

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

ANNEE : 2018



N° : 192

OPTIMISATION DE MARQUAGE INTRACELLULAIRE POUR LA DETECTION DES CYTOKINES PRO- ET ANTI- INFLAMMATOIRES AU COURS DES SPONDYLOARTHRISES

MEMOIRE

POUR OBTENIR LE DIPLOME D'ETUDES DE MASTER

EN IMMUNOLOGIE

Présenté et soutenu

Le 18 Août 2018

Par

Dr Coumba DIOUF

MEMBRES DU JURY

Président :	M. Alioune	DIEYE	Professeur Titulaire
Membres :	M. Tandakha	NDIAYE DIEYE	Professeur Titulaire
	M. Saïdou	DIALLO	Professeur Titulaire
	M. Moustapha	MBOW	Maître de Conférences Assimilé
Directeur :	M. Tandakha	NDIAYE DIEYE	Professeur Titulaire
Co-directeur :	M. Moustapha	MBOW	Maître de Conférences Assimilé

DEDICACES

A Mon Papa

Papa, ce travail est la suite logique de ton entreprise d'éducation que tu as réussie avec amour à nous inculquer. Je suis fière, aujourd'hui, de t'offrir ce mémoire qui, j'en suis sûre, comblera vraiment tes souhaits.

Que DIEU te préserve encore longtemps en vie avec toute la famille pour nous accompagner.

A Ma chère Maman.

Les mots me manquent pour exprimer toute l'affection et la reconnaissance que j'éprouve à ton égard. Vous vous êtes battue avec courage et tenacité pour la réussite de tes enfants. Je prie le TOUT PUISSANT pour que tous les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction, mon éducation et mon épanouissement ne soient pas vains. Qu'Allah me donne la chance de vous faire partager, pendant longtemps, les fruits de tant de sacrifices. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis devenue.

A Mes frères et sœurs

A Fallou, A Fatou, A Aïssatou, A Mame Diarra, A Niamy, A Khadim et A Mariama avec tout mon amour.

Ce travail est le vôtre merci chers frères et sœurs. Que LE TOUT PUISSANT vous accorde une longue vie, ainsi qu'une santé de fer et la réussite dans tous les domaines.

A la mémoire de mon petit frère Demba DIOUF

J'aurais tant aimé que tu sois présent.

Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

A mon prince charmant Ousseynou Goumballa

Depuis le jour où je t'ai connu, ma vie est comblée de bonheur. Ta présence m'inspire la sérénité et la tranquillité de l'âme.

Merci pour les encouragements, Que Dieu nous bénisse, protège notre amour et nous aide à réaliser tous nos projets.

Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorde santé, bonheur, longue vie et faire de sorte que jamais je ne te déçoive.

A NOS MAÎTRES ET JUGES

A notre maître et président de jury

Le Professeur Alioune DIEYE

Nous vous remercions d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous avons beaucoup apprécié l'ampleur de vos connaissances et l'élégance avec laquelle vous dispensez vos enseignements. Vos qualités scientifiques et vos talents pédagogiques ne sont plus à démontrer.

Trouvez ici, dans ces quelques mots l'expression de notre plus haut respect et de notre sincère gratitude.

A notre maître juge,

Le Professeur Saïdou DIALLO

Vous avez fait de la formation des étudiants votre principale préoccupation.

Votre disponibilité en toute heure et en toute circonstance nous reconforte au quotidien. Votre sens de l'éthique, du respect du malade dont vous faites montre tous les jours ont suscité en nous une admiration et une confiance sans bornes.

Nous sommes considérablement touchés par votre rigueur dans le travail scientifique et votre générosité.

Veillez croire en l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître juge,

Le Professeur Tandakha NDIAYE DIEYE

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous témoignait en acceptant de juger ce travail.

Cher maître, les mots nous manquent pour exprimer tout le respect et l'admiration que nous avons pour vous.

Soyez ici remercié pour tout ce que vous avez fait pour nous.

A notre maître

Le Docteur Moustapha MBOW

Vous nous avez fait un grand honneur en nous confiant ce travail et en suivant sans relâche la réalisation malgré vos nombreuses occupations. Vos compétences et votre disponibilité en tant qu'enseignant, l'art et la générosité avec lesquelles vous dispensez vos enseignements, font de vous une référence. Votre patience et votre rigueur scientifique ont été édifiantes

Vos grandes qualités humaines viennent couronner le tout.

Soyez assuré, cher maître de notre infinie reconnaissance.

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements à tout le personnel du service de Rhumatologie et l'unité d'Immunologie du CHUN Aristide Le Dantec.

Nos remerciements s'adressent également au personnel du service d'Immunologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

LISTE DES ABREVIATIONS

APC	: And allophycocyanin
AR	: Arthrite réactionnelle
DC	: Cellule dendritique
CHUN	: Centre Hospitalier National Universitaire
CPA	: Cellules présentatrices d'antigènes
CTL	: Lymphocytes T cytotoxiques
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
FACS	: Fluorescence Active Cell Sorter
FBS	: Fetal Bovis Serum
FCS	: Forward
FITC	: Isothiocyanate fluorescéine
FSC	: Forward scatter
HLA	: Human leukocyte antigen
PE	: Phycoerhytrin
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
IL23R	: Récepteur de l'interleukine 23
IL	: Interleukine
IFNγ	: Interféron γ
NK	: Natural Killer
PBMC	: Cellules mononuclées du sang périphérique
PFA	: Paraformaldehyde
PMA	: Phorbol myristate acetate
PMT	: Photodiodes et photomultiplicateurs
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SA	: Spondylarthrite ankylosante
SEB	: Staphylococcal enterotoxin B
SPA	: Spondyloarthrites

SSC : Side scatter
TA : Température ambiante
TCR : T Cell Receptor
Th : Lymphocyte T auxillaire
TNF α : Tumor necrosis factor- α
Treg : Lymphocyte T régulateurs

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mauvais repliement de la molécule HLAB27	7
Figure 2 : Rôle des homodimères de la molécule HLAB27 dans la pathogénèse des spondyloarthrites.....	8
Figure 3 : Présentation d'un antigène au lymphocyte T.	12
Figure 4 : Ontogénèse des lymphocytes	13
Figure 5 : Structure du TCR du lymphocyte TCD8.....	14
Figure 6 : Différentiation du lymphocyte Th0 en Th1	15
Figure 7 : Différentiation du lymphocyte Th0 en Th2.....	16
Figure 8 : Différentiation du Th0 en Th17.....	17
Figure 9 : Ontogénèse et les différentes populations de Tregs	19
Figure 10 : Lymphocyte Treg naturelle avec molécules de surface et leurs actions sur les cellules cibles	20
Figure 11 : Echantillon sanguin séparé par gradient de Ficoll.....	27
Figure 12 : FACSCalibur®	34
Figure 13 : Distribution des leucocytes du sang périphérique en fonction de la taille et de la granularité.....	35
Figure 14 : Stratégie de gating	36
Figure 15 : Populations des lymphocytes totaux selon la méthode de marquage (exemple de plots obtenus après stimulation par le PMA/Ionomycine).	37
Figure 16 : Répartition des populations de lymphocytes T selon la méthode de marquage cellulaire utilisée (exemple de plots obtenus après stimulation par le PMA/Ionomycine).	38
Figure 17 : Comparaison de la production de cytokines selon la méthode de fixation.	39
Figure 18 : Répartition des lymphocytes totaux selon la méthode de stimulation.....	40

Figure 19 : Populations de lymphocytes T en fonction de la méthode de stimulation (PMA/Ionomycine et SEB).....	40
Figure 20 : Répartition des cytokines selon la méthode de stimulation des lymphocytes (PMA/Ionomycine et SEB).	41

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	
I. HISTORIQUE DES SPONDYLOARTHRISES.....	3
II. EPIDEMIOLOGIE DES SPONDYLOARTHRISES.....	4
1. Fréquence.....	4
1.1. Prévalence.....	4
1.2. Incidence.....	4
1.3. Sexe	4
1.4. Age.....	4
III. PATHOGENIE	5
1. Facteurs génétiques.....	5
1.1. Gènes du système HLA.....	5
1.2. Gènes non HLA.....	9
2. Facteurs environnementaux impliqués dans les SpA.....	10
2.1. Rôle des agents infectieux.....	10
2.2. Microbiote intestinal.....	10
2.3. Tabac	11
2.4. Vitamine D	11
IV. COMPOSANTS DU SYSTEME IMMUNITAIRE IMPLIQUES DANS LES SPA.....	12
1. Cellules présentatrices d'antigènes.....	12
2. Lymphocytes.....	13
2.1. Ontogénèse des lymphocytes	13
2.2. Lymphocyte T	14
2.3. Différentiation et fonctions des lymphocytes T	14

V. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DES SPA	21
V.1. Rôle des cellules de l'immunité innée.....	21
V.2. Rôle des lymphocytes T helper	21
V.3. Rôle des lymphocytes Treg	22

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE	24
1. Objectifs.....	24
1.1. Objectif général	24
1.2. Objectifs spécifiques	24
II. CADRE TYPE ET PÉRIODE D'ÉTUDE.....	24
1. Cadre d'étude.....	24
2. Type et période d'étude	25
III. POPULATION D'ÉTUDE	25
1. Critères d'inclusion.....	25
2. Critères de non inclusion	25
IV. ASPECTS ÉTHIQUES.....	26
V. ANALYSE DES DONNEES	26
L'analyse des données a été effectuée par le logiciel SPSS version 17.	26
Les échantillons sanguins ont été analysés avec le logiel FlowJo pour identifier les différentes populations cellulaires.	26
VI. PROCEDURE DE L'ETUDE.....	26
1. Prélèvements.....	26
2. Séparation cellulaires.....	26
2.1. Réactifs et consommables	27
2.2. Principes de la séparation	27
2.3. Procédure de la séparation.....	28

3.	Conservation des cellules	28
3.1.	Réactifs et consommables	28
3.2.	Principes de la conservation	29
3.3.	Procédure de la conservation.....	29
4.	Décongélation stimulation et fixation.....	29
4.1.	Réactions et consommables.....	29
4.2.	Procédure de la décongélation.....	29
4.3.	Procédure de la stimulation et de la fixation.....	30
5.	Marquage intracellulaire	31
5.1.	Réactions et consommables.....	31
5.2.	Procédure du marquage en utilisant le kit de eBioscience.....	32
5.3.	Procédure du marquage en utilisant la méthode classique (PFA)....	32
6.	Analyse par cytométrie en flux.....	33
6.1.	Les pannels utilisés.....	33
6.2.	Principe de la cytométrie en flux.....	33
VII.	RESULTATS.....	36
1.	Stratégie de gating	36
2.	Comparaison du marquage en utilisant le kit eBioscience et le PFA.....	37
2.1.	Comparaison de la population des lymphocytes totaux.....	37
2.2.	Comparaison des lymphocytes T	38
2.3.	Comparaison des cytokines.....	38
3.	Comparaison des méthodes de stimulation en utilisant le PMA/Ionomycine et le SEB.....	39
3.1.	Comparaison de la population des lymphocytes totaux.....	39
3.2.	Comparaison des lymphocytes T	40
3.3.	Comparaison de la production de cytokines	41

VIII. COMMENTAIRES	42
VIII.1. Comparaison des méthodes de marquage	42
VIII.2. Comparaison des méthodes de stimulation	43
CONCLUSION.....	44
REFERENCES.....	46

INTRODUCTION

Les spondyloarthrites (SPA) sont des rhumatismes inflammatoires chroniques qui se distinguent des maladies auto-immunes par l'absence de modifications immunologiques humorales, bien qu'il existe une participation indéniable de l'immunité aussi bien innée qu'adaptative [38].

Elles ont en commun des manifestations cliniques (articulaires et extra-articulaires), des aspects radiologiques et un terrain héréditaire attesté par la liaison avec l'Ag HLA-B27. Sur le plan étiologique, l'étiologie exacte est inconnue ; ce pendant des facteurs étiologiques ont été décrits regroupant les facteurs génétiques et environnementaux qui agissent de concert [38].

La présence de facteurs environnementaux sur un terrain génétique va entraîner un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires contribuant ainsi à la genèse de la maladie. En effet, les lymphocytes (Th17) après stimulation secrètent des cytokines pro-inflammatoires qui initient l'inflammation locale au niveau des tissus cibles (Enthèses, l'uvéa, l'aorte etc...) [10 ; 38].

Au plan pronostique la présence de cytokines pro-inflammatoires est considérée comme un facteur de mauvais pronostic car entraînant les destructions au niveau des tissus cibles.

Enfin au plan thérapeutique, les SPA pour lesquelles on note plus de cytokines inflammatoires (Tumor necrosis factor (TNF)) répondent mieux aux anti TNF [20]. Il serait ainsi important d'évaluer les cytokines pro- et anti-inflammatoires au cours des SPA par le biais d'une cohorte de malades. Il est ainsi nécessaire d'optimiser la méthode utilisée.

Les études évaluant l'optimisation des techniques de marquage et de stimulation ont été effectuées aux Etats Unis par **Amanda A.P. Ng** et al et a porté sur l'optimisation de la fixation avec le Cyto-Chex® Transfix® et PFA [1], par **Hermi R et al** [18].

Ainsi, le but de ce présent travail est l'optimisation de la détection par marquage intracellulaire de l'interleukine 10 (IL-10) et de l'interleukine 17 (IL-17) chez les patients sénégalais atteints de SPA en vue d'une étude plus vaste du rôle de ces cytokines dans les SPA.

PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE

I. HISTORIQUE DES SPONDYLOARTHrites

Les SpA sont considérées comme étant le rhumatisme inflammatoire chronique le plus vieux de l'humanité [37]. En effet, des manifestations cliniques ressemblant à celles de la spondylarthrite ankylosante (SA) ont été découvertes sur la momie du pharaon Ramsès II (1279- 1213 avant JC) [22].

Au XVI^{ème} siècle, Matteo Realdo Colombo, médecin italien, rapporta la première description anatomique de la SA [22].

Au XIX^{ème} siècle, l'association avec le psoriasis, les entérocolopathies, le syndrome oculo-urétral fut démontré [22].

Entre 1893 et 1898, les publications de Pierre Marie en France, d'Adolph von Strümpell en Allemagne et de Vladimir Bechterev en Russie ont permis de faire un diagnostic de cette pathologie, en rapportant un tableau d'ankylose quasi-complet [21].

En 1931, Forestier et Sicard ont décrit les syndesmophytes et ont rapporté la classification des sacro-iléites [20 ; 21 ; 22].

En 1970, l'association de l'antigène HLA-B27 avec la SA fut découverte [34], puis plus tard confirmée pour la plupart des autres sous-types de SpA [25 ; 29]

II. EPIDEMIOLOGIE DES SPONDYLOARTHRISES

1. Fréquence

1.1. Prévalence

La prévalence des SPA dans le monde est évaluée à 0,1 à 2% dans la population générale [36].

En Europe, la prévalence des SpA dans les populations de souche caucasienne varie de 0,3 à 1,9%. Elle est proche de celle de la polyarthrite rhumatoïde dans les études récentes [27]. Aux États-Unis, la prévalence des SpA est de 0,21 % [27]. Cette prévalence est cependant plus élevée dans certaines tribus Indiennes d'Amérique du Nord et chez les Esquimaux de l'Alaska où elle est estimée à 1,6 % et 4,5 % [3]. En Asie, la prévalence des SpA est estimée à 0,26% comme en Chine [31]. En Afrique noire, les SpA sont classiquement considérées comme rares [19]. Des études ponctuelles rapportent cependant des cas isolés [11]. L'estimation de la prévalence des SpA est inférieure à 0,1% [32]. Au Maghreb, la prévalence des SpA n'est pas connue, mais elle semble plus élevée qu'en Afrique noire [17].

1.2. Incidence

Elle est plus élevée aux États-Unis et dans le nord de l'Europe où elle est estimée entre 6,4 et 10 pour 100 000 habitants. Cependant, elle est plus basse dans des zones comme la Grèce (1,5/100 000), au Japon (0,5/100 000) et en Afrique [27].

1.3. Sexe

Les SpA étaient considérées comme plus fréquentes chez les hommes. Cependant, le sex-ratio semble diminuer au cours du temps. Dans l'étude française de Epirhum 2 le sex-ratio était de 1/1 [27 ; 36].

1.4. Age

Ce groupe d'affections touche les adultes jeunes, avec un début des symptômes entre 20 et 40 ans dans la majorité des cas [27 ; 36].

III. PATHOGENIE

Si l'étiologie exacte des SpA demeure encore inconnue, cependant des facteurs étiologiques ont été décrits. Il s'agit ici de facteurs génétiques et environnementaux agissant de concert [2 ; 8 ; 12] et entraînant des modifications immunologiques.

1. Facteurs génétiques

L'existence de facteurs génétiques est attestée par des études familiales (étude sur des jumeaux et des enfants adoptés) et les modèles animaux. Elle est confirmée par des études d'associations, études cas-témoins, études de liaison. Ainsi plusieurs gènes certains appartenant au système HLA et, d'autres non ont été incriminés [10].

1.1. Gènes du système HLA

❖ Gène HLAB27

L'association entre le gène de HLA-B27 et les SA a été rapportée pour la première fois en 1973. Cette association a ensuite été observée pour d'autres pathologies du groupe des SpA et largement confirmée dans différents pays du monde. La fréquence du B27 dans la SPA est de 90 à 95 % [10 ; 26]. Différentes hypothèses ont été proposées pour essayer d'expliquer le rôle de la molécule HLA-B27 dans la pathogénie des SpA. Ces hypothèses peuvent être divisées en deux catégories : les théories spécifiques d'antigène, et les théories non spécifiques de l'antigène [7].

➤ Théories spécifiques d'antigène

Ces théories s'appuient sur la description des caractéristiques structurales de la molécule HLA-B27. En effet, il a été mis en évidence un motif caractéristique de la molécule HLAB27. Cette dernière est constituée de résidus particuliers au sein de la poche B de liaison au peptide antigénique, en comparaison avec les autres molécules HLA-B. Ce motif a été initialement déduit de la séquence des six

premiers sous types de HLAB27 qui ont été identifiés (HLA-B*2701-06), et a conduit à proposer que les SpA puissent résulter de la présentation par la molécule HLA-B27 de peptides particuliers [7].

✓ **Hypothèse du « peptide arthritogène ».**

Elle propose que la présentation par la molécule HLA-B27 d'un peptide, provenant d'un antigène exprimé spécifiquement dans les tissus cibles (articulations, enthèses), soit responsable de l'activation d'une population de lymphocytes T (LT) CD8+ auto-réactifs. Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs travaux, rapportant l'existence de clones T cytotoxiques restreints par la molécule HLA-B27 et dirigés soit, contre des antigènes bactériens, soit contre des auto-antigènes [7].

✓ **Hypothèse du mimétisme moléculaire**

Elle est complémentaire de la précédente dont elle fait le lien avec le rôle des bactéries dans le déclenchement des arthrites réactionnelles. En effet, cette hypothèse repose sur l'existence de séquences communes entre le HLA-B27 et certaines protéines bactériennes qui seraient à l'origine d'une réaction croisée. Cependant, ces théories n'ont pu être, jusqu'à ce jour, directement validées [7].

➤ **Théories non spécifiques d'antigène**

Ce sont des théories fondées sur des particularités biochimiques de la molécule HLA-B27.

✓ **Misfolding**

La molécule HLA-B27 se caractérise par un repliement qui ralentit lors de sa formation tridimensionnelle et lors de son assemblage avec le peptide et la b2-microglobuline (b2m) au sein du réticulum endoplasmique. Ce mauvais repliement semble dû à certains acides aminés situés dans la poche B du site de

liaison au peptide antigénique. L'une des conséquences possibles de ce mauvais repliement est la formation de dimères de lourdes chaînes de HLA-B27 qui s'accumulent progressivement dans le cytoplasme de la cellule [28]. La figure numéro 1 montre ainsi le mauvais repliement de la molécule HLAB27.

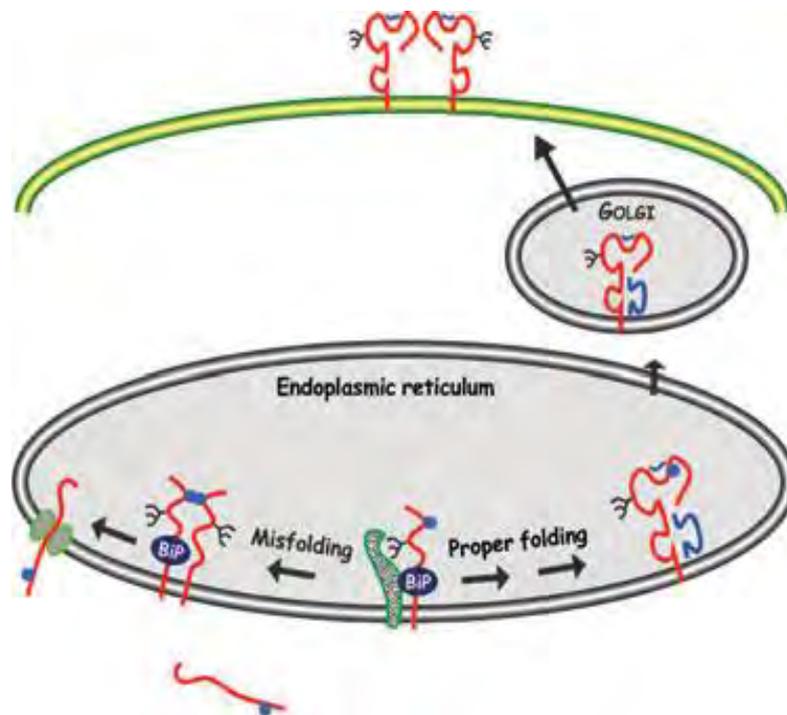


Figure 1 : Mauvais repliement de la molécule HLAB27 [28]

✓ Formation des homodimères

Récemment, certains auteurs ont montré que des homodimères de B27 exprimés à la surface de la cellule, proviendraient également du recyclage de formes moléculaires de HLA-B27 associées à la b2m (forme mature de B27) depuis la membrane plasmique par une voie endosomale. Cette formation d'homodimères est spécifique de B27, car liée à la formation de ponts disulfures entre les cystéines en position 67 de deux molécules B27, une position qui est caractéristique de cet allèle. En effet, sa mutation pour une sérine réduit de façon drastique la formation de dimères dans la cellule. Les conséquences possibles de ces anomalies biochimiques de B27 sont : l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique par accumulation de dimères, la présentation anormale d'auto antigènes par les

dimères de B27 aux (lymphocytes TCD4) LT CD4+ conduisant à une réponse T auto réactive, ou enfin la reconnaissance des dimères par des récepteurs de type « natural Killer » (NK) [24]

La figure ci-dessous illustre le rôle des homodimères de la molécule HLAB27 dans la pathogénèse des spondyloarthrites.

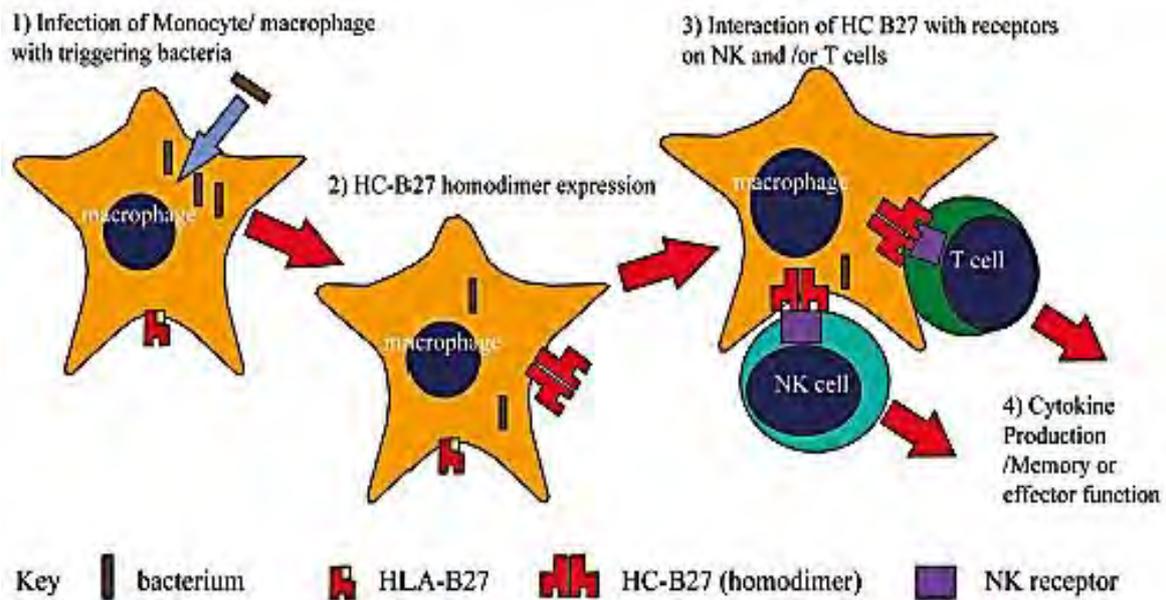


Figure 2 : Rôle des homodimères de la molécule HLAB27 dans la pathogénèse des spondyloarthrites [24]

Si l'antigène HLA-B27 semble être un important composant génétique dans la susceptibilité à la maladie, il n'en est pas, pour autant, indispensable, puisque d'authentiques SpA peuvent souvent survenir chez des sujets B27 négatifs. Cela amène à penser qu'il y'a bien l'intervention d'autres facteurs génétiques. Ainsi, existe il des facteurs portés par la région Human leukocyte antigen (HLA) et non HLA [10 ; 26].

1.2. Gènes non HLA

Pour les gènes situés ailleurs que dans la région HLA, différentes stratégies ont été adoptées pour la mise en évidence de ces facteurs génétiques ou d'une région chromosomique dans la susceptibilité à la maladie [10 ; 26].

❖ Stratégie de criblage du génome

La stratégie de criblage du génome, faisant appel aux micro-satellites et qui nécessite des études poussées portant sur les familles des patients.

Le criblage du génome a aussi permis de localiser plusieurs régions chromosomiques : 16q dans une étude anglaise, 6q et 11q dans une étude nord-américaine et 9q (9q31-34) dans une étude menée par le groupe français d'étude génétique des SpA.

Une méta-analyse récente de ces criblages du génome montre que 6, 16q, 19, 17p et 9q sont des régions chromosomiques d'intérêt dans la SA.

D'autres régions chromosomiques ont été identifiées, notamment dans les études familiales anglaises ; il s'agit des régions 1p, 2q, 6q, 9q, 16q et 19q. La liaison entre ces régions chromosomiques et la susceptibilité à la maladie est cependant variable selon ces études [10 ; 26].

❖ Stratégie des gènes candidats

Parmi les gènes candidats, NOD2 (nucleotid oligomerization domain gene- ou CARD15) a été étudié du fait de son implication en tant que facteur de prédisposition génétique à la maladie de Crohn. Le gène CARD15 code pour le récepteur de reconnaissance de motif (PRR) NOD2. Des travaux récents ont montré que l'expression de NOD2 par les cellules dendritiques est associée à l'expansion de cellules Th17.

D'autres gènes candidats ont été reliés à la SA. Il s'agit de l'allèle 4 du gène CYP2D6 codant pour un composant du cytochrome P450, porté en 22q. Ces données n'ont pas été confirmées par toutes les études.

Il a également été mis en évidence une association entre les gènes du cluster de l'interleukine 1(IL-1) (IL-1 α , IL-1 β et antagoniste du récepteur de l'IL-1) et la SA. Les facteurs de prédisposition génétique ont un rôle déterminant dans le risque de développement des SpA. Cependant, ils ne sont pas les seuls à être impliqués. Les facteurs liés à l'environnement sont également nécessaires au déclenchement, et peut-être même à l'entretien de la maladie [10 ; 26].

2. Facteurs environnementaux impliqués dans les SpA

Les facteurs génétiques ne sont pas les seuls facteurs étiologiques incriminés lors de la survenue des SPA. Des facteurs environnementaux ont également été décrits. Ces facteurs comportent des facteurs infectieux et non infectieux.

2.1. Rôle des agents infectieux

Leur influence est largement documentée dans les arthrites réactionnelles (AR). Les germes en cause ont été bien identifiés depuis plusieurs décennies, et comprennent *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni*. Ces bactéries possèdent certaines molécules sources d'une réponse immunitaire : il s'agit de composés immuno-stimulants comme les protéines du choc thermique (hsp) ou des antigènes lipopolysaccharidiques. Pour une même bactérie, plusieurs antigènes stimulants ont été identifiés [4 ; 10 ; 26].

2.2. Microbiote intestinal

Le microbiote intestinal ou flore intestinale est un ensemble des micro-organismes contenus dans l'intestin. Il est constitué d'espèces bactériennes dont certaines (*Bacteroides fragilis* et *Faecalibacterium prausnitzii*) ont des propriétés anti-inflammatoires et d'autres (bactéries filamenteuses) sont pro-inflammatoires [33].

Il paraît, de plus en plus, que des perturbations de son équilibre (ou dysbioses) pourraient contribuer à la survenue de pathologies inflammatoires chroniques. Il est intéressant de noter que le microbiote intestinal est en partie transmis par la mère à son enfant et que les facteurs génétiques pourraient donc, dans une certaine mesure, influencer sa composition [9].

2.3. Tabac

Le tabagisme a une influence néfaste sur l'activité de la SpA, sur le retentissement fonctionnel de la maladie et sur la progression radiographique, indépendamment du statut HLAB27 [33].

2.4. Vitamine D

Les patients atteints de SA ont des taux sériques significativement abaissés de 25(OH) vitamine D par rapport à des témoins sains [33].

La vitamine D3 agit sur la régulation de la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules immunitaires, de manière directe et indirecte en augmentant les Lymphocytes T régulateurs (Treg) et en diminuant les lymphocytes responsables de l'inflammation, en particulier, le lymphocyte Th17 (Th17) [16].

IV. COMPOSANTS DU SYSTEME IMMUNITAIRE IMPLIQUES DANS LES SPA

Dans la défense de l'organisme contre les agressions microbiennes ou les proliférations tumorales, il existe un ensemble de cellules et molécules impliquées.

Pour une meilleure compréhension de la réponse immunitaire, nous allons faire d'abord un rappel à propos des cellules du système immunitaire et des molécules impliquées dans la pathogénèse des SPA.

1. Cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont des cellules qui proviennent de la lignée myéloïde ou lymphoïde qui, à un moment donné, doivent présenter l'antigène et acquièrent les propriétés permettant de le faire. La fonction de ces cellules est de présenter l'antigène aux lymphocytes T et d'activer ces lymphocytes à produire les cytokines et les capacités effectrices qui sont les leurs. La figure suivante montre une CPA qui présente un antigène au lymphocyte T [5 ; 7].

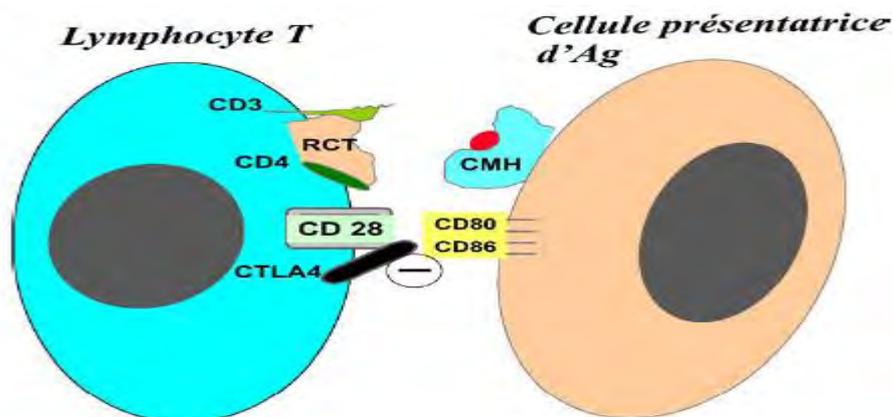


Figure 3 : Présentation d'un antigène au lymphocyte T. [5]

2. Lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules de l'immunité adaptative et sont les seules cellules qui portent des récepteurs spécifiques d'antigène. On distingue trois groupes de lymphocytes (les lymphocytes T, les lymphocytes B, et une troisième population de cellules appelée Lymphocytes NK (TNK)). Ils constituent une famille très hétérogène du point de vue fonctionnel.

2.1. Ontogénèse des lymphocytes

Les lymphocytes proviennent d'une cellule souche totipotente qui se différencie à la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Cette dernière après plusieurs étapes de différenciation donne les lymphocytes T et les lymphocytes B (LB).

La figure suivante permet d'illustrer les étapes de différenciation des lymphocytes T et B.

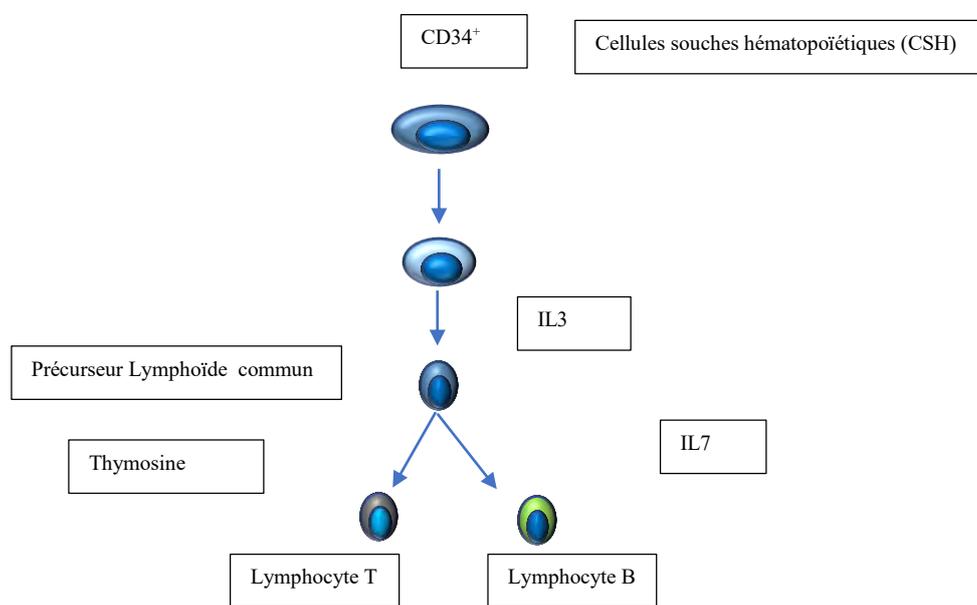


Figure 4 : Ontogénèse des lymphocytes

2.2. Lymphocyte T

Les lymphocytes T possèdent certaines caractéristiques particulières qui permettent leur identification. Ils possèdent ainsi la molécule CD3 qui assure la transduction du signal principal, la molécule CD2 qui est un facteur d'adhésion, la molécule CD28 ou CD40 ligand qui est une molécule de co-stimulation induisant le signal et le récepteur pour l'antigène qui s'appelle le TCR. Ce dernier de nature hétérodimérique, est formé par l'association de deux chaînes polypeptidiques glycosylées ancrées dans la membrane et sont produites par plusieurs gènes situés sur les chromosomes 7 et 14. Il constitue le site de reconnaissance de l'épitope à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ce récepteur des lymphocytes T (TCR) ne reconnaît que des antigènes protéiques. [13]

La figure suivante montre la structure du TCR du LTCD8.

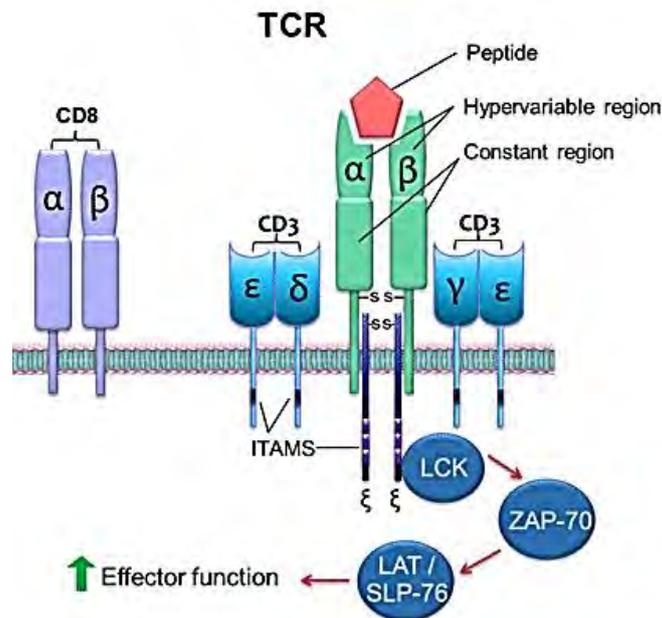


Figure 5 : Structure du TCR du lymphocyte TCD8 [13]

2.3. Différentiation et fonctions des lymphocytes T

Le lymphocyte T se différencie en plusieurs populations de lymphocytes en fonction de l'antigène présenté, de la cellule présentatrice d'antigène et surtout

des cytokines qui sont présentes dans l'environnement. Ainsi selon les critères fonctionnels, nous pouvons avoir :

❖ Lymphocytes T helper

Les lymphocytes T helper, encore appelés lymphocytes T « auxiliaire », expriment l'antigène CD4 à leur surface. Ces lymphocytes jouent un rôle important de régulation dans la réaction immunitaire. Ainsi, pouvons-nous avoir.

➤ Th1

La différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th1 débute par la liaison de l'interféron γ (IFN γ) à son récepteur, au niveau du lymphocyte Th0 activé, entraînant ainsi une activation du facteur de transduction STAT1 et également du facteur de transcription T-box expressed in T cells (T-bet, ancien TBX21). Le T-bet induit la formation de la composante $\beta 2$ du récepteur de l'interleukine 12 (IL12) qui se lie à la composante $\beta 1$ (déjà existante) pour former un récepteur fonctionnel. La liaison d'interleukine 12 (IL12) à ce récepteur active la voie de transduction de STAT4. Le lymphocyte T naïf différencié en Th1 secrète principalement l'interleukine 2 (IL-2), IFN- γ et IL-12. Ces cytokines vont donc orienter la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire en stimulant les lymphocytes T cytotoxiques (T CD8⁺). La figure 6 montre la différenciation du lymphocyte Th0 en Th1 [35].

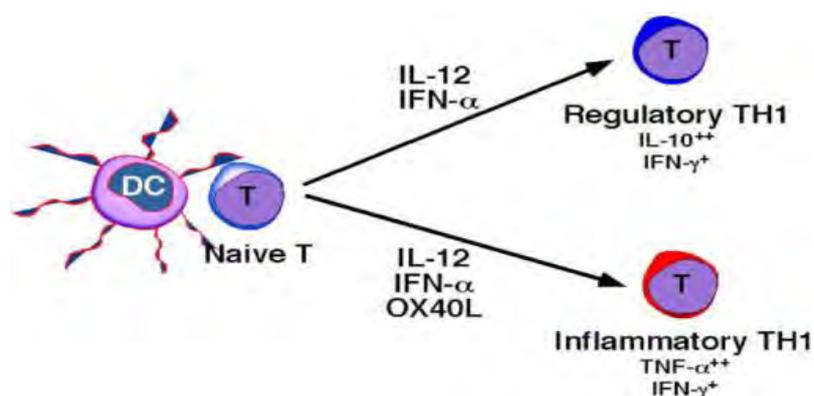


Figure 6 : Différenciation du lymphocyte Th0 en Th1 [35].

➤ Th2

La différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th2 dépend de la liaison de l'IL4 avec son récepteur. Cette liaison active la voie de transduction de STAT6 et du facteur de transcription guanosine adénosine thymidine adénosine 3 (GATA3). Les Th2 secrètent principalement les interleukines 4 (IL-4), interleukine 5 (IL-5), interleukine 9 (IL9), IL-10 et interleukine 13 (IL-13) et interleukine 25 (IL25) qui orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale en stimulant les LB à produire des anticorps. Les Th2 secrètent également des lymphokines qui mobilisent les macrophages et augmentent leur capacité à détruire les microorganismes et attirent d'autres types de leucocytes, comme les neutrophiles. Cette figure 7 illustre la différenciation du lymphocyte naïf (Th0) en Th2 [35].

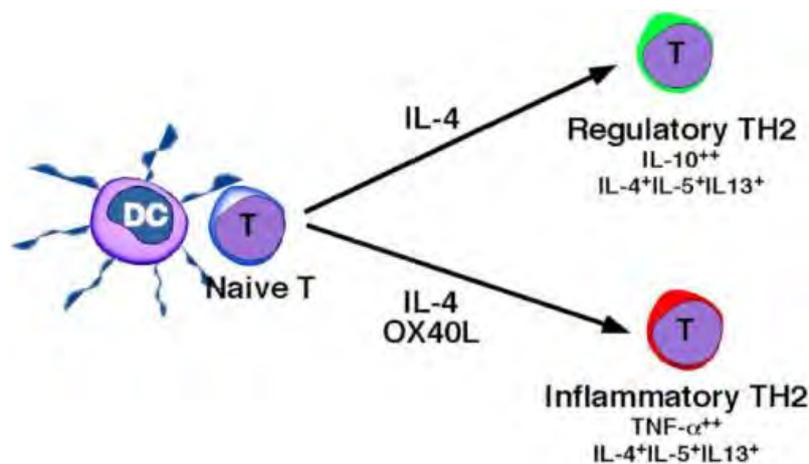


Figure 7 : Différenciation du lymphocyte Th0 en Th2 [35].

➤ Th17

Pendant longtemps, l'existence des lymphocytes T « helper » de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2) a permis à elle seule d'expliquer la plupart des réponses immunitaires mises en place dans les maladies inflammatoires. Une troisième classe de lymphocytes T « helper », les Th17, ont cependant été d'un apport important dans l'explication de différents mécanismes, surtout d'immunopathogénèse, qui étaient jusqu'ici non élucidés [30].

La différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th17 peut être schématisée en trois phases [30] :

- Une phase d'induction : après activation par une cellule dendritique (DC), les lymphocytes Th0 se différencient en lymphocyte Th17 sous l'action conjointe de l'IL-1 β ou de l'interleukine 6 (IL-6) associés au TGF- β sécrétés par la DC ;
- Une phase d'amplification grâce à une sécrétion autocrine de l'interleukine 21 (IL21) ;
- Une phase de stabilisation : l'interleukine 23 (IL-23) permet la stabilisation et l'expansion de la lignée cellulaire Th17 en agissant sur le récepteur membranaire de l'IL-23 (IL-23R) exprimé par les Th17 et induit la sécrétion d'IL-17A, IL-17F et interleukine 22 (IL-22) [30].

Le figure 8 illustre la différenciation du lymphocyte Th0 en Th17

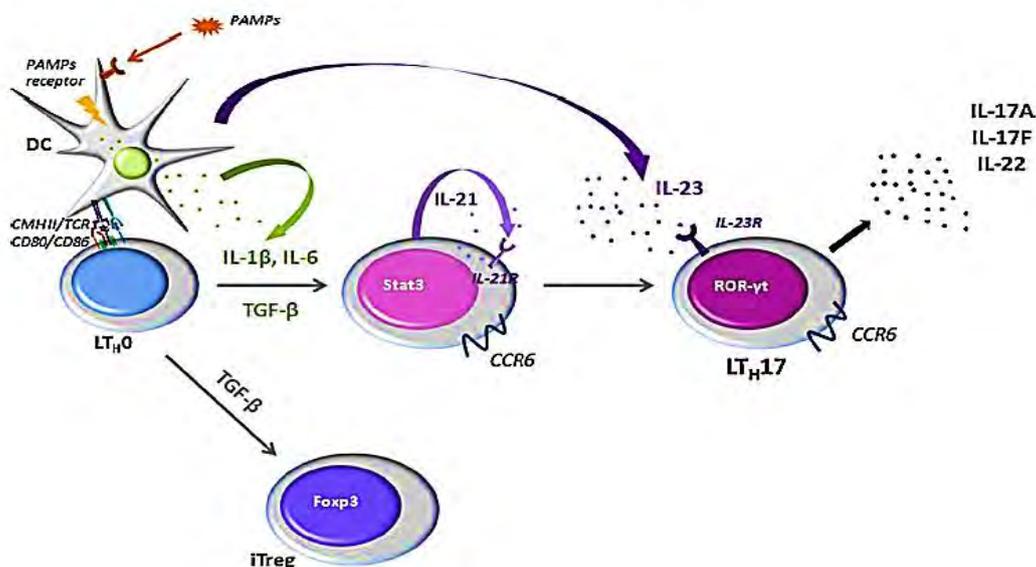


Figure 8 : Différenciation du Th0 en Th17 [30]

❖ Autres cellules T auxiliaires

Les autres lymphocytes T auxiliaires sont représentés par le Th9 et le Th22

❖ **Lymphocytes T cytotoxiques**

Les lymphocytes T CD8⁺ ou T cytotoxiques (CTL) expriment l'antigène CD8 à leur surface. Ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par la cellule. La reconnaissance est le premier signal d'activation. Un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique de la cellule. Ces lymphocytes T reconnaissent et se lient à des cellules cibles infectées par des virus, des cellules cancéreuses ou du non soi, et libèrent des protéines effectrices telles que la perforine. Cette dernière provoque des trous dans la membrane de la cellule cible entraînant la sécrétion des granzymes qui détruisent la cellule infectée. Lorsque celle-ci perd son cytoplasme, elle meurt en moins de deux heures. Une fois la perforine injectée, le lymphocyte se détache et se met à la recherche de nouvelles cellules cibles.

Les lymphocytes T cytotoxiques sécrètent aussi le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) qui tue lentement les cellules cibles en l'espace de 48 à 72 heures. Ils sécrètent également de nombreuses lymphokines qui interviennent de multiples façons pour amplifier la réponse immunitaire.

❖ **Lymphocytes T régulateurs**

Les lymphocytes T régulateurs sont les cellules T essentielles dans le contrôle de la réponse immunitaire. Deux catégories de cellules Treg ont été identifiées à savoir les cellules Treg naturelles et les Treg adaptatives ou induites [6].

La figure numéro 9 montre les deux catégories de Treg et leur origine.

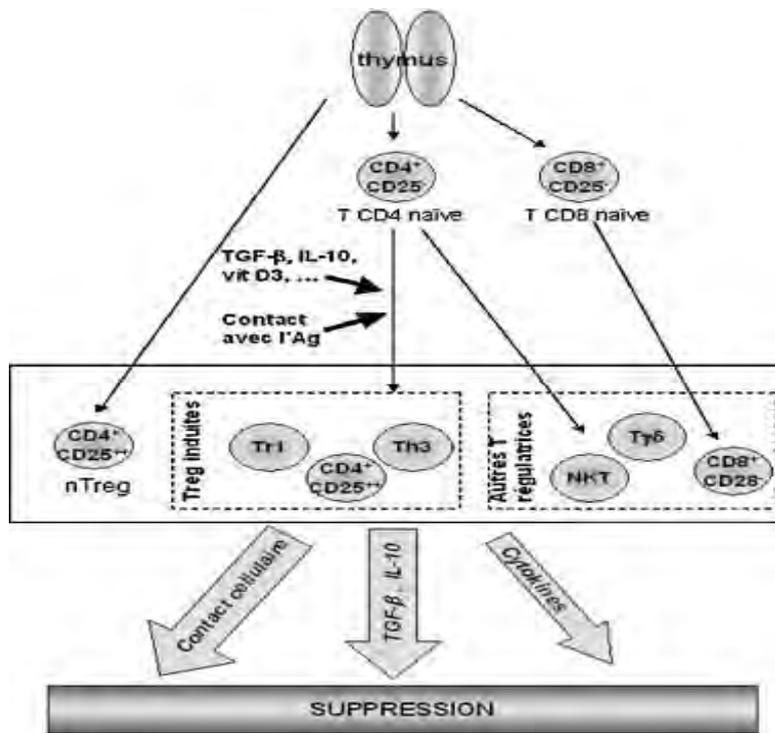


Figure 9 : Ontogénèse et les différentes populations de Tregs [6]

➤ i Treg

Elles sont issues des cellules épithéliales du cortex thymique. Ces cellules de l'immunité adaptative peuvent être induites *in vitro* par des cytokines ou par co-culture avec des cellules dendritiques immatures et *in vivo* après exposition répétée à un super antigène. On distingue :

- Les cellules régulatrices T CD8⁺ obtenues après stimulation des cellules CD8⁺ naïves et CD25⁻ par un antigène (Ag) étranger ou un Ag du soi.
- Les cellules régulatrices Th-3 obtenues après activation des cellules TCD4⁺ naïves CD25⁻ par un Ag. Elles produisent beaucoup d'IL10 et peu de TGF-β.
- Les cellules TR1 issues des cellules TCD4⁺ naïves CD25⁻, produisent essentiellement du TGF-β.

➤ n Treg

Elles proviennent des cellules dendritiques médullaires du thymus pendant la vie fœtale. C'est dans le thymus que les Tregs naturelles acquièrent leur phénotype régulateur et leur fonction suppressive. Elles migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires où elles acquièrent leur phénotype mémoire. Ces lymphocytes T régulateurs expriment en grande quantité la molécule CD25 (T CD4+CD25^{high+}) et le facteur de transcription FoxP3. Les lymphocytes T régulateurs naturels expriment également le « Glucocorticoid Induced TNF Receptor » (GITR), le lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), sont CD45RB^{low} chez la souris (l'équivalent du CD45RO chez l'homme) et expriment un taux faible de CD127. La fonction régulatrice des lymphocytes Treg naturels s'exerce sur les CPA par l'intermédiaire de signaux de régulation tels que CTLA-4 et le GITR, ou à travers les cytokines TGF- β et l'IL-10 [15].

La figure suivante illustre le lymphocyte T régulateur avec les différentes molécules à la surface et leurs actions sur les cellules cibles.

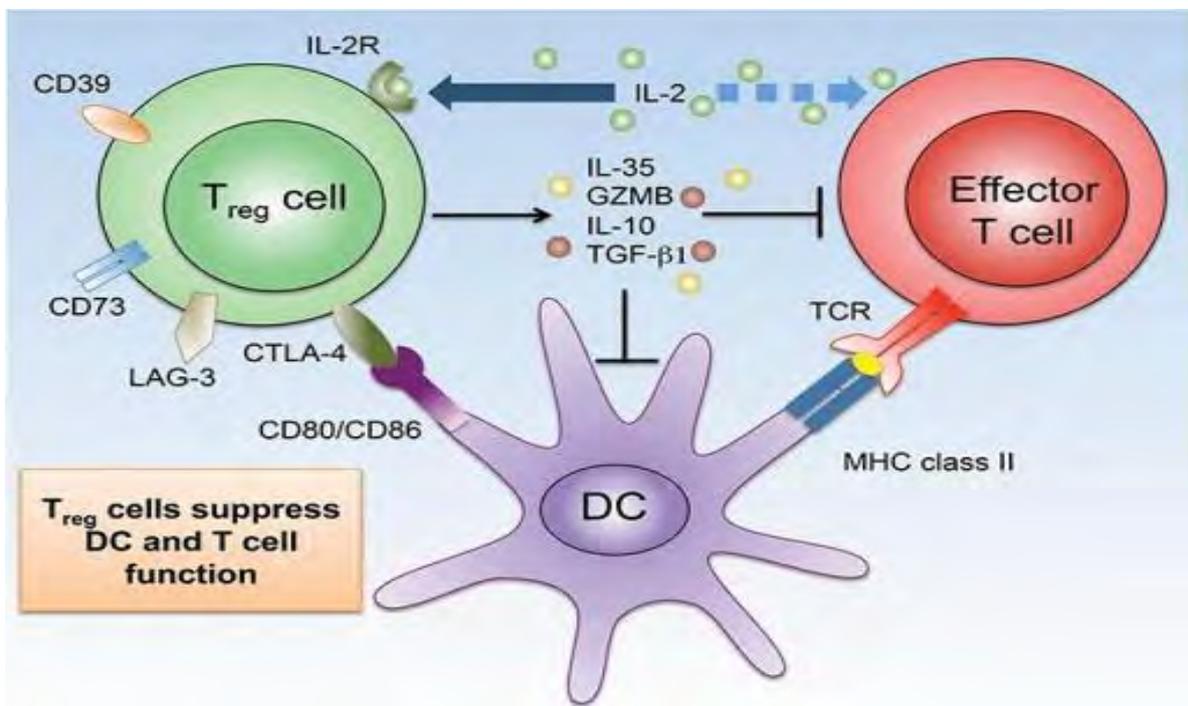


Figure 10 : Lymphocyte Treg régulateur avec molécules de surface et leurs actions sur les cellules cibles [15].

V. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DES SPA

La présence de facteurs environnementaux sur un terrain génétique va entraîner des modifications immunologiques conduisant à un déséquilibre entre les cytokines pro inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires, au profit des cytokines pro inflammatoires participant ainsi à l'initiation de la maladie au niveau des tissus cibles par l'activation des ostéoclastes, la formation de métalloprotéases, de BMP et autres facteurs contribuant à la destruction des tissus. Ce sont d'abord les cellules de l'immunité innée qui sont les premières cellules concernées.

V.1. Rôle des cellules de l'immunité innée

Actuellement, les hypothèses de travail mettent en avant le rôle des (CPA), sur exprimant le HLA-B27 dans la pathogénie de la SpA. Ces CPA prédisposeraient à la maladie en interagissant avec des LT normaux, entraînant ainsi une réduction de moitié de l'interaction DC et LT par rapport aux DC normales. Cette anomalie est due, en grande partie, à une mauvaise utilisation de la molécule CD86 par les DC B27+, bien qu'elle soit exprimée en quantité équivalente à la surface des différents types de DC. Ainsi, l'hyper-expression de B27 engendre une anomalie fonctionnelle des DC, qui pourrait perturber le maintien de la tolérance naturelle [7].

V.2. Rôle des lymphocytes T helper

Les LT jouent un rôle important dans l'expression de la maladie. Leur présence est nécessaire au déclenchement de la pathologie. Il persiste une prédominance de réponse CD4+ qui est considérée comme un événement observé à l'initiation de la réponse immunitaire alors qu'une réponse CD8+ jouerait plutôt un rôle dans la persistance de cette réaction. Après activation des lymphocytes T sous l'action des CPA, le lymphocyte T va sécréter des cytokines. Ainsi L'IL17A et IL17F augmentent le recrutement, l'activation, la migration des Polynucléaires

neutrophiles (PNN) et des macrophages via la stimulation de la granulopoïèse et la synthèse de chimiokines (CXCL1, GCP2, CXCL8 ou IL-8, CXCL10, MCP-1) par les PNN, les macrophages et les cellules épithéliales (cellules synoviales) activés par l'IL-17. L'IL-17A et 17F permettent également la synthèse par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α), de G-CSF et de GM-CSF qui stimulent la granulopoïèse, de prostaglandine E2 et de métalloprotéases qui vont augmenter l'inflammation locale et la destruction des tissus. IL17, entraînent une augmentation de l'expression de RANK. RANK est le récepteur activateur de NF κ B qui, fixé sur son ligand (RANKL), entraîne une augmentation de la différenciation des ostéoclastes. Ces ostéoclastes vont entraîner une destruction osseuse. *L'activation de Th17 entraîne la production* de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-23, IL-22, une augmentation Bone morphogenetic proteins (BMP) et une activation de la voie Wnt au niveau locale (des enthèses), responsable ainsi des destructions osseuses.

Des boucles d'amplification vont entretenir la réponse inflammatoire. Ainsi, les cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-6) sécrétées par les cellules stimulées par l'IL-17 au niveau du foyer inflammatoire vont induire une production d'IL-23 par les monocytes et les cellules dendritiques ; ceci va avoir comme conséquence une augmentation de la production d'IL-17 par les LTh17 [30].

V.3. Rôle des lymphocytes Treg

Un défaut d'activation des LT régulateurs, dont on connaît le rôle essentiel dans le maintien de la tolérance immunologique pourrait, dans certaines circonstances, entraîner une rupture de tolérance et conduire à la pathologie inflammatoire. On peut transposer cette hypothèse à la situation des ARe, où le HLA-B27 faciliterait le développement de l'ARE en entravant des mécanismes de régulation de la

réponse inflammatoire. Ainsi, dans la plupart des cas, la réponse régulatrice parviendrait à maîtriser la réaction, même avec retard, et parfois l'absence de réponse régulatrice entraînerait le développement d'une SpA [7].

Au cours également des maladies inflammatoires, l'activité suppressive des Treg est altérée et la compréhension à ce phénomène a fait l'objet d'un petit nombre d'études. Il semble d'abord que les interactions entre CPA et Treg sont modifiées au cours de la maladie. En fait, la surexpression de molécules de co-stimulation comme HLA de classe II, CD80, CD86 ou CD40 par les monocytes des maladies inflammatoires induit une baisse de l'activité suppressive des Treg. Le même travail a montré aussi l'effet de plusieurs cytokines pro-inflammatoires sur la fonction des Treg. En effet les cytokines abondamment présentes dans la synoviale des maladies inflammatoires, inhibent la fonction des Treg. Il semblerait par ailleurs que l'IL-17 agisse sur la fonction des Treg rendant les cellules T effectrices résistantes à la suppression exercée par les Treg [7].

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL PERSONNEL

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. Objectifs

1.1. Objectif général

L'objectif principal de ce travail est d'arriver à optimiser la détection des cytokines par marquage intracellulaire chez les patients atteints de SPA dans l'optique d'une étude visant à évaluer l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires au cours de cette pathologie. En effet, dans le cadre de cette étude, des échantillons de PBMC provenant de sujets atteints de SPA ont été déjà collectés et l'optimisation de la détection des cytokines s'avère nécessaire avant l'analyse finale des échantillons.

1.2. Objectifs spécifiques

Pour atteindre ces objectifs, nous nous sommes proposés de :

- Comparer la détection de cytokines après stimulation des cellules par le PMA/Ionomycine et le SEB.
- Comparer les méthodes de marquage intracellulaire en utilisant le kit de eBioscience et la méthode classique utilisant le marquage par le PFA et la perméabilisation par la saponine.

II. CADRE TYPE ET PÉRIODE D'ÉTUDE

1. Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée au Centre Hospitalier National Universitaire (CHNU) Aristide le Dantec et a comporté deux volets :

- Un volet clinique qui s'est déroulé au niveau du service de Rhumatologie où les patients atteints de SPA ont été recrutés.
- Un volet biologique qui s'est déroulé à l'Unité d'Immunologie du Laboratoire de Bactériologie et Virologie du CHNU Le Dantec où la

séparation des cellules, les tests immunologiques et l'analyse des données ont été effectués.

2. Type et période d'étude

Les échantillons que nous prévoyons d'analyser proviennent d'une étude transversale, à visée descriptive et analytique portant sur des patients suivis dans le service de Rhumatologie. La collecte de ces échantillons a été réalisée sur une période de 2ans, allant de Janvier 2016 à Décembre 2018.

III. POPULATION D'ÉTUDE

Nos échantillons proviennent d'une population d'étude constituée de patients atteints de SPA, suivis en ambulatoire dans le service de Rhumatologie du CHNU Aristide Le Dantec.

Les critères suivants ont été considérés avant l'enrôlement des patients :

1. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion des patients étaient les suivants :

- La connaissance préalable du diagnostic de SPA ;
- Obtention d'un consentement libre et éclairé des malades après information sur les objectifs de l'étude.

2. Critères de non inclusion

- Les patients atteints des autres types de rhumatismes inflammatoires chroniques outre que la SPA ;
- Ceux dont le diagnostic de SPA était en attente ;
- Un refus de consentement libre et éclairé des malades après information sur les objectifs de l'étude.

IV. ASPECTS ÉTHIQUES

Avant le début de l'étude, tous les participants ont été informés des objectifs et des modalités de l'étude ; chaque patient/participant a librement consenti à participer à l'étude à travers une fiche de consentement libre éclairé. Pour les personnes consentantes, un questionnaire individuel a été rempli.

Lors de l'analyse des résultats, le nom de chaque participant a été remplacé par un code pour garantir la confidentialité des données. Tout participant était libre de se retirer à tout moment ; et cette décision n'affecterait en aucun cas les conseils et soins médicaux à délivrer.

V. ANALYSE DES DONNEES

L'analyse des données a été effectuée par le logiciel SPSS version 17.

Les échantillons sanguins ont été analysés avec le logiciel FlowJo pour identifier les différentes populations cellulaires.

VI. PROCEDURE DE L'ETUDE

Des échantillons de sang ont été prélevés et séparés. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) obtenues après séparation cellulaire ont permis de faire une stimulation et un marquage cellulaire.

1. Prélèvements

Après information du patient, 16ml de sang total ont été prélevés sur 2 tubes héparinés de 10ml. Le sang a été acheminé au laboratoire dans les six heures qui ont suivi le prélèvement.

2. Séparation cellulaires

Une séparation cellulaire a été effectuée et les PBMC ont été isolées par gradient de Ficoll.

2.1. Réactifs et consommables

Pour la séparation cellulaire, nous avons utilisé comme matériel : des tubes leucosep 50ml (tube avec le filtre), des tubes Falcon 50ml, des cryotubes avec anneau rouge (pour les cellules), des cryotubes simples (pour plasma, buffy coat et PAXGen), une pipette 1000ml (avec ambouts 1000ml), une pipette 200 μ l (avec ambouts 200 μ l), une pipette 20 μ l (avec ambout 20ul), une pipette de transfert 10ml, une pipette pasteur en plastique 3ml, des portoirs pour tube 50ml et cryotubes, une centrifugeuse, un microscope, des lames de comptage. Concernant les réactifs, du Ficoll a été utilisé de même que du RPMI 1640, de FBS, de la Pénicilline et streptomycine, de L-Glutamine, du Bleu Turk, du DMSO et en fin du PAXGen.

2.2. Principes de la séparation

Les éléments figurés du sang périphérique, ont été séparés en milieu Ficoll-triosil de haute densité, subissent durant la centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en deux fractions. D'une part, les érythrocytes et les granulocytes qui sédimentent au fond du tube et d'autre part, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes qui restent à l'interface échantillon/milieu de séparation.

La figure suivante montre un échantillon sanguin séparé par gradient de Ficoll.

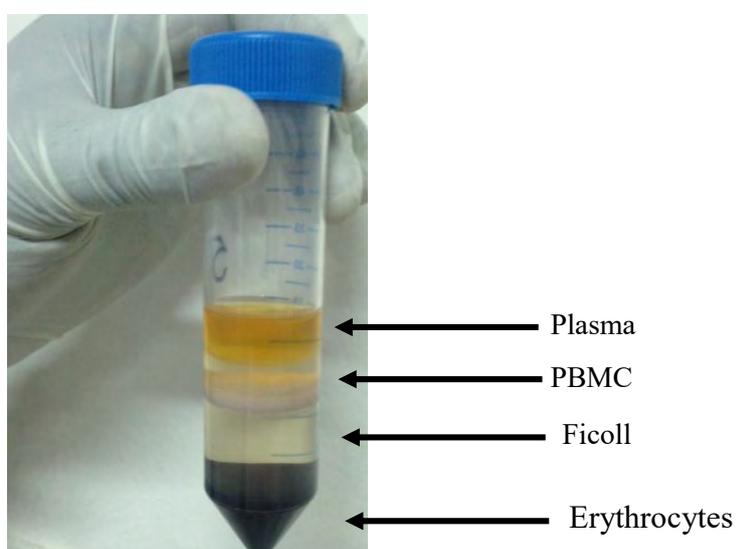


Figure 11 : Echantillon sanguin séparé par gradient de Ficoll

2.3. Procédure de la séparation

Dans un tube Falcon de 50 ml, nous avons versé 15ml de Ficoll et centrifugé pendant une mn. Le sang collecté (2x8 ml de sang dans un tube hépariné) est versé doucement dans le tube Falcon contenant le Ficoll en bas du filtre. Le sang a été centrifugé pendant 15 minutes à 800 tours sans freinage. A la suite de cette centrifugation, deux ml de plasma ont été aliquotés dans du tube eppendorf 1,5 et conservés à -20°C (pour autres tests au besoin), 2 x 300 µl de Buffy-coat dans un tubes eppendorf 1,5 (pour l'extraction de l'ADN au besoin) et congelés à -20° C. Les PBMCs restant dans le tube ont été transférés dans un nouveau tube Falcon de 50 ml et le volume complété jusqu'à 50ml avec la solution de lavage (RPMI/PS). Le tube a été centrifugé à 1800 tpm pendant 10 minutes à 4° avec freinage. Après centrifugation, le surnageant a été versé et le culot re-suspendu doucement dans 10ml de solution de lavage 10% de FBS/RPMI. Pour le comptage des cellules, nous avons transféré 50 µl de la suspension cellulaire dans un puit d'une plaque de 96 puits. Le liquide restant dans le tube a été encore centrifugé à 1800 tpm pendant 10 minutes à 4°. Durant la centrifugation, nous avons ajouté 50 µl de bleu trypan (dilution au 1/2) dans le puits contenant les 50 µl de la suspension cellulaire et compté les cellules vivantes avec une cellule hematométrique. Pour une cellule de comptage mesurant 0,1 µl /16 carrés, les cellules ont été comptés dans 2 quadrants de 16 carrés et divisés par 2 => n et nous avons multiplié par 20.000 pour avoir la concentration cellulaire.

3. Conservation des cellules

Les cellules séparées, sont conservées pour la détermination ultérieure des cytokines après stimulation et marquage cellulaire.

3.1. Réactifs et consommables

Pour la conservation des cellules, nous avons utilisé un réfrigérateur à – 80°C et un réfrigérateur à – 150°C.

3.2. Principes de la conservation

Les PBMC ainsi isolées ont été conservées pour leur stimulation et la détermination ultérieure des réponses cellulaires. L'objectif de ce procédé a été de réaliser les tests immunologiques de tous les échantillons en même temps afin d'éviter les variabilités techniques entre les échantillons mesurés à des moments différents.

3.3. Procédure de la conservation

La conservation des PBMCs a été réalisée selon les étapes suivantes :

Après la centrifugation des PBMCs, le surnageant est versé et le culot cellulaire re-suspendu dans un volume suffisant de 10%FBS/RPMI pour avoir une concentration de 20 millions de PBMC/ml.

300µl de la suspension de 20 million de PBMC ont été mis dans un cryotube => 6 millions de PBMC. Après cette étape, le même volume de solution de conservation (10%FCS/20%DMSO/RPMI) a été ajouté dans le tube contenant les cellules et nous avons mis les cryotube à 4°C dans de l'isopropanol et conserver à -80°C pendant une nuit. Le jour suivant, les tubes contenant les cellules ont été transférés dans un réfrigérateur à -150°C.

4. Décongélation stimulation et fixation

4.1. Réactions et consommables

La décongélation, la stimulation et la fixation cellulaire nécessitent un certain nombre de matériels. Parmi ce matériel, nous avons: le FBS, le RPMI, le FACS, les tubes stériles, un bain Marie, une centrifugeuse, du bleu Trypan et des cellules de comptage.

4.2. Procédure de la décongélation

Lorsque tous les échantillons ont été collectés, les cellules ont ensuite été décongelées pour procéder à la stimulation précédant le marquage cellulaire. Pour

la décongélation, nous avons préparé une solution de 10% de FBS/RPMI constituant la solution de décongélation. 2ml de cette solution de décongélation ont été mis dans des tubes FACS stériles de 5ml. Les cellules ont été ensuite sorties du réfrigérateur à -150°C et laissées dans la hotte jusqu'au début de la décongélation. 500µl de la solution de décongélation ont été ajoutées dans le cryotube contenant les cellules et mélangées jusqu'à la décongélation totale. Après décongélation totale, nous avons pris 500µl du mélange des cellules en suspension et nous les avons mis dans le tube FACS contenant la solution de décongélation. A partir du FACS tube, 500µl de la solution ont été pris et nous les avons mis dans le cryotube. 1ml de la solution contenue dans les cryotubes ont été pris, mis dans le FACS tube et mélangé. Nous avons procédé de la même manière jusqu'au transfert total des cellules dans le FACS tube. Après le transfert total des cellules dans le FACS tube, nous avons centrifugé le mélange pendant 5 min à 1800tpm à TA. Le surnageant a été versé et les cellules re-suspendues dans 2ml de 10% de FBS/RPMI pour le comptage des cellules avec du BT. Après comptage (N), nous avons centrifugé pendant 5 min à 1800tpm, versé le surnageant puis ajouté le volume de 10% de FBS/RPMI nécessaire pour obtenir $5 \cdot 10^6$ PBMC/ml (5/N).

4.3. Procédure de la stimulation et de la fixation

❖ Principe de la stimulation et de la fixation

La stimulation cellulaire permet de mettre en évidence les différentes sous-populations de cellules T « helper » par leurs cytokines spécifiques et d'apprécier *in vitro* leurs fonctions effectrices. Pour ce faire, les PBMCs ont été stimulées par un antigène en présence de Bréfeldine A qui inhibe l'appareil de Golgi afin de maintenir les cytokines secrétées dans la cellule. Ensuite, les cellules étaient fixées pour stabiliser les marqueurs à déterminer par cytométrie de flux.

➤ **Stimulation avec le PMA/Iono**

Pour chaque échantillon, nous avons pipeté 100µl de la suspension cellulaire (5.10^6 /ml) dans 10 différents puits d'une plaque de 96 puits et nous avons ajouté 100µl de 10% de FBS/RPMI dans les 5 premiers puits (condition non stimulée), 100µl d'une solution de 100ng/ml de PMA + 1µg/ml d'Ionomycine dans les 5 autres puits. Les tubes ont été incubés à l'étuve à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂ pendant 2 h. A la deuxième heure, nous avons sorti la plaque et rajouté 5µl de la Brefeldine A + Monensin prédilulée au 25ieme et 37,5ieme respectivement dans le même tube contenant 10% de FBS/RPMI, et ensuite, les tubes ont été incubés pendant 4 heures.

➤ **Stimulation avec le SEB**

Pour chaque échantillon, pipeter 100µl de la suspension cellulaire (5.10^6 /ml) dans 10 différents puits d'une plaque de 96 puits et nous avons ajouté 100µl de 10% de FBS/RPMI dans les 5 premiers puits (condition non stimulée) 100µl de SEB à 200ng/ml dans les derniers tubes. Les tubes incubés à l'étuve à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂ pendant 2 h. A la deuxième heure, nous avons sorti la plaque et y rajouté 5µl de la Brefeldine A + Monensin prédilulée au 25ieme et 37,5ieme respectivement dans le même tube contenant 10%FBS/RPMI et les tubes incubés pendant 4 heures supplémentaires.

5. Marquage intracellulaire

5.1. Réactions et consommables

Pour le marquage cellulaire, nous avons utilisé le materiel suivant: le FBS, le RPMI, le FACS, les tubes stériles, un bain Marie, une centrifugeuse, du bleu Trypan et des lames de comptage.

5.2. Procédure du marquage en utilisant le kit de eBioscience

Après incubation des tubes, la solution contenue dans ces tubes a été centrifugée à 1200rpm pendant 5min. Le surnageant a été versé, 200µl de FACS buffer ont été ajoutés dans les tubes et centrifugés encore à 1200rpm pendant 5min. Après centrifugation, 100µl de solution de eBiofix ont été ajoutés et les tubes incubés pendant 1h, à l'abri de la lumière. L'incubation a été suivie de l'ajout de 200µl de FACS buffer et d'une centrifugation à 1200rpm pendant 5min. Le surnageant a été versé après centrifugation et 100µl de solution de perméabilisation (saponine 0.5%) ou eBio perm buffer ajoutés, suivi encore d'une incubation de 30mn. Pendant l'incubation, nous avons préparé les panels d'anticorps dans une solution de perméabilisation. Après incubation avec la solution de perméabilisation, nous avons centrifugé pendant 5 min à 1200rpm, versé le surnageant et ajouté 30µl de chaque panel d'anticorps dans les puits correspondants puis incubé encore pendant 30min à l'abri de la lumière.

5.3. Procédure du marquage en utilisant la méthode classique (PFA)

Après incubation des tubes, la solution contenue dans ces tubes a été centrifugée à 1200rpm pendant 5min. Le surnageant a été versé, 200µl de FACS buffer ont été ajoutés dans les tubes et centrifugés encore à 1200rpm pendant 5min. Après centrifugation, 100µl de solution PFA 2% ont été ajoutés et les tubes incubés pendant 15mn, à l'abri de la lumière. L'incubation a été suivie de l'ajout de 200µl de FACS buffer et d'une centrifugation à 1200rpm pendant 5min. Le surnageant a été versé après centrifugation et 100µl de solution de perméabilisation (saponine 0.5%) ou eBio perm buffer ajoutés, suivi encore d'une incubation de 30mn. Pendant l'incubation, nous avons préparé les panels d'anticorps dans une solution de perméabilisation. Après incubation avec la solution de perméabilisation, nous avons centrifugé pendant 5 min à 1200rpm, versé le surnageant et ajouté 30µl de chaque panel d'anticorps dans les puits correspondants puis incubé encore

pendant 30min à l'abri de la lumière. Cette étape est suivie de l'ajout de 100µl de solution de perméabilisation (saponine 0.5% ou eBio perm buffer) et centrifugé pendant 5min à 1200tpm et versé le surnageant. 200µl de FACS buffer ont été ajouté et centrifugé à 1200tpm pendant 5min et versé le surnageant. Nous avons re-suspendu les cellules dans 200µl de FACS buffer et transféré le contenu de chaque puits dans un tube FACS pour la lecture.

6. Analyse par cytométrie en flux

A partir des cellules stimulées, les cytokines associées aux cellules Treg (IL-10), Th17 (IL-17) ont été mesurées par marquage intracellulaire.

Nous avons marqué les marqueurs de différenciation à savoir CD3 et CD4 au niveau du lymphocyte T de même que IL-10 et IL-17 qui sont produites respectivement par les Tregs et les Th17.

6.1. Les pannels utilisés

Les pannels suivant ont été utilisés :

- **CD3-APC** 1:80
- **CD4-PerCP** 1:80
- **IL-10-PE** 1:50
- **IL-17-FITC** 1:50

6.2. Principe de la cytométrie en flux

Le principe repose sur l'identification des antigènes cellulaires encore appelés classes de différenciation (CD) qui ont été préalablement mis en contact avec des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome et excités par un laser. L'identification est réalisée selon les caractéristiques d'émission des lumières par les cellules. En effet, après introduction de l'échantillon, les cellules marquées sont entraînées dans un fin tube par le liquide de gainage (le FACSflow*) qui les contraint à défiler une à une devant un faisceau laser émettant une lumière d'excitation bleu-vert (laser Argon 488nm). Les informations issues de cette

interaction sont recueillies par des filtres qui les transmettent à des photodiodes et photomultiplicateurs (PMT) qui les transforment en signaux électriques.

Enfin, ces signaux électriques sont analysés par des intégrateurs couplés à un logiciel informatique. Ces signaux apparaissent spontanément sous forme de spots définissant la taille (SSC = Side scatter) et la granularité (FSC = Forward scatter) (Figure 17).

En présence de différents fluorochromes, des signaux de fluorescence apparaissent au niveau de chaque PMT spécifique à chaque fluorochrome. Différentes combinaisons (SSC-fluorochrome ou FSC- fluorochrome ou entre deux fluorochromes de spectres différents) permettent de repérer les marqueurs cellulaires et de les analyser.

La figure suivante montre un appareil FACSCalibur permettant la séparation des cellules.



Figure 12 : FACSCalibur®

La figure suivante montre un échantillon cellulaire séparé par le FACSCalibur en fonction de la taille et de la granulation

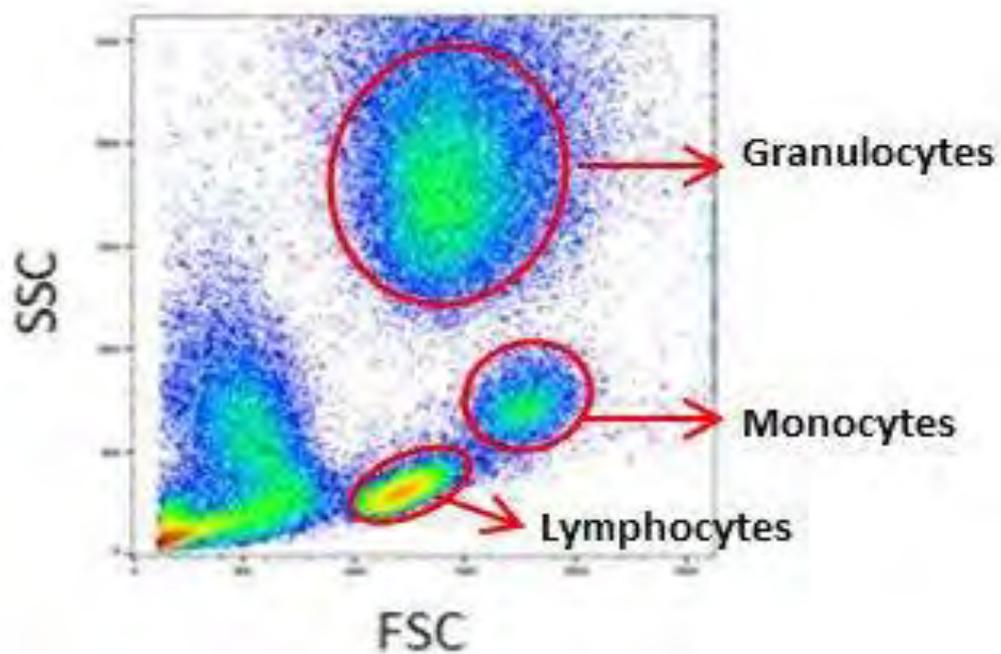


Figure 13 : Distribution des leucocytes du sang périphérique en fonction de la taille et de la granularité

- La zone du cercle situé en bas correspond à la distribution des lymphocytes.
- La zone du cercle situé au milieu correspond à celle des monocytes.
- La zone du cercle situé en haut correspond à celle des granulocytes.

VII. RESULTATS

1. Stratégie de gating

A partir des résultats donnés par le cytomètre, les échantillons ont été analysés avec le logiciel FlowJo pour identifier les différentes populations cellulaires. Ainsi à partir de la population totale de lymphocytes définie par leur taille (Forward Scatter ou FSC) et leur granulation (Side Scatter ou SSC), les différentes sous populations de lymphocytes T ont été identifiées grâce aux fluorochromes qui leurs sont associés. A partir des lymphocytes T CD4+ également, les cytokines à savoir IL-17 et IL-10 ont aussi été déterminées à travers un quadrant.

La figure suivant permet d'illustrer la stratégie gating

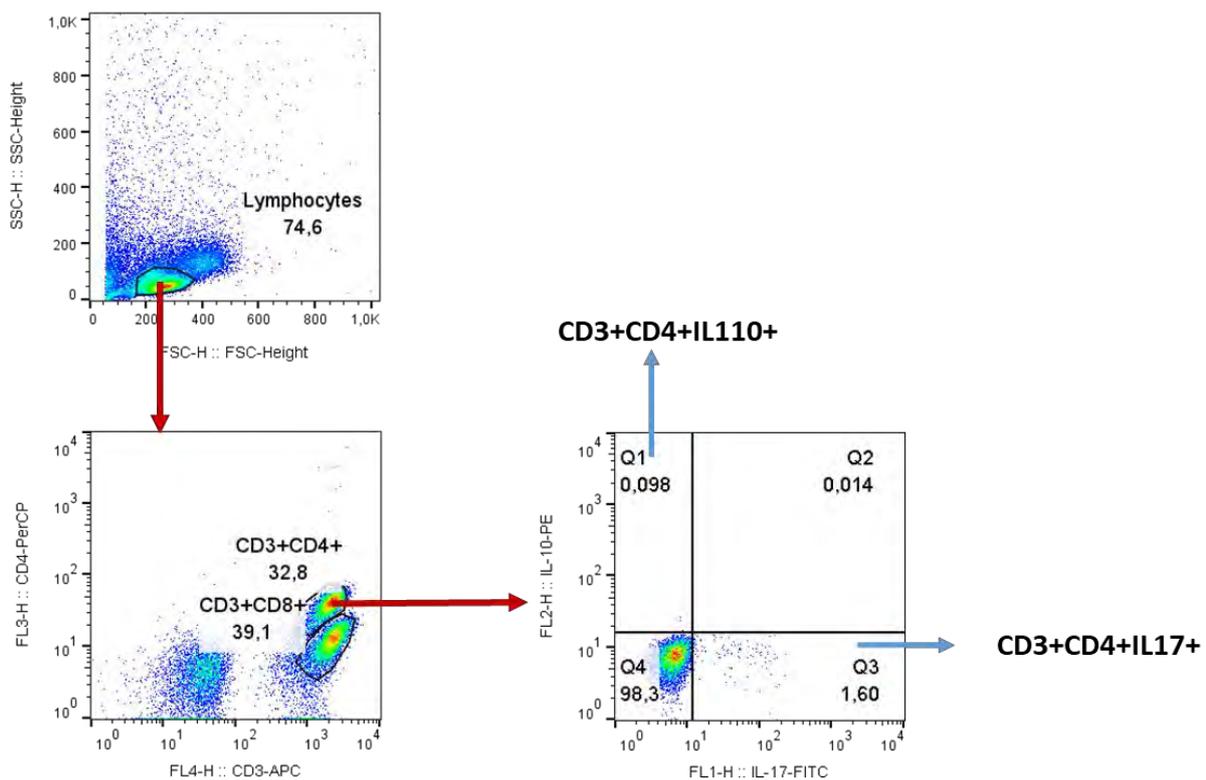


Figure 14 : Stratégie de gating

2. Comparaison du marquage en utilisant le kit eBioscience et le PFA

Dans le but d'identifier la meilleure méthode pour la détermination des cytokines IL-10 et IL-17 au cours des spondyloarthrites, nous avons comparé les méthodes de marquage cellulaire en utilisant le kit de fixation et de perméabilisation commercialisé par la firme eBioscience et la méthode classique consistant à fixer les cellules par le paraformaldéhyde (PFA).

2.1. Comparaison de la population des lymphocytes totaux

Nous avons d'abord essayé de voir l'impact de ces deux méthodes de marquage sur la population des lymphocytes totaux. Selon nos résultats, il apparaît clairement que la population des lymphocytes totaux reste nettement identifiable quel que soit la méthode de marquage utilisée. Cependant, la taille de la population cellulaire apparaît plus importante avec le marquage utilisant le PFA. La figure numéro 16 illustre la répartition de la population des lymphocytes totaux selon la méthode de marquage, en utilisant comme exemples les plots obtenus après stimulation par le PMA/Ionomycine. Le même profil des lymphocytes totaux a aussi été observé avec les plots obtenus après stimulation par le SEB.

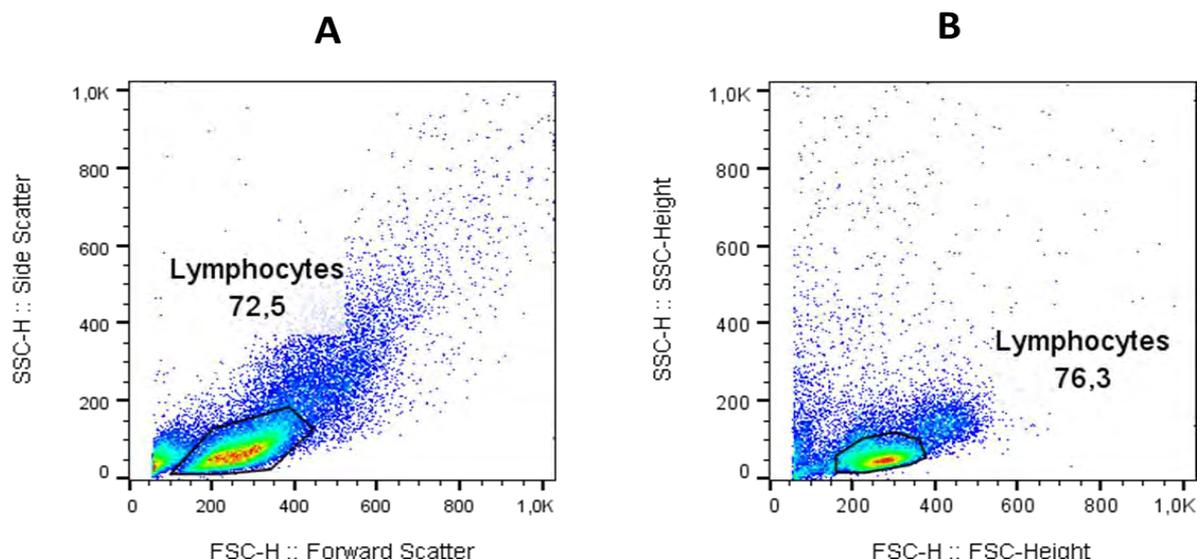


Figure 15 : Populations des lymphocytes totaux selon la méthode de marquage (exemple de plots obtenus après stimulation par le PMA/Ionomycine).

A : marquage utilisant le PFA ; B : marquage utilisant le eBio Fix.

2.2. Comparaison des lymphocytes T

A partir des lymphocytes totaux, les sous populations de lymphocytes T (CD4+ et T CD8+ considérées comme les lymphocytes T cytotoxiques) ont été identifiées. Nos résultats montrent que la séparation entre ces deux populations de lymphocytes T est moins nette avec le marquage utilisant le PFA. Cependant l'utilisation du kit eBioscience montre une distinction claire des deux populations. La figure numéro 17 montre la répartition des deux populations de lymphocytes T en utilisant comme exemples les cellules obtenues après stimulation par le PMA/Ionomycine. A l'instar de la population des lymphocytes totaux, le même profil a aussi été observé pour les lymphocytes T quel que soit la méthode de stimulation.

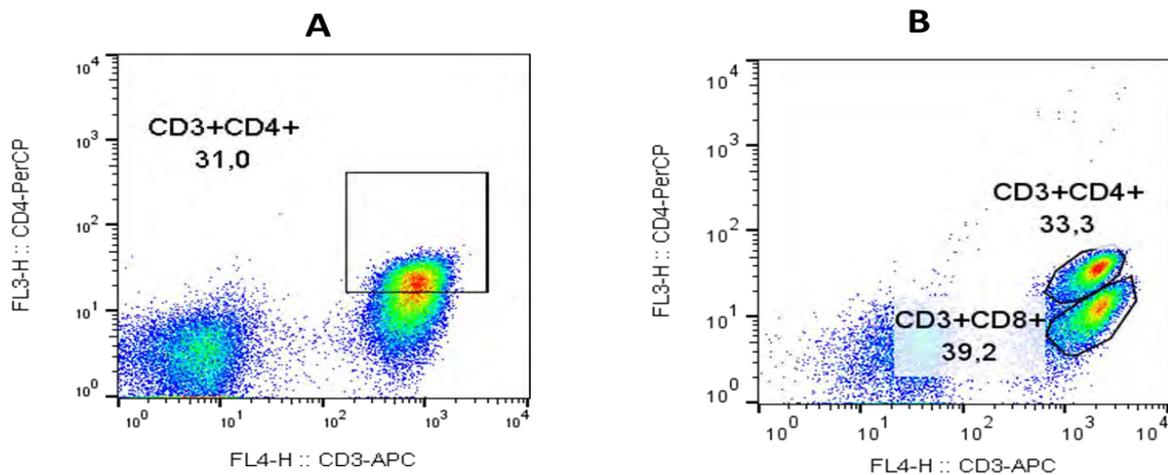


Figure 16 : Répartition des populations de lymphocytes T selon la méthode de marquage cellulaire utilisée (exemple de plots obtenus après stimulation par le PMA/Ionomycine).

A : marquage utilisant le PFA ; B : marquage utilisant le eBio Fix.

2.3. Comparaison des cytokines

Les deux méthodes de marquage montrent une production claire de cellules productrice d'IL-17 avec des proportions plus importantes en utilisant la méthode de fixation par le PFA. La production d'IL-10, reste quant à elle, faible dans les deux méthodes malgré un pourcentage plus important pour la fixation utilisant le

PFA. L'IL-17 et l'IL-10 produites après marquage en utilisant les deux méthodes sont illustrées sur la figure 17.

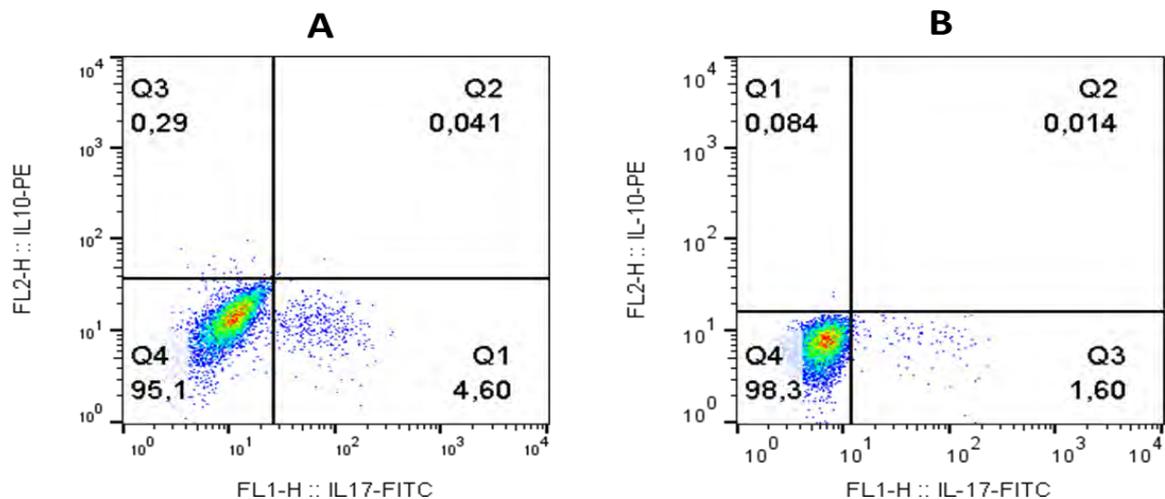


Figure 17 : Comparaison de la production de cytokines selon la méthode de fixation.

A : marquage cellulaire en utilisant le PFA ; B : marquage cellulaire en utilisant le kit eBioscience.

3. Comparaison des méthodes de stimulation en utilisant le PMA/Ionomycine et le SEB

A la lumière de nos résultats qui montrent une séparation plus nette des populations de lymphocytes T avec le kit de fixation eBioscience par rapport au PFA, nous avons considéré cette première méthode pour la détermination des cytokines dans les SPA. Ainsi, en choisissant le marquage avec le Kit eBioscience, nous avons comparé la réponse des cytokines selon la stimulation utilisant le PMA/Ionomycine et le SEB.

3.1. Comparaison de la population des lymphocytes totaux

Selon ces deux méthodes de stimulation, nos résultats montrent que la population des lymphocytes totaux peut être nettement identifiée dans les deux cas malgré une taille des cellules plus importante avec le PMA/Ionomycine. La figure 19 montre la répartition de la population des lymphocytes totaux selon la méthode de stimulation utilisée.

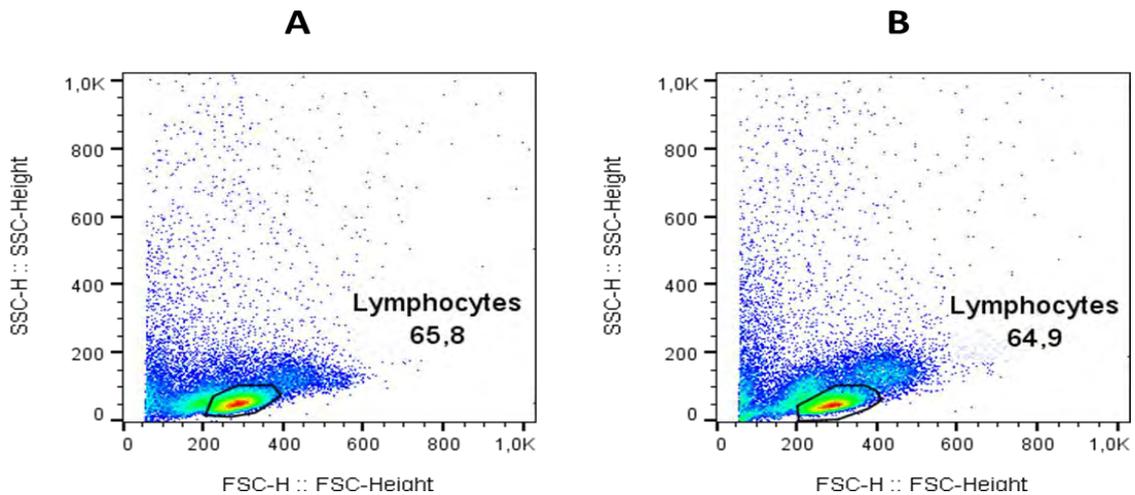


Figure 18 : Répartition des lymphocytes totaux selon la méthode de stimulation.

A : Stimulation cellulaire en utilisant le SEB ;

B : Stimulation cellulaire en utilisant PMA/Ionomycine.

3.2. Comparaison des lymphocytes T

A partir des lymphocytes totaux, les sous populations de lymphocytes T (CD4+ et T CD8) ont été identifiés. Les résultats montrent que la séparation entre ces deux populations de lymphocytes T est moins nette avec la stimulation utilisant le PMA/Ionomycine ; la stimulation avec le SEB quant à elle montrait une distinction claire entre les deux populations de lymphocytes T. La figure 19 illustre les différentes sous-populations de lymphocytes T selon la méthode de stimulation.

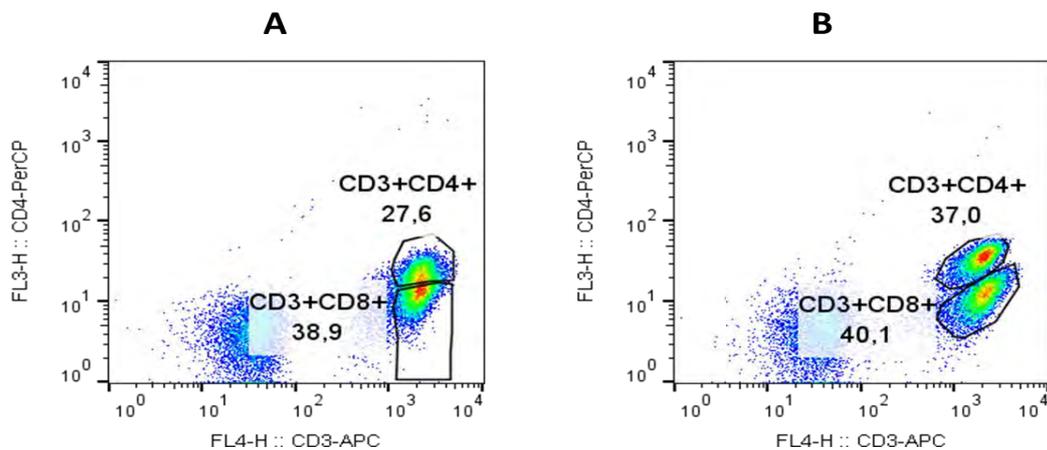


Figure 19 : Populations de lymphocytes T en fonction de la méthode de stimulation (PMA/Ionomycine et SEB).

A : Stimulation cellulaire en utilisant PMA/Ionomycine ; **B** : Stimulation cellulaire en utilisant le SEB

3.3. Comparaison de la production de cytokines

Nos résultats ont montré qu'après stimulation des cellules avec le PMA/Ionomycine et le SEB, la production d'IL-17 par les cellules T CD4⁺ était nette avec les deux méthodes malgré des proportions plus importantes avec le PMA et l'Ionomycine. La production d'IL-10 était quant à elle très faible quel que soit la méthode de stimulation. La figure suivante montre la répartition des cytokines selon la méthode de stimulation.

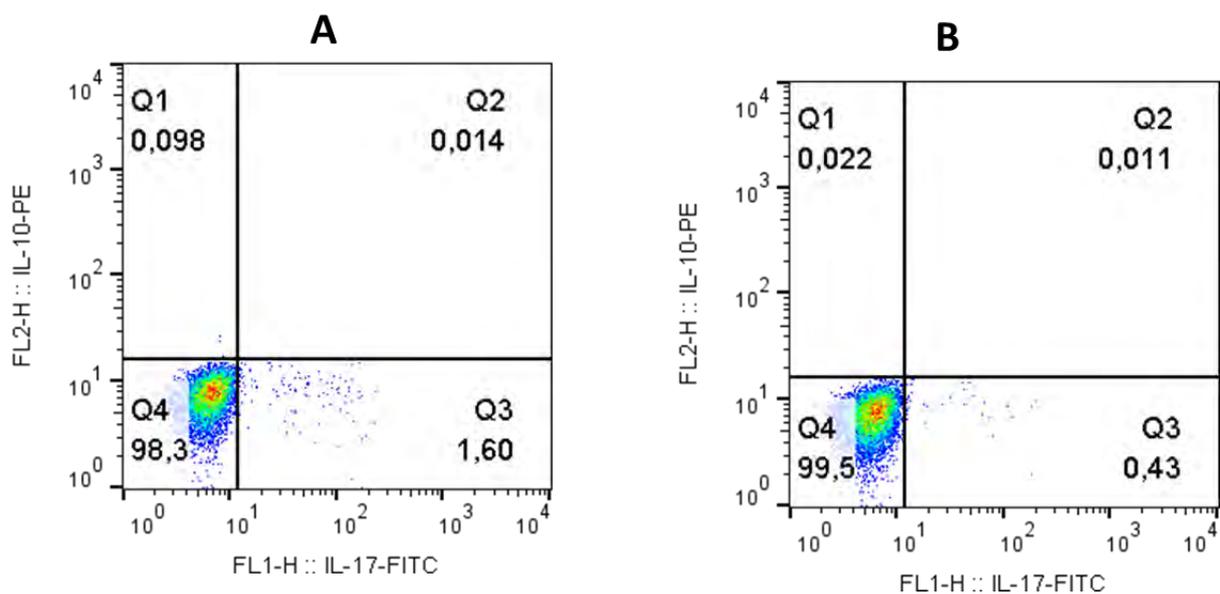


Figure 20 : Répartition des cytokines selon la méthode de stimulation des lymphocytes (PMA/Ionomycine et SEB).

A : Stimulation cellulaire en utilisant PMA/ Ionomycine ; **B** : Stimulation cellulaire en utilisant SEB

VIII. COMMENTAIRES

Afin de déterminer le profil des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les SPA, nous nous proposons d'optimiser les méthodes de stimulation et de marquage intracellulaire. Ainsi, avons-nous comparé d'une part, les méthodes de fixation utilisant le PFA et le kit de eBioscience, et d'autre part, la stimulation des cellules en utilisant le PMA/Ionomycine et le SEB.

VIII.1. Comparaison des méthodes de marquage

Ainsi quel que soit la méthode de marquage utilisée, les lymphocytes totaux présentent le même profil au niveau des scatter plots. Cependant, la fixation avec le kit de eBioscience semble entraîner une rétraction des cellules avec une diminution de leur taille observée au niveau du scatter plot SSC/FSC. Il est ainsi important de mener d'autres investigations pour voir si cette rétraction cellulaire aurait un impact sur l'expression des marqueurs de surface des cellules ou la fonction de ces dernières.

La comparaison de la population des lymphocytes T selon la méthode de marquage a montré une nette séparation des différentes populations T CD4⁺ et TCD8 avec le kit eBioscience, ce qui n'est pas le cas avec la fixation utilisant le PFA. Ceci a été le facteur déterminant pour le choix de la méthode utilisant le kit eBioscience. En effet, les cytokines sont déterminées sur les populations de lymphocytes T CD4⁺ et l'absence de discrimination entre les cellules T pourrait conduire à des valeurs erronées des taux de cytokines par l'inclusion inconsidérée d'autres populations de lymphocytes T ou le fait de minimiser la population de cellules T CD4⁺.

Les populations de cellules productrices de cytokines étaient nettes dans les deux méthodes de fixation bien que les taux de cytokines aient été plus importants avec le PFA. Malgré ce taux plus important avec le PFA, l'absence de discrimination entre les populations de lymphocytes ne permet pas de le considérer car cette réponse pourrait inclure des cellules autres que les T CD4⁺.

VIII.2. Comparaison des méthodes de stimulation

Les deux méthodes de stimulation ont donné une bonne séparation des populations lymphocytes totaux.

Le paramètre le plus important a été l'absence de discrimination entre les lymphocytes T quand les PBMC ont été stimulé avec le PMA/Ionomycine. Ceci est aisément expliqué par le fait ce mitogène altère les récepteurs CD4 au niveau des cellules [23]. Il est important de considérer ce phénomène car la difficulté de distinguer les cellules T CD4+ des autres lymphocytes T peut avoir un impact considérable sur le taux des cytokines comme précédemment expliqué.

Les populations de cellules productrices de cytokines étaient nettes dans les deux conditions de stimulation bien que les taux de cytokines aient été plus important avec le PMA/Ionomycine. La bonne distinction des populations de cellules productrices de cytokine est plus importante que le taux de cytokine en question. Ainsi, le critère de choix de la méthode n'a cependant pas été basé sur le taux de cytokines. En effet, une forte réponse à un mitogène peut conduire à une absence de différence entre différents groupes d'étude si elle correspond à la réponse de saturation.

CONCLUSION

Les spondyloarthrites sont des rhumatismes inflammatoires chroniques qui se distinguent des maladies auto-immunes par l'absence d'auto-immunité. L'étiologie exacte est inconnue, cependant des facteurs étiologiques ont été décrits regroupant des facteurs génétiques et environnementaux.

La présence de facteurs environnementaux sur un terrain génétique va entraîner un déséquilibre entre les cytokines pro inflammatoires et anti-inflammatoires contribuant ainsi à la genèse de la maladie.

Ainsi, le but de ce présent travail est d'optimiser la méthode de détection de l'interleukine 10 (IL-10) et de l'interleukine 17 (IL-17) chez les patients sénégalais atteints de SPA en vue d'une étude plus large sur le rôle de ces cytokines dans les SPA. Pour atteindre cet objectif, nous avons pris des échantillons de sang chez des patients suivis pour SPA dans le service de Rhumatologie du CHUN Aristide Le Dantec. Ces échantillons séparés et les PBMC obtenues après séparation cellulaire ont permis de faire une stimulation et un marquage cellulaire. Une comparaison des méthodes de stimulation avec le SEB et PMA/Ionom a été effectuée. Nous avons également comparé les méthodes de marquage cellulaire avec le eBioscience et le PFA.

A la lumière de nos résultats, il apparaît que l'utilisation du kit de eBioscience pour la fixation au cours du marquage intracellulaire est plus optimale que celles le PFA. En utilisant cette méthode de fixation, la comparaison des méthodes de stimulation montre que le SEB conduit à une meilleure séparation des lymphocytes T sensés produire ces cytokines. Ainsi, la stimulation avec le SEB et l'utilisation du kit eBioscience pour la fixation constitue la méthode optimale pour la détection de l'IL-17 et IL-10.

RECOMMANDATIONS

A la suite de nos résultats pour la détection optimale des cytokines pro-inflammatoires (IL-17) et anti-inflammatoires (IL10) chez les patients atteints de SPA, nous recommandons

- La stimulation cellulaire par le SEB
- Le marquage cellulaire par le Kit eBioscience.

REFERENCES

- 1. Amanda A.P. Ng, Bernett T.K. Lee, Timothy S.Y. Teo, Poidinger M, Connolly J E.**
Optimal cellular preservation for high dimensional flow cytometric analysis of multicentre trials.
Journal of Immunological Methods 2012; 385:79-89.
- 2. Astier F, Guillot X, Cook-Moreau J.**
La spondylarthrite ankylosante : un rhumatisme inflammatoire chronique.
Actualités pharmaceutiques 2013; 527:1-5.
- 3. Benevolanskaya L.I, Boyer G.S, Erdesz S.**
Les spondylarthropathies chez les populations indigènes du cercle polaire en Russie et en Alaska.
Revue du Rhumatisme 1996; 63: 949-57.
- 4. Berthelot JM, Cochetière MF, Gilles Potel G.**
Evidence supporting a role for dormant bacteria in the pathogenesis of spondylarthritis.
Joint Bone Spine 2013; 80:135-140.
- 5. Bigby M, Wang P, Fierro JF, Sy MS.**
Phorbol myristate acetate-induced down-modulation of CD4 is dependent on calmodulin and intracellular calcium.
J Immunol April 1990, 144 : 3111-3116.
- 6. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N.**
Les cellules T régulatrices (Treg) dans la polyarthrite rhumatoïde.
Revue du Rhumatisme 2009; 76:10-15.
- 7. Boudier CH, Ittah M, Breban M.**
Modèles animaux de spondylarthropathies liés au HLA-B27 : où en est la recherche ?
Revue du Rhumatisme 2006; 73: 215-221.

8. Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E.

La génétique des spondylarthropathies.

Revue du Rhumatisme 2006; 73:665-672.

9. Breban M.

Microbiote intestinal et rhumatismes inflammatoires.

Revue du Rhumatisme Monographies 2016; 83:233-237.

10. Breban M.

Immunopathologie actuelle.

Revue du Rhumatisme Monographies 2014; 81: 235-239.

11. Chatzikiyriakidou, A., P.V. Voulgari, and A.A. Drosos.

What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies?

Autoimmun Revue 2011; 10: 464 - 8.

12. Costantino F, Breban M.

Génétique : les nouveaux éléments.

Revue du Rhumatisme Monographies 2014; 81:230-234.

13. Delhove J.M.K.M, Qasim W.

Genome-Edited T Cell Therapies.

Curr Stem Cell Rep 2017: 1-13.

14. Freeston J, Barkham N, Hensor E.

Spondylarthrite ankylosante, positivité de HLAB27 et utilisation des biothérapies.

Revue du Rhumatisme 2007; 74:232-236.

15. Geem D, Harusato A, Flannigan K, Denning TL.

Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease.

Inflamm. Bowel Dis 2015; 21:1409-1418.

16. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N.

Vitamine D et inflammation.

Revue du Rhumatisme 2011; 78: 128-133.

17. Hassouni N, Maetzel A, Dougados M., Amor B.

Comparaison des malades examinés pour spondylarthropathies en France et au Maroc.

Revue du Rhumatisme 1993; 60: 420- 425.

18. Hermi R. Sumatoh, Karen Wei Weng Teng, Yang Cheng, Evan W.

Newell. Optimization of Mass Cytometry Sample Cryopreservation After Staining.

International Society for Advancement of Cytometry 2017; 91: 4861.

19. Jeandel P, Roux H.

Épidémiologie des affections rhumatologiques en Afrique subsaharienne.

Revue du Rhumatisme 2002; 69: 764-76.

20. Kahn M.F.

Histoire de la spondylarthrite ankylosante.

Revue du Rhumatisme Monographies 2014; 81: 216 -217.

21. Kemta Lekpa F, Wendling D, Claudepierre P.

Spondyloarthrites : critères, limites, et perspectives à travers l'histoire.

Revue du Rhumatisme 2015; 82: 356 -359.

22. Khan, M.-F.

The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes.

Auto-immun Revue 2007; 6: 183-189.

23. Mariette X.

Biothérapies émergentes dans la polyarthrite rhumatoïde.

Revue du Rhumatisme 2004; 71: 848-853.

24. Michael A, Bowness P.

HLA-B27 : natural function and pathogenic role in spondyloarthritides.
Arthritis 2002; 4:153-158.

25. Perdriger A, Faccin M.

Spondylarthrite et grossesse.
Revue du Rhumatisme Monographies 2015; 82: 38-41.

26. Pham T.

Physiopathologie de la spondylarthrite ankylosante : Actualités.
Revue du Rhumatisme 2008; 75:925-930.

27. Ra A-C.

Epidémiologie de la spondylarthrite au xxie siècle.
Revue du Rhumatisme Monographies 2014; 81: 225-229.

28. Robert A. Colbert Monica L. DeLay Erin I.

From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER.
Immunological Reviews 2010; 233: 181-202.

29. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, et al.

New ASAS classification criteria for peripheral spondyloarthritis.
Ann Rheum Dis 2009; 68: 127.

30. Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B.

Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine.
Revue de Médecine Interne 2011;32:292-301.

31. Saraux A, Allain J, Guedes C, Devauchelle V, Le Goff P.

Epidémiologie des spondylarthropathies.
La Lettre du Rhumatologue 2000 ; 261: 6- 8.

32. Saraux A, Devauchelle V, Jousse S, Le Goff P.

Spondylarthropathies tropicales.
Revue du Rhumatisme 2002 ; 69 : 809 -13.

33. Schaeffer T, Truchetet M-E, Richez C.

Rôle des facteurs d'environnement dans les spondyloarthrites.

Revue du Rhumatisme Monographies. 2015 ; 82 : 3-6.

34. Sibia J, Pham T, Sordet C, Jaulhac B, Claudepierre P.

Spondylarthrite ankylosante et autres spondylarthropathies.

EMC-Médecine 2005; 2: 488 -511.

35. Tomoki Ito, Yui-Hsi Wang, Omar Duramad, Toshiyuki Hori, Guy J. Delespesse, Norihiko Watanabe, F. Xiao-Feng Qin, Zhengbin Yao, Wei Cao, and Yong-Jun Liu.

TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.

The Journal of Experimental Medicine 2005; 202: 1213-1223.

36. Wendling D, Claudepierre P, Prati C.

Pourquoi un diagnostic et une prise en charge précoces des spondyloarthrites?

Revue du Rhumatisme 2013; 80: 435-438.

37. Wendling D.

Des nouveaux critères de classification accompagnés d'une évolution sémantique et nosologique.

Rhumatos 2014 ; 11 : 100.

38. Xueyi L, Lina C, Zhenbiao W et al.

Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy.

J Clin Immunol 2013 ; 33:151-61.

RESUME

Les spondyloarthrites sont des rhumatismes inflammatoires chroniques qui se distinguent des maladies auto-immunes par l'absence d'auto-immunité.

La présence de facteurs environnementaux sur un terrain génétique va entraîner un déséquilibre entre les cytokines pro inflammatoires et anti-inflammatoires contribuant ainsi à la genèse de la maladie.

Ainsi, le but de ce présent travail est d'optimiser la méthode de détection de l'interleukine 10 (IL-10) et de l'interleukine 17 (IL-17) chez les patients sénégalais atteints de SPA en vue d'une étude plus large sur le rôle de ces cytokines dans les SPA. Pour atteindre cet objectif, nous avons pris des échantillons de sang chez des patients suivis pour SPA dans le service de Rhumatologie du CHUN Aristide Le Dantec. Ces échantillons séparés et les PBMC obtenues après séparation cellulaire ont permis de faire une stimulation et un marquage cellulaire. Une comparaison des méthodes de stimulation avec le SEB et Ionom a été effectuée. Nous avons également comparé les méthodes de marquage cellulaire avec le eBioscience et le PFA.

A la lumière de nos résultats, il apparait que l'utilisation du kit de eBioscience pour la fixation au cours du marquage intracellulaire est plus optimale que celles le PFA. En utilisant cette méthode de fixation, la comparaison des méthodes de stimulation montre que le SEB conduit à une meilleure séparation des lymphocytes T sensés produire ces cytokines. Ainsi, la stimulation avec le SEB et l'utilisation du kit eBioscience pour la fixation constitue la méthode optimale pour la détection de l'IL-17 et IL-10.

Mots clés : Optimisation IL10 IL17 SPA