique et multiplex concernant le polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D).....	121
Annexe 7 : Protocole de la PCR <i>QX200 Droplet Digital</i> (ddPCR).....	123
Annexe 8 : Publication scientifique internationale.....	127

Lise des Abréviations

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN : Acide Désoxyribose Nucléiques
AGT : Angiotensinogène
AINS : Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens
Ang : Angiotensine
AR : Arthrites réactionnelles
ARN : Acide RiboNucléiques
ASAS: Assessment of Spondyloarthritis International Society
ASDAS: *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*
AT-R: récepteur transmembranaire d'Angiotensine II
AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux
BASDAI : *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*
BASFI : *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*
BMPs : Bone Morphogenic Proteins
CCL3L1 : *Chemokine C-C motif Ligand 3-like 1*
CD : cellule dendritique
CD40 : *Cluster of Differentiation 40*
CGH : *Comparative Genomic Hybridation*
CHUO : Centre Hospitalo-universitaire d'Oran
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CN : *Copy Number*
CNP : Polymorphismes de nombre de copies
CNVs : *Copy Number Variations*
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
c-Rel : *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*
CRP : C-Reactive Protein
CTLA-4 : *Cytotoxic-T-Lymphocyte-associated molecule 4*
DAG : Diacylglycérol.
dPCR : *Digital PCR*
ddPCR : *Digital Droplet PCR*
ESSG : European Spondylarthropathy Study
EULAR : *European League Against Rheumatism*
FCGR : *Low-affinity Fc gamma Receptor*
FoSTeS : *Fork Stalling and Template Switching.*
GFEGS : Groupe Français d'Étude Génétique de la Spondylarthrite
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GWAS : études d'association génétique pan-génomiques (*Genome-Wide Association Study,*)
HAS : Group Haute Autorité de Santé
HLA : *Human Leucocyte Antigen*
HLA-B27 : antigène leucocytaire humain-B27 (Human Leucocyte Antigen-B27)
I/D : Insertion/délétion
IDO : *Indole amine 2,3-DiOxygénase*
IGAS : International Genetics of Ankylosing Spondylitis consortium

IKK : *IκB Kinase*
IL : Interleukines
ISV : Variants de taille intermédiaire
ITAM : Immunreceptor Tyrosine Activating Motif
ITIM : Immunreceptor Tyrosine Inhibitory Motif
KDa: Kilo Dalton
LB : Lymphocyte B
LCRs : *Low Copy Repeat*
LCVs : Larges variants de nombre de copies
LES : Lupus érythémateux systémique
LGMC : Laboratoire de génétique moléculaire et cellulaire
LT : Lymphocyte T
LTh0 : LT helper indifférenciés
MAI : Maladies auto immunes
MICA : MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MIP : *Macrophages Inflammatory Protein*
MPP : métallo-protéinases matricielles
MZ ou DZ : Jumeaux monozygotes ou Dizygotes
NAHR : Recombinaison Homologue Non-Allélique (*Non-Allelic Homologue Recombinaison*)
NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*
NHANES I : *National Health and Nutrition Examination Survey*
NHEJ : jonction d'extrémités non homologues (*Non Homologous End Joining*)
NLS : Séquence de localisation nucléaire.
NO : Monoxyde d'azote
NASC : North American Spondyloarthritis Consortium
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PGE2 : Prostaglandine E2
PGI1 : Prostaglandine I-1
PKC : Sérine/Thréonine Kinases.
PNN : Polynucléaires neutrophiles
PR : Polyarthrite rhumatoïde
PRT : *Paralogue Ratio Test*
RANK: *Receptor activator of nuclear factor kappa B*
RHD : Domaine d'Homologie Rel
RICs : Rhumatismes Inflammatoires Chroniques
RID : domaine d'inhibition Rel
RP : Rhumatisme psoriasique
SA : Spondylarthrite ankylosante
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
SpA : Spondylarthrites ou spondylarthropathies
TCR : T Cell Receptor
TGF-β : *Transforming Growth Factor*
TLR : Toll Like Receptor
TNFα : *Tumor Necrosis Factor alpha*
UAA : Uvéite antérieure aigüe

USA : United States of America

USTO-MB : Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf

VEGF : vascular endothelial growth factor

VIH : Virus d'immunodéficience humain

VS : Vitesse de Sédimentation

X² : Chi 2

Nomenclature :

- Les gènes sont indiqués en italique
- Les protéines produites par ces gènes sont indiquées en lettres droites

INTRODUCTION

Les maladies complexes sont dues à la présence simultanée de nombreuses variations génétiques affectant des gènes différents et ayant chacune un effet modeste. Ainsi, il est préférable de parler de déterminisme « multigénique », plutôt que « polygénique » (*Ponder BA. 2001 ; Thomson G. 2001*). Les variations génétiques sont le moteur de l'évolution, et la source de la diversité entre individus. Mais elles sont aussi à l'origine des prédispositions génétiques aux maladies complexes (*Almal & Padh 2012*).

Les polymorphismes génétiques sont des variations phénotypiques mineures mais qui peuvent expliquer les différences entre les individus dans la prédisposition génétique à certaines pathologies. Un polymorphisme génétique est le produit d'un événement de mutation transmissible d'une génération à l'autre, détectable chez au moins 1% des individus d'une population (*Feuk et al. 2006*). Ces variations génétiques peuvent être présentes sous formes de séquences répétées en tandem, d'insertions/délétions, de variations du nombre de copies (CNVs) ou de polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) (*Frazer K.A et al. 2009 ; Robert J. 2010*).

L'utilisation fructueuse des marqueurs génétiques de type SNP ou microsatellites pour l'étude de maladies complexes humaines a incité à rechercher de nouveaux types de polymorphismes dans le génome humain, ainsi que dans le génome d'espèces modèles tels que la Souris (*Wain et al. 2009*). Cependant, les études d'association qui ont exploré les SNPs du génome entier n'ont expliqué qu'une faible part de la composante génétique de ces maladies (*Freeman J.L et al. 2006*). Il y a quelques années, les techniques fines de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence la présence de nombreuses variations structurales des génomes, qui n'avaient pas été suspectées jusqu'alors : les CNVs (*Redon et al. 2006*). Ces microremaniements chromosomiques sont devenues des variations génomiques indispensables à investiguer dans les études de prédispositions aux maladies complexes (*Almal & Padh 2012*).

Comme la plus part des maladies complexes, la spondylarthrite ankylosante (SA) est associée à plusieurs facteurs de risque génétiques dont le facteur majeur est l'antigène HLA-B27. En effet, la fréquence de la spécificité *HLA-B27* chez les malades est très élevée. Elle est de 90 % chez les patients spondylarthriques, contre seulement 6 à 8 % dans la population caucasöide normale. Dans ce cas, le risque relatif de développer la maladie est supérieur à 100 (*Toussirot E. & Wendling D. 2006*). Cependant, il est admis maintenant que la spécificité *HLA-B27* ne représenterait que 20 à 30 % de la susceptibilité génétique à la SA. Par conséquence, l'étude de nouveaux gènes candidats au développement de la SA est devenue indispensable

pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie (*Chatzikyriakidou A et al. 2011*).

L'approche gène candidat est puissante dans la détection des effets mineurs contribuant à la prédisposition d'une maladie complexe. Le choix du gène candidat peut se faire selon son implication supposée dans les mécanismes pathogéniques (gène candidat fonctionnel) et, ou bien en considérant sa localisation dans une région génomique auparavant décrite dans des études de liaison ou pan-génomiques.

L'objectif de cette étude était de confirmer en premier lieu, l'association entre la spécificité *HLA-B27* et le développement de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. En second lieu, nous avons recherché les associations entre la survenue de la SA et les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) d'une part : [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C), et le polymorphisme insertion/délétion : [*ACE*] rs4340 (I/D), d'autre part. Nous avons également, étudié l'impact des CNVs situés au niveau des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *CCL3L1* sur le développement de cette maladie.

Par ailleurs, les résultats de ce travail de thèse contribueront à l'estimation de l'impact des différentes variations génétiques explorées dans cette étude sur le risque de la survenue de la SA dans l'Ouest Algérien. Ensuite, l'ensemble des observations et hypothèses sera discuté au regard des connaissances actuelles, et nos conclusions mettront en évidence les perspectives de la recherche à envisager à l'avenir.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Epidémiologie de la spondylarthrite ankylosante (SA)

Les rhumatismes inflammatoires chroniques (RIC) constitueraient le premier motif de recours aux soins dans plusieurs pays. Près de 150 pathologies seraient concernées dont la polyarthrite rhumatoïde (PR), la spondylarthrite ankylosante (SA) et le syndrome de Gougerot-Sjögren, ces maladies toucheraient plus d'une personne sur 2000 (*Braun J. 2007*).

La SA occupe par sa fréquence le deuxième rang des RIC après la PR. C'est le chef de file d'un ensemble de maladies qui partagent un terrain génétique commun appelées : les spondylarthropathies (SpA). Ce lien génétique entre ces pathologies est attesté par l'existence de cas de SpA familiaux et par la forte association avec l'antigène leucocytaire humain-B27 (*Human Leucocyte Antigen-B27 ou HLA-B27*) (*Slobodin G et al. 2012*).

I.1. Age de survenue de la spondylarthrite ankylosante :

Cette pathologie semble affecter de façon préférentielle le jeune adulte. L'âge moyen de survenue de la maladie est de 26 ans, les premiers symptômes apparaissent dans 80 % des cas avant l'âge de 30 ans, contre seulement 5 % des cas après 45 ans (*Calin A et al. 1988 ; Braun J. & Sieper J. 2007 ; Pertuiset E. 2008*).

La SpA peut débuter aussi dans l'enfance, les formes à début juvénile sont plus fréquentes dans certaines régions : 10 à 15% débutent avant l'âge de 15 ans en Europe, ce pourcentage est de 30% dans les pays du Maghreb (*Saraux A. 2007*).

I.2. Sexe ratio dans la spondylarthrite ankylosante :

Il est classiquement admis qu'il existe une prédominance masculine de la SA, les hommes seraient plus touchés que les femmes avec un ratio homme/femme de 4/1 (*Wendling D. 1998*). Cependant, il est néanmoins intéressant de noter que ce déséquilibre de sexe ratio a tendance à disparaître dans les études les plus récentes. Cette évolution suggère que les femmes atteintes de la SA ont eu tendance à être sous-diagnostiquées par le passé. Cette hypothèse est étayée par les données d'une étude allemande portant sur plus de 1300 patients où le pourcentage de femmes parmi les malades est passé de 10% en 1960 à 46% en 1990 (*Feldtkeller E et al. 2000*). Ce sous-diagnostic pourrait s'expliquer par des différences de symptomatologie en fonction du sexe, avec notamment une plus grande sévérité radiologique (et donc un diagnostic plus aisé) chez les hommes (*Lee W et al. 2007*). En revanche, une autre étude a montré que la fréquence de l'atteinte chez les femmes (0,29 %) est presque égale à

celle des hommes (0,31 %) et les formes féminines sont peu différentes des formes masculines (Saraux A et al. 2003).

I.3. Prévalence de la spondylarthrite ankylosante :

Différentes études ont permis d'étudier l'épidémiologie de la spondylarthrite à travers le monde. A l'inverse de l'incidence, la prévalence permet d'étudier le nombre de personnes atteintes par une pathologie au sein d'une population à un moment donné. Il existe trois facteurs à prendre en compte lorsque l'on souhaite comparer la prévalence de la SA entre les différentes populations : le choix de l'échantillon représentatif de la population (nombre de patient inclus), les paramètres de sélection (lieu de recrutement différent, population entière, armée) et la corrélation directe entre la prévalence de la SA et celle de l'antigène HLA-B27 (Sieper J et al. 2006 ; Braun J. & Sieper J. 2007).

De nombreuses études ont cherché à estimer la prévalence de la SA. Des variations ont été observées en fonction de la population étudiée avec, d'une manière générale, l'existence d'un gradient décroissant Nord-Sud. Ces différences s'expliquent par la répartition géographique de l'allèle HLA-B27, principal facteur de susceptibilité à la maladie (Khan M.A. 1995). Les prévalences les plus élevées de HLA-B27 et de la SA sont retrouvées dans les régions subarctiques de l'Eurasie et d'Amérique du Nord. Alors que la SA est quasi-absente en Amérique du Sud, en Australie et en Afrique (Sieper J et al. 2006) (**Figure 1**).

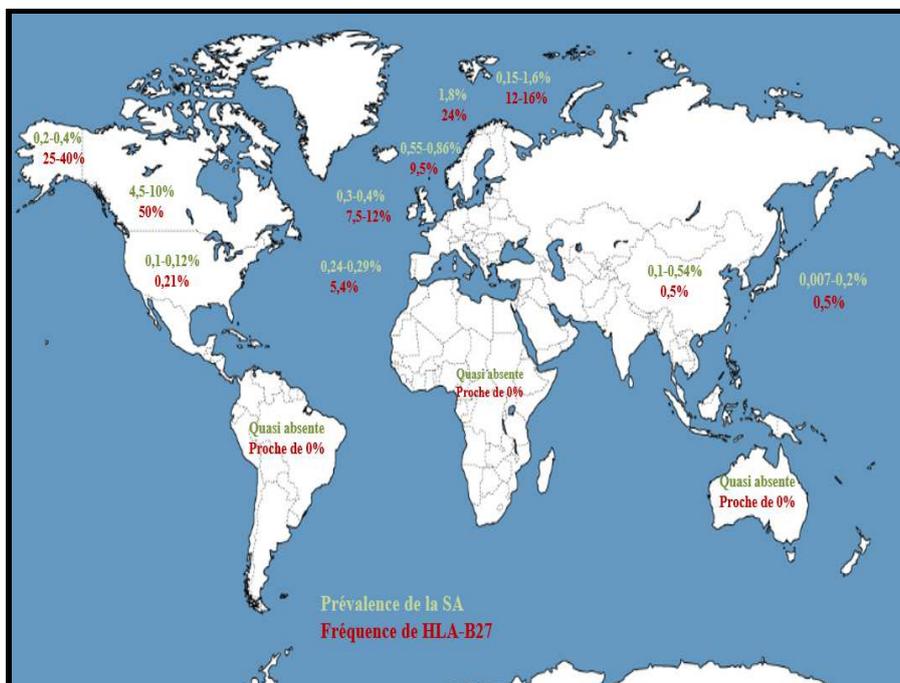


Figure 1 : Gradient décroissant Nord/Sud de la prévalence de la SA et de la fréquence du HLA-B27, (d'après Sieper J et al. 2006 ; Pertuiset E. 2008 ; Zochling J et al. 2010).

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées sur les différentes populations du continent Européen. Les prévalences de la SA les plus élevées ont été retrouvées dans des populations caucasiennes du Nord du continent variant de 0,15 à 1,8%. Les études conduites en Italie, France et en Allemagne ont montré des valeurs moins fréquentes (0,24%, 0,3% et 0,55%, respectivement) (*Sieper et al. 2006 ; Van Praet et al. 2012*). Cette variation de la prévalence de la SA est constatée du fait de l'hétérogénéité des populations étudiées.

Les conclusions de la première enquête nationale américaine (*National Health and Nutrition Examination Survey ou NHANES I*) ont rapporté une prévalence de 0,2 à 0,4% en Amérique du Nord (*Reveille J.D et al. 2011*). Cependant, un rapport clinique a noté une prévalence élevée de la SA chez les Noires Américains (4,5%) (*Jeandel P & Roux H. 2002*). Cette enquête était obligée à se confronter à l'hétérogénéité ethnique de cette population (les amérindiens, les apaches/navajo...).

La prévalence de la SA en Chine (pays le plus peuplé au monde) a été estimée à 0,54%, identique à celle retrouvée chez les caucasiens (*Liao ZT et al. 2009*). Des prévalences beaucoup plus faibles ont été constatées au Japon, au Vietnam et en Iran avec 0,007%, 0,28% et 0,23%, respectivement (*Hukuda S et al. 2001 ; Minh Hoa T et al. 2003 ; Davatchi F et al. 2008*). Cependant, les études réalisées dans les pays Eurasiatiques montrent des valeurs de 2,5% en Russie (*Alexeeva L et al. 1994*) et 1,05% en Turquie (*Onen F et al. 2008*).

Les SpA sont rares en Afrique, particulièrement en Afrique sub-saharienne où la prévalence de *HLA-B27* est très faible voire nulle. Toutefois, en raison du brassage ethnique, la maladie existe et sa prévalence peut varier d'un pays à l'autre. En effet, la prévalence de la SA est de 0% au Nigéria et au Zimbabwe et de 0,15% en Afrique du Sud. La rareté de la pathologie s'explique aussi par d'éventuelles variations de susceptibilité à la SA, le sous-type *HLA-B27*03* est majoritaire dans la population noire et il est moins associé à la pathogénie de la maladie (*Bourriaud C. 2014*).

Il n'existe pas de données épidémiologiques valides concernant la prévalence de la SA dans les pays de l'Afrique du Nord, mais contrairement à ce qui est observé dans les pays d'Afrique noire, la fréquence de l'allèle *HLA-B27* est nettement plus élevée dans les pays maghrébins. Au Maroc et en Tunisie, 59% et 62% des patients atteints de la SA étaient *HLA-B27* positif (+), respectivement (*Hamdi W. et al. 2012 ; Atouf O. et al. 2012*). Des résultats similaires ont été trouvés en Algérie avec des fréquences de 63% dans la région du Centre et de 52% dans la région de l'Ouest (*Amroun H. et al. 2005 ; Dahmani C.A et al, 2018*).

II. Concept des spondylarthropathies (SpA)

En 1974, les anglais *Moll, Haslock, Macrae et Wright* étaient les premiers chercheurs à proposer le regroupement de ces différentes pathologies sous un même terme « *seronegative spondarthritis* ». Cet ensemble se base sur une étude épidémiologique montrant des similitudes phénotypiques et génétiques entre ces différents rhumatismes. La découverte du lien entre l'antigène HLA-B27 et les rhumatismes inflammatoires permit d'en restreindre le nombre en excluant la maladie de Behçet et la maladie de Whipple (*Moll et al. 1973*).

L'agrégation de ces différentes entités sous une même dénomination a été validée par l'« *European League against Rheumatism* » (EULAR). Dans un premier temps, l'EULAR recommandait l'emploi du terme « spondylarthropathies » puis celui de « spondyloarthrites ». Ensuite, l'emploi de cette dernière dénomination a été recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS) depuis 2008 (*Malaviya A. 2013 ; Claudepierre P et al. 2012 ; Toussirot E. 2013*).

Les spondylarthropathies (SpA) correspondent aux RIC qui partagent un ensemble de caractéristiques sur le plan clinique, immunogénétique et radiologique. Elles se caractérisent par une atteinte inflammatoire, secondairement ossifiante, des articulations axiales et/ou périphériques, et par la survenue inconstante de manifestations inflammatoires non rhumatismales (uvéïte, psoriasis, maladie inflammatoire intestinale). Les SpA regroupent habituellement cinq entités phénotypiquement différentes : la spondylarthrite ankylosante (SA), le syndrome de Reiter, les arthrites réactionnelles (AR), le rhumatisme psoriasique (RP) et enfin, les manifestations articulaires des entérocolopathies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn et rectocolite ulcérohémorragique). Par contre, certaines formes moins caractérisées sont appelées, les SpA indifférenciées (*Sibilia J et al. 2005*) (**Figure 2**).

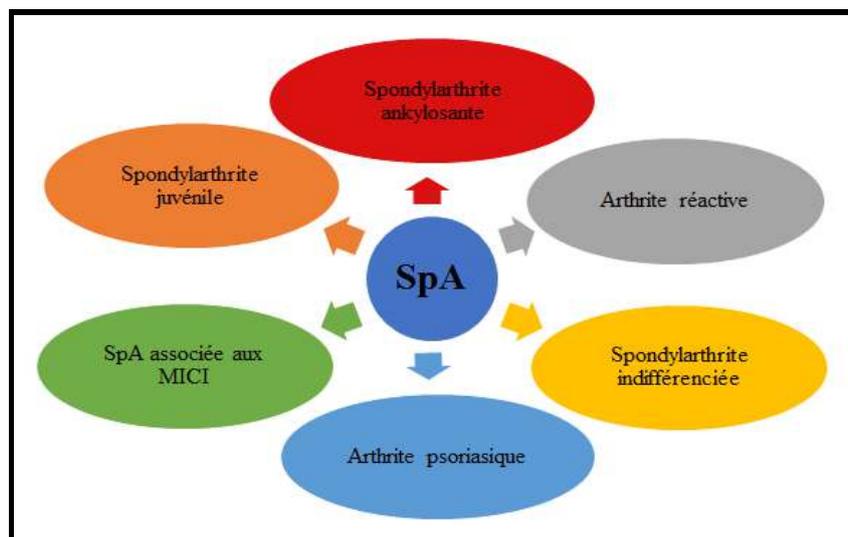


Figure 2 : Le concept des spondyloarthrites et ses différentes formes (d'après *Sibilia J et al. 2005*).

L'intérêt du concept de SpA est double, premièrement, il facilite le diagnostic des rhumatismes inflammatoires grâce à l'utilisation de critères diagnostiques internationaux. Et deuxièmement, il regroupe des affections dont la pathogénie est souvent caractérisée par l'interaction entre un terrain génétique prédisposant et différents micro-organismes arthritogènes. Ces dernières années, cette classification a tendance à disparaître au profit d'une autre prenant en compte le type d'atteinte articulaire prédominant chez le patient. Il s'agit de la nouvelle classification de SpA axiale ou périphérique (*Toussirot E. 2013*).

II.1. Description de la spondylarthrite ankylosante :

La spondylarthrite ankylosante (SA), également dénommée spondyloarthrite axiale, spondylite ankylosante, maladie de Bechterew ou encore pelvispondylite rhumatismale, a été décrite par *Realdo Colombo* sur des squelettes au XVI^{ème} siècle (*Colombo R. 1559*). Elle est connue depuis des centaines voire des milliers d'années si l'on en croit les remodelages osseux ayant été observé chez certaines momies égyptiennes. Le plus ancien patient atteint connu n'est autre que le pharaon *Ramsès II* souffrant d'une calcification des vertèbres cervicales (*Sieper J et al. 2002 ; Zeidler et al H. 2011*).

Il y a environ un siècle, cette pathologie a été individualisée comme une « maladie enraidissante et douloureuse, de nature inflammatoire, responsable d'une ankylose osseuse du squelette axial (rachis et bassin) » (*Bourriaud C. 2014*). La majorité des patients atteints de cette maladie souffrent de douleurs dorsales ou lombalgies qui résultent de l'inflammation des articulations sacro-iliaques. La persistance de cette inflammation entraîne au long terme des érosions osseuses, une sclérose, un élargissement ou un rétrécissement osseux de l'interligne articulaire, la formation de ponts osseux et pour finir une ankylose.

II.2. Diagnostic de la spondylarthrite ankylosante :

II.2.1. Critères de diagnostic :

La reconnaissance d'un lien entre les différentes entités constituant les SpA a généré le besoin de définir des critères de classifications car ce groupe rassemble des maladies dont les manifestations cliniques combinent de façon variable un syndrome articulaire axial et/ou périphérique et un/ou plusieurs syndromes extra-articulaires. La visualisation radiographique de la sacro-illite était considérée comme un outil diagnostique important et a permis le développement des critères de classification dans les années 60. Malgré le développement de nouvelles techniques telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'échographie,

le diagnostic des SpA reste encore aujourd'hui difficile du fait du caractère très polymorphe des manifestations cliniques et de l'absence du test diagnostique ayant à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité (Amor et al. 1995). La méconnaissance de la SA contribue à retarder le diagnostic, on estime le délai diagnostique de cette pathologie à environ 7 ans (Rudwaleit M. & Taylor W.J. 2010).

Ces constatations ont conduit au début des années 90 à l'élaboration de critères de classification qui sont encore employés aujourd'hui : critères d'Amor (Amor et al. 1990) et critères de l'European Spondylarthropathy Study Group (ESSG) (Dougados et al. 1991) (Tableau 1). Récemment, l'individualisation de formes articulaires axiales ou périphériques avec un nouveau jeu de critères a été élaborée par l'Assessment of Spondyloarthritis International Society (critères ASAS) (Rudwaleit et al. 2009). Tous ces systèmes de critères se ressemblent et se réfèrent au concept de SpA plutôt qu'à la sous-classification de la maladie.

II.2.2. Critères biologiques :

Ces dernières années, la recherche de biomarqueurs est devenue un enjeu majeur au diagnostic et à l'évaluation de l'activité de la SA et des dommages structuraux qu'elle entraîne. Ces biomarqueurs peuvent être détectés dans le sang, dans le liquide synovial ou encore au niveau de la membrane synoviale chez les patients ayant une atteinte périphérique.

Le choix du ou des biomarqueurs essentiels au diagnostic de la SA est établi en fonction des mécanismes physiopathologiques de la maladie et des facteurs de prédisposition. La grande contribution des facteurs génétiques dans la survenue de la maladie a permis de mettre en évidence leur utilité au diagnostic. Le principal facteur génétique retrouvé dans la SA reste le *HLA-B27* même s'il existe des formes *HLA-B27* négatives.

La *C-Reactive Protein* (CRP) et la vitesse de sédimentation (VS), marqueurs biologiques de l'inflammation, sont positives chez seulement 40 à 75 % des cas où l'inflammation est réellement présente. De ce fait, ces biomarqueurs ne peuvent pas être indispensables au diagnostic de la SA du fait de leur faible spécificité (Astier F. 2012).

Cependant, une nouvelle approche s'est basée sur la recherche de protéines ou de produits biologiques reflétant les mécanismes physiopathologiques de la SA qui peuvent servir de biomarqueurs spécifiques. En effet, les marqueurs biologiques de l'ostéo-formation pourraient contribuer au diagnostic différentiel de la SA vis-à-vis des autres formes d'arthrites chroniques. Un algorithme a été établi par Baeten en 2004 pour permettre cette différenciation

Tableau 1 : Critères de classification des SpA d'Amor et ceux d'ESSG (Amor et al, 1990) (Dougados et al, 1991).

Critères de classification d'Amor	
Signes Cliniques Ou Histoire Clinique	Points
1. Douleurs nocturnes lombaires ou dorsales ou raideur matinale lombaire ou dorsale	1
2. Oligoarthritis asymétrique	2
3. Douleur fessière sans précision Douleur fessière à bascule	1 2
4. Doigt ou orteil en saucisse	2
5. Talagie ou toute autre entésopathie	2
6. Iritis.	2
7. Urétrite non gonococcique ou cervicite moins d'un mois avant le début d'une arthrite.	1
8. Diarrhée moins d'un mois avant une arthrite.	1
9. Présence ou antécédent de psoriasis, ou de balanite, ou d'entéropathie chronique	2
Signes Radiologiques	Points
10. Sacro-iliite (stade >2)	2
Terrain Génétique	Points
11. Présence de l'antigène HLA-B27 ou antécédents familiaux de spondylarthrite, de syndrome de Reiter, de psoriasis, d'entéropathie chronique	2
Sensibilité Au Traitement	Points
12. Amélioration en 48 heures des douleurs par anti-inflammatoires non stéroïdiens ou rechute rapide (<48 heures) des douleurs à leur arrêt	2

Critères de classification d'ESSG	
Critères Majeurs	Critères Mineurs
<p>Synovites (passées ou présentes) asymétriques ou prédominants aux membres inférieurs</p> <p>Ou</p> <p>Douleurs du rachis lombaire, dorsal ou cervical (passées ou présentes) : présence des 3 à 5 critères suivant :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Début avant 45ans. - Début progressif. - Améliorées par l'exercice. - Raideur le matin. - Depuis plus de 3 mois. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ATCD familiaux de spondylarthrite, psoriasis, uvéite, arthrite réactionnelle ou entéropathie. 2. Psoriasis (antécédent ou en cours) objectivé par un médecin. 3. Infection génitale ou digestive (un mois avant arthrite) 4. Entéropathie (antécédent ou en cours, de Crohn ou Rectocolite hémorragique). 5. Enthésopathie (achillienne ou plantaire). 6. Douleur des fesses à bascule. 7. Sacro-iliite radiologique (stade 2-4 bilatéral, stade 3-4 unilatéral selon la cotation suivante : 0= normal, 1= possible, 2= modérée, 3= évoluée, 4= ankylose).

Les critères d'Amor comprennent 11 critères cliniques et un critère radiologique, affectés chacun d'une pondération. Un score total supérieur ou égal à six points permet de déclarer le patient comme ayant une spondylarthrite (SA).

La présence d'un critère majeur ESSG et d'au moins un critère mineur ESSG permet de classer le patient comme ayant une spondylarthropathie (SpA).

et identifier les sujets atteints de SpA. Les critères énoncés étaient une vascularisation prononcée, une hyperplasie modérée de l'intima, une présence accrue de CD163 et une abondance des polynucléaires dans le tissu synovial (*De Vlam K. 2010*).

II.2.3. Critères d'activité et de sévérité :

Une fois la maladie diagnostiquée, il est nécessaire d'en évaluer l'activité afin de permettre une prise en charge thérapeutique adéquate du patient. Depuis 15 ans, l'outil de référence recommandé par les institutions nationales et internationales pour évaluer cette activité est l'indice BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) (**Annexe 1**). Cinq domaines sont étudiés : la fatigue, la rachialgie, les douleurs articulaires, les enthésites et la raideur matinale. Chaque domaine est estimé sur une échelle de 0 à 10 ou de 0 à 100 et la moyenne des cinq domaines donne le score BASDAI global (*Schett G. & Rudwaleit M. 2010*). Lorsque le score est supérieur ou égal à 4, la maladie est dite active et le patient peut alors être inclus dans la plupart des essais thérapeutiques ou mis sous traitement anti-TNF α . Ce score possède toutefois certaines limites : il ne prend en compte que l'opinion du patient et il n'évalue pas les paramètres biologiques de l'inflammation, alors que celle-ci indique que la maladie est active (*Lepka F.C. 2010*).

Par ailleurs, les capacités fonctionnelles du patient et ses aptitudes physiques peuvent être appréciées par un autre indice appelé : le BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*) (**Annexe 1**). Ce score varie de 0 à 10 et un résultat supérieur à 4 est synonyme d'une grande incapacité fonctionnelle, soit une réduction significative de la capacité à effectuer certains actes de la vie quotidienne (ménage, courses...). Il est sensible aux changements induits par les traitements mais n'est pas spécifique que de la SA (*Toussirot E et al. 2009 ; Lepka F.C. 2010*).

Un nouvel indice d'activité a été récemment développé, il s'agit du score ASDAS (*Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*) qui prend en compte un marqueur biologique ; la CRP. Si la CRP ne peut être déterminée, la VS peut-être employé aussi en remplacement (*Lepka F.C. 2010*).

Cependant, tous ces indices ne sont pas interchangeables, un seul de ces scores doit être utilisé pour le suivi d'un patient donné concernant l'activité ou la sévérité de la SA (*Astier F. 2012*).

II.3. Manifestations articulaires de la spondylarthrite ankylosante :

L'atteinte axiale est caractéristique de la SA avec trois localisations principales. L'inflammation de ces sites articulaires se traduit par deux symptômes majeurs, la douleur et la raideur. La maladie débute dans les deux-tiers des cas par une atteinte lombo-pelvienne qui se manifeste par une douleur au niveau des fesses ou de la région lombaire inférieure. Ces douleurs traduisent une inflammation de l'articulation sacro-iliaque ou sacro-illite. Elles peuvent irradier à la face postérieure de la cuisse jusqu'au creux du genou (Breban M. 2004 ; Keat A. 2010) (Figure 3 (A)).

La maladie touche également le rachis dorsal et la cage thoracique selon une progression ascendante. Des atteintes thoraciques peuvent être observés, les douleurs thoraciques antérieures par atteinte costo-sternum se manifestent par des douleurs inflammatoires de la région sternale, entraînant une oppression thoracique capable de réduire de la capacité de ventilation pulmonaire du patient (Breban M. 2004 ; Sibia J et al. 2005) (Figure 3 (B)).

En plus du rachis dorsal, il a été montré que le rachis cervical était régulièrement touché chez les patients souffrant de SA. En effet, environ 70 % des patients se plaignent de douleurs au cou et la moitié présente des signes radiologiques d'atteinte du rachis cervical. Le risque d'altération du rachis cervical a été évalué en fonction de la durée de la maladie, 20 % des patients seraient affectés au bout de 5 ans et 70 % après 20 ans (Mansour M. et al. 2007) (Figure 3 (C)).

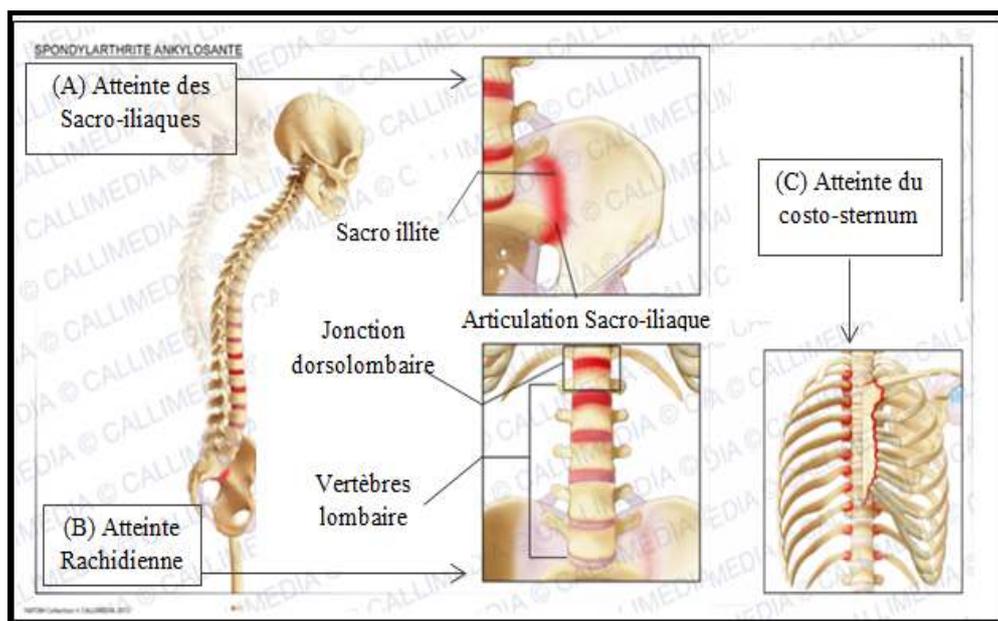


Figure 3 : Schéma de l'atteinte d'une articulation sacro-iliaque, Rachidienne et du costo-sternum (www.rhumatismes.net mise à jour septembre 2005)

L'atteinte axiale est une caractéristique fondamentale de la SA, cependant, l'inflammation des articulations périphériques, comme les arthrites, la rapprochent plus des autres rhumatismes inflammatoires chroniques. Toutefois, elles présentent des particularités physiopathologiques correspondant à des enthésites périphériques et à des arthrites avec synovite.

Les arthrites périphériques sont la conséquence d'une inflammation de la membrane synoviale qui enveloppe l'articulation (**Figure 4**). La cible élective de la réaction inflammatoire semble être l'enthèse (zone d'insertion des ligaments, des tendons et des capsules articulaires dans l'os) (McGonagle *et al.* 1999). Ce déferlement déclenche une réaction chimique en chaîne, qui débouche sur une inflammation articulaire. Les cellules synoviales peuvent se mettre à proliférer de façon anarchique, formant un pannus, une masse de tissu semblable à une tumeur. Le pannus fabrique à son tour des enzymes qui détruisent le cartilage (Breban M. 2004 ; Keat A. 2010).

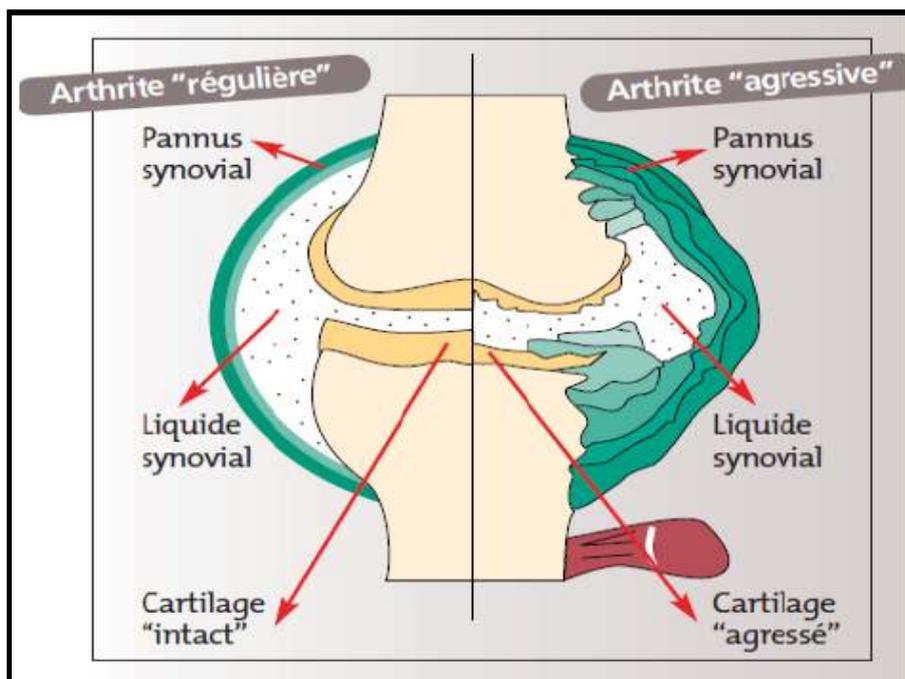


Figure 4 : Schéma d'une articulation normale et arthritique (<http://www.euroas.org> mise à jour septembre 2015).

L'enthésite est l'atteinte inflammatoire des enthèses qui semble être la cible privilégiée de la SA et notamment, du risque d'ankylose. Cet état inflammatoire de l'enthèse, peut produire des lésions érosives, des ossifications et un œdème osseux sous-jacent. L'atteinte la plus fréquente et la plus caractéristique est la talalgie (douleur du talon) et peut être révélatrice de la SA dans 1/3 des cas (D'Agostino *et al.* 2003).

II.4. Manifestations extra-articulaires de la spondylarthrite ankylosante :

Le caractère systémique de la SA est mis en évidence par les atteintes inflammatoires non rhumatismales touchant la quasi-totalité des organes.

II.4.1. Atteintes ophtalmiques :

L'uvéite est la principale manifestation ophtalmologique retrouvée lors de la SA. Il s'agit de l'inflammation de l'uvée, membrane intermédiaire située entre la sclérotique et la rétine. L'uvéite antérieure aiguë (UAA) se caractérise par un œil rouge, douloureux et est habituellement unilatérale. Les patients SA ont 20 à 40 % de risques de développer une uvéite. Ce risque est plus élevé s'ils sont porteurs de l'antigène HLA-B27. Il n'est pas rare que l'UAA soit à l'origine du diagnostic de la SA par la recherche systématique de l'antigène HLA-B27 (*Monnet et al. 2004 ; Munoz-Fernandez et al. 2006*).

II.4.2. Atteintes cutanées :

Dix à 25 % des patients SA sont porteurs de lésions psoriasiques (*Canoui-Poitrine et al. 2012*) alors que dans la population générale, ces lésions touchent 3% des individus (*Griffiths C & Barker J. 2007*). Ces atteintes précèdent dans plus des deux tiers des cas les manifestations articulaires, mais elles apparaissent parfois plus tard (*Wendling D & Toussirot E. 2007*).

II.4.3. Atteintes digestives :

Environ 8% des patients atteints de la SA souffrent en outre d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), (maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique). Les MICI se traduisent par une diarrhée glairo-sanglante, chronique ou évoluant en poussées aiguës, associée à de violentes douleurs abdominales (*Canoui-Poitrine et al. 2012*). La rémission de l'inflammation articulaire a été souvent corrélée à une disparition de l'inflammation intestinale (*El Maghraoui A. 2011*).

II.4.4. Atteintes cardiaques :

La prévalence des pathologies cardiaques chez les patients souffrant de SA est comprise entre 10 et 30 %, elles sont liées à un phénomène inflammatoire sclérosant. En

conséquence, les patients atteints de la SA et présentant des pathologies cardiaques ont un risque accru de faire des Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) (Brebant M. 2004).

III. Traitements de la Spondylarthrite Ankylosante

La prise en charge de la SA doit permettre de lutter contre la douleur, le syndrome inflammatoire, de prévenir l'ankylose mais aussi de limiter les déformations articulaires. Le choix du traitement dépend de l'activité de la maladie, de la présence ou non d'une inflammation, du type d'atteinte que le malade présente et éventuellement les médicaments déjà prescrits. Les traitements médicamenteux doivent être choisis et adaptés à chaque malade (Skorzewski E. 2010). L'ASAS et l'EULAR ont établi des recommandations pour la prise en charge thérapeutique de la SA et des critères de réponses thérapeutiques sont à disposition pour évaluer l'efficacité des traitements sur la SA (Bourriaud C. 2014).

Les traitements doivent s'adapter aux différentes manifestations cliniques, à l'intensité des symptômes et au mode de vie du patient. Ils se divisent en deux classes, les médicaments qui agissent sur les manifestations de la maladie appelés : médicaments symptomatiques. Et ceux qui combattent la maladie elle-même appelés : les médicaments de fond (Bourriaud C. 2014). Afin de soulager les patients spondylarthriques, le rhumatologue utilise conjointement des moyens médicamenteux et des traitements physiques. En effet, des orthèses peuvent être utilisées pour diminuer la douleur et prévenir les déformations, alors que la chirurgie est exceptionnelle et ne s'adresse qu'aux séquelles (Skorzewski E. 2010).

III.1. Traitements médicamenteux symptomatiques :

Appelés aussi les médicaments de la crise, il s'agit de médicaments qui traitent les symptômes en soignant l'inflammation et la douleur et non la maladie en elle-même.

III.1.1. Les Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) :

Les AINS constituent le traitement de base de la SA et un des critères de diagnostic de cette maladie. Ils agissent sur la douleur, mais aussi sur les raideurs, la durée du dérouillage matinal, l'incapacité fonctionnelle et sur l'activité de la maladie. Plusieurs AINS seront testés sur des périodes de deux à trois semaines pour déterminer la molécule la mieux tolérée/efficace ainsi que la dose minimale efficace. Il s'agit surtout d'un traitement symptomatique mais qui pourrait prévenir l'apparition des lésions osseuses ankylosantes (Bourriaud C. 2014).

III.1.2. Les antalgiques :

Les antalgiques peuvent constituer chez certains patients un appoint thérapeutique intéressant. A la différence des AINS, ils sont bien supportés sur le plan digestif. Les antalgiques apportent un complément au traitement par AINS. Ils n'agissent que sur la douleur et n'ont aucun effet sur l'inflammation.

III.1.3. Les corticoïdes :

Les corticoïdes dérivent de la cortisone, ils remplacent le traitement par AINS lorsque ces derniers sont mal tolérés ou en courtes cures lors des poussées inflammatoires. La corticothérapie par voie orale n'a toutefois pas démontré une réelle efficacité dans les formes axiales de spondylarthrites (HAS. 2008). Des injections intra ou péri-articulaires de corticoïdes sont indiquées en cas de sacro-illite pour soulager la douleur. Leur efficacité n'a pas été cliniquement prouvée lors de leur utilisation dans les formes périphériques et les enthésites (Mansour M. et al. 2007).

III.2. Les traitements de fond classiques :

L'indication du traitement de fond contre les rhumatismes inflammatoires vient après l'échec des traitements de la crise (symptomatiques). La notion de ces traitements fait référence à des médicaments dont l'administration produit des effets habituellement progressifs, nécessitant un délai d'action prolongé. Ils se caractérisent aussi par une action rémanente, par opposition aux traitements anti-inflammatoires considérés comme purement symptomatiques de la phase terminale de l'inflammation, et d'action rapidement réversible (Bourriaud C. 2014).

L'une des vertus essentielles des traitements de fond serait de provoquer une rémission véritable de la maladie et donc d'arrêter l'évolution de la SA. Cependant, les mécanismes pathologiques ne sont pas connus de façon très précise. C'est pourquoi le classement de certaines molécules comme traitement de fond pourrait s'avérer faux (Skorzewski E. 2010). De nombreux traitements de fond utilisés dans le traitement de la PR ont été utilisés dans celui de la SA. En effet, les cliniciens ont eu recours aux antipaludéens, aux sels d'or, à la sulfasalazine et au méthotrexate..., mais les résultats ont été assez décevants sauf pour la sulfasalazine (Astier F. 2012). A l'heure des anti-TNF α , il reste peu de place pour ces traitements non évalués.

III.3. Les biothérapies :

Les traitements de fond classiques qui ont été décrits précédemment n'ont pratiquement pas d'impact sur les symptômes et les signes de la maladie lorsqu'elle est exclusivement axiale d'où l'intérêt de l'avènement de nouveaux traitements de fond comme les inhibiteurs du TNF α (*Tumor Necrosis Factor*).

Les anti-TNF α représentent une innovation majeure dans le champ thérapeutique de la SA. Ces molécules bloquent l'action d'une cytokine produite par les cellules de l'immunité en cas d'inflammation, le TNF α dont la production excessive favorise la persistance de l'état inflammatoire et joue un rôle central dans la progression de la SA. Actuellement, quatre anti-TNF- α bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la SA, et sont couramment utilisés (*Claudepierre P et al. 2012*) :

L'infliximab : Anticorps monoclonal chimérique (humain-souris) dirigé contre la cytokine qu'elle soit circulante ou fixée sur son récepteur.

L'adalimumab : Anticorps monoclonal entièrement humain. Il se lie spécifiquement au TNF- α dont il neutralise la fonction biologique en bloquant son interaction avec ses récepteurs.

L'étanercept : Dimère d'une protéine de fusion du récepteur p75 du TNF, avec le domaine Fc d'une Ig humaine. Il empêche le TNF- α circulant d'agir sur ses sites naturels de fixation.

Le Golimumab : Anticorps monoclonal complètement humain. Il se lie aux formes solubles et transmembranaires du TNF humain, ils forment des complexes stables, empêchant ainsi le TNF de se fixer à ses récepteurs.

De nouvelles molécules laissent entrevoir de belles perspectives pour le traitement de la SA en échec des anti-TNF- α , toutefois ces résultats nécessitent un contrôle préalable avec des études menées à long terme. En effet, l'abatacept ou CTLA-4Ig ORENCIA® est un modulateur humain soluble qui agit spécifiquement sur le signal de co-stimulation transmis par les récepteurs CD80/CD86 d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) au CD28 des lymphocytes T (LT), responsable de l'activation de ces derniers. De plus, des taux élevés de CTLA-4 soluble (*Cytotoxic-T-Lymphocyte-associated molecule 4*) ont été retrouvés chez les patients atteints de la SA par rapport au sujets sains (*Wendling D. & Prati C. 2011*).

Une équipe française a alors décidé de tester l'efficacité de l'abatacept chez des patients atteints de SpA ayant eu une réponse inadéquate aux anti-TNF α . Sept patients de sexe féminin dont cinq souffrant de SA ont été inclus. Au bout de 6 mois, seules les enthésites semblent avoir été améliorées. Cette étude présente cependant l'étroitesse de l'échantillon et l'emploi du traitement selon les mêmes conditions que dans celui de la PR. Vu que la

physiopathologie de la PR et celle de la SA ne sont pas identiques à 100%, d'autres recherches doivent être menées pour confirmer ou affirmer ces résultats (*Wendling D. & Prati C. 2011 ; Lekpa F.K. et al. 2012*).

Par ailleurs, le blocage de la voie IL-23/IL-17 pourrait devenir aussi un enjeu thérapeutique majeur dans le traitement de la SA. Il existe actuellement des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'IL-17 (AMG-827 et anti-IL17R) et contre la cytokine elle-même LY-2439821 (anti-IL-17A) et AIN457 (Secukinumab). Ce dernier a fait l'objet d'études plus approfondies versus placebo chez des patients souffrant de SA. L'anticorps monoclonal Ustekinumab STELARA® dirigé contre une sous-unité de l'IL-12 et de l'IL-23 a été déjà employé dans le traitement du psoriasis cutané et ayant montré des résultats positifs dans le traitement de la maladie de Crohn et dans celui du rhumatisme psoriasique. Des études préliminaires doivent être effectuées afin d'envisager son éventuel emploi chez des patients spondylarthritiques (*Astier F. 2012*).

III.5. La kinésithérapie et l'hygiène de vie :

La kinésithérapie et le respect d'une certaine hygiène de vie sont des compléments utiles, voire indispensables, aux traitements médicamenteux, surtout dans les formes potentiellement enraidissantes de la SA. La pierre angulaire de la prise en charge de la SA reste l'association de la prise d'AINS aux exercices de rééducation fonctionnelle. La rééducation est indiquée tout au long de la maladie et a pour but de lutter contre les douleurs, l'enraidissement à moyen terme et la réadaptation socioprofessionnelle en fonction de l'état évolutif (*Zochling J et al. 2006*).

III.6. Le traitement chirurgical :

L'indication chirurgicale au cours de la SA se limite à certaines situations relativement rares, s'agissant surtout de la chirurgie de remplacement (prothèse) des articulations détruites (principalement la hanche ou du genou). Les progrès réalisés dans la chirurgie prothétique ont transformé la vie des malades les plus gravement atteints. Ainsi, un patient handicapé par une coxite sévère peut récupérer une fonction convenable grâce à la mise en place d'une prothèse totale de la hanche (*Kadi A et al. 2012*).

IV. Etiologie de la spondylarthrite ankylosante :

La physiopathologie d'une maladie inflammatoire et auto-immune telle que la spondylarthrite, est une des énigmes de la rhumatologie. Plusieurs hypothèses et facteurs favorisant l'apparition de cette maladie ont été identifiés. Il s'agirait d'une coexistence entre des facteurs environnementaux sur un terrain génétique prédisposant qui induirait au développement d'une réponse immunitaire anormale.

IV.1. Facteurs environnementaux :

La découverte de l'antigène HLA-B27 en 1973 et la mise en évidence de sa fréquence dans le groupe des SpA (SA, syndrome de Reiter, arthrites réactionnelles, rhumatisme psoriasique et entérocolopathies inflammatoires chroniques) a montré le lien commun entre ces entités pathologiques (*Brewerton et al. 1973*). Un taux de concordance incomplet (50 %) observé chez les jumeaux monozygotes (MZ) atteints de différentes formes de SpA indique une place importante des facteurs d'environnement dans le déterminisme de ces entités qu'ils soient infectieux, toxiques ou psychologiques (*Jarvinen. 1995 ; Brown M.A et al. 1997*).

L'arthrite réactionnelle (AR) est la seule forme des SpA, pour laquelle un facteur de risque environnemental est identifié, elle se définit comme une poussée d'arthrite stérile survenant plusieurs jours ou semaines après une infection bactérienne intestinale causée par des entérobactéries 'gram négatif' comme *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella* et *Campylobacter* ou à la suite d'une infection génitale provoquée par *Chlamydia trachomatis* (*Mansour M et al. 2007*).

Même si la présence de la molécule HLA-B27 est moins fréquente au cours des AR (60%-80%) que dans d'autres formes des SpA telle dans la SA avec une fréquence de 90%, cette molécule semble perturber la réponse immunitaire lors des infections bactériennes (*Vahamiko et al. 2005 ; Hacquard-Bouder & Breban. 2006*). En effet, les études d'un modèle de SpA chez le rat transgénique pour le HLA-B27 et la β 2-microglobuline humaine (rat/B27-) ont montré qu'en isolateur stérile, aucune inflammation des intestins et des articulations n'est détectée chez les rats_B27- alors qu'ils la déclencheraient lors de la réintroduction de la flore bactérienne intestinale (*Taurog et al. 1994 ; Rath et al. 1996 ; Braun J. 2007*). De plus, l'étude de *Syrbe et al.*, a montré un enrichissement des LTh1 spécifiques de la bactérie *Escherichia coli* dans les articulations enflammées de patients atteints de SA. Ceci suggérerait l'implication possible d'antigènes bactériens d'origine muqueuse dans la pathogenèse de la SA (*Syrbe et al. 2012*). Aussi, une récente étude (microbiome avec biopsies de l'iléum terminal) a

identifié cinq familles de bactéries plus abondantes chez les patients avec une SA précoce comparés à des contrôles sains. L'une de ces cinq familles, l'espèce *Prevotella*, a également été identifiée à un niveau élevé dans la microflore des rats transgéniques pour le HLA-B27 (*Costello M.E. et al. 2015 ; Nissen M.J. 2016*).

Compte-tenu des éléments précédents, il est légitime de suspecter chez les patients atteints de la SA que le microbiote intestinal soit un inducteur d'inflammation de la muqueuse intestinale et aussi des structures articulaires. Ceci du fait de la diffusion de constituants microbiens, à la faveur d'une augmentation de la perméabilité muqueuse et des cellules responsables de la réponse immunitaire (LT...), vers ces structures articulaires (*Jacques et al. 2008 ; Breban et al. 2011*).

Mis à part le microbiote, l'implication des hormones sexuelles dans la réponse immunitaire a été largement étudiée, en particulier les œstrogènes autant qu'un modulateur de l'immunité humorale et la progestérone comme suppresseur naturel de l'immunité (*Cutolo et al. 2004*). L'étude de *Ghannouchi M et al*, a montré que des perturbations du statut hormonal ont été observées chez plusieurs patients atteints d'une spondylarthrite. Dans cette étude les femmes ménopausées ont été exclues ainsi que les patients ayant une pathologie associée ou sous traitement pouvant influencer le métabolisme osseux (*Ghannouchi M et al. 2009*).

Le tabagisme a été aussi suspecté plus tard. Il pourrait être un facteur favorisant le déclenchement des SA axiales. Il a été montré que le tabac pourrait influencer l'activité de la maladie, la diminution de la qualité de vie ainsi que l'altération fonctionnelle et le développement de lésions radiologiques au cours de la SA (*Ciurea A et al. 2013*). Par ailleurs, une étude conduite par *Breban* a montré que les facteurs psychologiques peuvent accélérer et aggraver l'évolution de la spondylarthrite et le stress semblait avoir un rôle dans l'augmentation du niveau d'activité de la SA (*Zeboulon-Ktorza N. et al. 2013 ; Bourriaud C. 2014*).

IV.2. Facteurs génétiques :

La prévalence des SpA est plus fréquente au sein des familles que ne le voudrait le hasard. Cette donnée a été établie de longue date et témoigne d'une prédisposition génétique sous-jacente aux SpA (*West. 1949 ; De Blecourt Polman et al. 1961 ; Moll et al. 1974*). L'existence d'un terrain génétique commun est un argument majeur à l'origine du regroupement des entités constituant les SpA. En effet, la prévalence de la SA est de 1-3% dans une population caucasöide HLA-B27+ mais elle est de 20% si les sujets HLA-B27+ sont

apparentés à un patient atteint d'une des forme de SpA. Ces chiffres suggèrent aussi une prédisposition familiale indépendante de la présence de l'antigène HLA-B27 (*Sibilia J et al. 2005*).

Par ailleurs, le taux de concordance chez les jumeaux (MZ) indique le niveau maximum de contribution génétique à une maladie. Schématiquement, la discordance entre les jumeaux MZ est d'origine environnementale et celle entre jumeaux MZ et dizygotes (DZ) est d'origine plutôt génétique.

Deux études se sont intéressées à la concordance entre les jumeaux pour le phénotype de la SA. La première étude ; finlandaise ; portait sur 26 paires de jumeaux de même sexe (6 MZ et 20 DZ) dans lesquelles au moins un individu par paire présentait un diagnostic de SA. Le taux de concordance des paires MZ était de 50 %, celui des paires DZ était globalement de 15 %. Il était de 20 % pour les jumeaux DZ HLA-B27+. Il existait donc une différence de concordance entre les jumeaux MZ et DZ même après conditionnement sur la présence de HLA-B27 (*Jarvinen P. 1995*). La seconde étude ; anglaise ; a porté sur 8 paires MZ et 32 paires DZ (*Brown M.A et al. 1997*). Le taux de concordance était de 75 % pour les jumeaux MZ (tous HLA-B27+), de 12,5 % pour les DZ et de 27 % pour les DZ HLA-B27+. Là encore, une différence de concordance entre les paires MZ et DZ (62,5 %) a été observée et qui persistait même après ajustement selon la présence de HLA-B27 (48 %). Tous ces résultats suggéraient l'existence d'autres facteurs de prédisposition génétique à la SA. De nombreux autres facteurs génétiques contribuent donc nécessairement à la prédisposition à la SA, dont seulement quelques-uns ont été identifiés ces dernières années et d'autres restent toujours à découvrir (*Reveille J.D. 2012a*).

Une méta-analyse publiée par l'équipe de *Brown et al*, a estimé le risque de la SA chez les germains à 8,2% et chez les parents de patients à 7,9%, ce qui donne des valeurs pratiquement identiques entre les deux groupes. En revanche, le risque chez les apparentés au second degré serait beaucoup plus faible, de l'ordre de 1 % (*Brown M.A et al. 2000a*).

L'équivalence du risque relatif de la SA entre parents et germains indique un effet génétique dominant, chose déjà admise pour le *HLA-B27* et qui s'appliquerait donc de la même façon aux autres gènes de prédisposition encore, inconnus. De plus, la décroissance rapide du risque entre premier et second degré de parenté indique qu'il s'agit d'une maladie multigénique. En effet, les auteurs de cette méta-analyse proposent un modèle multigénique, de trois à neuf gènes (*HLA-B27* inclus) en interaction épistatique les uns avec les autres exerçant entre eux des effets multiplicatifs (*Brown M.A et al. 2000a*).

V. Immunopathologie de la spondylarthrite ankylosante

La SA est une maladie inflammatoire systémique d'origine auto-immune. En d'autre terme, au cours de cette maladie le système de défense de l'organisme s'attaque à ses propres articulations ainsi qu'aux attaches de ligaments et de tendons. Le développement de cette pathologie se caractérise par des mécanismes d'inflammation et d'auto-immunité conduisant à une destruction osseuse excessive qui engendre le stade d'ankylose (*Lucas O.D. 2011*).

La cause du « dérèglement » du système immunitaire au cours de la spondylarthrite n'est pas encore bien élucidée. La physiopathologie de cette maladie fait intervenir plusieurs facteurs environnementaux sur un terrain génétique prédisposant ayant en commun un acteur principal le HLA-B27 (*Saroux A et al. 2001*). Plusieurs théories ont été évoquées pour tenter d'expliquer le rôle de la spécificité HLA-B27 dans le déterminisme de la SA (*Braun J et al. 1995*).

Actuellement, il existe deux hypothèses principales pour expliquer la contribution du HLA-B27 dans la pathogenèse de la SA (**Tableau 2**). On distingue les hypothèses spécifiques d'antigène, qui regroupent l'hypothèse du « peptide arthritogène » et celle du « mimétisme moléculaire ». Ces théories qui sont complémentaires l'une de l'autre postulent que certains peptides microbiens ressemblent aux peptides du soi du point de vue du récepteur des cellules T (TCR) de certains LT CD8⁺ (cytotoxiques) spécifiques pour le HLA-B27. La réactivité de ces LT avec le complexe peptide-HLA-B27 aurait pour conséquences une auto-réactivité et une maladie auto-immune (*Ben Dror L et al. 2010*). L'équipe de *Khan M.A et al*, a suggéré que certains sous-types de l'allèle *HLA-B*27* possèdent des propriétés distinctes en ce qui concerne le site de fixation des antigènes déclenchant la spondylarthrite (*Khan M.A et al. 2007*). En effet, les variants de l'antigène HLA-B27 diffèrent d'un ou plusieurs acides aminés par substitution au niveau des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui constituent la niche de fixation des peptides antigéniques.

La seconde catégorie est celle des hypothèses indépendantes d'antigènes. Ces théories font appel aux particularités biochimiques de la molécule HLA-B27, aux propriétés structurales modifiées à l'origine du rôle pathogène et aux éventuelles conséquences qu'elles peuvent provoquer sur la réponse immunitaire (*Breban M. 2004 ; Moalic V. 2010*).

La physiopathologie de la SA se caractérise par la survenue de trois phénomènes, un premier stade d'inflammation initiale qui se traduit par la suite d'une érosion osseuse et une phase réparatrice excessive entraînant le stade d'ankylose.

Tableau 2 : Récapitulatif des hypothèses pouvant expliquer le rôle joué par le HLA-B27 dans physiopathologie de la SA (d'après Breban M. 2004).

Hypothèses	Rôle de la molécule HLA-B27	Conséquences immunologiques
<i>Théories spécifiques d'antigène</i>		
Peptide arthritogène	Présentation par HLA-B27 d'un peptide de soi dérivant d'un Ag exprimé dans les tissus cibles.	Activation d'un clone CD8+ dirigé contre le peptide du soi.
Mimétisme moléculaire	Homologie séquentielle entre un peptide présenté par HLA-B27 et un Ag bactérien ou viral.	Réponse immunitaire T croisée entre l'agent pathogène et le peptide du soi présenté par HLA-B27.
<i>Théories indépendantes d'antigène</i>		
Anomalies de repliement ou « misfolding »	Lenteur de repliement lors de l'assemblage avec la β 2m dans le Réticulum Endoplasmique (RE).	Stress cellulaire par UPR. Activation de NF κ B. Induction de cytokines pro-inflammatoires.
Formation d'homodimères	Création de ponts disulfures entre cys67 des chaînes lourdes et expression à la surface cellulaire.	Présentation non conventionnelle de peptide bactérien ou d'auto-Ag aux LTCD4+ ou reconnaissance inhabituelle avec LILR ou KIR.

▪ **Inflammation :**

Le processus inflammatoire au cours de la SA touche électivement l'enthèse, la synovie et la moelle osseuse. L'enthèse désigne la zone d'insertion des ligaments, des tendons d'Achille et de la capsule articulaire dans l'os. Cette dernière est un tissu dynamique capable de supporter de fortes contraintes mécaniques. La matrice extracellulaire qui l'entoure et les cellules qui la composent, servent à compenser les modifications de pression et à réduire les impacts (*Hacquard C et al. 2004*) (**Figure 5**).

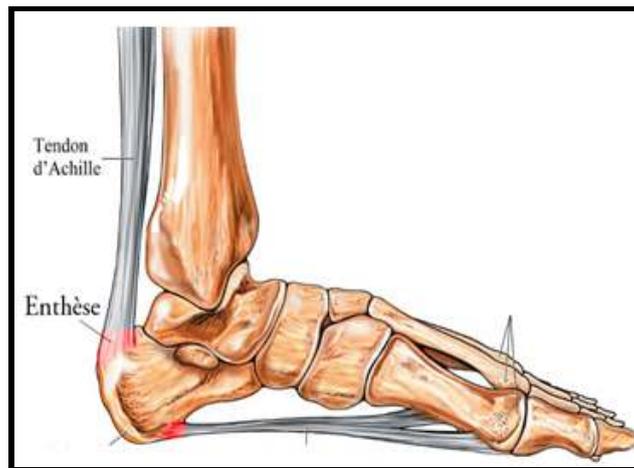


Figure 5 : Localisation anatomique de l'enthèse et de tendon d'Achille (*Benokba K. 2017*)

L'enthésite retrouvée au cours de la SA est la cause majeure des symptômes et du risque d'ankylose. Elle débute par des lésions inflammatoires au niveau des sites d'attachement de l'os, ces lésions érosives évoluent ensuite par un phénomène de cicatrisation ou fibrose, puis par une ossification sans formation de cartilage préalable (*Laloux L et al. 2001*) (**Figure 6**).

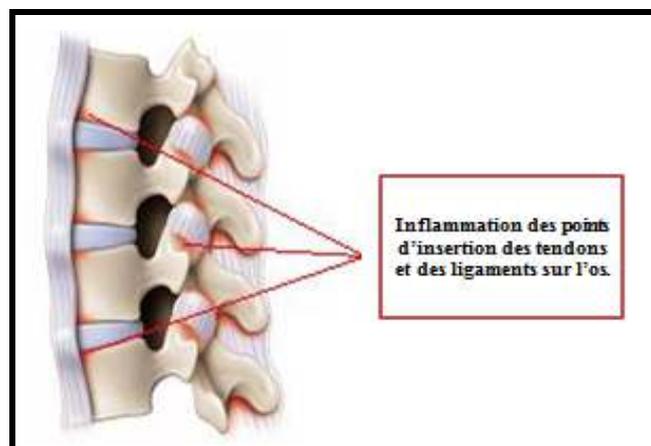


Figure 6 : Phase d'inflammation de l'enthèse, l'enthésite (*Taurog JD & Lipsky PE. 1994*)

Par ailleurs, la sacro-iliaque est une des articulations les plus fréquemment touchées au cours de la SA, elle est constituée en majeure partie de fibrocartilage recouvrant l'os et qui est histologiquement proche des enthèses (Braun J et al. 1995). Lors des sacro-illites précoces, l'inflammation de la synovie entrainerait la formation de pannus et la granulation des tissus (Figure 7). L'infiltrat cellulaire composé de lymphocytes T CD4+, T CD8+ et de macrophages est accompagné d'une prolifération fibroblastique et d'une néo-vascularisation. Une expression accrue d'ARN messager codant pour le TNF α et le TGF- β (*Transforming Growth Factor*) est également retrouvée au sein des sacro-iliaques des patients spondylarthritiques (Dougados M et al. 2005 ; Smith. 2006).

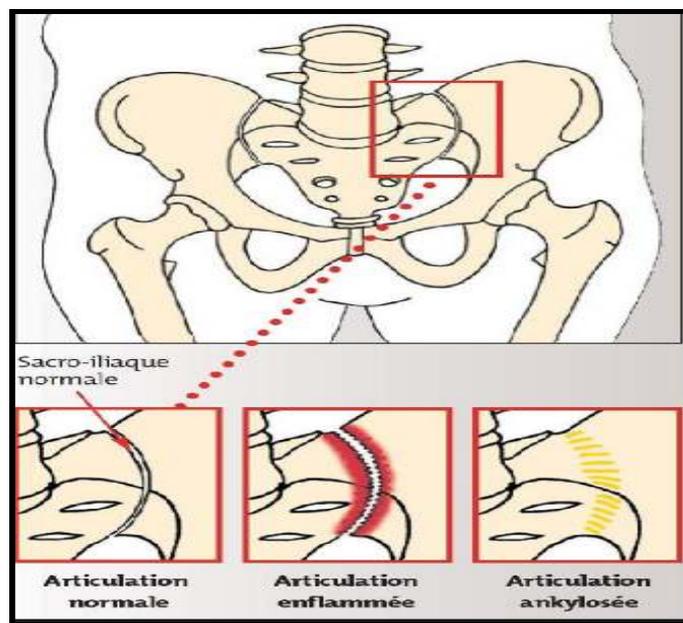


Figure 7 : L'articulation sacro-iliaque au cours d'une spondylarthrite (d'après Dougados M et al. 2005).

L'inflammation chronique au cours de la spondylarthrite se développe plus facilement dans les tissus proches et en contact avec les enthèses car ils sont plus accessibles à l'infiltration cellulaire et à l'angiogénèse. Parmi ces tissus, on retrouve la membrane synoviale et la moelle osseuse sous-chondrale (Lories R & Luyten F. 2009). La membrane synoviale est un tissu qui tapisse l'intérieur de la capsule articulaire. Elle sécrète un liquide transparent, la synovie, ou liquide synovial, qui facilite le glissement des articulations lors des mouvements. Des synovites sont constatées au cours de la SA et rendent compte des arthrites périphériques. Les synovites périphériques montrent une vascularisation renforcée chez les patients spondylarthritiques illustrée par des taux élevés de facteur pro-angiogénique VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) circulants (Toussirot & Wendling. 2006). Elles présentent aussi une activation des cellules endothéliales avec l'expression accrue de

molécules d'adhésion et de facteurs chimiotactiques. L'infiltrat cellulaire est composé d'un taux de LT CD4+ supérieur au taux de LT CD8+, de cellules NK (*Natural Killer*), de lymphocytes B CD20+, de macrophages CD68+ mais surtout CD163+ ; marqueur d'une production accrue de TNF α (*Drouart M et al. 2003 ; Smith et al. 2006*). Cet infiltrat inflammatoire se distingue de celui au niveau des enthèses provenant de patients atteints de PR ou de sujets arthrosiques (*Baeten D et al. 2000*).

▪ **Erosion osseuse :**

Les auteurs pointent tout particulièrement le fait qu'au cours de la physiopathologie de la SA, de nombreux arguments sont en faveur d'un rôle primordial de l'os lui-même dans les symptômes et les lésions présentes chez les patients atteints de cette pathologie (*Maksymowych W.P. 2000*). Des travaux histologiques ont bien mis en évidence les anomalies osseuses radiologiques des SpA telles que l'ostéite inflammatoire, ou ostéomyélite, siégeant immédiatement sous l'enthèse ou sous le cartilage de la sacro-iliaque (*Shichikawa K et al. 1985*). Il se pourrait donc qu'une réaction auto-immune prenne naissance dans la moelle osseuse dirigée contre les composants tissulaires immédiatement en contact avec elle, à savoir, le fibrocartilage de l'enthèse et le cartilage articulaire (*Gaucher A et al. 1987*).

Cette vision d'auto-immunité n'exclue pas les mécanismes inflammatoires locaux déclenchés par un stress mécanique ou des composants bactériens favorisent la réaction inflammatoire ou l'auto immunité elle-même (*Fournié B. 2004*). Les hypothèses émises indiquent toutes une augmentation de la vascularisation locale de l'enthèse qui pourrait favoriser le dépôt d'antigènes bactériens reconnus par les TLR (*Toll Like Receptor*). Ces réactions stimulent les macrophages et les polynucléaires ; cellules de l'immunité innée ; et activent les voies de signalisation cellulaire ainsi que la production de médiateurs inflammatoires (*Toussirot et Wendling. 2006*).

Après activation par les TLR, les CPA, majoritairement des cellules dendritiques, présentent l'antigène grâce à l'interaction du CMH avec le TCR et les molécules de co-stimulation CD80-CD86 (B7-1/B7-2) aux LT CD4+ naïfs ou LTh0 (LT helper indifférenciés). Ensuite, les cytokines IL-6 et IL-1 β sont sécrétées pour permettre la différenciation du LTh17, alors que le TGF- β est libéré pour inhiber la différenciation en LTh1. Une boucle d'amplification est ensuite réalisée grâce à la sécrétion d'IL-21. Une fois la différenciation en LTh17 réalisée, la CPA produit de l'IL-23 pour interagir avec son récepteur (IL-23R) à la surface du LTh17. Ceci permet la stabilisation et l'expansion de la lignée Th17, ainsi que la

sécrétion d'IL-17 et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) (Samson M et al. 2011) (Figure 8).

L'IL-17 est synthétisée à la fois par les cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les macrophages et par les cellules de l'immunité adaptative telles que les LT CD8⁺ et les LTh17. Six cytokines font partie de la famille de l'IL-17 dont deux sont principalement sécrétées, il s'agit de l'IL-17A et l'IL-17F qui induisent la sécrétion par les cellules épithéliales de la synovie, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs stimulant la granulopoïèse (GM-CSF ou *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) qui augmentent l'inflammation locale.

Au niveau du tissu synovial, l'IL-17 est responsable de l'infiltrat cellulaire et facilite la synthèse de métallo-protéinases matricielles (MPP) et de monoxyde d'azote (NO) par les chondrocytes, les cellules dendritiques et les macrophages. En effet, les MPP et le NO sont responsables d'une destruction de l'articulation. Cependant, au niveau de l'os, L'IL-17 augmente l'expression du facteur RANK (*Receptor activator of nuclear factor kappa B*) à la surface des ostéoclastes : l'interaction RANK/RANK-ligand (à la surface de certains LTh17) déclenche l'érosion osseuse (Samson M et al. 2011) (Figure 8).

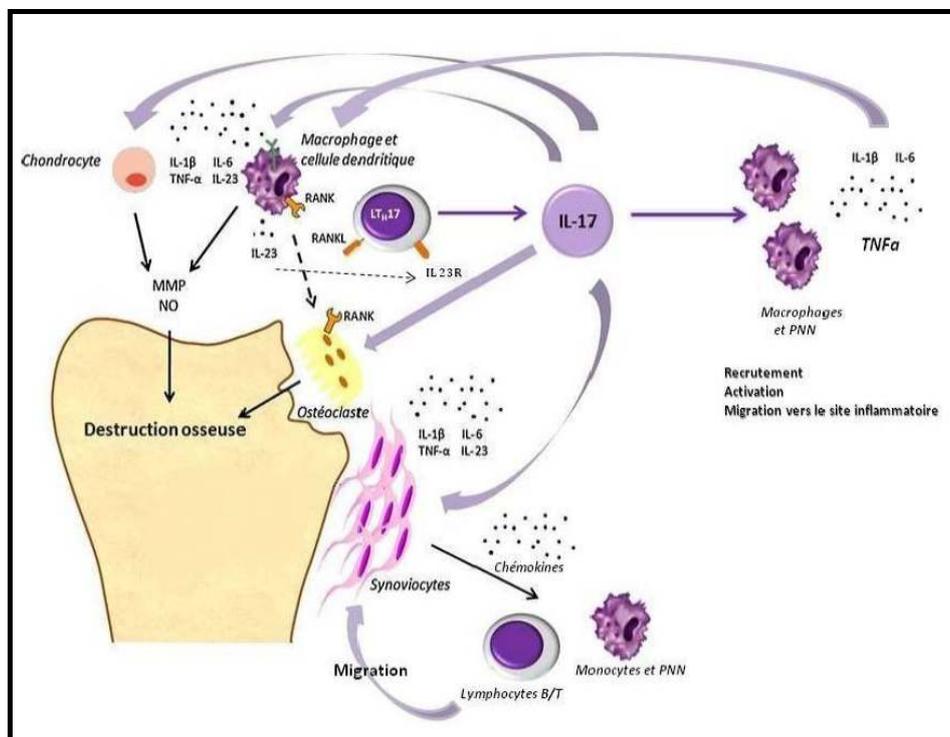


Figure 8 : Différenciation des lymphocytes Th0 en Th17, destruction osseuse de la spondylarthrite ankylosante (Samson M et al. 2011)

CD=cellule dendritique, *IL-1 β , 6, 17A, 17F, 21, 22, 23*= interleukines 1 β , 6, 17A, 17F, 21, 22, 23, *IL 21R et IL 23R*= Récepteurs des interleukines 21 et 23, *PAMPs*= pathogen associated molecular patterns, *TGF- β* =transforming growth factor β , *TLR*= toll like receptor, *RANK* = receptor activator of nuclear factor kappa B.

▪ **Synthèse osseuse excessive :**

Le développement de la SA est caractérisé contrairement à la PR, par un déséquilibre entre la résorption osseuse et l'ostéo-formation en faveur d'une formation osseuse excessive qui affecte pratiquement tous les compartiments du squelette.

Au niveau des tendons :

La formation d'excroissances osseuses a été aussi observée chez les spondylites prenant le nom d'enthésiophytes. La croissance osseuse passe par différents signaux cellulaires capables de réguler la différenciation et l'activation des ostéoblastes (Astier F et al. 2013).

Il a été montré que la prostaglandine E2 aurait un rôle dans la stimulation de la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. Les *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) quant à elles, auront un rôle dans la différenciation des chondrocytes (cellules à l'origine de la synthèse du cartilage). Enfin, la protéine Wnt qui jouerait un rôle plutôt dans la différenciation des ostéoblastes (Astier F et al. 2013).

Au niveau de la colonne vertébrale :

Une présence d'ossifications ou syndesmophytes est observée entre les espaces intervertébraux de patients atteints de la SA. L'évolution peut se poursuivre vers une ankylose du rachis, liée aux fusions consécutives des espaces intervertébraux. On parle de colonne en bambou (Figure 9).

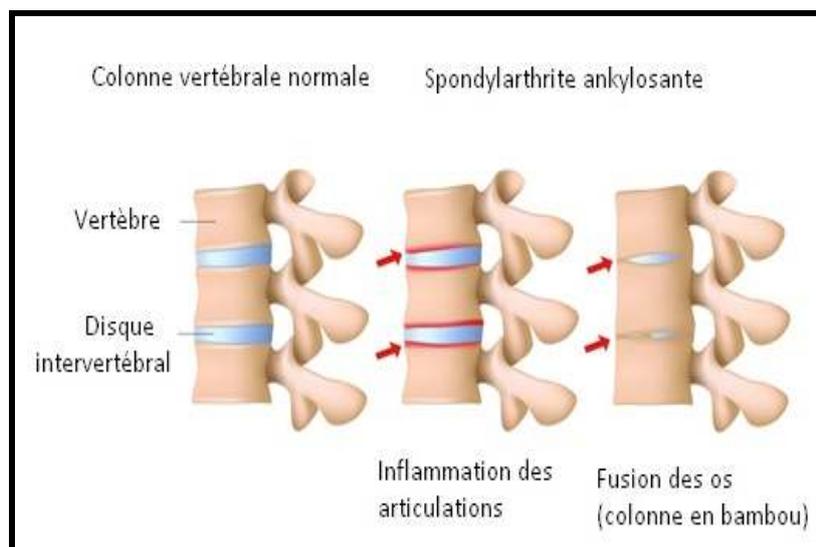


Figure 9 : Formation d'une colonne en bambou (Samson M et al. 2011)

VI. Associations et liaisons génétiques avec la spondylarthrite ankylosante

Le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) humain est une région située sur le chromosome 6 (6p21.3) qui comprend plusieurs systèmes génétiques dont le système HLA (*Human Leucocyte Antigen*). Cette région est caractérisée par un ensemble de gènes étroitement liés dont 40 % jouent un rôle dans la réponse immunitaire (*Forbes et al. 1999*).

L'équipe de *Braun J et al.*, a montré que le système HLA représentait plus de 30% de la prédisposition génétique de plusieurs maladies auto immunes (MAI) telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les spondylarthropathies (SpA) (*Braun J et al. 1995*). En effet, l'antigène humain leucocytaire B27 ou HLA-B27 est le premier facteur de risque identifié dans la survenue de la spondylarthrite, il appartient au CMH de classe I et est le facteur de susceptibilité majeur à cette maladie. Cependant, d'autres facteurs génétiques situés dans les autres classes du CMH semblaient également, être impliqués (*Reveille J.D. 2006 ; Fernando M.M et al. 2008*).

Par ailleurs, il a fallu attendre les premières publications des études du génome entier pour que des polymorphismes de gènes en dehors du CMH soient associés à la SA (*Laval S.H et al. 2001 ; WTCCC et TASC. 2007 ; Reveille J.D et al. 2010*). Tous ces gènes ou polymorphismes impliqués dans la survenue de cette maladie n'expliquaient pas toute l'héritabilité de la spondylarthrite. Par conséquent, il est devenu important d'explorer la possibilité que d'autres facteurs génétiques tels que les CNVs (*Copy Number Variations*) influenceraient le risque de survenue de la SA (*Costantino F. 2014*).

VI.1. Impact des gènes-HLA sur la susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante :

Quarante ans après sa découverte, l'association génétique entre la molécule HLA-B27 et la SA continue d'être l'une des plus fortes associations entre un antigène du CMH et une maladie complexe. En 1973, deux équipes ont identifié parallèlement une très forte association entre la SA et l'antigène tissulaire HLA-B27 (*Brewerton et al. 1973 ; Caffrey MF & James DC. 1973*). En 1977, des études ont montré que la prévalence de HLA-B27 augmentait au sein des familles de patients atteints de SA (*Woodrow J.C & Eastmond C.J. 1978*).

L'antigène HLA-B27, comme toutes les molécules HLA de classe I, est distribuée sur l'ensemble des cellules nucléées et sur les plaquettes (*Moalic V. 2010*). Cette molécule est

organisée en hétérodimère et est ainsi composée d'une chaîne lourde α à trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, qui est à l'origine du polymorphisme allélique. La chaîne α est associée par liaison covalente à une chaîne légère non polymorphe, la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$). Cette dernière est codée par un gène situé sur le chromosome 15 (**Figure 10**) (Toussirot E. & Wendling D. 2006 ; Khan M.A et al. 2007 ; Moalic V. 2010).

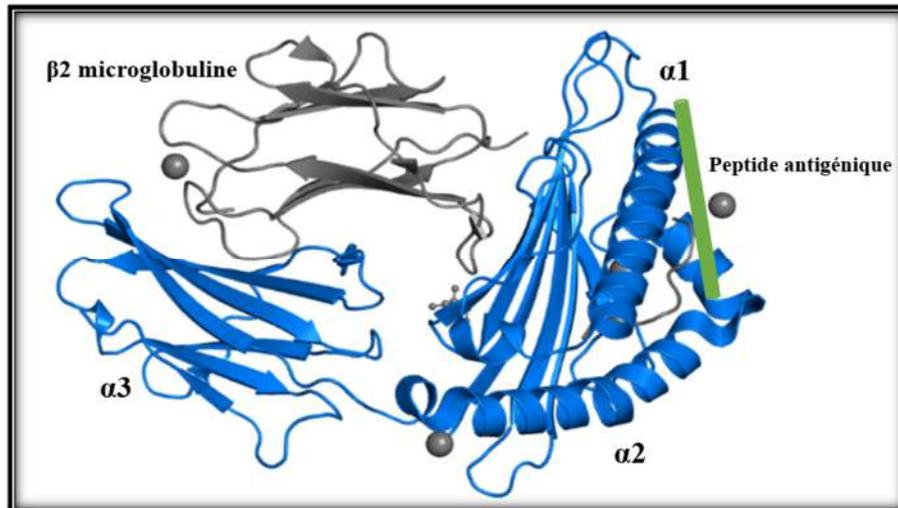


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B27 (Janke R. et al. 2017).

Structure et organisation en hétérodimère avec une chaîne lourde à trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et une chaîne légère $\beta 2$ microglobuline.

Plusieurs travaux ont pu montrer la forte association entre l'antigène HLA-B27 et le développement de la SA dans différentes régions du monde (Brown M.A et al. 1996) (Savran Oguza F et al. 2004 ; Khader N.M et al. 2012). En Algérie, une étude réalisée sur la population Algéroise a montré une forte association avec le HLA-B27 chez les patients SA par rapport aux témoins ($p=10^{-11}$, OR=39.73) (Amroun H et al. 2005). Une autre étude réalisée sur un échantillon de la population de l'Ouest a montré aussi, un résultat significatif pour le HLA-B27 ($p=0.00026$, OR=7.33) (Messal I. 2011).

Les études familiales suggéraient une contribution de *HLA-B27* correspondant à moins de 40% de l'ensemble du déterminisme génétique de la SA, alors que l'effet global de la région du CMH serait de 50% (Brown et al. 1997). En effet, d'autres allèles *HLA* de classe I ont été incriminés dans la susceptibilité à la SA comme l'allèle *HLA-B*60* (Robinson WP et al. 1989 ; Brown MA et al. 1996). Une interaction épistatique entre *HLA-B*60* et *HLA-B27* a été observée récemment (Van Gaalen FA et al. 2013). De plus, les allèles *HLA-B60* et *HLA-B61* ont été trouvés chez des sujets HLA-B27- dans une population Taiwanaise et Chinoise (Wei J.C et al. 2004). Et l'allèle *HLA-B*1403* a été identifié dans les populations sub-

sahariennes où le *HLA-B27* est extrêmement rare (*Paladini F et al. 2005 ; Cauli A et al. 2007 ; Taurog JD. 2007*).

L'identification de nouveaux gènes du système *HLA* classe I est rendue très délicate par le poids du gène *HLA-B* notamment l'allèle *HLA-B27* (*Brown MA et al. 1997*). Plusieurs études ont mis en évidence la contribution du gène *MICA* (*MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A*) dans la susceptibilité à la SA. En Algérie, l'association entre ce gène a été confirmée d'abord, par l'équipe d'Amroun *et al*, qui a rapporté une association entre le génotype *MICA-129 met/met* dans la population Algéroise (*Amroun H et al. 2005*). Ensuite, une étude réalisée sur un échantillon de la population de l'Ouest Algérien a montré également que l'allèle *MICA-129met* est fortement associé à la SA chez les patients atteints de la SA ($p=11.10^{-6}$) (*Bouras N et al. 2017*). Finalement, le gène *MICA* a été associé chez des patients SA provenant de différentes ethnies, mais cette association a été observée dans les deux groupes *HLA-B27* positifs et négatifs (*Talpin A. 2013*). Dans certains travaux cette association avait été finalement expliquée par le déséquilibre de liaison retrouvé entre le gène *MICA* et *HLA-B27* (*Tsuchiya N et al. 1998 ; Martinez-Borra J et al. 2000*).

Les gènes du CMH de classe II ont également fait l'objet d'études, comme celle de *Brown et al*, consacrée aux molécules *HLA-DR* qui avait suggéré une association de l'allèle *HLA-DRB1*01* et le risque de développer la SA (*Brown M.A et al. 1998a*). D'autres travaux ont montré que l'allèle *HLA-DRB1*04* était aussi impliqué à la susceptibilité de cette maladie (*Said-Nahal R et al. 2002*). En effet, il semblerait que la présence de la molécule *HLA-DR4* multiplierait par un facteur (de 2,8) le risque de SA chez les individus apparentés aux patients *B27+* (*Breban M et al. 2003*). Dans le but de rechercher d'autres gènes *HLA* de susceptibilité à la SA, une étude menée par l'équipe de *Djouadi K et al*, a montré que l'allèle spécifique *DQB1*0503* a été retrouvé avec une fréquence très élevée chez les patients SA ($RR=12.82$). Il semblait constituer un facteur de risque important (*Djouadi K et al. 2001*). Plus récemment, une autre équipe a rapporté l'association d'une région, située entre les gènes *HLA-DPA1* et *HLA-DPB1*, à la survenue de la SA dans une population Espagnole, confirmée par la suite chez les Portugais (*Díaz-Peña R et al. 2011 ; Díaz-Peña R et al. 2013*).

Des études ont aussi été consacrées aux gènes du CMH de classe III. Le gène du *TNF alpha* (*TNF α*) qui code pour une cytokine pro-inflammatoire et modulateur de la réponse immune a été largement étudié. En effet, une association significative entre le polymorphisme en position 308 sur le promoteur de ce gène et la survenue de la SA a été constatée chez les Anglais et les Ecossais (*Mc Garry F et al. 1999 ; Milicic A et al. 2000*). Elle a ensuite été

retrouvée chez les Mexicains et les Portugais (*Vargas-Alarcón G et al. 2006 ; Sousa E et al. 2009*). Le gène qui code pour la protéine de choc thermique, HSP70, a été aussi associé au développement de la SA chez les individus HLA-B27+ et HLA-B27- (*Vargas-Alarcón G et al. 2002*).

VI.2. Impact des gènes-non HLA sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante :

Si le CMH n'explique qu'une partie du déterminisme génétique de la SA (*Brown et al. 1997 ; Reveille J.D et al. 2012b*), l'autre part de susceptibilité génétique serait due forcément à des facteurs localisés en dehors de cette région. Les méthodes de recherche de gènes de susceptibilité dans le cas des maladies complexes ont toutes été appliquées à la SA, qu'ils s'agissent des études de liaison ou des études d'association.

VI.2.1. Les études de liaison génétique :

Trois études de liaison pan-génomique ont été précédemment publiées concernant la génétique des SpA : les deux premières se sont intéressées uniquement à la génétique de la SA (*Brown M.A et al. 1998b ; Laval S.H et al. 2001 ; Zhang G et al. 2004*) et la troisième à l'ensemble des sous-types des SPA (*Miceli-Richard C. et al. 2004*). Ces trois études ont fait secondairement l'objet de deux méta-analyses (*Carter et al. 2007 ; Lee Y. H et al. 2005*).

Les Criblages génomiques de l'équipe d'Oxford ont comporté deux étapes successives analysées d'abord séparément puis conjointement. L'analyse conjointe portait sur 185 familles comprenant 255 paires de germains atteints. Le génotypage de marqueurs microsatellites répartis sur tout le génome différait en fonction du jeu de familles analysé : 505 marqueurs lors de la première étape et 367 marqueurs lors de la seconde étape (*Hoyle, E et al. 2000*). L'analyse multipoints a permis de mettre en évidence la région du CMH avec un LOD score de 15,6 et la région 16q23.3 avec un LOD score maximal de 4,7. Par ailleurs, cinq locus supplémentaires ont atteint le seuil de suggestivité : 1p, 2q, 9q, 10q et 19q (*Brown M.A et al. 1998b ; Laval S.H et al. 2001*).

En 2004, le *North American Spondyloarthritis Consortium* (NASC) a publié une étude de liaison portant sur 180 familles (244 paires de germains atteints) (*Zhang, G. et al. 2004*). Un jeu de 400 marqueurs microsatellites a été utilisé dont 16 nouveaux marqueurs ont été génotypés pour affiner les premiers résultats. La région du CMH était la seule à obtenir un score de liaison significatif.

Contrairement aux études précédentes, le Criblage du Groupe Français d'Étude Génétique de la Spondylarthrite (GFEGS) s'est intéressé à l'ensemble des sous-types de SPA (Miceli-Richard C. et al. 2004). Elle a aussi inclus des familles plus étendues présentant notamment plusieurs générations de malades. Dans un premier temps, 369 marqueurs microsatellites ont été génotypés chez 65 familles multiplex. Ensuite, une étude d'extension a été réalisée en génotypant 21 microsatellites localisés sur les régions d'intérêt identifiées lors de la première étape chez les mêmes familles, ainsi que dans 55 familles multiplex supplémentaires. Lors de la première étape de l'étude, aucune région n'a atteint le seuil de significativité en dehors du CMH mais quatre régions d'intérêt ont été identifiées sur 5q, 9q, 13q et 17q. Dans la deuxième étape, ils ont identifié la région 9q31-34 qui chevauchait une région avec une liaison suggestive, le locus *SPA2* (Costantino F. 2014).

Deux méta-analyses ont été publiées successivement en 2005 et en 2007 (Lee Y.H et al. 2005 ; Carter et al. 2007). Les deux se basaient sur les résultats des trois études précédemment citées. Bien que la méthodologie utilisée fût différente, les résultats se sont révélés assez proches. La méta-analyse de Lee et al, mettait en évidence une liaison significative au niveau de la région du CMH, ainsi qu'un signal de liaison suggestif dans cinq autres régions : 6q, 9q, 16q, 17p et 19p (Lee Y.H et al. 2005). L'étude de Carter et al, identifiait une liaison significative avec le CMH et une liaison suggestive avec trois autres locus, 6q, 10q et 16q (Carter et al. 2007).

VI.2.2. Les études d'association génétique :

Les études d'association sur la survenue de la SA ont d'abord été restreintes à l'analyse de gènes-candidats puis grâce aux progrès technologiques, elles ont pu s'étendre à l'ensemble du génome. Cependant, les polymorphismes génétiques identifiés à ce jour ne représentent qu'une faible proportion de l'héritabilité totale de la spondylarthrite. De plus, les conséquences fonctionnelles de ces polymorphismes de susceptibilité sont encore largement méconnues. De ce fait, d'autres approches ont été envisagées ces dernières années comme la recherche de variants structuraux (délétions, insertions, ou variations de nombre de copies (CNV)).

- Les études d'association du génome-entier :

Les études d'association génétique pan-génomiques (*Genome-Wide Association Study*, GWAS) ont pour objectif d'identifier des facteurs de susceptibilité génétiques des maladies

multifactorielles. Elles consistent à comparer la fréquence de centaines de milliers de variants génétiques distribués sur l'ensemble des chromosomes entre un groupe de cas et un groupe de témoins, en utilisant des technologies de génotypage à haut débit (*Debette S. 2012*).

À ce jour, quatre études GWAS d'association génétique de susceptibilité à la SA ont été publiées concernant les polymorphismes de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (*Zhixiu L. & Matthew A.B. 2017*). Les trois premières ont été réalisées dans des populations caucasiennes (*Burton P.R et al. 2007 ; Reveille J.D et al. 2010 ; Evans D.M et al. 2011*), alors que la dernière a étudié la population Chinoise de l'ethnie Han (*Lin Z et al. 2012*). Ces études ont permis l'identification de facteurs de susceptibilité à la SA en dehors du CMH. Plus récemment, l'*International Genetics of Ankylosing Spondylitis* consortium (IGAS) a publié les résultats d'une nouvelle étude gène-candidat à grande échelle. Cette étude consistait à l'analyse simultanée d'un grand nombre de locus potentiellement impliqués dans les maladies auto-immunes ou inflammatoires. Outre la confirmation des facteurs génétiques identifiés lors des précédentes GWAS, 13 nouveaux locus de susceptibilité à la SA ont été identifiés (**Tableau 3**) (*IGAS. 2013*). Cependant, on estime que la contribution de l'ensemble des gènes décrits (*HLA-B27, IL23R, ERAP1, RUNX3, IL1R...*) ne représenterait que 25,39 % de l'héritabilité globale de cette pathologie, dont l'écrasante majorité correspond au poids du *HLA-B27* (23,3%) (*Reveille J.D et al. 2012b*).

Les GWAS ont permis avec succès de mettre en évidence des associations entre les marqueurs de type SNPs et les maladies fréquentes. Cependant, ces SNPs associés représentent une faible fraction de la composante génétique de la plupart de ces maladies et notamment de la SA et leur impact sur la physiopathologie de ces maladies n'est pas toujours évident (*Burton P.R et al. 2007 ; Reveille J.D et al. 2010 ; Evans D.M et al. 2011 ; Lin Z et al. 2012*). Il est connu maintenant que le génome est très instable et que des régions, qui peuvent dépasser plusieurs dizaines de milliers de nucléotides sont supprimées, remaniées ou dupliquées. Le génome contient des milliers de ces variations de structure que l'on appelle CNV et il est admis actuellement, que ces derniers pourraient être à l'origine de certaines maladies génétiques (*Feuk L et al. 2006 ; Redon R et al. 2006*). Ces variations ont des retentissements sur l'expression des gènes, les maladies communes (complexes) pourraient donc résulter non pas de variations qualitatives de gènes mais de variations de leur expression (*Yang TL et al. 2008 ; Fanciulli M et al. 2010*). En effet, de nouvelles GWAS confirmées par des études cas-témoins ont vu le jour afin d'identifier les CNVs associés à la SA et contribuer à la recherche de l'héritabilité manquante de cette maladie.

Tableau 3 : Résultats des études d'association GWAS dans la SA (IGAS. 2013).

Études	Populations	Locus identifiés en dehors du CMH
<i>(Burton P.R. et al. 2007)</i>	Caucasienne	<i>IL23R, ERAP1</i>
<i>(Reveille J.D. et al. 2010)</i>	Caucasienne	<i>IL23R, ERAP1</i> <i>2p15, 21q22, ANTXR2, IL1R2</i>
<i>(Evans D. M. et al. 2011)</i>	Caucasienne	<i>IL23R, ERAP1, 2p15, 21q22</i> <i>KIF21B, RUNX3, IL12B, LTBR-TNFRFSA1,</i> <i>ANTXR2, PTGER4, CARD9, TBKBP1</i>
<i>(Lin Z. et al. 2012)</i>	Chinoise Han	<i>2p15,</i> <i>EDIL3-HAPLN1, ANO6</i>
<i>(IGAS. 2013)</i>	Caucasienne et Asiatique	<i>RUNX3, IL23R, GPR25-KIF21B, 2p15, PTGER4,</i> <i>ERAP1, IL12B, CARD9, LTBR-TNFRFSA1, NPE-</i> <i>PPS, 21q22.</i> <i>IL6R, FCGR2A, UBE2E3, GPR35, BACH2, ZMIZ1,</i> <i>NKX2-3, SH2B3, GPR65, IL27-SULT1A1, NOS2,</i> <i>TYK2, ICOSLG</i>

Les locus en gras correspondent aux locus déjà associés à la SA dans au moins un précédent GWAS.

Les locus en bleu correspondent à des associations suggestives.

En 2014, une étude GWAS a été réalisée dans le but d'identifier les CNVs associées à la spondylarthrite chez des sujets Coréens (*Jung S.H et al. 2014*). Les CNVs ciblés sont ceux déjà inventoriés lors des études exploratoires des CNVs dans le génome chez différentes populations (*Conrad Pinto et al. 2010*). Un total de 309 patients atteints de SA et 309 sujets témoins ont été génotypés en utilisant la PCR quantitative en temps réel. En effet, 227 régions CNV étaient significativement associées au risque de développer la SA. Parmi les régions CNV candidates, neuf ont été répliquées avec succès dans la première analyse : (*HHAT, BMP8A, PRKRA, HLA-DPBI, CNTN5, EEF1DP3, RGS6, et IL17RA*). Les cinq régions CNVs de type délétion ; 1q32.2, 2q31.2, 6p21.32, 13q13.1 et 16p13.3 ; étaient associées à un risque accru de spondylarthrite tandis que les autres étaient protectrices. Dans la deuxième analyse, quatre régions CNVs (1q32.2, 2q31.2, 6p21.32 et 16p13.3) ont été répliquées (*Jung S.H et al. 2014*).

- Les études d'association de gènes-candidats :

L'approche gène candidat est plus puissante que les analyses de liaisons génétiques dans la détection des effets mineurs contribuant à la prédisposition de la maladie. Néanmoins, pour avoir une étude avec des résultats probants, le *design* de l'étude doit être fait avec précaution pour ne pas avoir des associations faussement positives). Le choix du gène candidat peut se faire selon son implication fonctionnelle dans les mécanismes pathogéniques (gène candidat fonctionnel) et, ou bien en considérant sa localisation dans une région génomique auparavant décrite (*Cordell & Clayton. 2005*).

De nombreuses études d'association génétique ont été publiées concernant l'impact des polymorphismes (SNP) de gènes candidats (*FCGR, CTLA4, IL1, ACE...*) sur la survenue de la spondylarthrite, les résultats sont résumés dans le **Tableau 4**. Toutefois, la majorité des associations mises en évidence n'ont pas pu être répliquées de façon indépendante.

Par ailleurs, certaines CNVs localisées dans des régions candidates impliquées dans la réponse immunitaire ont été identifiées aussi dans la contribution au développement des MAI notamment, la SA (*Nguyen D.Q et al. 2006 ; Schaschl H et al. 2009*). En effet, le locus *FCGR* (*Low-affinity Fc gamma Receptor*) a été largement étudié. Les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* ont été associés à survenue de la PR et de la SA (*Morgan A.W et al. 2000 ; Morgan A.W et al. 2006 ; Wang et al. 2016*). Le gène *CCL3L1* (*Chemokine C-C motif Ligand 3-like 1*), quant à lui, a été associé au développement du Lupus (LES) ainsi qu'à la PR et le diabète de type 1 (*Mamtani M et al. 2008 ; Ben Kilani M.S et al. 2014*).

Tableau 4 : Résultats des études d'association gènes-candidats dans la SA.

Gènes explorés	Localisation chromosomique	Associations significatives	Absence d'associations
<i>TNAP</i>	1p35	(Tsui H.W et al. 2007)	(Cheng N. et al. 2009). (Liu Z et al. 2013)
<i>FCRL4</i>	1q21	(Zeng Z. et al. 2012)	-
<i>FCGR2B</i>	1q23	(Duan Z.H. et al. 2012)	-
<i>IL10</i>	1q32-q33	(Lv C. et al. 2011)	(Goedecke V. et al. 2003 (Mastrovic Radoncic K et al. 2013)
<i>IL1</i>	2q14	(MC Garry F et al. 2001). (Van der Paardt M. et al.2002). (Timms A.E. et al. 2004). (Chou C.T. et al. 2006). (Maksymowych W.P. et al. 2006). (Sims A.M. et al. 2008). (Guo Z.S. et al. 2010). (Monnet D. et al. 2012).	(Kim T.H. et al. 2005)
<i>CTLA4</i>	2q33	(Azizi E. et al. 2010). (Lee W.Y. et al. 2010). (Wang NG et al. 2015). (Dahmani C.A et al. 2018)	-
<i>PDCD1</i>	2q37	(Lee S.H. et al. 2006). (Yang Q et al. 2011)	(Soleimanifar N. et al. 2011)
<i>ANKH</i>	5p15	(Timms A.E et al. 2003). (Tsui F. W. L. et al. 2003). (Pimentel-Santos F.M. et al. 2012)	(Liu Z et al. 2013)
<i>MSX2</i>	5q35	(Furuichi T. et al. 2008)	-
<i>CAI</i>	8q21	(Chang X. et al. 2012)	-
<i>ASPEN</i>	9q22	(Liu D et al. 2010)	-
<i>TLR4</i>	9q33	(Van der Paardt M. et al. 2005 ; Gergely P et al. 2006 ; Snelgrove T. et al. 2007 ; Pointon J.J et al. 2008)	(Na K.S. et al. 2008). (Xu W.D et al. 2012)
<i>LRPS</i>	11q13	(Liu J. et al. 2011)	
<i>MMP3</i>	11q22	(Jin L. et al. 2005)	(Wei J.C.C. et al. 2009)
<i>JARID1A</i>	12p11	(Pointon J. J. et al. 2011). (Chai. W. et al. 2013)	-
<i>ORAI1</i>	12q24	(Wei J. C. C. et al. 2011)	-
<i>IKBa</i>	14q13	(Hung Y.H. et al. 2009)	-
<i>MEFV</i>	16p13	(Cosan F. et al. 2010). (Yigit S. et al. 2012)	-
<i>CARD15</i>	16q21	(Miceli-Richard C. et al. 2002). (Kim. T.-H. et al. 2004). (Kobak S.. 2013)	(Van der Paardt M. et al. 2003)
<i>STAT3</i>	17q21	(Danoy P. et al. 2010). (Davidson S. I. et al. 2011)	-
<i>ACE</i>	17q23	(Shehab D. K. et al. 2008). (Inanr A. et al. 2012)	-
<i>TGFβ</i>	19q13	(Jaakkola E. et al. 2004). (Wu W. et al. 2012)	-
<i>CYP2D6</i>	22q13	(Brown M.A. et al. 2000)	-

TNAP: Tissue-Nonspecific ALP, *IL (1, 10)* : interleukins, *CTLA4* : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4, *PDCD1* : Protein Coding), Programmed Cell Death 1, *ANKH*: Inorganic Pyrophosphate Transport Regulator, *MSX2*: Msh Homeobox 2, *CAI*: Carbonic anhydrase 1, *ASPEN*: asporin precursor protein, *TLR4*: Toll-like receptor 4, *LRPS*: lipoprotein receptor-related protein phosphatase, *MMP3*: Matrix Metalloproteinase 3, *JARID1A*: jumonji/ARID domain-containing protein 1A, *ORAI1*: Calcium release-activated calcium channel protein 1, *IKBa*: NF-kappa-B inhibitor alpha, *MEFV*: Mediterranean fever, *CARD15*: caspase recruitment domain-containing protein 15, *STAT3*: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3, *ACE* : Angiotensin Converting Enzyme, *TGFβ*: transforming growth factor-beta, *CYP2D6*: Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6.

▪ **Les variations de nombre de copies**

Depuis quelques années, les CNVs sont considérées comme des variations génomiques indispensables à investiguer dans la composante génétique des maladies complexes (Almal & Padh. 2012). A ce jour, des CNVs ont été identifiés dans environ 15% du génome humain. Leurs rôles dans le développement de maladies mono-géniques et multifactorielles ont également été mis en évidence (Redon R & al. 2006).

L'étude des variations structurelles est un des champs en cours d'explorations dans le cadre de la compréhension du génome. Actuellement, il existe une acquisition de plus en plus de nouvelles connaissances sur la structure et la fonction des gènes. Les CNVs sont des régions génomiques et non pas seulement des polymorphismes géniques, des variations qui impliquent des segments d'ADN allant de quelques kilo-bases à quelques méga-bases. L'équipe de Feuk et ses collaborateurs ont proposé une définition de CNVs en 2006 : « un CNV est défini comme une variation de copies d'une région génomique dont la séquence est supérieure à 1kb où le nombre de copies diffère par rapport à un génome de référence. Il est considéré comme un polymorphisme si sa fréquence dans la population est supérieure ou égale à 1% » (Feuk L et al. 2006). Après concertation, il a été décidé que la nomination "CNV" regroupait trois sous-groupes : les larges variants de nombre de copies (LCVs, (Iafrate A.J et al. 2004), les polymorphismes de nombre de copies (CNP) (Sebat L et al. 2004) et les variants de taille intermédiaire (ISV) (Tuzun E et al. 2005). Les CNVs peuvent présenter, au sein du génome, soit un gain de nombre de copies (insertion ou duplication) soit une perte (délétion ou des génotypes nuls) et ceci par rapport à une séquence de référence du génome (Scherer S.W et al. 2003). Il existe bien d'autres variations structurelles du génome telles que l'inversion et la translocation qui semblent avoir aussi de l'importance (Figure 11).

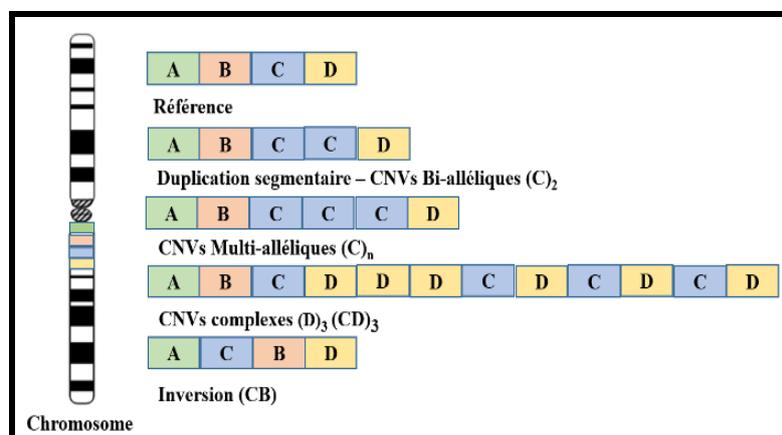


Figure 11 : Les microremaniements affectant les segments d'ADN (D'après Estivill X & Armengol L. 2007). Ces variations conduisant à des suppressions, des duplications, des inversions et des changements de segments chromosomiques (bi-allélique, multi-allélique et complexes). Le seul segment qui est constant est "A". Le segment "B" varie en orientation dans l'inversion. Les segments "C" et "D" montrent différents types de variation de nombre de copies (CNVs).

▪ **Mécanisme de formation des CNVs :**

Selon la définition classique, les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux. Plus récemment les progrès de la cytogénétique moléculaire ont conduit à proposer des modèles pour expliquer les remaniements du génome humain. Ces modifications peuvent apparaître lors de la méiose comme à la mitose, tel que l'a été montré chez de vrais jumeaux qui pouvaient avoir un nombre de copies différent (*Piotrowski A et al. 2008*).

Le changement de nombre de copies requiert un changement dans la structure du chromosome en joignant deux séquences d'ADN préalablement séparées, de ce fait, deux types de réarrangement se distinguent : les réarrangements récurrents (ou fréquents) et les réarrangements non-récurrents. Les premiers possèdent la même taille et des bordures fixes chez plusieurs individus. Ils surviennent dans des régions contenant des séquences appelées « *Low Copy Repeat* » (LCRs) qui possèdent une forte homologie. Les CNVs issus de ces changements sont, en très grande partie le résultat de recombinaison homologue non-allélique (*Non-Allelic Homologue Recombinaison*, NAHR). Cette recombinaison nécessite deux répétitions segmentaires LCRs d'une longueur suffisante qui agissent comme substrats moléculaires de recombinaison (*Hastings P.J et al. 2009*). Lorsque ces répétitions se situent sur le même chromosome en orientation directe, la NAHR entraîne une duplication et/ou une délétion (*Estivill X & Armengol L. 2007*).

Les réarrangements non-récurrents, quant à eux, sont de tailles variables et peuvent survenir à n'importe quel endroit du génome. Des séquences répétées présentant un haut degré d'homologie (*Alu* et *LINE* par exemple) pourraient induire certaines NAHR rares, mais la majorité des remaniements non-récurrents sont expliqués grâce aux modèles de jonction d'extrémités non homologues (*Non Homologous End Joining* ou NHEJ), et ceux d'interruption de la fourche de réplication et commutation de la matrice (*Fork Stalling and Template Switching* ou FoSTeS). Le NHEJ est un mécanisme de réparation des cassures d'ADN double-brin qui nécessite une région génomique commune entre des séquences de très petite taille (2 à 15pb).

A l'inverse, le FoSTeS s'agit principalement d'une voie basée sur la fourche de réplication de l'ADN qui ne nécessite pas forcément la survenue d'une cassure double brin contrairement aux NAHR et NHEJ (*Gu W et al. 2008*).

VI.3. Association entre la molécule CTLA-4 et la survenue de la spondylarthrite ankylosante :

VI.3.1. Rôle de CTLA-4 dans l'activation des lymphocytes T :

L'activation des LT est un mécanisme complexe qui fait intervenir plusieurs marqueurs et molécules immunitaires. Le premier signal d'activation des LT est la présentation d'Ag réalisée par le récepteur des LT (TCR), d'un côté, et par les molécules du CMH à la surface des CPA, de l'autre côté. L'activation optimale des LT requiert un second signal indépendant de l'antigène appelé : la co-stimulation (Rudd C.E & Schneider H. 2003).

Les molécules de co-stimulation peuvent être divisées en deux groupes ; « CD28, LFA-1 et ICOS » induisent une activation après liaison avec leur ligand (signal positif ou signal 2) (Figure 12 (A)), alors que les molécules « CTLA-4 et PD-1 » génèrent des signaux plutôt inhibiteurs (signal négatif ou signal 3) (Figure 12 (B)). Par ailleurs, il existe une balance de régulation des LT, les molécules CD28 et CTLA-4 sont antagonistes ; capables de se fixer sur le même ligand CD80/CD86 (B7) induisant par contre deux signaux opposés (positif et négatif, respectivement) (Gomes B.O. 2003).

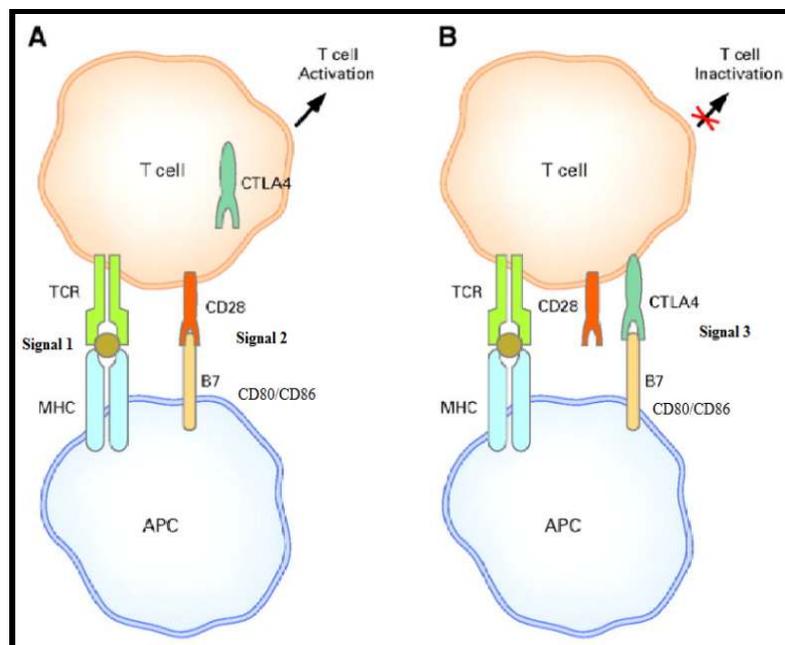


Figure 12 : Rôle des molécules de co-stimulation dans l'activation du lymphocyte T (Gomes B.O. 2003).

A : activation des cellules T par deux signaux positifs, **Signal 1 :** TCR-MHC, **Signal 2 :** CD28-B7 (CD80-CD86).

B : inhibition de l'activation des LT par un troisième signal ; cette fois-ci ; négatif, **Signal 3 :** CTLA-4-B7 (CD80-CD86).

APC : Antigen Presenting Cell (Cellule présentatrice d'antigène). **MHC :** Major Histocompatibility Complex (Complexe Majeure d'histocompatibilité).

VI.3.2. La protéine CTLA-4 :

La molécule CTLA-4 ou CD152 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 qui fait partie de la superfamille des Ig. Elle est exprimée à la surface des cellules CD4 et CD8 sous la forme d'un homodimère de 43kDa (*Harper K et al. 1991*) et est principalement induite (48h-72h) au cours de l'activation du LT (*Egen JG & Allison JP. 2002*). Elle est codée sous la forme d'une protéine précurseur de 223 acides aminés (aa). La protéine mature contient une région extracellulaire de 124 aa avec une homologie avec le domaine Ig-V, une région transmembranaire de 26 aa et une région cytoplasmique de 36 aa. CTLA-4 et CD28 sont homologues à 30% au niveau protéique. Leur similitude est due à la reconnaissance aux ligands identiques ; CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). CTLA-4 peut se fixer aux deux ligands CD80/CD86 à la fois avec une affinité 20 à 50 fois plus grande que CD28 (*Van der Merwe P.A et al. 1997*).

La molécule CTLA-4 induit l'inhibition de l'activation des LT par l'arrêt du cycle cellulaire après une cascade de signalisation provoquant le ralentissement voire la suppression de la réponse immunitaire. En effet, l'engagement de CTLA-4 via CD80-CD86 favorise la production autocrine ou paracrine de l'enzyme IDO (*Indole amine 2,3-DiOxygénase*) libérée par les CPA. Cette enzyme dégrade le tryptophane qui inhibe la prolifération cellulaire des LT (*Kearney E.R et al. 1995*). Elle semble avoir un effet négatif sur l'organisation des synapses immunologiques. Les phosphatases recrutées par CTLA-4 favorisent la polymérisation du cytosquelette et la polarisation des radeaux lipidiques dans la zone d'interaction membranaire entre la CPA et le LT-CD4 (*Walunas T.L et al. 1994 ; Krummel M.F & Allison J.P. 1995*). CTLA-4 régule la sécrétion de certaines cytokines par inhibition des facteurs de transcription dans le noyau tels que AP-1, NFAT et NF-kB (*Waterhouse P et al. 1995 ; Saito T et al. 1998*).

VI.3.3. Le gène *CTLA4* :

Chez l'Homme, le gène codant pour la molécule inhibitrice CTLA-4 est localisé sur le chromosome 2 (2q33) au sein d'une région candidate qui comporte trois molécules clés dans l'activation et la régulation des LT (CD28, CTLA-4 et ICOS) (*Dariavach P et al. 1988*). L'homologie entre la séquence génomique du *CTLA4* humain et murin est de 78% et l'homologie au niveau protéique est de 74% (au niveau de la protéine précurseur). Les différences dans ces séquences peuvent suggérer différents mécanismes de régulation des

deux gènes (*Kristiansen OP et al. 2000*). Le gène *CTLA4* s'étend sur 6Kb et porte 4 exons dont l'épissage alternatif du transcrit primaire peut produire une protéine transmembranaires (exons 1 à 4) et une forme soluble (exons 1, 2, 4, sCTLA-4). Ce gène est très polymorphe où plusieurs variations géniques ont été décrites dans sa séquence génomique (*Harper K et al. 1991 ; Ling V et al. 1999*).

VI.3.4. Les polymorphismes du gène *CTLA4* :

L'équipe de *Deichmann et al*, a publié pour la 1^{ère} fois la séquence génomique des régions régulatrices et codantes du gène *CTLA4* (*Deichmann K et al. 1996*). De nombreux polymorphismes ont été distingués tout au long de la séquence du gène *CTLA4* humain (*Nistico` L et al. 1996 ; Donner H et al. 1998*). Seulement, quatre variations ont été étudiés et associés à un très large éventail de MAI et inflammatoires.

Le premier est un polymorphisme situé au niveau du promoteur induisant une transition de C en T en position -318 (C-318T) (*Ligers A et al. 1999*). Ensuite, un fort déséquilibre de liaison (DL) a été montré entre ce polymorphisme et un deuxième SNP situé au niveau de l'exon 1 à la position 49 (A49G) (*Larsen ZM et al. 1999*). Le SNP +49 provoque une substitution d'Alanine en Thréonine sur le codon 17 de l'exon 1. Ce SNP a été trouvé aussi en DL avec la région 3'UTR du gène *CTLA4* dont deux variations ont été largement explorées. Une répétition d'un motif AU (AT)_n dont le nombre de répétition peut atteindre n=30 engendrant des allèles très informatifs. Et le second polymorphisme est une transition de A en G localisé à 279pb en amont du site de poly-adénilation nommé : [*CTLA4*] rs3087243 (A>G, il est appelé aussi « *CT60* ») (**Figure 13**) (*Malquori L et al. 2008*).

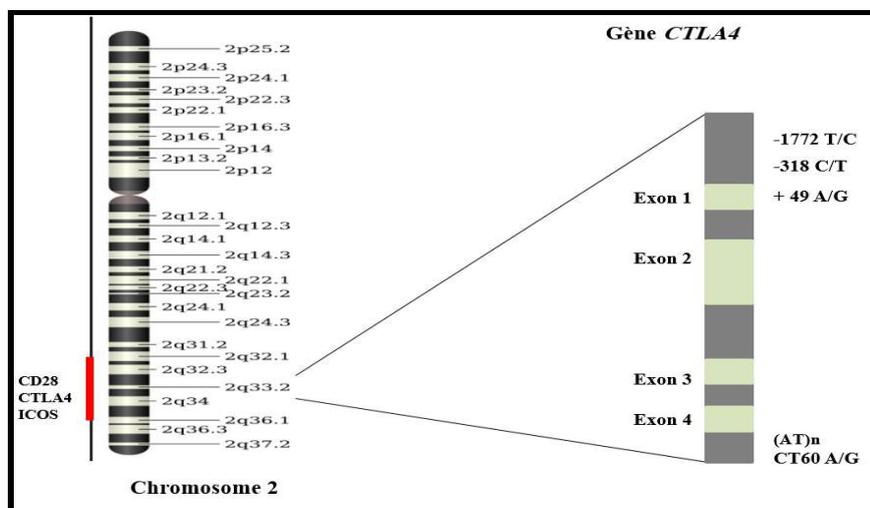


Figure 13 : Localisation des polymorphismes du gène *CTLA4* (d'après *Harper K et al, 1991 ; Ling V et al, 1999*).

L'épissage alternatif du transcrit primaire du gène *CTLA4* produit deux sortes de protéines (transmembranaire et soluble). Des preuves expérimentales ont présenté l'effet de l'allèle G du polymorphisme rs3087243 sur l'expression de la forme soluble de la protéine CTLA-4 mais non pas sur la forme longue. En effet, l'allèle G était en corrélation avec l'augmentation de la production de la forme soluble de CTLA-4 chez les sujets atteints de MAI (Oaks et al. 2000 ; Purohit et al. 2005), mais parfois avec sa diminution (Ueda H et al. 2003 ; Kaartinen T et al. 2007). Cependant, l'équipe d'Anjos et al, a montré que le polymorphisme rs3087243 (A>G) ne suggère aucun effet fonctionnel évident (Anjos S.M et al. 2005 ; Anjos S.M & Polychronakos C. 2006).

Par ailleurs, l'étude de Maier et al, a montré que l'allèle G pourrait influencer la signalisation cellulaire des LT-CD4 au cours des MAI telle que la SA. Cette étude a suggère un mécanisme direct du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 dans l'activation des LT (Maier LM et al. 2007). Ensuite, l'équipe de Malquori et al, a démontré que la région 3'UTR du gène *CTLA4* où se situe le polymorphisme rs3087243 contient des séquences qui peuvent réguler son expression au niveau post-transcriptionnel. Ceci influence à la fois la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la traduction de ce gène. Cette étude a suggéré que plusieurs éléments agissant en cis sont impliquées dans ces mécanismes (Malquori L et al. 2008). Ce polymorphisme fait partie des SNPs sélectionnés pour l'étude d'association à la SA dans cette thèse.

VI.4. Association entre la molécule c-REL et la survenue de la spondylarthrite ankylosante :

VI.4.1. Les protéines NF-kB/Rel :

Chez les cellules de mammifères, la famille NF-kB (*Nuclear Factor-kappa B*) exprime cinq membres de protéines Rel groupés en deux classes. La première comprend NF-kB1 (p50) et NF-kB2 (p52) exprimés respectivement, sous forme de précurseurs p105 et p100. La seconde classe, comprend p65 (Rel-A), Rel-B et c-Rel qui ne subissent pas de phénomène de maturation protéolytique. Le NF-kB est composé d'homo- ou d'hétéro-dimères formés de combinaisons variées de ces 5 sous-unités. Ces protéines se lient spécifiquement à l'ADN grâce à une séquence consensus de 10pb : 5'-GGGRNNYYCC- 3' (R = purine, Y = pyrimidine, N = autres bases), que l'on retrouve sur les promoteurs d'un très grand nombre de gènes (Vermeulen et al. 2002). Dans leur partie amino-terminale ces protéines partagent une

séquence de 300aa extrêmement conservée, appelée le Domaine d'Homologie Rel (RHD) (Ghosh et al. 1998).

Le facteur NF-κB est un facteur de transcription décrit pour la première fois par R. Sen et al. C'est la clé des phénomènes permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire (Sen & Baltimore. 1986). Ce facteur est ubiquitaire et inductible, il peut être activé par de nombreux stimuli comme les récepteurs à activité kinase (EGFR, PDGFR), les protéines G (Ras et Raf), les infections virales (EBV, HBV, HCV...) et les cytokines : TNFα, IL1... (Pahl. 1999). Ces stimulations conduisent à l'activation de NF-κB afin d'induire la transcription de nombreux gènes impliqués dans la croissance, dans la survie cellulaire et dans la réponse immunitaire et inflammatoire (Figure 14) (Ghosh et al. 1998 ; Barkett & Gilmore. 1999 ; Pahl. 1999).

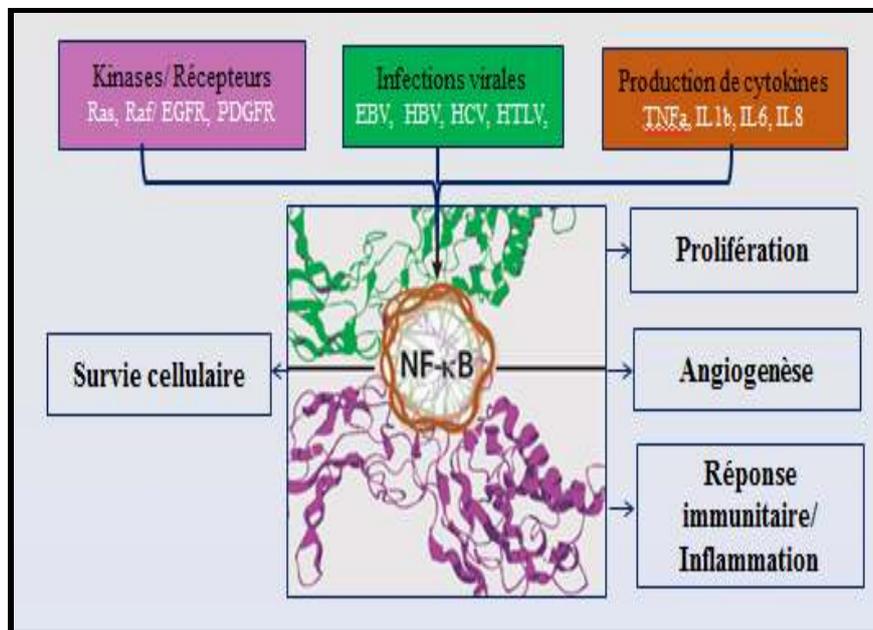


Figure 14 : Synthèse des différents rôles que jouent le facteur NF-κB (De Lartigue J. 2013).
 EGFR: epidermal growth factor receptor; PDGFR: platelet-derived growth factor receptor; EBV: indicates Epstein-Barr virus; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; HTLV: human T-lymphotropic virus; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor.

VI.4.2. La protéine c-Rel :

Le gène *REL* code pour la protéine c-Rel (*v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*) de 587 acides aminés, membre de la grande famille NF-Kb (Fullard N et al. 2012). Les cinq facteurs de transcription NF-Kb/Rel partagent un domaine RHD hautement conservée à leur extrémité N-terminale et jouent un rôle important dans le développement, l'activation et l'homéostasie du système immunitaire (Sung-Yun P & I-Cheng Ho. 2002). La molécule c-Rel contient à son extrémité N-terminale, le domaine d'homologie RHD, un domaine de liaison à l'ADN, une séquence responsable de la dimérisation des différents

membres de la famille Rel et aussi, une séquence de localisation nucléaire (NLS). A son extrémité C-terminal, il existe deux domaines (TAD1/TAD2) responsables de l'activation des transcriptions des gènes cibles. Et enfin, un domaine d'inhibition Rel (RID) formé de séquences de liaison avec les protéines inhibitrices IκBs (Chable-Bessia C. 2004) (**Figure 15**).

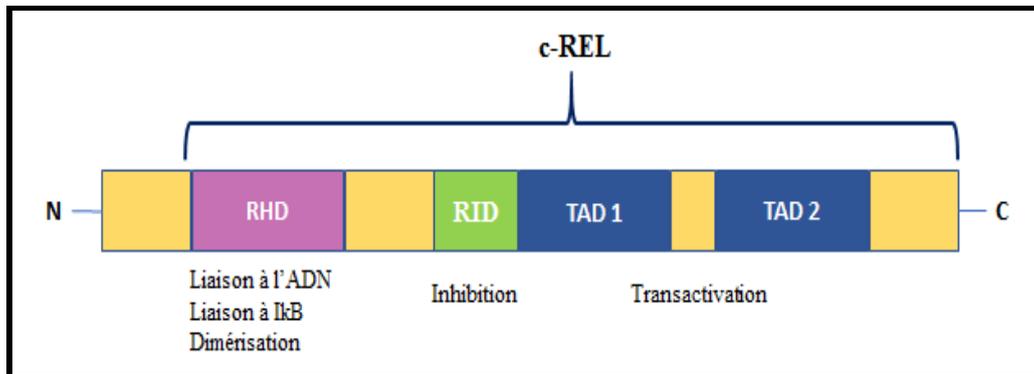


Figure 15 : Structure de la protéine REL humaine (Gilmore T & Gerondakis S. 2011).

RHD : Domaine d'Homologie Rel, **RID** : Domaine d'inhibition Rel, **TAD1** : Domaine de trans-activation 1, **TAD 2** : Domaine de trans-activation 2.

Dans la plupart des cellules, la protéine c-Rel existe soit comme homo-dimère, soit comme hétéro-dimère avec p50, p65 et/ou NFκB2. Elle augmente l'expression des gènes de nombreuses cytokines, enzymes et molécules d'adhésion dans les maladies inflammatoires chroniques qui semblent être des cibles préférées pour ce facteur de transcription. Beaucoup de ces gènes sont impliqués dans la prolifération des cellules immunitaires (IL2, CD40, TGFβ) ainsi que dans leurs fonctions (TNFα, IL12, IL23, CD40L) (Gilmore T & Gerondakis S. 2011). L'équipe de Campbell *et al*, a montré également que l'inhibition locale de c-Rel peut empêcher l'inflammation articulaire et les réponses des tissus synoviaux qui entraînent une destruction des articulations. Ceci suggère que le gène *REL* est une cible pour la conception des médicaments dans l'arthrite inflammatoire (Campbell IK *et al*. 2000).

VI.4.3. Le gène *REL* :

Chez l'homme, la protéine c-Rel est codée par le gène *REL*, constitué de 10 exons dont le domaine RHD est codé par les sept premiers exons. Les récentes études évoquent qu'il est situé sur le chromosome 2p16 (Leeman *et al*. 2008 ; Bagheri H *et al*. 2016). Le gène *REL* se retrouve dans la région candidate (2p15) qui a été associée à la pathogénie de la SA dans différentes études d'association génétique (**Tableau 3**) (Reveille J.D *et al*. 2010 ; IGAS. 2013). En effet, les régions inter-géniques connues sous le nom de «déserts de gènes»

localisées sur cette région chromosomique ont été associées au développement de la SA (Reveille J.D et al. 2010).

Il a été démontré que les cellules dendritiques murines déficientes en c-Rel (*REL*^{-/-}), sont sévèrement compromises dans leur capacité à transcrire le gène qui code pour la sous unités *IL-23 p19* (un des deux gènes qui codent pour la protéine IL-23). Le promoteur de ce gène contient trois sites de liaison avec les facteurs NF-kB dont deux se lient au facteur c-Rel (Carmody R.J. et al. 2007). La molécule IL23 a été fortement associée à la survenue de la SA (Wendling D. 2008 ; Ciccio F et al. 2009 ; Haroon N. 2012 ; Sherlock J.P. et al. 2014). De plus, il a été récemment rapporté que les protéines c-Rel possède une activité régulatrice de la production de l'IL12 et l'IL23 par les CPA (Visekruna A et al. 2012). Ceci semblerait incriminer l'effet du gène *REL* à la susceptibilité de développer la SA.

VI.4.4. Les polymorphismes du gène *REL* :

Plusieurs rapports ont rapporté des associations génétiques entre les SNPs situés dans le gène *REL* et la susceptibilité à certaines maladies auto-immunes telles que la PR (Gregersen et al. 2009 ; Eyre et al. 2010), le psoriasis (Strange et al. 2010) le lupus LES (Varadé J et al. 2011), la maladie cœliaque (Trynka G et al. 2009) et la maladie de Behçet (Chen F et al. 2016). Trois polymorphismes au niveau de ce gène ont fait l'objet de ces études d'association sur la survenue des MAI (rs702873, rs842647 et rs13031237).

Les études d'association pan-génomique ont montré que la plupart des maladies auto-immunes partagent des loci de susceptibilité multiple (Parkes M et al. 2013). En effet, plusieurs gènes de la voie NF-kB sont associés à plusieurs maladies à médiation immunitaire, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (*REL*, *TNFAIP3* et *NFKB1*), le psoriasis (*REL*, *NFKB1* et *TNIP1*), la maladie cœliaque (*REL* et *TNFAIP3*) et la PR (*REL* et *TNFAIP3*) (Cabrera S et al. 2014).

La SA est aussi une maladie inflammatoire et auto-immune, elle pourrait alors, partager des facteurs de risque génétiques similaires. Nous avons sélectionné le polymorphisme (rs13031237 (G>T)) du gène *REL* comme SNP candidat à la SA. Ce polymorphisme est situé sur l'intron 4 de ce gène (Gilmore T & Gerondakis S. 2011). Il a été significativement associé au développement de la PR dans une étude GWAS (Stahl EA et al. 2010). Il a été aussi trouvé significativement associé au psoriasis et à la PR dans des études d'association indépendantes (Gregersen P.K et al. 2009) (Strange A et al. 2010), (Eyre S et al. 2010) et à d'autres MAI comme le lupus (Varadé J et al. 2011) (Zhou X.J et al. 2012).

VI.5. Association entre la molécule de surface CD40 et la spondylarthrite ankylosante :

La liaison de CD154 (CD40L) sur la surface des LT au récepteur CD40 sur les LB est connue pour engendrer dans l'état normal, une panoplie d'événements dont les principaux sont : une prolifération des LB, une production d'immunoglobulines (Ig) ou une commutation de classe des Ig chez les LB. Cela dit, cette interaction n'est pas à l'abri de dérèglements.

L'engagement de CD40 par son ligand le CD40L entraîne l'activation de la voie de signalisation intracellulaire NF-κB. Afin d'activer la voie inflammatoire par la voie NF-κB classique, le CD40 induit le recrutement de la protéine TRAF2 par les LB engagées par le CD40L (*Holowka et al. 2007*). Cette protéine se lie à une kinase qui recrute la molécule TRAF6, elle aurait pour rôle d'activer le complexe IKK (*IκB Kinase*) (IKKα, IKKβ et IKKγ). Ces protéines recrutent d'autres molécules afin d'activer le complexe IKK de manière directe ou indirecte (*Deng et al. 2000*). Finalement, cette signalisation peut aboutir chez les lymphocytes, à une prolifération cellulaire, à l'expression de marqueurs membranaires comme CD80 et CD86 et à la transcription de gènes codant pour la cytokine pro-inflammatoire, IL-6 (*Zarnegar et al. 2004 ; Jacobson et al. 2005*) (**Figure 16**).

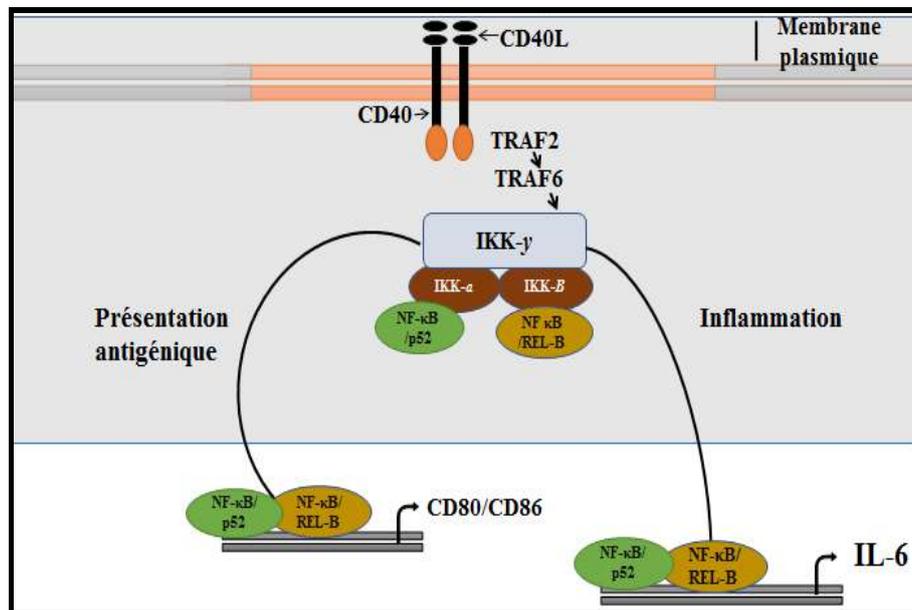


Figure 16 : La voie de signalisation du complexe CD40-CD40L via les voies classique et alterne du NF-κB dans les LB (*D'après Corinti et al. 1999*).

Chez les LB engagées par le CD40L, le récepteur CD40 induit le recrutement de TRAF2 pour l'activation de deux voies de signalisation : la voie alterne du NFκB et la voie classique. La molécule TRAF2 se lie à une kinase afin d'activer le complexe IKK. Et ceci est la voie alterne de NF-κB. Concernant la voie classique, la molécule TRAF2 recrute la TRAF6 via le complexe CD40L-CD40 toujours afin d'activer la voie inflammatoire. TRAF2 et TRAF6 induisent la phosphorylation du complexe IKK-NF-κB pour libérer ce dernier. Une fois les dimères NF-κB sont libérés par le complexe IKKα-IKKβ, ils migrent vers le noyau et se lient aux sites caractéristiques. Ceci entraîne la transcription des gènes codant pour des protéines impliquées dans : la prolifération cellulaire des LB, l'immunité (en activant par exemple, CD80-CD86), et l'inflammation : en activant l'IL6 (cytokine pro-inflammatoire).

VI.5.1. La molécule CD40 :

Le récepteur CD40 (*Cluster of Differentiation 40*) est une glycoprotéine transmembranaire de 48KDa appartenant à la superfamille des récepteurs TNF (*Noelle et al. 1992*). C'est une protéine de co-stimulation présente souvent sur les CPA, on la retrouve aussi à la surface des LB, qui d'ailleurs l'expriment tôt et tout au long de leur développement (*Stamenkovic I et al. 1989 ; Clark E.A et al. 1990 ; Uckun F.M et al. 1990*). Également, le récepteur CD40 est retrouvé sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (*Freudenthal P.S & Steinman R.M. 1990 ; Alderson M.R et al. 1993 ; Gerritse K et al, 1996 ; van Kooten C & Banchereau J. 2000*). Des cytokines telles que : IFN- γ , IL-1, IL-3, IL-4, TNF- α et GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) peuvent augmenter l'expression de CD40, tandis que le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) l'inhiberait (*Nguyen et al. 1998 ; Schonbeck U & Libby P. 2001*).

Il est intéressant de noter que le marqueur CD40 a été fortement associé à la survenue de la PR (anti-CCP+/FR+). Ceci a laissé suggérer que cette molécule pourrait jouer un rôle dans la production des LB et des autoanticorps (*Wang C.R & Liu M.F. 2003*). De plus, le blocage de la voie CD40-CD40L a été envisagé comme une approche thérapeutique dans le traitement des patients atteints de la PR, du SLE et la MICI (*Wang C.R & Liu M.F. 2003 ; Toubi E. 2004 ; Orozco G et al. 2010*).

Par ailleurs, une étude fonctionnelle cas/témoins réalisée sur 66 patients atteints de SA et 30 témoins a montré que l'expression de CD40L (LT) dans le sang était plus élevée chez les patients SA que chez les contrôles et les patients PR ($p < 0,001$). Cette équipe a suggéré qu'il serait possible que la molécule CD40L ait un effet important dans la physiopathologie de la SA (*Qu Lin et al. 2010*). En revanche, une autre étude portée sur 44 patients SA et 38 contrôles Français n'a pas pu montrer une association entre le taux du ligand soluble de CD40 (CD40Ls) et la spondylarthrite ($p=0,83$) (*Sari et al. 2010*). La taille des échantillons étudiés devrait être plus importante afin de confirmer ou d'affirmer ces résultats.

De plus, dans les cellules tumorales et les cellules B normales, il a été récemment rapporté que les protéines CD40 et c-Rel forment un hétéro dimère ayant une activité régulatrice de la production de l'IL12 et l'IL23 par les CPA. Ces cytokines ont été rapportées au cours de la physiopathologie de la spondylarthrite (*Visekruna A et al. 2012*).

VI.5.2. Le gène *CD40* :

Le gène *CD40* est situé sur le chromosome 20q13.2, il a une taille de 16.3Kb comprenant 9 exons. L'exon I code pour la séquence promotrice de la protéine, les exons II-V pour le domaine extracellulaire, l'exon VII pour le domaine transmembranaire et les exons VIII et IX codent pour le domaine intracellulaire du CD40.

La protéine finale contient 255 acides aminés, dont la majorité forme la région extracellulaire (Naismith et al. 1998). Le domaine C-terminale du CD40 est situé dans la région intracellulaire et le domaine N-terminal se trouve du côté extracellulaire. Ce dernier est principalement constituée d'une séquence répétitive riche en cystéines (20 résidus), divisée en 4 domaines (A1, A2, B1 et B2) (Figure 17) (Van Kooten C & Banchereau J. 2000).

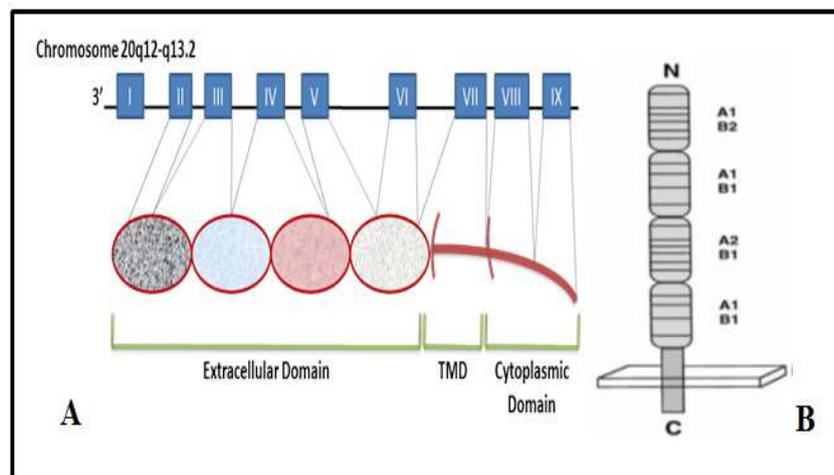


Figure 17 : Structure du gène *CD40* et de la protéine CD40 humaine (Van Kooten & Banchereau J. 2000).

Le gène du CD40 contient 9 exons codant pour le domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire de la protéine (**Leader** = séquence promotrice ; **EC**= extracellulaire ; **TM**= transmembranaire ; **IC** = intracellulaire). La protéine du CD40 est principalement constituée d'un long domaine extracellulaire contenant une séquence de 20 résidus cystéines (lignes horizontales) divisée en quatre domaines comprenant chacun deux sous-domaines.

VI.5.3. Les polymorphismes du gène *CD40* :

Parmi les variations génétiques les plus explorés sur le gène *CD40*, il y a le polymorphisme rs4810485 (G>T) (6042 T/G) situé au niveau de l'intron 4 et le rs1883832 (-1 C/T) localisé sur le promoteur. Il a été montré que ces deux polymorphismes se trouvent dans un bloc de DL qui s'étend sur une grande partie du gène *CD40* et sa région intergénique en 5'UTR (Jacobson EM et al. 2007 ; Blanco-Kelly F et al. 2010).

Les résultats d'une méta-analyse de deux études GWAS faite sur des sujets d'ascendance Européenne ainsi qu'une réplification indépendante ont montré que les

polymorphismes rs4810485 et le rs1883832 du gène *CD40* ont été trouvés associés à la PR. Ces SNPs ont été trouvés dans un bloc de DL (presque parfait : $r^2=0,95$) (Raychaudhuri S et al. 2008). Cette étude a trouvé que l'allèle C du SNP rs1883832 augmenterait le taux de la traduction de la protéine CD40, ce qui donne 15 à 32% de plus de la protéine CD40 que dans la présence de l'allèle T. Ceci a été expliqué par le fait que ce polymorphisme semble perturber la séquence Kozak (1^{er} codon d'initiation de traduction AUG) du gène *CD40* (Raychaudhuri S et al. 2008).

Plusieurs travaux concernant l'association du polymorphisme rs4810482 ont rapporté des résultats intéressants avec certaines MAI dont la maladie de Crohn (Blanco-Kelly F et al. 2010) et la PR (Raychaudhuri S et al. 2008). Ce SNP a été représenté étant un marqueur confirmé au risque de développement de cette maladie (Raychaudhuri S et al. 2008). Par la suite, il a été fortement associé à la vitesse de destruction articulaire chez les patients PR (ACPA+) (Van der Linden M et al. 2009 ; Orozco G et al. 2010).

Cependant, aucune étude d'association à la SA n'a été faite à l'heure actuelle concernant le polymorphisme [*CD40*] rs4810485 (G>T) mais ces deux SNPs ont été trouvés en parfait DL (Raychaudhuri S et al. 2008). Nous avons donc sélectionné l'étude de l'impact de ce SNP sur le développement de la SA dans notre population d'étude.

VI.6. Association entre l'enzyme PKC-thêta et la spondylarthrite ankylosante :

VI.6.1. La famille PKC :

La PKC est une famille de protéines Sérine/Thréonine Kinases, activées en présence des phospholipides de manière réversible par un lipide neutre le diacylglycérol (DAG). Plusieurs PKC ont été décrites et regroupées en trois catégories. D'abord, les PKC conventionnelles (cPKC) qui répondent à la définition d'origine de régulation par le calcium et le DAG. Puis, les deux autres PKC qui ne sont pas sensibles au calcium et sont dites nouvelles (nPKC) ou atypiques (aPKC) selon qu'elles sont ou non activées par le DAG (Royet J. 1998). Mis à part le mécanisme d'activation de ces iso-types, des différences distinctes existent aussi au niveau de leur réseau d'expression tissulaire, de leur localisation subcellulaire et les substrats que ces enzymes phosphorylent. Les protéines de la famille PKC sont impliquées dans plusieurs voies : la désensibilisation des récepteurs, la modulation des événements de la structure de la membrane, la régulation de la transcription, la médiation des réponses immunitaires et la régulation de la croissance cellulaire (Wang X et al. 2012). En

effet, la PKC-thêta (PKC- θ) est un membre de cette famille et c'est un composant essentiel dans l'activation optimale des LTs (Altman A & Villalba M. 2008).

VI.6.2. La PKC-thêta :

La PKC- θ est un membre de la famille PKC précisément de la catégorie des nPKC. Cette kinase a une structure de base composée d'un domaine de régulation N-terminal et d'un domaine de kinase C-terminal hautement conservé. Ce dernier est attaché par une région unique 'V3' qui contient un motif de polyproline. Cette région joue un rôle essentiel dans la translocation de PKC- θ à la synapse immunologique (SI). La région régulatrice N-terminal quant à elle, est suivie de deux domaines C1, en tandem (C1a et C1b), riches en cystéines et contenant une séquence de pseudo-substrat (V1), ces domaines sont responsables de la liaison au DAG. Le dernier domaine de cette région est le C2-like, responsable dans la liaison avec les kinases LCK (Brezar V et al. 2015) (Figure 18).

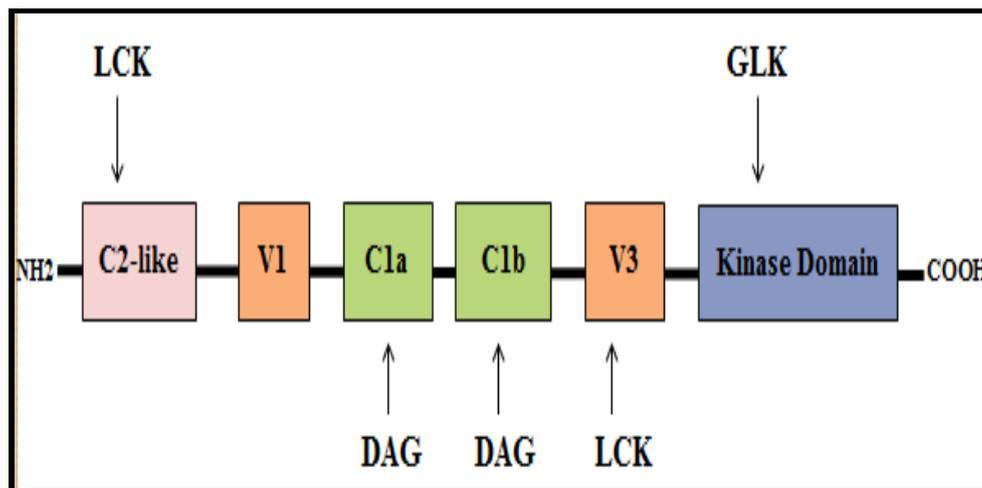


Figure 18 : Structure et réglementation du recrutement de la PKC θ (d'après Arendt CW et al. 2002).

Au repos, la PKC- θ est maintenue dans un état inactif ou fermé donc inaccessible aux substrats cellulaires. Cependant, lors de la stimulation de TCR par un complexe peptide/CMH (signal 1) et l'engagement du signal co-stimulateur CD28 (signal 2), la protéine kinase Lck phosphoryle Zap70 qui a son tour active LAT et génère la phospholipase- γ 1 (PLC γ 1) qui génère ensuite le DAG. Ce dernier est accumulé sur la membrane plasmique pour se lier au domaine C1 de la PKC- θ . Le contact des LTs spécifiques d'antigène et les CPA induit la formation d'une structure hautement ordonnée, appelée complexe d'activation supramoléculaire (SMAC), au site de contact où la tyrosine kinase Lck joue un rôle clés dans la régulation de la formation du complexe tri-moléculaire CD28-Lck-PKC- θ (Sun Z. 2012).

Le mécanisme par lequel elle participe au changement de conformation et à l'activation kinase reste encore peu clair. L'activation de la PKC- θ conduit finalement à un réseau de transcription où elle est transloquée au noyau via le signal de localisation nucléaire (NLS), formant un complexe actif qui comprend l'ARN polymérase II, la kinase MSK-1, la diméthylase spécifique de la lysine 1 (LSD1) et la molécule adaptatrice 14-3-3. Cette signalisation permet d'amplifier la transcription de gènes de la prolifération et la différenciation des cellules T (Brezar V et al. 2015).

Les études ex vivo ont montré que la PKC- θ est impliquée dans l'activation des gènes qui codent le NF- κ B (c-REL), la protéine d'activation-1 (AP-1), et le facteur nucléaire des LTs (NFAT). Toutes ces protéines sont indispensables à l'activation de l'IL-2 qui traduit le signal à une réponse inflammatoire (Thuille N et al. 2005) (Figure 19).

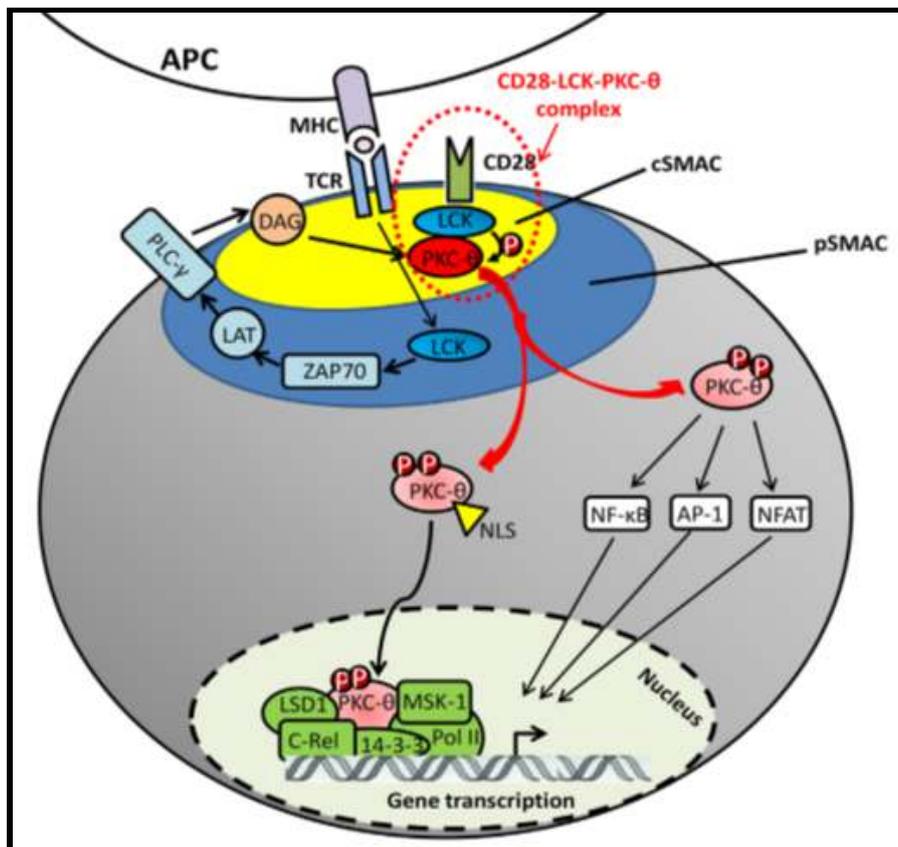


Figure 19 : Recrutement de la PKC-théta à la synapse immunologique (Brezar V et al. 2015).

SMAC : complexe d'activation supramoléculaire, Lck : tyrosine kinase, NLS : signal de localisation nucléaire, PLC γ 1 : phospholipase- γ 1, LAT : linker for activated T-cells, Zap-70 : protéine kinase associée à la chaîne zêta, LSD1 : diméthylase spécifique de la lysine 1, AP-1 : protéine d'activation-1, NF- κ B : Nuclear Factor- κ B, Pol II : Polymérase II.

VI.6.3. Le gène PRKCQ :

La kinase sérine/thréonine PKC- θ est codée par le gène *PRKCQ*, localisé sur le locus 10p15. Il s'étend sur environ 62 kb et il se compose de 15 exons. Le site d'initiation de la traduction AUG a été localisé dans l'exon 1, alors que l'exon 15 comprend le site de terminaison de la traduction UAG ainsi que le signal de polyadénylation AUUAAA. La protéine produite a un poids moléculaire d'environ 81KDa. Elle est exprimée principalement dans les tissus lymphoïdes et en particulier dans les LTs (Kofler K et al. 1998).

La région chromosomique localisée en 10p15 est caractérisée par trois gènes candidats ; *PRKCQ*, *IL-2RA* et *LOC399716*. En effet, plusieurs travaux ont montré que certains polymorphismes situés sur ces gènes sont susceptibles d'être candidats à la survenue de plusieurs MAI notamment, la PR et la SA (Cooper J et al. 2008 ; Barrett JC et al. 2009 ; Strange A et al. 2010 ; Kiani AK et al. 2015 ; Feilan Chen et al. 2016).

VI.6.4. Les polymorphismes du gène PRKCQ :

Quatre polymorphismes situés au niveau des trois gènes *LOC399716* (rs947474, rs4750316), *PRKCQ* (rs11258747) et *IL-2RA* (rs12722489) ont fait l'objet de nombreuses études d'association génétique (Cooper et al. 2008 ; Feilan Chen et al. 2016).

Le gène *LOC399716* ou encore appelé *DKFZp667F0711* (10p15.1) comprend deux exons codant pour un ARNm dont le rôle est méconnu (*hypothetical protein DKFZp667F0711*) (Barrett JC et al. 2009). De ce fait, les deux polymorphismes identifiés sur ce gène (rs947474 et le rs4750316) ont été attribués au gène *PRKCQ* étant le plus proche avec une distance de 76 Kb (Feilan Chen et al. 2016) (**Figure 20**).

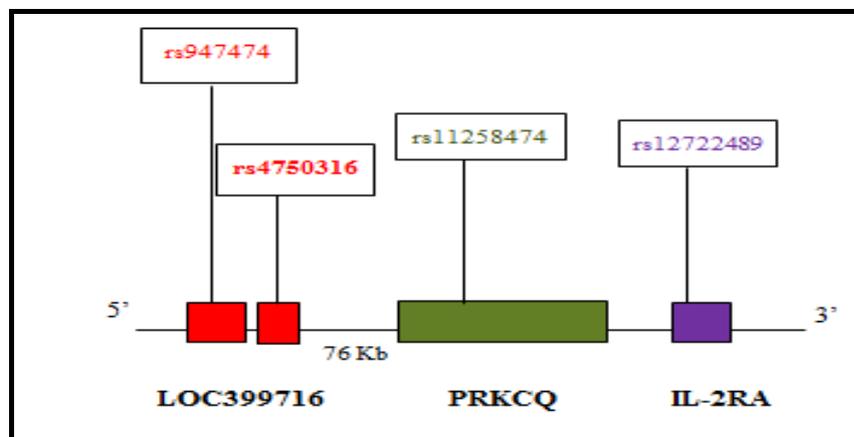


Figure 20 : Positionnement des SNPs sur les gènes *PRKCQ*, *IL-2RA* et *LOC399716* (d'après Barrett JC et al. 2009).

Le SNP rs12722489 (*IL-2RA*) a été trouvé associé chez des patients SA avec uvéite et le SNP rs4750316 (*PRKCQ*) a été trouvé associé avec le développement de la PR (Cooper et al. 2008 ; Marieke J.H et al. 2009 ; Hinks A et al. 2010 ; Kiani AK et al. 2015). D'autre part, il a été montré que les SNPs (rs947474, rs4750316) se trouvent finalement en DL avec le SNP (rs12722489-*IL-2RA*) (Cooper et al. 2008 ; Barrett JC et al. 2009). De ce fait, nous avons choisi d'étudier l'impact du polymorphisme rs4750316 attribués au gène *PRKCQ* sur la survenue de la spondylarthrite, c'est un SNP tag de la région candidate 10p15.

VI.7. Association de l'enzyme ACE avec la spondylarthrite ankylosante :

VI.7.1. Le système rénine-angiotensine (SRA) :

Le SRA est un système autacoïde, ce sont des substances organiques spécifiques formées par les cellules d'un organe. Elles sont déversées dans le sang et provoquent dans les autres organes des effets semblables à ceux des médicaments. Ce système fait intervenir un précurseur produit dans le foie, l'angiotensinogène (AGT), pour conduire à la formation d'angiotensine I (Ang I) dans le sang. Celle-ci est convertie en Ang II dans le poumon par l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Michel JB et al. 1997 ; Laraqui A. 2006). Quand le volume sanguin diminue, les reins sécrètent la rénine qui clive l'AGT en Ang I puis en Ang II par l'ACE. L'Ang II exerce un effet vasoconstricteur et provoque une augmentation de la pression sanguine en stimulant le système nerveux sympathique et la sécrétion d'aldostérone et de vasopressine et ainsi la réabsorption de sels et la rétention d'eau (Oparil S. et al. 1974 ; Goodfriend T.L et al. 1996). L'ACE est une enzyme clé du SRA, elle établit le maintien de la pression artérielle et l'équilibre hydrominéral (Mahi F. 2014) (**Figure 21**).

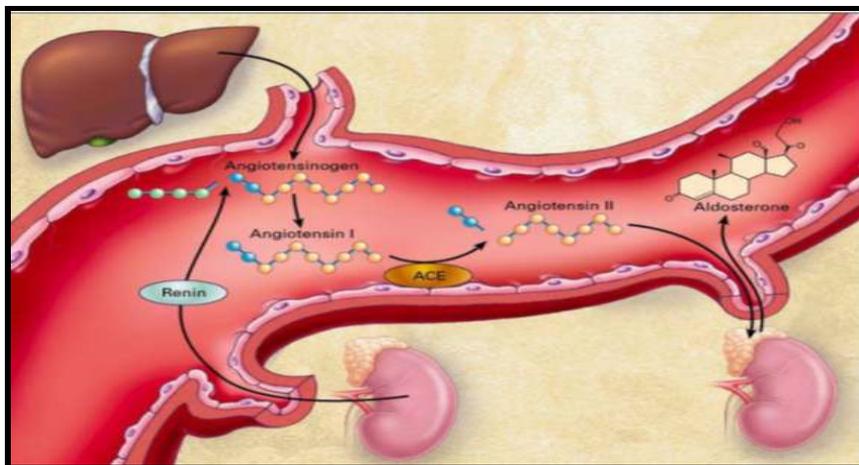


Figure 21 : Le système rénine-angiotensine (SRA) (<http://master.univ-paris-diderot.fr>, mise à jour 11/2002).

VI.7.2. Les voies de signalisation du SRA :

Les récepteurs transmembranaires AT1-R et AT2-R lient l'Ang II avec une haute affinité (Lin S.Y & Goodfriend T.L. 1970). L'Ang II peut exercer ses effets sur le récepteur AT2, aux rôles approximativement contraires à ceux d'AT1 (Marchesi et al, 2008).

La liaison de l'Ang II avec ses deux récepteurs AT1-R et AT2-R déclenche différentes voies de signalisation aboutissant d'abord, à une réponse fonctionnelle immédiate (hypertension artérielle), puis à une réponse structurale hypertrophiante et à des réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes (Lin S.Y & Goodfriend T.L. 1970). En effet, l'Ang II stimule l'expression de molécules d'adhésion aux leucocytes, au recrutement des cytokines inflammatoires et augmente le stress oxydant, lui-même responsable du déséquilibre de la balance endothéliale (par l'activation des MAP Kinases) (Michel JB et al. 2004). Inversement, les cellules inflammatoires génèrent des enzymes telles que l'ACE, favorisant une augmentation de la production locale de l'Ang II dans la paroi vasculaire, instituant un véritable cercle vicieux (Marchesi et al. 2008). L'Ang II agit aussi comme un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires qui produisent le VEGF « *Vascular endothelial growth factor* » qui induit la néo-angiogenèse et la production du PGE2 (*Prostaglandine E-2*) et PGI1 (*Prostaglandine I-1*) par les cellules endothéliales (Gimbrone M.A & Alexander R.W. 1975 ; Baylis et Brenner. 1978 ; Chua et al. 1998 ; Pupilli et al. 1999) (Figure 22).

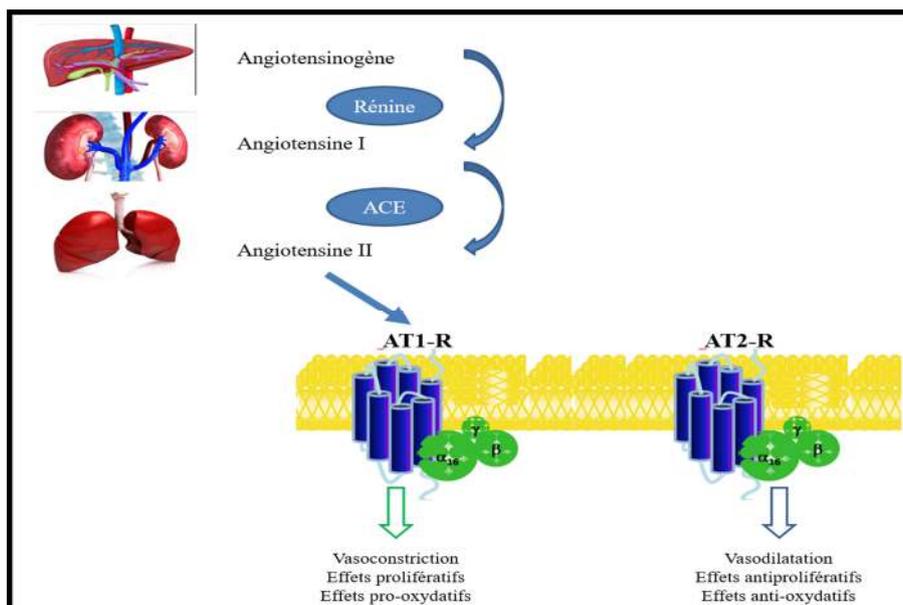


Figure 22 : Schéma simplifié du métabolisme des angiotensines et de leurs effets physiologiques médiés par les récepteurs AT (D'après Jean-Baptiste M. 2004).

VI.7.3. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) :

L'ACE est connue sous différentes dénominations, comme la dipeptide carboxypeptidase ou la peptidylpeptide hydrolase ou Kininase II (*Laraqui A. 2006*). C'est une métallo-enzyme à zinc, appartenant à la famille des carboxypeptidases. La présence de l'atome de zinc et du chlore modifie la conformation de son site actif, lui donnant sa spécificité pour les substrats di-peptidiques. On lui connaît de nombreux substrats tels que l'Ang I, la bradykinine et l'enképhaline (*Chalghouma et al. 2010 ; Amrani A. 2015*). L'ACE est une enzyme ubiquitaire de distribution très large puisque la forme membranaire est présente sur toutes les cellules endothéliales et épithéliales (*Diall A.A. 2011*).

L'ACE est une protéine hautement glycosylée (les sucres représentent selon les formes, 20 à 30% de son poids moléculaire). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur avec un peptide signal de 29 aa qui est clivé pour donner la molécule mature (*Mahi F. 2014*). La séquence complète en acides aminés de l'ACE a été déterminée sous trois formes : une forme membranaire : avec un poids moléculaire de 160 Kda et pourvue de peptide d'ancrage, une forme circulante : soluble légèrement plus petite avec un poids moléculaire de 140 Kda et une forme testiculaire de 90 Kda.

VI.7.4. Structure du gène ACE :

Le gène codant l'enzyme ACE a été localisé sur le chromosome 17 du génome humain, en17q23 (*Mattei et al. 1989 ; Cambien & sourbier. 1995*). Il s'étend sur 21 kb portant 26 exons (*Hubert C. 1991*). Le gène ACE code pour deux iso-enzymes selon l'utilisation alternative des deux promoteurs, soit le promoteur de type somatique (en 5'UTR), soit le promoteur de type germinale (intron 12) (*Howard et al. 1990*). Le plus grand ARNm est obtenu à partir de la transcription des exons : de 1 à 26, à l'exception de l'exon 13 et il correspond à l'ACE de type endothélial (ACE somatique). Le second ARNm est transcrit à partir des exons : de 13 à 26. Il correspond à l'ACE testiculaire (ACE germinale) (*Hubert C. 1991*).

VI.7.5. Polymorphismes du gène ACE :

Un total de 252 polymorphismes a été décrit au niveau du gène ACE, dont cinq de type SNPs (rs1800764, rs4291, rs4309, rs4331, rs4340) couvrant une région de 15,6kb (*Rieder et al. 1999 ; Rebaï et al. 2006*). Cependant, le polymorphisme le plus étudié consiste en une

insertion/délétion (I/D) (*rs4340*), lié à la présence ou l'absence d'une séquence *Alu* de 287pb au niveau de l'intron16 de ce gène. (Figure 23).

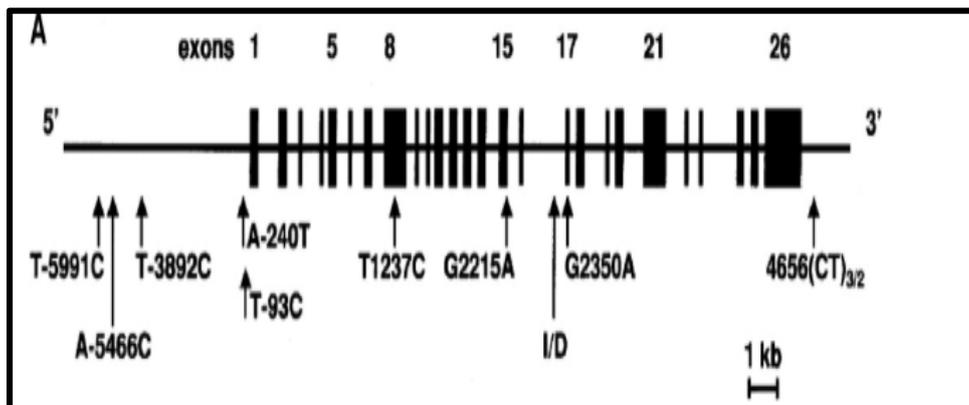


Figure 23 : Représentation schématique du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine humaine (d'après Keavney B et al. 1998).

Les exons sont indiqués par les boîtes noires, les SNP et la localisation du polymorphisme I/D sont indiqués par des flèches.

Il a été démontré que le taux circulant d'ACE dans une population humaine donnée suit une distribution bimodale en faveur d'une détermination génétique. Ce déterminisme génétique a été confirmé lorsqu'on a pu montrer que le polymorphisme [*ACE*] *rs4340* (I/D) peut revêtir trois formes : La forme courte (DD) code pour un taux élevé de l'enzyme circulante, la forme longue (II) pour un taux plus bas et la forme hétérozygote (ID) pour un taux intermédiaire (Laraqui A. 2006).

Bien que la nature et l'emplacement du ou des polymorphismes fonctionnels responsables des taux d'ACE plasmatiques restent un mystère, toutes les études réalisées dans les populations caucasiennes ont indiqué que la majorité des polymorphismes dans la région candidate du gène *ACE* sont étroitement liés au polymorphisme I/D (Sayed-Tabatabaei F.A et al. 2006). Les chercheurs ont donc continué de l'utiliser comme marqueur valide pour étudier les associations entre le(s) polymorphisme (s) fonctionnel (s) et les conditions physiopathologiques inconnues.

Une masse considérable de travaux a visé l'évaluation de l'impact du polymorphisme I/D sur les concentrations plasmatique et tissulaire de l'ACE. L'hypothèse d'un rôle fonctionnel que pourrait jouer ce polymorphisme a été validée dans une étude quantitative dont les sujets porteurs de l'allèle D présentaient un taux presque double de l'expression du gène de l'ACE comparé à ceux porteurs de l'allèle I (Rigat et al. 1990 ; Costerousse et al. 1993 ; Suehiro et al. 2004). En effet, les génotypes respectifs ID et DD étaient associés à une

augmentation de 25 à 50% de la concentration plasmatique de l'enzyme ACE comparés au génotype II (*Wang W et al. 1997 ; Staesson J et al. 1997*).

L'ensemble de ces travaux a confirmé que les taux élevés d'ACE dans le plasma ainsi que dans les parois des vaisseaux favorisent la formation des molécules de l'Ang II qui activent le facteur NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (*Dalbeth N et al. 2005*). Ces angiotensines sont capables également d'inactiver la bradykinine qui est un vasodilatateur et un médiateur important dans le système kinine qui comprend plusieurs protéines sanguines, ce système joue un rôle dans l'inflammation, le contrôle de la pression artérielle, la coagulation et la douleur (*Riordan JF. 2003 ; Hong SJ et al. 2003*).

Par conséquent, les inhibiteurs de l'ACE empêchent l'activation du NF- κ B et inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 par les monocytes et les cellules dendritiques (*Dalbeth N et al. 2005*). De plus, il a été rapporté qu'un individu porteur de l'allèle D a une activité d'ACE relativement plus élevée qu'un individu porteur de l'allèle I dans le plasma et en particulier dans le liquide synovial (*Shehab DK et al. 2008 ; Yigit S et al. 2012*). Ces phénomènes expliquent l'intérêt potentiel du gène de l'ACE comme acteur indirect dans la physiopathologie des maladies inflammatoires telles que : la SA.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont rapporté aussi des résultats d'association significative entre le polymorphisme I/D et la survenue des SpA. Une étude cas-témoins a montré une association significative entre le génotype DD et l'atteinte oculaire et sacro-iliaque chez les patients atteints de la SA (*Inanir A et al. 2012*). Aussi, une autre étude a pu mettre en évidence une association significative entre le rhumatisme psoriasique (SpA) et l'allèle I (*Al-Awadhi AM et al. 2007*). Ensuite, l'étude d'*Inanir* et ses collaborateurs a montré que l'allèle D a été corrélé avec le développement de la SA ($p < 0,001$) entre 122 patients et 140 contrôles (*Inanir A et al. 2012*). L'étude d'*Inal et son équipe* quant à elle, a démontré une association significative entre le génotype II et la maladie ($P=0,005$, OR > 1) dans la même population incluant 38 cas et 71 témoins (*Inal E.E et al. 2016*). De plus, le génotype DD et/ou l'allèle D semblaient aussi, être des marqueurs génétiques de développement de la PR dans différentes populations (*Uppal S.S et al. 2007 ; Yigit S et al. 2012 ; Ahmed A.Z et al. 2013*).

VI.8. Association entre les récepteurs Fc Gamma et la spondylarthrite ankylosante :

De récentes études ont montré que les FcγRs jouent un rôle important dans la coopération entre le système immunitaire innée et le système adaptatif. Les récepteurs Fc forment un groupe hétérogène de glycoprotéines de surface sur les cellules hématopoïétiques. Ces récepteurs régulent plusieurs réponses à médiation humorale et cellulaire incluant la phagocytose, la dégranulation et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Ils interviennent également dans la régulation transcriptionnelle des cytokines et de chimiokines. Ils reconnaissent spécifiquement les différents isotypes d'Immunoglobulines (IgA, IgG, IgD, IgE et IgM) (Li X. et al. 2009).

Chez l'Homme, la famille des FcγRs se divise en trois sous-familles de récepteurs : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16). Les récepteurs FcγRI, FcγRIIA/FcγRIIC et FcγRIII sont activateurs alors que le FcγRIIB est inhibiteur notamment de la phagocytose, de la cytotoxicité et de la présentation de l'antigène. Ils agissent tous grâce aux motifs ITAM (*Immunreceptor Tyrosine Activating Motif*) ou aux motifs ITIM (*Immunreceptor Tyrosine Inhibitory Motif*) (Li X. et al. 2009) (**Figure 24**).

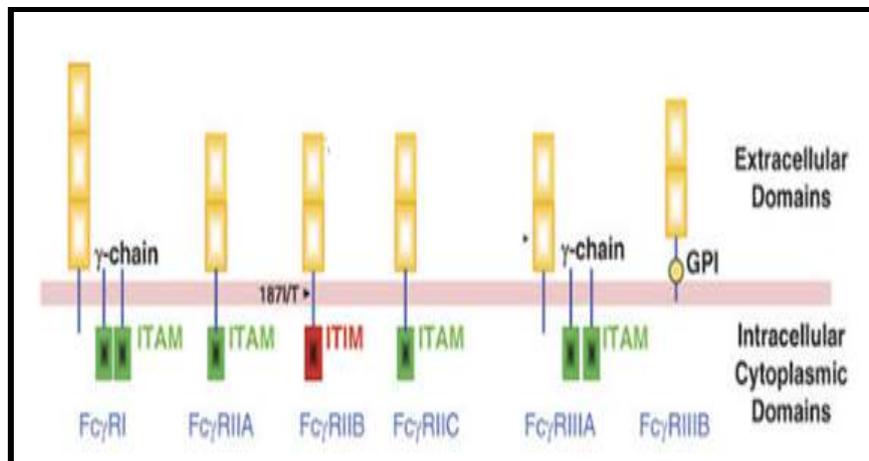


Figure 24 : Structure des classes de FcγR humains (Li X. et al. 2009).

ITAM (*Immunreceptor Tyrosine Activating Motif*), ITIM (*Immunreceptor Tyrosine Inhibitory Motif*)

VI.8.1. Les récepteurs FcγRIII :

Cette sous classe est formée de deux types de récepteurs, le FcγRIIIa et FcγRIIIb. Ils sont codés par les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*, respectivement. Le récepteur FcγRIIIa est exprimé à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et NK, il est

impliqué dans l'élimination des complexes antigène-anticorps, ainsi que d'autres autres réponses d'anticorps dépendantes. Ce récepteur est exprimé comme une glycoprotéine membranaire intégrale ancré par l'intermédiaire d'un peptide transmembranaire alors que le FcγRIIIb est exprimé à la surface des neutrophiles et des basophiles et il est ancré par une liaison phosphatidylinositol (PI). Le récepteur FcγRIIIa fixe des IgG monomériques avec une moyenne affinité alors que les deux FcγRIIIa et FcγRIIIb se lient efficacement aux IgG multimériques et aux complexes immuns (*Simmons & Seed. 1988 ; Croker & Kimberly. 2005*).

VI.8.2. Les variants de nombre de copie des gènes FCGR :

Un cluster de gènes localisé sur 1q23.3 est constitué de cinq gènes *FCGR* (*Low-affinity Fc gamma Receptor*) : *FCGR2A*, *FCGR3A*, *FCGR2C*, *FCGR3B* et *FCGR2B*, respectivement (*Breunis WB et al. 2009 ; Machado LR et al. 2012*). Seulement trois gènes dans ce cluster comportent des régions de variations de nombre de copies (CNVs) (*FCGR3A*, *FCGR3B*, et *FCGR2C*), alors que les deux autres gènes n'en comportent pas (*Breunis WB et al. 2009 ; Machado LR et al. 2012*).

Des duplications et des délétions d'environ 82kb ont été décrite pour le gène *FCGR3B* (*De Haas M. et al. 1995 ; Koene H.R. et al. 1996*), elles sont identiques à 98% (*Bailey J.A. et al. 2002*). Une étude a montré par Southern blot que ces CNVs étaient le résultat d'une recombinaison inégale entre *FCGR2A* et *FCGR2B* qui a induit la formation d'un pseudogène *FCGR2C* (*Warmerdam P.A. et al. 1993 ; Marques R.B. et al. 2010*) (**Figure 25**).

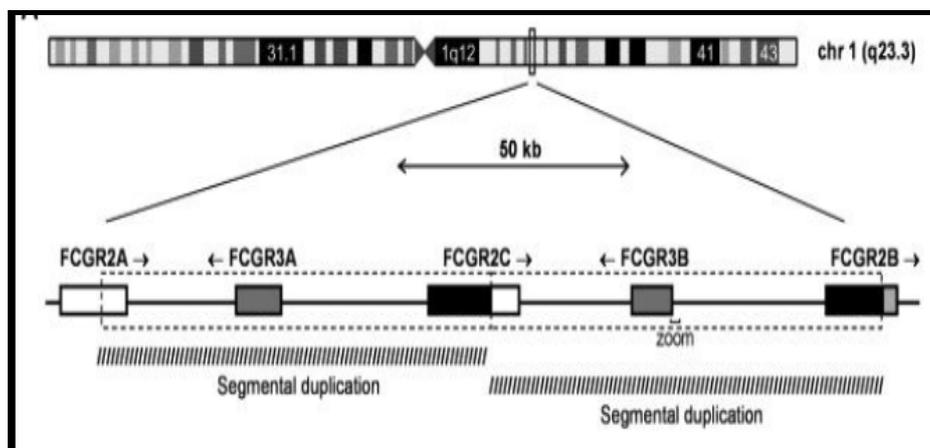


Figure 25 : Cluster des gènes FcγRs au niveau du chromosome 1 (*d'après Marques R.B. et al. 2010*).

Une plus récente étude a montré que, par ailleurs, il existe plusieurs *break points*, distribués sur l'ensemble de la région *FCGR*, et regroupés dans des clusters de mutations créant un *hot spot* de recombinaison NAHR. Ces derniers, favorisent l'apparition de délétions de différentes tailles entre *FCGR3B* et *FCGR3A* (Machado L.R. et al. 2012).

Par ailleurs, le locus *FCGR* a été largement étudié, précisément, les gènes *FCGR3*, ils ont été associés au Lupus (Chen JY et al. 2014), à la PR (Graf SW et al. 2012) et à la SA (Li Wang et al. 2016). L'équipe de Li Wang et al, a montré que les CNVs sur les deux gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* étaient significativement associés à la susceptibilité de développer la SA dans la population Chinoise. Cette équipe a suggéré que les carences des protéines FcγRIIIa et FcγRIIIb pourraient être un facteur de risque génétique à la susceptibilité de la spondylarthrite (Li Wang et al. 2016).

VI.9. Association entre la chimiokine CCL3L1 et la spondylarthrite ankylosante :

VI.9.1. La chimiokine CCL3L1 :

La famille des chimiokines est divisée en deux groupes, les CXCs (ou sous-famille α) codés par 15 gènes, et les membres de C-C motifs (la sous-famille β) codés par 16 gènes, localisés au niveau du chromosome 17q11.2-q12 et 8 gènes dispersés sur les chromosomes 2, 7, 9 et 16 (Zlotnik & Yoshie. 2000). Parmi les 16 gènes (chromosome 17), il existe 2 paires de gènes très proches *CCL3/CCL3L1* et *CCL4/CCL4L1* (Figure 26). Cette région a été caractérisée par la présence de CNVs, et les mieux décrits sont ceux du gène *CCL3L1* (Modi W.S. 2004).

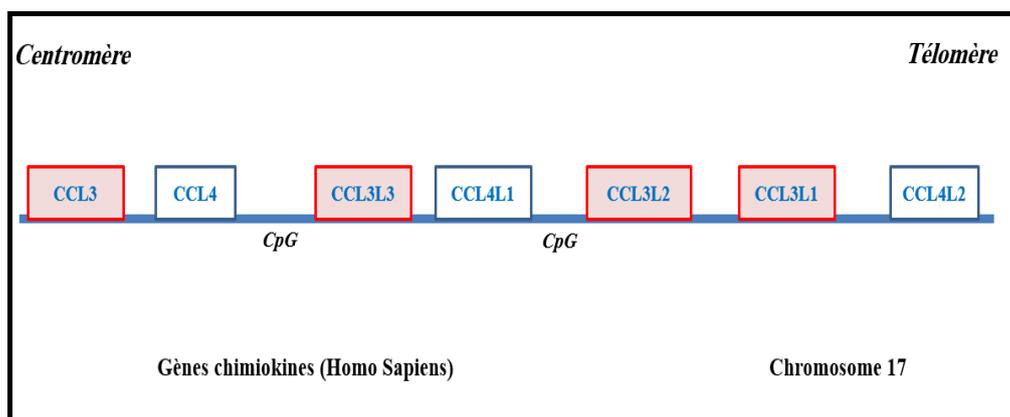


Figure 26 : Le cluster du gène *CCL3L1* (d'après Shrestha S. et al. 2010).

Orientation et localisation des gènes *CCL3* (Gene ID : 6348), *CCL3L1* (Gene ID : 6349), *CCL3L2* (Gene ID : 390788) et *CCL3L3* (Gene ID : 414062) sur le chromosome 17.

Les gènes *CCL3/CCL3L1* codent pour les *Macrophages Inflammatory Protein* (MIP)-1 α , plus particulièrement les isoformes LD78 α et LD78 β , respectivement. Ce sont des β -chimiokines avec un faible poids moléculaire qui agissent comme des cytokines pro-inflammatoires en induisant l'activation d'une large variété de cellules immunitaires, et plus particulièrement les LTs CD8+, et les cellules dendritiques immatures. Elles sont inhibées par IL4, IL10 et IL13 (Standiford T.J. et al. 1993 ; Berkman N. et al. 1995). Ces protéines sont produites pour attirer les lymphocytes et amplifier la présence des macrophages dans le site de l'inflammation (Menten P. et al. 1999).

L'isoforme LD78 β est deux fois plus efficace que l'isoforme LD78 α pour le chimiotactisme des monocytes et les lymphocytes. De plus, l'isoforme LD78 β est l'agoniste le plus efficace du co-récepteur CCR5 qui, par sa fixation, permet une activité anti-virale et inhibe la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) lors des infections (Menten P. et al. 1999 ; Aquaro S. et al. 2001 ; Lederman M. et Sieg. 2007). C'est pour cette raison que les CNVs du gène *CCL3L1* ont le potentiel d'influencer les désordres immunologiques et l'auto-immunité, ce qui a fait de lui un gène candidat fonctionnel dans le développement des MAI.

VI.9.2. Les variations de nombre de copie du gène *CCL3L1* :

Le gène *CCL3L1* (*Chemokine C-C motif Ligand 3-like 1*) est localisé au niveau du chromosome 17 dans un cluster de gènes homologues (*CCL3*, *CCL3L3* et *CCL3L2*). Ce gène peut subir des duplications ou des délétions de 90kb. Il partage environ 96% de séquences similaires avec son paralogue *CCL3* (Ben Kilani M.S. 2014). Le nombre de copie de ce gène variait entre 0 et 4 copies dans la population Européenne et peut aller jusqu'à 14 copies dans la population Africaine (Gonzalez E. et al. 2005). Mais ce nombre a été récemment revue à la baisse pour atteindre 10 copies (Carpenter D. et al. 2012).

Plusieurs études ont suggéré que les récepteurs de chimiokines, qui activent la réponse inflammatoire, auraient un rôle dans la physiopathologie des maladies auto-immunes (Godessart & Kunkel. 2001 ; Ezerzer & Harris. 2007). En effet, les CNVs du gène *CCL3L1* ont été significativement associés à la survenue du Lupus, de la PR et du DT1 (Mamtani M. et al. 2008). De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact des CNVs du gène *CCL3L1* sur la susceptibilité de développer la SA dans notre population d'étude.

***OBJECTIFS
DE LA THESE***

La spondylarthrite ankylosante (SA) est un rhumatisme inflammatoire chronique. C'est une pathologie complexe qui résulte de l'interaction de différents facteurs environnementaux sur un terrain génétique prédisposant. Même si l'antigène HLA-B27 a été longtemps, le seul gène associé de façon certaine à cette maladie, grâce aux avancées technologiques, de nouveaux facteurs génétiques de susceptibilité à la SA ont été identifiés.

Ces découvertes ont permis d'identifier des polymorphismes nucléotidiques simples (*Single Nucleotid Polymorphism ou SNP*) sur une vingtaine de locus génétiques afin de mieux comprendre la physiopathologie de la SA et ont ouvert la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques. Cependant, une large part de la prédisposition génétique reste à expliquer et l'un des défis actuels consiste à identifier la part d'héritabilité «manquante».

Il est admis maintenant que le génome est très instable et que des régions, qui peuvent dépasser plusieurs dizaines de milliers de nucléotides sont délétées, remaniées ou dupliquées. Le génome contient des milliers de ces variations de structure appelées : CNV (*Copy Number Variation*). Ces variants ont été retrouvés dans la population humaine et chez les animaux. Ces régions délétées ou dupliquées du génome représentent une source importante de variabilité génétique chez l'Homme, c'est pourquoi l'analyse des CNV a suscité un engouement important dans la recherche sur les maladies complexes humaines ces dernières années

Le travail présenté dans ce manuscrit s'est organisé autour de deux axes de recherche complémentaires, avec comme principal objectif une meilleure compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la survenue de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. Le caractère complémentaire de ces deux axes renforce les défis portés sur l'héritabilité «manquante» de cette pathologie complexe.

Dans le premier axe de ce travail, nous avons eu comme objectif de déterminer la fréquence de *HLA-B27* chez les sujets témoins originaires de l'Ouest Algérien. Ce travail nous a permis de positionner notre échantillon de la population Algérienne par rapport aux différentes populations du monde. Ensuite, nous avons eu comme but de réaliser des stratifications entre les groupes de cas et de témoins selon le statut HLA-B27 positif ou négatif. L'objectif de cette stratification était de pouvoir distinguer les effets des autres gènes étudiés sur la susceptibilité à la SA indépendamment de l'influence de HLA-B27.

Dans le deuxième axe de cette thèse, notre premier objectif a été d'investiguer différents marqueurs génétiques de gènes candidats par des études d'association génétique cas/témoins. En effet, nous avons sélectionné des polymorphismes de type SNP situés sur quatre gènes différents [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C). Ce choix a été fait par rapport aux données publiées dans les GWAS et dans les études d'association cas/témoins réalisées sur la survenue de la SA et de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Ensuite, nous nous sommes également intéressés à explorer l'impact du polymorphisme insertion/délétion (I/D) (*rs4340*) du gène *ACE* sur la susceptibilité de développer la maladie. Cette exploration était motivée par l'effet de ce polymorphisme dans l'induction des mécanismes d'inflammation par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

Le dernier objectif de cette partie a porté sur l'étude de marqueurs génétiques de type CNVs au niveau de trois gènes candidats : *FCGR3A*, *FCGR3B* et *CCL3L1*. Ce choix a été basé selon les différents et récents travaux réalisés sur la prédisposition de la SA et la PR dans la littérature.

***MATERIEL ET
METHODES***

I. Population d'étude :

La présente étude a été réalisée sur deux échantillons, le premier comprenait les patients atteints de la SA et le deuxième comprenait les contrôles sains. La collection d'ADN a été établie au niveau du laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC) de l'USTO-MB. Tous les sujets de l'étude sont originaires de l'Ouest Algérien (Oranie). Cette région regroupe les villes dont les coordonnées géographiques sont comprises entre latitude 36°20' nord, longitude 14°40' ouest et latitude 34°20' sud, longitude 1°15' ouest. L'origine « Ouest-Algérienne » de chaque individu a été définie par rapport au critère de naissance dans cette région, en plus d'avoir une ascendance née dans cette région sur au moins deux générations (les parents et les grands parents). Les individus participant à cette étude ont signé un consentement éclairé, donnant leur accord pour participer à une étude génétique (**Annexe 2**).

I.1. Le groupe des Cas :

Le premier échantillon (Cas) est constitué de 83 patients atteints de la SA, recrutés au niveau du service de rhumatologie au Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran (CHU d'Oran). Le diagnostic des patients a été établi selon les critères d'Amor (*Amor et al. 1990*) et de l'ESSG (*Groupe Européen d'Étude des Spondylarthropathies*) (*Dougados et al. 1991*). L'âge de diagnostic de nos patients était compris entre 10 et 71 ans. Une fiche de renseignements personnelle et clinique a été remplie par les médecins pour chaque malade (**Annexe 3**).

I.2. Le groupe des Témoins :

L'échantillon des contrôles comprenait deux groupes, le premier appelé « Témoins 1 » composé de 131 sujets sains non apparentés, âgés entre 20 et 64 ans (**Tableau 5**). L'absence de consanguinité et de toute maladie auto-immune chez les parents des sujets a été retenue comme critère de sélection. Le recrutement s'est déroulé au centre de transfusion sanguine au Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran (CHU d'Oran).

Tableau 5 : Caractéristiques de la population d'étude Cas-Témoins 1

Caractéristiques	Cas 83 (%)	Témoins 1 131 (%)
Hommes/Femmes	38/45 (46/54%)	54/77 (41/59%)
Moyenne d'âge (ans) ± Écart type moyen	35,54 ± 14,46	29,31 ± 10,34

Nous avons disposé aussi d'une banque de données de génotypes de témoins concernant le polymorphisme *I/D* du gène *ACE*. Ce 2^{ème} groupe « Témoins 2 » est constitué de 110 sujets sains recrutés par l'équipe du Pr. *Mediene-Benchekor Sonia* (LGMC, USTO-MB). Les caractéristiques sont représentées sur le **tableau 6**.

Tableau 6 : Caractéristiques de la population d'étude Cas-Témoins 2

Caractéristiques	Cas 83 (%)	Témoins 2 110 (%)
Hommes/Femmes	38 (46%)	54 (49%)
Moyenne d'âge ± Écart type moyen	35,54 ± 12,43 ans	39 ± 6,72 ans

II. Extraction d'ADN :

Les molécules d'ADN ont été extraites à partir du sang total collectés des patients SA (15ml) par la technique d'extraction au NaCl, appelée aussi « salting out » (*Miller S.A. et al. 1988*). L'extraction a eu lieu au niveau du LGMC, USTOMB. La concentration d'ADN génomique a ensuite été mesurée par spectrophotométrie et normalisée à des concentrations finales de 10 à 100 ng/µl selon les techniques utilisées.

Les études génétiques effectuées sur ces banques d'ADN restent anonymes, et les informations personnelles restent confidentielles. Chaque personne est identifiée par un numéro unique, permettant ainsi une traçabilité permanente.

III. Génotypage moléculaire :

III.1. Technique de discrimination allélique en temps réel (TaqMan) :

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. A partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée (*Poitras E & Houde A. 2002*). La technologie de la PCR en temps réel est basée quant à elle sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent dont l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons par PCR en temps réel : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) ou les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe quatre technologies principales :

hydrolyse de sondes (*TaqMan assay*), hybridation de 2 sondes (*HybProbes*), balises moléculaires (*Molecular Beacons*) et amorces scorpion (*Scorpion primers*). Selon les études, ces différentes technologies auraient une sensibilité équivalente. Cependant, elles présentent des différences au niveau de la spécificité (*Wittwer et al. 1997 ; Bustin. S.A 2000*).

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la technologie d'hydrolyse de sondes appelée aussi « *TaqMan assay* » afin de réaliser le génotypage de quatre polymorphismes nucléotidiques ainsi que le typage de l'antigène HLA-B27. Cette technologie est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA). Lorsque stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise (**a**). Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique (**b**). Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (**c**) (*Mackay et al. 2002*) (**Figure 27**).

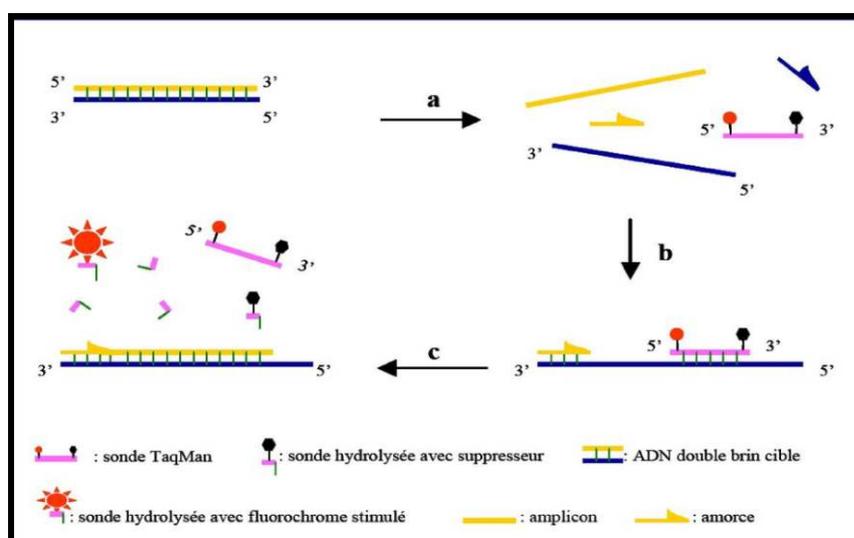


Figure 27 : Hydrolyse de sondes (TaqMan assay) (*Poitras E & Houde A. 2002*).

III.1.1 Génotypage de l'allèle *HLA-B27* :

La détermination du statut HLA-B27 a concerné 200 ADN de 81 patients atteints de la SA et 119 témoins. La présence et/ou l'absence de l'antigène HLA-B27 chez ces deux groupes a été déterminée au sein du Laboratoire d'Immunologie à l'Institut Pasteur d'Alger. Le typage HLA-B27 a été réalisé par la PCR en temps réel (*TaqMan*) en utilisant un kit commercialisé (GeneFinder HLA-B*27 RealAmp kit).

Les réactions d'amplifications ont été refaites pour chaque individu au minimum deux fois en utilisant un contrôle positif et négatif à chaque réaction. La fiche technique du kit ainsi que les détails du génotypage sont présentés dans l'**annexe 4**.

III.1.2. Génotypage des SNPs :

Le génotypage des quatre polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) a été réalisé par discrimination allélique par sondes fluorescentes en temps réel (*TaqMan*®, LifeTech) (**Tableau 7**). Ce travail a été fait au Laboratoire Européen de la polyarthrite rhumatoïde, GenoHotel-EA3886 (Genopole d'Evry, France).

Les réactions d'amplification de nos échantillons ont été réalisées sur l'appareil de PCR en temps réel « ABI-7500 » (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) selon le protocole du fabricant. Les conditions ainsi que le protocole de PCR sont les mêmes quelque soit le polymorphisme étudié, seul le mélange des amorces et des sondes fluorescentes est spécifique pour chaque polymorphisme (**Annexe 5**).

Tableau 7 : Les SNPs sélectionnés pour le génotypage par la technologie TaqMan

Gènes/ Locus	db SNP ID	Assay ID LifeTech	SNP	Localisation	Polymorphismes
<i>CTLA4</i>	rs3087243	C__3296043_10	A/G	Chr 2	3'UTR
<i>REL</i>	rs13031237	C__3219755_10	G/T	Chr 2	Intron
<i>CD40</i>	rs4810485	C__1260190_10	G/T	Chr 20	Intron
<i>PRKCQ</i>	rs4750316	C__32117918_10	C/G	Chr 10	Intergénique

db : data base ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism ; Chr : chromosome ; ID : Identification Number.

III.2. Technique d'amplification par PCR multiplex :

La PCR multiplexe est l'un des outils les plus utilisés en génotypage pour la détection des SNP, SSR, STR, microsatellites..., également employée pour identifier des mutations des maladies génétiques. Le principe de la PCR multiplexe est l'utilisation d'un set de plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément une ou plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction de PCR.

III.2.1. Identification du polymorphisme Insertion/Délétion :

La caractérisation du polymorphisme Insertion/Délétion (I/D) du gène de l'*ACE* a été réalisée par PCR classique au niveau du laboratoire de recherche LGMC, USTOMB selon le protocole et le programme illustré dans l'**annexe 5**. Après amplification, la migration des fragments amplifiés a été obtenue par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%. Trois génotypes ont été identifiés : II, ID et DD. Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification de la région d'intérêt sont présentées dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification du polymorphisme I/D du gène de l'*ACE*

Séquences des amorces	Pourcentage GC (%)
PCR classique :	
sens 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	54
non-sens : 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	48
PCR multiplex :	
sens 5'-CATCCTTTCTCCCATTTCTC-3'	45
non-sens 5'-AATTTTATTCCAGCTCTGAAAT-3'	27
interne 5'-TGGGATTACAGGCGTGATACAG-3'	50

L'équipe de *Lindpaintner K et al*, a constaté que 5 à 10% des sujets « DD » génotypés par la PCR classique sont en réalité de génotype ID (*Lindpaintner K. et al, 1995*). Afin de confirmer les résultats de la PCR précédente (présence ou l'absence de l'insertion), une 3^{ème} amorce (PCR multiplex) a été utilisée concernant les sujets de génotypes DD (**Annexe 5**). Ainsi, nous avons utilisé deux amorces flanquantes encadrant la région d'intérêt et une 3^{ème} amorce interne. Les séquences des amorces encadrant l'insertion et la séquence de l'amorce complémentaire de la région interne de l'insertion sont représentées sur le **tableau 8**.

La lecture des génotypes a été réalisée après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Le génotype DD a été confirmé par l'absence de l'amplification du fragment en question.

Concernant les échantillons amplifiés dans cette étude, 40 ADN_s ($\approx 50\%$) ont été directement amplifiés par PCR à trois amorces au laboratoire GenHotel EA3886 dont les conditions d'amplification sont éclairées sur l'**annexe 6**. Cependant, la lecture des trois génotypes a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% mais avec une migration de 1h30 à 150 volts afin de pouvoir séparer les deux bandes de 68 et 87 pb, respectivement.

III.3. Technique de la PCR *QX200 Droplet Digital* (ddPCR) :

Après plusieurs méthodes testées dans l'analyse des variations de nombre de copies (CNVs), la "*Digital PCR* (dPCR)" ou "*Molecular Copy-number Counting* (MCC)" a été mise en place avec succès (McCaughan & Dear 2010). Une PCR multiplex est réalisée afin d'amplifier la séquence cible. Les produits de cette PCR sont ensuite amplifiés par une PCR nichée à amorces spécifiques pour le gène cible et le gène de référence. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse en gel puis un comptage simultané des aliquotes positives ou négatives se fait pour estimer le nombre de copies (CN) du gène cible par rapport au gène de référence (Daser A. et al. 2006 ; McCaughan F. 2009). Cette approche a été améliorée en développant un système de nano fluide sur micro-puces, la *Digital-array*. Elle est basée sur le fait que les molécules d'ADN individuelles sont réparties aléatoirement dans plus de 9000 nano-puits de réactions. Une PCR est lancée avec deux sondes fluorescentes spécifiques pour le gène cible et le gène de référence. Le CN relatif par génome haploïde est estimé par le ratio entre la concentration du gène cible et du gène de référence (Qin J. et al. 2008).

Plus tard, une autre variante de digital PCR a vu le jour, remplaçant la distribution des molécules d'ADN dans des nano-puits par la partition d'un volume final de réaction normale de qPCR en 20 000 gouttelettes (*Droplets*) grâce au principe d'émulsion d'où son appellation *Droplet Digital PCR* (ddPCR). Une huile pour l'émulsion et le volume réactionnel sont déposés dans deux puits différents d'une cassette. Ensuite, les gouttelettes sont générées grâce au générateur de *droplets*, qui va appliquer une pression pour aspirer l'huile. Cette huile va stabiliser les *droplets* et le mélange réactionnel à travers des nano-circuits et mélanger les deux solutions pour former des microgouttes qui seront collectées dans un troisième puits. Les droplets générées sont ensuite transférées vers une plaque de PCR classique et amplifiées par un thermocycleur conventionnel. Enfin, un lecteur de droplets va mesurer le signal fluorescent dans chaque gouttelette et compter le nombre d'évènements positifs et négatifs. Le logiciel « QuantaSoft™ » quant à lui, estimera les concentrations (copie/ μ l) pour le gène cible et le gène de référence et calculer le nombre de copies équivalent (Hindson B.J. et al. 2011) (**Annexe 7**).

L'avantage de cette technologie (ddPCR) par rapport aux précédentes c'est qu'elle utilise un principe plus simple pour la détection de duplication en tandem qui se base sur le choix d'une enzyme de restriction qui coupe de part et d'autre de la région amplifiée. La ddPCR est donc plus économique et plus simple puisqu'elle n'utilise pas de puces, consomme moins de réactifs, et comporte moins d'étapes (Hindson B.J. et al. 2011).

Dans ce travail de thèse, la QX200™ Droplet Digital PCR (Bio-Rad Laboratories, California, USA) a été utilisée pour la caractérisation des CNVs situés sur trois gènes différents (*CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B*) au niveau du laboratoire Européen de la polyarthrite rhumatoïde, GenoHotel-EA3886. L'estimation de nombre de copies a été évaluée en utilisant deux sondes fluorescentes pour chaque gène cible (*CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B*) portant chacune un fluorophore différent (selon la méthodologie *TaqMan*). La première sonde est spécifique du gène d'intérêt (*FAM*) alors que la deuxième est spécifique d'un gène de référence (*VIC*) dont le nombre de copies ne varie pas dans le génome. Nous avons utilisé dans cette étude le gène *RPP30* (NCBI gene 10556) connu avec 2 copies chez tous les individus.

Nous avons utilisé les mêmes conditions d'amplification et de quantification pour chaque réaction concernant les trois gènes explorés. Les détails de la quantification des CNVs sont présentés dans l'**annexe 7**. Des tests de contrôle qualité ont été réalisés suivant le protocole international dMIQE (*Minimum Information for the Publication of Digital PCR Experiment*) (Huggett J.F. et al. 2013).

III.3.1. Caractérisation des CNVs du gène *CCL3L1* :

Les précédentes études ayant investigué les CNVs du gène *CCL3L1* avec la qPCR en utilisant une sonde spécifique n'ont pas tenu compte de la présence du pseudogène *CCL3P1* et du gène *CCL3L3*. Ce dernier a une similarité avec *CCL3L1* de 99%, ces deux gènes ne varient que par une seule paire de base. Nous avons donc choisi des amorces spécifiques au gène *CCL3L1* selon la mise au point réalisée au GenHotel par l'équipe de Ben Kilani (Ben Kilani M.S. 2014). En effet, cette équipe a utilisé une amorce « sens » spécifique de *CCL3L1* avec le nucléotide spécifique à l'extrémité 3' en plus d'une sonde spécifique.

Afin de déterminer le nombre de copies du gène *CCL3L1*, nous avons amplifié 81 échantillons de cas et 119 échantillons de contrôles par la ddPCR. La réaction de quantification a été réalisée avec les amorces d'amplification et la sonde spécifique du gène *CCL3L1* en plus de la deuxième sonde spécifique pour le gène de référence *RPP30* (**Tableau 9**). Les deux contrôles positifs (NA10851 et NA10852) ont été rajoutés dans chaque

expérience. De plus, nous avons utilisé les mêmes conditions préalablement testées au laboratoire GenHotel (**annexe 7**).

Tableau 9 : Caractéristiques des amorces d’amplification et de la sonde spécifique du gène cible *CCL3L1* et du gène de référence *RPP30*

Séquences d’amorces et des sondes	Pourcentage-GC (%)
CCL3L1	
F 5’-TCTTCGGGGCTCTCAGGCCG-3’	70
R 5’-CCATCACCTGCTCCCAATCATGCA-3’	54
FAM 5’-GGACTCACGTGGTGCAGAGAGGA-3’	61
RPP30	
F 5’-GATTTGGACCTGCGAGCG-3’	61
R 5’-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3’	61
VIC 5’-CTGACCTGAAGGCTC-3’	60

F : forward, R : reverse

III.3.2. Caractérisation des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* :

Nous avons utilisé la ddPCR sur les mêmes échantillons précédemment testés avec *CCL3L1* afin de déterminer le nombre de copies des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*. La réaction de quantification a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour *CCL3L1* mis à part les sondes spécifiques pour le gène *FCGR3A* : Hs00139300_cn, *AppliedBiosystem* et le gène *FCGR3B* : Hs04211858_cn, *AppliedBiosystem*. Les CNVs ont été quantifiés en comparant la fluorescence du gène cible *FCGR3A* et celle du gène *FCGR3B* par rapport à celle du gène référence *RPP30* en utilisant les sondes spécifiques à chaque gène. Les séquences sont illustrées sur le tableau 10. Comme pour le précédent gène, les mêmes contrôles positifs ont été utilisés dans chaque expérience (NA10852 et NA10851) (**Annexe 7**).

Tableau 10 : Caractéristiques des sondes spécifiques des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*

Amorces et sondes	Pourcentage-GC (%)
FCGR3A	
F 5’-TCTTCGGGGCTCTCAGGCCG-3’	70
R 5’-CCATCACCTGCTCCCAATCATGCA-3’	54
FAM 5’-GGACTCACGTGGTGCAGAGAGGA-3’	61
FCGR3B	
F 5’-GATTTGGACCTGCGAGCG-3’	61
R 5’-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3’	61
FAM 5’-CTGACCTGAAGGCTC-3’	60

F : forward, R : reverse

IV. Les tests de stratifications :

IV.1. Stratifications selon les paramètres anthropologiques :

Après l'étape de génotypage, nous avons procédé à l'étude d'association génétique entre tous les polymorphismes étudiés et le développement de la spondylarthrite ankylosante. Puis, nous avons recherché d'éventuelles associations génétiques entre ces polymorphismes génétiques selon deux paramètres : l'âge du diagnostic et le sexe. Ceci a été fait afin de tester les effets de ces deux facteurs sur la physiopathologie de la SA.

IV.2. Stratifications selon les paramètres cliniques :

Le groupe des patients atteints de la SA a été stratifié selon leurs expositions à certains facteurs biologiques et cliniques. D'abord, nous avons élaboré des tests de stratification des cas et des témoins selon la présence et l'absence du *HLA-B27* concernant tous les marqueurs génétiques étudiés mis à part l'insertion/délétion au niveau du gène *ACE*.

Par ailleurs, le groupe des patients atteints de la SA a été classé et stratifié selon plusieurs paramètres cliniques et biologiques comme la présence de la protéine CRP, la forme clinique de la SA et les scores des indices BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) et BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*).

V. Etude Statistique :

V.1. L'équilibre d'Hardy-Weinberg (HWE) :

L'équilibre d'Hardy-Weinberg est un principe fondamental en génétique, il prescrit que sous certaines conditions et après quelques générations, les proportions génotypiques d'un locus se fixent autour d'un équilibre (*Hardy G.H. 1908*). Au cours des générations, la fréquence des génotypes reste constante d'une génération à l'autre s'il n'y a pas de sélection, si la population est grande, s'il n'y a ni mutation, ni migration et si les unions se font au hasard. D'une façon générale, le modèle d'Hardy-Weinberg peut alors être utilisé pour vérifier la distribution génotypique d'une population, en comparant la distribution observée et la distribution théorique par un test de χ^2 (chi2).

V.2. Etude d'association gène-candidat :

L'approche la plus classique pour les études d'association consiste à échantillonner des malades et des témoins (non atteints), indépendants les uns des autres (sans apparentement), dans la population générale. Puis, comparer la fréquence de différents

variants entre les deux échantillons par un test de Chi2 d'homogénéité, un test exact de Fisher, ou tout autre test de comparaison.

Le marqueur utilisé peut être un polymorphisme sans relation causale suspecté a priori avec la pathologie ou bien un polymorphisme d'un gène candidat. L'hypothèse nulle dans ces études est l'indépendance entre la présence d'un allèle à un locus et la maladie chez les individus de la population testée. Si les tests statistiques rejettent cette hypothèse cela indique la présence éventuelle d'une association. Cette approche permet de mettre en évidence si un allèle d'un marqueur est plus ou moins présent dans une population de patients que ne le voudrait le hasard. Par conséquent, la force de l'association peut être mesurée, par la p-value (valeur p) ou par un *Odd Ratio* (OR). La p-value (niveau de probabilité comprise entre 0 et 1) indique la probabilité d'obtenir par hasard un résultat de test au moins aussi extrême que la valeur réellement observée, assumant que l'hypothèse nulle est vraie. L'OR (rapport de côtes) est un indice statistique utilisé en épidémiologie pour les études cas-témoins (*Glas et al. 2003*). L'*odd* (ou côte) d'un individu dans un groupe donné, correspond au nombre d'individus qui présentent l'événement, rapporté au nombre de ceux qui ne le présentent pas. L'OR est le rapport entre l'*odd* des patients et celui des témoins.

Au cours de cette thèse, l'association entre l'exposition aux différents facteurs cliniques, biologiques et les variables génétiques «polymorphisme mono-nucléotidique (SNP), insertion/délétion et variation de nombre de copies (CNVs)» a été mise en évidence par un test Chi2 d'homogénéité. Une valeur p est considérée significative selon un seuil de $p < 0,05$. Le risque a été ensuite quantifié par un calcul de l'OR avec un intervalle de confiance (IC) à 95%. Si l'OR = 1, le variant étudié n'est pas associé à la maladie. Si l'OR est > 1 , le variant étudié est associé à une augmentation de la prédisposition à la maladie. Et si l'OR est < 1 , le variant étudié est associé à une réduction du risque de la maladie (effet protecteur).

Les corrections des tests multiples ont été établies pour l'ensemble des SNPs [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C), de l'insertion/délétion du gène *ACE* et des CNVs au niveau des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *CCL3L1* en utilisant la correction de Bonferroni (*Sonnenberg A. 1985*).

Cette méthode consiste à réaliser les tests statistiques avec un seuil de signification de « $0,05/\pi$ » où π désigne le nombre de comparaisons effectuées. De ce fait, le degré de significativité pour la valeur p_{seuil} dans notre étude a été limité à 0,006 ; $0,05/9$ considérant les 9 marqueurs génétiques testés sur l'ensemble de l'étude.

***RESULATS ET
DISCUSSION***

I. Description de la population d'étude

Dans ce travail de thèse, nous avons recruté 83 patients atteints de la SA et on disposait déjà d'une bibliothèque d'ADN de 131 sujets témoins au niveau de notre équipe de recherche au laboratoire LGMC, USTO-MB. Les caractéristiques anthropologiques et/ou cliniques des cas et témoins sont rapportés dans le **tableau 11**.

Concernant les caractéristiques générales des sujets recrutés dans cette étude, nous avons trouvé que la distribution du sexe et de l'âge est similaire entre le groupe de cas et celui de témoins. En effet, le sexe ratio (homme/femme) des sujets SA est de 0,84 tandis que chez les contrôles il est de 0,7. De même, nous n'avons pas observé une différence concernant l'âge moyen entre ces deux groupes. Il était de $39,75 \pm 14,54$ ans chez les cas, contre $29,32 \pm 10,35$ ans chez les témoins (**Tableau 11**). Ces constatations indiquent que les échantillons d'étude sont équilibrés. Cette distribution de l'âge et du sexe est similaire à celle observée dans l'étude réalisée chez les patients atteints de la SA et les témoins de la population Chinoise (*Wang N.G. et al. 2015*). Cependant, des résultats discordants concernant le sexe ratio ont été retrouvés dans différentes populations (*Tayel M.Y et al. 2012 ; Hamdi W. et al. 2012*). Cette discordance est due à la différence de la taille des échantillons étudiés ainsi qu'aux objectifs de recrutements des patients spondylarthriques.

Concernant les caractéristiques cliniques du groupe des cas, 72% des patients avaient des antécédents familiaux de SA ou de SpA. Le mode de début est pelvi rachidien dans 20 cas (24%), périphérique dans 9 cas (11%) et mixte dans 54 cas (65%). De plus, 41 et 62% des cas présentaient un syndrome d'uvéïte et d'atteinte périphérique, respectivement (**Tableau 11**). Ces résultats ont été retrouvés similaires dans d'autres travaux (*Tayel M.Y et al. 2012 ; Wang N.G. et al. 2015*).

Par ailleurs, les moyennes des paramètres d'activité et de sévérité de la maladie étaient de 3.8 ± 0.3 cm, 3.9 ± 0.3 cm pour le BASDAI et le BASFI, respectivement. Le taux moyen de la vitesse de sédimentation (VS) était de $36,01 \pm 2,5$ mm/heure alors que 72% des patients présentaient une CRP (*C- Reactive Protein*) > 6 mg/L (**Tableau 11**). Ces résultats sont en concordance avec les études effectuées chez les patients spondylarthriques Nord Africains (*Tayel M.Y et al. 2012 ; Belkhou A et al. 2013*).

Tableau 11 : Caractéristiques anthropologiques et cliniques des patients et des témoins de la population de l'Ouest Algérien

Caractéristiques des sujets	Patients 83 (%)	Témoins 131 (%)
Caractéristiques générales		
Sexe :		
Hommes	38 (46)	54 (41)
Femmes	45 (54)	77 (59)
Age de survenue :		
Moyenne \pm ES	39,75 \pm 14,54	29,32 \pm 10,35
Age du diagnostic :		
\leq 30, n (%)	33 (40)	70 (53)
$>$ 30, n (%)	50 (60)	61 (47)
Caractéristiques cliniques		
Antécédents familiaux :		
Présence/Absence n (%)	59 (72)	
Forme :		
Axiale	20 (24)	
Périphérique	09 (11)	
Mixte	54 (65)	
Syndrome clinique :		
Uvéite	34 (41)	
Atteinte périphérique	51 (62)	
Paramètres d'activité :		
BASDAI (moyenne \pm ES), cm	3,8 \pm 0,3	
BASFI (moyenne \pm ES), cm	3,9 \pm 0,3	
VS (moyenne \pm ES), mm/heure	36,01 \pm 2,5	
CRP $>$ 6 mg/L, n (%)	59 (72)	

ES : Erreur Standard, *n* : nombre de, % : fréquence en pourcentage **HLA-B27** : Antigène leucocytaire Humain-B2, **BASDAI** : Indice d'activité de la spondylarthrite ankylosante (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), **BASFI** : Indice de sévérité de la spondylarthrite ankylosante (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index). *VS* : Vitesse de Sédimentation. **CRP** : Protéine C - réactive.

II. Résultats de l'étude d'association de *HLA-B27* avec la spondylarthrite ankylosante

La présence et/ou l'absence de l'antigène HLA-B27 a été déterminée pour 204 ADN dont 81 ADN de sujets atteints de SA et 123 ADN de contrôles. Le génotypage de l'antigène HLA-B27 a été fait au laboratoire d'immunogénétique et de transplantation au département d'Immunologie à l'institut Pasteur d'Alger. Les résultats de la distribution de l'antigène HLA-B27 entre le groupe de cas et de témoins sont présentés dans le **tableau 12**.

Nous avons constaté que parmi les 81 patients SA de l'Ouest Algérien, 52% sont porteurs de l'allèle HLA-B27. Alors que parmi les 123 contrôles, seulement 5% le portent. Ceci a mené à une distribution significative de HLA-B27 entre les cas et les contrôles de la population de l'Ouest Algérien ($p= 10^{-6}$, OR= 14.62 [6.43-33.20]) (**Tableau 12**). Cette distribution a été retenue même après correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Ces fréquences ne sont pas très différentes de celles observées précédemment dans la population Algéroise où 63% des patients atteints de la SA sont porteur de l'antigène HLA-B27 contre 4% pour les témoins (*Amroun H. et al. 2005*). Il apparaît que le HLA-B27 joue un rôle important dans la physiopathologie de la SA dans la population Algérienne.

Ces constatations sont en corrélation avec les études réalisées dans les populations maghrébines. En fait, chez nos voisins Tunisiens et Marocains, ces études ont trouvé des fréquences de *HLA-B27* (+) de 43 et 58% chez les patients SA et de 3 et 5% chez les sujets témoins, respectivement (*Sakly N. et al, 2009 ; Atouf O et al, 2012 ; Hamdi W. et al. 2012*). De plus, l'étude de *Tayel MY. et al*, a trouvé des fréquences de *HLA-B27* (+) similaires en Egypte (58,7% vs. 4%) (*Tayel MY. et al, 2012*). Cependant, les études faites aux pays d'Europe du Nord et aux pays Arabo-asiatiques ont retrouvés des fréquences beaucoup plus élevées (90% et 74% vs. 5 à 9%, respectivement) (*Reveille J.D. et al, 2001 ; Sieper J. et al. 2006 ; Pertuiset E. 2008 ; Zochling J et Smith E.U. 2010 ; Abdelrahman MH. et al, 2012*).

Ces résultats indiquent qu'il existe une discordance concernant la distribution de la fréquence de HLA-B27 entre les pays des continents du Nord et ceux du Sud. Cette différence de fréquence de l'antigène HLA-B27 entre ces populations confirme la théorie que l'allèle *HLA-B27* suit un gradient décroissant Nord-Sud (*Piazza et al. 1980 ; Khan M.A. 1995*).

Tableau 12 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles dans la population de l'Ouest Algérien.

	Patients SA 81 (%)	Contrôles 123 (%)	Valeur p	OR (IC 95%)
Présence de HLA-B27 (+)	42 (52)	07 (5)		1 ^a
Absence de HLA-B27 (-)	39 (48)	116 (95)	10⁻⁶	14.62 [6.43-33.20]

*% : fréquence en pourcentage, p : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), **OR** : odd ratio, **IC** : intervalle de confiance, **a** : allèle/ génotype de référence.*

III. Résultats de l'étude d'association entre les polymorphismes, [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) et la survenue de la spondylarthrite ankylosante

III.1. Recherche des fréquences des allèles mineurs dans notre population d'étude :

L'analyse du génotypage des sujets témoins de la population de l'Ouest Algérien nous a permis pour la première fois, d'établir les fréquences des allèles mineurs (MAF : *Minor Allele Frequency*) des cinq polymorphismes explorés dans la population de l'Ouest Algérien : [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D).

III.1.1. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs3087243 du gène CTLA4 :

Nous avons génotypé 123 sujets témoins concernant le polymorphisme [CTLA4] rs3087243 (A>G). La distribution des fréquences alléliques nous a révélé que l'allèle G est l'allèle mineur avec une fréquence de 0,49 (**Tableau 13**). L'allèle G du polymorphisme rs3087243 (A>G) a été largement étudié, sa fréquence change selon l'origine ethnique des populations. La fréquence observée dans notre population est semblable à celles rapportées dans les populations Tunisienne (*Benmansour J. et al. 2010*), Européenne (*Farago B. et al. 2010*) et Chinoise d'ethnie Han (*Wang N.G. et al. 2015*) (MAF \leq 50%), alors qu'elle est différente dans les populations Asiatiques (*Lei C. et al. 2005 ; Tsukahara S et al. 2008*) et Américaines (*Pincerati M.R et al. 2010, Torres-Carrillo N. et al. 2013*) (MAF > 50%).

III.1.2. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs13031237 du gène REL :

Pour le polymorphisme [REL] rs13031237 (G>T), la distribution des fréquences alléliques a été recherché chez 131 sujets témoins. Nous avons montré que l'allèle T est l'allèle mineur avec une fréquence de 0,35 (**Tableau 13**). Ce résultat a été trouvé identique dans une étude GWAS réalisée dans la population Nord-Américaine où l'allèle T de ce polymorphisme était l'allèle mineur avec une fréquence de 0,35 (*Gregersen P.K. et al. 2009*). Cette fréquence a été aussi trouvée dans une étude de répliation dans la même région à 0,34 (*Gregersen P.K. et al. 2009*). Une autre étude GWAS et méta-analyse réalisées en 2010 sur la population Européenne a attesté que l'allèle mineur T avait une fréquence similaire de 0,37 (*Stahl et al. 2010*). De plus, dans la même année, l'étude d'*Eyre et al.*, a trouvé une fréquence de 0,30 pour l'allèle mineur T dans la population Américo-Canadienne (*Eyre et al. 2010*). Toutes les études publiées rapportent des fréquences similaires de l'allèle mineur T du

Tableau 13 : Distribution des fréquences alléliques des quatre polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (*A>G*), [*REL*] rs13031237 (*G>T*), [*CD40*] rs4810485 (*G>T*) et [*PRKCQ*] rs4750316 (*G>C*) dans la population Témoins de l'Ouest Algérien.

Polymorphismes génétiques	Témoins	
	Allèle mineur n (%)	Allèle majeur n (%)
[<i>CTLA4</i>] rs3087243 (<i>A>G</i>)	G : 121 (49)	A : 125 (51)
[<i>REL</i>] rs13031237 (<i>G>T</i>)	T : 93 (35)	G : 169 (65)
[<i>CD40</i>] rs4810485 (<i>G>T</i>)	T : 59 (23)	G : 203 (77)
[<i>PRKCQ</i>] rs4750316 (<i>G>C</i>)	C : 80 (31)	G : 182 (69)

% : fréquence, n : nombre

polymorphisme [*REL*] rs13031237 (G>T). Cependant, une récente étude réalisée par l'équipe de *Rahmoun et al.*, a trouvé que l'allèle mineur de ce polymorphisme est plutôt l'allèle G avec une fréquence de 0,28. Cette étude a été faite sur un petit échantillon de 28 nourrissons originaires de l'Ouest Algérien (*Rahmoun N. et al. 2018*).

III.1.3. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs4810485 du gène CD40 :

L'analyse de la distribution du polymorphisme [*CD40*] rs4810485 (G>T) sur 131 sujets témoins a montré que l'allèle T représente l'allèle mineur avec une fréquence de 0,23 (**Tableau 13**). Notre résultat est en concordance avec celui de l'étude d'*Orozco et al.*, la fréquence de cet allèle a été trouvée à 0,25 (*Orozco G et al. 2010*). La même fréquence de l'allèle mineur T a été observée dans une méta-analyse de deux études GWAS réalisée sur 12462 contrôles d'ascendance Européenne (MAF = 0,25) (*Raychaudhuri S et al. 2008*). De plus, des fréquences proches pour cet allèle ont été observées chez les populations Turque et Espagnole (MAF= 0,33, MAF= 0,27, respectivement) (*İnal E.E et al. 2016*) (*Garcia-Bermudez M et al. 2012*).

III.1.4. Fréquence de l'allèle mineur du polymorphisme rs4750316 proche du gène PRKCO :

Concernant le quatrième polymorphisme [*PRKCO*] rs4750316 (G>C), la distribution des fréquences alléliques des 131 témoins a révélé que l'allèle C représente l'allèle mineur avec une fréquence de 0,31 (**Tableau 13**). Notre résultat est concordant avec une méta-analyse de deux études GWAS réalisée sur des contrôles d'ascendance Européenne (MAF = 0,20) (*Raychaudhuri S et al. 2008*). Dans la même année, l'étude de *Barton et son équipe* a analysé les résultats de 11238 témoins caucasiens et a trouvé le même résultat concernant l'allèle mineur C (MAF = 0,20) (*Barton A et al. 2008*).

III.1.5. Fréquence de l'allèle mineur MAF du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) :

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme [*ACE*] rs4340 (I/D) dans la population témoin a été retrouvée en équilibre d'Hardy-Weinberg ($\chi^2= 2,9$, $p=0,23$).

Par ailleurs, l'analyse de la distribution des fréquences allélique de 110 sujets sains originaires de l'Ouest Algérien, nous a révélé que l'allèle insertion (I) représente l'allèle mineur avec une fréquence de 0,40 (**Tableau 14**). Ces résultats sont en concordance (MAF< 50%) avec ceux caractérisant les populations Nord-Africaines (*Meroufel D.N. et al. 2014 ; Zawilla et al. 2014 ; Motawi et al. 2016 ; Fekih-Mrissa et al. 2017 ; Hmimech et al. 2017 ;*

Tableau 14 : Distribution allélique de l'allèle I du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) dans les différentes populations « contrôles »

Continents	Nations/pays	Polymorphisme rs4340 (I/D) Fréquence de l'allèle I	Nombre de contrôles	Références
Afrique du Nord :	Notre étude	0,36	110	(Dahmani C.A. et al. 2018)
	Algérie	0,30	115 (Hommes)	(Meroufel D.N. et al. 2014)
	Tunisie	0,44	120	(Fekih-Mrissa et al. 2017)
	Maroc	0,235	182	(Hmimech et al. 2017)
	Egypte	0,24	279 (Hommes)	(Zawilla et al. 2014)
	Egypte	0,225	80 (Femmes)	(Motawi et al. 2016)
Europe :	Danemark	0,49	382	(Hadjadj et al. 2007)
	Allemagne	0,48	719	(Mondry et al. 2005)
	Royaume-Uni	0,47	478	(Jackson et al. 2000)
	France	0,46	273	(Hadjadj et al. 2007)
	Portugal	0,44	510	(Freitas et al. 2008)
	Espagne	0,37	364	(Villar et al. 2008)
	Italie	0,38	201	(Paterna et al. 2000)
Eurasie :	Turquie (Nord)	0,58	200 (F70%)	(Inanir et al. 2013)
	Turquie (Sud)	0,31	71 (H70%)	(Erkol et al. 2015)
	Russie	0,48	947	(Gineviciene V et al. 2016)
Asie :	Malaisie	0,65	-	(Jayapalan et al. 2008)
	Taiwan	0,64	-	(Jayapalan et al. 2008)
	Japon	0,63	407	(Tomino Y et al. 1999)
	Chine	0,61	106	(Xiao Zheng et al. 2017)
	Kuwait	0,40	100	(Al-Awadhi et al. 2007)
	Arabie Saoudite	0,34	145	(Al-Harbi et al. 2015)

H : hommes, **F** : Femmes.

(Fekih-Mrissa et al. 2017) et Européennes (Jackson et al. 2000 ; Paterna et al. 2000 ; Mondry et al. 2005 ; Hadjadj et al. 2007 ; Freitas A.I et al. 2008 ; Villar J et al. 2008). De plus, des résultats similaires ont été retrouvés aussi, dans les pays Eurasiatiques tels que la Turquie et la Russie (İnal E.E et al. 2016 ; Gineviciene V et al. 2016) et dans quelques pays arabes (Al-Awadhi A.M et al. 2007 ; Al-Harbi K.M et al, 2015) (**Tableau 14**). Cependant, les sujets témoins Asiatiques présentaient plutôt des fréquences très élevées de l'allèle I (MAF > 50%) (Tomino Y et al. 1999 ; Jayapalan J et al. 2008 ; Xiao Z et al. 2017) (**Tableau 14**).

D'après les fréquences de l'allèle I du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) observées et regroupées dans le **tableau 14**, il semblerait que la distribution de ces fréquences alléliques appuie la théorie de l'existence d'un gradient géographique Nord-Sud de l'allèle I ou D dans le monde. Cependant, cette constatation n'exclue pas non plus le rôle du facteur ethnique.

III.2. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Nous avons réalisé une étude cas/témoins afin d'explorer l'impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la physiopathologie de la SA dans notre population d'étude. Pour cela nous avons analysé la distribution des fréquences génotypiques et alléliques de ces polymorphismes entre le groupe de patients SA et le groupe de témoins.

III.2.1. Impact du polymorphisme rs3087243 du gène CTLA4 sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Il a été admis que la molécule de co-stimulation CTLA-4, semblait avoir un effet négatif sur l'organisation des synapses immunologiques. Cette molécule aurait la capacité de réguler la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires par inhibition des facteurs de transcription dans le noyau des lymphocytes T (LTs) (Waterhouse P et al. 1995 ; Saito T et al. 1998).

Plusieurs études ont montré que l'isoforme CTLA-4 soluble a été trouvé en grande quantité chez les patients atteints de SpA comparés aux témoins (Pawlak E et al. 2005 ; Toussirot E. et al. 2008 ; Toussirot E. et al. 2009). Ces études ont suggéré que la protéine CTLA-4 soluble semble jouer un rôle important dans la physiopathologie de la SA et des MAI (Toussirot E et al. 2009). En effet, les polymorphismes +49 (rs231775 G>A) et CT60

(rs3087243 A>G) du gène *CTLA4* semblaient avoir un impact sur l'expression de CTLA-4 soluble et le développement des MAI notamment, la SA (Torres B et al. 2004 ; Farago B et al. 2010 ; Azizi E. et al. 2010 ; Lee W.Y. et al. 2010 ; Spoletini M et al 2013 ; Wang N.G. et al. 2015). De plus, l'haplotype +49G/CT60G du gène *CTLA4* a été trouvé associé à un faible taux d'ARNm codant le CTLA-4 soluble (Ueda H. et al. 2003).

De ce fait, Nous avons analysé dans ce travail de thèse, la distribution des fréquences alléliques et génotypiques du SNP rs3087243 A>G entre 83 patients atteints de la SA et 131 témoins dans l'Ouest Algérien. Parmi les 83 patients recrutés pour cette étude, deux échantillons n'ont pas pu être génotypés pour le polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243. Quant à la population des contrôles, seulement 123/131 sujets sains ont été génotypés. La distribution de ce polymorphisme dans la population témoin était retrouvée en équilibre d'Hardy-Weinberg ($\chi^2= 0,7$, $p=0,4$).

L'analyse de la distribution des fréquences du génotype mineur GG entre le groupe de malades et celui de contrôles n'a révélé aucune différence statistiquement significative ($p> 0,05$). Cependant, l'analyse de la distribution des fréquences du génotype cumulé GT+GG a mis en évidence une différence significative entre les cas et témoins (90% vs 70%, $p=0,001$, OR=3,46 [1,54-7,79]) (**Tableau 15**). De même, l'allèle mineur G du polymorphisme rs3087243 était surreprésenté dans le groupe de patients par rapport aux témoins (70% vs 49%, $p=0,002$, OR=1,89 [1,26-2,84]) (**Tableau 15**). Les résultats de la distribution génotypique et allélique ont été confirmés après les corrections de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Ceci indiquerait que le polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 est associé à la survenue de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication scientifique internationale (**Annexe 8**).

Nos résultats sont discordants avec la seule étude cas/témoins réalisée dans la population Chinoise d'ethnie Han (Wang N.G. et al. 2015). Cette étude a montré que l'allèle majeur A du polymorphisme rs3087243 a été associé à la susceptibilité de développer la SA (Wang N.G. et al. 2015). Les résultats de cette étude pourraient être expliqués par la présence de l'haplotype spécifique ; [*CTLA4*] +49G/CT60A ; fréquemment rencontré dans la population Chinoise, alors qu'il est retrouvé rarement chez les sujets d'origine Japonaise par exemple (Tsukahara S. et al. 2008). Il serait nécessaire que des études ultérieures soient réalisées afin de confirmer ces constatations.

Par ailleurs, le rôle que joue l'allèle G du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 a été démontré dans différentes études explorant le développement des MAI notamment, la PR, le

Tableau 15 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*CTLA4*] *rs3087243* (*A>G*) entre les patients SA et les contrôles

polymorphisme [<i>CTLA4</i>] <i>rs3087243</i> (<i>A>G</i>)	Patients SA 81 (%)	Contrôles 123 (%)	Valeur P	OR (IC 95%)
Génotypes :				
AA	8 (10)	35 (30)		1 ^a
AG	41 (50)	55 (50)		1 ^a
GG	32 (40)	33 (20)	0,004	1,77 [0,98-3,21]
Génotype groupé :				
AG+GG	73 (90)	88 (70)	0,001	3,46 [1,54-7,79]
Allèles :				
A	57 (30)	125 (51)		1 ^a
G	105 (70)	121 (49)	0,002	1,89 [1,26-2,84]

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **a** : allèle/ génotype de référence.

lupus (LES) et le diabète de type 1 (DT1) (*Torres B et al. 2004 ; Farago B et al. 2010 ; Spoletini M et al 2013*). Cependant, il semblerait que l'effet de l'haplotype +49G/CT60G sur l'épissage alternatif du gène *CTLA4* est plus grand que l'effet de l'allèle CT60G seul (*Ueda H. et al. 2003*). De ce fait, il serait intéressant de confirmer nos résultats par l'exploration du polymorphisme +49 (rs231775 G>A) afin de constituer les haplotypes spécifiques à la population Algérienne.

III.2.2. Impact du polymorphisme rs13031237 du gène *REL* sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Le facteur nucléaire NF-kB est un facteur de transcription qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire (*Sen et Baltimore. 1986*). Le gène *REL* code pour une composante de la voie de signalisation du facteur NF-kB (c-Rel). L'étude de *Campbell et al.*, a montré à travers les souris déficientes en c-Rel que ce dernier joue un rôle majeur dans le développement de l'auto-immunité systémique (*Campbell I.K. et al. 2000*). En effet, chez les patients atteints d'arthrite et de maladies intestinales inflammatoires, le facteur c-Rel active le processus inflammatoire par l'activation coordonnée de la transcription de plusieurs gènes candidats à la SA tels que, l'IL12 et l'IL23 (*Jane de Lartigue. 2013*).

Dans ce travail de thèse, le polymorphisme [*REL*] rs13031237 (G>T) a été génotypé pour 83 patients et 131 contrôles. La distribution de ce polymorphisme chez la population des témoins de l'Ouest Algérien a été trouvée en équilibre d'Hardy-Weinberg ($\chi^2= 0,6$, $p= 0,4$).

L'analyse de la distribution des fréquences génotypiques de ce polymorphisme entre le groupe de cas et le groupe de contrôles a montré que le génotype TT ainsi que le génotype cumulé GT+TT ne présentent aucune différence statistiquement significative (respectivement : 6% vs. 10%, $p > 0,05$ et 57% vs. 61%, $p > 0,05$). De même, l'analyse de la distribution des fréquences alléliques n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les cas et les témoins (31% vs. 35%, $p > 0,05$) (**Tableau 16**). Notre étude suggère que le polymorphisme [*REL*] rs13031237 n'aurait aucun effet sur la survenue de la SA dans la population de l'Ouest Algérien.

La présente étude est la première à analyser les distributions des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme [*REL*] rs13031237 chez des sujets spondylarthriques. Cependant, le gène *REL* a été sélectionné comme un gène candidat à la PR dans les études GWAS et quelques réplifications indépendantes (*Gregersen et al. 2009 ; Stahl et al. 2010*). L'étude GWAS de *Gregersen et al.*, faite sur la population Nord-Américaine a trouvé une

Tableau 16 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*REL*] rs13031237 (G>T) entre les patients SA et les contrôles

polymorphisme [<i>REL</i>] rs13031237 (G>T)	Patients SA 83 (%)	Contrôles 131 (%)	Valeur <i>P</i>	OR (IC 95%)
Génotypes :				
GG	36 (43)	51 (39)		
GT	42 (51)	67(51)		
TT	05 (06)	13 (10)	NS.	-
Génotype groupé :				
GT+TT	47 (57)	80 (61)	NS.	-
Allèles :				
G	114 (69)	169 (64)		
T	52 (31)	93 (35)	NS.	-

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **NS.** : Non significative, **a** : allèle/ génotype de référence.

association significative entre l'allèle T du polymorphisme rs13031237 et la survenue de la PR ($p=6,01 \times 10^{-10}$, OR=1,27) (Gregersen et al. 2009). Des réplifications par études cas/témoins ont confirmé cette association ($p=6,01 \times 10^{-10}$, OR=1,27) (Gregersen et al. 2009). De plus, l'étude GWAS de Stahl et al, a attesté aussi une association significative de l'allèle T de ce SNP entre les patients PR et les contrôles dans la population Européenne ($p= 7,9 \times 10^{-7}$, OR=1,13) (Stahl et al. 2010).

Les résultats retrouvés dans ces GWAS et études de réplifications peuvent être le reflet de la taille des échantillons explorés (> 1000 sujets). Nos résultats montrent une distribution quasi égale des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme [REL] rs13031237 entre les cas et témoins. De ce fait, nous devrions confirmer ou affirmer ces démonstrations sur un échantillon plus large. De plus, d'autres SNPs du gène REL pourraient être explorés.

III.2.3. Impact du polymorphisme rs4810485 du gène CD40 sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

La molécule CD40 est une protéine de co-stimulation présente souvent sur les CPA et à la surface des LB. Il a été récemment rapporté que la protéine CD40 possède une activité régulatrice de la production de l'IL12 et l'IL23 par les CPA. Ces cytokines ont été rapportées au cours de la physiopathologie de la spondylarthrite (Visekruna A et al. 2012). De plus, il a été montré que l'interaction de CD40 à son ligand CD40L serait capable d'induire l'expression de l'IL23 via une attaque infectieuse (Tan ZY et al. 2009). De ce fait, nous avons sélectionné un polymorphisme nucléotidique simple sur le gène CD40 (rs4810485) afin de chercher son impact sur la survenue de la SA dans la population Algérienne.

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme [CD40] rs4810485 (G>T) a été comparé entre 83 patients et 131 témoins de l'Ouest Algérien. La distribution chez le groupe des contrôles a été trouvée en équilibre d'Hardy-Weinberg ($\chi^2= 0,3$, $p=0,6$).

D'après le **tableau 17**, l'analyse des résultats des distributions des fréquences génotypiques (TT et GT+TT) et allélique du polymorphisme [CD40] rs4810485 ne montre aucune différence statistiquement significative entre les patients SA et les contrôles (6% vs. 5%, $p > 0,05$; 46% vs. 41%, $p > 0,05$ et 25% vs. 52%, $p > 0,05$, respectivement) (**Tableau 17**). Nos résultats suggèrent que le polymorphisme rs4810485 du gène CD40 ne semble jouer aucun rôle dans la susceptibilité de développer la SA dans la population Algérienne.

Les résultats sont concordants avec toutes les études ayant exploré l'effet du polymorphisme [CD40] rs4810485 sur la survenue de la SA. En effet, l'équipe de Sari I. et

Tableau 17 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*CD40*] rs4810485 (G>T) entre les patients SA et les contrôles

Polymorphisme [<i>CD40</i>] rs4810485 (G>T)	Patients SA 83 (%)	Contrôle 131 (%)	Valeur <i>P</i>	OR (IC 95%)
Génotypes :				
GG	45 (54)	78 (59)	NS	-
GT	33 (40)	47 (36)		
TT	05 (06)	06 (05)		
Génotype groupé :				
GT+TT	38 (46)	53 (41)	NS	-
Allèles :				
G	123 (75)	203 (78)	NS	-
T	43 (25)	59 (52)		

% : fréquence, *n* : nombre, *p* : valeur de signification ($p \leq 0,05$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **NS** : Non significative, **a** : allèle/ génotype de référence.

son équipe n'a montré aucune association significative entre ce polymorphisme et la survenue de la SA dans la population Française (44 patients et 38 témoins) (*Sari et al. 2010*). De plus, l'équipe de *Qu Lin* et ses collaborateurs n'ont trouvé aucune différence statistique de la fréquence génotypique TT entre les cas (n=66) et les témoins (n=30) ($p > 0,05$) dans la population Chinoise (*Lin Q al. 2010*).

En revanche, l'étude de *Orozco et al.*, a montré dans une grande cohorte Britannique (3962 patients PR et 3531 contrôles) une association statistiquement significative entre le génotype TT et la survenue de la PR ($p = 2 \times 10^{-4}$) (*Orozco G et al. 2010*). Une méta-analyse de deux GWAS a trouvé une association positive entre le SNPs rs4810485 et le développement de la PR. Cette étude portait sur 3393 cas PR et 12462 contrôles tous blancs et d'ascendance Européenne (*Raychaudhuri S et al. 2008*).

De ce fait, l'absence d'association entre le polymorphisme [*CD40*] rs4810485 (G>T) et la survenue de la SA dans les populations Algériennes, Française et Chinoises pourrait être due à la taille limitée des échantillons explorés. Il serait nécessaire que des études sur des échantillons plus larges soient effectuées afin de confirmer ou d'affirmer les résultats observés.

Par ailleurs, l'étude de *Qu Lin et al.*, a montré que l'expression de CD40L dans le sang était significativement plus élevée chez les patients SA que chez les contrôles ($p < 0,001$) (*Qu Lin et al. 2010*). Cependant, l'étude de *Sari et al.*, n'a pas pu montrer une association significative entre le taux du ligand soluble de CD40 (CD40Ls) et la SA ($p = 0,83$) (*Sari et al. 2010*). De plus, une surexpression du ligand CD40L a été observée chez les patients atteints de la PR (*Wang C.R. et Liu M.F. 2003*), du lupus érythémateux disséminé (LES) (*Koshy M et al. 1996*), et de la sclérose en plaques (*Filion L.G et al. 2003*) par rapport aux témoins. Ceci engendre une production importante d'auto-anticorps et de cytokines pro-inflammatoires (*Toubi E et Shoenfeld Y. 2004*). Il serait important, d'étudier l'impact du ligand CD40L sur la survenue de la SA dans la population l'Ouest Algérien.

III.2.4. Impact du polymorphisme rs4750316 proche du gène *PRKCQ* sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Les protéines exprimées par les gènes PKC ont été impliquées dans la signalisation de divers types de cellules immunitaires (*Dempsey EC. et al. 2000*). En effet, la PKC-théta (PKC- θ) codée par le gène *PRKCQ* a été impliquée dans la régulation et le contrôle de la signalisation cellulaire médiée par les LTs. Les études ex vivo ont montré que la PKC- θ est

impliquée dans l'activation des facteurs qui traduisent le signal d'activation lymphocytaire à une réponse inflammatoire comme le facteur NF-kB, la protéine d'activation-1 (AP-1) et le facteur nucléaire des LTs (NFAT) (Baier G. 2003 ; Thuille N et al. 2005). De ce fait, la PKC- θ est donc un candidat plausible pour les MAI telles que la SA (Hayashi K. et Altman A. 2007 ; Sun Z. 2012). Dans cette étude, nous avons sélectionné un SNP attribué au gène *PRKCQ* (rs4750316) afin de rechercher son impact sur la susceptibilité de développer la SA.

Le polymorphisme rs4750316 (G>C) du gène *PRKCQ* a été génotypé chez 83 patients SA et 131 contrôles. La distribution des fréquences génotypiques de ce polymorphisme dans la population témoin était retrouvée en équilibre d'Hardy-Weinberg aussi ($\chi^2= 0,03$, $p=0,8$).

L'analyse de la distribution des fréquences du génotype CC du polymorphisme rs4750316 (G>C) a montré une différence statistiquement significative limitée entre les deux groupes de cas et de témoins (2% vs. 5%, $p=0,05$, OR=0,24 [0,16-0,99] (**Tableau 18**). Cependant, cette différence n'a survécu ni après la correction de Bonferroni ni en présence de trois doses de l'allèle mineur (GC+CC) ($p> 0,05$). Aussi, l'analyse de la distribution des fréquences alléliques n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les cas et contrôles (53% vs. 31%, $p> 0,05$) (**Tableau 18**). Nos résultats suggèrent que le SNP [*PRKCQ*] rs4750316 ne semble avoir aucun effet sur la survenue de la SA.

A notre connaissance, aucune étude n'a recherché précédemment, l'association du SNP [*PRKCQ*] rs4750316 à la SA. Par contre, l'impact de ce polymorphisme a été largement étudié sur la survenue de certaines MAI. En effet, l'étude réalisée sur une population Allemande n'a trouvé aucune association positive dans des cohortes de patients atteints de PR et de maladie cœliaque par rapport aux témoins ($p> 0,05$) (Marieke J.H et al. 2009). Alors que l'étude de Barton A. et son équipe réalisée sur 4106 cas et 11238 témoins Caucasiens a suggère une association significative du génotype mineur CC avec la survenue de la PR ($p=4 \times 10^{-5}$; OR=0,87) (Barton A et al. 2008).

Il serait nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon étudié dans ce travail pour confirmer ou affirmer nos résultats dans la population de l'Ouest Algérien.

III.2. Impact du polymorphisme rs4340 (I/D) du gène *ACE* sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Les résultats du génotypage moléculaire du polymorphisme [*ACE*] rs4340 (I/D) a été réalisé par la PCR multiplex concernant le groupe des patients. Cette méthode nous a permis de déterminer les trois génotypes (II, ID et DD) pour 83 ADNs de sujets SA. Concernant

Tableau 18 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme rs4750316 (G>C) proche du gène *PRKCQ* entre les patients SA et les contrôles

polymorphisme [<i>PRKCQ</i>] rs4750316 (G>C)	Patients SA 83 (%)	Contrôles 131 (%)	Valeur <i>P</i>	OR (IC 95%)
Génotypes :				
GG	43 (52)	66 (59)		1 ^a
GC	38 (46)	50(36)		
CC	02 (02)	15 (05)	0.05	0,24 [0,16-0,99]
Génotype groupé				
GC+CC	40 (48)	65 (41)	NS	-
Allèles :				
G	124 (47)	182 (69)	NS	-
C	42 (53)	80 (31)		

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **NS** : Non significative, **a** : allèle/ génotype de référence.

l'échantillon des témoins, nous n'avons pas effectué le génotypage moléculaire étant donné que nous disposions des résultats du génotypage de 110 témoins.

Il a été démontré que le taux circulant de l'enzyme ACE suivait une distribution en faveur d'une détermination génétique. Ceci a été confirmé par le fait que le polymorphisme insertion/délétion (I/D) du gène *ACE* peut revêtir trois formes : la forme courte (DD) qui code pour un taux élevé de l'enzyme circulante, la forme longue (II) code pour un taux plus bas et la forme hétérozygote (ID) qui code pour un taux intermédiaire (Laraqui A. 2006). L'ensemble de ces travaux ont confirmé que les taux élevés d'ACE dans le plasma ainsi que dans les parois des vaisseaux, favorisent la formation de l'angiotensine II (Ang II). Il a été rapporté que les molécules de l'Ang II activent le facteur NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines au cours des MAI (Dalbeth N et al. 2005). Ces travaux nous ont motivé à rechercher l'impact de ce polymorphisme sur la survenue de la SA.

L'analyse de la distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme [*ACE*] *rs4340* (I/D) entre les groupes de cas et de témoins n'a montré aucune différence statistiquement significative pour le génotype mineur insertion/insertion (II) ainsi que les deux génotypes cumulés ID+II et ID+DD (respectivement : 12% vs. 22%, $p > 0,05$, 42% vs. 60 et 88% vs. 88%, $p > 0,05$) (**Tableau 19**). L'analyse de la distribution de la fréquence allélique de l'allèle I a révélé une différence significative limitée entre les cas et les contrôles (27% vs. 40%, $p = 0,05$, OR = 0,65 [0,42-0,99]) (**Tableau 19**). Cependant, ce résultat n'a pas survécu après les corrections de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Notre étude indique que le polymorphisme [*ACE*] *rs4340* (I/D) ne semble pas avoir un effet sur la survenue de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. Ce résultat doit être confirmé sur un échantillon plus large.

Des résultats controversés ont été observés d'une part, dans les deux seules études ayant exploré l'effet du polymorphisme I/D du gène *ACE* sur la survenue de la SA. En effet, l'étude d'*Inanir et al*, a montré que l'allèle D a été associé à la SA ($p < 0,001$) entre 122 patients et 140 contrôles Turques (*Inanir et al. 2012*). Cependant, l'étude d'*İnal et al*, a démontré une association significative entre le génotype II et la maladie ($p = 0,005$, OR > 1) entre 38 cas et 71 témoins Turques (*İnal E.E et al. 2016*). D'autre part, des études cas/témoins ont exploré l'impact de ce polymorphisme sur la survenue des maladies rhumatismales. L'étude d'*Alsaeid et al*, a démontré une fréquence très élevée du génotype II entre 82 patients atteints de l'arthrite juvénile idiopathique et 48 contrôles koweïtiens ($p < 0,003$) (*Alsaeid K et al, 2003*). Ensuite, *Bayram et al*, ont révélé que le génotype DD est significativement associé à l'arthrose et l'ostéo-arthrite dans la population turque ($P < 0,001$) (*Bayram et al, 2011*).

Tableau 19 : Distribution génotypique et allélique du polymorphisme [*ACE*] rs4340 (I/D) entre les patients SA et les contrôles de l'Ouest Algérien.

	Patients SA 83 (%)	Contrôle 110 (%)	Valeur P	OR (IC 95%)
Génotypes :				
II	10 (12)	22 (22)	NS.	-
ID	25 (30)	36 (36)		
DD	48 (58)	52 (52)		
Génotypes groupés				
ID+II	35 (42)	60(60)	NS.	-
ID+DD	73 (88)	88 (88)		
Allèles :				
I	45 (27)	80 (36)	0,05	0,65 [0,42-0,99]
D	121 (73)	140 (64)	1 ^a	1,53 [1,02-2,37]

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **NS.** : Non significative, **a** : allèle/ génotype de référence.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'impact des autres molécules intervenant dans le système rénine angiotensine. En effet, des études ont montré que l'Ang IV aurait des effets pro-inflammatoires en activant le facteur de transcription NF- κ B et en induisant l'expression des cytokines, l'IL-6 et le TNF α (Sexton *et al.* 1979 ; Sim M.K *et al.* 1994 ; Gammelgaard *et al.* 2006 ; Fyhrquist et Saijonmaa. 2008).

IV. Résultats de l'étude d'association des CNVs des gènes *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* avec la spondylarthrite ankylosante

Les tests d'interférence réalisés sur les sondes des gènes étudiés *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* vis-à-vis le gène de référence *RPP30*, nous ont montré une séparation correcte des clusters des événements positifs et négatifs correspondants à chaque sonde. Ceci indique qu'il n'y a pas eu d'interférence entre les sondes du gène *CCL3L1* comme le montre la **Figure 28** vis-à-vis le gène de référence *RPP30*.

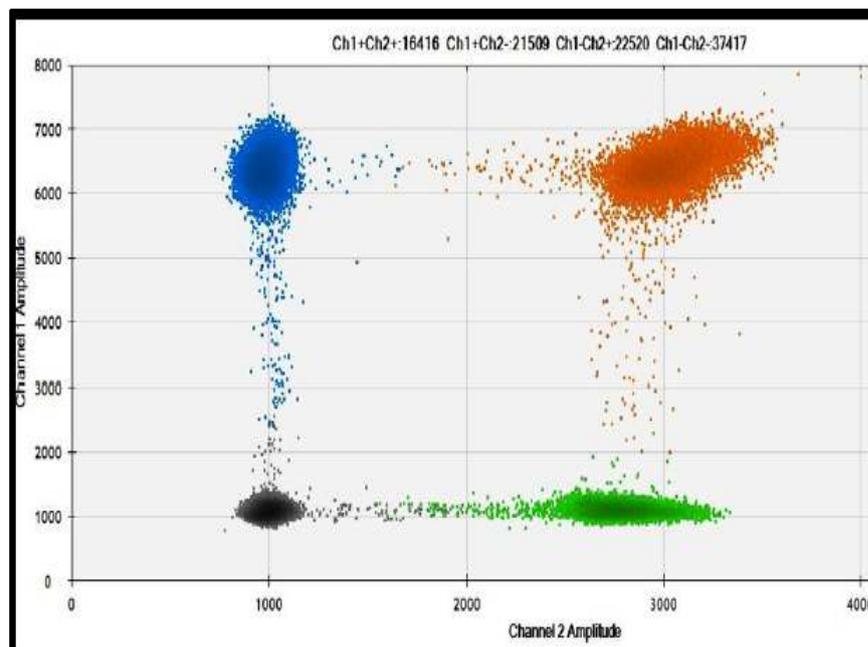


Figure 28 : Tests d'interférence des sondes des gènes *CCL3L1* vis à vis le gène de référence *RPP30*.

Les points bleus : les événements positifs pour les gènes cibles. Les points verts : les événements positifs pour le gène de référence (*RPP30*). Les points orange : les événements positifs pour les gènes cibles et le gène de référence (*RPP30*). Les points noirs : les événements négatifs.

Par ailleurs, après la quantification des CNVs des trois gènes explorés (*CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B*), les échantillons qui ne répondaient pas à la condition de validation : le nombre de copies doit avoir une variation supérieure à $\pm 0,25$ ou avec un indice de confiance $< 90\%$, n'ont pas été pris en compte pour cette étude.

IV.1. Impact des CNVs du gène *CCL3L1* sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante :

Les CNVs du premier gène investigué dans cette partie, le gène *CCL3L1*, ont été analysés au départ sur 81 patients et 119 témoins. Cependant, tous les échantillons avec un écart au nombre de copies entier supérieure à $\pm 0,25$ ont été exclues de l'analyse. Nous avons pu alors, quantifier les CNVs sur les ADNs de 75/81 patients atteints de la SA et de 99/119 témoins.

IV.1.1. Fréquence des CNVs du gène *CCL3L1* chez la population témoin :

La distribution des CNVs quantifiés chez les 99 contrôles Algériens a montré un nombre de copies (CN) de 1 à 5. Les fréquences des effectifs et le CN étaient comme suit : 5% / 0 copies, 24% / 1 copie, 47% / 2 copies, 14% / 3 copies, 8% / 4 copies et 1% / 5 copies (Figure 29).

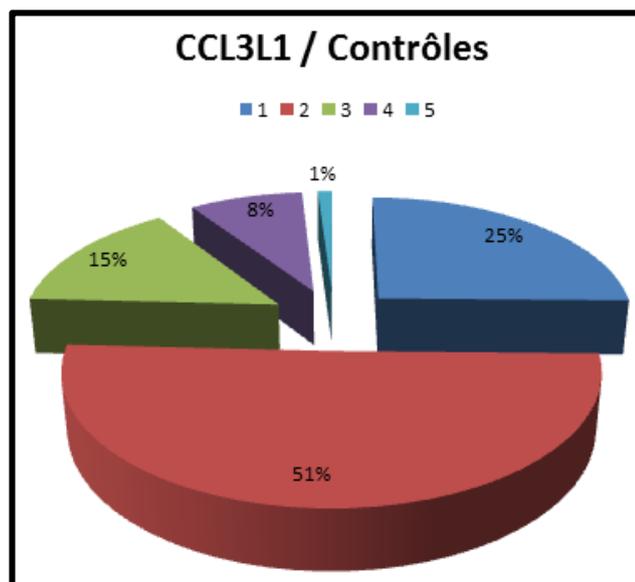


Figure 29 : Distribution des CNVs du gène *CCL3L1* chez les 99 contrôles de l'Ouest Algérien.

Parallèlement, des résultats concordants ont été retrouvés chez des groupes de contrôles issus de plusieurs populations. En effet, dans chaque groupe de contrôles, les CNVs du gène *CCL3L1* variaient de 1 à 5 copies (Tableau 20). La distribution des CNVs du gène *CCL3L1* chez les contrôles Algériens était plus fréquente lorsque le CN=2 copies. Ceci a été observé aussi dans les études réalisées chez les Tunisiens (Ben Kilani M.S. et al, 2016), Norvégiens (Nordang G.B et al, 2012) et Européens (Carpenter D. et al, 2012) (Tableau 20). La distribution des CNVs = 0, 1, 3 et 4 copies était également similaire entre les quatre populations. Cependant, les contrôles Tunisiens présentaient des fréquences plus élevées concernant les CNVs= 5 copies (Tableau 20).

Tableau 20 : Distribution des CNVs du gène *CCL3L1* chez les contrôles de différentes origines ethniques

CNV CCL3L1	Contrôles Algériens n=99 (%)	Contrôles Tunisiens n= 102 (%)	Contrôles Norvégiens n= 905 (%)	Contrôles Européens n= 252 (%)
0 copie	05 %	08,5 %	01,2 %	01,6 %
1 copie	24 %	20,2 %	17,6 %	19,4 %
2 copies	47 %	31,9 %	58,2 %	59,1 %
3 copies	14 %	24,5 %	19,0 %	17,9 %
4 copies	08 %	05,3 %	03,9 %	02,0 %
5 copies	01 %	09,6 %	00,1 %	00,0 %

n : nombre d'effectif, % : pourcentage. Les valeurs en **gras rouge** représentent les fréquences des CNVs de référence (CN= 2 copies).

IV.1.2. Impact des CNVs du gène *CCL3L1* sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

Le gène *CCL3L1* code pour des β -chimiokines (isoformes LD78 β) qui agissent comme des cytokines pro-inflammatoires en induisant l'activation d'une large variété de cellules immunitaires. Ces protéines attirent les lymphocytes et amplifient la présence des macrophages dans le site de l'inflammation (*Menten P. et al. 1999*). Ce gène est connu pour sa grande variabilité et présente des CNVs multi-alléliques décrites dans la littérature (*Gonzalez E. et al. 2005*).

L'analyse des résultats d'après le **tableau 21** montre une différence statistiquement significative de la distribution des CNVs du gène *CCL3L1* entre les patients SA et les contrôles concernant les CNVs de type « duplications » (> 2 copies) (41% vs 23%, $p= 0,05$, OR= 3,17 [1.47-6.82]). Après les corrections de Bonferroni, cette association n'a pas été retenue ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Cependant, aucune valeur significative n'a été retrouvée pour la distribution des CNVs de type « délétions » (CNVs < 2 copies) entre les cas et témoins ($p > 0,05$) (**Tableau 21**). Nos résultats montrent que les CNVs du gène *CCL3L1* ne sembleraient pas jouer un rôle dans la susceptibilité de développer la SA dans la population Algérienne.

A notre connaissance, cette étude est la première qui explore l'effet des CNVs du gène *CCL3L1* sur la susceptibilité à développer la SA. De ce fait, nous avons comparé nos résultats avec les études explorant des maladies auto-immunes ayant une physiopathologie proche de la SA. En effet, l'étude de *Carpenter et al*, n'a trouvé aucune association significative des CNVs du gène *CCL3L1* chez les sujets atteints de la maladie de Crohn, du psoriasis et de la PR (*Carpenter D. et al, 2012*). Le même résultat a été trouvé dans l'étude de *Nordang et al*, explorant des sujets atteints de PR Norvégiens (*Nordang G.B et al, 2012*) et l'étude de *Ben Kilani et al*, explorant des sujets atteints de PR dans les populations Française et Tunisienne (*Ben Kilani M.S. et al. 2016*). Ces études concordent avec les résultats observés dans la population Algérienne.

En revanche, des résultats discordants ont été observés, notamment, l'étude de *McKinney et al*, qui a montré une association significative entre les CNVs > 2 copies et la survenue de la PR dans une population de Nouvelle Zélande ($p=0,009$, OR= 1,34 [1,08–1,66]) (*McKinney C. et al, 2008*). Egalement, l'étude de *Mamtani et al*, a trouvé que les CNVs > 2 copies du gène *CCL3L1* jouent un rôle important dans le développement du lupus chez trois populations ; Colombienne de descendance Européenne (Espagne), Américaine (Caucasiens et Hispaniques) et Américaine d'origine Européenne (*Mamtani M. et al, 2008*).

Tableau 21 : Analyse de la distribution des CNVs du gène *CCL3L1* entre les cas et les témoins dans la population de l'Ouest Algérien

CNV <i>CCL3L1</i>	Patients SA n=75 (%)	Contrôles n=99 (%)	Valeur p	OR (IC)
< 2 copies	12 (16)	29 (29)	NS.	-
= 2 copies	32 (43)	47 (47)		1 ^a
> 2 copies	31 (41)	23 (23)	0,05	3,17 [1.47-6.82]

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **a** : allèle/ génotype de référence.

La disparité des résultats observée entre ces différentes études pourrait être due à la variété des pathologies testées, à l'hétérogénéité des populations étudiées ou aux différentes techniques de quantification. En effet, la quantification des CNVs par la qPCR, quantifie également le pseudogène de *CCL3L1*, ce qui induit une surestimation des valeurs de nombre de copies. Il a été démontré que ce pseudogène est présent dans environ 10% des individus ayant entre 1 et 2 copies du gène et dans 80% des échantillons ayant un nombre de copies entre 3 et 4 (*Walker S. et al. 2009*). Ainsi, si ce pseudogène est présent chez certains patients, le nombre de copies sera surestimé par rapport aux contrôles, ceci pourrait introduire un biais dans les analyses d'association (*Ben Kilani M.S. 2014*). Au regard des variabilités des protocoles techniques et ethniques, de nouvelles études d'association utilisant des protocoles spécifiques pour le gène *CCL3L1* (comme celui décrit dans cette étude) doivent être réalisées dans d'autres populations.

IV.2. Impact des CNVs du gène *FCGR3A* et *FCGR3B* sur la survenue de la spondylarthrite ankylosante :

La quantification des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* a été réalisée sur 181 sujets. Comme pour le gène *CCL3L1*, nous avons exclu les échantillons avec un écart au CN entier $> \pm 0,25$. Pour l'étude du gène *FCGR3A*, 11/81 patients et 6/100 contrôles ont été éliminés de l'analyse et 8/81 patients et 3/100 contrôles ont été exclus pour le gène *FCGR3B*.

VI.2.1. Fréquence des CNVs de *FCGR3A* et *FCGR3B* chez la population Témoin :

La distribution des CNVs quantifiés chez les 94 contrôles Algériens a montré un CN de 1 à 3 copies pour le gène *FCGR3A*. Les fréquences des effectifs étaient comme suit : 3% / 1 copie, 95% / 2 copies et 2% / 3 copies (**Figure 30**). De même, le gène *FCGR3B* était caractérisé par une distribution de 1 à 3 copies chez les 97 contrôles Algériens avec des fréquences d'effectifs/CN de 15% / 1 copie, 80% / 2 copies et 5% / 3 copies (**Figure 30**).

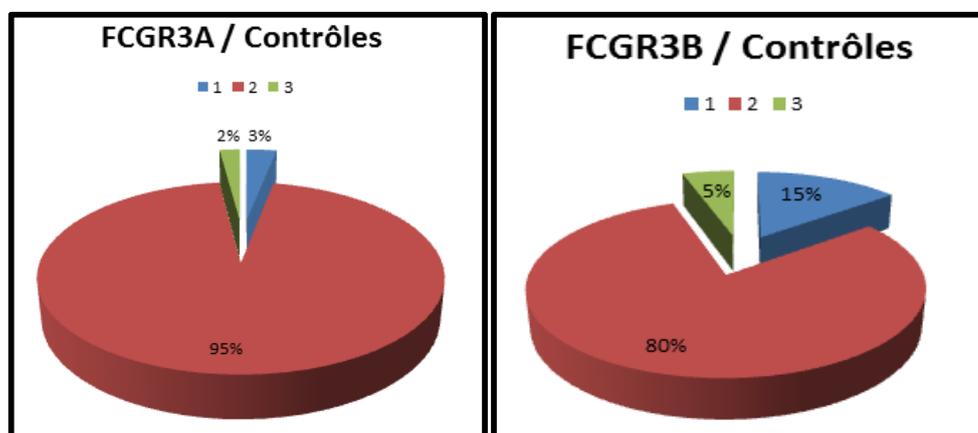


Figure 30 : Distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* chez les contrôles de l'Ouest Algérien.

La distribution des CNVs des deux gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* dans les différentes populations contrôles étudiées est indiquée sur **les tableaux 22 et 23**, respectivement. Les résultats de cette distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* semblent être similaires entre toutes les populations contrôles Africaine, Caucasienne et même chez les Taiwanais, Hindous et Chinois (*Zhou X-J et al, 2009 ; Chen JY. et al, 2014 ; Wang L. et al. 2016 ; Jianming W. et al, 2016*). Les résultats de la distribution indiquent que les CNVs= 2 copies des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* sont les plus fréquemment retrouvées. De plus, toutes les populations ne présentaient aucune variation de 0 copie de ces deux gènes. Cependant, les études investiguées sur la population Chinoise a montré la présence des CNVs= 4 copies (*Zhou X-J et al, 2009 ; Wang L. et al. 2016*).

Par ailleurs, l'étude de *Wang L. et al*, a montré une distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* différente de celles observées dans les autres populations notamment, l'étude de *Zhou X-J et al*, réalisée sur les contrôles Chinois d'ethnie Han. De ce fait, l'étude de *Wang L. et al*, a utilisé par le calcul de la médiane, les CNVs= 4 copies comme variation de référence spécifique de la population Chinoise étudiée (*Wang L. et al. 2016*).

Cette différence concernant la distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* chez les Chinois pourrait être expliquée par les différentes méthodes de quantification utilisées dans ces études ou par l'hétérogénéité des sous-populations Chinoises explorées.

VI.2.2. Impact des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* sur la susceptibilité de développer la spondylarthrite ankylosante :

L'étude de l'impact des CNVs sur la survenue de la SA a ensuite porté sur les CNVs localisées sur les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*. Ces deux gènes codent pour les deux récepteurs FcγRIIIa et FcγRIIIb, respectivement. Ces récepteurs sont impliqués dans la réponse inflammatoire et plus précisément dans la reconnaissance des IgGs (*Simmons & Seed. 1988 ; Croker & Kimberly. 2005*). Il a été démontré que des CNVs situés dans les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* pouvaient altérer l'efficacité à phagocyter les complexes immuns. De ce fait, il pourrait avoir des conséquences sur le développement de certaines maladies auto-immunes telles que la SA (*Salmon J. E. et al. 1992*). Le locus *FCGR* a été largement étudié, précisément, les CNVs localisées sur les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* qui ont été associés au développement de la spondylarthrite dans une seule étude (*Wang L. et al. 2016*). Nous avons donc voulu déterminer l'impact de ces CNVs sur la survenue de la SA en Algérie.

Tableau 22 : Distribution des CNVs du gène *FCGR3A* chez les contrôles de différentes origines ethniques

CNV <i>FCGR3A</i>	Contrôles Algériens n=94 (%)	Contrôles Africains n= 300 (%)	Contrôles Caucasiens n= 371 (%)	Contrôles Han Chinois n= 146 (%)	Contrôles Taiwanais n= 1420 (%)	Contrôles Chinois n= 399 (%)
0 copie	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %
1 copie	03 %	01 %	02 %	4,1%	1,34 %	00 %
2 copies	95 %	97 %	93 %	87,7%	90,14 %	0,3 %
3 copies	02 %	02 %	05 %	7,5%	8,52 %	08,8 %
4 copies	-	-	-	0,7 %	-	62,4 %
5 copies	-	-	-	-	-	23,8 %
6 copies	-	-	-	-	-	04,3 %
7 copies	-	-	-	-	-	0,5 %

n : nombre d'effectif, % : pourcentage. Les valeurs en **gras rouge** représentent les fréquences des CNVs de référence de chaque étude.

Tableau 23 : Distribution des CNVs du gène *FCGR3B* chez les contrôles de différentes origines ethniques

CNV <i>FCGR3B</i>	Contrôles Algériens n=97 (%)	Contrôles Africains n= 300 (%)	Contrôles Caucasiens n= 371 (%)	Contrôles Han Chinois n= 146 (%)	Contrôles Hindous n= 100 (%)	Contrôles Chinois n= 399 (%)
0 copie	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %	00 %
1 copie	15 %	14 %	07 %	19,2 %	21 %	00 %
2 copies	80 %	77 %	86 %	64,4 %	77 %	0,3 %
3 copies	05 %	09 %	07 %	11,0 %	02 %	11,5 %
4 copies	-	-	-	5,5 %	-	60,9 %
5 copies	-	-	-	-	-	22,6 %
6 copies	-	-	-	-	-	4,0 %
7 copies	-	-	-	-	-	0,8 %

n : nombre d'effectif, % : pourcentage. Les valeurs en **gras rouge** représentent les fréquences des CNVs de référence de chaque étude.

L'analyse de la distribution des fréquences des CNVs entre le groupe de SA et le groupe de contrôles a montré des différences statistiquement significatives pour le gène *FCGR3A*. En effet, nous avons montré une association significative concernant les délétions du gène *FCGR3A* (CNVs < 2 copies) entre les cas et les témoins (23% vs 3%, $p = 0,0001$, OR= 7,74 [2.32-25.74]). Cette différence statistique a survécu après la correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$) (**Tableau 24**). Cependant, aucune valeur significative n'a été trouvée pour les duplications (CNVs > 2 copies) au niveau de ce même gène (**Tableau 24**). Par ailleurs, la distribution des fréquences de CNVs entre les groupes de cas et de témoins n'a montré aucune différence statistiquement significative pour le gène *FCGR3B* ni pour les CNVs > 2 copies ($p > 0,05$) ni pour les CNVs < 2 copies ($p > 0,05$) (**Tableau 24**).

Notre étude suggère d'une part, que les délétions des CNVs du gène *FCGR3A* pourraient avoir un effet prédisposant à la SA, d'autre part, les CNVs du gène *FCGR3B* ne sembleraient avoir aucun effet sur la survenue de la SA dans la population Algérienne.

A l'heure actuelle, une seule étude réalisée dans la population Chinoise s'est intéressée à explorer l'effet des CNVs des deux gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* sur le développement de la SA. Les résultats indiquaient une association significative entre les CNVs ≤ 3 copies et la survenue de la SA concernant le gène *FCGR3A* (OR= 2.17 [1.41-3.34]) et les CNVs ≤ 3 du gène *FCGR3B* (OR= 1.87 [1.25-2.79]) (Wang L. et al, 2016). Les résultats de cette étude concordent avec les nôtres concernant les CNVs du gène *FCGR3A*.

Dans la littérature, les résultats d'association entre la délétion du gène *FCGR3A* divergent. Actuellement, une seule étude s'est intéressée à explorer l'effet des CNVs du gène *FCGR3A* sur le développement de la SA. Cette étude a montré une association significative entre les CNVs ≤ 3 copies et la survenue de la SA (OR= 2.17 [1.41-3.34]) dans la population Chinoise (Wang L. et al, 2016). Nos résultats discordent avec ceux trouvés par Thabe et al, qui n'ont rapporté aucune association significative entre les CNVs du gène *FCGR3A* et le développement de la PR dans une population Caucasienne (Thabe M.M. et al, 2009).

Parallèlement, l'étude des CNVs du gène *FCGR3B* a induit des résultats discordants concernant la délétion de ce gène. En effet, une association significative entre les CNVs ≤ 3 du gène *FCGR3B* et la survenue de la SA a été mise en évidence en Chine (OR= 1.87 [1.25-2.79]) (Wang L. et al, 2016). Une méta-analyse des études effectuées sur le développement de la PR a encore confirmé l'association de la délétion du gène *FCGR3B* chez les Caucasiens (McKinney C & Merriman TR. et al, 2012). Cependant, nos résultats concordent avec ceux

Tableau 24 : Analyse de la distribution des CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* entre les cas et les témoins dans la population de l'Ouest Algérien

CNV <i>FCGR3A</i>	Patients SA n=70 (%)	Contrôles n=94 (%)	P value	OR (IC)
< 2 copies	16 (23)	3 (3)	0,0001	7,74 [2.32-25.74]
= 2 copies	54 (77)	89 (95)		1 ^a
> 2 copies	00 (0)	02 (2)	NS.	-
CNV <i>FCGR3B</i>	Patients SA n=73 (%)	Contrôles n=97 (%)	P value	OR (IC)
< 2 copies	11 (15)	14 (14)	NS.	-
= 2 copies	57 (78)	78 (80)		1 ^a
> 2 copies	05 (07)	05 (06)	NS.	-

% : fréquence, **n** : nombre, **p** : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **a** : allèle/ génotype de référence.

retrouvés dans l'étude de *Ben Kilani et al*, qui n'a montré aucune association entre les CNVs du gène *FCGR3B* et la survenue de la PR en France (*Ben Kilani M.S. 2014*).

Des recherches antérieures ont démontré que les individus porteurs d'un nombre de copies réduit de *FCGR3* exprimaient significativement moins de protéines FcγRIII sur les cellules NK et les neutrophiles, que ceux porteurs d'un nombre élevé (*Chen JY. et al, 2014*). Les récepteurs Fc-gamma régulent diverses réponses immunitaires humorales et cellulaires, y compris la clairance des complexes immunitaires ; ainsi, l'expression de ceux portant les délétions de *FCGR3A* peut réguler ces réponses immunitaires pour augmenter le risque de la survenue de la SA par FcγRIIIA (*Wang L. et al. 2016*). De plus, il a été démontré que les FcγRIII fonctionnent comme récepteurs inhibiteurs de l'ostéoclastogenèse. Ceci a été confirmé par l'expression de FcγRIII qui diminue à mesure que l'ostéoclastogenèse progresse et qu'une formation efficace d'ostéoclastes a été observée dans les cellules 'précurseur' des ostéoclastes avec un faible taux de FcγRIII (*Negishi-Koga T et al. 2015*). Par conséquent, l'expression de FcγRIII est crucial pour le processus physiologique de l'ostéoclastogenèse, ce qui peut entraîner l'augmentation du risque de survenue de la SA chez les individus porteurs d'un nombre de copies réduit de *FCGR3*.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* étaient localisés dans un cluster de gènes homologues sujets à de nombreuses recombinaisons permettant ainsi l'apparition de CNVs multi-alléliques de différentes tailles, compliquant l'interprétation des résultats (*De Haas M. et al. 1995 ; Koene H.R. et al. 1996 ; Machado L.R. et al. 2012*). Cependant, la ddPCR a été rapportée comme étant la meilleure technique à utiliser pour la quantification absolue des CNVs. Cette technique a l'avantage de pouvoir séparer les copies en tandem grâce à la génération des *droplets*. Même dans le cas où la distance entre deux copies en tandem est petite, un protocole préalable de digestion enzymatique de l'ADN pourra être utilisé pour l'identification de ce type de copies.

L'équipe de *Ben Kilani M.S* a montré que lors de la génération de *droplets* par la ddPCR, le partitionnement fragmente l'ADN et par conséquent, lorsque la distance qui sépare deux copies en tandem est assez grande, comme c'est le cas pour *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* (~90kb), les duplicats sont séparés dans deux *droplets* différentes permettant ainsi une estimation correcte du nombre de copies sans l'étape de digestion (*Ben Kilani M.S. 2014*).

V. Stratifications des résultats selon le statut HLA-B27

V.1. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T) et [PRKCQ] rs4750316 (G>C) sur la survenue de la SA selon le statut HLA-B27 :

Nous avons étudié la distribution des quatre polymorphismes précédemment étudiés [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T) et [PRKCQ] rs4750316 (G>C) par rapport au statut HLA-B27 entre le groupe des cas et des témoins. Les résultats sont présentés sur le **tableau 25**.

Parmi ces polymorphismes, aucune association significative n'a été déterminée concernant l'impact des trois SNPs [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T) et [PRKCQ] rs4750316 (G>C) sur la survenue de la SA selon la présence/absence de HLA-B27 ($p > 0,05$) (**Tableau 25**). Cependant, la distribution des fréquences alléliques du polymorphisme [CTLA4] rs3087243 (A>G) a montré une différence significative selon le statut HLA-B27 et elle a tout juste survécu après correction de Bonferroni (68% vs. 51%, $p = 0,006$, OR= 2.10 [1.23-3.59]) (**Tableau 25**). Il semblerait que l'allèle G du SNP [CTLA4] rs3087243 est associé à la SA exclusivement dans le groupe HLA-B27 négatif (-) (**Tableau 25**). Cette partie de résultats a fait l'objet de la publication scientifique (**Annexe 8**).

Nous rappelons que dans notre étude, 52% des patients atteints de la SA sont HLA-B27 positif (+), alors que presque 90% des patients spondylarthriques caucasiens portent cet antigène (Reveille J.D. et al, 2001). Ceci mène à penser que d'autres gènes tels que le CTLA4 pourraient jouer un rôle indépendant de HLA-B27 dans le déclenchement de cette maladie dans la population de l'Ouest Algérien.

Il a été rapporté que certains SNPs de plusieurs gènes candidats à la SA étaient associés dans le groupe de HLA-B27 (-) (McGarry F et al. 1999 ; Talpin A. 2013 ; Akkoç N et al. 2017 ; Qian Y et al. 2017). Ces travaux ont suggéré que ces polymorphismes ont un effet indépendant de l'antigène HLA-B27 dans la contribution génétique de la SA. Cependant, ces travaux discordent avec les résultats de plusieurs études, qui ont montré que la molécule CTLA-4 agit plutôt en synergie avec les molécules HLA classe II chez les patients atteints de plusieurs maladies auto-immunes (Agarwal K et al. 2000 ; Einarsdottir E et al, 2003). Il a été récemment montré aussi, que la forte association du gène ERAP1 à la SA est retrouvée seulement chez les patients HLA-B27 (+) (Popa O.M et al. 2016 ; Akkoç N et al. 2017). Ainsi, des études antérieures pourraient confirmer si le polymorphisme [CTLA4] rs3087243 a un effet indépendant vis-à-vis la spécificité HLA-B27 dans la population Algérienne.

Tableau 25 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les quatre polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C).

	Présence HLA-B27**		Absence HLA-B27*		Test statistique	
	Cas 42 (%)	Témoins 07 (%)	Cas 39 (%)	Témoins 116 (%)	Valeur <i>P</i>	OR (IC 95%)
[<i>CTLA4</i>] rs3087243						
A :	32 (38)	06 (43)	25 (32)	115 (49)	0,006**	1 ^a 2.10 [1.23-3.59]*
G :	52 (62)	08 (57)	53 (68)	117 (51)		
[<i>REL</i>] rs13031237						
G :	61 (73)	08 (57)	49 (63)	150 (65)	NS	-
T :	23 (27)	06 (43)	29 (37)	082 (35)		
[<i>CD40</i>] rs4810485						
G :	57 (68)	12 (86)	62 (79)	179 (77)	NS	-
T :	27 (32)	02 (14)	16 (21)	053 (23)		
[<i>PRKCQ</i>] rs4750316						
C :	20 (24)	05 (36)	21 (27)	074 (32)	NS	-
G :	64 (76)	09 (64)	57 (73)	158 (68)		

% : fréquence, n : nombre, p : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), **OR** : odds ratios, **IC** : intervalle de confiance, **a** : allèle/ génotype de référence.

V.2. Impact des CNVs des gènes *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* sur la survenue de la SA selon le statut HLA-B27

Nous avons comparé les trois variations de nombre de copies de gènes précédemment étudiés (*CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B*) selon la présence/absence de l'antigène HLA-B27 entre le groupe des cas et des témoins. Les résultats sont présentés sur **les tableaux 26 et 27** selon les gènes étudiés *CCL3L1* et *FCGR3*, respectivement.

Concernant le gène *CCL3L1*, nous avons observé une différence statistiquement significative concernant les CNVs > 2 copies uniquement en présence de l'antigène HLA-B27 « HLA-B27 (+) » (**Tableau 26**). En revanche, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative concernant les CNVs < 2 copies selon le statut HLA-B27 (**Tableau 26**). De ce fait, nous pouvons conclure que les duplications des CNVs du gène *CCL3L1* ont un effet additif par rapport à la forte relation génétique entre la SA et la spécificité *HLA-B27* dans la population de l'Ouest Algérien.

Concernant les deux gènes *FCGR3*, nous avons observé des corrélations significatives concernant le gène *FCGR3A* seulement. En effet, lorsque le nombre de copies du gène *FCGR3A* était < 2 copies, nous avons trouvé une différence significative dans le groupe des patients HLA-B27 (-) cette fois-ci ($p = 0,002$, $OR = 7,98$ (1,74-36,55) (**Tableau 27**). Ce résultat a été retenu après la correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Cependant, nous n'avons pas trouvé des différences significatives concernant la distribution des CNVs > 2 copies du gène *FCGR3A* selon le statut HLA-B27 (**Tableau 27**).

Ces résultats indiquent que les délétions des CNVs du gène *FCGR3A* ont un effet indépendant de la spécificité *HLA-B27* dans la susceptibilité de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. Ceci renforce les travaux qui ont montré que l'expression des récepteurs FcγRIII est crucial pour le processus physiologique de l'ostéoclastogenèse, ce qui peut amplifier le risque de développement de la SA chez les individus porteurs d'un nombre de copies réduit de *FCGR3*.

Par ailleurs, aucun résultat significatif n'a été observé pour la distribution des CNVs du gène *FCGR3B* entre les cas et les témoins. Ceci pourrait être due à l'absence d'association des CNVs de ce gène à la SA, à la taille réduite de notre effectif ou bien à une particularité ethnique spécifique de la population Algérienne. Il serait intéressant d'augmenter l'effectif de notre échantillon d'étude afin de confirmer ou affirmer ces résultats.

Tableau 26 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les CNVs du gène *CCL3L1*.

<i>CCL3L1</i> / <i>HLA-B27</i>	Sujets	CNVs <2 copies	CNVs =2 copies	CNVs >2 copies
Absence* HLA-B27	Patients n=34 (%)	6 (18)	15 (44)	1 3 (38)
	Contrôles n=89 (%)	28 (32)	41 (46)	20 (22)
Présence** HLA-B27	Patients n=41 (%)	05 (15)	13 (41)	18 (44)
	Contrôles n=10 (%)	02 (20)	08 (80)	0 (00)
Tests Statistiques	Valeur p	NS	1 ^a	0,003**
	OR (IC)	-	-	23,3 [1,23-43,9]

% : fréquence, n : nombre, p : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), OR : odds ratios, IC : intervalle de confiance, a : allèle/ génotype de référence.

Tableau 27 : Distribution de l'antigène HLA-B27 entre les patients SA et les contrôles selon les CNVs des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*, respectivement.

<i>FCGR3A</i> / <i>HLA-B27</i>	Sujets	CNVs <2 copies	CNVs =2 copies	CNVs >2 copies
Absence* HLA-B27	Patients n=33 (%)	6 (18)	27 (82)	00 (00)
	Contrôles n=87 (%)	02 (02)	84 (97)	01 (01)
Présence** HLA-B27	Patients n=37 (%)	10 (27)	27 (73)	00 (00)
	Contrôles n=05 (%)	00 (00)	04 (80)	01 (20)
Tests Statistiques	Valeur p	0,002*	1 ^a	0,02
	OR (IC)	7,98 (1,74-36,55)	-	3,43 (0,17-69,51)
<i>FCGR3B</i> / <i>HLA-B27</i>	Sujets	CNVs <2 copies	CNVs =2 copies	CNVs >2 copies
Absence* HLA-B27	Patients n=34 (%)	07 (20)	26 (76)	01 (04)
	Contrôles n=92 (%)	14 (15)	73 (80)	05 (05)
Présence** HLA-B27	Patients n=39 (%)	04 (10)	31 (80)	04 (10)
	Contrôles n=05 (%)	00 (00)	05 (100)	00 (00)
Tests Statistiques	Valeur p	NS	1 ^a	NS
	OR (CI)	-	-	-

% : fréquence, n : nombre, p : valeur de signification ($p \leq 0,05$), Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (9 variations génétiques, $\alpha = 0,006$), OR : odds ratios, IC : intervalle de confiance, a : allèle/ génotype de référence.

VI. Stratifications des résultats selon le sexe et l'âge

VI.1. Impact des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) et [*ACE*] rs4340 (I/D) sur la survenue de la SA selon les facteurs sexe et âge :

Nous avons comparé la distribution des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) et [*ACE*] rs4340 (I/D) entre le groupe des cas et témoins selon les facteurs sexe et âge. Les résultats significatifs sont présentés sur le **tableau 28**.

La stratification selon le facteur sexe n'a déterminé aucune association significative concernant la distribution génotypique et allélique des polymorphismes [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) et [*ACE*] rs4340 (I/D) sur la survenue de la SA (résultats non présentés). En revanche, l'analyse de la distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 (A>G) entre le groupe de SA et de contrôles a montré des différences statistiquement significatives dans le groupe des femmes. En effet, nous avons trouvé que la fréquence du génotype cumulé AG+GG était statistiquement plus élevée chez les cas SA de sexe féminin que chez les témoins de sexe féminin (93% vs. 71%, $p = 0,004$, OR= 4,85 [1,46-16,13]). Cette association a survécu après correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$) (**Tableau 28**). De plus, cette différence de distribution génotypique a été confirmée par une différence statistiquement significative de la distribution de l'allèle G du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 entre les cas et témoins féminins même après correction de Bonferroni (70% vs. 48%, $p = 0,001$, OR= 2.42 [1,39-4,21]) (**Tableau 28**). Cependant, aucune différence significative des distributions des fréquences génotypiques ou alléliques n'a été observée entre le groupe des cas et témoins masculins (86% vs. 70%, $p > 0,05$ et 60% vs. 50%, $p > 0,05$, respectivement) (**Tableau 28**).

De ce fait, ces résultats indiquent que l'allèle G du SNP [*CTLA4*] rs3087243 pourrait influencer le développement de la maladie chez les patientes spondylarthriques dans la population de l'Ouest Algérien. Il semblerait que le facteur sexe pourrait accélérer le risque de survenue de la SA. Ces résultats ont fait partie de la publication scientifique (**Annexe 8**).

Par ailleurs, la distribution des fréquences génotypique et allélique des polymorphismes [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) après stratification selon le paramètre âge, n'a montré aucune différence statistiquement significative (résultats non présentés). Par contre, l'analyse de la distribution des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G) et

Tableau 28 : Distribution des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (*A>G*) et [*ACE*] rs4340 (*I/D*) entre les cas et témoins selon le genre et l'âge.

Stratifications	Selon le facteur sexe				Selon le facteur âge			
	Femmes		Hommes		≤ 30 ans		> 30 ans	
	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles
CTLA4 CT60								
AA	03 (07)	21 (29)	05 (14)	15 (30)	04 (17)	24 (28)	04 (07)	12 (32,5)
AG	21 (48)	34 (46)	20 (54)	21 (40)	11 (46)	40 (47)	30 (53)	15 (40,5)
GG	20 (45)	18 (25)	12 (32)	15 (30)	09 (37)	22 (25)	23 (40)	10 (27)
AG+GG*	41 (93)	52 (71)	32 (86)	36 (70)	20 (73)	62 (78)	53 (93)	25 (67,5)
A	27 (30)	77 (52)	30 (40)	51 (50)	19 (40)	89 (51)	38 (33)	39 (53)
G*	61 (70)	71 (48)	44 (60)	51 (50)	29 (60)	85 (49)	76 (67)	35 (47)
P value	0,004*, 4,85 [1,46-16,13]		NS		NS		0,001*, 5,82 [1,79-18,89]	
OR (95%)	0,001**, 2,42 [1,39-4,21]		NS		NS		0,008**, 2,21 [1,22-4,01]	
ACE I/D								
DD	27 (63)	30 (54)	19 (50)	22 (41)	20 (56)	10 (37)	26 (58)	42 (51)
ID	12 (28)	18 (32)	13 (34)	18 (33)	09 (25)	04 (15)	16 (36)	32 (39)
II*	04 (09)	08 (14)	06 (16)	14 (26)	07 (19)	13 (48)	03 (07)	09 (11)
ID+II	16 (37)	26 (46)	19 (50)	32 (59)	16 (44)	17 (63)	19 (42)	41 (49)
D	60 (81)	69 (73)	45 (71)	53 (59)	45 (71)	22 (44)	60 (87)	100 (75)
I*	14 (19)	25 (27)	18 (29)	37 (41)	18 (29)	28 (56)	09 (13)	34 (25)
P value	NS		NS		0,05*, 0,28 [0,10-0,91]		NS	
OR (95%)	NS		NS		0,003**, 0,32 [0,15-0,69]		NS	

* Ou ** : mentionne le génotype ou l'allèle concernés par les tests statistiques significatifs, p : valeur seuil $\leq 0,05$, OR : Odd ratio avec un intervalle de confiance à 95%. Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni ($p \leq 0,006$).

[ACE] rs4340 (I/D) entre le groupe de cas et de témoins a montré des différences statistiquement significatives dans le groupe des sujets > 30 ans.

Concernant le SNP [CTLA4] rs3087243, nous avons observé une différence significative de la distribution du génotype cumulé AG+GG entre les cas et témoins avec un âge > 30ans (93% vs. 67,5%, $p = 0,001$, OR=5,82 [1,79-18,89]). Cette association a survécu après correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$) (**Tableau 28**). Ainsi, la différence de distribution génotypique a été confirmée par une différence statistiquement significative de l'allèle G entre les cas et témoins > 30 ans (67% vs. 47%, $p = 0,008$, OR= 2,21 [1,22-4,01]) (**Tableau 28**). Cependant, la distribution des fréquences allélique n'a pas été retenue après correction de Bonferroni. Par ailleurs, aucune différence significative des distributions génotypiques ou alléliques n'a été observée dans le groupe des patients dans l'âge est ≤ 30 ans ($p > 0,05$) (**Tableau 28**).

Ces observations montrent que le polymorphisme [CTLA4] rs3087243 aurait un impact sur le développement de la SA chez les sujets âgés de plus de 30 ans dans la population de l'Ouest Algérien. Il semblerait que le facteur âge pourrait augmenter le risque de la survenue de la SA.

Contrairement aux résultats obtenus pour le SNP [CTLA4] rs3087243, la distribution des fréquences alléliques du polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) a montré des différences significatives entre le groupe de cas et témoins ayant un âge ≤ 30 ans (29% vs. 46%, $p = 0,003$, OR= 0,32 [0,15-0,69]) (**Tableau 28**). Cette différence statistique observée pour l'allèle insertion (I) a pu persister après les corrections de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). D'autre part, nous n'avons trouvé aucune différence significative de la distribution des fréquences alléliques dans le groupe de sujets ayant un âge >30 ans.

Il semblerait que l'allèle I de ce polymorphisme protégerait contre le développement de la SA chez les sujets avec un âge ≤ 30 ans dans la population de l'Ouest Algérien (**Tableau 28**).

Les résultats de stratification concernant les polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G) et [ACE] rs4340 (I/D) selon les paramètres sexe et âge indiquent qu'il serait possible que des facteurs endocriniens pourrait influencer le déclenchement de la SA dans notre population d'étude. En effet, plusieurs études ont montré que le dérèglement des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) pourrait perturber le système immunitaire au cours des maladies auto immunes (Cutolo et al. 2004).

VI.2. Impact des CNVs des gènes *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* sur la survenue de la SA selon les facteurs sexe et âge :

Concernant la stratification selon les paramètres sexe et âge, nous avons comparé la distribution des trois variations de nombre de copies de gènes *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* entre le groupe des cas et des témoins (**Tableau 29**).

L'analyse des distributions des CNVs < 2 copies et CNVs > 2 copies a été réalisée par rapport au nombre de copies de référence (CN=2) entre le groupe de cas et des témoins. Les analyses statistiques n'ont montré aucune différence significative concernant le gène *FCGR3B* (résultats non présentés). En revanche, plusieurs résultats significatifs ont été observés pour les deux autres gènes étudiés (*CCL3L1* et *FCGR3A*).

Les résultats de stratifications selon les deux paramètres sexe et âge concernant les CNVs du gène *CCL3L1* ont montré des distributions significatives pour les CNVs > 2 copies entre les cas et témoins. En effet, nous avons observé une association à la SA lorsque les CNVs étaient > 2 copies dans le groupe masculin (47% vs. 17%, $p= 0,01$, OR= 3,82 [1,26-11,58]) et entre les cas et témoins avec un âge > 30ans (39% vs. 12%, $p= 0,04$, OR= 3,69 [1,00-14,15]) (**Tableau 29**). Ces résultats n'ont pas atteint la signification statistique après application de la correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Cependant, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative concernant les CNVs < 2 copies selon ces deux paramètres, respectivement (**Tableau 29**).

Par ailleurs, des distributions significatives des CNVs < 2 copies du gène *FCGR3A* ont été observées entre les cas et témoins après stratification selon le sexe et l'âge. En effet, nous avons retrouvé une différence statistiquement significative lorsque les CNVs du gène *FCGR3A* < 2 copies entre le groupe de patients féminins (21% vs. 02%, $p= 0,002$, OR= 9,93 [1,65-59,64]). Le même résultat a été constaté entre le groupe de patients et de témoins âgés de plus de 30 ans (24% vs. 02%, $p= 0,0003$, OR=13,66 [2,26-82,36]) (**Tableau 29**). Toutes ces associations ont survécu après la correction de Bonferroni ($p_{\text{seuil}} \leq 0,006$). Par contre, aucune différence significative entre ces groupes n'a été identifiée concernant les CNVs > 2 copies (**Tableau 29**).

Nous pouvons conclure que les délétions du gène *FCGR3A* pourrait influencer la survenue de la SA chez les patientes atteintes de la SA et chez les sujets Algériens ayant plus que 30 ans (**Tableau 29**). Ces résultats viennent confirmer encore une fois que le facteur sexe et le facteur âge semblerait multiplier le risque de susceptibilité de développer la SA.

Tableau 29 : Distribution des fréquences des CNVs *CCL3L1* et *FCGR3A* entre les cas et témoins selon le genre et l'âge.

Stratifications	Selon le facteur sexe				Selon le facteur âge			
	Femmes		Hommes		≤ 30 ans		> 30 ans	
	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles	Patients	Contrôles
CCL3L1								
< 2 copies*	05 (13)	15 (26)	07 (19)	14 (34)	05 (15)	21 (28)	07 (17)	08 (32)
= 2 copies ^{&}	20 (51)	27 (47)	12 (33)	20 (49)	14 (41)	33 (45)	18 (44)	14 (56)
> 2 copies**	14 (36)	16 (28)	17 (47)	07 (17)	15 (44)	20 (27)	16 (39)	03 (12)
P value	NS		0,01**		NS		0,04**	
OR (95%)			3,82 [1,26-11,58]				3,69 [1,00-14,15]	
FCGR3A								
< 2 copies*	08 (21)	01 (02)	08 (24)	02 (05)	08 (24)	01 (02)	08 (21)	02 (06)
= 2 copies ^{&}	30 (79)	53 (96)	25 (76)	37 (93)	25 (76)	61 (95)	30 (79)	29 (94)
> 2 copies**	00 (00)	01 (02)	00 (00)	01 (03)	00 (00)	02 (03)	00 (00)	00 (00)
P value	0,002*		0,02*		0,0003*		NS	
OR (95%)	9,93 [1,65-59,64]		5,00 [1,11-22,34]		13,66 [2,26-82,36]			

* Ou ** : mentionne le génotype ou l'allèle concernés par les tests statistiques significatifs, p : valeur seuil ≤ 0,05, OR : Odd Ratio avec un intervalle de confiance à 95%. Les valeurs indiquées **en gras** sont significatives après les corrections de Bonferroni (p ≤ 0,006).

VII. Stratifications des résultats selon les facteurs d'activité

VII.1. Impact des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) sur la survenue de la SA selon les facteurs d'activité et de sévérité :

Nous avons étudié la distribution des polymorphismes précédemment étudiés [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) chez les patients SA par rapport aux paramètres suivants : Les indices BASDAI et BASFI (< 4 ou \geq 4), le taux de la CRP (positive ou négative) et la forme de la maladie (axiale, périphérique ou mixte) (résultats non présentés).

Après l'analyse de la distribution des fréquences génotypiques et alléliques de ces polymorphismes chez les sujets atteints de la SA, nous n'avons pas obtenus des résultats significatifs ni pour les paramètres d'activité ($p > 0,05$) ni pour les paramètres de sévérité de la SA ($p > 0,05$). D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la distribution des polymorphismes [CTLA4] rs3087243 (A>G), [REL] rs13031237 (G>T), [CD40] rs4810485 (G>T), [PRKCQ] rs4750316 (G>C) et [ACE] rs4340 (I/D) ne sembleraient pas avoir un impact sur l'activité de la SA (BASDAI et CRP) et la sévérité de la maladie (BASFI et Forme) dans la population de l'Ouest Algérien. Afin de valider nos résultats, nous devrions appliquer des études avec un effectif plus large.

VII.2. Impact des CNVs de gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B sur la survenue de la SA selon les facteurs d'activité et de sévérité :

De même que pour les polymorphismes des gènes précédemment étudiés (CTLA4, REL, CD40, PRKCQ et ACE), la distribution des CNVs des gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B a été établi chez les patients SA par rapport aux mêmes paramètres biologique et cliniques ; les indices BASDAI (< 4 ou \geq 4) et BASFI (< 4 ou \geq 4), le taux de la CRP (positive ou négative) et la forme de la maladie (axiale, périphérique ou mixte) (résultats non présentés).

Encore une fois, l'analyse des CNVs des gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B chez les patients SA n'a pas pu mettre en évidence des associations significatives selon les paramètres cliniques concernant les CNVs explorés ($p > 0,05$). De ce fait, Nous pouvons conclure, que les CNVs des gènes CCL3L1, FCGR3A et FCGR3B ne sembleraient pas influencer les facteurs de sévérité (BASFI et Forme) et l'activité (BASDAI et CRP) de la SA dans la population Algérienne. Comme ces différents tests de stratifications n'ont pas été réalisés auparavant, des études ultérieures devraient être effectuées.

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Malgré la découverte de plus d'une vingtaine de locus de susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante (SA), le déterminisme génétique de cette maladie reste encore largement inconnu. En effet, le *HLA-B27* semble être le facteur génétique majeur mais il n'est pas indispensable à la survenue de la maladie. De plus, l'ensemble des facteurs identifiés à ce jour n'expliquent que moins d'un quart de l'héritabilité totale de la SA. Nous ignorons encore combien d'autres facteurs génétiques sont en cause et dans quelle mesure ils interagissent entre eux et avec l'environnement.

Durant ces années de thèse, nous avons cherché à identifier de nouveaux facteurs génétiques de susceptibilité à la SA par des études d'association gènes-candidats. Nous avons tout d'abord, vérifié l'association entre l'antigène HLA-B27 et la maladie dans la population de l'Ouest Algérien. Ensuite, nous avons recherché l'association entre les cinq polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T), [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C), [*ACE*] rs4340 (I/D) et la SA. Nous avons également, étudié l'impact des variations de nombre de copies (CNVs) au niveau des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *CCL3L1* sur la survenue de cette maladie.

Le premier axe de cette thèse, nous a permis d'établir la fréquence de HLA-B27 (+) chez les contrôles et les patients spondylarthriques Algériens. Cette fréquence a été trouvée similaire à celles observée dans les études menées sur des sujets Nord-Africains, notamment, les Maghrébins. Nous avons pu confirmer l'association entre la spécificité *HLA-B27* et la survenue de la SA dans la population de l'Ouest algérien. Ces résultats renforcent le rôle que joue l'antigène HLA-B27 et attestent que c'est le facteur génétique majeur dans la susceptibilité de développer la SA en Algérie.

Dans le deuxième axe, nous avons mis en évidence un SNP significativement associé au développement de la SA parmi les cinq polymorphismes explorés dans cette partie. Il s'agit du polymorphisme [*CTLA4*] rs3087243 (A>G). Après stratification selon l'âge et le sexe, l'association de ce polymorphisme à la SA a été retrouvée dans le groupe de femmes et le groupe de sujets ayant un âge > 30 ans. Les tests de stratification ont permis de conclure que les facteurs sexe et âge pourraient influencer le déterminisme génétique de cette maladie dans la population de l'Ouest Algérien.

Comme les conséquences fonctionnelles de la majorité des polymorphismes de susceptibilité à la SA sont encore largement méconnues. Nous avons recherché les associations des variants structuraux du génome tels que les CNVs avec cette maladie. L'étude de quantification des CNVs au niveau des gènes *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B* a montré que les délétions du gène *FCGR3A* (CNVs < 2 copies) semblent avoir un impact sur la survenue de la SA dans la population de l'Ouest Algérien. Les tests de stratifications selon l'âge et le sexe ont montré que seules les délétions du gène *FCGR3A* sembleraient influencer la survenue de la SA chez les patientes Algériennes et chez les sujets ayant plus que 30 ans. Ces résultats ont confirmé encore une fois le rôle que jouent le facteur sexe et le facteur âge. Ces facteurs semblent augmenter le risque de susceptibilité de la SA.

Nous relevons dans cette étude que la technique employée dans ce travail, la ddPCR, présente une faiblesse car elle ne permet pas l'identification des copies des gènes cibles sur chaque chromosome. En effet, pour des CNVs multi-alléliques d'un gène donné, il peut y avoir plusieurs configurations possibles de génotypes. Par exemple, les échantillons ayant 4 copies peuvent avoir un génotype homozygote 2/2 ou hétérozygote 3/1 ou 4/0. Ceci souligne la limite de la ddPCR pour l'identification des génotypes et nous indique l'avantage des analyses familiales pour la caractérisation des CNVs multi-alléliques de gènes candidats. Par conséquent, afin de pouvoir constituer les génotypes des CNVs caractérisées dans ce travail de thèse, nous devrions avoir recours aux études familiales.

Par ailleurs, nous avons stratifié tous les marqueurs génétiques explorés dans le deuxième axe de ce travail par rapport à la présence/absence de l'antigène HLA-B27. Cette stratification nous a donné la possibilité de distinguer les effets des gènes étudiés sur la susceptibilité à la SA indépendamment de l'influence de *HLA-B27*. Les résultats suggèrent que le SNP [*CTLA4*] rs3087243 (*A>G*) et les CNVs < 2 copies du gène *FCGR3A* auraient des effets indépendants de l'antigène HLA-B27 dans la susceptibilité à la SA. Cependant, les CNVs > 2 copies du gène *CCL3L1* auraient des effets plutôt additifs dans la population de l'Ouest algérien.

Les résultats que nous avons obtenus dans ce travail de thèse, concordent avec les quelques études publiées dans les populations proches ou voisines de la population Algérienne. Cependant, afin d'atteindre une forte puissance statistique, nos travaux de recherches futures doivent s'orienter vers la confirmation de ces résultats sur des échantillons plus élargis et la réplique des associations génétiques identifiées.

Les études d'association génétique sont particulièrement intéressantes lorsqu'il existe plusieurs loci impliqués. Il serait donc intéressant de réaliser des études portant sur l'implication des autres polymorphismes de gènes candidats sélectionnés dans ce travail, notamment, les polymorphismes fonctionnels du gène *CTLA4*. Ces perspectives nous permettront d'identifier les haplotypes associés à la SA et spécifiques à la population Algérienne.

Compte-tenu de l'absence d'association génétique des SNPs investigués dans ce travail, il serait important de poursuivre cette étude par la confirmation des SNPs de gènes-candidats déjà associés à la SA comme (*ERAPI1*, *IL12B*, *IL23R*, *IL17...*) ou par la recherche d'autres variants structuraux comme les délétions, les duplications, les inversions. De plus, une étude familiale serait préconisée afin d'établir les modèles de transmissions des CNVs étudiés.

Contrairement à ce que l'on pouvait espérer, les découvertes de nouveaux gènes impliqués dans les maladies complexes comme la SA n'ont pas encore apporté beaucoup de solutions, ni pour leur diagnostic, ni pour leur thérapeutique. Les principales avancées semblent plutôt concerner la compréhension de la physiopathologie de ces maladies. Il est donc important de garder à l'esprit, que l'accumulation d'associations positives mais sans réel sens physiopathologique est due au fait que la partie « fonctionnelle » du travail de recherche est considérablement plus longue que celle de l'identification. Une illustration de ce problème concernant la SA est la relation qui existe entre l'allèle *HLA-B27* et la maladie dont le rôle pathogénique de cette molécule n'a toujours pas été élucidé. Le défi de demain consistera alors à transcrire les avancées génétiques en avancées thérapeutiques, ce qui nécessite une compréhension fine des mécanismes reliant la variabilité génétique à la pathogénie.

En raison de la fréquence de plus en plus élevée de la SA, des retombées importantes sur le plan de la santé publique en découleront. Ainsi, la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la SA permettrait d'améliorer le diagnostic, de définir plus facilement un pronostic et de développer des traitements plus appropriés et plus efficaces par des études pharmacogénétiques.

ANNEXES

Annexe 1

Les indices d'activité BASDAI et de sévérité BASFI :

1- L'indice BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*) :

C'est l'indice habituellement employé pour évaluer l'activité clinique de la maladie. Il est calculé à partir des réponses données par le patient à six questions portant sur sa fatigue, ses manifestations axiales et périphériques ainsi que sa raideur matinale. Il fournit une appréciation globale en calculant la moyenne des réponses données sur une échelle visuelle analogique (deux questions étant dédiées à l'appréciation de la raideur matinale, mais regroupées en une valeur avant le calcul final).

Il s'agit là d'une mesure strictement subjective, entièrement basée sur les déclarations du patient faire appel à l'appréciation du médecin. Cependant, c'est encore l'indice qui est utilisé dans la plupart des essais cliniques, il est utile à déterminer certaines thérapeutiques comme les biothérapies (*Abdelmalek S. 2015*).

La valeur de 4/10 est celle retenue pour considérer une SA comme active cliniquement, et justifiant en particulier l'introduction d'un agent anti-TNF (si les traitements de première intention se sont avérés insuffisants). Une diminution d'au moins 50 % ou de deux points est requise après trois mois de traitement pour conclure à un bénéfice thérapeutique significatif (*Abdelmalek S. 2015*).

Le patient y répond en marquant d'un trait ses réponses à chacune des questions et en se référant aux dernières 48h ou à la dernière semaine. Le score final est calculé en faisant la moyenne des réponses 5 et 6 additionnée des réponses aux quatre premières questions. Il varie de 0 à 10 ou de 0 à 100 (*Toussirot E et al. 2009a ; Lepka F.C. 2010*).

NOM :
DATE :

Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

Intérêt

L'indice de BASDAI est un indice composite évaluant plusieurs domaines. Il est simple d'utilisation.

Mode de calcul

1° Calcul de la moyenne des réponses n°5 et n°6

2° Pour la question n°6, 1centimètre = 1 unité

3° Calcul de la moyenne des 5 valeurs finales (c'est à dire la valeur moyenne des réponses 5 et 6, avec les valeurs des 4 premières questions).

Résultat

Le score va de 0 à 10

1- Où situeriez-vous votre degré global de fatigue ?
Absent ----- Extrême
2- Où situeriez-vous votre degré global de douleur au niveau du cou, du dos, et des hanches dans le cadre de votre spondylarthrite ankylosante ?
Absent ----- Extrême
3- Où situeriez-vous votre degré global de douleur/gonflement articulaire en dehors du cou, du dos, et des hanches ?
Absent ----- Extrême
4- Où situeriez-vous votre degré global de gêne pour les zones sensibles au toucher ou à la pression ?
Absent ----- Extrême
5- Où situeriez-vous votre degré global de raideur matinale depuis votre réveil ?
Absent ----- Extrême
6- Quelle est la durée de votre raideur matinale à partir de votre réveil ?
]------]------]------]------]------]------]------]-
0h 1/2h 1h 1h1/2 2h ou plus
TOTAL

2- L'indice BASFI (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*) :

Dans le cadre de retentissement fonctionnel au cours de la SA, le BASFI évalue les capacités fonctionnelles et les aptitudes physiques du patient lors d'activités de la vie quotidienne. Elles sont appréciées au moyen de dix questions, avec pour chacune d'entre elles une échelle visuelle analogique évaluant la possibilité pour le malade d'effectuer la tâche en question, depuis son accomplissement sans difficultés jusqu'à la complète impossibilité de la réaliser.

Le calcul du BASFI s'effectue alors en moyennant les valeurs obtenues aux dix questions, aboutissant à une valeur comprise entre 0 et 10. Cet indice est reconnu et validé comme ayant une bonne sensibilité au changement. En revanche, l'interférence possible d'autres pathologies (rhumatologiques comme l'arthrose, les troubles neurologiques ou encore cardiovasculaires) le rend peu spécifique et ne doit par conséquent être employé que chez un patient dont le diagnostic de SA est certain et interprété dans le contexte d'éventuelles pathologies ou comorbidités associées (*Astier F. 2012 ; Abdelmalek S. 2015*).

• **La sévérité de la maladie :**

Il n'existe pas dans la littérature d'unanimité sur la définition d'une spondylarthrite sévère ni sur le(s) facteur(s) prédictif(s) d'une évolution péjorative de la spondylarthrite. A partir des données de la littérature (essais cliniques comparatifs, suivis de cohortes, revues, consensus et recommandations d'experts), un accord professionnel s'établit concernant les facteurs associés à la gravité de la maladie. Il est recommandé de définir la gravité ou la sévérité d'une spondylarthrite par l'un des constats suivants :

- a- Il existe une manifestation « sévère » évidente.
- b- Le médecin constate à au moins deux reprises (à 3 mois d'intervalle), malgré la prise d'AINS à la dose maximale recommandée ou tolérée, l'une des manifestations suivantes :
 - Plus de 3 atteintes articulaires inflammatoires simultanées
 - Activité de la spondylarthrite : BASDAI > 4 sur une échelle de 0 à 10.
 - incapacité fonctionnelle importante (BASFI > 4 sur une échelle de 0 à 10).
- c- une prise permanente d'AINS à la dose maximale recommandée ou tolérée est nécessaire pour contrôler les symptômes.

BASFI

Bath Ankylosing Spondylitis
Functional Index
in French language



Nom: _____

Date: _____

Marquer d'un trait la réponse à chacune des questions en vous référant aux dernières 7 jours



❶	Pouvez-vous mettre vos chaussettes ou collants sans l'aide de quelqu'un ou de tout autre moyen extérieur (ex : petit appareil vous aidant à mettre vos chaussettes) ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	Évaluer sur dix <input type="checkbox"/>
❷	Pouvez-vous vous pencher en avant pour ramasser un stylo posé sur le sol sans l'aide d'un moyen extérieur ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❸	Pouvez-vous atteindre une étagère élevée sans l'aide de quelqu'un ou d'un moyen extérieur ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❹	Pouvez-vous vous lever d'une chaise sans accouder sans utiliser vos mains ou toute autre aide ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❺	Pouvez-vous vous relever de la position « couché sur le dos » sans aide ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❻	Pouvez-vous rester debout sans soutien pendant 10 minutes sans ressentir de gêne ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❼	Pouvez-vous monter 12 à 15 marches, en ne posant qu'un pied sur chaque marche, sans vous tenir à la rampe ou utiliser tout autre soutien ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❽	Pouvez-vous regarder par dessus votre épaule sans vous retourner ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❾	Pouvez-vous effectuer des activités nécessitant un effort physique (ex : mouvements de kinésithérapie, jardinage ou sports) ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>
❿	Pouvez-vous avoir des activités toute la journée, que ce soit au domicile ou au travail ? sans aucune difficulté 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 impossible	<input type="checkbox"/>

BASFI =

BASFI = (❶+❷+❸+❹+❺+❻+❼+❽+❾+❿) / 10

Ankylosing Spondylitis International Federation

World-wide network of societies of patients suffering from ankylosing spondylitis or related diseases
www.ankylosing-spondylitis-international.org

Score BASFI varie de 0 à 100 et est obtenu en faisant la moyenne des réponses aux 10 questions

Annexe 2

Consentements en français et en arabe des prélèvements sanguins des sujets

Identité du Médecin :

Consentement de prélèvement dans un but d'étude génétique et / ou de conservation dans une banque d'ADN chez une personne MAJEURE

Consentement établi en deux exemplaires dont un a été remis à l'intéressé(e).

Je soussigné(e)..... Né(e) le :

Demeurant à.....

accepte que soit effectué chez moi un prélèvement sanguin afin de faire réaliser une étude de génétique moléculaire, qui peut aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie : pour moi-même ou des membres de ma famille, selon la proposition du Docteur

Dans certains cas, la connaissance de mon origine géographique est nécessaire pour orienter les études génétiques.

J'en autorise le recueil.

Je n'en autorise pas le recueil.
(Rayer la mention inutile)

Cette étude sera faite à partir de l'ADN extrait du sang prélevé, qui sera conservé dans la banque d'ADN du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire de l'USTO. Dans certains cas, cette étude peut s'étendre sur plusieurs années. A tout moment je peux demander que mon ADN me soit restitué ou détruit.

Je déclare avoir été pleinement informé(e) de la nature des études qui seront effectuées et des conséquences éventuelles des résultats qui peuvent m'être donnés.

Ces résultats seront transmis uniquement au Docteur en être informé(e) par lui.

Je souhaite

Je ne souhaite pas
(Rayer la mention inutile)

Je consens au recueil, à la saisie et au traitement des données contenues dans mon dossier médical par des personnes tenues au secret professionnel. Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'en autorise la consultation qu'aux personnes qui collaborent à l'analyse. Je pourrai à tout moment demander que mon dossier soit détruit.

Conformément à la loi Informatique et Libertés, je peux exercer mon droit d'accès aux données qui me concernent par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

L'utilisation éventuelle de mon ADN à des fins de recherche médicale, pour une étude non directement liée à celle à laquelle je consens ce jour, nécessitera un nouveau consentement de ma part.

Fait à : Le :

**Signature du
médecin recueillant
le consentement**

**Signature de
L'intéressé(e)**

أخذ العينات من أجل الموافقة على الدراسة الجينية و / أو الحفظ في مكتبة الحمض النووي

أدلى الموافقة في مكررة وأعطيت نسخة واحدة إلى المحتملين
أنا الممضي اسفله..... ولد (هـ) :
مقيم في.....
قبول تنفيذ كما هو الحال في عينة دم لي لإجراء دراسة علم الوراثة الجينية ، والتي يمكن أن تساعد التشخيص أو الوقاية من
الأمراض..... لنفسي أو أفراد عائلتي، وفقا لاقتراح من
الدكتور.....في بعض الحالات، المعرفة بلدي المنشأ الجغرافي اللازمة لتوجيه الدراسات الجينية.

أنا لم أذن للجمع.

أنا أذن للجمع.

(الحال)

مقتضى

حسب

(حذف)

هذه الدراسة تتطلب الدم استخراج وستتاح الحمض النووي التي جمعت من دمي، والتي سيتم الاحتفاظ بها في بنك الحمض النووي في
مختبر علم الوراثة الجينية والخلوية USTO. في بعض الحالات، قد هذه الدراسة تمتد على عدة سنوات. أي وقت يمكن ان اطلب
اعادة أو قديمير الحمض النووي خاصتي.
أعلن أنني على علم تام طبيعة الدراسات المتخذة والنتائج المحتملة لنتائج وستحال هذه النتائج فقط للدكتور
.....

أنا لم أذن.

أنا أذن

(حذف حسب مقتضى الحال)

أنا موافقة على جمع ومعالجة البيانات في سجلاتي الطبية من قبل أشخاص اقساموا على التكم المهنية. وستبقى البيانات المتعلقة بي
سرية. أنا لا اسمّ الا للأشخاص الذين يتعاونون في التحليل. ويمكنني أن اطلب في أي وقت أن يتم إتلاف السجل.
وفقا لقانون حماية البيانات، أود أن أمارس حق الوصول إلى البيانات من خلال طبيب المختار

إمكانية استخدام الحمض النووي للبحوث الطبية الا لهده دراسة أي دراسة اخري تتطلب موافقة جديدة مني

حررت في..... على ما يلي :
.....

التوقيع الشخص

توقيع الطبيب

Annexe 3

La fiche de renseignement clinique du patient atteint de la SA :

Identification

N° du dossier :

Date : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|_|

Nom et Prénom :

Sexe : Homme Femme

Date et Lieu de Naissance : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|_| à

Profession :

N° de Téléphone :

Médecin traitant :

Date de début de la maladie : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|_|

Date de diagnostic de la maladie : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|_|

Antécédents

1) Antécédents personnels :

- | | | |
|---|-----|-----|
| • Atteinte oculaire | Oui | Non |
| • Urétrite ou cervicite dans le mois qui précède le début | Oui | Non |
| • Diarrhée dans le mois qui précède le début | Oui | Non |
| • Diarrhée chronique | Oui | Non |
| • Lésions cutanées ou muqueuses (si oui préciser) | Oui | Non |
| – Psoriasis | | |
| – Balanite | | |
| – Autres : | | |

Pathologies associées :

.....
.....
.....

2) Antécédents familiaux :

- Spondylarthropathie
- Rhumatisme psoriasis
- Entérocologie inflammatoire
- Autres :

3) Antécédents obstétricaux :

- Nombre de Grossesses |_|_|
- Nombre d'avortements |_|_|

Examens cliniques

Date de l'examen clinique : /..... /.....
Poids :
Taille :
IMC :
TA :
Périmètre thoracique :

Histoire de la maladie

Mode de début :

1) Atteintes articulaires

- Manifestations rachidiennes Oui Non
- Manifestations extra rachidiennes : Oui Non
 - Monoarthriculaire
 - Oligoarthriculaire
 - Polyarthriculaire
- Articulaires périphériques
- **Atteinte des enthèses :**
.....

2) Atteintes extra-articulaires

- Oculaire
- Cardiaque
- Cutanée
- Digestive
- Uro-génitale
- Autres :

Signes Cliniques

Douleurs rachidiennes inflammatoires :

- Cervicale
- Dorsale
- Lombaire

Douleurs fessières :

- Bilatérales
- Unilatérales
- A bascule

Raideur rachidienne matinale

Sciatalgie Talalgies Autres entésopathies

Oligo arthrite asymétrique : Oui Non

Siège :

Douleur de la paroi thoracique antérieure : Oui Non

Durée du dérouillage matinale :

Sensibilité aux antis inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : Oui Non

Examen clinique

a) Mobilité du rachis

- Cervical :
 - DMS :
 - DOM :
- Lombaire :
 - DDS :
 - Indice de Schöber :

b) Rachis dorsal :

- Indice Hirtz :
- DDM :

c) Déformations :

- Cyphose : Oui Non

Autres :
.....
.....

Articulations périphériques : Si atteintes préciser
.....

Membres supérieurs : Oui Non

Membres inférieurs :

- Hanche
- Genoux
- Pied :
 - Au pied :
 - Medio tarse
 - Arrière pieds

Examen des enthèses : Si douleur à la palpation Oui Non

[Rotule- TTA - gd trochanter - branche ischiopubienne - talon]

Examen somatique

Cardiovasculaire :

- Trouble du rythme Oui Non
- Valvulopathie Oui Non
- Trouble de conduction Oui Non

Pleuro-pulmonaire : Oui Non Pneumopathie

- EFR :
- Indice Hirtz :

Uvéite : Oui Non
Digestif : Oui Non
Urinaire : Oui Non
Autre :

Tableau réalisé :

Forme axiale Forme périphérique Forme mixte
Nombre d'articulations douloureuses : Nombre d'articulations gonflées :
Nombre d'enthésites :
Evaluation douleur (0-100) :
Evaluation globale (0-100) :

ASDAS :

- ASDAS-CRP :
- ASDAS-VS

Autres explorations :

Recto-coloscopie : Oui Normale Pathologique
Non

Biopsie (ANAPATH) :

Examen complémentaires

Examens Biologique :

Paramètres	Valeurs	Date
VS		
CRP		
Hb		
Plaquettes		
Créatinémie		
GB		
GR		
SGOT		
SGPT		

Antigène HLA-B27 Positif Négatif

Radiologie

Radio du bassin :

Sacroilite :

- Droite
- Gauche

Stade :

Stade :

Coxite :

- Droite
- Gauche

Radio du rachis :

- Syndesmophyte : Oui Non

Siège :
.....
.....

- | | | | | |
|-------------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| Colonne bambou : | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| Image en rail de tramway | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| Spondylite art de romanus | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| Spondylodiscite inflammatoire | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| Déminéralisation | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |

Pieds :

- Avant pied
- Medio tarse
- Arrière

Entesopathies : Oui Non

Siège :

Téléthorax :

- | | | | | |
|-----------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| • Fibrose | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |
| • Autre | Oui | <input type="checkbox"/> | Non | <input type="checkbox"/> |

Autres examens :

- EFR
- ECG
- Ecographie
- Biopsie jéjuno-duodéal
- Biopsie cutanée

Traitement symptomatique

	Date de début du traitement	Posologie	Date d'arrêt	Cause d'arrêt
Antalgiques				
AINS				
corticoïdes				
Autres				

Traitement de fonds

Nom du produit	Date de début du traitement	Posologie	Réponse au traitement		Date d'arrêt
			Efficacité	Inefficacité	
salazopyrine					
Méthotrexate					
Autres					

Effets secondaires :

Hématologique Oui Non
Anémie Leucopénie Thrombopénie
Cutanés Digestifs Rénaux

Annexe 4
Typage de HLA-B*27 par le kit GenFinder



The image shows the packaging for the GeneFinder™ HLA-B*27 RealAmp kit. The top of the box features the GeneFinder logo, which consists of a stylized 'G' made of blue and green lines, followed by the text 'GeneFinder™' and the tagline 'SMART Solution for Better Life™'. Below this, the product name 'HLA-B*27 RealAmp kit' is prominently displayed. To the left of the product name is a 'REF' box containing 'IFMR-08', and to the right is a triangle symbol containing the Greek letter sigma (Σ) followed by '100 rxns/ kit'. Below the product name, there is a storage instruction: 'Store at -20 °C or below. Shelf life is 12 months after manufacturing.' followed by a small icon of a test tube. The text 'CE-IVD (CE0123)' is printed below the storage instructions. Further down, it lists compatible PCR systems: 'Applied Biosystems 7500 Real Time PCR' and 'Bio-Rad CFX96 Real Time PCR'. A grey shaded box with the heading 'INTENDED USE' contains a paragraph describing the kit's purpose: 'GeneFinder™ HLA-B*27 RealAmp kit is designed for direct, qualitative detection of the HLA-B*27 gene in the human DNA sample. The test is intended for use as an aid in diagnosis of HLA-B*27 associated disease in patients.' Another grey shaded box with the heading 'KIT COMPONENT' is followed by a table listing the components and their quantities. The table has two columns: the component name and the quantity. Below the table, there are three footnotes: '*' for the B27 2X Rxn (Oligonucleotides, Buffer, dNTPs), '**' for the B27 DNA pol. (DNA polymerase), and '***' for the B27 PC (Clones for targets).

GeneFinder™
" SMART Solution for Better Life™ "

HLA-B*27 RealAmp kit

REF IFMR-08 Σ 100 rxns/ kit

 Store at -20 °C or below.
Shelf life is 12 months after manufacturing.

CE-IVD (CE0123)

Applied Biosystems 7500 Real Time PCR
Bio-Rad CFX96 Real Time PCR

INTENDED USE

GeneFinder™ HLA-B*27 RealAmp kit is designed for direct, qualitative detection of the HLA-B*27 gene in the human DNA sample. The test is intended for use as an aid in diagnosis of HLA-B*27 associated disease in patients.

KIT COMPONENT

HLA-B*27 RealAmp kit	100 rxns
B27 2X Rxn*	550 µl
B27 DNA pol.**	110 µl
B27 PC***	50 µl

*, B27 2X Rxn, Oligonucleotides for amplification and detection of target and internal control, Buffer containing dNTPs.
**, B27 DNA pol., DNA polymerase.
***, B27 PC, Clones for targets.

ISO9001; 13485
Certified

PROTOCOL

A. Specimen

This product has to be used for genomic DNA samples extracted from blood (with EDTA). Do not use blood sample in heparin which can lead to PCR reaction inhibition.

B. DNA Extraction

It is recommended to use commercialized extraction kit such as QIAamp DNA blood mini kit.

C. Reagent Preparation

Before setting up PCR, all components need to be thawed, gently mixed and centrifuged briefly to collect solution at the bottom.

1. Mix 5 μL of B27 2X *Rxn* and 1 μL of B27 DNA pol. to prepare master mixture per each reaction (refer to the below). Prepare enough volume of master mixture for all the reactions plus extra to prevent pipetting error.
2. After mixing well, place 6 μL of master mixture into 96-well plate or PCR tube.
3. Add 4 μL of extracted DNA sample into 96-well plate¹ or tube, then mix all components by pipetting. Proceed in the same way with other DNA samples, positive and negative control (Ultrapure quality water, PCR-grade).
¹, For CFX96, it is recommended to use BR white plate/tube for the best result.
4. Accurately close the tube with the cap or seal the 96-well plate.
5. Transfer the tubes or 96-well plate for test into the real-time PCR and start for the amplification.

Component	Per reaction (μL)
B27 2X <i>Rxn</i>	5
B27 DNA pol.	1
DNA sample or PC or NC	4
Total volume	10

¹, PC, positive control; ², NC, negative control

D. Setting of Real-time PCR

This product is validated on ABI 7500 Real-Time PCR instrument system and Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR instrument system.

1. Referring to the instrument manual, set on the dedicated software the parameters of thermal cycle.
2. Set up the PCR program and fluorescence as following, and then click the start "Run" button.

PCR program				
	Step	Temp.	Time	Cycle
1	Denaturation	96 °C	5 min	1
	Denaturation	96 °C	25 sec	
2	Annealing	70 °C	45 sec	5
	Extension	72 °C	30 sec	
	Denaturation	96 °C	25 sec	
3	Annealing †	65 °C	45 sec	30
	Extension	72 °C	30 sec	
	Denaturation	96 °C	25 sec	

†, Instrument setting; for ABI7500, select ON for data collection; for CFX96, select 'Add plate Read to Step'.

Target	Fluorescence setting	
	Instrument	
	ABI 7500	CFX96
HLA-B*27	FAM	FAM
Internal control (IC)	Cy5	Cy5
Passive dye	ROX	-

E. Analysis Setting

The values of fluorescence emitted by the specific probes and by the specific internal control probe in amplification reactions should be analyzed by the instrument software.

1. Prior to result analysis, set the baseline and threshold as the below.
2. Start to analyze the result.

Annexe 5

Protocol de génotypage par PCR en temps réel (*TaqMan*)

- Le génotypage des polymorphismes [*CTLA4*] rs3087243 (A>G), [*REL*] rs13031237 (G>T), [*CD40*] rs4810485 (G>T) et [*PRKCQ*] rs4750316 (G>C) a été réalisé par PCR en temps réel (ABI7500) en adaptant la chimie et les conditions recommandées par le fournisseur (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 10 µl contenant :

- 5 µl de Master mix (2X)
- 0,5 µl de l'Assay (x40)
- 1 µl d'ADN (10ng/µl)
- QSP (10 µl d'eau)

Les conditions de la PCR utilisées étaient standardisées par le fournisseur set ont comme suit :

L'étape de dénaturation 5min à 95 °C,
L'étape des 40 cycles de :
15 secondes à 94 °C,
45 secondes à 55 °C,
45 secondes à 72 °C,
Et la dernière étape d'élongation 10 min à 72 °C.

-L'analyse des résultats a été effectuée grâce au logiciel « 7500 System Software ».

Annexe 6

Protocole de la PCR classique et multiplex concernant le polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) :

1. Protocole de la PCR classique concernant le polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) :

Nous avons réalisé l'amplification de la région d'intérêt qui contient le fragment de 287pb (séquence Alu) inséré au niveau de l'intron 16 du gène ACE afin de distinguer trois génotypes : **DD** : homozygotes pour la délétion, **ID** : hétérozygote et **II** : homozygote pour l'insertion.

Protocole pour 25 µl de volume final (un seul ADN) :

Tampon : 2.5 µl
MgCl ₂ (25mMol) : 1 µl
DMSO (5%) : 2.5 µl
dNTPs (2mM) : 1.5 µl
ACE EC3 (50pM) : 1,5 µl
ACE EC5 (50pM) : 1,5 µl
Taq : 0.1
ADN (50-200ng) : 1
H ₂ O : QSP

Programme d'amplification :

Phase 1 (1 cycle) :
95°C pendant 5min
58°C pendant 1min
72°C pendant 2min 30 sec
Phase 2 (34cycles) :
92°C pendant 1min
50°C pendant 1min
72°C pendant 2min 30sec
Phase 3 :
72°C pendant 10min

Electrophorèse :

Gel d'agarose à 3% (150v pendant 20min) :
1 bandes pour l'allèle « insertion » : 490pb
1 seule bande pour l'allèle « délétion » : 190pb

2. Protocol de la PCR multiplex concernant le polymorphisme [ACE] rs4340 (I/D) :

Ensuite, nous avons réalisé une deuxième amplification de la région d'intérêt afin de confirmer la présence ou l'absence du fragment inséré au niveau de l'intron 16 du gène *ACE*.

Protocole pour 25 µl de volume final (un seul ADN) :

Tampon : 2.5 µl
MgCl ₂ (25mMol) : 2.5 µl
DMSO (5%) : 2.5 µl
dNTPs (2mM) : 1.5 µl
ACE 1 (50pM) : 1 µl
ACE 2 (15pM) : 0.3 µl
ACE 3 (50pM) : 1 µl
Taq : 0.1
ADN (50-200ng) : 1
H ₂ O : QSP

Programme d'amplification :

1- 94°C pendant 5min
2- 40cycles :
94°C pendant 1min
55°C pendant 1min
72°C pendant 1min
3- 72°C pendant 10min
4- 10°C à l'infini

Electrophorèse :

Gel d'agarose à 3% (150v pendant 20-30min) :
2 bandes pour l'allèle « insertion » : 370pb + 63pb
1 seule bande pour l'allèle « délétion » : 83pb

Annexe 7

Protocole de PCR *QX200 Droplet Digital* (ddPCR) :

▪ Test de quantification :

Nous avons utilisé les mêmes conditions d'amplification et de quantification pour chaque réaction concernant les trois gènes explorés dont nous avons pris, 20ng d'ADN, 1X de Master Mix (contenant les réactifs nécessaires à l'amplification), 1X de chaque assay (sondes fluorescentes et amorces spécifiques du gène d'intérêt et du gène de référence respectivement). Des tests de contrôle qualité ont été réalisés suivant le protocole international dMIQE (*Minimum Information for the Publication of Digital PCR Experiment*) (**Huggett, Foy et al. 2013**).

Les CNVs ont été quantifiés en comparant la fluorescence des gènes cibles et celle du gène de référence RPP30 en utilisant des sondes spécifiques. Deux contrôles positifs avec un nombre de copies connu ont été utilisés, l'un avec deux copies et l'autre avec trois copies (NA10852 et NA10851, respectivement).

La réaction de quantification a été réalisée avec la *QX200™ Droplet Digital PCR* (Bio-Rad Laboratories, California, USA). La réaction a été réalisée dans un volume final de 22µl selon le protocole suivant.

1- Préparation du mélange réactionnel :

Schématiser d'abord, un plan de plaque à 96 puits, puis, déposer l'ADN dans chaque puit de barettes de 8 (déposer par colonnes).

La quantification des CNVs CCL3L1 a été réalisée selon les conditions suivantes (22µl) :

Déposer 1,6 µl d'ADN (10-30ng) sur chaque puit de la plaque (96)

Mélange réactionnel :

900nM (amorces F/R) + 250nM (sonde) (*CCL3L1*)

0,5 µl de chaque Assay Référence (*RPP30*) (x20)

10 µl de tampon Supermix (2X)

QSP H2O.

-La quantification des CNVs *FCGR3A* et *FCGR3B* a été réalisée selon les conditions suivantes :

Déposer 1,6 μ l d'ADN (10-30ng) sur chaque puit de la plaque (96)

Mélange réactionnel :

0,5 μ l de chaque Assay Target (x20) (*FCGR3A* et *FCGR3B*)

0,5 μ l de chaque Assay Référence (x20)

10 μ l de tampon Supermix (2X)

QSP H₂O.

-Ajouter 21 μ l de mélange réactionnel à chaque ADN déposé dans les puits. Fermer la plaque.

-Laisser 5-10min à température ambiante.

-Vortexer la plaque pendant 1min.

-Centrifuger ensuite, pendant 1min à 500rpm.

2- Génération des droplets :

-Installer la cartouche dans la cassette selon l'orientation et la verrouiller.

-Transvaser 8 mélanges à l'aide d'une pipette multicanaux réglée sur 20 μ l en utilisant des cônes

-Rainin vert (vérifier les bulles) sur les puits respectifs de la cartouche (Ligne '*sample*').

-Ajouter 70 μ l d'huile dans chacun des 8 puits de la cartouche (Ligne '*oil*') (**Figure 31**).

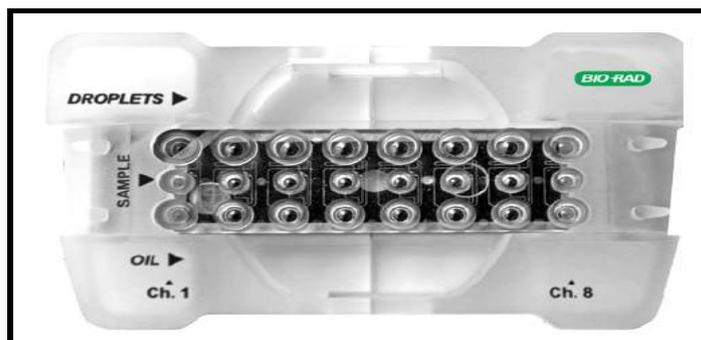


Figure 31 : Photo d'une cassette DG8 QX200 pour la ddPCR.

La ligne « *sample* » pour déposer le mélange réactionnel sur 8 puits. La ligne « *oil* » pour mettre 70 μ l de l'huile d'émulsion dans chaque puit. La ligne « *droplet* » est spécifique à la génération de droplets.

-Charger la cassette dans le générateur et refermer. La génération des droplets dure 2-3min (Figure 32).



Figure 32 : Photo d'une cassette DG8 placée dans le générateur de droplets QX200.

3- Réaction d'amplification :

-Transférer à chaque fois les 8 puits avec droplets vers la plaque 96 puits avec la pipette Rainin 8 canaux 40 μ l. Prélever et déposer en biais pendant 8-10sec.

-A la fin, allumer le scelleur de plaque et apposer le film alu sur la plaque (bande rouge en haut).

-Fermer et appuyer sur Seal.

-Lancer l'amplification dans un thermocycleur avec le programme suivant :

1- 95°C pendant 10min

2- 40cycles :

94°C pendant 30sec

60°C pendant 1min

3- 98°C pendant 10min

4- 8-12°C à l'infini

4- Lecture des résultats :

-Ouvrir le logiciel *QuantaSoft* relié au lecteur des droplets. Mettre la plaque sur la place indiquée (Figure 33).



Figure 33 : Photo de lecteur de droplets QX200 et ses consommables (BioRad).

- Indiquer les informations nécessaires à chaque puit.
- Sélectionner les puits à analyser et lancer la lecture de la fluorescence.
- Exporter les résultats (**Figure 34**).

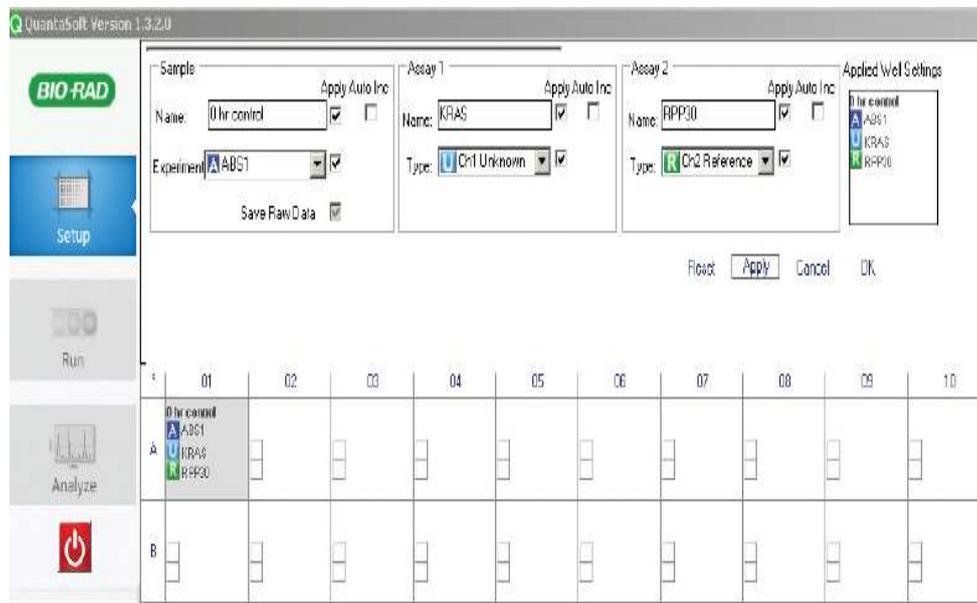


Figure 34 : Photo prise sur les caractéristiques d'une plaque de ddPCR sur la plateforme du logiciel *QuantaSoft*TM.

L'avantage de l'utilisation de la ddPCR était de pouvoir séparer les copies en tandem par la génération de *droplets*. Cependant, cet avantage s'applique seulement aux longues duplications en tandem. De ce fait, l'équipe de *Ben Kilani*, a émis l'hypothèse que le partitionnement, lors de la génération de *droplets* par ddPCR, fragmente l'ADN et par conséquent, lorsque la distance qui sépare deux copies en tandem est grande, comme c'est le cas pour *CCL3L1*, *FCGR3A* et *FCGR3B*, les duplicats sont séparés dans deux *droplets* différentes. Cette technique permet ainsi une estimation correcte du nombre de copies (*Ben Kilani M.S. 2014*). En revanche, dans le cas des gènes avec des CNVs simples ou uniques, la distance entre deux copies en tandem est largement inférieure, c'est pourquoi un protocole préalable de digestion de l'ADN est nécessaire pour l'identification des copies en tandem.

Annexe 8

Publication scientifique internationale

Received: 12 June 2017 | Revised: 30 January 2018 | Accepted: 22 March 2018
 DOI: 10.1111/iji.12369

ORIGINAL ARTICLE

WILEY INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOGENETICS

Association of the HLA-B27 antigen and the CTLA4 gene CT60/rs3087243 polymorphism with ankylosing spondylitis in Algerian population: A case-control study

C. A. Dahmani¹  | A. Benzaoui² | H. Amroun³ | F. Mecabih³ | F. Z. Sediki¹ | F. Zemani-Fodil¹ | M. Fodil¹ | W. Boughrara¹ | B. Mecheti³ | N. Attal³ | N. Mehtar¹ | E. Petit-Teixeira⁴ | A. Boudjema¹

¹Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire (LGMC), Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Oran, Algeria

²Service de Rhumatologie, Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) d'Oran, Oran, Algeria

³Laboratoire d'Immunogénétique et de Transplantation, Département d'Immunologie, Institut Pasteur d'Algérie à Alger, Algeria

⁴Laboratoire Européen de la Polyarthrite Rhumatoïde, Université d'Evry-Val D'Essonne, Evry, France

Correspondence

Chahinez Amira Dahmani, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran, Mohamed-Boudiaf (USTO-MB), Oran, Algérie.
 Emails: chahinez.dahmani@univ-usto.dz and chahinez.dahmani23@gmail.com

Funding information

The study was funded by Laboratory of Molecular and Cellular Genetic and Sciences and Technology University of Oran, Mohamed Boudiaf Resources.

Summary

Ankylosing spondylitis (AS) is a complex inflammatory disease that represents a major health problem both in Algeria and worldwide. Several lines of evidence support that genetic risk factors play a role in AS etiology and the CTLA4 gene has attracted a considerable attention. In this study, we were interested in evaluating the HLA-B27 frequency and in exploring the CTLA4 gene in a sample of the North African population. The dataset of the current study is composed of 81 patients with AS and 123 healthy controls. All samples were genotyped by TaqMan® allelic discrimination assay. The genetic risk of the HLA-B27 specificity and the CTLA4/CT60 polymorphism were assessed by odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). High spondylitis risk was detected for HLA-B27 allele (OR= 14.62, $p = 10^{-6}$) in addition to a significant association of the CT60*G allele (OR= 1.89, $p = .002$). After gender and age stratifications, the association of the CT60*G allele was still significant in females sample (OR= 2.10, $p = .001$) and when age up to 30 years (OR = 2.21, $p = .008$). Interestingly, the CT60*G allele revealed an increased spondylitis risk in the B27 negative group (OR= 2.81, $p = .006$). The present work showed in West Algerian population that the HLA-B27 antigen and the variation in the CTLA4 3'UTR region played an important role in the ankylosing spondylitis susceptibility. The heterogeneity of this disease is deduced by genetic difference found between B27+ and B27- groups.

KEYWORDS

Algerian population, ankylosing spondylitis, CT60 polymorphism, CTLA4, HLA-B27

1 | INTRODUCTION

The ankylosing spondylitis (AS) is a prototype of inflammatory diseases group formerly known as spondyloarthropathies (SpA). It has been shown that the AS disease is more frequently present in men than in women at a ratio of 2:1. It often occurs between 20 and 30 years, but sometimes in adolescence or later in life (Feldtkeller, Khan, van der Heijde, van der Linden, & Braun, 2003). It is a

progressive disease that affects 0.5% of the European population, 0.2% of the Asian, and between 0.2%–0.5% in American, but it is uncommon among Africans (Ng et al., 2007; Reveille et al., 2010). It appears that the spondylitis frequencies difference depends mostly on the Human Leucocyte Antigen-B27 (HLA-B27) frequency in populations. Indeed, the study of Piazza, Menozzi, and Cavalli-Sforza (1980) showed that the HLA-B27 allele frequency follows a decreasing north-south geographic gradient (Piazza et al., 1980). In fact, it

is true that for a long time several hypotheses have been issued to explain the role of the *HLA-B27* gene in the onset of the spondylitis disease (Rysnik et al., 2016). Otherwise, the studies suggested the involvement of other genes not belonging to the HLA system.

The balance between stimulatory and inhibitory co-signals determines the ultimate nature of T-cell responses. Ankylosing spondylitis is an autoimmune disease and the imbalance of peripheral tolerance is identified in its pathogenesis. Many studies have shown that the patients with AS experienced higher numbers of circulating CD4+ T cells and CD8+ T cells than the healthy subject (Schirmer et al., 2002). The T-cell activation mediated by the T-cell receptor (TCR) complex after antigen recognition requires co-stimulation by co-receptors such as CD28 and *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) (Alegre, Frauwirth, & Thompson, 2001). The CD28 receptor provides positive signals that promote T-cell response while CTLA-4 transmits inhibitory signals to attenuate T-cell activation by competing for the B7 ligands with its homologue CD28 (van der Merwe, Bodian, Daenke, Linsley, & Davis, 1997).

Genome-wide scans have implicated regions contributing in the spondylitis genetic risk on chromosomes 2q, 6p, 6q, 10q, 11q, 16q, 17q and 19q (Brown et al., 1998; Laval et al., 2001). The *CTLA4* gene is located on chromosome 2q33 and encodes a protein actively involved in regulating T-cell activation (Dariavach, Mattei, Golstein, & Lefranc, 1988). *CTLA4* has become one of the main genes of research interest for association studies and has been considered as a target for immunotherapy because it has a crucial role in immunological homeostasis (Scalapino & Daikh, 2008). It consists of four exons, the alternative splicing of the *CTLA-4* transcript generates three forms, a complete trans-membrane form (exons 1-4), a soluble *CTLA-4* (s*CTLA-4*) (lacking exon 3) and a short form encoded only for exons 1 and 4 (Dariavach et al., 1988; Oaks et al., 2000). Up to now, among hundreds of *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) tested in *CTLA4* gene, three of them have been associated with high AS risk (-318°C/T, +49°A/G, and *CT60*) (Kristiansen, Larsen, & Pociot, 2000). The *CT60* (*rs3087243*) polymorphism leads to a transition from A to G at the position 60 of the 3'UTR (Song, Kim, & Lee, 2013) located 279 base pairs downstream of the 3' major polyadenylation site (Malquori, Carsetti, & Ruberti, 2008). The Ueda's report indicated the influence of the *CT60* SNP in the soluble *CTLA-4* splicing and production (Ueda et al., 2003). The association of the *CT60**G allele with lower mRNA levels of the s*CTLA-4* isoform was also observed (Ueda et al., 2003). Furthermore, the study of Toussiro et al. (2009) showed that the s*CTLA-4* isoform rate was found higher in a SpA group compared to controls (Toussiro et al., 2009). These findings suggest that the soluble *CTLA-4* plays an immune-genetic role in the activation and the regulation of the T cell. Also, the *CT60* SNP was reported to confer risk for autoimmune diseases in numerous studies such as Type 1 Diabetes (T1D) (Spoletini et al., 2013), systemic lupus erythematosus (SLE) (Torres et al., 2004), Grave's disease (GD) (Kavvoura et al., 2007) and rheumatoid arthritis (RA) (Farago, Kisfali, Magyar, Polgar, & Melegh, 2010). It was recently associated with the AS risk in a Chinese study (Wang,

Wang, Tan, Wang, & Yuan, 2015). However, results are controversial, some findings could not reveal any association (Barton et al., 2004; Pincerati, Dalla-Costa, & Petzl-Erler, 2010) such as a recent meta-analysis (Chen et al., 2016). In this case-control study, we investigated the *CTLA4 CT60* polymorphism and the *HLA-B27* allele genotyping. This is the first time that such association study was performed in spondylitis patients living in the North African population.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population

A total of 81 patients diagnosed with AS (37 males and 44 females) were randomly selected and treated in the Rheumatology Service at the Oran University Hospital Center (CHU) in the diagnosis age range of 10–72 years. The diagnosis of spondylitis patients was made based on the Amor and the European Spondylarthropathy Study Group (ESSG) criteria (Amor, Dougados, & Mijiyawa, 1990; Dougados et al., 1991). Clinical characteristics including the age at the initial symptom, the *HLA-B27* status, the SpA family history and the medication history were summarized in Table 1. The control group selected in the same geographical areas as cases was composed of 123 healthy subjects (51 males and 72 females) in the age range of 20–50 years, which have never suffered from any rheumatologic or inflammatory diseases.

All enrolled patients and controls in this study were unrelated. Informed consent was obtained from all participants before sampling and the experiment was supported by the Oran University Hospital Center's Ethics Committee. The patients and control groups were stratified in according to age and gender (Tables 3 and 4). For age stratification, two groups were set as follow: under 30 years and over 30 years, as the AS disease occurs often before 30 years (Feldtkeller et al., 2003). Furthermore, we have stratified the *CT60* allele's distribution into two groups, *HLA-B27* negative (*HLA-B27*-) and *HLA-B27* positive (*HLA-B27*+) individuals in Table 5.

2.2 | DNA isolation

Approximately 35 ml of peripheral blood samples were collected in EDTA tubes and stored at -20°C until analysis. The DNA was isolated from peripheral white blood cells by a standard manual salting-out method (Miller, Dykes, & Polesky, 1988).

2.3 | SNP genotyping

Firstly, the *HLA-B* generic typing was performed by real-time polymerase chain reaction (GeneFinder *HLA-B27* RealAmp kit). All samples underwent at least two reactions to confirm the genotypes. Then, the *CTLA4 CT60* SNP (*rs3087243*) was genotyped using the TaqMan SNP 5'-Allelic Discrimination (AD) assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). Two reference samples (from CEPH "Centre d'Etude du Polymorphisme Humain" families, France) were

co-genotyped for each experiment to a reproductive data. Moreover, 10% of randomly chosen samples were genotyped a second time in an independent experiment to avoid compliance issues.

2.4 | Statistical analysis

Statistical description of continuous variables was indicated by a mean and a standard error (SE); frequencies and percentages were used for categorical data. The distribution of the *CTLA4 CT60* SNP among controls was analysed according to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The distribution of the demographic variables (age, gender) and the polymorphism frequencies distribution between cases and controls were performed by the Pearson's chi-square (χ^2) test and *p* values were considered significant when *p* < .05. The genotypic and allelic distributions of the *CT60* polymorphism were assessed by the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs).

The multivariate analysis of age of diagnostic (> and ≤30 years), gender (female/male), HLA-B27 status (presence or absence) and the AS clinical characteristics (including the CRP test, the SPA family history, and the Uveitis status) stratifications were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 22.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

3 | RESULTS

The demographical and clinical characteristics of 81 patients and 123 controls are summarized in Table 1. In this study, the sex ratio was 44 females per 37 males in patients with AS while it was 72 females per 51 males in the controls. The mean age of the cases was 39.80 ± 1.6; while as mean age of the healthy group was 30.02 ± 0.95. There was no statically significant difference in mean age and gender distributions between cases and controls, indicating a well-matched study population (*p* > .05). Interestingly, AS frequency was higher among individuals more than 30 years compared to those less than 30 years. It was a statically significant difference between the two age groups (*p* < .05). Comparing the AS frequency between males and females, females were more commonly affected than males (70% vs. 30%). As expected, the HLA-B27 allele frequency distribution was higher in our patients than controls (*p* = 10⁻⁶) (results not shown). The clinical syndromes of patients with AS were presented, which 42% of patients were diagnosed with uveitis, 63% with peripheral arthritis and the majority (63%) of patients have the mixt form (axial and peripheral). We have observed that the frequency of positive CRP test (C-reactive protein) in patients with AS was very higher (73%).

Genotyping experiments are reproducible as the 10% randomly samples genotyped twice revealed no discrepancy. The distribution of allele and genotype frequencies of the *CT60* SNP between patient and control groups is presented in Table 2. At first, allelic distribution was consistent with the assumption of the HWE in controls (*p* > .05). There were significant differences in the frequencies distribution of the *CT60**G allele (OR = 1.89 [1.26–2.84], *p* = .002) and also of

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of AS patients and healthy controls

Subject characteristics	AS patients (N = 81)	Healthy control (N = 123)
Gender*		
Females, n (%)	44 (54)	72 (58)
Males, n (%)	37 (46)	51 (42)
Age* (mean ± SE), years		
≤30, n (%)	24 (30)	86 (70)
>30, n (%)	57 (70)	37 (30)
HLA-B27*		
HLA-B27+, n (%)	42 (52)	7 (5)
HLA-B27-, n (%)	39 (48)	116 (95)
Family history		
Presence, n (%)	59 (73)	
AS forms		
Axial form, n (%)	22 (27)	
Peripheral form, n (%)	8 (10)	
Mixt form, n (%)	51 (63)	
Clinical features		
Age of symptom (mean ± SE), years	31.40 ± 1.6	
Disease duration (mean ± SE), years	8.61 ± 0.9	
Diagnosis delay (mean ± SE), years	4.16 ± 0.7	
Clinical syndromes		
Uveitis, n (%)	34 (42)	
Peripheral arthritis, n (%)	51 (63)	
Deformation (kyphosis), n (%)	14 (17)	
Laboratory test		
BASDAI (mean ± SE), cm	3.6 ± 0.2	
BASFI (mean ± SE), cm	3.9 ± 0.25	
SGOT (mean ± SE), UI	22.74 ± 1.87	
SGPT (mean ± SE), UI	23.24 ± 2.3	
ESR (mean ± SE), mm/hr	35.95 ± 2.4	
CRP >6 mg/L, n (%)	59 (73)	
Medication history		
NSAIDs use, n (%)	65 (80)	
NSAIDs sensibility, n (%)	55 (84)	
DMARDs use, n (%)	35 (43)	

The data are presented as the mean ± standard error; n, number; %, frequency; **p* < .05 considered as statistically significant.

AS, ankylosing spondylitis; HLA-B27, human leukocyte antigen-B27; BASDAI, bath ankylosing spondylitis disease activity index; BASFI, bath ankylosing spondylitis functional index; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; SGOT, serum glutamoxaloacetate transferase; SGPT, serum glutamopyruvate transferase; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; DMARDs, disease-modifying anti rheumatic drugs.

	AS patients N = 81 (%)	Controls N = 123 (%)	OR [CI]	p value
Genotypes				
CT60*AA	8 (10)	35 (30)	—	—
CT60*AG	41 (50)	55 (50)	—	—
CT60*GG	32 (40)	33 (20)	1.77 [0.98–3.21]	.004
CT60*AG+GG	73 (90)	88 (70)	3.46 [1.54–7.79]	.001
Alleles				
CT60*A	57 (30)	125 (51)	—	—
CT60*G	105 (70)	121 (49)	1.89 [1.26–2.84]	.002

The values are presented as genotypes and alleles number (N) and frequency in percentage (%). *p*, significance; OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval. Bold *p* values mean a significant association with $p < .05$ and OR > 1 [CI 95%].

TABLE 2 The distribution of allele and genotype frequencies of the CT60 SNP (rs3087243) between ankylosing spondylitis (AS) patients and controls

TABLE 3 The distribution of the allele and genotype frequencies of the CT60 SNP (rs3087243) after gender and age stratifications

	Female group		Statistical analysis		Age >30 years old group		Statistical analysis	
	Patients N = 44 (%)	Controls N = 72 (%)	OR [CI]	p values	Patients N = 57 (%)	Controls N = 37 (%)	OR [CI]	p values
Genotypes								
CT60*AA	3 (7)	21 (29)	—	—	4 (7)	12 (32.5)	—	—
CT60*AG	21 (48)	34 (46)	—	—	30 (53)	15 (40.5)	—	—
CT60*GG	20 (45)	18 (25)	2.51 [1.14–5.52]	.006	23 (40)	10 (27)	1.78 [0.74–4.32]	.006
CT60*AG+GG	41 (93)	52 (71)	4.85 [1.46–16.1]	.004	53 (93)	25 (67.5)	5.82 [1.80–18.89]	.001
Alleles								
CT60*A	27 (30)	77 (52)	—	—	38 (33)	39 (53)	—	—
CT60*G	61 (70)	71 (48)	2.42 [1.39–4.21]	.001	76 (67)	35 (47)	2.21 [1.22–4.01]	.008

The values are presented as genotypes and alleles number (N) and frequency in percentage (%). *p*, significance; OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval. Bold *p* values mean a significant association with $p < .05$ and OR > 1 [CI 95%].

the CT60*(AG+GG) combined genotypes (OR = 3.46 [1.54–7.79], $p = .001$) between cases and controls.

To better study the effect of the difference observed between female and male patients (Table 1), we explored age and gender stratification analysis; results were summarized in Table 3. Firstly, there was a significant difference in the allelic and genotypic distributions between female cases and controls [CT60*G allele (OR= 2.42 [1.39–4.21], $p = .001$) and CT60*(GG+AG) genotypes (OR= 4.85 [1.46–16.13], $p = .004$)] (Table 3). Secondly, we also showed in the group of age >30 years that the CT60*G allele and the CT60*(GG+AG) genotypes frequencies were significantly higher (OR= 2.21 [1.22–4.01], $p = .008$ and OR= 5.82 [1.80–18.89], $p = .001$, respectively) (Table 3). Interestingly, when we combined the results observed in Table 3, we showed a significant association between the CT60*G allele and the AS susceptibility in women with age >30 years (OR = 3.38 [1.40–8.19], $p = .005$) (Table 4).

Later to consider association of the HLA-B27 allele and the CT60 polymorphism, we analysed the CT60 allele's distribution into the HLA-B27- and HLA-B27+ individuals (Table 5). A significant association of the CT60*G allele with AS risk is restricted to

HLA-B27- sample (OR = 2.10 [1.23–3.59], $p = .006$) while it has no effect in the B27+ sample ($p > .05$). Subsequently, the CT60 allelic and genotypic distributions results according to the AS clinical characteristics were presented in Table 6. We observed a significant difference of the CT60*(AG+GG) genotypes considering AS family history status (OR = 4.85 [1.46–16.13], $p = .02$) and of the CT60*GG genotype considering the CRP test (OR = 3.72 [1.20–21.48], $p = .02$). However, no difference was found considering the uveitis status ($p > .05$).

4 | DISCUSSION

We conducted a case-control study to investigate a relationship between the HLA-B27 status, the CTLA4 CT60 polymorphism and the AS susceptibility in a Western Algerian population. Ankylosing spondylitis is associated with the HLA system, particularly the HLA-B27 antigen. Nevertheless, the strength of this association may vary in different ethnic populations (Gonzalez-Roces et al., 1997). Our study was conducted to assess the prevalence of HLA-B27 antigen

TABLE 4 The distribution of allele and genotype frequencies of the CT60 SNP (rs3087243) only in female group with age >30 years

CT60 SNP	Females with age >30 years		Statistical analysis	
	Patients N = 39 (%)	Controls N = 14 (%)	OR [CI]	p values
Genotypes				
CT60*AA	2 (5)	6 (43)	–	–
CT60*AG	20 (51)	5 (36)	–	–
CT60*GG	17 (44)	3 (21)	2.55 [0.66–9.86]	.003
CT60* AG+GG	37 (95)	8 (57%)	11.47 [2.23–58.99]	.0007
Alleles				
CT60*A	24 (31)	17 (61)	–	–
CT60*G	54 (69)	11 (39)	3.38 [1.40–8.19]	.005

The values are presented as genotypes and alleles number (N) and frequency in percentage (%). p, significance; OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval. Bold p values mean a significant association with $p < .05$ and OR > 1 [CI 95%].

TABLE 5 The CT60-CTLA4 (rs3087243) and HLA-HLA-B27 alleles' distribution among patients and controls

HLA-B27 status	HLA-B27- group		HLA-B27+ group	
	CT60*A	CT60*G	CT60*A	CT60*G
AS patients	25	53	32	52
Controls	115	115	6	10
Statistical analysis		p = .006 OR = 2.10 CI = [1.23–3.59]	NS	

The values are presented as genotypes number, p, significance; OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval. Bold p values mean a significant association with $p < .05$ and OR > 1 [CI 95%].

TABLE 6 The CT60 (rs3087243) allele and genotype distributions in the ankylosing spondylitis (AS) clinical characteristics

	SpA family history		Uveitis status		CRP test	
	Presence N = 59 (%)	Absence N = 22 (%)	Presence N = 34 (%)	Absence N = 47 (%)	Positive (>6 mg/L) N = 59 (%)	Negative (<6 mg/L) N = 22 (%)
Genotypes						
CT60*AA	3 (05)	5 (23)	3 (9)	5 (11)	6 (10)	2 (9)
CT60*AG	33 (56)	8 (36)	16 (47)	25 (53)	25 (42)	16 (73)
CT60*GG	23 (39)	9 (41)	15 (44)	17 (36)	28 (48)	4 (18)
CT60*AG+GG	56 (95)	17 (77)	31 (91)	42 (89)	53 (90)	20 (91)
Alleles						
CT60*A	39 (33)	18 (41)	22 (32)	35 (37)	37 (31)	20 (45)
CT60*G	79 (67)	26 (59)	46 (68)	59 (63)	89 (69)	34 (55)
Statistical analysis	OR [CI]		OR [CI]		OR [CI]	
	p values		p values		p values	
CT60*GG	NS		NS		OR = 3.72 [1.18–11.72] p = .02	
CT60*(AG+GG)	OR = 4.85 [1.46–16.13] p = .02		NS		NS	
CT60*G allele	NS		NS		NS	

The values are presented as genotypes and alleles number (N) and frequency in percentage (%). p, significance; OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval; SpA, spondylarthropathies; CRP, C-reactive protein. Bold p values mean a significant association with $p < .05$ and OR > 1 [CI 95%].

among patients with AS disease living in the West of Algeria. The HLA-B27 frequency's distribution between cases and controls (OR = 14.62 [6.43–33.20]) (results not presented) suggests that this allele is involved in the predisposition to the spondylitis in the West of Algeria. The frequency of the HLA-B27 antigen already described in Algerian population was 5%. This value is similar in several Maghreb countries (3% to 5%) but is lower than observed in the Caucasian population (6% to 8%) (Sieper, Rudwaleit, Khan, & Braun, 2006). In our study, the HLA-B27 was found to be positive in 52% of the spondylitis patients, at a lower percentage compared to Caucasian of European ancestry patients (90%) (Reveille, Ball, & Khan, 2001), to Asian (61%) (Abdelrahman et al., 2012) and to Arabian (74%) (Abdelrahman et al., 2012). A study on 100 AS Algerian patients reported a frequency of 63% (Amroun et al., 2005). Equivalent HLA-B27 frequencies have been described in the North African countries: Egypt (59% (Tayel et al., 2012)), Morocco (58% (Atouf et al., 2012)) and Tunisia (43%, Sakly et al., 2009). Various ancestral genetic components in the northern Africa have been described because of a complex history of demographic events (Bekada et al., 2015). One of the most relevant ancestors of West Algerian region were the Berbers but, historical events testified to numerous invasions and migrations by the Phoenicians, the Romans, the Arabs, the Spanish, the Ottomans and the French (Bosch et al., 1997; Henn et al., 2012).

CTLA-4 (CD152) is an important co-stimulatory molecule, which can inhibit the function of T lymphocytes. Indeed, CTLA4 gene variations might participate in genetic susceptibility to autoimmune diseases by modifying the inhibitory effect on T-cell activity. Importantly, the study of Maier and colleagues demonstrated that the CT60*G allele alters the signal pattern of CD4_T cells in the autoimmune diseases, suggesting a direct mechanistic link with T-cell function (Maier, Anderson, De Jager, Wicker, & Hafler, 2007). The CT60*G allele has been extensively studied, but its frequency changes with ethnicity. In our population, the minor allele frequency (MAF) of this variant in controls group (MAF ≤50%) was found similar to those reported in European (Farago et al., 2010) Tunisian (Benmansour et al., 2010) and Chinese Han (Wang et al., 2015) populations, whereas it was different (MAF >50%) in Asian (Lei et al., 2005; Tsukahara et al., 2008) and American populations (Pincerati et al., 2010; Torres-Carrillo et al., 2013).

Considering the present genetic association study, the CT60*G allele may be associated with the AS risk in Algerian population (Table 2). In contrast, a case-control study in Chinese Han population reported that the major allele CT60*A was involved in the AS susceptibility (Wang et al., 2015). One reason for this discrepancy is the difference observed in the MAF of CT60*G between populations. It was lower (MAF <50%) in the Chinese Han controls (Wang et al., 2015), but it was so higher in other Chinese and Japanese populations (MAF >50%) (Lei et al., 2005; Tsukahara et al., 2008). One reason for this discrepancy between these Asian populations could be the difference in haplotype frequencies, as the haplotype +49*G/CT60*A was rarely found in Japanese population whereas it was more frequent in the Chinese

one (Tsukahara et al., 2008). It seems that the biological impact of genetic markers on the risk for common diseases may usually be consistent with different origins (Ioannidis, Ntzani, & Trikalinos, 2004). The ethnic differences and the genetic heterogeneity in our population may be another major reason to explain the controversial findings between the present Algerian study and the Chinese findings (Wang et al., 2015).

In this study, we observed that the AS cohort randomly recruited ($n = 81$) consists of slightly more women than men (54% vs. 46%). This observation is in accordance with the recent article on the Chinese population (55% vs. 45%) (Wang et al., 2015), but, it does not imply that women are more affected by the spondylitis in Algeria. Additionally, the CT60*G allele was statistically associated in the female patients compared to females control after gender stratification in Table 3. Our result can be in accordance with the Lei's report in which it is supposed that the CT60*G allele was associated with the RA risk in a Chinese population with a female predominance (65%) (Lei et al., 2005). The sex factor could play an important role in AS susceptibility in Algeria. On the other hand, the mean age of AS cases in our study was 39.8 years (Table 1). This observation is similar to findings from the Wang et al.'s (2015) study (36 years) (Wang et al., 2015). Interestingly, the mean age in our AS females was observed so higher (45.7 years). This observation is in accordance with findings from the Wang et al.'s (2015) among female patients with AS (49.6 years) (Wang et al., 2015). After the age-adjustment in our study, the CT60*G allele was associated with the AS risk in the group of age >30 years (Table 4). It seems that the age factor could play an important role in the occurrence of spondylitis disease. The involvement of the sexual hormones in the immune response has been extensively studied, particularly estrogens as much as a modulator of humoral immunity and progesterone as a natural suppressor of immunity. Indeed, a hormone-immune imbalance could contribute to the autoimmune disease's etiology (Cutolo et al., 2004). Curiously, we have observed in Table 4 that the CT60*G allele was associated with the AS risk in the group of the females with older age (>30 years). It is also possible that AS development was declared in the oldest of females because of the hormonal disequilibrium during menopause, but further studies are required to confirm this hypothesis.

To evaluate whether the association of the CT60 SNP is independent of the HLA B27-AS relation, we stratified the CT60 allele's distribution into HLA-B27- and HLA-B27+ groups (Table 5). About 52% of our patients with spondylitis were HLA-B27+ whereas in Caucasian populations this value was estimated to be 90% (Reveille et al., 2001), this suggests that other genes such as CTLA4 could have an important effect on the disease susceptibility in our population. Other studies found that several candidate gene polymorphisms are associated with AS development in HLA-B27- subgroup (Gonzalez et al., 2001; Popa et al., 2016) suggesting genetic factors with an independent effect on the overall contribution of this disease. Whether this set of genetic factors has a direct effect or represents an additive contribution in AS susceptibility remains to be determined.

For several decades, it has been known that AS disease inherited due to shared susceptibility factors. We have found in our study a significant association between the CT60*AG+GG genotype and the SpA family history (Table 6), suggesting that the CTLA4 CT60 SNP could be involved in AS heritability in Algerian population. Furthermore, we identified an increased risk between the CT60*GG genotype and AS patients with a CRP up to 6 mg/L, the CT60 SNP might therefore be associated in our population with AS disease progress. Nevertheless, our findings should be confirmed with similar studies performed on larger samples.

Ankylosing spondylitis genetic predisposition associated with HLA-B27 antigen seems to be confirmed in our West Algerian sample. Various studies suggest that apart from the strong association between HLA-B27, ERAP, IL23R genes and the AS susceptibility (Duan et al., 2012; Popa et al., 2016; Reveille et al., 2001), other genetic factors could be considered in the spondylitis disease development. To our best knowledge, this is the first time that the CTLA4 gene association was analysed with AS risk in an Algerian population sample. Our findings suggest that the CT60 polymorphism is involved in genetic AS susceptibility but, curiously this SNP was associated only in the female group and in older patients. Further stratification based on the HLA-B27 status showed that the CT60*G allele was also associated with the disease in the HLA-B27- group. This association study strengthens our understanding of the link between the inhibitory signal resulting from the CTLA-4/CD80-CD86 binding and the AS pathogenesis. However, such studies should be performed on larger populations to deal with the statistical limitations. Moreover, it is important to include other variants in CTLA4 gene as the effect of some haplotype containing CT60 polymorphism seems higher than the effect of this SNP alone. This has to be confirmed with haplotype study in Algerian population.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all the patients who consented to take part in the present study, as well as the doctors for recruitment. We are grateful to Professor Elisabeth PETIT-TEIXEIRA, director for European Research Laboratory for Rheumatoid Arthritis, Genhotel-EA3686/Evry-Val D'Essonne University, for excellent technical assistance. We also thank Professor Habiba AMROUN and his colleagues for the help we received at the Pastor Institute of Algiers. This work was supported by the Laboratory of Molecular and Cell Genetics, University of Science and Technology of Oran and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

ETHICS

The experiment was supported by the Oran University Hospital Center's Ethics Committee.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest is declared.

ORCID

C. A. Dahmani  <http://orcid.org/0000-0002-9529-2936>

REFERENCES

- Abdelrahman, M. H., Mahdy, S., Khanjar, I. A., Siam, A. M., Malallah, H. A., Al-Emadi, S. A., ... Hammoudeh, M. (2012). Prevalence of HLA-B27 in patients with ankylosing spondylitis in Qatar. *International Journal of Rheumatology*, 2012, 860213. <https://doi.org/10.1155/2012/860213>
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology*, 1(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/35105024>
- Amor, B., Dougados, M., & Mijiyawa, M. (1990). [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. [Clinical Trial Multicenter Study]. *Revue Du Rhumatisme Et Des Maladies Osteo-Articulaires*, 57(2), 85–89.
- Amroun, H., Djoudi, H., Bussou, M., Allat, R., El Sherbini, S. M., Sloma, I., ... Tamouza, R. (2005). Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Human Immunology*, 66(10), 1057–1061. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.09.004>
- Atouf, O., Benbouazza, K., Brick, C., Saoud, B., Benseffaj, N., Amine, B., ... Essakalli, M. (2012). Distribution of HLA class I and II genes in ankylosing spondylitis patients from Morocco. *Pathologie Biologie*, 60(6), e80–e83. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.01.001>
- Barton, A., Jury, F., Eyre, S., Bowes, J., Hinks, A., Ward, D., & Worthington, J. (2004). Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3), 748–752. <https://doi.org/10.1002/art.20118>
- Bekada, A., Arauna, L. R., Deba, T., Calafell, F., Benhamamouch, S., & Comas, D. (2015). Genetic heterogeneity in Algerian human populations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS ONE*, 10(9), e0138453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138453>
- Benmansour, J., Stayoussef, M., Al-Jenaidi, F. A., Rajab, M. H., Rayana, C. B., Said, H. B., ... Almawi, W. Y. (2010). Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(9), 1473–1477. <https://doi.org/10.1128/CVI.00099-10>
- Bosch, E., Calafell, F., Perez-Lezaun, A., Comas, D., Mateu, E., & Bertranpetit, J. (1997). Population history of north Africa: Evidence from classical genetic markers. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Human Biology*, 69(3), 295–311.
- Brown, M. A., Pile, K. D., Kennedy, L. G., Campbell, D., Andrew, L., March, R., ... Wordsworth, B. P. (1998). A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis and Rheumatism*, 41(4), 588–595. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199804\)41:4<588:AID-ART5>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199804)41:4<588:AID-ART5>3.0.CO;2-0)
- Chen, S., Li, Y., Deng, C., Li, J., Wen, X., Wu, Z., ... Zhang, F. (2016). The associations between PD-1, CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: A meta-analysis and systemic review. *Rheumatology International*, 36(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s00296-015-3327-9>
- Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B., & Straub, R. H. (2004). Sex hormones influence on the immune system: Basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13(9), 635–638. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu1094oa>
- Dariavach, P., Mattei, M. G., Golstein, P., & Lefranc, M. P. (1988). Human Ig superfamily CTLA-4 gene: Chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic

- domains. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *European Journal of Immunology*, 18(12), 1901-1905. <https://doi.org/10.1002/eji.1830181206>
- Dougados, M., van der Linden, S., Juhlin, R., Huitfeldt, B., Amor, B., Calin, A., ... Zeidler, H. (1991). The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. [Clinical Trial Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis and Rheumatism*, 34(10), 1218-1227. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1529-0131](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1529-0131)
- Duan, Z., Pan, F., Zeng, Z., Zhang, T., Wang, S., Li, G., ... Zhang, L. (2012). Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: A meta-analysis. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Rheumatology International*, 32(5), 1209-1214. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1769-7>
- Farago, B., Kisfalvi, P., Magyari, L., Polgar, N., & Melegh, B. (2010). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen +49G variant confers risk for anti-CCP- and rheumatoid factor-positive type of rheumatoid arthritis only in combination with CT60G allele. *Autoimmune Diseases*, 2010, 285974. <https://doi.org/10.4061/2010/285974>
- Feldtkeller, E., Khan, M. A., van der Heijde, D., van der Linden, S., & Braun, J. (2003). Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology International*, 23(2), 61-66. <https://doi.org/10.1007/s00296-002-0237-4>
- Gonzalez, S., Torre-Alonso, J. C., Martinez-Borra, J., Fernandez Sanchez, J. A., Lopez-Vazquez, A., Rodriguez Perez, A., & Lopez-Larrea, C. (2001). TNF-238A promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Rheumatology*, 28(6), 1288-1293.
- Gonzalez-Roces, S., Alvarez, M. V., Gonzalez, S., Dieye, A., Makni, H., Woodfield, D. G., ... Lopez-Larrea, C. (1997). HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Tissue Antigens*, 49(2), 116-123. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1997.tb02724.x>
- Henn, B. M., Botigue, L. R., Gravel, S., Wang, W., Brisbin, A., Byrnes, J. K., ... Comas, D. (2012). Genomic ancestry of North Africans supports back-to-Africa migrations. [Historical Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002397. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002397>
- Ioannidis, J. P., Ntzani, E. E., Trikalinos, T. A. (2004). 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases. [Comparative Study Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature Genetics*, 36(12), 1312-1318. <https://doi.org/10.1038/ng1474>
- Kavvoura, F. K., Akamizu, T., Awata, T., Ban, Y., Chistiakov, D. A., Frydecka, I., ... Ioannidis, J. P. (2007). Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: A meta-analysis. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(8), 3162-3170. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0147>
- Kristiansen, O. P., Larsen, Z. M., & Pociot, F. (2000). CTLA-4 in autoimmune diseases - A general susceptibility gene to autoimmunity? [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Genes and Immunity*, 1(3), 170-184. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363655>
- Laval, S. H., Timms, A., Edwards, S., Bradbury, L., Brophy, S., Milicic, A., ... Brown, M. A. (2001). Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: Evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 918-926. <https://doi.org/10.1086/319509>
- Lei, C., Dongqing, Z., Yeqing, S., Oaks, M. K., Lishan, C., Jianzhong, J., ... Daming, R. (2005). Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *European Journal of Human Genetics*, 13(7), 823-828. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201423>
- Maier, L. M., Anderson, D. E., De Jager, P. L., Wicker, L. S., & Hafler, D. A. (2007). Allelic variant in CTLA4 alters T cell phosphorylation patterns. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18607-18612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706409104>
- Malquori, L., Carsetti, L., & Ruberti, G. (2008). The 3' UTR of the human CTLA4 mRNA can regulate mRNA stability and translational efficiency. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2007.10.004>
- van der Merwe, P. A., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P., & Davis, S. J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 393-403. <https://doi.org/10.1084/jem.185.3.393>
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Ng, S. C., Liao, Z., Yu, D. T., Chan, E. S., Zhao, L., & Gu, J. (2007). Epidemiology of spondyloarthritis in the People's Republic of China: Review of the literature and commentary. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 37(1), 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2007.01.003>
- Oaks, M. K., Hallett, K. M., Penwell, R. T., Stauber, E. C., Warren, S. J., & Tector, A. J. (2000). A native soluble form of CTLA-4. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cellular Immunology*, 201(2), 144-153. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1649>
- Piazza, A., Menozzi, P., & Cavalli-Sforza, L. L. (1980). The HLA-A, B gene frequencies in the world: Migration or selection? *Human Immunology*, 1(4), 297-304. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(80\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0198-8859(80)90105-6)
- Pincerati, M. R., Dalla-Costa, R., & Petzl-Erler, M. L. (2010). CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genetics and Molecular Biology*, 33(3), 442-444. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000073>
- Popa, O. M., Cherciu, M., Cherciu, L. I., Dutescu, M. I., Bojinca, M., Bojinca, V., ... Popa, L. O. (2016). ERAP1 and ERAP2 gene variations influence the risk of psoriatic arthritis in Romanian population. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 64(Suppl 1), 123-129. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0444-4>
- Reveille, J. D., Ball, E. J., & Khan, M. A. (2001). HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Current Opinion in Rheumatology*, 13(4), 265-272. <https://doi.org/10.1097/00002281-200107000-00004>
- Reveille, J. D., Sims, A. M., Danoy, P., Evans, D. M., Leo, P., Pointon, J. J., ... Brown, M. A. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature Genetics*, 42(2), 123-127. <https://doi.org/10.1038/ng.513>
- Rysnik, O., McHugh, K., van Duivenvoorde, L., van Tok, M., Guggino, G., Taurog, J., ... Bowness, P. (2016). Non-conventional forms of HLA-B27 are expressed in spondyloarthritis joints and gut tissue. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Autoimmunity*, 70, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.009>
- Sakly, N., Boumiza, R., Zrou-Hassen, S., Hamzaoui, A., Ben Yahia, S., Amara, H., ... Ghedira, I. (2009). HLA-B27 and HLA-B51 determination in Tunisian healthy subjects and patients with suspected ankylosing spondylitis and Behcet's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173, 564-569. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04756.x>
- Scalapino, K. J., & Daikh, D. I. (2008). CTLA-4: A key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 223, 143-155. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00639.x>
- Schirmer, M., Goldberger, C., Wurzner, R., Duftner, C., Pfeiffer, K. P., Clausen, J., ... Falkenbach, A. (2002). Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. [Research Support,

- Non-U.S. Gov't]. *Arthritis Research & Therapy*, 4(1), 71-76. <https://doi.org/10.1186/ar386>
- Sieper, J., Rudwaleit, M., Khan, M. A., & Braun, J. (2006). Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20(3), 401-417. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.02.001>
- Song, G. G., Kim, J. H., & Lee, Y. H. (2013). The CTLA-4 + 49 A/G, CT60 A/G and PTPN22 1858 C/T polymorphisms and susceptibility to vitiligo: A meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 2985-2993. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2370-9>
- Spoletini, M., Zampetti, S., Campagna, G., Marandola, L., Capizzi, M., & Buzzetti, R. (2013). Temporal trends of HLA, CTLA-4 and PTPN22 genotype frequencies among type 1 diabetes in Continental Italy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS ONE*, 8(4), e61331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061331>
- Tayel, M. Y., Soliman, E., El Baz, W. F., El Labaan, A., Hamaad, Y., & Ahmed, M. H. (2012). Registry of the clinical characteristics of spondyloarthritis in a cohort of Egyptian population. [Multicenter Study]. *Rheumatology International*, 32(9), 2837-2842. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2068-7>
- Torres, B., Aguilar, F., Franco, E., Sanchez, E., Sanchez-Roman, J., Jimenez Alonso, J., ... Gonzalez-Escribano, M. F. (2004). Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis and Rheumatism*, 50(7), 2211-2215. <https://doi.org/10.1002/art.20347>
- Torres-Carrillo, N., Ontiveros-Mercado, H., Torres-Carrillo, N. M., Parra-Rojas, I., Rangel-Villalobos, H., Ramirez-Duenas, M. G., ... Munoz-Valle, J. F. (2013). The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(3), 1217-1228. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9640-6>
- Toussirot, E., Saas, P., Deschamps, M., Pouthier, F., Perrot, L., Perruche, S., ... Wendling, D. (2009). Increased production of soluble CTLA-4 in patients with spondylarthropathies correlates with disease activity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arthritis Research & Therapy*, 11(4), R101. <https://doi.org/10.1186/ar2747>
- Tsukahara, S., Iwamoto, T., Ikari, K., Inoue, E., Tomatsu, T., Hara, M., ... Momohara, S. (2008). CTLA-4 CT60 polymorphism is not an independent genetic risk marker of rheumatoid arthritis in a Japanese population. [Letter Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(3), 428-429. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.079186>
- Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., ... Gough, S. C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature*, 423(6939), 506-511. <https://doi.org/10.1038/nature01621>
- Wang, N. G., Wang, D. C., Tan, B. Y., Wang, F., & Yuan, Z. N. (2015). Association between CTLA-4 gene polymorphism and ankylosing spondylitis: A case-control study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 7421-7425.

How to cite this article: Dahmani CA, Benzaoui A, Amroun H, et al. Association of the HLA-B27 antigen and the CTLA4 gene CT60/rs3087243 polymorphism with ankylosing spondylitis in Algerian population: A case-control study. *Int J Immunogenet*. 2018;00:1-9. <https://doi.org/10.1111/iji.12369>

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdelmalek Soumia. (2015) Spondylarthrite rhumatoïde ankylosante. *Mémoire de fin d'étude soutenu à l'Université abou bekr belkaid-Tlemcen, Faculté de médecine.*

Abdelrahman MH, Mahdy S, Khanjar IA, Siam AM, Malallah HA, Al-Emadi SA, *et al.* (2012) Prevalence of HLA-B27 in Patients with Ankylosing Spondylitis in Qatar. *International journal of rheumatology 2012: 1-3.*

Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. (2000) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology 31(1):49-53.*

Ahmed AZ, El-Shahaly HA, Omar AS, Ghattas MH. (2013) Patterns of angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism among an Egyptian cohort of patients with rheumatoid arthritis. *International Journal Rheumatic Diseases 16 (3):284-290.*

Akkoç N, Yarkan H, Kenar G, Khan MA. (2017) Ankylosing Spondylitis: HLA-B*27-Positive Versus HLA-B*27-Negative Disease. *Curr Rheumatol Rep 19(5):26.*

Al-Awadhi AM, Hasan EA, Sharma PN, M Zafaryab Haider, Al-Saeid K. (2007) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatology International 27(12):1119–1123.*

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. (1993) CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *The Journal of Experimental Medicine 178(2): 669-674.*

Alexeeva L, Krylov M, Vturin V, Mylov N, Erdesz S, Benevolenskaya L.. (1994) Prevalence of spondyloarthropathies and HLA-B27 in the native population of Chukotka, Russia. *J Rheumatol 21(12):2298–2300.*

Al-Harbi K.M, Ibrahim S Almuzaini, Mohamed M Morsy, Nada A Abdelaziz, Alia M Al-Balawi, Atiyeh M. Abdallah. (2015) Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Saudi patients with rheumatic heart disease. *Saudi Med J 36(2): 176–180.*

Almal SH and Padh H. (2012) Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *Journal of Human Genetics 57: 6-13.*

Alsaeid K, Haider MZ, Ayoub EM. (2003) Angiotensin converting enzyme gene insertion-deletion polymorphism is associated with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol 30(12):2705-9.*

Altman A and Villalba M. (2002) Protein kinase C-theta (PKC theta) a key enzyme in T cell life and death. *Journal of Biochemistry 132(6):841-6.*

Amor B, Dougados M, Mijiyawa H. (1990) Critères de classification des spondyloarthropathies. *Revue de Rhumatisme et Maladies Osteoarticulaires 57(2):85–89.*

Amor B, Dougados M, Lustrat V, Menkes CJ, Dubost JJ, Roux H, *et al.* (1991) Evaluation of the Amor criteria for spondylarthropathies and European Spondylarthropathy Study Group (ESSG). A cross-sectional analysis of 2,228 patients. *Ann Med Interne (Paris)* 142(2): 85-89.

Amor B, Dougados M, Lustrat V, Menkes CJ, Roux H, Benhamou C, *et al.* (1995) Are classification criteria for spondylarthropathy useful as diagnostic criteria ? *Revue de Rhumatisme English Ed* 62(1): 10-15.

Amrani Asma. (2015) Etude d'association entre certains polymorphismes du système rénine angiotensine aldostérone et l'hypertension artérielle au sein d'un échantillon de la population Oranaise. *Thèse de Doctorat soutenue à l'Université d'Oran 1.*

Amroun H, Djoudi H, Busson M, Allat R, El Sherbini SM, Sloma I, *et al.* (2005) Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. *Human immunology* 66(10):1057-1061.

Anjos SM, Shao W, Marchand L, Polychronakos C. (2005) Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a reevaluation of the 3' +6230G>A polymorphism. *Genes Immun.* 6(4): 305-311.

Anjos SM and Polychronakos C. (2006) Functional evaluation of the autoimmunity-associated CTLA4 gene: the effect of the (AT) repeat in the 3'untranslated region (UTR) *J Autoimmun* 27:105-109.

Aquaro S, Menten P, Struyf S, Proost P, Van Damme J, De Clercq E, *et al.* (2001) The LD78beta isoform of MIP-1alpha is the most potent CC-chemokine in inhibiting CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages. *J Virol* 75(9): 4402-4406.

Arendt CW, Albrecht B, Soos TJ, Littman DR. (2002) Protein kinase C-theta signaling from the center of the T-cell synapse. *Current Opinion in Immunology* 14(3):323-30.

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

Astier Frédérique. (2012) La spondylarthrite ankylosante et la place de l'immunothérapie dans son traitement. *Thèse soutenue à l'Université De Limoges, Faculte De Pharmacie.*

Atouf O, Benbouazza K, Brick C, Saoud B, Benseffaj N, Amine B, *et al.* (2012) Distribution of HLA class I and II genes in ankylosing spondylitis patients from Morocco. *Pathol Biol (Paris)* 60(6):80-83.

Azizi E, Massoud A, Amirzargar AA, Mahmoudi M, Soleimanifar N, Rezaei N, *et al.* (2010) Association of CTLA4 gene polymorphism in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol* 30:268-271.

B

Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, *et al.* (2000) Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondylarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis* 59: 945-53.

- Bagheri H, Badduke C, Ying Q, Colnaghi R, Abramowicz I, Alcantara D, *et al.* (2016) Identifying candidate genes for 2p15p16.1 microdeletion syndrome using clinical, genomic, and functional analysis. *JCI Insight*. 1(3): e85461.
- Baier G. (2003) The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev* 192:64–79.
- Barkett M and Gilmore TD. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924.
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, *et al.* (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297(5583): 1003-1007.
- Barrett JC, Clayton D, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, *et al.* (2009) Genome-wide association study and meta-analysis finds over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41(6):703-7.
- Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, *et al.* (2008) Identification of novel RA susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* 40(10): 1156–1159.
- Baylis C and Brenner BM. (1978) Modulation by prostaglandin synthesis inhibitors of the action of exogenous angiotensin U on glomerular ultrafiltration in the rat. *Circ Res* 43: 889- 898.
- Bayram B, Sayın E, Güneş HV, Değirmenci I, Türkoğlu Z, Doganer F, Coşan DT. (2011) DD genotype of ace gene I/D polymorphism is associated in a Turkish study population with osteoarthritis. *Mol Biol Rep* 38(3):1713-6.
- Belkhou A, Bakri Y, Yakoubi H, Mohamed Amine, Radouane Niamane, Selma El Hassani. (2013) Prevalence of HLA B-27 in ankylosing spondylitis in Morocco. *Rev Mar Rhum* 25: 38-41.
- Ben Dror L, Barnea E, Beer I, Mann M, Admon A. (2010) The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum* 62:420-9.
- Ben Kilani Mohamed Sahbi. (2014) Analyses des Variations de Nombre de Copies de gènes candidats dans la Polyarthrite Rhumatoïde. *Thèse soutenue à l'Université d'Evry Val d'Essonne, France au GENHOTEL-EA3886.*
- Ben Kilani MS, Achour Y, Perea J, Cornelis F, Bardin T, Chaudru V, *et al.* (2016) Characterization of copy number variants for CCL3L1 gene in rheumatoid arthritis for French trio families and Tunisian cases and controls. *Clin Rheumatol* 35(8):1917-1922.
- Benokba Talalgie K. (2017) 9 origines des douleurs du talon. *Santé Orthopédique, mise à jour 08/10/2017.*
- Benmansour J, Stayoussef M, Al-Jenaidi FA, Rajab MH, Rayana CB, Said HB, *et al.* (2010) Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. *Clinical and vaccine immunology CVI* 17:1473-1477.
- Berkman N, John M, Roesems G, Jose P J, Barnes P J and Chung K F. (1995). Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 155(9): 4412-4418.

- Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, María T, Díaz-Gallo LM, Gómez-García M, *et al* (2010) CD40: Novel Association with Crohn's Disease and Replication in Multiple Sclerosis Susceptibility. *Edited by Francesc Palau. PLoS ONE 5, no 7.*
- Bouras N, Benzaoui A, Messal I, Boushaba N, and Boudjema A. (2017) Study of Association between the Polymorphism of MICA Gene (met 129 val) and Ankylosing Spondylitis in a Sample of the Population of Western Algeria. *J Mol Biomark Diagn 8:4.*
- Bourriaud Clémentine. (2014) La spondylarthrite ankylosante à propos d'un cas : Diagnostic, prise en charge, thérapeutiques et évolution de la pathologie au cours d'une vie. *Thèse soutenue à l'Université de POITIERS, Faculté de Médecine et de Pharmacie.*
- Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, *et al.* (1995) Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum 38: 499–505.*
- Braun J. (2007) Ankylosing spondylitis. *The Lancet. Vol. 369 page 1379-1390.*
- Breban M, Said-Nahal R, Hugot JP, Miceli-Richard C. (2003) Familial and genetic aspects of spondyloarthropathy. *Rheum Dis Clin North Am 29: 575–594.*
- Breban Maxime. (2004) “la spondylarthrite cordoonnée par Maxime Breban”. *Edition JOHN LIBBEY EUROTTEXT pages 33-36.*
- Breban MA, Leboime I, Fert and Furetc J. (2011) Microbiote intestinal et spondylarthrites: quelles perspectives? *Revue du Rhumatisme 78(5): A35-A36.*
- Breunis WB, Van Mirre E, Geissler J, Laddach N, Wolbink G, van der Schoot E, *et al.* (2009) Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C, FCGR3B, but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat 30: E640–E645.*
- Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. (1973) Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet 1(7809): 904-907.*
- Brezar V, Tu WJ, Seddiki N. (2015) PKC-theta in regulatory and effector T-cell functions. *Front Immunol 6: 530.*
- Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J. (1996) HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis 55(4): 268–270.*
- Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, *et al.* (1997) Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum 40(10): 1823-1828.*
- Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Campbell D, Andrew L, March R, *et al.* (1998b) A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum 41: 588–595.*
- Brown MA, Kennedy LG, Darke C, Gibson K, Pile KD, Shatford JL, *et al.* (1998a) The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum 41(3): 460-5.*

Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. (2000a) Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 59(11): 883-886.

Brown MA, Edwards S, Hoyle E, Campbell S, Laval S, Daly AK, *et al.* (2000b) Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet* 9:1563-1566.

Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, *et al.* (2007) Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet* 39: 1329-1337.

Bustin SA. (2000) Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.

C

Cabrera S, Sanchez E, Requena T, Martinez-Bueno M, Benitez J, Perez N, *et al.* (2014) Intronic Variants in the NFKB1 Gene May Influence Hearing Forecast in Patients with Unilateral Sensorineural Hearing Loss in Meniere's disease. *PLoS ONE* 9 (11):e112171.

Caffrey MF and James DC. (1973) Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature* 242:121.

Calin A, Elswood J, Rigg S, Skevington SM. (1988) Ankylosing spondylitis. An analytical review of 1 500 patients: the changing pattern of disease. *J Rheumatol* 15: 1234-8.

Cambien F, Soubrier F. (1995) The angiotensin-converting enzyme: molecular biology and implication of the gene polymorphism in cardiovascular diseases. *Hypertension: Pathophysiology, Dignosis, and Management, Second Edition* 3:250-258.

Campbell IK, Gerondakis S, O'Donnell K, Wicks IP. (2000) Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in infl ammatory arthritis. *J Clin Invest* 105:1799-806.

Canoui-Poitrine F, Lekpa FK, Farrenq V, Boissinot V, Hacquard-Bouder C, Comet D, *et al.* (2012) Prevalence and factors associated with uveitis in spondylarthritis patients in France: results from an observational survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64:919-924.

Carmody RJ, Ruan Q, Liou HC, Chen YH. (2007) Essential Roles of c-Rel in TLR-Induced IL-23 p19 Gene Expression in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 178(1): 186-191.

Carpenter D, Färnert A, Rooth I, Armour J AL and Shaw Marie-Anne. (2012) CCL3L1 copy number and susceptibility to malaria. *Infect Genet Evol* 12(5): 1147-1154.

Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, Miceli-Richard C, Bourgain C. (2007) Combined analysis of three whole genome linkage scans for Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 46: 763-771.

Cauli A, Vacca A, Mamei A, Passiu G, Fiorillo MT, Sorrentino R, *et al.* (2007) A Sardinian patient with ankylosing spondylitis and HLA-B*2709 co-occurring with HLA-B*1403. *Arthritis Rheum* 56(8): 2807-2809.

Chable-Bessia Christine. (2004) Rôle de hdac4 dans la régulation du facteur de transcription nf-kb. *Thèse soutenue à l'École Pratique des Hautes Études. Section des Sciences de la Vie et de la Terre.*

- Chai W, Lian Z, Chen C, Liu J, Shi LL and Wang Y, *et al.* (2013) JARID1A, JMY, and PTGER4 Polymorphisms are related to Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Patients: A Case-Control Study. *PLoS ONE* 8(9): 1-8.
- Chalghouma Y, Noichria Z, Jaidanea, Gammoudia H, Chaheda A, Dandanaa S, *et al.* (2010) Activity of angiotensin I converting enzyme and hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with coronary disease. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*; 25:185–190.
- Chang X, Zheng Y, Yang Q, Wang L, Pan J, Xia Y, *et al.* (2012) Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Therapy* 14(4): 1-14.
- Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Drosos AA. (2011) What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies? *Autoimmun Rev* 10(8) 464-468.
- Chen F, Xu Lei, Zhao Tingting, Xiao Xiang, Pan Yongquan, Hou Shengping. (2016) Genetic Variation in the REL Gene Increases Risk of Behcet's Disease in a Chinese Han Population but That of PRKCQ Does Not. *PLoS ONE* 11(1):1-8.
- Chen JY, Wang CM, Chang SW, Cheng CH, Wu YJ, Lin JC, *et al.* (2014) Association of FCGR3A and FCGR3B copy number variations with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in Taiwanese patients. *Arthritis Rheumatol* 66:3113–3121.
- Cheng N, Cai Q, Meng F, Duan S, Lin J, Hu Ji, *et al.* (2009) No significant association between genetic polymorphisms in the TNAP gene and ankylosing spondylitis in the Chinese Han population. *Rheumatol Int* 29: 305–310.
- Chou CT, Timms AE, Wei JCC, Tsai WC, Wordsworth BP and Brown MA. (2006) Replication of association of IL1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Taiwanese Chinese. *Ann Rheum. Diseases* 65: 1106–1109.
- Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. (1998) Up-regulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*; 1401: 187-194.
- Ciccia F, Bombardieri M, Principato A, Giardina A, Tripodo C, Porcasi R, *et al.* (2009) Overexpression of Interleukin-23, but Not Interleukin-17, as an Immunologic Signature of Subclinical Intestinal Inflammation in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatism* 60(4); 955-965.
- Ciurea A, Scherer A, Exer P, Bernhard J, Dudler J, Beyeler B, *et al.* (2013) Tumor necrosis factor α inhibition in radiographic and nonradiographic axial spondyloarthritis: results from a large observational cohort. *Arthritis Rheum* 65(12):3096-106.
- Clark EA. (1990) CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* 36(1): 33-36
- Claudepierre P, Wendling D, Breban M, Goupille P, Dougados M. (2012) Spondylarthrite ankylosante, spondylarthropathies, spondylarthrite(s) ou spondyloarthrites: de quoi parlons-nous ou comment mieux se comprendre? *Revue de rhumatisme* 79: 377-378.
- Colombo R. (1559) De Re Anatomica. *Libri XV*.
- Conrad DF, Pinto Dalila, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, *et al.* (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464(7289): 704-712.

Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen J, *et al.* (2008) Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes loci. *Nat Genet* 40(12): 1399–1401.

Cordell HJ and Clayton DG. (2005) Genetic association studies. *Lancet* 24-30; 366(9491):1121-1131.

Corinti S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Cavani A, Angelisova P, and Girolomoni G. (1999) Crosslinking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. *J Immunol* 162:6331-6336.

Costantino F. (2014) Recherche de nouveaux facteurs génétiques de susceptibilité à la spondyloarthrite grâce à une approche associant études familiales et génomique fonctionnelle. *Thèse soutenue à l'Université Paris Descartes, École Doctorale GC2ID.*

Costello ME, Ciccio F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, *et al.* (2015) Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 67(3):686-691.

Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. (1993) Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 290: 33-40.

Croker JA and Kimberly RP. (2005) Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 17(5): 529-537.

Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. (2004). Sex hormones influence on the immune system: Basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupu*, 13(9): 635–638.

D

D'Agostino MA1, Said-Nahal R, Hacquard-Bouder C, Brasseur JL, Dougados M, Breban M. (2003) Assessment of peripheral enthesitis in the spondylarthropathies by ultrasonography combined with power Doppler: a cross-sectional study. *Arthritis Rheum* 48(2): 523-533.

Dahmani CA, Benzaoui A, Amroun H, Mecabih F, Sediki FZ, Zemani-Fodil F, *et al.* (2018) Association of the HLA-B27 antigen and the CTLA4 gene CT60/rs3087243 polymorphism with ankylosing spondylitis in Algerian population: A case-control study. *Int J Immunogenet* 45(3):109-117.

Dalbeth N, Edwards J, Fairchild S, Callan M, Hall FC. (2005) The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44:24–31.

Dariavach P, Matte' i MG, Golstein P, Lefranc MP. (1988) Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 18: 1901–1905.

Daser A, Thangavelu M, Pannell R, Forster A, Sparrow L, Chung G, *et al.* (2006). Interrogation of genomes by molecular copy-number counting (MCC). *Nat Methods* 3(6): 447-453.

Davatchi F1, Jamshidi AR, Banihashemi AT, Gholami J, Forouzanfar MH, Akhlaghi M, *et al.* (2008) WHO-ILAR COPCORD Study (Stage 1, Urban Study) in Iran. *J Rheumatol* 35: 1384.

De Blecourt J, Polman A, De Blecourt-Meindersma T. (1961) Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 20: 215-20.

- De Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, and von dem Borne AE. (1995) Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 86(6): 2403-2413.
- De Vlam K. (2010) Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24 (5): 671-682.
- Debette S. (2012) Comment lire une étude d'association génétique pangénomique (GWAS)? *STV* 24(5): 240-247.
- De Lartigue Jane. (2013) The Inflammation Link: NF-κB remains a Difficult but Intriguing Target. *Oncology Live* 56(9):3666-3679
- Deichmann K, Heinzmann A, Brüggelnte E, Forster J, Kuehr J. (1996) An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 817-818.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA et al. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 429-438.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. (2000) Activation of the IκappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
- Diall AA. (2011) Etude des aspects pharmaco-épidémiologiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion au CHU du point G. *Doctorat. Université de BAMAKO.*
- Díaz-Peña R, Aransay AM, Bruges-Armas J, López-Vázquez A, Rodríguez-Ezpeleta N, Mendibil I, et al. (2011) Fine mapping of a major histocompatibility complex in ankylosing spondylitis: association of the HLA-DPA1 and HLA-DPB1 regions. *Arthritis Rheum* 63(11):3305-12.
- Díaz-Peña R, Castro-Santos P, Aransay AM, Bruges-Armas J, Pimentel-Santos FM, López-Larrea C. (2013) Genetic study confirms association of HLA-DPA1 (*) 01:03 subtype with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive populations. *Hum Immunol* 74: 764-767.
- Djouadi K, Nedelec B, Tamouza R, Genin E, Ramasawmy R, Charron D, et al. (2001) Interleukin 1 gene cluster polymorphisms in multiplex families with spondylarthropathies. *Cytokine* 13(2):98-103.
- Donner H, Seidl C, Braun J, Siegmund T, Herwig J, Seifried E, et al. (1998) CTLA4 gene haplotypes cannot protect from IDDM in the presence of high- risk HLA DQ8 or DQ2 alleles in German families. *Diabete* 47: 1158-1160.
- Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. (1991) The European spondylarthropathy study group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 34: 1218-1227.
- Dougados, M. la spondylarthrite en 100 questions. (2005) [en ligne] consultation en decembre 2013.
- Drouart M, Saas P, Billot M, Cedoz JP, Tiberghien P, Wendling D, et al. (2003) High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies. *Clin Exp Immunol* 132:158-62.

Duan ZH, Pan FM, Zeng Z, Zhang TC, Wang S, GX Li, *et al.* (2012) The FCGR2B rs10917661 polymorphism may confer susceptibility to ankylosing spondylitis in Han Chinese: a case-control study. *Scand J Rheumatol* 41: 219–222.

E

Egen JG and Allison JP. (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*16(1):23-35.

Einarsdottir E, Soderstrom I, Lofgren-Burstrom A, Haraldsson S, Nilsson- Ardnor S, Penha-Goncalves C, *et al.* (2003) The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Hum Genet* 11:81-84.

El Maghraoui A. (2011) Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: Prevalence, characteristics and therapeutic implications. *European Journal of Internal Medicine. In Press, Corrected Proof* 7.

Estivill X and Armengol L. (2007) Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet* 3(10):1787-1799.

Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, *et al.* (2011) Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 43: 761–767.

Eyre S, Hinks A, Flynn E, Martin P, Wilson AG, Maxwell JR, *et al.* (2010) Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. *Ann Rheum Dis* 69:1572–1573.

Ezerzer C. and Harris N. (2007) Physiological immunity or pathological autoimmunity--a question of balance. *Autoimmun Rev* 6(7): 488-496.

F

Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ. (2010) Gene copy number variation and common human disease. *Clin Genet* 77:201–213.

Farago B, Kisfali P, Magyari L, Polgar N, Melegh B. (2010) Cytotoxic T lymphocyte-Associated Antigen +49G Variant Confers Risk for Anti-CCP- and Rheumatoid Factor-Positive Type of Rheumatoid Arthritis Only in Combination with CT60G Allele. *Autoimmune diseases* 285974.

Fekih-Mrissa N, Bedoui I, Sayeh A, Derbali H, Mrad M, Mrissa R, *et al.* (2017) Association between an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and Alzheimer's disease in a Tunisian population. *Ann Gen Psychiatry* 16:41.

Feldtkeller E, Bruckel J, Khan MA. (2000) Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups. *Curr Opin Rheumatol* 12: 239–247.

Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, *et al.* (2008) Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 4(4): 1-10.

- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7(2):85-97.
- Field SF, Howson Joanna MM, Maier LM, Walker Su, Walker NM, Smyth DJ, *et al.* (2009) Experimental aspects of copy number variant assays at CCL3L1. *Nat Med* 15(10): 1115-1117.
- Filion LG, Matusевич D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS. (2003) Monocytederived IL12, CD86 (B72) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 106(2):127-138.
- Forbes SA and J Trowsdale. (1999) The MHC quarterly report. *Immunogenetics. United States* 50: 152-159.
- Fournié B. (2004) Pathology and clinico-pathologic correlations in spondylarthropathies. *Joint Bone Spine (in press)* 71(6):525-529.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10: 241-251.
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, *et al.* (2006) Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16(8):949-961.
- Freudenthal PS and Steinman RM. (1990) The distinct surface of human blood dendritic, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(19): 7698–7702
- Freitas A.I, Isabel Mendonça, Maria Brión, Miguel M Sequeira, Roberto P Reis, Angel Carracedo, *et al.* (2008) RAS gene polymorphisms, classical risk factors and the advent of coronary artery disease in the Portuguese population. *BMC Cardiovascular Disorders* 8:15.
- Fullard N, Wilson CL, Oakley F. (2012) Roles of c-Rel signaling in inflammation and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 851– 860
- Furuichi T, Maeda K, Chou CT, Liu YF, Liu TC, Miyamoto Y, *et al.* (2008) Association of the MSX2 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in Japanese. *J Hum Genet* 53(5):419-24.
- Fyrquist F and Saijonmaa O. (2008) Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine* 264(3): 224–236.

G

- Gammelgaard I, Wamberg S, Bie P. (2006) Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin–angiotensin–aldosterone-system. *Acta Physiologica* 188(2): 129–138.
- García-Bermúdez Mercedes, Carlos Gonza´lez-Juanatey, Raquel Lo´pez-Mejías, Mari´a Teruel, Alfonso Corrales, Jose´A. Miranda-Fillooy *et al.* (2012) Study of Association of CD40-CD154 Gene Polymorphisms with Disease Susceptibility and Cardiovascular Risk in Spanish Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS ONE* 7(11): e49214.
- Gaucher A, Péré P, Régent D, Grandhay P, Aussedat R, Vivard T. (1987) Spondylarthropathies or ossifying polyenthesitis. Scintigraphic and scanographic evidence. *Rev Rhum* 54:243–248.

- Gergely P Jr, Blazsek A, Weiszhar Z, Pazár B, Poór G. (2006) Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology (Oxford)* 45: 1194–1196.
- Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, *et al.* (1996) CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 19 93(6):2499-2504.
- Ghannouchi M, Hamdi W, Kaffel D, Kochbati S, Besbes S, Kchir M. (2009) Statut hormonal chez les patients atteints d'une spondylarthrite ankylosante avec ostéoporose. *SFR - Soumission Congrès*.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
- Gilmore TD and Gerondakis S. (2011) The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* 2(7):695-711.
- Gimbrone MA and Alexander RW. (1975) Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. *Science* 189: 219-220.
- Gineviciene V, Jakaitiene A, Aksenov MO, Aksenova AV, Druzhevskaya AM, Astratenkova IV, *et al.* (2016) Association analysis of ACE, ACTN3 and PPARGC1A gene polymorphisms in two cohorts of European strength and power athletes. *Biology of Sport* 33(3):199-206.
- Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PM. (2003) The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 56(11):1129-1135.
- Godessart N and Kunkel SL. (2001) Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 13 (6): 670-675.
- Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, Kaluza W, Laiho K, Weeks DE, *et al.* (2003) Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 4:74–76.
- Gomes BO. (2003) Etude d'une voie de signalisation intervenant dans la production de cytokines par les lymphocytes T. Thèse d'exercice présentée et soutenue publiquement à l'Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, *et al.* (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307(5714): 1434-1440.
- Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. (1996) Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J* 334(25):1649-1654.
- Graf SW, Lester S, Nossent JC, Hill CL, Proudman SM, Lee A, *et al.* (2012) Low copy number of the FCGR3B gene and rheumatoid arthritis: a case-control study and Meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 14:R28.
- Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu Y, Remmers EF, Kastner DL, *et al.* (2009) REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 41 (7):820-823.
- Griffiths CEM and Barker JNWN. (2007) Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370: 263–271.

- Gu W, Zhang F, Lupski JR. (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1(1): 4.
- Guo ZS, Li C, Lin ZM, Huang JX, Wei QJ, Wang XW, *et al.* (2010) Association of IL-1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Int J Immunogenet* 37: 33–37.

H

- Hacquard C and Breban M. (2004) Physiopathologie de la spondylarthrite. In: Breban, editor. La spondylarthrite. Montrouge: John Libbey Eurotext. p. 17–42.
- Hacquard-Bouder C and Breban M. (2006) Arthrites réactionnelles. *EMC 0521(09): 1-9.*
- Hadjadj S, Tarnow L, Forsblom C, Gbenga K, Marre M, Groopet PH, *et al.* (2007) Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and diabetic nephropathy: case-control, haplotype, and family-based study in three European populations. *J Am Soc Nephrol* 18:1284–1291.
- Hamdi W, Kaffel D, Ghannouchi MM, Laadhar L, Makni S, Montacer Kchir M. (2012) Particularités cliniques, radiologiques et biologiques de la spondylarthrite ankylosante en tunisie selon la présence ou l'absence du HLA-B27 et de ses sous-types. *Rev Med Liège* 67(7-8): 391-397.
- Hardy GH. (1908) Mendelian proportions in a mixed population, *Science N S Vol XXVIII: 49–50.*
- Haroon N, Tsui FW, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Inman RD. (2012) Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 71:589–595.
- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei, MG, Lucian MF and Golstein P. (1991) CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147: 1037–1044.
- HAS Service des bonnes pratiques professionnelles et Service évaluation économique et santé publique (2008) Diagnostic, prise en charge thérapeutique et suivi des spondylarthrites. [En ligne, mise à jour Nov 2015].
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10(8): 551-564.
- Hayashi K and Altman A. (2007) Protein kinase C theta (PKCtheta): a key player in T cell life and death. *Pharmacol Res* 55: 537–544.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, *et al.* (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83: 8604-10.
- Hinks A, Eyre S, Ke X, Barton A, Martin P, Flynn E, *et al.* (2010) Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*; 69:1049–1053.
- Hmimech W, Idrissi HH, Diakite B, Korchi F, Baghdadi D, Tahri Joutey Hassani Idrissi H, *et al.* (2017) Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene on myocardial infarction susceptibility among young Moroccan patients. *BMC Res Notes* 10(1):763.

Holowka D, Sil D, Torigoe C, Baird B. (2007) Insights into immunoglobulin E receptor signaling from structurally defined ligands. *Immunol Rev* 217:269-279.

Hong SJ, Yang HI, Yoo MC, In CS, Yim SV, Jin SY, *et al.* (2003) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Korean patients with primary knee osteoarthritis. *Exp Mol Med* 35:189–195

Howard TE, Shai SY, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE. (1990) Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Molecular and Cellular Biology* 10(8): 4294–4302.

Hoyle I, Laval SH, Calin A, Wordsworth BP, Brown MA. (2000) Wordsworth, B. P. & Brown, M. A. The X-chromosome and susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 43:1353–1355.

Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. (1991) Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 266(23):15377-83.

Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, *et al.* (2013) The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem* 59(6): 892-902.

Hukuda S, Minami M, Saito T, Mitsui H, Matsui N, Komatsubara Y, *et al.* (2001) Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan Ankylosing Spondylitis Society. *J Rheumatol* 28: 554–559.

I

Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, *et al.* (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9): 949-951.

İnal EE, Görükmez O, Eroğlu S, Görükmez Ö, Solak Ö, Topak A, *et al.* (2016) Association of GSTM1, GSTT1, GSTP1-ILE105VAL and ACE I/D polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 36(1): 17-23.

Inanır A, Yigit S, Tural S, Ozturk SD, Akkanet S, Habiboğlu A. (2012) Significant association between insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and ankylosing spondylitis. *Molecular Vision* 18: 2107-2113.

International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, *et al.* (2013) Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune related loci. *Nat. Genet* 45: 730–738.

J

Jaakkola E, Crane AM, Laiho K, Herzberg I, Sims AM, Bradbury L, *et al.* (2004) The effect of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 43: 32–38.

Jackson A, Brown K, Langdown J, Luddington R, Baglin T. (2000) Effect of the angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism on the risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 111:562–564.

Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. (2005) A graves disease-associated kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 146:2684-2691.

Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, *et al.* (2007) A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. *Genes Immun* 8:205–214.

Jacques P and Elewaut D. (2008) Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. *Mucosal Immunol* 1(5): 364-371.

Janke R, Ballaschk M, Schmieder P, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Loll B. (2017) Crystal structure of HLA-B*27:09 complexed with the self-peptide pVIPR and Copper. Metal-triggered conformational reorientation of a HLA-B*27-bound self-peptide. *Synthetic construct, Homo sapiens*.

Jarvinen P. (1995) Occurrence of ankylosing spondylitis in a nationwide series of twins. *Arthritis Rheum* 38(3): 381-383.

Jayapalan JJ, Muniandy S, Chan SP. (2008) Angiotensin-1 converting enzyme I/D gene polymorphism: scenario in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39:917-921.

Jean-Baptiste Michel. (2004) Système rénine-angiotensine et remodelage vasculaire. *Médecine/sciences* 20(4): 409-413.

Jeandel P, Roux H. (2002) Épidémiologie des affections rhumatologiques. *Revue du Rhumatisme* 69: 764- 776.

Jianming W, Yunfang L, Guan W, Viken K, Perlman DM, Bhargava M. *FCGR3A* and *FCGR3B* copy number variations are risk factors for sarcoidosis. *Hum Genet* (2016) 135:715–725.

Jin L, Weisman M, Zhang G, Ward M, Luo J, Bruckel J, *et al.* (2005) Lack of association of matrix metalloproteinase 3 (MMP3) genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility and severity. *Rheumatology (Oxford)* 44:55–60.

Jung SH, Yim SH, Hu HJ, Lee KH, Lee JH, Sheen DH, *et al.* (2014) Genome-Wide Copy Number Variation Analysis Identifies Deletion Variants Associated With Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatology* 66(8): 2103–2112

K

Kaartinen T, Lappalainen J, Haimila K, Autero M, Partanen Jukka. (2007) Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. *Molecular Immunology* 44: 1644–1651

Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, Morton PA, Loh DY, Bluestone JA, *et al.* (1995) Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J Immunol* 155: 1032–1036.

Kadi Amir. (2012). Etude des gènes candidats positionnels du locus SPA2 de prédisposition aux spondylarthrites. Présentée et soutenue publiquement le 27 novembre 2012. Ecole doctorale: Biologie et Biotechnologie B2T, Université Paris Diderot (Paris 7).

- Keat A. (2010) Ankylosing spondylitis. *Medicine (Baltimore)* 38(4): 185-189.
- Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, *et al.* (1998) Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. *Hum Mol Genet* 7: 1745–1751.
- Khader MN, Hammoudeh M, Khan MA. (2012) HLA-B27 Prevalence in Arab Populations and Among Patients with Ankylosing Spondylitis. *The Journal of Rheumatology* 39(8):1675-1677.
- Khan MA. (1995) HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 7: 263–269.
- Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. (2007) The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev* 6(3): 183-189.
- Kiani AK, Jahangir S, John P, Bhatti A, Zia A, Wang X, *et al.* (2015) Genetic link of type 1 diabetes susceptibility loci with rheumatoid arthritis in Pakistani patients. *Immunogenetics* 67(5-6):277-82.
- Kim TH, Uhm WS and Inman RD. (2005) Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17: 400-405.
- Kim TH, Kim TH, Lee HJ, Peddle L, Rahman P, Hu P, *et al.* (2005) Interleukin 1 and nuclear factor-kappaB polymorphisms in ankylosing spondylitis in Canada and Korea. *J Rheumatol* 32: 1907–1910.
- Koene H, Masja de H, Marion K, Dirk R, Albert E. G. Kr Von Dem Borne. (1996) NA-phenotype-dependent differences in neutrophil Fc gamma RIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble Fc gamma RIII. *Br J Haematol* 93 (1): 235-241.
- Kofler K, Köchl S, Parson W, Erdel M, Utermann G, Baier G. (1998) Molecular characterization of the human protein kinase C theta gene locus (PRKCQ). *J Biol Chem* 268(7):4997-5004.
- Koshy M, Berger D, Crow MK. (1996) Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 98(3): 826–837.
- Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. (2000) CTLA-4 in autoimmune diseases, a general susceptibility gene to autoimmunity. *Genes and Immunity* 1: 170–184.
- Krummel MF and Allison JP. (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182: 459–465.

L

- Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboull, Chevalier X, *et al.* (2001) Immunohistological study of entheses in spondylarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 316–321.
- Laraqui A. (2006) Étude des facteurs métaboliques et polymorphismes génétiques prédisposant à la survenue de l'athérosclérose coronaire. *Université Mohammed V-Agdal Rabat.*
- Larsen ZM, Kristiansen OP, Mato E, Johannesen J, Puig-Domingo M, de Leiva A, *et al.* (1999) IDDM12 (CTLA4) on 2q33 and IDDM13 on 2q34 in genetic susceptibility to Type 1 diabetes (insulin-dependent). *Autoimmunity* 31: 35–42.

- Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, Milicic A, *et al.* (2001) Whole genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 68 (4): 918-926.
- Lederman MM and Sieg SF. (2007) CCR5 and its ligands: a new axis of evil? *Nat Immunol* 8 (12): 1283-1285.
- Lee SH, Lee YA, Woo DH, Song R, Park EK, Ryu MH, *et al.* (2006) Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther* 8:1-6.
- Lee WY, Chang YH, Lo MK, Chang CP, Yang SC, Yang TP. *et al.* (2010) Polymorphisms of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and cytokine genes in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 75, 119–126.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. (2005) Ankylosing spondylitis susceptibility loci defined by genome-search meta-analysis. *J Hum Genet* 50: 453–459.
- Leeman JR, Weniger MA, Barth TF, Gilmore TD. (2008) Deletion analysis and alternative splicing define a transactivation inhibitory domain in human oncoprotein REL. *Oncogene* 27(53): 6770–6781.
- Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks MK, Lishan C, Jianzhong J, *et al.* (2005) Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *European journal of human genetics. EJHG* 13: 823-828.
- Lekpa FK, Farrenq V, Canouï-Poitrine F, Paul M, Chevalier X, Bruckert R, *et al.* (2012) Lack of efficacy of abatacept in axial spondylarthropathies refractory to tumor-necrosis-factor inhibition. *Joint Bone Spine.* 79(1):. 47-50.
- Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. (2009) Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun* 10(5): 380-389.
- Liao ZT, Pan YF, Huang JL, Huang F, Chi WJ, Zhang KX, *et al.* (2009) An epidemiological survey of low back pain and axial spondyloarthritis in a Chinese Han population. *Scand J Rheumatol* 38: 455–459.
- Ligers A, Xu C, Saarinen S, Hillert J, Olerup O. (1999) The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 97: 182–190.
- Lin Q, Lin Z, Gu J, Huang F, Li T, Wei Q, *et al.* (2010) Abnormal high-expression of CD154 on T lymphocytes of ankylosing spondylitis patients is down-regulated by etanercept treatment. *Rheumatol Int* 30(3):317-323.
- Lin SY and Goodfriend TL. (1970) Angiotensin receptors. *American Journal of Physiology–Legacy Content* 218(5): 1319–1328.
- Lin Z, Bei JX, Shen M, Li Q, Liao Z, Zhang Y, *et al.* (2012) A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat. Genet* 44; 73–77.
- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz, Re, Stampfer MJ, Grodstein F, Lamotte F, *et al.* (1995) A prospective evaluation of an angiotensin-converting–enzyme gene polymorphism and the risk of Ischemic Heart Disease. *The New England ournal of Medicine* 332(11): 706-711.
- Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Sharpe AH, Gray GS, Collins M. (1999) Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 60: 341-355.

Liu D, Yang Q, Li M, Mu K, Zhang, Y. (2010) Association of an asporin repeat polymorphism with ankylosing spondylitis in Han Chinese population: a case-control study. *Clin Invest Med* 33: 63–68.

Liu J, Zhou X, Shan Z, Yang J, Yang Q, Cui Y, *et al.* (2011) The association of LRP5 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in a Chinese Han population. *J. Rheumatol* 38 (12): 2616–2618.

Liu Z, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. (2013) Association of mineralization-related genes TNAP and ANKH polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Chinese Han population. *Biosci Trends* 7 (2):89–92.

Lories RJ and Luyten FP. (2009) Bone morphogenetic protein signaling and arthritis. *Cytokine & growth factor reviews* 20 (5): 467-473.

Lucas Olivier Daniel. (2011) Lésions traumatiques du rachis spondylarthritiques. A propos de 36 cas. *Thèse de Doctorat soutenue à l'université de Nantes.*

Lv C, Wang Y, Wang J, Zhang H, Xu H, Zhang D. (2011) Association of Interleukin-10 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med* 34 (6):E370.

M

Machado LR, Hardwick RJ, Bowdrey J, Bogle H, Knowles TJ, Sironi M, *et al.* (2012) Evolutionary History of Copy-Number-Variable Locus for the Low-Affinity Fcγ Receptor: Mutation Rate, Autoimmune Disease, and the Legacy of Helminth Infection. *The American Journal of Human Genetics* 90 (6): 973–985.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. (2002) Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30 (6): 1292-1305.

Mahi Fadia. (2014) Epidémiologie des facteurs de risque de l'infarctus du myocarde à Tlemcen. *Mémoire de Master soutenu à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.*

Maier LM, Anderson DE, De Jager PL, Wicker LS, Hafler DA. (2007) Allelic variant in CTLA4 alters T cell phosphorylation patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the United States of America* 104(47): 18607-18612.

Maksymowych WP. (2000) Ankylosing spondylitis--at the interface of bone and cartilage. *J Rheumatol* 27(10): 2295–301.

Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, Gladman DD, Peddle L, Inman RD. (2006) Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* 54(3): 974–985.

Malaviya A. (2013) Classification of spondyloarthritis: A journey well. *Indian journal of rheumatology* 8: 122-129.

Malquori L, Carsetti L, Ruberti G. (2008) The 3'UTR of the human CTLA4 mRNA can regulate Mrna stability and translational efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779(1): 60–65.

Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, *et al.* (2008) CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythaematosus. *Ann Rheum Dis* 67(8): 1076-1083.

- Mansour M, Cheema GS, Naguwa SM, Greenspan A, Borchers AT, Keen CL *et al.* (2007) Ankylosing spondylitis: a contemporary perspective on diagnosis and treatment. *Semin Arthritis Rheum* 36(4): 210-23.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. (2008) Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29(7): 367-374.
- Marieke JH, Gosia T, Heskamp S, Franke B, van Diemen C, Smolonska J, *et al.* (2009) Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Human Molecular Genetics* 18(21): 4195-4203.
- Marques RB, Thabet MM, White SJ, Houwing-Duistermaat JJ, Bakker AM, Hendriks GJ, *et al.* (2010) Genetic variation of the Fc gamma receptor 3B gene and association with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 5 (10).
- Martinez-Borra J¹, Gonzalez S, López-Vazquez A, Gelaz MA, Armas JB, Kanga U, *et al.* (2000) HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. *Human Immunology* 61(2): 131-139.
- Mastrovic Radoncic K, Kaluza-Schilling W, Cikes N, Märker-Hermann E. (2013) Association of interleukin-10G microsatellite polymorphism with the susceptibility of ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 80(1): 113–114.
- Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roecke N, Corvol P, and Soubrier F. (1989) Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 51: 1041.
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, *et al.* (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38(1): 86-92.
- McCaughan F. (2009). Molecular copy-number counting: potential of single-molecule diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 9(4): 309-312.
- McCaughan F and Dear PH. (2010) Single-molecule genomics. *J Pathol* 220(2): 297-306.
- McGarry F, Walker R, Sturrock R, Field M. (1999) The -308 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J Rheumatol* 26(5): 1110-1116.
- McGonagle D, Khan MA, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Gibbon W, Emery P. (1999) Enthesitis in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11(4): 244-250.
- McKinney C, Merriman ME, Chapman PT, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, *et al.* (2008) Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67(3): 409–413.
- McKinney C and Merriman TR. (2012) Meta-analysis confirms a role for deletion in FCGR3B in autoimmune phenotypes. *Hum Mol Genet* 21(10): 2370-2376.
- Menten P, Struyf S, Schutyser E, Wuyts A, De Clercq E, Schols D, *et al.* (1999) The LD78beta isoform of MIP-1alpha is the most potent CCR5 agonist and HIV-1-inhibiting chemokine. *J Clin Invest* 104(4): R1-5.
- Meroufel DN, Médiène-Benchekor S, Dumont J, Benhamamouch S, Amouyel P, Brousseau T. (2014) A study on the polymorphisms of the renin-angiotensin system pathway genes for their effect on blood pressure levels in males from Algeria. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 15(1) :1-6.

- Messal Ibtissem. (2011) Etude des associations entre la spécificité HLA-B27 et les allèles HLA-DMB avec respectivement la spondylarthrite ankylosante et la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon de la population de l'Ouest Algérien. *Mémoire de magister soutenu à l'Université d'USTO-MB*.
- Miceli-Richard C¹, Zouali H, Said-Nahal R, Lesage S, Merlin F, De Toma C, *et al.* (2004) Significant linkage to spondyloarthropathy on 9q31-34. *Hum Mol Genet* 13(15): 1641–1648.
- Miceli-Richard C. (2010) HLA-B27 et spondyloarthropathies. *Revue du rhumatisme monographies* 77: 288-292.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272(25):15583-6.
- Milicic A, Lindheimer F, Laval S, Rudwaleit M, Ackerman H, Wordsworth P, *et al.* (2000) Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 1(7): 418-22.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16(3): 1215.
- Minh Hoa TT, Darmawan J, Chen SL, Van Hung N, Thi Nhi C, Ngoc An T. (2003) Prevalence of the rheumatic diseases in urban Vietnam: a WHO-ILAR COPCORD study. *J Rheumatol* 30(10) : 2252–2256.
- Moalic V. (2010) Immunogénétique de la spondylarthrite ankylosante. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 25: 123-128.
- Modi WS. (2004) CCL3L1 and CCL4L1 chemokine genes are located in a segmental duplication at chromosome 17q12. *Genomics* 83(4): 735-738.
- Moll JM, Haslock I, Macrae IF, Wright V. (1974) Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 53(5): 343-64.
- Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. (2005) Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol* 6:1–11.
- Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brézin AP. (2004) Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* 111(4): 802-809.
- Monnet D, Kadi A, Izac B, Lebrun N, Letourneur F, Zinovieva E, *et al.* (2012) Association between the IL-1 family gene cluster and spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 71(6): 885–890.
- Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP, *et al.* (2000) Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* 43(10): 2328-2334.
- Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, *et al.* (2006) Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther* 8(1): R5.

Motawi TK, Shaker OG, Shahin NN, Ahmed NM. (2016) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism association with obesity and some related disorders in Egyptian females: a case-control observational study. *Nutr Metab (Lond)* 13: 68.

Muñoz-Fernández S, Martín-Mola E. (2006) Uveitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(3): 487-505.

N

Na KS, Kim TH, Rahman P, Peddle L, Choi CB, Inman RD. (2008) Analysis of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 4 shows no association with ankylosing spondylitis in a Korean population. *Rheumatol Int.* 28(7): 627–630.

Naismith JH and Sprang SR. (1998) Modularity in the tnf-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23(2):74-79.

Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, *et al.* (1994) Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*; 90(5): 2199-202.

Negishi-Koga T, Gober HJ, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, *et al.* (2015) Immune complexes regulate bone metabolism through FcRg signalling. *Nat Commun* 6:6637.

Nissen M.J. (2016) General concepts and pathogenesis of the spondyloarthropathies. *Rev Med Suisse* 12(509): 485-489.

Nguyen DQ, Webber C, Ponting CP. (2006) Bias of selection on human copy-number variants. *PLoS Genet* 2(2): e20.

Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. (1998) Posttranscriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factorbeta. *Eur J Immunol* 28(8): 2537-2548.

Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E *et al.* (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 5(7): 1075–1080.

Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. (1992) CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 13(11):431-433.

Nordang G.B, Carpenter D, Viken MK, Kvien TK, Armour JA, Lie BA. (2012) Association analysis of the CCL3L1 copy number locus by paralogue ratio test in Norwegian rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Genes Immun* 13(7): 579–582.

O

Oaks MK, Hallett KM. (2000) Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 164(10):5015-5018.

Onen F, Akar S, Birlik M, Sari I, Khan MA, Gurler O, Ergor A *et al.* (2008) Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey. *J Rheumatol* 35(2): 305–309.

Oparil S and Haber E. (1974) The renin-angiotensin system (first of two parts). *N Engl J Med* 291(8): 389-401.

Orozco G, Eyre S, Hinks A, Ke X, Wilson AG, Bax DE, *et al.* (2010) Association of CD40 with Rheumatoid Arthritis Confirmed in a Large UK Case-Control Study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69(5): 813–816.

P

Pahl HL. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6853-6866.

Poitras E and Houde A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2(2): 2-11.

Paladini F, Taccari E, Fiorillo MT, Cauli A, Passiu G, Mathieu A, *et al.* (2005) Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthroses. *Arthritis Rheum* 52(10): 3319-3321.

Parkes M, Cortes A, van Heel DA, Brown MA. (2013) Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet* 14(9):661–673.

Paterna S, Di Pasquale P, D'Angelo A, Seidita G, Tuttolomondo A, Cardinale A, *et al.* (2000) Angiotensin converting enzyme gene deletion polymorphism determines an increase in frequency of migraine attacks in patients suffering from migraine without aura. *Eur Neurol* 43(3): 133–136.

Pawlak E, Kochanowska IE, Frydecka I, Kielbiński M, Potoczek S, Bilińska M. (2005) The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53(4):336-41.

Pertuiset E. (2008) Diagnosis of early spondyloarthritis. *Rev Med Interne* 29(7): 596-605.

Piazza A, Menozzi P, Cavalli-Sforza LL. (1980) The HLA-A, B gene frequencies in the world: Migration or selection? *Human Immunology* 1(4): 297–304.

Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, Mourão AF, Vieira de Sousa E, Pinto P, *et al.* (2012) ANKH and susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 39(1): 131–134.

Pincerati MR, Dalla-Costa R, Petzl-Erler ML. (2010) CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genetics and molecular biology* 33(3): 442-444.

Piotrowski A, Bruder CE, Andersson R, Diaz de Ståhl T, Menzel U, Sandgren J, *et al.* (2008) Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat* 29 (9): 1118-1124.

Pointon JJ, Chapman K, Harvey D, Sims AM, Bradbury L, Laiho K, *et al.* (2008) Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms in ankylosing spondylitis: evidence of a weak association in Finns. *J Rheumatol* 35(5): 1609–1612.

Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, Appleton LH, Farrar C, Wordsworth BP. (2011) The histone demethylase JARID1A is associated with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 12(5): 395–398.

Ponder BA. (2001) Cancer genetics. *Nature* 411(6835): 336-341.

Popa OM, Cherciu M, Cherciu LI, Dutescu MI, Bojinca M, Bojinca V, *et al.* (2016) ERAP1 and ERAP2 Gene Variations Influence the Risk of Psoriatic Arthritis in Romanian Population. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64(Suppl 1):123-129.

Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, *et al.* (1999) Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10(2): 245-255.

Purohit S, Podolsky R, Collins C, Zheng W, Schatz D, Muir A, *et al.* (2005) Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis* 2:8.

Q

Qian Y, Wang G, Xue F, Chen L, Wang Y, Tang L, Yang H. (2017) Genetic association between TAP1 and TAP2 polymorphisms and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res* 66(8):653-661.

Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. (2008) Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Res* 36(18): e116.

R

Rahmoun N, El Mecherfi KE, Bouchetara A, Lardjem Hetraf S, Dahmani Amira C, Adda Neggaz L, *et al.* (2018) Association of REL Polymorphism with Cow's Milk Proteins Allergy in Pediatric Algerian Population. *Fetal Pediatr Pathol* 37(1): 74-83.

Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, *et al.* (1996) Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 98(4): 945-953.

Raychaudhuri S, Elaine F Remmers, Annette T Lee, Rachel Hackett, Candace Guiducci, Noël P Burt et al. (2008) Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 40(10): 1216–1223.

Rebaï M, Kharrat N, Ayadi I, Rebaï A. (2006) Haplotype structure of five SNPs within the ACE gene in the Tunisian population. *Ann Hum Biol* 33(3): 319-329.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, *et al.* (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118): 444-454.

Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. (2001) HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Current opinion in rheumatology* 13(4): 265-272.

Reveille JD. (2006) Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(3): 601-609.

Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, Pointon JJ, *et al.* (2010) Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet* 42(2): 123–127.

Reveille JD. (2011) Epidemiology of Spondyloarthritis in North America. *Am J Med Sci* 341(4): 284- 286

Reveille JD. (2012a) Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol* 8 (5): 296-304.

Reveille JD, Witter JP, Weisman MH. (2012b) Prevalence of axial spondylarthritis in the United States: estimates from a cross-sectional survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(6): 905–910.

Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA. (1999) Sequence variation in the human angiotensin-converting enzyme. *Nat Genet* 22(1): 59-62.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. (1990) An insertion/ deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86(4):1343-1346.

Riordan JF. (2003) Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 4(8): 225

Robert J. (2010) Gene polymorphisms. *Bull Cancer* 97(11): 1253-1264.

Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A, *et al.* (1989)HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum.* 32(9):1135-1141.

Royet J. (1998) Organisation spatiale des disques imaginaires et des bourgeons de membre. *Medecine/sciences* 14(11): 1167-1175.

Rudd CE and Schneider H. (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3(7): 544-56.

Rudwaleit M and Taylor WJ. (2010) Classification criteria for psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis/axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(5): 589-604.

Rudwaleit M, Landewé R, van der Heijde D, Listing J, Brandt J, Braun J, *et al.* (2009) The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 68(6): 770-776.

S

Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, Tamouza R, Borot N, Porcher R,*et al.* (2002). The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis* 61(3): 201-206.

Saito T. (1998) Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin. Immunol* 10(3): 313–321.

Sakly N, Boumiza R, Zrour-Hassen S, Hamzaoui A, Ben Yahia S, Amara H, *et al.* (2009) HLA-B27 and HLA-B51 determination in Tunisian healthy subjects and patients with suspected ankylosing spondylitis and Behcet's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173: 564-569.

Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. (1992) Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest* 89(4): 1274-1281.

Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. (2011) TH17 lymphocytes: induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapeutic. *Rev Med Interne* 32(5):292-301.

- Saraux A, Guillemin F, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, *et al.* (2001) Prevalence of spondyloarthropathies in France. *Annals of the rheumatics' disease* 64: 1431 – 1435.
- Saraux A, Guillemin F, Fardellone P, Fautrel B, Masson C, *et al.* (2003) Prevalence of spondylarthropathies in France. *Ann Rheum Dis* 62: 90-91.
- Saraux A. (2007) Epidémiologie des maladies rhumatismales en France. *La revue du Rhumatisme* 74 : 9-11.
- Sari I, Alacacioglu A, Kebapcilar L, Taylan A, Bilgir O, Yildiz Y, *et al.* (2010) Assessment of soluble cell adhesion molecules and soluble CD40 ligand levels in ankylosing spondylitis. *Joint BoneSpine* 77(1): 85–87.
- Savran OF, Ocalb L, Sarper DA, Ozkula H, Asicioglua F, Kasapoglub E, *et al.* (2004) HLA B-27 subtypes in Turkish patients with, spondyloarthropathy and healthy controls. *Disease Markers* 20: 309-312
- Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. (2006) ACE Polymorphisms. *Circulation Research* 98(9):1123-1133.
- Schaschl H, Aitman TJ, Vyse TJ. (2009) Copy number variation in the human genome and its implication in autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 156(1): 12-16.
- Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, *et al.* (2003) Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 300(5620): 767-772.
- Schett G, Rudwaleit M. (2010) Can we stop progression of ankylosing spondylitis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(3): 363-371.
- Schönbeck U, Libby P. (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sciences* 58(1):4.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, *et al.* (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683): 525-528.
- Sexton JM, Britton SL, Beierwaltes WH, Fiksen-Olsen MJ, Romero JC. (1979) Formation of angiotensin III from [des-Asp1] angiotensin I in the mesentric vasculature. *Am J Physiol* 237(2): H218–H223.
- Shehab DK, Al-Jarallah KF, Al-Awadhi AM, Al-Herz A, Nahar I, Haider MZ.(2008) Association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion-deletion polymorphism with spondylarthropathies. *J Biomed Sciences* 15(1): 61–67.
- Sherlock JP, Buckley CD, Cua DJ. (2014) The critical role of interleukin-23 in spondyloarthropathy. *Molecular Immunology* 57(1): 38– 43.
- Shichikawa K, Tsujimoto M, Nishioko J, Nishibayashi Y, Matsumoto K. (1985) Histopathology of early sacroiliitis and enthesitis in ankylosing spondylitis. In: Ziff M, Cohen SB, editors. *Advances in Inflammatory Research: The Spondylarthropathies, 9.* New York: Raven Press.
- Shrestha S, Nyaku M, Edberg JC. (2010) Variations in CCL3L gene cluster sequence and non-specific gene copy numbers. *BMC Research Notes* 3:74.
- Sibilia J, Pham T, Sordet C, Jaulhac B, Claudepierre P. (2005) Rheumatoid spondylitis and other spondylarthropathies. *EMC-Medecine* 2(5): 488–511.

- Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. (2002) Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis* 61: 8-18.
- Sieper J, Rudwaleit M, Khan MA, Braun J. (2006) Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (3): 401- 417.
- Sim M.K, Choo MH, Qiu XS. (1994) Degradation of angiotensin I to [des-Asp1] angiotensin I by a novel aminopeptidase in the rat hypothalamus. *Biochemi pharmacol* 48(5): 1043–1046.
- Simmons D and Seed B. (1988) The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 333(6173): 568-570.
- Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, Burgos-Vargas R, Chou CT, Doan T, *et al.* (2008) Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 67(9): 1305–1309.
- Skorzewski Emilie. (2010) La spondylarthrite ankylosante: les traitements actuels et la prise en charge globale des patients. *Université Henri Poincaré, Nancy 1. Faculté De Pharmacie.*
- Slobodin G, Rosner I, Rimar D, Boulman N, Rozenbaum M, Odeh M. (2012) Ankylosing Spondylitis: Field in Progress. *Isr Med Assoc J* 14(12): 763-767.
- Smith JA, Märker-Hermann E, Colbert RA. (2006) Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(3): 571–591.
- Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, Peddle L, Hamilton S, Inman R, *et al.* (2007) Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Rheumatol* 34(2): 368–370.
- Soleimanifar N, Amirzargar AA, Mahmoudi M, Pourfathollah AA, Azizi E, Jamshidi AR, *et al.* (2011) Study of programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *Inflammation* 34(6): 707–712.
- Sonnenberg A. (1985) Die sequentielle Testprozedur nach Bonferroni-Holm [Bonferroni-Holm sequential test procedure]. *Z Gastroenterol* 23(12): 703-704.
- Sousa E, Caetano-Lopes J, Pinto P, Pimentel F, Teles J, Canhão H, *et al.* (2009) Ankylosing spondylitis susceptibility and severity--contribution of TNF gene promoter polymorphisms at positions -238 and -308. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 581-588.
- Spoletini M, Zampetti S, Campagna G, Marandola L, Capizzi M, Buzzetti R. (2013) Temporal trends of HLA, CTLA-4 and PTPN22 genotype frequencies among type 1 diabetes in Continental Italy. *PLoS One* 8(4): e61331.
- Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, *et al.* (2010) Genome wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 42(6): 508–514.
- Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. (1989) A B- lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* 8(5): 1403-1410.

Standiford TJ, Kunkel SL, Liebler JM, Burdick MD, Gilbert AR, Strieter RM. (1993) Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9(2): 192-198.

Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, Weale ME, Allen MH, *et al.* (2010) A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-c and ERAP1. *Nat Genet* 42:985-90.

Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, Ikeda Y, Hashimoto K. (2004) Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA originating from the ACE allele with deletion. *Hum Genet* 2004 Jul; 115(2):91-6.

Sun Z. (2012) Intervention of PKC- θ as an immunosuppressive regimen. *Front Immunol* 3: 225.

Sung-Yun P and I-Cheng Ho. (2002) c-Rel delivers a one-two punch in Th1 cell differentiation. *J Clin Invest* 110(6):741-742.

Syrbe U, Scheer R, Wu P, Sieper J. (2012) Differential synovial Th1 cell reactivity towards Escherichia coli antigens in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 71(9):1573-1576.

T

Tan ZY, Bealgey KW, Fang Y, Gong YM, Bao S. (2009) Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* 41(4): 733-735.

Talpin A. (2013) Complexe majeur d'histocompatibilité Et Génomique Fonctionnelle Dans Les Spondylarthrites. Thèse soutenue à l'Université Paris Descartes Faculté De Médecine Paris Descartes – Site Cochin. Ecole Doctorale Gc2id.

Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, *et al.* (1994) The germ free state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 180(6): 2359-2364.

Taurog JD and Lipsky PE. (1994) Ankylosing spondylitis and reactive arthritis. In: Harrison's. New York: Mc Graw Hill 1451-1455.

Taurog JD. (2007) The mystery of HLA-B27: if it isn't one thing, it's another. *Arthritis Rheum* 56(8): 2478-2481.

Tayel MY, Soliman E, El Baz WF, El Labaan A, Hamaad Y, Ahmed MH. (2012) Registry of the clinical characteristics of spondyloarthritis in a cohort of Egyptian population. *Rheumatology international* 32(9): 2837-2842.

Thomson G. (2001) An overview of the genetic analysis of complex diseases, with reference to type 1 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(3):265-277.

Thuille N, Heit I, Fresser F, Krumböck N, Bauer B, Leuthaeusser S, *et al.* (2005) Critical role of novel Thr-219 autophosphorylation for the cellular function of PKC θ in T lymphocytes. *EMBO J* 24(22): 3869-3880.

- Timms AE, Zhang Y, Bradbury L, Wordsworth BP, Brown MA. (2003) Investigation of the role of ANKH in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 48(10): 2898–2902.
- Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell HJ, Bradbury LA, Abbott A, *et al.* (2004) The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet* 75(4): 587–595.
- Tomino Y, Makita Y, Shike T, Gohda T, Haneda M, Kikkawa R, *et al.* (1999) Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progression in Japanese NIDDM patients. *Nephron* 82(2):139-44.
- Torres B, Aguilar F, Franco E, Sánchez E, Sánchez-Román J, Jiménez Alonso J, *et al.* (2004) Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 50(7): 2211-2215.
- Torres-Carrillo N, Ontiveros-Mercado H, Torres-Carrillo NM, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Ramírez-Dueñas MG, *et al.* (2013) The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population. *Cell biochem biophys* 67(3): 1217-1228.
- Toubi E, Kessel A, Bamberger E, Golan TD. (2004) Systemic Lupus Erythematosus Vasculitis: A Current Therapeutic Overview. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 6(2): 87-97.
- Toubi E and Shoenfeld Y. (2004) The role of CD40/CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* 37(67): 457-464.
- Toussiro E and Wendling D. (2006) The immunogenetics of ankylosing spondylitis. *Rev Med Interne* 27(10): 762-771.
- Toussiro E, Deschamps M, Pouthier F, Perrot L, Perruche S, Tiberghien P, Wendling D, Saas P. (2008) Expression intracellulaire de CTLA-4 (CD152) dans les spondylarthropathies : étude comparative avec la polyarthrite rhumatoïde. *Soumission Congrès de Société Française de Rhumatologie (SFR)*.
- Toussiro E, Saas P, Deschamps M, Pouthier F, Perrot L, Perruche S, *et al.* (2009) Increased production of soluble CTLA-4 in patients with spondylarthropathies correlates with disease activity. *Arthritis research & therapy* 11(4): R101.
- Toussiro E. (2013) Des spondylarthropathies aux spondyloarthrites : vers une nouvelle dénomination pour un diagnostic précoce et de nouvelles indications thérapeutiques ? *La revue de médecine interne* 34: 661-666.
- Trynka G, Zhernakova A, Romanos J, Franke L, Hunt KA, Turner G, *et al.* (2009) Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut* 58(8): 1078–1083.
- Tsuchiya N, Shiota M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, *et al.* (1998) MICA allele typing of HLA-B27 positive japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: Differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes. *Arthritis & Rheumatism* 41(1): 68–73.
- Tsui FW, Tsui HW, Cheng EY, Stone M, Payne U, Reveille JD, *et al.* (2003) Novel genetic markers in the 5'-flanking region of ANKH are associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 48(3): 791–797.

Tsui HW, Inman RD, Reveille JD, Tsui FW. (2007) Association of a TNAP haplotype with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 56(1): 234–243.

Tsukahara S, Iwamoto T, Ikari K, Inoue E, Tomatsu T, Hara M, *et al.* (2008) CTLA-4 CT60 polymorphism is not an independent genetic risk marker of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Annals of the rheumatic diseases* 67(3): 428-429.

Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, *et al.* (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* 37(7): 727-732.

U

Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Myers DE, Jaszcz W, Haissig S, Ledbetter JA. (1990) Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human Bcell ontogeny and the efficacy of antiCD40 immunotoxins against clonogenic Blineage acute lymphoblastic leukemia as well as Blineage non-Hodgkin's lymphomacells. *Blood* 76(12): 2449-2458.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, *et al.* (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423(6839): 506–511.

Uppal SS, Haider MZ, Hayat SJ, Abraham M, Sukumaran J, Dhaunsi GS. (2007) Significant association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 34(): 2395-2399.

V

Vähämiko S, Penttinen MA, Granfors K. (2005) Aetiology and pathogenesis of reactive arthritis: role of non-antigen-presenting effects of HLA-B27. *Arthritis Res Ther. England*, 7(4): 136-141.

Van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. (1984) The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* 27(3): 241–249.

Van der Linden MP, Feitsma AL, le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, *et al.* (2009) Association of a Single-Nucleotide Polymorphism in CD40 with the Rate of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, 60(8): 2242–2247.

Van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185(3): 393–403.

Van der Paardt M, Crusius JB, García-González MA, Baudoin P, Kostense PJ, Alizadeh BZ, *et al.* (2002) Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 41(12) : 1419–1423.

Van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, Morré SA, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, *et al.* (2005) No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 64(2): 235–238.

- Van Gaalen FA, Verduijn W, Roelen DL, Böhringer S, Huizinga TW, van der Heijde DM, *et al.* (2013) Epistasis between two HLA antigens defines a subset of individuals at a very high risk for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 72(6): 974–978.
- Van Kooten C and Banchereau J. (2000) CD40/CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67(1): 2-17.
- Van Praet L, Jacques P, Van den Bosch F, Elewaut D. (2012) The transition of acute to chronic bowel inflammation in spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8(5): 288-295.
- Varadé J, Palomino-Morales R, Ortego-Centeno N, Díaz-Rubio M, Fernández-Gutiérrez B, González-Gay MÁ, *et al.* (2011) Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 70(4): 711-712.
- Vargas-Alarcón G, Londoño JD, Hernández-Pacheco G, Pacheco-Tena C, Castillo E, Cardiel MH, *et al.* (2002) Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. *Ann Rheum Dis* 61(8): 714-717.
- Vargas-Alarcón G, Casasola-Vargas J, Rodríguez-Pérez JM, Huerta-Sil G, Pérez-Hernández N, Londoño J, *et al.* (2006) Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol*, 67(10): 826–832.
- Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G. (2002) Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 963-970.
- Villar J, Flores C, Pérez-Méndez L, Maca-Meyer N, Espinosa E, Blanco J, *et al.* (2008) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 34(3): 488–495.
- Visekruna A, Volkov A, Steinhoff U. (2012) A Key Role for NF-κB Transcription Factor c-Rel in T-Lymphocyte-Differentiation and Effector Functions. *Clin Dev Immunol* 2012: 239-368.

W

- Walker S, Janyakhantikul S, Armour JA. (2009) Multiplex Paralogue Ratio Tests for accurate measurement of multiallelic CNVs. *Genomics* 93(1): 98-103.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, *et al.* (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1(5): 405–413.
- Wain, L.V., J.A. Armour, and M.D. Tobin. (2009) Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet* 374 (9686): 340-50.
- Wang C.R and Liu MF. (2003) Regulation of CCR5 expression and MIP1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 132(2): 371-378.
- Wang L, Xiao Y, Guoqi C, Lihong X, Qing X, Xu Z. (2016) Association study of copy number variants in FCGR3A and FCGR3B gene with risk of ankylosing spondylitis in a Chinese population. *Rheumatol Int* 36(3):437-42.

- Wang N.G, Wang DC, Tan BY, Wang F, Yuan ZN. (2015) Association between CTLA-4 gene polymorphism and ankylosing spondylitis: a case-control study. *International journal of clinical and experimental pathology* 8(6): 7421-7425.
- Wang X, Chuang HC, Li JP, Tan TH. (2012) Regulation of PKC- θ function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Front Immunol* 3: 197.
- Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, van de Winkel JG, Capel PJ. (1993) The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 268 (10): 7346-7349.
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, *et al.* (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 270(5238): 985–988.
- Wei JC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. (2004) HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology* 43(7): 839–842.
- Wei JC, Lee HS, Chen WC, Shiu LJ, Yang SF, Wong RH. (2009) Genetic polymorphisms of the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulate the development of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 68(11): 1781–1786.
- Wei JC, Yen JH, Juo SH, Chen WC, Wang YS, Chiu YC, *et al.* (2011) Association of ORAI1 haplotypes with the risk of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis. *PLoS ONE* 6(6): e20426.
- Wendling D. (1998) Spondylarthrite ankylosante in: appareil locomoteur. *Paris: encyclopédie médico-chirurgicale* 14-230-A-10,14p
- Wendling D and Toussiro E. (2007) Bone and matrix remodeling markers: a new tool for assessment of treatment efficacy in ankylosing spondylitis? *J Rheumatol* 34(8):1647-1649.
- Wendling D. (2008) Interleukin 23: a key cytokine in chronic inflammatory disease. *Joint Bone Spine* 75(5): 517-519.
- Wendling D and Prati C. (2011) Biologic agents for treating ankylosing spondylitis: beyond TNF α antagonists. *Joint Bone Spine* 78(6): 542-544.
- West HF. (1949) Aetiology of Ankylosing Spondylitis. *Ann Rheum Dis* 8(2): 143-148.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1): 130-138.
- Woodrow JC, Eastmond CJ. (1978) HLA B27 and the genetics of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 37(6): 504-509.
- WTCCC, TASC, Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, *et al.* (2007) Association scan of 14,500 nsSNPs in four common diseases identifies variants involved in autoimmunity. *Nat Genet* 39(11): 1329–1337.
- Wu W, Ding Y, Chen Y, Hua Z, Liu H, Wang H, *et al.* (2012) Susceptibility to ankylosing spondylitis: evidence for the role of ERAP1, TGF β 1 and TLR9 gene polymorphisms. *Rheumatol Int* 32: (8) 2517–2521.

X

Xiao Z, Guoli L, Gang C, Ming C, Nan Z, Sanyuan H, Hu S. (2017) Angiotensin-Converting Enzyme Gene Deletion Polymorphism is Associated with Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer Patients in a Chinese Population. *Med Sci Monit* 23: 4926–4931.

Xu WD, Liu SS, Pan HF, Ye DQ. (2012) Lack of association of TLR4 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine* 79(6): 566–569.

Y

Yang Q, Liu Y, Liu D, Zhang Y, Mu K. (2011) Association of polymorphisms in the programmed cell death 1 (PD-1) and PD-1 ligand genes with ankylosing spondylitis in a Chinese population. *Clin Exp Rheumatol* 29(1): 13–18.

Yang TL, Chen XD, Guo Y, Lei SF, Wang JT, Zhou Q, *et al.* (2008) Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet* 83(6): 663-674.

Yigit S, Inanir A, Tural S, Ates O. (2012) Association of angiotensin converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism and rheumatoid arthritis. *Gene* 511(1): 106–108.

Z

Zarnegar B, He JQ, Oganesyanyan G, Hoffmann A, Baltimore D, Cheng G. (2004) Unique CD40-mediated biological program in B cell activation requires both type 1 and type 2 NFkappaB activation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(21): 8108-8113.

Zawilla N, Shaker D, Abdelaal A, Aref W. (2014) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and hypertension in occupational noise exposure in Egypt. *Int J Occup Environ Health* 20(3):194-206.

Zeboulon-Ktorza N, Boelle PY, Nahal RS, D'agostino MA, Vibert JF, Turbelin C, *et al.* (2013) Influence of environmental factors on disease activity in spondyloarthritis: a prospective cohort study. *J Rheumatol* 40(4): 469–475.

Zeidler H, Calin A, Amor B. (2011) Historical perspective of the spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 23(4): 327–333.

Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Wang S, Li G, Mei Y, *et al.* (2012) Association of FCRL4 polymorphisms on disease susceptibility and severity of ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Clin Rheumatol* 31(10): 1449–1454.

Zhang G, Luo J, Bruckel J, Weisman MA, Schumacher HR, Khan MA, *et al.* (2004) Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 50(7): 2246–2254.

Zhixiu L and Matthew AB. (2017) Progress of genome-wide association studies of ankylosing spondylitis. *Clinical & Translational Immunology* 6(12): e163.

Zhou XJ, Lu XL, Nath SK, Lv JC, Zhu SN, Yang HZ, *et al.* (2012) Gene-gene interaction of BLK, TNFSF4, TRAF1, TNFAIP3, and REL in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 64(1): 222-31.

Zhou XJ, Lv JC, Bu DF, Yu L, Yang YR, Zhao J, *et al.* (2009) Copy number variation of FCGR3A rather than FCGR3B and FCGR2B is associated with susceptibility to anti-GBM disease. *IntImmunol*, 22(1): 45–51.

Zlotnik A and Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2): 121-127.

Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, Collantes E, Davis JC Jr, Dijkmans B, *et al.* (2006) ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65(4): 442-452.

Zochling J and Smith EU. (2010) Seronegative spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(6): 747-756.

Sites Internet :

- <http://www.fondation-arthritis.org/les-rhumatismes-inflammatoires/arthritis--fondation-specialisee-dans-la-recherche-contre-les-rhumatismes-et-les-maladies-inflammatoires.html>, 1,14,8,0,0.
- <http://www.fondation-arthritis.org>. [En ligne] consultation en juillet 2013
- <http://www.lepharmacien.fr/mars-2006/spondylartrite-des-signes-qui-ne-trompent-pas.html>. [En ligne] consultation en aout 2013.