

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB de Blida



Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
Master II en sciences de la nature et de la vie

Option : GÉNIE BIOLOGIQUE

THÈME

**Etudes des fréquences alléliques et
génotypiques de polymorphisme des
gènes STAT4 et IRF5 chez une population
Algérienne saine**

Présenté par :
SELLALI Sihem

Soutenu le :
01/07/2013

Devant le jury :

Mme HAMAIDI F.	MCB	USAB	Présidente
Mme GUESSAIBIA N.	MCB	USAB	Examinatrice
Mr BENYAHIA N.	MAA	USAB	Examineur
Mlle ALLAM I.	Assistante	CHU Beni-Messous	Promotrice
Mr BESSAAD M.A.	MCB	USAB	Co-promoteur

Année universitaire 2012/2013

Remerciements

*Je remercie tous d'abord le bon DIEU de m'avoir aidé à réaliser ce travail
Mes sincères remerciements vont s'adresser :*

A mon encadreuse, Docteur Allam, assistante en immunologie à l'hôpital ASSAD Hassani – Beni Messous, d'avoir accepté de diriger ce travail et qui m'a donné la force, le courage et la patience.

A mon co-promoteur, Mr Bessaad, maitre de conférence B, pour ses critiques, ses conseils et sa patience pendant la réalisation de ce travail.

Je remercie également le professeur Ghafour, chef de service du laboratoire central de biologie et le professeur Djidjik, chef d'unité d'immunologie, de m'avoir ouvert les portes de leur service à fin de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier profondément et spécialement Mr Chergui, et toutes l'équipe du centre de transfusion sanguin de Féroudja -Blida- de m'avoir accepté au sein du laboratoire, et de leur aide et gentillesse.

Un immense merci à Mme HAMAIDI, maitre de conférence B à l'université SAAD DAHLEB-Blida au département de biologie, d'avoir bien voulu présidé le jury.

Mes sincères remerciements vont également à Mme GESSAIBIA et Mr BENYAHIA pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie très fort Salîha, Soumia, Souraia, Yasmine, Brahim et Smail de m'avoir apporter aidé et soutien durant la période de mon stage pratique.

Je remercie profondément ma chère collègue Radhia pour sa présence sa bonne humeur et son aide précieuse. Je tiens à lui souhaiter pleine de réussite et de succès dans son parcours.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont destinés à mes grands parents, mes parents, ma sœur, mes tantes, mes oncles et bien sur à mes chers amis : Amina, Lamia, Ihcene, Nafissa, Rym et Fouad qui m'ont apportés un énorme soutien moral et qui ont toujours été présent ☺.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie
mon travail à mes grands parents et parents en particulier
et à toute ma famille.*

*À mes chers amis , et a toute ma classe de Génie
Biologique.*

*Ainsi qu'à toutes personnes qui m'ont encouragé et aidé
tout ou long de mes études*

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ARN :	Acide ribonucléique.
BANK:	B cell scaffold protein with ankyrin repeats
BLK:	B-Lymphocyte Kinase
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTS	Centre de Transfusion Sanguin
DBD :	Domain Binding DNA
DID :	Diabète Insulinodépendant
DD :	Death domain
DZ :	Dizygote
EDTA :	Ethylene Diamine Tetracetic Acide
Fc :	Du latin Fractio = Fragment cristallisable
FR :	Facteur rhumatoïde
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HLA :	Human Leucocyte Antigène
IRF :	Interferon Regulated Factor
IFN :	Interféron
IL :	Interleukine
IL- 12R :	Interleukine 12 Receptor
IgG :	Immunoglobulines de type G
IRAK4 :	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4
ISRE :	IFN-stimulated response element
Jak1 :	Janus kinase 1
LED :	Lupus Erythémateux Disséminé
LES :	Lupus Erythémateux Systémique
LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
MAI :	Maladie Auto-Immune
MyD88 :	Myeloïd Differentiation factor 88
MZ :	Monozygote

NaCl :	Chlorure de sodium
NK :	Natural Killer
PBMC :	Peripheric blood mononucleus cells
PCR :	P olymerase chain reaction
PK :	Protéinase K
PR :	Polyarthrite Rhumatoïde
PTPN22 :	Protein Tyrosin Phosphatase Nonreceptor 22
Rs :	Reference SNP
ScS :	Sclérose Systémique
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
sGS :	Syndrome de Gougerot-Sjören
SH2 :	SRC-Homologie
SLB :	Solution de Lyse des globules Blancs
SLR :	Solution de Lyse des globules Rouges
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription
Th1 :	T helper 1
TIR Domain:	Toll/Interleukin-1 receptor Domain
TLR :	Tol-Like Receptor
TNF :	Tumorel Necrosis Factor
TRAF :	TNF Receptor-Associated Factor
Tyk2 :	tyrosine Kinase 2
VS :	Vitesse de sédimentation

Liste des tableaux

Tableau I :	Exemple de taux de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes des MAI.	3
Tableau II :	Principales associations HLA-MAI.	3
Tableau III :	Principaux facteurs de susceptibilité génétique non HLA impliqués dans la détermination de certaines maladies auto-immune.	4
Tableau IV :	Limite supérieure de la norme de la vitesse de sédimentation en mm à la première heure.	14
Tableau V :	L'interprétation des résultats de la technique de Waaler-rose et la réaction au Latex.	14
Tableau VI :	Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiées.	23
Tableau VII :	Comparaison des fréquences alléliques et génotypiques des deux gènes STAT4 et IRF5 de notre population avec les résultats des autres pays.	32
Tableau VIII :	Répartition des sujets selon l'âge et le sexe.	Annexe II
Tableau IX :	Distribution allélique du gène STAT4 dans la population étudiée.	Annexe II
Tableau X :	Distribution allélique du gène STAT4 chez les Femmes et les Hommes.	Annexe II
Tableau XI :	Distribution allélique du gène IRF5 dans la population générale étudiée.	Annexe II
Tableau XII :	Distribution allélique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.	Annexe II
Tableau XIII :	Distribution génotypique du gène STAT4 dans la population étudiée.	Annexe II
Tableau XIV :	Distribution génotypique du gène IRF5 dans la population étudiée.	Annexe II
Tableau XV :	Distribution génotypique du gène STAT4 chez les deux sexes.	Annexe II
Tableau XVI :	Distribution génotypique du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.	Annexe II
Tableau XVII :	La fréquence des sujets portant les deux polymorphismes en même temps.	Annexe II

Liste des figures

Figure 01 :	Représentation schématique de la localisation du gène STAT4 sur chromosome 2.	5
Figure 02 :	Représentation schématique de la protéine STAT.	6
Figure 03 :	Voie de signalisation de l'interleukine 12 via la molécule STAT4.	7
Figure 04 :	Représentation schématique de la localisation du gène IRF5 sur le chromosome 7.	8
Figure 05 :	Schéma représentatif de voie de signalisation de l'IRF5 via le TLR7 et TLR9.	9
Figure 06 :	Représentation schématique du gène d'IRF5. Le SNP rs2004640 crée un site d'épissage au niveau de l'exon 1b.	10
Figure 07 :	L'implication des gènes STAT4 et IRF5 dans la susceptibilité du LES.	11
Figure 08 :	Technique de mesure de la VS.	13
Figure 09 :	Sédimentation des constituants solide du sang et mode de lecture d'une VS.	13
Figure 10 :	Lecture d'une plaque du test Waaler-rose montrant le contrôle positif agglutinant et le control négatif homogène.	15
Figure 11 :	Les principales étapes de la technique de salting-out avec en A) La lyse des GR en B) La lyse des GB et en C) La récupération de la méduse d'ADN.	16
Figure 12 :	A) Schéma représentant la succession des cycles durant une réaction PCR. B) les trois phases de chaque cycle PCR	17
Figure 13 :	Schéma d'une sonde TaqMan marquée en 5' par un Reporter et en 3' par un Quencher.	18
Figure 14 :	Schéma représentant l'hybridation des amorces et de la sonde Taqman sur la séquence du gène STAT4 rs7574865.	19
Figure 15 :	Schéma représentant l'émission de fluorescence après l'hydrolyse de la sonde TaqMan par l'activité 5'exonucléasique de la Taqpolymérase.	19
Figure 16 :	Schéma représentative des courbes d'amplification de plusieurs échantillons.	20

Figure 17 :	Schéma représentatif des différentes phases d'une réaction de PCR en temps réel	21
Figure 18 :	Les courbes d'amplifications et la répartition en nuages des trois populations différentes génotypiques.	22
Figure 19 :	Schéma récapitulatif des méthodes effectuées au cours de notre stage expérimentale.	23
Figure 20 :	Répartition de la population étudiée selon le sexe	24
Figure 21 :	Représentation de la population selon la tranche d'âge	25
Figure 22 :	Représentation graphique de la distribution allélique du gène STAT4 dans la population générale étudiée.	26
Figure 23 :	Représentation graphique de la distribution allélique du polymorphisme du gène STAT4 chez les deux sexes.	26
Figure 24 :	Représentation graphique de la distribution allélique du gène IRF5 dans la population générale étudiée.	27
Figure 25 :	Représentation graphique de la distribution allélique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.	27
Figure 26 :	Représentation graphique de la distribution génotypique du gène STAT4 dans la population étudiée.	28
Figure 27 :	Représentation graphique de la distribution génotypique du gène STAT4 chez les Femmes et les Hommes.	28
Figure 28 :	Représentation graphique de la distribution génotypique du gène IRF5 dans la population étudiée.	29
Figure 29 :	Représentation graphique de la distribution génotypique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.	29
Figure 30 :	Présentation du kit utilisé pour la recherche du facteur rhumatoïde.	Annexe I
Figure 31 :	Réaction d'agglutination à la recherche du FR par le test de Waaler-rose.	Annexe I

Table des matières

RÉSUMÉ

INTRODUCTION	01
---------------------------	----

CHAPITRE I : Etude bibliographique

I. Le système immunitaire	02
II. Maladies auto-immunes multifactorielles	02
II. 1. Les facteurs immunogénétiques	02
II. 1. 1. Les gènes HLA	03
II. 1. 2. Les gènes non HLA	03
III. L'immunogénétique	04
IV. Les gènes étudiés	05
IV. 1. Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT4)	05
IV. 1. 1. Le gène	05
IV. 1. 2. La protéine	05
IV. 1. 3. La voie de signalisation	06
IV. 1. 4. Le rôle physiopathologique	07
IV. 2. Interferon-Regulatory Factor 5 (IRF5)	08
IV. 2. 1. Le gène	08
IV. 2. 2. La protéine	08
IV. 2. 3. La voie de signalisation	08
IV. 2. 4. Le rôle physiopathologique.....	10
IV. 3. L'association des deux gènes	11

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

I.	Matériel	12
I.	1. Echantillonnage	12
I.	2. Appareillage	12
II.	Méthodes	13
II.	1. Mesure de la vitesse de sédimentation	13
II.	2. Recherche du facteur rhumatoïde	14
II.	3. Extraction de l'ADN par salting out	15
II.	4. PCR en temps réel	17
II.	5. Outil statistique	22

CHAPITRE III : Résultats et discussions

I.	Résultats	24
I.	1. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée	24
I.	2. Etude allélique des gènes STAT4 et IRF5	26
I.	3. Etude génotypique des gènes STAT4 et IRF5	28
II.	Discussion générale	30

CONCLUSION	34
-------------------------	----

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNÉXES

Etudes des fréquences alléliques et génotypiques de polymorphisme des gènes STAT4 et IRF5 chez une population Algérienne saine

Résumé

A ce jour des polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP) de plusieurs gènes ont été étudié et décrits comme associé à différentes pathologies auto-immunes.

Les SNP des gènes STAT4 rs7574865 et IRF5 rs2004640 ont fait l'objet de notre étude qui consiste à déterminer leurs fréquences alléliques et génotypiques des ces polymorphismes, chez une population Algérienne saine de 264 personnes. La tranche d'âge est de 18-59 ans avec une moyenne d'âge de $35 \pm 10,62$ ans et un sexe ratio de 1H : 1F. Pour cela, la détermination de la vitesse de sédimentation (VS) et un examen sérologique à la recherche du facteur rhumatoïde (FR) ont été fait en premier suivi d'une étude génétique qui consiste au génotypage de nos gènes par une technique de PCR en temps réel.

Nos sujets étudiés avaient une (VS) généralement normale $< 20\text{mm/h}$ et l'examen sérologique a révélé l'absence de facteur rhumatoïde (FR).

L'étude génétique a révélé que les fréquences alléliques du gène STAT4 sont caractérisées par une dominance de l'allèle sauvage **G (80%)**, tandis que ceux du gène IRF5 sont caractérisées par une très légère dominance de l'allèle muté **T (55%)**. Chez les deux sexes, la distribution allélique est identique pour les deux gènes.

Le génotypage du gène STAT4 a révélé une dominance de génotype homozygote sauvage **GG (64%)** contrairement au gène IRF5 qui présent une dominance de génotype hétérozygote **GT (46%)**.

Nos résultats corrént parfaitement avec la population nord Africains et certaines populations Européennes principalement les méditerranéens avec des fréquences de l'allèle muté T comprises entre **16%** et **22%** pour le gène STAT4 et entre **51%** et **54%** pour l'IRF5. Tandis que la population Asiatique et celle de l'Amérique latine présentent quelques légères différences de distribution de ces allèles mutés avec une fréquence de **31%** pour le gène STAT4 et entre **44%** et **48%** pour le gène IRF5.

Enfin, notre travail nous a permis d'avoir une idée sur les fréquences de ces polymorphismes au sein d'une population Algérienne saine.

Mots clés : Polymorphisme SNP, STAT4, IRF5, maladies auto-immune, génotypage PCR en temps réel.

Studies of allelic and genotypic frequencies of polymorphism of STAT4 and IRF5 genes in a healthy Algerian population

Abstract

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several genes have been studied and described as being associated with various autoimmune diseases.

SNPs of STAT4 gene rs7574865 and IRF5 gene rs2004640 have been the subject of our study is to determine their allelic and genotypic frequencies of these polymorphisms in Algerian inhabitants of 264 persons, aged between 18-58 years old with an age average of 35 ± 10.62 years old and a sex ratio of 1M: 1W. For this, the erythrocyte sedimentation rate and a serologic test to search of the rheumatoid factor has been done at the first follow of the genetic study consisting on genotyping of our genes by PCR technique in a real time.

Our studied subjects have generally a normal segmentation course $< 20 \text{ mn/h}$ and the serologic examination reveals the rheumatoid factor absence (FR).

The genetic study appears that the frequencies of STAT4 gene are characterized by the difference dominance G (80%), when those of IRF5 has a very decreased dominance of T(55%). And for both sex, the distribution is identical for both genes STAT4 and IRF5.

The genotype of STAT4 gene reveals a homozygote dominance GG 64%, in the opposite, the IRF5 gene presents an heterozygote GT (46%).

Our results a exactly conform to the population of the north of Africa and some European inhabitants especially Mediterranean ones with frequencies T including 16% and 22% for the STAT4 and between 51% and 54% for IRF5, the Asiatic inhabitants and American ones present some little differences of distribution with frequencies of 31% for STAT4 gene and between 44% and 48% for the IRF5 gene

Finally, our work has enabled us to have an idea about the frequency of these polymorphisms in a healthy Algerian population.

Keywords: SNP polymorphism, STAT4, IRF5, autoimmune diseases, genotyping real-time PCR.

الملخص

تم درس الأشكال المتعددة للتركيبات النووية المنفردة (SNP) في عدة جينات وصفها بأنها ترتبط مع مختلف أمراض المناعة الذاتية.

SNP للجينات STAT4 (rs 7574865) و IRF5 (rs 2004640) قد كانوا موضوع دراستنا التي تركزت على تحديد تردداتها أليلية والوراثية، لمجموعة جزائرية سليمة تتكون من 264 شخصا، تتراوح اعمارهم بين 18 و58 سنة مع معدل السن $25 \pm 10,62$ سنة و نسبة الجنس 1 رجل : 1 امرأة . ومن اجل ذلك تم تحديد سرعة ترسب الدم و دراسة التشخيص المصلي بحثا عن العامل الروماتويد (FR) و أجريه كذلك تقنية PCR ضمن الزمن الحقيقي للدراسة الجينية .

و قد كانت سرعة ترسب الدم لدى الأشخاص عادية على العموم > 20 مم/سا و بينت دراسة المصل عن غياب العامل الروماتويد (FR). كما بينت دراسة الجينية على ان ترددات الأليلية للمورثة STAT4 متميزة بكثرة التباين للأليل G (80%)، اما المورثة IRF5 فتمتيز بسيطرة قليلة جدا من الأليل T (55%). و لدى الجنسين تم توزيع متساوي للمورثتين STAT4 و IRF5.

تبين من الدراسات الجينية للمورثة STAT4 تغلب المكون المتمائل العوامل الوراثية GG بـ 66% عكس المورثة IRF5 التي يتغلب عليها المكون المختلف الاقتران GT بـ 46%.

و قد تطابقت نتائجها تماما مع سكان شمال افريقيا و بعض الشعوب الاوروبية لاسيما البحر المتوسط بترددات الأليل T و تتضمن ما بين 16% و 22% للمورثة STAT4 و 51% و 54% للمورثة IRF5.

في حين تمثل شعوب أسيا و امريكا الاتينية بعض الترددات الضئيلة في التوزيع مع تواتر قدره 31% للمورثة STAT4 و بين 44% و 48% للمورثة IRF5.

الكلمات المفتاحية :

الأشكال المتعددة للتركيبات (SNP)، STAT4، IRF5، أمراض المناعة الذاتية، الدراسة الجينية تقنية PCR ضمن الزمن الحقيقي.

Introduction

Les maladies auto-immunes (MAI) sont dites multifactorielles, leur apparition renvoie à l'association entre divers facteurs environnementaux et facteurs génétiques. Ces derniers sont principalement les gènes appartenant au système Human Leukocyte Antigen (HLA) et les gènes qui codent pour les protéines qui interviennent dans les réponses immunitaires comme les facteurs de transcription STAT4 et IRF5 (**Feingold, 2005**).

La protéine codée par le gène STAT4 est stimulée par des cytokines principalement l'IL-12, ce qui permet la différenciation et la prolifération des cellules Th1 et la libération de l'interféron- γ (INF- γ) (**Romagnani, 2004**). Tandis que le gène IRF5 code pour une protéine impliquée dans la signalisation des récepteurs toll-like (TLR) et l'activation des gènes cibles de l'interféron de type I (INF- I) (**Essakalli et al., 2009**).

L'étude de la génétique du système immunitaire, désignée par le terme d'immunogénétique, a considérablement bénéficié de nouveaux développements qui ont permis entre autres d'identifier et de détecter la présence de polymorphisme SNP (**Jorde et al., 2004**). Dans notre étude nous nous sommes intéressés au SNP du gène STAT4 rs7574865 caractérisé par le changement du nucléotide sauvage G par le nucléotide muté T et celui du gène IRF5 rs2004640 caractérisé par le changement du nucléotide sauvage G par le nucléotide muté T.

Notre travail consiste à déterminer les fréquences alléliques et génotypique des polymorphismes des gènes STAT4 et IRF5 dans une population Algérienne saine indemne de toute pathologie rhumatismale ou auto-immune, dans le but de comparer nos résultats avec ceux des autres pays. Cela permettra de situer notre population parmi d'autres : Maghrébine, Européenne, Asiatique et Américaine.

I. Matériel

I. 1. Echantillonnage

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau de l'hôpital ISSAD Hassani de Beni Messous, au laboratoire Central de biologie – Unité d'immunologie – pendant une durée de 2 mois, de Mars jusqu'à la fin Mai.

Notre thème consiste en l'étude des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes génétique des gènes STAT4 et IRF5 chez une population Algérienne saine.

Notre étude a inclus 264 sujets sains volontaires issus de familles indépendantes et de différentes willayas d'Algérie, 143 Hommes et 121 Femmes, dont l'âge varie entre 18 et 59 ans avec une moyenne d'âge de $35 \pm 10,62$ ans.

Chaque volontaire répond à un questionnaire, incluant des informations sur son âge, sexe, région d'origine, antécédents personnels et familiaux aux maladies auto-immunes ou toute autre maladie. (**Voir Annexe II**)

Pour chacun de ces sujets trois prélèvements ont été effectués :

- ✓ 2 tubes avec anticoagulants EDTA pour l'extraction de l'ADN.
- ✓ 1 tube avec anticoagulant citraté pour évaluer la vitesse de sédimentation (VS).
- ✓ 1 tube sec pour la recherche des facteurs rhumatoïdes (FR).

La récupération du sérum, pour la recherche des FR, et la VS a été faite le jour même du prélèvement au niveau du laboratoire central de Beni Messous et au centre de transfusion sanguin (CTS) de Blida.

I. 2. Appareillage

Le matériel nécessaire pour la réalisation de notre étude se compose de :

- Principalement, un appareil Taqman 7500 real time PCR : pour l'amplification et le génotypage des séquences des gènes étudiés.
- Un ensemble de verreries de laboratoire et de réactifs.

II. METHODES

Le mode opératoire des méthodes utilisées est retrouvé en **Annexe I**

II. 1. Mesure de la vitesse de sédimentation

La VS est calculée à partir de sang prélevé sur tube citraté, elle présente un intérêt dans le diagnostic de nombreuses infections en particulier les maladies inflammatoires.

a. Principe

C'est la vitesse à laquelle les hématies se déposent au fond d'un tube, appelé pipette à VS, remplis de sang et posé verticalement sur un portoir (Figure 08).

Au bout d'une heure, nous obtenant deux phases :

- Le plasma (partie liquide du sang)
- Les sédiments (constitués d'éléments solides du sang : GR, GB, plaquettes,...etc).

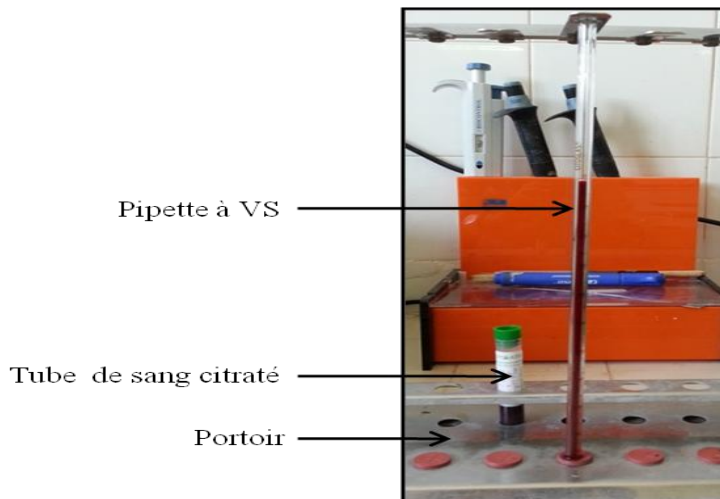


Figure 08 : Technique de mesure de la VS.

b. Lecture

La VS est mesurée par la hauteur (exprimée en mm) de la colonne de plasma située au-dessus des hématies qui ont sédimentées par heure (mm/h). (**Figure 09**)

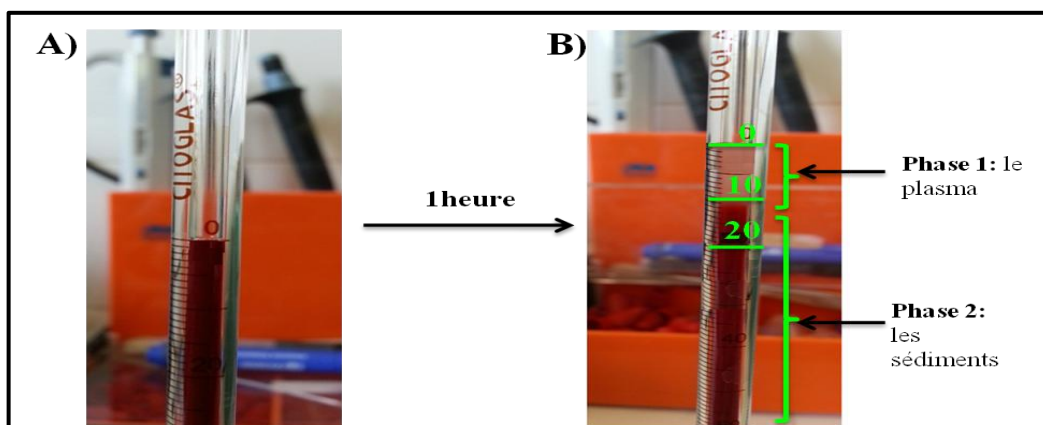


Figure 09 : Sédimentation des constituants solides du sang et mode de lecture d'une VS.

Les hématies sédimentent un peu plus rapidement chez les femmes que chez les hommes, de même chez les individus âgés par rapport aux jeunes.

Tableau IV : Limite supérieure de la norme de la vitesse de sédimentation en mm à la première heure.

Age		<50 ans	>50 ans
sexe	Hommes	0-15	0-20
	Femmes	0-20	0-30

(Hermann Lessing et al., 2007)

II. 2. Recherche du facteur rhumatoïde

Un facteur rhumatoïde est un auto-anticorps dirigé contre la partie Fc des IgG. La détection rapide de facteurs rhumatoïdes de type IgM dans le sérum utilise des réactions d'agglutination (Miossec, 2004).

a. Principe

Le test au latex et la réaction de Waaler-Rose sont des tests d'agglutination sur lame.

- Le test au latex : utilise des particules synthétiques de latex sensibilisées par des IgG humaines, qui agglutinent spécifiquement le FR.
- La réaction de Waaler-Rose : utilise des globules rouges de mouton recouverts d'IgG de lapin anti mouton.

b. Lecture

Le coffret de chaque test contient un contrôle qualité interne qui permet d'observer la réaction positive et négative comme décrites ci-dessous :

Tableau V : L'interprétation des résultats de la technique de Waaler-rose et la réaction au Latex.

Résultats		Interprétation
Positive (+)	Latex : Agglutinats rouges sur fond bleu	Présence du facteur rhumatoïde
	Waalер-rose : Agglutinats marron sur fond blanc	
Négative (-)	Latex : Couleur violette homogène.	Absence du facteur rhumatoïde
	Waalер-rose : Couleur marron homogène.	

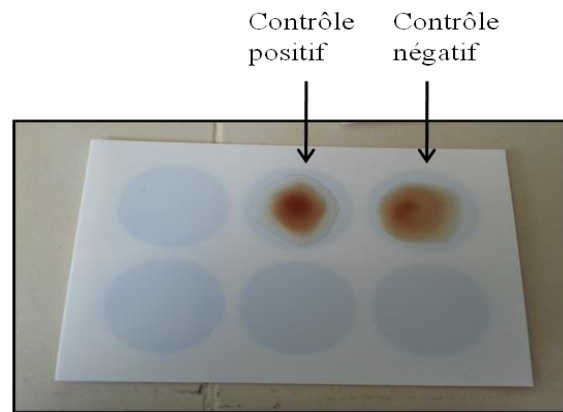


Figure 10: Lecture d'une plaque du test Waaler-rose montrant le contrôle positif agglutinant et le control négatif homogène.

II. 3. Extraction d'ADN par salting out

L'ADN utilisé comme matrice d'amplification pour les réactions PCR en temps réel a été extrait par la technique de relargage des protéines à force ionique élevée « Salting-out ».

a. Principe

La technique de salting-out se base sur la propriété qu'a une concentration saline de très forte molarité de précipiter une grande partie de débris générés par la lyse de la cellule. L'étape subséquente de précipitation de l'ADN par l'éthanol permet alors d'isoler ce dernier. (Miller et al., 1988)

Le sang total prélevé sur tube EDTA a été traité par plusieurs solution afin d'extraire l'ADN leucocytaire (Sachant que les hématies sont anucléées).

b. Mode opératoire

1) La lyse des globules rouges

Le sang prélevé sur tube EDTA est traité par la SLR, agiter vigoureusement afin d'éliminer tous les globules rouges anucléés, puis incuber 30min dans la glace, le choque à froid facilite leur lyse.

Le lysat ainsi obtenu est centrifugé 10min, 2500 trs/min à +4°C. Eliminer le surnageant avec précaution, et répéter l'opération une deuxième fois afin d'éliminer toutes les hématies et d'obtenir un culot blanchâtre constitué de leucocytes.

2) La lyse des globules blancs

Le culot cellulaire obtenu, est traité par la SLB. Bien agiter afin de solubiliser les membranes plasmiques puis rajouter la PK, très active capable de lyser les protéines cellulaire, et le SDS détergent anionique pour la lyse des membranes nucléaires. Le lysat est incubé une nuit au bain marie à 37°C.

3) La récupération de la méduse d'ADN

- **Précipitation des protéines**

Les débris cellulaires générés sont relargués par la force ionique du NaCl (6M), bien vortexer le mélange jusqu'à l'apparition d'une mousse blanchâtre puis centrifuger 15mn à 3600 trs/mn à 4°C.

Obtenir une phase inférieure organique contenant les débris cellulaires (protéines, lipides...) et une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN dissous.

- **Précipitation de l'ADN**

En rajoutant de l'éthanol absolu (100%) et en agitant délicatement le tube, l'ADN précipité sous forme d'un filament fin appelé « Méduse d'ADN », visible à l'œil nu.

La méduse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur puis rincée dans de l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sel. Enfin la laisser sécher sous une haute à une température ambiante pendant 24h.

L'ADN ainsi séché est resuspendu dans une solution tampon de Tris-EDTA 10/1 pH 8,

L'ADN dissout peut être conservé à +4°C pendant quelques jours ou bien à -20°C pour une conservation à plus long terme.

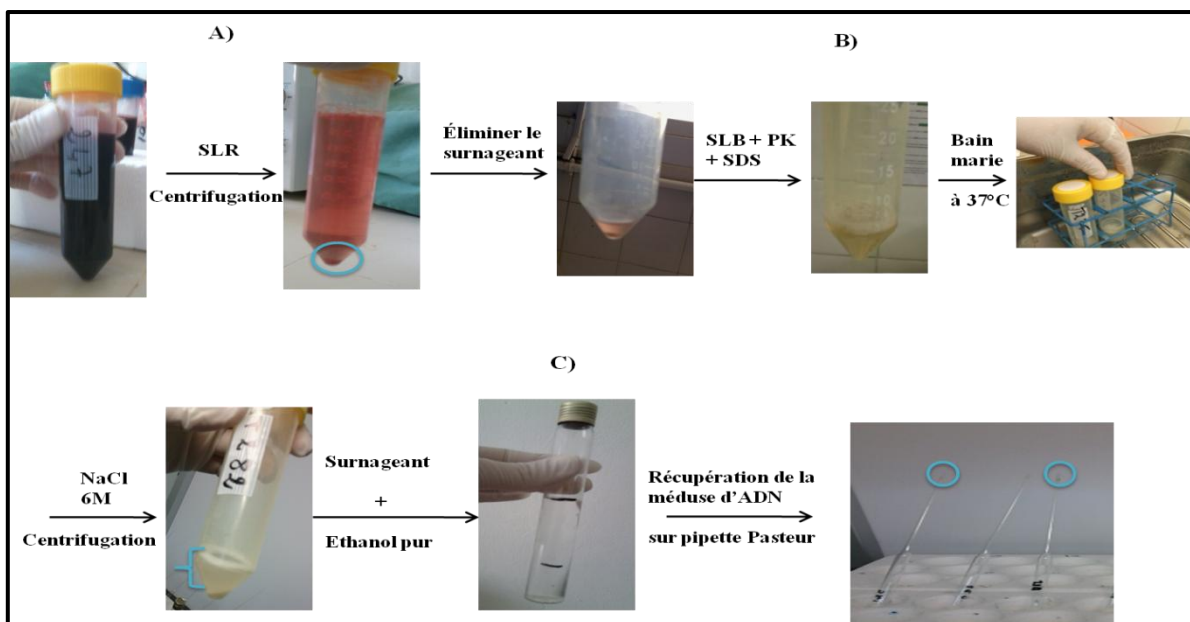


Figure 11: Les principales étapes de la technique de salting-out avec en A) La lyse des GR en B) La lyse des GB et en C) La récupération de la méduse d'ADN.

II. 4. PCR en temps réel

a. Principe

La PCR est une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant (Figure 12 A). Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation (Figure 12 B) aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. (Tse et Capeau, 2003)

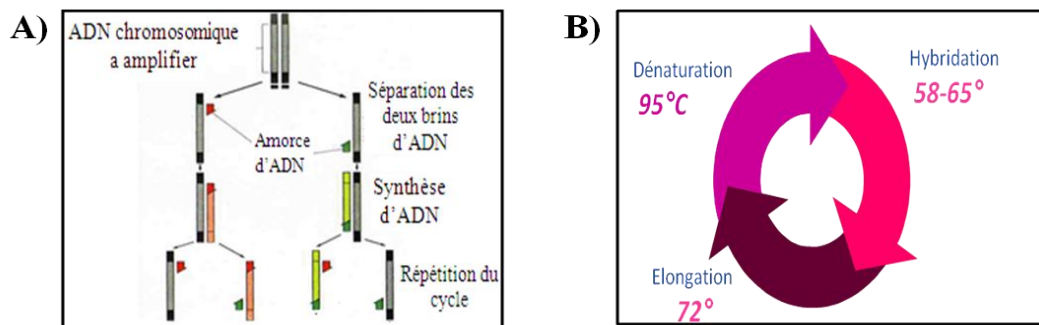


Figure 12: A) Schéma représentant la succession des cycles durant une réaction PCR. B) les trois phases de chaque cycle PCR

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en point final mais tout au long de l'amplification à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent les produits amplifiés à cet instant.

b. Détection

➤ La Sonde d'hydrolyse : TaqMan

C'est le système de détection qu'utilise notre PCR. La sonde a une taille qui varie de 15 à 25 nucléotides (Nt) et est complémentaire à une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier.

Elle porte en 5' un fluorophore ou "reporter" et en 3' un "Quencher" une molécule qui absorbe l'émission du reporter lorsque les deux molécules sont proches du fait du principe de Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) : Transfert d'énergie du chromophore à haute énergie à celui à faible énergie (Poitras E., Houde A., 2002). (Figure 13)

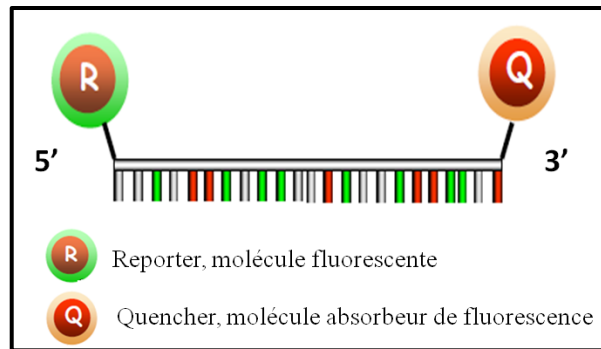


Figure 13: Schéma d'une sonde TaqMan marquée en 5' par un Reporter et en 3' par un Quencher.

Génotypage par PCR en temps réel n'utilise pas l'aspect quantitatif de cette PCR mais met à profit sa rapidité et sa simplicité, notamment grâce à l'absence d'analyse post-PCR (pas d'électrophorèse). Le principe est d'utiliser deux sondes TaqMan marquées par deux fluorophores différents spécifique de l'allèle sauvage et l'allèle muté respectivement ; chaque sonde est située entre les deux amorces:

- Le génotypage du gène STAT4
 - ✓ Deux amorces :
 - Sens : 5'-AAA GAA GTG GGA TAA AAA GAA GTT TG-3'
 - Anti-sens : 5'-CCA CTG AAA TAA GAT AAC CAC TGT-3'
 - ✓ Deux sondes :
 - Spécifique à l'allèle sauvage « G » marquée par le fluorophore VIC.
 - Spécifique à l'allèle muté « T » marquée par le fluorophore FAM. (Figure 14)
(Zervou et al., 2008)

- Le génotypage du gène IRF5
 - ✓ Deux amorces :
 - Sens : 5'-CACCGCAGACAGGTGGG-3'
 - Anti-sens : 5'-GGGAGGCGCTTTGGAAGT-3'
 - ✓ Deux sondes :
 - Spécifique à l'allèle sauvage « G » marquée par le fluorophore VIC.
 - Spécifique à l'allèle muté « T » marquée par le fluorophore FAM.
(Uccellini et al., 2012)

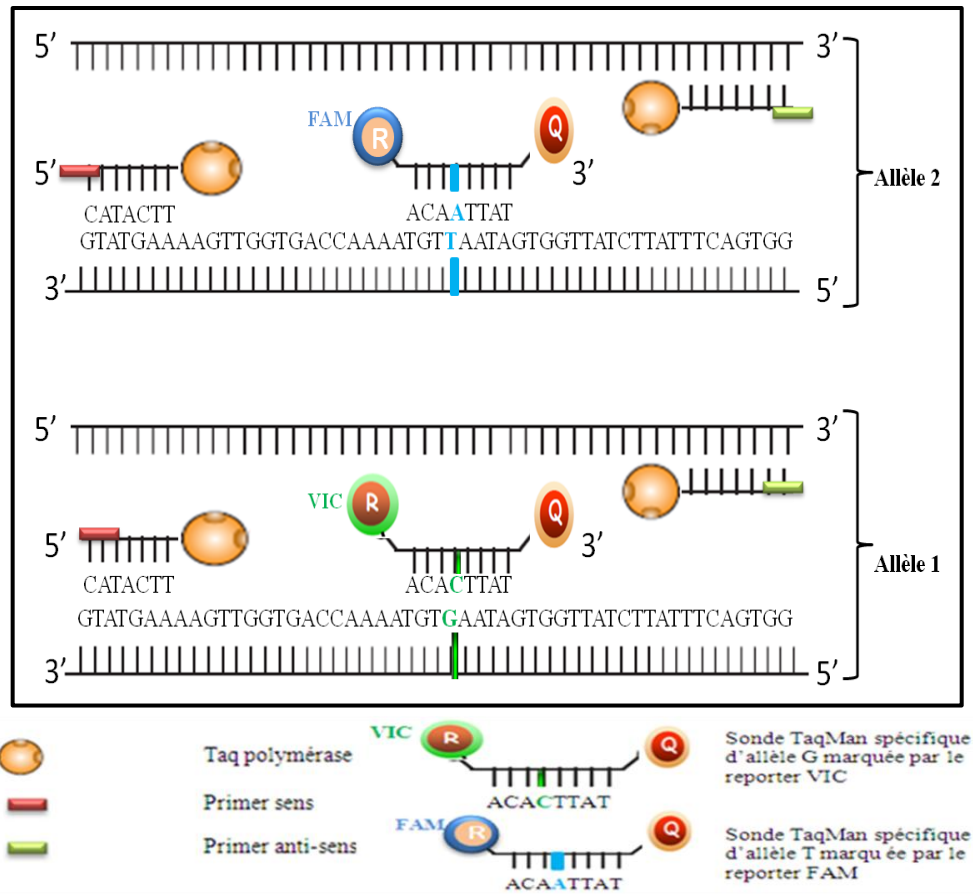


Figure 14 : Schéma représentant l'hybridation des amorces et de la sonde Taqman sur la séquence du gène STAT4 rs7574865.

Durant l'étape d'élongation, le fluorophore se dissocie de la sonde suite à l'activité 5'exonucléasique de la polymérase, permettant dès lors l'émission de fluorescence étant donné que le reporter s'éloigne du quencher. (Figure 15)

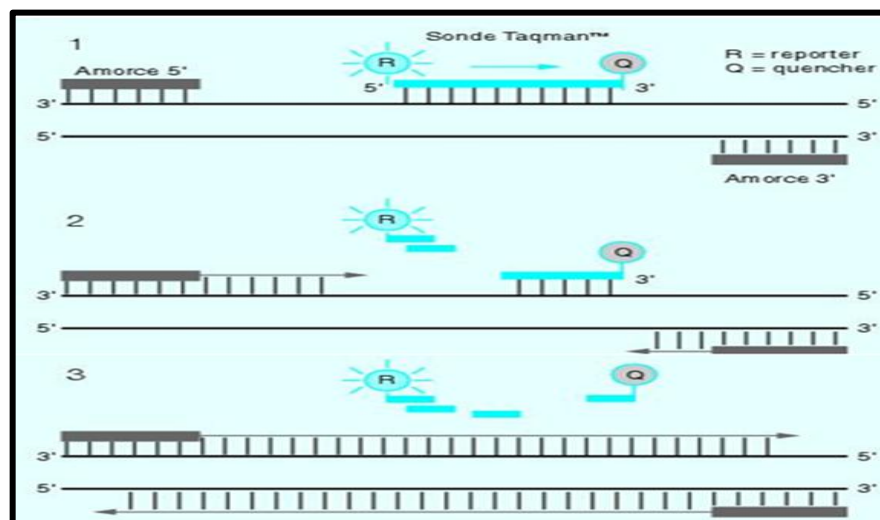


Figure 15 : Schéma représentant l'émission de fluorescence après l'hydrolyse de la sonde TaqMan par l'activité 5'exonucléasique de la Taqpolymérase (Tse et Capeau, 2003).

c. Lecture

➤ Courbe d'amplification :

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN répliquée pendant la réaction de PCR. Le résultat est représenté graphiquement sous forme de courbe sigmoïde, chaque courbe correspond à un échantillon. (Figure 16)

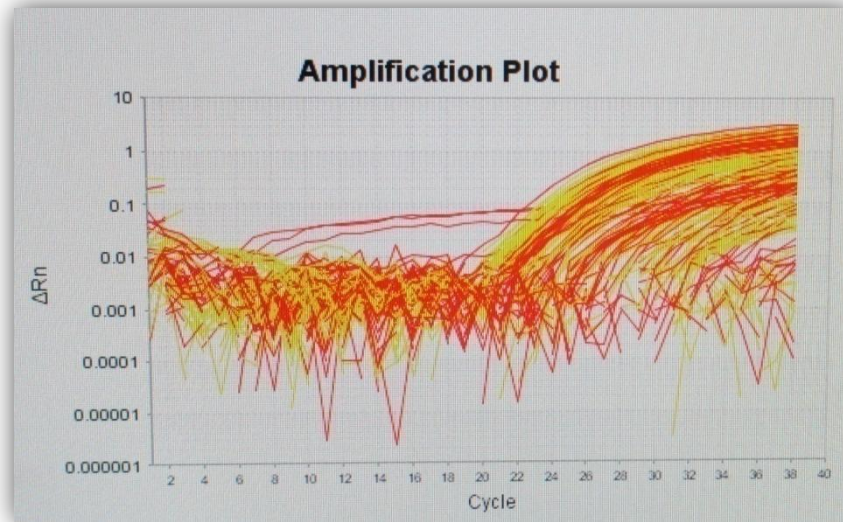


Figure 16 : Schéma représentative des courbes d'amplification de plusieurs échantillons.

La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases :

- ✓ Une phase d'initiation
 - ✓ Une phase exponentielle
 - ✓ Une phase plateau.
- La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence.
 - La ligne seuil (Thr), correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle.
 - Le cycle seuil (Ct) : Est le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil et correspond au point de départ de la phase exponentielle (Figure 17).

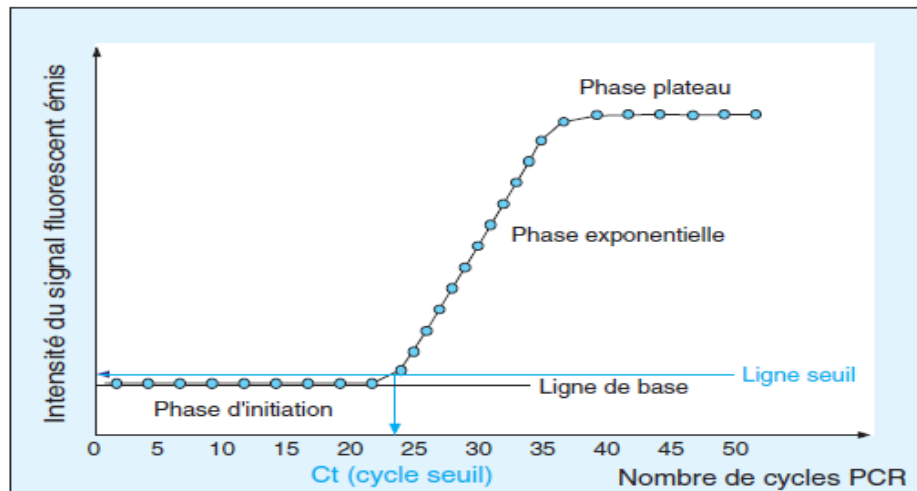


Figure 17: Schéma représentatif des différentes phases d'une réaction de PCR en temps réel (Tse et Capeau, 2003)

L'utilisation de deux sondes permet de détecter deux signaux différents correspondant aux produits de PCR de l'allèle sauvage et de l'allèle muté, visibles par deux courbes d'amplification distinctes représentées ci-dessous dans la (Figure 18).

✓ **Génotype homozygote sain :**

- Hybridation seulement de la sonde VIC spécifique de l'allèle sauvage sur les deux allèles.
- Emission d'une seule fluorescence.
- Une seule courbe d'amplification est tracée.

✓ **Génotype hétérozygote :**

- Hybridation des deux sondes, l'allèle normal est reconnu par VIC et l'allèle muté est reconnu par FAM.
- Emission de deux fluorescences distinctes.
- D'eux courbes d'amplification sont tracées.

✓ **Génotype homozygote muté :**

- Hybridation seulement de la sonde FAM spécifique de l'allèle muté sur les deux allèles.
- Emission d'une seule fluorescence.
- Une seule courbe d'amplification est tracée. (Figure18)

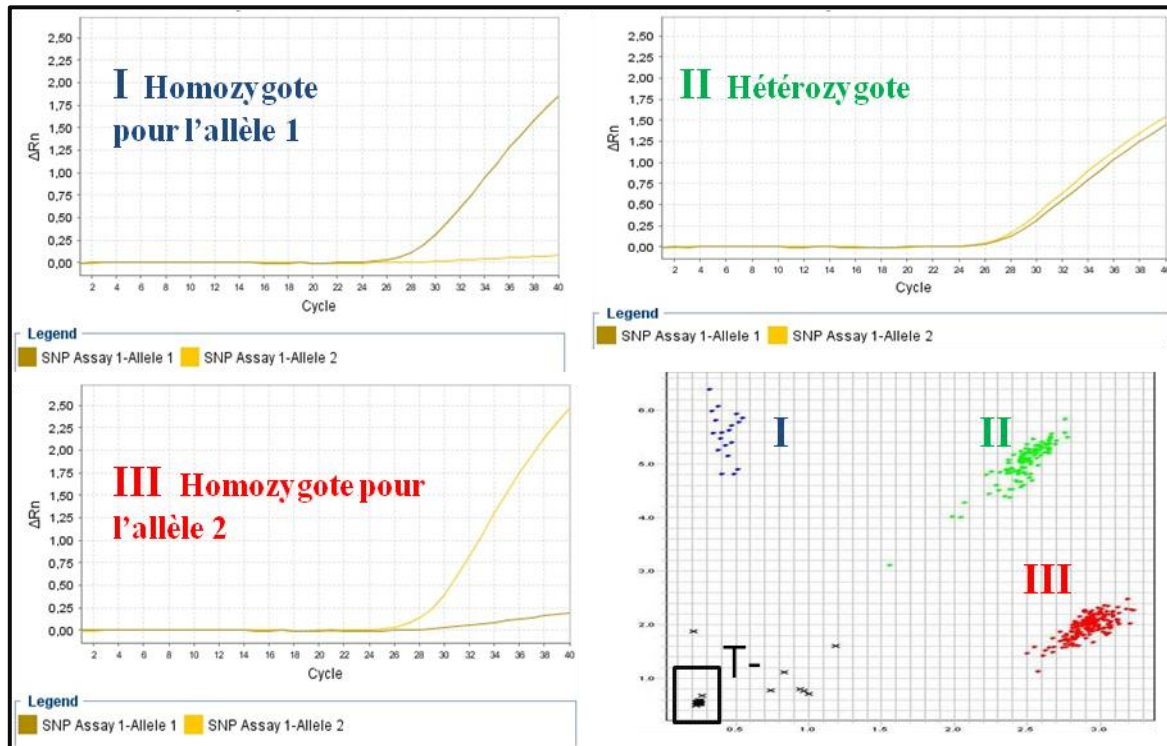


Figure 18 : Les courbes d’amplifications et la répartition en nuages des trois populations différentes génotypiques.

II. 5. Outil statistique

La comparaison des fréquences génotypiques et alléliques entre les sujets féminins et masculins a été faite en utilisant le logiciel « Compare2 », utilisant le test de Khi2. Le P a été calculé et est considéré comme significatif s’il est inférieure à 0.05 ($P < 0.05$).

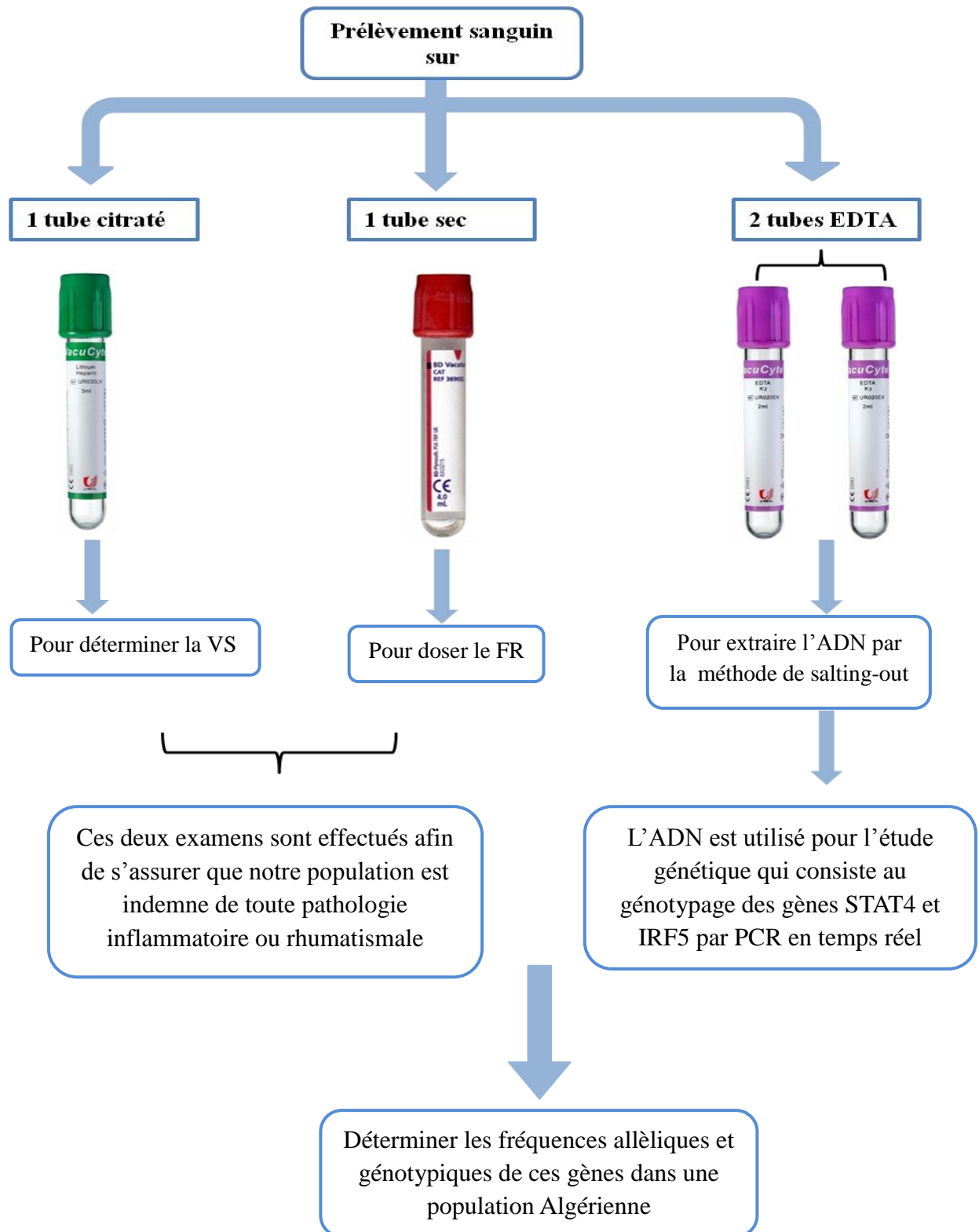


Figure 19 : Schéma récapitulatif des méthodes effectuées au cours de notre stage expérimentale.

I. Résultats

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau de l'hôpital ISSAD Hassani de Beni Messous, au laboratoire Central de biologie – Unité d'immunologie – pendant une durée de 2 mois.

1. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

Notre étude a inclus 264 sujets sains volontaires indemnes de toute pathologie inflammatoire ou rhumatismale issus de familles indépendantes et de différentes willayas d'Algérie, dont l'âge varie de 18 à 59 ans et un âge moyen de $35 \pm 10,62$ ans.

Les résultats de notre travail sont résumés dans les tableaux et les histogrammes suivant :

Tableau VI : Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiées.

Nombre total de sujets sains étudiés	264
Nombre des femmes	121
Nombre des Hommes	143
Moyenne d'âge	$35 \pm 10,62$
Extrême	18-59

- **Représentation de nos échantillons selon le sexe :**

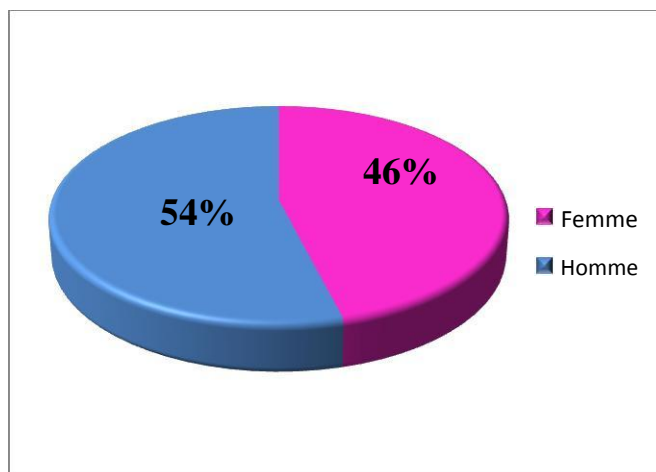


Figure 20 : Répartition de la population étudiée selon le sexe

D'après la figure 20, on remarque que 54% sont de sexe masculin et 46% des sujets sont de sexe féminin avec un sexe ratio= 1F :1H.

- **Représentation de nos échantillons selon la tranche l'âge :**

Voire tous les tableaux en **Annexe II**

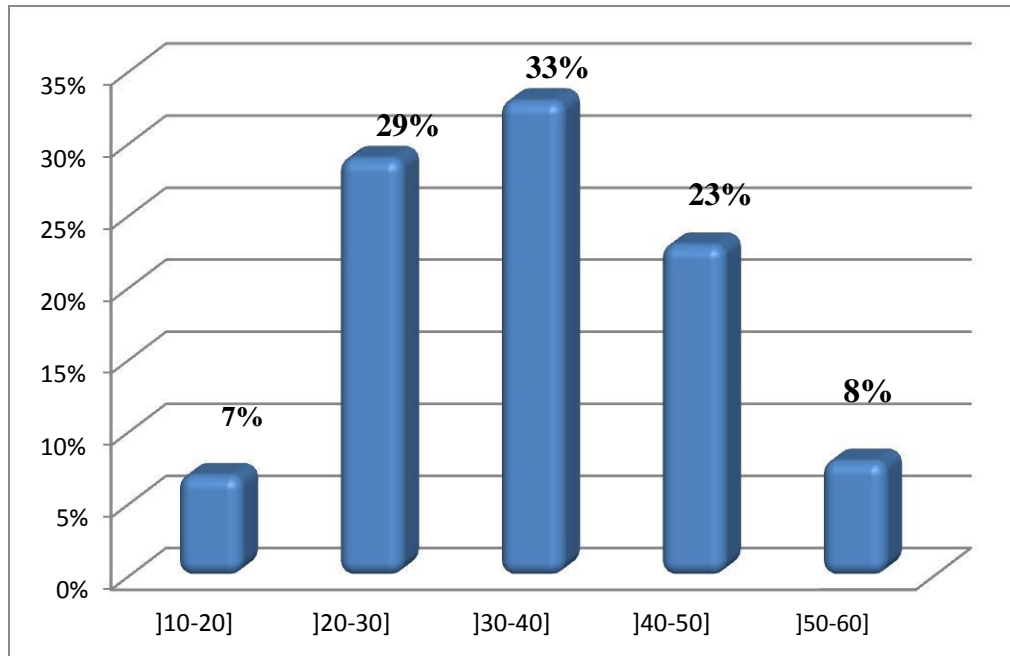


Figure 21 : Représentation de la population selon les classes d'âge

La figure 21 montre que 33% de notre population étudiée a un âge compris entre 30 et 40 ans et de 7% de jeunes entre 10 et 20 ans, tandis que les sujets âgés de 50 à 60 ans présente 8%.

- **La vitesse de sédimentation (VS)**

Les sujets étudiés avaient une VS généralement normale inférieur à 20mm/h

- **Les facteurs rhumatoïdes (FR)**

La fréquence des facteurs rhumatoïdes doit être entre 1- 2%, nous avons trouvé deux cas de FR+ que nous avons éliminé pour plus de précaution.

2. Etude allélique des gènes STAT4 et IRF5

1.1. Le gène STAT4

- Représentation de la fréquence allélique du gène STAT4 dans la population

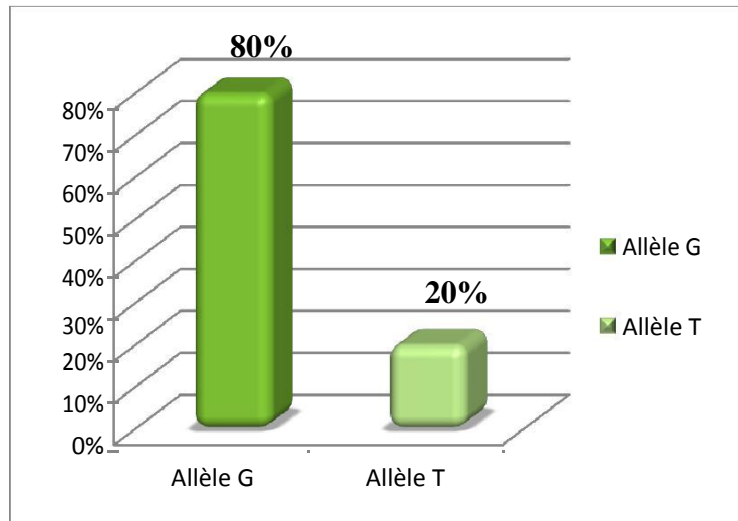


Figure 22: Représentation graphique de la distribution allélique du gène STAT4 dans la population générale étudiée.

La figure 22 montre que dans la population générale la fréquence de l'allèle sauvage G est beaucoup plus importante que l'allèle muté T avec une différence de 60%.

- Représentation de la fréquence allélique du gène STAT4 chez les deux sexes

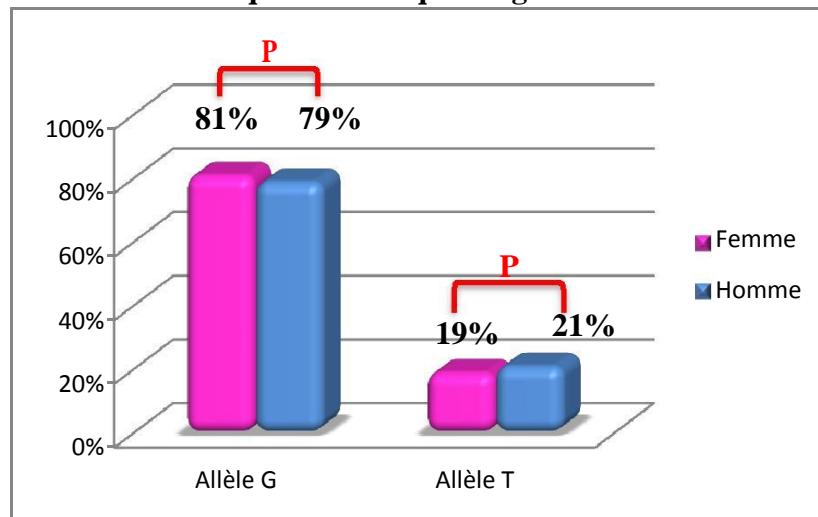


Figure 23 : Représentation graphique de la distribution allélique du polymorphisme du gène STAT4 chez les deux sexes.

La figure 23 montre que la fréquence de l'allèle G est très importante chez les femmes de même que chez les hommes, et la fréquence de l'allèle T est de 19% chez les femmes et 21% chez les hommes, cette différence est non significative $P=0.573$, ce P est largement supérieur à 0.05

1.2. Le gène IRF5

- Représentation de la fréquence allélique du gène IRF5 dans la population

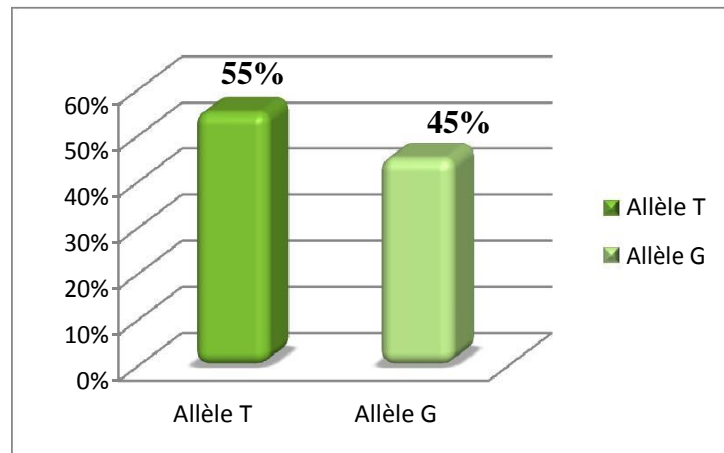


Figure 24 : Représentation graphique de la distribution allélique du gène IRF5 dans la population générale étudiée.

La figure 24 montre que la fréquence de l'allèle muté T dans la population est légèrement plus élevée que l'allèle sauvage G avec une différence de 10%.

- Représentation de la fréquence allélique du gène STAT4 chez les deux sexes

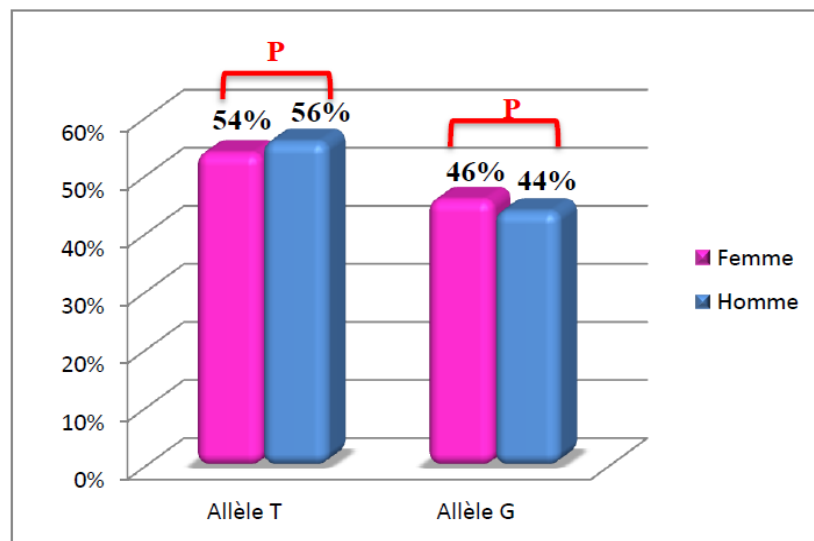


Figure 25 : Représentation graphique de la distribution allélique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.

La figure 25 montre la distribution des fréquences alléliques chez les Hommes et les Femmes qui sont de 56% et 54% respectivement pour l'allèle T et de 44% et 46% pour l'allèle G avec une très légère différence non significative avec un $P=0.553$

3. Etude génotypique des gènes STAT4 et IRF5

1.3. Le gène STAT4

- Représentation de la répartition génotypique du gène STAT4 dans la population

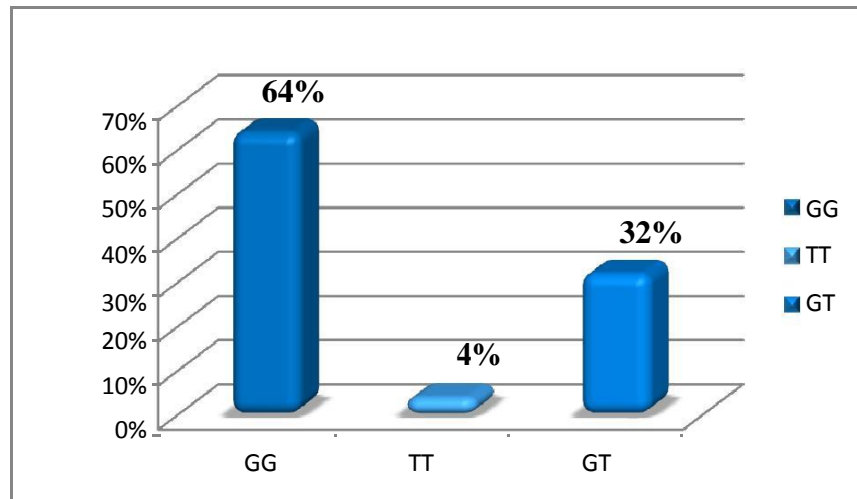


Figure 26 : Représentation graphique de la distribution génotypique du gène STAT4 dans la population étudiée.

La figure 26 montre qu'il y a une prédominance visible du génotype sauvage GG, et un très faible pourcentage du génotype homozygote muté TT dans seulement 4% de la population.

- Représentation de la répartition génotypique du gène STAT4 chez les deux sexes

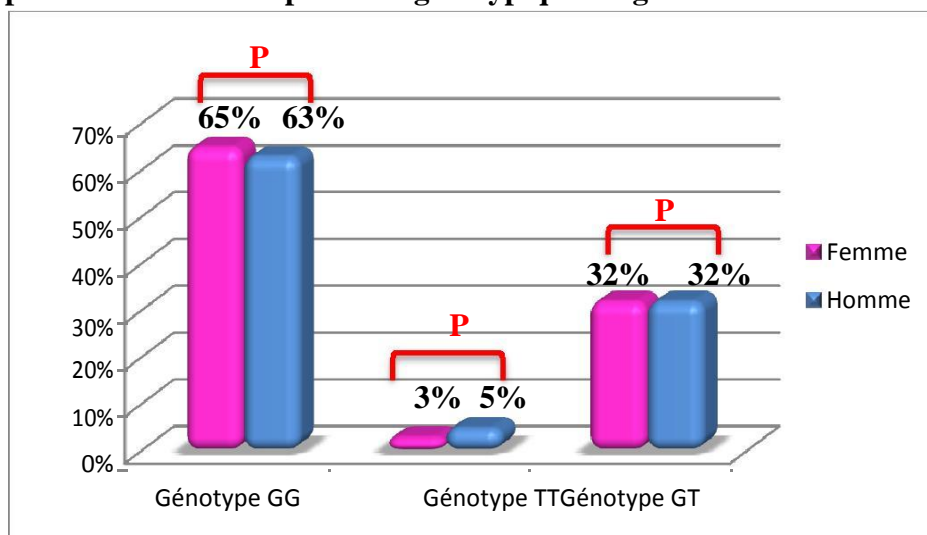


Figure 27 : Représentation graphique de la distribution génotypique du gène STAT4 chez les Femmes et les Hommes.

La figure 27 montre que le génotype hétérozygote GT est distribué avec exactement les mêmes fréquences (32%) entre les deux sexes, ce qui fait que la différence de distribution de ces génotypes entre les Femmes et les Hommes est non significative avec un $P=0.692$ pour le génotype sauvage GG, $P=0.520$ pour le génotype muté TT et enfin $P=0.895$ pour le génotype hétérozygote GT

1.4. Le gène IRF5

- Représentation de la répartition génotypique du gène IRF5 dans la population

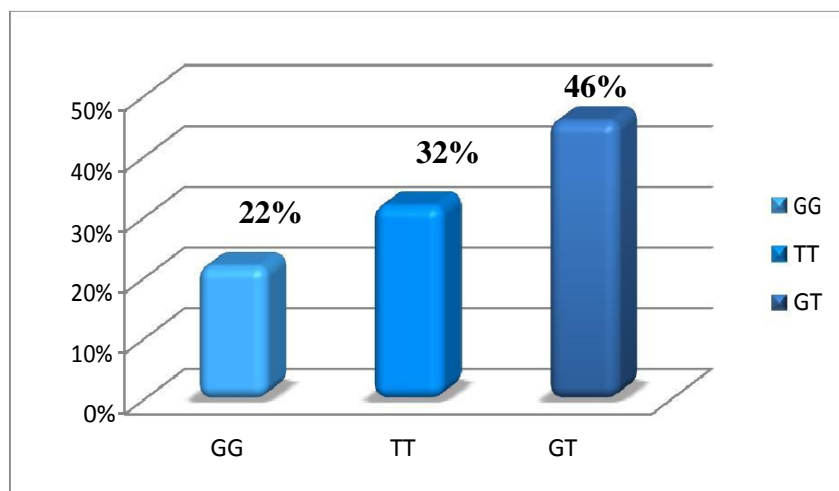


Figure 28 : Représentation graphique de la distribution génotypique du gène IRF5 dans la population étudiée.

La figure 28 montre que le génotype hétérozygote GT présente le plus grand pourcentage avec 46% de la population, suivi par les homozygotes mutés TT (32%) puis les sauvages GG (22%).

- Représentation de la répartition génotypique du gène IRF5 chez les deux sexes

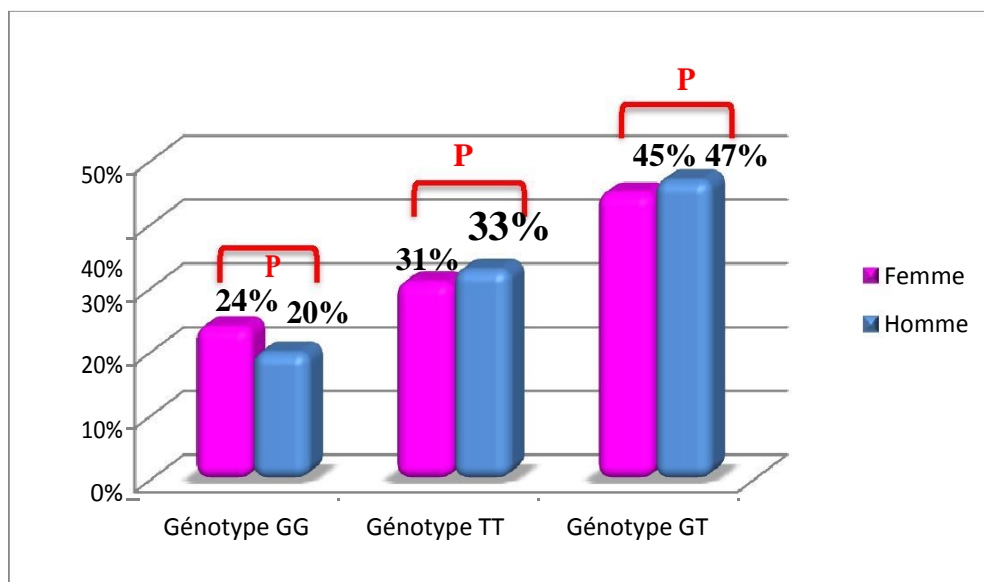


Figure 29: Représentation graphique de la distribution génotypique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.

La figure 29 montre que les trois génotypes sont distribués avec quasiment les mêmes fréquences entre les deux sexes, avec un $P=0.471$ pour le génotype sauvage GG, $P=0.800$ pour le génotype muté TT et enfin $P=0.718$ pour le génotype hétérozygote GT

II. Discussion générale

Notre étude a porté sur **264** sujets sains ne présentant aucune pathologie inflammatoire ou rhumatismale, révélé par la mesure de la VS et l'absence du FR que nous avons vérifié par les réactions d'agglutination au latex et au Waaler rose. Dans notre population nous avons autant de Femmes que d'Hommes qui sont en moyenne âgés de 35 ans \pm 10,62 ans ce qui représente pour nous un effectif assez homogène.

L'essentiel de notre travail était d'étudier le polymorphisme des deux gènes STAT4 rs7574865 et IRF5 rs2004640, qui sont impliqués dans des maladies inflammatoires et auto-immunes.

Effectivement, le premier gène code pour la protéine STAT4 elle même appartient à la famille des STAT. Elle est impliquée dans la médiation du signal induit par l'IL-12 et l'interféron de type I. Bien que le mécanisme par lequel l'allèle mineur de rs7574865 contribue à la rupture de tolérance du soi ne soit pas bien compris. Des études ont suggéré qu'il peut probablement causer une dérégulation de la différenciation des LT auxiliaires vers le profile Th1 (**Lamana et al., 2012**).

Nous avons tenu dans notre travail à déterminer les fréquences alléliques et génotypiques de ce polymorphisme et c'est ainsi que nous avons remarqué que :

La fréquence de l'allèle G sauvage et de l'allèle T muté est de (80%) et (20%) respectivement, ceci a été retrouvé dans de nombreuses études : Tunisienne, Egyptienne, Espagnole, Italienne et Allemande, où les fréquences de l'allèle G varient de 78% à 84% et de l'allèle T qui varie de 16% à 22%. Le fait que l'expression du gène STAT4 est limitée a quelques tissus spécifiques (**Zhong et d'autres, 1994**), ceci peut expliquer la faible fréquence de l'allèle muté semblable dans l'ensemble de ces populations.

Ceci dit, il faut noter que des études japonaise et chinoise ont montré une distribution de l'allèle T légèrement plus importante avec une moyenne de 31%. Ceci doit faire la particularité génétique de ces populations.

Kariuki et al., (**2009**) ont rapportaient que la présence de l'allèle muté T rs7574865 chez les patients atteints de LES été associé a un faible taux d'INF- α ce qui confirme le rôle de la molécule STAT4 dans la voie de signalisation de cette cytokine. Toute fois, l'allèle mineur a également été associé à des manifestations plus sévères de LES en particulier la production d'auto-anticorps anti ADN double brin (**Taylor et al., 2009**).

Par conséquent, l'activité la plus intense des maladies a été observée chez les homozygotes TT, pouvant être associé à une sensibilité plus accrue à l'IL-12 ou aux INF type I.

Dans notre étude, la distribution des trois génotypes était GG (64%), TT (4%) et GT (32%). Ces résultats ont montré des similitudes avec ceux décrit en Espagne, en Allemagne et en Angleterre où leurs fréquences génotypiques sont en moyenne de 63% pour les GG, de 33% pour les GT et de 4% pour les TT.

Et des différences dans d'autres études Japonaise, Chinoise et Colombienne où les génotypes GT/ TT sont plus important, ils varient de (39%) à (46%) et de (8%) à (10%) respectivement.

Ces résultats soutiennent l'idée que le gène STAT4 rs7574865 semble être un facteur de risque génétique commun à l'auto-immunité. Toutefois, il ne s'agit probablement pas du variant causal de ces pathologies (**Remmers et al., 2007**).

Par ailleurs, vu la faible fréquence de l'allèle T et du génotype TT dans notre population le risque d'aller vers les MAI impliquant la molécule STAT4 du polymorphisme rs7574865 est a priori faible rajoutant à ça qu'il faudrait l'association d'autres polymorphismes et des facteurs environnementaux.

Le travail sur le deuxième gène IRF5 rs2004640 qui code pour le facteur de transcription IRF5 tient au fait qu'il est impliqué dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'INF- α . Ces cytokines sont connues pour jouer un rôle important dans la pathogénicité de la PR, LES et d'autres MAI inflammatoires (**Sigurdsson et al., 2007**). En effet, plusieurs polymorphismes au niveau de ce gène codent pour différents variant d'IRF5 susceptibles d'augmenter le risque de ces MAI.

Le SNP qui a fait l'objet de notre travail est le rs2004640, nous avons déterminé les fréquences génotypiques de ce gène, les résultats issus de cette partie montrent que:

Le génotypage du gène IRF5 rs2004640 a montré une fréquence de l'allèle muté T et de l'allèle sauvage G de 55% et 45% respectivement. Ceci a été retrouvé en Tunisie, en Suède, en Espagne et l'Amérique du nord où les fréquences de l'allèle T varient de (51%) à (54%) et de l'allèle G qui varie de (46%) à (49%). Dans toutes ces études la fréquence de l'allèle muté T est très importante, ceci peut être dû au fait que la molécule IRF5 est exprimée dans la plupart des tissus de l'organisme.

Par contre des études en Argentine et en Finlande ont montré une fréquence relativement moins importante de la distribution de l'allèle T qui varie de (44%) à (48%).

Miceli-Richard et al., (**2007**) ont été les premiers à montré une association significative entre la présence de l'allèle T rs2004640 et la SGs. Cette association a été décrite chez les patients lupiques avec présence d'auto-anticorps anti-ADN double brin (**Dieudé et al., 2009**). Effectivement une étude de Demirci et al., (**2007**) a montré une très forte présence de l'allèle muté T chez ces sujets. D'autres études de gènes candidats ont montré sa contribution à la fibrose pulmonaire associée à la ScS (**Allanore et Boileau 2011**). Vu que la molécule d'IRF5 est impliquée dans la régulation de la voie de l'INF de type I (**Nordang et al., 2011**).

La distribution des trois génotypes dans notre étude GG (22%), TT (32%), GT (46%) a montré des similitudes avec celle décrite en Tunisie, en Amérique du nord, Espagne, Suède avec une prédominance du génotype hétérozygote GT qui varie de 44% à 48% et des différences avec celles faite en Argentine et en Finlande où le génotype homozygote muté TT est un peu moins importante: 23% et 25% respectivement.

Vu l'énorme fréquence de l'allèle T et/ou du génotype TT. Ceci pourrait favoriser l'idée que l'IRF5 rs2004640 soit un facteur de susceptibilité commun aux maladies rhumatismales et inflammatoire sévères. De ce fait on se demande si notre population présente un risque de développer ces maladies dans le temps ou bien de transmettre cet allèle aux générations suivantes et favoriser davantage le génotype homozygote pour l'allèle T et donc émergence d'un risque sévère.

En associant ces facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans le développement, la différenciation et la fonction du système immunitaire. Ils sont les deux impliqués dans la voie de l'INF type I (**Dieudé et al., 2010**) cette cytokine est largement présente dans les réactions inflammatoires (**Khan, 2006**).

Bouزيد et al., (**2011**) ont rapportés qu'un polymorphisme au niveau de ces deux gènes rs7574865 et rs2004640 augmente la susceptibilité au LES. L'étude combinée de IRF5 et STAT4 a aussi montré que les deux variants pourraient avoir un effet additif quand au risque de développer cette pathologie (**Kariuki et al., 2009**)

Seulement deux personnes représentant 0.76% de notre échantillon ont le génotype homozygote muté pour des deux gènes en même temps, ces deux cas présentent probablement une susceptibilité plus importante au MAI ou bien de transmettre l'allèle muté à leurs descendances.

Ceci dit, la présence de ces deux SNP uniquement ne suffit pas à dire qu'une personne est prédisposée à telle ou telle MAI. De travaux sur d'autres gènes de susceptibilité à ces pathologies inflammatoires tels PTPN22, PADI4, BLK... sont nécessaire afin d'établir un fond génétique.

Les SNP constituent les polymorphismes les plus répandus du génome humain. Ils sont le plus souvent phénotypiquement neutres. A l'heure actuelle, plus de 5 millions de SNP ont été caractérisés (**Keyser, P, 2006**). Cette abondance explique l'énorme intérêt qu'ils suscitent dans les domaines de la recherche biologique où ils sont notamment utilisés pour détecter des prédispositions individuelles à certaines maladies ou pour identifier les gènes impliqués dans des maladies multifactorielles.

Tableau VII : Comparaison des fréquences alléliques et génotypiques des deux gènes STAT4 et IRF5 de notre population avec les résultats des autres pays

- **STAT4**

Pays	Allèle		Génotype			Références
	G	T	GG	GT	TT	
Algérie (n= 264)	80%	20%	64%	32%	4%	Notre étude
Tunisie (n= 162)	84%	16%	70%	28%	2%	(Bouزيد et al., 2011)
Egypte (n=	81%	19%	68%	27%	5%	(Mohamed et al., 2011)
Espagne (n=716)	81%	19%	66%	31%	3%	(Martínez et al., 2008)
Italie (n= 362)	79%	21%	61%	35%	4%	(Rueda et al., 2009)
Allemagne(n=227)	78%	22%	61%	34%	5%	(Palomino-Morales et al., 2010)
Grèce (n=341)	82%	18%	66%	32%	2%	(Zervou et al., 2009)
Angleterre (n=3520)	–	–	61%	34%	5%	(Morgan et al., 2010)
Colombie (n=296)	71%	29%	51%	39%	10%	(Palomino-Morales et al., 2010)
Japon (n=745)	69%	31%	48%	42%	10%	(Kobayashi et al., 2008)
Chine (n=414)	69%	31%	46%	46%	8%	(Hu et al., 2010)

- **IRF5**

Pays	Allèle		Génotype			Références
	T	G	TT	GT	GG	
Algérie (n= 264)	55%	45%	32%	46%	22%	Notre étude
Tunisie (n= 162)	52%	48%	27%	50%	23%	(Bouزيد et all., 2011)
Suède (n= 256)	52%	48%	27%	50%	23%	(Sigurdsson et all., 2005)
Espagne (n=541)	54%	46%	31%	46%	23%	(Graham et all., 2006)
Amérique (n=1434)	51%	49%	30%	47%	23%	(Graham et all., 2006)
Argentine (n=279)	44%	56%	23%	50%	27%	(Graham et all., 2006)
Finlande (n=121)	48%	52%	25%	51%	24%	(Sigurdsson et all., 2005)

I. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un réseau de cellules, de tissus et d'organes qui interagissent pour défendre l'organisme contre les diverses agressions étrangères, Il est caractérisé par sa spécificité, sa diversité, sa capacité de distinguer et tolérer le soi et de réagir contre le non-soi. Pour assurer sa protection, l'organisme possède deux types de mécanismes de défense :

- **L'immunité innée**

L'immunité innée fait appel à un ensemble de mécanismes non spécifique qui permettent d'entrer rapidement en action. Cette défense fait intervenir les cellules phagocytaires (les neutrophiles, les monocytes et les macrophages), les cellules cytotoxiques naturelles (NK). Et les protéines du système du complément (**Abbas et Lichtman, 2009**)

- **L'immunité adaptative**

L'immunité adaptative est une défense acquise qui, bien qu'elle soit moins rapide, elle est spécifique et dotée d'une mémoire. Elle entre en action lorsque l'agent pathogène réussi a déjoué les défenses naturelles, et se déroule dans les tissus lymphoïdes, en particulier dans la rate et les ganglions. Elle met en jeu les cellules lymphocytaires B et T (**Abbas et Lichtman, 2009**).

Il arrive que le système immunitaire présente des défaillances et donnant naissance à des pathologies tels que les Maladies auto-immunes (MAI).

II. Maladies auto-immunes multifactorielles

L'auto-immunité se définit par la rupture des mécanismes de tolérance vis-à-vis constituants naturels du soi avec comme conséquences l'activation des lymphocytes T et lymphocytes B auto réactifs

Ces maladies auto-immunes sont dites multifactorielles, leur apparition renvoie à divers facteurs environnementaux (agents infectieux, tabac, facteurs hormonaux ...) et des facteurs immunogénétiques (**Feingold, 2005**).

II. 1. Les facteurs immunogénétiques

L'implication du facteur immunogénétique est fondamentale, comme le suggère le caractère familial fréquent des MAI. Il a été démontré qu'il existe une fréquence augmentée des maladies chez les apparentés du premier degré de sujets atteints (parents, fratrie ou enfants) par rapport à celle observée dans la population générale.

L'étude de jumeaux permet d'appréhender au mieux le poids de la composante génétique d'une maladie multifactorielle. Elle est fondée sur la comparaison du taux de concordance pour la maladie entre jumeaux monozygotes (MZ), partageant un patrimoine

génétique identique, et jumeaux dizygotes (DZ) du même sexe, comme le montre le **tableau I** ci dessous (**Dieudé, 2009**).

Tableau I : Exemple de taux de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes des MAI

MAI	Jumeaux monozygotes	Jumeaux dizygotes
Polyarthrite rhumatoïde (PR)	12 à 32%	4 à 9%
Lupus érythémateux systémique (LES)	23 à 57%	3 à 10%
Diabète de type1 (DID)	30 à 54%	0 à 13%
Sclérose en plaque (SEP)	9 à 20%	0 à 4%

(**Dieudé, 2009**)

La majorité des MAI sont polygéniques et associées à de multiples loci. Parmi les gènes candidats, on retrouve les gènes du système Human Leukocyte Antigen (HLA) et les gènes qui codent pour les protéines qui interviennent dans les réponses immunitaires (les protéines du complément, cytokines, facteurs de transcriptions, récepteurs membranaires...)

1. 1. Les gènes HLA

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comprend une famille des gènes très polymorphes qui codent pour les molécules HLA de classe I et II. L'association entre le système HLA et les MAI est reconnue, le **tableau II** ci-dessous montre quelque exemple de ces associations. Les gènes HLA codent pour des protéines présentes à la surface des cellules et forgent l'identité biologique de l'individu.

Tableau II : Principales associations HLA-MAI

MAI	Gènes HLA	Références
PR	DR4	(Weill, Batteux 2003)
DID	DR3 et DR4	(Weill, Batteux 2003)
LES	DR3	(Michel, 2000)
Sclérodemie Systémique (ScS)	DR3 et DR4	(Sibilia, 2004)

1. 2. Les gènes non HLA

Les gènes HLA à eux seuls n'expliquent pas la maladie, d'autres gènes ont été incriminés comme facteurs favorisant le développement de la maladie chez des sujets prédisposés génétiquement. Voir quelque exemple dans le **tableau III**.

Tableau III : Principaux facteurs de susceptibilité génétique non HLA impliqués dans la détermination de certaines maladies auto-immune

MAI	Gènes
PR	IRF5, STAT4, PTPN22, TRAF1,
LES	IRF5, STAT4, PTPN22, BANK1, BLK,
syndrome de Gougerot sjögren	IRF5, STAT4
sclérodémie systémique	IRF5, STAT4, PTPN22, BANK1, BLK

(Dieudé et Dawidowicz, 2010)

Des polymorphismes d'un grand nombre de gènes non-HLA répertoriés à ce jour, ont été associés aux MAI. Ce sont des gènes qui codent pour des protéines intervenant dans la réponse immunitaire telles que les gènes qui codent pour des facteurs de transcription : STAT4 et IRF5 (Dieudé et Dawidowicz, 2010).

III. L'immunogénétique

L'étude de la génétique du système immunitaire, désignée par le terme « Immunogénétique », a considérablement bénéficié des nouveaux développements, ce qui a permis d'identifier les gènes responsables de la synthèse des substances et molécules qui interviennent dans les défenses immunitaires et anti-tumorales (Jorde et al., 2004).

L'un des procédés d'immunogénétique qui a permis d'étudier l'association entre différentes maladies et les gènes en relation est l'étude des « Single nucleotide polymorphism » (SNP) des gènes concernés.

Rappel : Le polymorphisme ponctuel ou singular nucleotide polymorphisme (SNP)

Les SNPs sont des polymorphismes bi-alléliques correspondant à un changement nucléotidique :

La variation nucléotidique est appelée non-synonyme si elle entraîne une modification secondaire de la protéine. Par ailleurs, un SNP est dit fonctionnel si la fonction de la protéine codée résultante en est modifiée (Allonore et Boileau, 2011). Cette forme courante de polymorphisme se rencontre environ toutes les 1 000 bases dans le génome humain. Si ces variations sont silencieuses, ou à l'origine de nos différences morphologiques, elles peuvent aussi être à l'origine de maladies génétiques, ou de prédispositions à des maladies.

IV. Les gènes étudiés

Les gènes *STAT4* et *IRF5* codent tous deux pour des protéines qui portent leurs noms respectivement, ce sont des facteurs de transcriptions qui ont la particularité de posséder plusieurs domaines. Certains domaines participent à la liaison avec l'ADN tandis que d'autres sont plutôt impliqués dans la régulation génique en induisant la synthèse des protéines. Ces domaines de régulation permettent ainsi d'augmenter ou de diminuer la transcription de la protéine codée par un gène (**Morel et al., 2004**).

Le choix de ces gènes a porté par leur importante implication dans l'induction des MAI.

IV. 1. Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT4)

La protéine *STAT4* est un membre de la famille des « *STATs* » qui compte les : *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5a*, *STAT5b*, *STAT6*. Ces protéines sont à la fois des molécules de signalisation et des facteurs de transcription cytosolique.

Certains *STATs* ont relativement une expression ubiquitaire, tant dis que *STAT4* semble avoir une expression restreinte (**Zhong et al., 1994**).

1. 1. Le gène

Le gène *STAT4* est localisé sur le bras long(q) du chromosome 2 entre les deux positions 32.2 et 32.3, en contiguïté du gène *STAT1*. Il contient 24 exons et s'étend sur une région de 122 kb. (Figure 01).

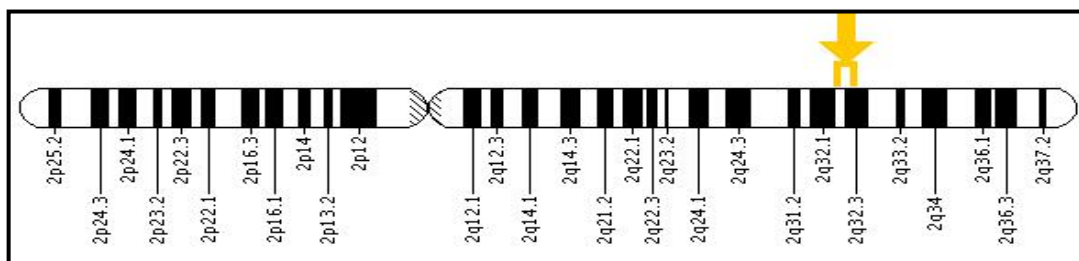


Figure 01 : Représentation schématique de la localisation du gène *STAT4* sur chromosome 2

1.2. La protéine

Le gène *STAT4* code pour la molécule *STAT4*. C'est une protéine de 748 acide aminés, exprimée dans les cellules myéloïde, le thymus et le testicule (**Zhong et al., 1994**).

Elle agit comme facteur de transcription impliqué dans la transduction du signal des cytokines : IL-23 et IL-12 ainsi que les interférons de type 1. La molécule *STAT4* est impliquée dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes Th1 capables de produire des cytokines spécifiques qui stimulent d'autres cellules immunitaires (**Romagnani, 2004**).

La protéine STAT4 comme toute la famille des STAT, est composée de quatre motifs fonctionnels : (Figure 02)

- Le motif CC : « coiled-coil », la partie enroulée.
- Le motif DBD : domaine de liaison à l'ADN.
- Le motif SH2 : domaine SRC-homologie.
- Le motif Tyr : résidu tyrosine (site de phosphorylation).

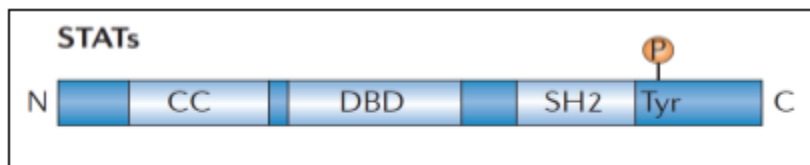


Figure 02: Représentation schématique de la protéine STAT (Reich et Liu, 2006).

1.3. La voie de signalisation

La principale voie de signalisation pour la différenciation Th1 est la voie de :

➤ L'IL12/STAT4

La protéine STAT4 est un facteur de transcription essentiel à la régulation de la réponse inflammatoire, elle est activée sous la stimulation des cytokines telles que l'IL-12, IL-23 ou l'IL-17 (Jacobson et al., 1995) et conduit à l'expression de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la différenciation et la prolifération des cellules Th1 et les Th17.

En effet, la fixation de l'IL-12 sur son récepteur (IL-12R) provoque des changements de conformation de la partie cytoplasmique du récepteur ce qui va initier l'activation et la phosphorylation des kinases qui lui sont associés Jak1 et Tyk2 de la famille des Janus kinase (JAK).

Ces kinases phosphorylent une tyrosine du récepteur IL-12R β 2, ce qui va permettre le recrutement et la fixation de STAT4 par son domaine SRC-homology (SH2).

La phosphorylation de STAT4 permet sa dimérisation et sa translocation du cytoplasme vers le noyau ou encore augmente son affinité pour l'ADN par modification de sa conformation. Le dimère se fixe sur le promoteur de gènes cibles, comme celui de l'IFN- γ , et les active (Figure 03) (Jacobson et al., 1995).

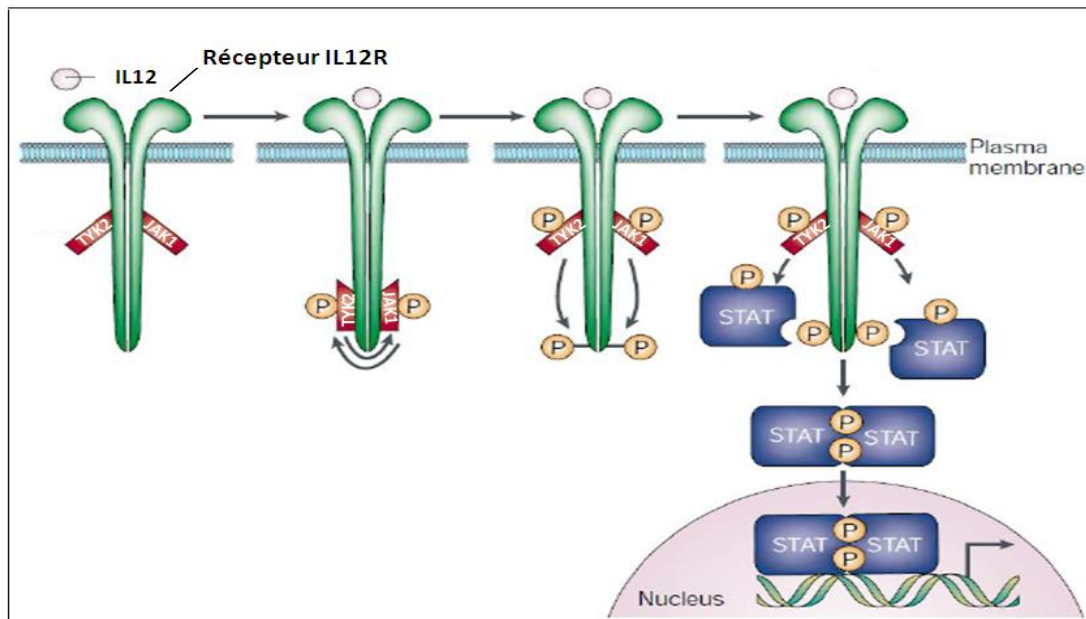


Figure 03 : Voie de signalisation de l'interleukine 12 via la molécule STAT4 (Levy et Darnell, 2002).

1.4. Le rôle physiopathologique

Le SNP du gène STAT4 rs7574865 est situé dans le troisième intron du gène en position: 191964633, caractérisé par le changement du nucléotide G dit « sauvage » par le nucléotide T « muté ».

Toutefois, les conséquences fonctionnelles et les mécanismes physiopathologiques de ce SNP restent incompris. Des études suggèrent que cette variante de STAT4 peut avoir un rôle clé présumé dans le développement de plusieurs MAI comme la PR, SGs, LES, ScS, probablement en raison de défauts de signalisation qu'il provoque dans la voie de l'IL-12 (Zervou et al., 2008).

Exemple

Dans la ScS il est possible que le niveau élevé de l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-17 conduise à l'augmentation et à la prolongation de l'activation de la voie STAT4 dû à la variante génétique rs7574865. Ainsi STAT4 pourrait provoquer une réponse inflammatoire soutenue avec l'expression et l'infiltration de LT pro-inflammatoires dans la peau et les organes internes des patients (Rueda et al., 2009). Cependant, les mécanismes par lesquels ce facteur de transcription peut conduire à l'élaboration de la ScS sont encore mal connus.

Néanmoins, pour comprendre comment STAT4 influe sur le développement des MAI, des études fonctionnelles sont nécessaires afin d'identifier quelles sont les variantes causales qui peuvent influencer l'activité ou l'expression de la protéine STAT4.

IV. 2. Interferon-Regulatory Factor 5 (IRF5)

Les interféron-regulatory factor (IRF) sont des facteurs transcriptionnels impliqués dans la signalisation des récepteurs toll-like (TLR) et l'activation des gènes cibles de l'interféron. Ces facteurs de transcription résident dans le cytoplasme sous forme inactive et sont transloqués dans le noyau après stimulation.

Actuellement, neuf IRF ont été identifiés, et il a été correctement établi que l'IRF-1, IRF-2, IRF3, IRF-4, IRF-7 et IRF8 jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire (**Taniguchi, Ogasawara et al., 2001**). Tandis que l'IRF5 participe à l'activation des gènes de l'IFN- α et l'IFN- β .

2. 1. Le gène

Le gène IRF5 est localisé sur le bras long(q) du chromosome 7 en position 32 (7q32). Il contient 20 exons et s'étend sur une région de 122 kb. (Figure 04).

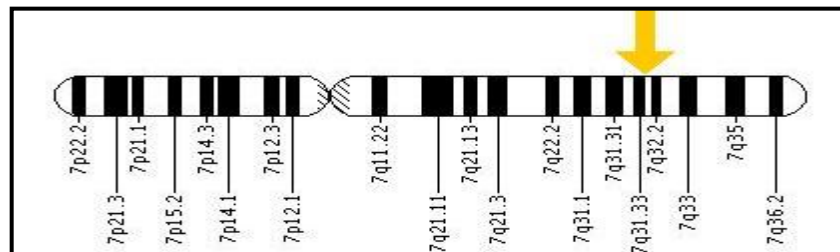


Figure 04: Représentation schématique de la localisation du gène IRF5 sur le chromosome 7.

Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, l'IRF5 est transcrit en 4 isoformes distinctes (V1, V2, V3 et V4), alors que 2 isoformes supplémentaires V5 et V6 sont retrouvés dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) (**Mancl et al., 2005**). Les isoformes V1, V2 et V3 d'IRF5 possèdent chacun l'exon 1 non codant.

2. 2. La protéine

Le gène IRF5 code pour l'interféron-regulatory factor 5 (IRF5), une protéine de 498 acides aminés, qui agit comme facteur de transcription. Elle a la particularité de posséder un motif de liaison à l'ADN N-terminal, leur permettant ainsi de se fixer sur le promoteur des gènes IFN de type I (IFN- I) (**Escalante et al., 1998**). L'IRF5 est donc impliquée dans la régulation de la voie de signalisation de l'IFN- I.

En effet, des études ont montré que les isoformes d'IRF5 ont des effets différents dans leur capacité à transactiver le gène de l'IFN-I (**Mancl et al., 2005**).

2. 3. Les voies de signalisations

L'activation de l'IRF5 implique la voie de signalisation des Toll-like receptor (TLR), TLR7 et TLR9, se sont des récepteurs cellulaires situés sur les membranes endosomales des cellules immunes : macrophages, cellules dendritiques, LB et LT, neutrophiles, cellules

natural killer (NK), monocytes, éosinophiles et sur quelques des cellules non immunes telles que les fibroblastes, synoviocytes, kératinocytes (Essakalli et al., 2009).

Après fixation avec leurs ligands (ADN ou ARN), les TLR7 et TLR9 recrutent directement et seulement l'adaptateur myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), cette protéine adaptatrice est activée au niveau de son death domaine (DD), elle va interagir avec la famille des protéines kinases IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRAK-M. IRAK4 est la première kinase activée. Une fois phosphorylée, IRAK4 se détache de My88 et interagit avec TNF-receptor-associated factor (TRAF6). Le complexe IRAK4-TRAF6 formé initie la translocation de l'IRF5 qui migre vers le noyau et entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-12 et le TNF α . (Figure 05) (Essakalli et al., 2009).

L'IRF5 par son domaine de liaison à l'ADN localisé dans la partie N-terminale est capable de reconnaître une séquence d'ADN consensus connue comme l'élément de réponse stimulé par l'IFN (ISRE ou IRF-E = *IFN-stimulated response element*) (Taniguchi et al., 2001). La région ISRE se trouve dans le promoteur de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires cibles (Takaoka et al., 2005).

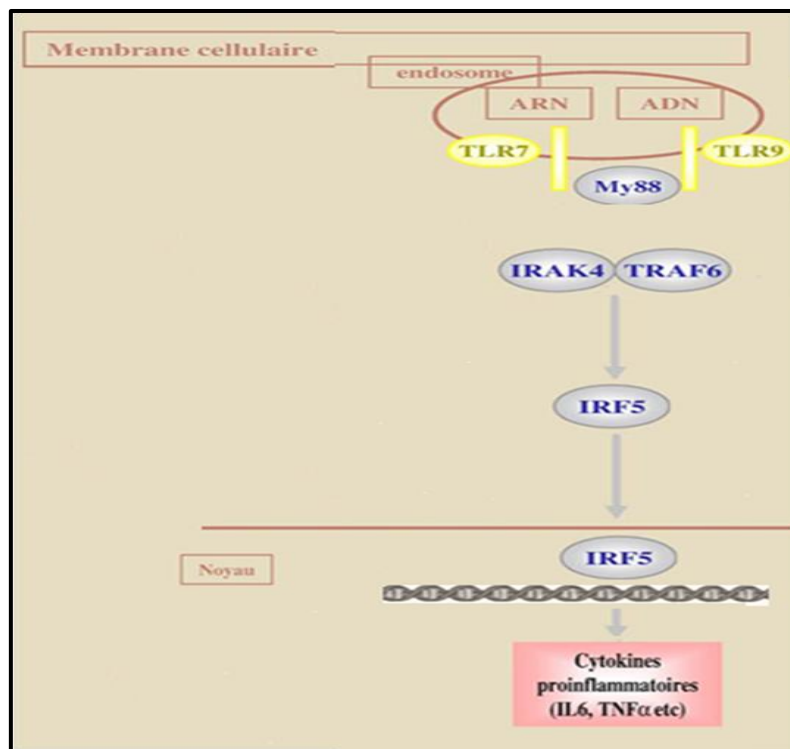


Figure 05 : Schéma représentatif de voie de signalisation de l'IRF5 via le TLR7 et TLR9 (Miyaji et al., 2011).

2. 4. Le rôle physiopathologique

Le facteur de transcription IRF-5 est à ce jour l'IRF plus étudiés en termes de pathologies inflammatoires et auto-immunes. Plusieurs SNP de ce gène (IRF5) ont été identifiés. Dans notre étude nous nous sommes intéressés au polymorphisme rs2004640 IRF5 (G/T) en position 128578301. L'allèle T de ce polymorphisme est situé sur l'intron 1 à deux paires de bases de l'exon 1b, il crée ainsi un site d'épissage dans l'intron 1 résultant en la transcription d'un exon 1B alternatif l'expression de multiple variant d'IRF5 (**Graham et al., 2006 ; Kozyrev et al., 2007**). (Figure 06)

Ce qui fait, que les transcrits de cet exon peuvent former différentes protéines d'IRF5 qui peuvent avoir des effets différents sur les voies de signalisation. En effet, des études ont montré que les isoformes d'IRF5 (protéines) ont des effets différents dans leur capacité à transactiver le gène de l'IFN- α (**Mancl, Hu et al., 2005**).

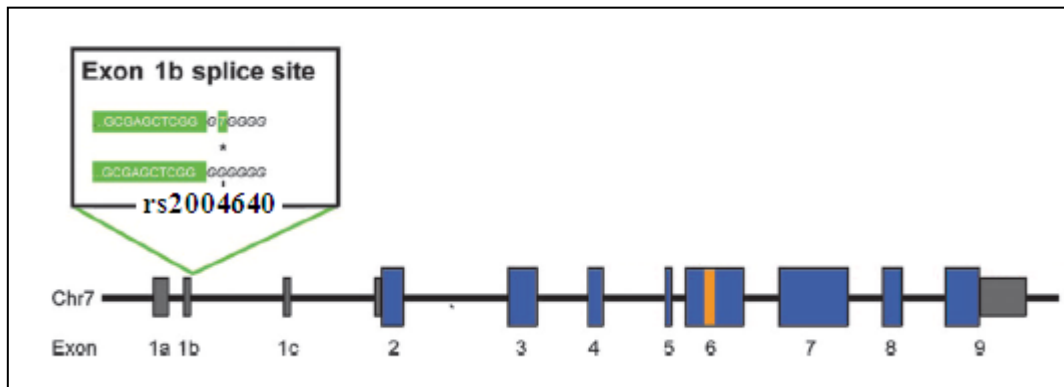


Figure 06 : Représentation schématique du gène d'IRF5. Le SNP rs2004640 crée un site d'épissage au niveau de l'exon 1b (**Graham et al., 2007**)

D'autre part ce SNP conduit à une expression plus importante de l'ARNm d'IRF5 et augmente sa durée de vie, ce qui permet une traduction continue de l'ARNm et l'augmentation du taux des protéines IRF5. (**Graham et al., 2006**).

Les premières études montrant le rôle d'IRF5 dans une MAI se rapporte au LES (**Sigurdsson, et al. 2005**). Il a été associé également à d'autres maladies auto-immunes telles que : la PR (**Sigurdsson et al. 2007**), sSG (**Miceli-Richard et al. 2007**), ScS (**Dieude et al., 2009**).

Exemple :

Le LED est caractérisé par la présence d'anticorps contre les antigènes nucléaires dans le cas physiologique normal, lors de la mort cellulaire, les débris nucléaires sont phagocytés par les macrophages sans stimulation du système immunitaire. Tandis, que dans la physiopathologie du LED cette tolérance vis-à-vis des débris nucléaires est perdue. Le mécanisme de cette tolérance n'est pas élucidé. (**Essakalli et al., 2009**).

Toute fois, un mécanisme peut être envisagé :

Les débris nucléaires (ARN viral ou ADN étranger) générés par la mort cellulaire sont fixés par des auto-anticorps formant des complexes immuns. Ce complexe se lie aux cellules dendritiques par le fragment Fc des immunoglobulines. Après phagocytoses, l'ARN active le TLR7 et l'ADN le TLR9, cela entraîne l'activation du variant défaillant d'IRF5 rs2004640 qui diminue la production des cytokines pro-inflammatoires et augmente celle de l'IFN de type I (IFN- α). (Essakalli et al., 2009).

IV. 3. L'association des les deux gènes :

Ces facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans le développement, la différenciation et la fonction du système immunitaire. Ils sont les deux impliqués dans la voie de l'INF type I (Dieudé et al., 2010).

Dans le LES, les auto-anticorps anti-ADN forme un complexe immuns avec les acide nucléique du soi, ces complexe sont reconnus par les cellules dendritiques par leurs fragment Fc résultant en l'activation des des TLR7 et TLR9 endosomal et la transcription du gène de IFN- α par l'intermédiaire du variant à risque IRF5, il s'en suit la production et le relargage de l'IFN- α , ce dernier ce lie au récepteur de l'IFN de type I (IFN-I R) des monocytes (les LT) où le variant à risque STAT4 est hypersensible à l'IFN- α , il s'en suit une surexpression des gènes cibles tel que l'IFN- γ (Kariuki et al., 2009). (Figure 07)

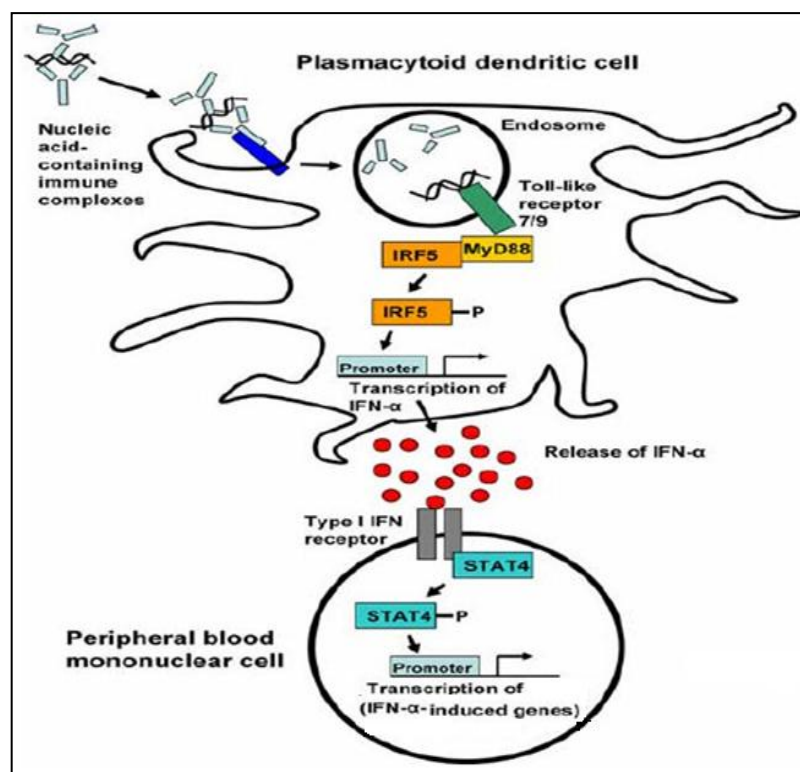


Figure 07 : L'implication des gènes STAT4 et IRF5 dans la susceptibilité du LES (Kariuki et al., 2009)

Conclusion

Au niveau du gène STAT4 rs75746865, les résultats ont montré une prédominance de l'allèle sauvage **G (80%)**, tandis que pour le gène IRF5 rs2004640 une légère prédominance non significative de l'allèle muté T (**55%**). à été noté.

Nos résultats serviront de contrôle pour d'éventuelles études « Cas-témoins » de maladies auto-immunes. Ce travail ouvre aussi une porte sur une étude d'association de plusieurs gènes de susceptibilité à ces Maladies

Et espérons qu'ils pourraient servir d'une source de données pour établir un registre international contenant les fréquences alléliques et génotypiques de plusieurs polymorphismes des gènes codant pour des molécules impliqués dans les voies de signalisation des MAI.

REFERENCES

- Abbas A.K., Lichtman A.H., 2009.** "Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique". 3^{ème} Edition ELSEVIER MASSON SAS, PP : 3-4.
- Allonore Y., Boileau C., 2011.** "Génétique et physiopathologie de la sclérodermie systémique". Bull. Acad Natle Méd.; 195(1) : 55-67.
- Bouزيد D., Fourati H., Amouri A., Marques I., Abida O., Haddouk S., Ben Ayed M., Tahri N., Penha-Gonçalves C., Masmoudi H., 2011.** "The CREM gene is involved in genetic predisposition to inflammatory bowel disease in the Tunisian population". Human Immunology ; 72 : 1204-1209.
- Cham C.M., Ko K., Niewold T.B., 2012.** "Interferon Regulatory Factor 5 in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus". Review Article: Clinical and Developmental Immunology ; ID 780436.
- Dieudé P., 2009.** "Rhumatismes: environnement et génétique". Revue du Rhumatisme ; 76 : 937-943.
- Dieudé P., Dawidowicz K., 2010.** Déterminisme des pathologies auto-immunes : facteurs génétiques et environnementaux, Revue du rhumatisme monographies ; 77: 283-287.
- Dieudé P., Guedj M., Wipff J., Avouac J., Fajardy I., Diot E., Granel B., Sibia J., Cabane J., Mouthon L., Cracowski J. L., Carpentier P. H., Hachulla E., Meyer O., Kahan A., Boileau C., Allanore Y., 2009.** "Association Between the *IRF5* rs2004640 Functional Polymorphism and Systemic Sclerosis". ARTHRITIS & RHEUMATISM ; 60 (1): 225-233.
- Dieudé P., Guedj M., Wipff J., Ruiz B., Hachulla E., Diot E., Granel B., Sibia J., Tiev K., Mouthon L., Cracowski J.L., Carpentier P.H., Amoura Z., Fajardy I., Avouac J., Meyer O., Kahan A., Boileau C., Allanore Y., 2009** "STAT4 Is a Genetic Risk Factor for Systemic Sclerosis Having Additive Effects With *IRF5* on Disease Susceptibility and Related Pulmonary Fibrosis". ARTHRITIS & RHEUMATISM ; 60(8) : 2472-2479.
- Escalante C.R., Yie J., Thanos D., Aggarwal A.K., 1998.** "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation". Nature ; 391(6662) : 103-6.
- Essakalli M., Atouf a O., Bennani N., Benseffaj N., Ouadghiri S., Brick C., 2009.** "Toll-like receptors". Pathologie Biologie ; 57 : 430-438.
- Fourati H., Bouزيد D. Abida O., Kharrat N., Mnif F., Haddouk S., Fesl C., Costa J., Ben Ayed M., Abid M., Rebai A., Penha-Gonçalves C., Masmoudi H., 2012.** "Non-HLA autoimmunity genetic factors contributing to Autoimmune Polyglandular Syndrome type II in Tunisian patients". Human Immunology ; 73 : 740-746.
- Feingold J., 2005.** "Maladies multifactorielles : un cauchemar pour le généticien". Médecine sciences ; 21(11) : 927-933.

REFERENCES

- Graham R.R., Kozyrev S.V., Baechler E.C., Reddy P.L., Plenge R.M., Bauer J.W., Ortmann W.A., Koeth T., González Escriban M.F., The Argentine and Spanish Collaborative Groups, Pons-Estel B., Petri M., Daly M., Gregersen P.K., Martín J., Altshuler D., T.W. Behrens, Alarcón-Riquelme M.E., 2006.** "A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus". *NATURE GENETICS* ; 38 (5) : 550-555.
- Graham R. R., Kyogokuc C., Sigurdsson S., Vlasovac I.A., Daviesa L.R. L., Baechlerc E.C., Plengea R. M., Koethec T., Ortmannc W.A., Homc G., Bauerc J.W., Gillettc C., Burtta N., Cunnighamc D.S., Onofrioa R., Petrig M., Gunnarssonh I., Svenungssonh E., Rönnblomi L., Nordmarki G., Gregersenj P. K., Moserc K., Gaffneyc P.M., Criswellk L. A., Vysef T. J., Syvänen A-C., Bohjanenc P.R., Dalya M.J., Behrensc T.W., Altshuler D., 2007.** "Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus". *PNAS* ; 104 (16) : 6758–6763.
- Gourh P., Agarwal S.K., Divecha D., Assassi S., Paz G., Arora-Singh R.K., Reveille J.D., Shete S., Mayes M.D., Arnett F.C., Tan F.K., 2009.** "Polymorphisms in *TBX21* and *STAT4* Increase the Risk of Systemic Sclerosis: Evidence of Possible Gene–Gene Interaction and Alterations in Th1/Th2 Cytokines". *Arthritis Rheum.* ; 60(12) : 3794–3806.
- Hermann Lessing P., Delmenico S., 2007.** "Une vitesse de sédimentation augmentée". *Forum Med Suisse* ; 7 : 765–769.
- Hu K., Yang P., Jiang Z., Hou S., Du L., Li F., 2010.** "STAT4 polymorphism in a Chinese Han population with Vogt–Koyanagi–Harada syndrome and Behçet’s disease". *Human Immunology* ; 71: 723–726.
- Jacobson N.G., Szabo S.J., Weber-Nordt R.M., Zhong Z., Schreiber R.D., Darnell J.E., Murphy K.M., 1995.** "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4". *J. Exp. Med.*; 181(5) : 1755-62.
- Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J. White R.L., 2004.** "Génétique médicale". *ELSEVIER SAS* ; PP : 223.
- Kariuki S.N., Kirou K.A., MacDermott E.J., Barillas-Arias L., Crow M.K., Niewold T.B., 2009.** "Cutting Edge: Autoimmune Disease Risk Variant of STAT4 Confers Increased Sensitivity to IFN- α in Lupus Patients in Vivo". *J Immunol.* ; 182(1) : 34–38.
- Keyser C. et Petkovsk E., 2006.** "Utilisation des SNP pour l’identification humaine", *SPECTRA ANALYSE* ; (249) : 24-29.
- Khan N.A., 2006.** "Inflammation et immunité : implications dans l’obésité et le diabète de type 2". *OCL.* ; 13(5) : 343-351.

REFERENCES

- Kobayashi S., Ikari K., Kaneko H., Kochi Y., Yamamoto K., Shimane K., Nakamura Y., Toyama Y., Mochizuki T., Tsukahara S., Kawaguchi Y., Terai C., Hara M., Tomatsu T., Yamanaka H., Horiuchi T., Tao K., Yasutomo K., Hamada D., Yasui N., Inoue H., Itakura M., Okamoto H., Kamatani N., Momohara S., 2008. "Association of *STAT4* with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus in the Japanese Population", *ARTHRITIS & RHEUMATISM* ; 58(7) : 1940–1946.
- Kozyrev S.V., Lewén S., Reddy P.M.V.L., Pons-Estel B., the Argentine Collaborative Group, Witte T., the German Collaborative Group, Junker P., Laustrup H., Gutiérrez C., Suárez A., González-Escribano M.F., Martín J., the Spanish Collaborative Group, Alarcón Riquelme M.E., 2007. "Structural Insertion/Deletion Variation in *IRF5* Is Associated With a Risk Haplotype and Defines the Precise *IRF5* Isoforms Expressed in Systemic Lupus Erythematosus". *ARTHRITIS & RHEUMATISM* ; 56(4) : 1234–1241.
- Levy D.E., Darnell J.E., 2002. "Stats: transcriptional control and biological impact". *Nat Rev Mol Cell Biol.* ; 3(9) : 651-62.
- Lamana A., Balsa A., Rueda B., Ortiz A.M., Nunõ L., Miranda-Carus M.E., Gonzalez-Escribano M.F., Lopez-Nevot M.A., Pascual-Salcedo D., Martín J., González-Álvaro I., 2012. "The TT Genotype of the *STAT4* rs7574865 Polymorphism Is Associated with High Disease Activity and Disability in Patients with Early Arthritis". *PLOS ONE* ; 7(8) : 1-8.
- Mancl M.E., Hu G., Sangster-Guity N., Olshalsky S.L., Hoops K., Fitzgerald-Bocarsly P., Pitha P.M., Pinder K., Barnes B.J., 2005. "Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function". *J Biol Chem* ; 280(22) : 21078-90.
- Martinez A., Varadé J., Màrquez A., Cénit M. C., Espino L., Perdigonés N., Santiago J. L., Fernández-Arquero M., De la Calle H., Arroyo R., Mendoza J. L., Fernández-Gutiérrez B., De la Concha E. G., Urcelay E., 2008. "Association of the *STAT4* gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases". *ARTHRITIS & RHEUMATISM* ; 58 (9) : 2598–2602.
- Miceli-Richard C., Comets E., Loiseau P., Puechal X., Hachulla E., Mariette X., 2007. "Association of an *IRF5* Gene Functional Polymorphism With Sjögren's Syndrome". *ARTHRITIS & RHEUMATISM* ; 56 (12) : 3989–3994.
- Michel M., 2000. "Médecine thérapeutique". *Lupus* ; 6(7) : 8-522.
- 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.
- Miossec P., 2004. "Pathologies auto-immunes Aspects épidémiologiques, diagnostiques et principes de traitement". *LAREVUE DU PRATICIEN* ; 54 : 2187-2193.

REFERENCES

- Morel J., Miossec P., Combe B., 2004. "Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde". Encyclopédie Médico-Chirurgicale ; 14-220-A-15
- Morgan A.W., Robinson J.I., Conaghan P.G., Martin S.G., Hensor E.M.A., Morgan M. D., Steiner L., Erlich H.A., Gooi H.C., Barton A., Worthington J., Emery P., 2010. "Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci *HLA-DRB1*, *PTPN22*, *OLIG3/TNFAIP3*, *STAT4* and *TRAF1/C5* in an inception cohort". Arthritis Research & Therapy ; 12(57) : 1-10.
- Nordmark G., Kristjansdottir G., Theander E., Eriksson P., Brun J.G., Wang C., Padyukov L., Truedsson L., Alm G., Eloranta M-L., Jonsson R., Rönnblom L., Syvänen A-C., 2009. "Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome". Genes and Immunity ; 10 : 68–76.
- Nordang G.B. N., Viken M. K., Amundsen S. S., Sanchez E.S., Flatø B., Førre Ø.T., Martin J., Kvien T. K., Lie B. A., 2011. "Interferon regulatory factor 5 gene polymorphism confers risk to several rheumatic diseases and correlates with expression of alternative thymic transcripts". Rheumatology ; 51 : 619-626.
- Palomino-Morales R.J., Diaz-Gallo I-M., Witte T., Anaya J-M., Martín J., 2010. "Influence of STAT4 Polymorphism in Primary Sjögren's Syndrome". The Journal of Rheumatology ; 37(5) : 1016-1019.
- Reich N.C., Liu L., 2006. "Tracking STAT nuclear traffic". Nat Rev Immunol. ; 6(8) : 602-12.
- Remmers E.F., Plenge R.M., Lee A.T., Graham R.R., Hom G., Behrens T.W., De Bakker P.I.W., Le J.M., Lee H-S., Batliwalla F., Li W., Masters S.L., Booty M.G., Carulli J.P., Padyukov L., Alfredsson L., Klareskog L., Chen W.V., Amos C.I., Criswell L.A., Seldin M.F., Kastner D.L., Gregersen P.K., 2007. "STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus". N Engl J Med. ; 357(10) : 977–986.
- Romagnani S., 2004. "Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance". J ALLERGY CLIN IMMUNOL ; 113 (3) : 935-400.
- Rueda B., Broen J., Simeon C., Hesselstrand R., Diaz B., Suárez H., Ortego-Centeno N., Riemekasten G., Fonllosa V., Vonk M.C., Van Den Hoogen F.H.J., Sanchez-Román J., Aguirre-Zamorano M.A., Garcia-Portales R., Pros A., Camps M.T., Gonzalez-Gay M.A., Coenen M.J.H., Airo P., Beretta L., Scorza R., van Laar J., Gonzalez-Escribano M.F., Nelson J.L., Radstake T.R.D.J., Martin J., 2009. "The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype". Human Molecular Genetics ; 18(11) : 2071–2077.
- Sibilia J., 2004. "Sclérodémie systémique : classification, physiopathologie et pronostique". Lettre du Rhumatologue ; (229) : 1-6.

REFERENCES

- Sigurdsson S., Göring H.H. H., Kristjansdottir G., Milani L., Nordmark G., Sandling J. K., Eloranta M-L., Feng D., Sangster-Guity N., Gunnarsson I., Svenungsson E., Sturfelt G., Jönsen A., Truedsson L., Barnes B.J., Alm G., Rönnblom L., Syvänen A-C., 2008.** "Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus". *Human Molecular Genetics* ; 17 (6) : 872–881.
- Sigurdsson S., Nordmark G., Göring H.H. H., Lindroos K., Wiman A-C., Sturfelt G., Jönsen A., Rantapää ahlqvist S., Möller B., Kere J., Koskenmies S., Widén E., Eloranta M-L., Julkunen H., Kristjansdottir H., Steinsson K., Alm G., Rönnblom L., Syvänen A-C., 2005.** "Polymorphisms in the Tyrosine Kinase 2 and Interferon Regulatory Factor 5 Genes Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus". *Am. J. Hum. Genet.* ; 76 : 528–537.
- Sigurdsson S., Nordmark G., Garnier S., Grundberg E., Kwan T., Nilsson O., Eloranta M-L., Gunnarsson I., Svenungsson E., Sturfelt G., Bengtsson A.A., Jönsen A., Truedsson L., Rantapää Dahlqvist S., Eriksson C., Alm G., Göring H.H.H., Pastinen T., Syvänen A-C., Rönnblom L., 2008.** "A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5". *Human Molecular Genetics* ; 17 (18) : 2868–2876.
- Sigurdsson S., Padyukov L., Kurreeman FA., Liljedahl U., Wiman AC., Alfredsson L., Toes R., Rönnelid J., Klareskog L., Huizinga TW., Alm G., Syvänen AC., Rönnblom L., 2007.** "Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* ; 56(7) : 2202-10.
- Taylor K.E., Remmers E.F., Lee A.T., Ortmann W.A., Chao Tian P.R.M., Chung S.A., Nititham J., Hom G., Kao A.H., Demirci F.Y., Kamboh M.I., Petri M., Manzi S., Kastner D.L., Seldin M.F., Gregersen P.K., Behrens T.W., Criswell L.A., 2008.** "Specificity of the STAT4 Genetic Association for Severe Disease Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus". *PLOS Genetics* ; 4(5) : 1-9.
- Takaoka A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano S., Honda K., Ohba Y., Mak T. W., Taniguchi T., 2005.** "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors". *Nature* ; 434(7030) : 243-9.
- Taniguchi T., Ogasawara K., Takaoka A., Tanaka N., 2001.** "IRF family of transcription factors as regulators of host defense". *Annu Rev Immunol* ; 19 : 623-55.
- Tse C., Capeau J., 2003.** "Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel". *Ann Biol Clin* ; 61(3) : 279–293.
- Uccellini L., De Giorgi V., Zhao Y., Tumaini B., Erdenebileg N., E Dudley M., Tomei S., Bedognetti D., Ascierto M.L., Liu Q., Simon R., Kottyan L., Kaufman K. M., Harley J. B., Wang E., Rosenberg S.A., Marincola F.M., 2012.** "IRF5 gene polymorphisms in melanoma". *Journal of Translational Medicine* ; 10:170.
- Weill B., Batteux F., 2003.** "Immunologie et réactions inflammatoires". de boeck. PP 111.

REFERENCES

- Zervou M.I., Goulielmos G.N., Castro-Giner F., Tosca A.D., Krueger-Krasagakis S., 2009.** "STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece". *Human Immunology* ; 70 : 738–741.
- Zervou M.I., Sidiropoulos P., Petraki E., Vazgiourakis V., Krasoudaki E., Raptopoulou A., Kritikos H., Choustoulaki E., Boumpas D.T., Goulielmos G.N., 2008.** "Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population". *Hum Immunol* ; 69(9) : 567-71.
- Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E., 1994.** "Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription". *Proc Natl Acad Sci USA* ; 91(11) : 4806-10.

Présentation des réactifs et solutions utilisés

I. Réactifs des tests du facteur rhumatoïde

I. 1. Réactifs du test au latex

a. Composition et concentration

R1 : Latex sensibilisé par des IgG humaines.

R2 : Contrôle positif (+).

R3 : Contrôle négatif (-).

Plaque de 6 zones.

Baguette à usage unique pour homogénéiser le mélange.

b. Préparation et stabilité

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Les réactifs sont conservés entre 2-8°C et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

c. Mode opératoire

- Mettre une goutte (50µl) de : control (+), sérum et control (-) dans 3 zones différentes de la plaque.
- Rajouter une goutte de réactif de latex dans chaque zone.
- Homogénéiser le mélange à l'aide d'une baguette.
- Effectuer avec la plaque un lent mouvement rotatoire.
- Attendre 2min puis lire les résultats.

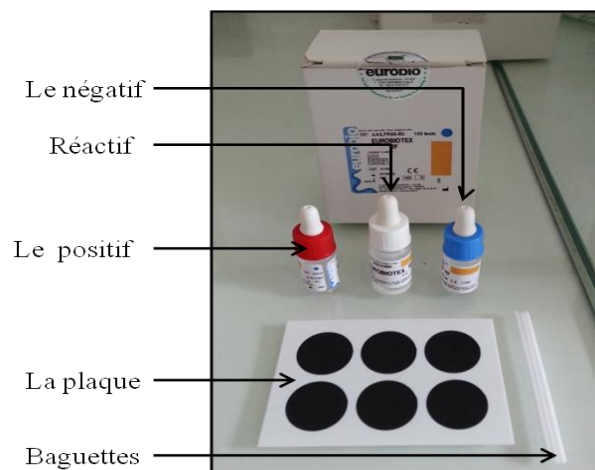


Figure 30 : Présentation du kit utilisé pour la recherche du facteur rhumatoïde.

I. 2. Réactif Waaler-Rose

Le test au Waaler-Rose utilise les mêmes réactifs que le test au latex sauf pour le R1 ce sont des globules rouges de mouton sensibilisés par des IgG de lapin. La stabilité et le mode opératoire sont aussi pareils.

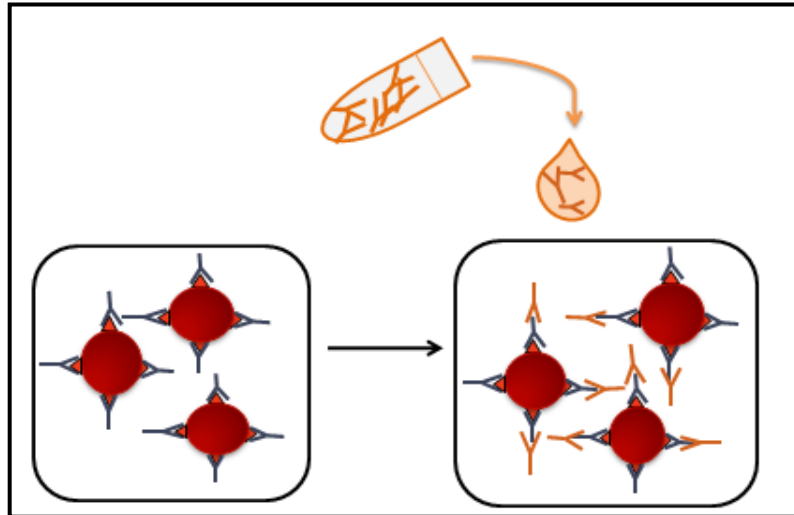


Figure 31 : Réaction d'agglutination à la recherche du FR par le test de Waaler-Rose.

II. Les solutions utiliser pour le salting-out

a. Composition et concentration

SLR : Solution de Lyse des globules Rouges (NH₄Cl, KHCO₃, EDTA)

SLB : Solution de Lyse des globules Blancs (Tris-HCL, NaCl, EDTA)

PK: Protéinase K (20mg/ml)

SDS: Sodium Dodecyl Sulfat (10%)

NaCl : Chlorure de sodium (6M)

Ethanol 100% et 70%

b. Préparation et stabilité

Le SDS et le NaCl sont conservés à température ambiante, les solutions SLR, SLB, PK sont conservées à +4°C et l'Ethanol 100% et 70% sont congelés à -20°C.

III. PCR en temps réel

a. Composition

✓ Le milieu réactionnel

- Master Mix composé de : Désoxyribonucléotides (dNTP), Taq polymérase, Mg²⁺, Tampon.

- Référence SNP (rs) : STAT4 (rs7574865) et IRF5 (rs2004640)

- ADN dilué

- H₂O stérile

- ✓ Microplaque de 96 puits
- ✓ Film adhésif transparent

b. Stabilité

- ✓ Le master mix est conservé à +4°C, les rs sont conservés à -20°C, ils sont stables jusqu'à leur date de péremption indiquée sur leurs paquetages.
- ✓ L'ADN dilué est conservé à +4°C.

c. Mode opératoire

Préparer pour chaque polymorphisme son milieu réactionnel avec le rs correspondant puis déposer délicatement la plaque sur son socle

Mettre dans tous les puits 4.5µl du mélange réactionnel puis rajouter dans chaque puits 1µl d'ADN dilué correspondant à chaque témoin. Le dernier puits de la série ne contient pas d'ADN dilué mais la même quantité en H₂O stérile, ce puits servira de témoin négatif à notre réaction PCR.

Bien seller notre plaque par un film adhésif, cela pour éviter l'évaporation de l'eau lors de l'augmentation de la température pendant la réaction PCR.

Enfin, introduire les informations de la plaque (le nombre, la position de chaque échantillon et le SNP étudié) dans le système informatique du Taqman, par la suite placer la plaque dans le thermocycleur. La durée totale de la réaction est de 90min.

Tableau VIII : Répartition des sujets selon l'âge et le sexe.

Sujet	Homme	Femme	Total
Nombre (n)	143	121	264
Fréquence (%)	54%	46%	100%
Moyenne d'âge	35±10,62 ans		

Tableau IX : Distribution allélique du gène STAT4 dans la population étudiée.

Fréquence allélique	Allèle G	Allèle T
	n (%)	n (%)
	422 (80%)	106 (20%)

Tableau X : Distribution allélique du gène STAT4 chez les Femmes et les Hommes.

Fréquence allélique	Allèle G	Allèle T
	n (%)	n (%)
F	196 (81%)	46 (19%)
H	226 (79%)	60 (21%)
p	0.573	

Tableau XI : Distribution allélique du gène IRF5 dans la population générale étudiée.

Fréquence allélique	Allèle T	Allèle G
	n (%)	n (%)
	291 (55%)	237 (45%)

Tableau XII : Distribution allélique du polymorphisme du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.

Fréquence allélique	Allèle T	Allèle G
	n (%)	n (%)
F	130 (54%)	112 (46%)
H	161 (56%)	125 (44%)
P	0.553	

Tableau XIII : Distribution génotypique du gène STAT4 dans la population étudiée.

Fréquence génotypique	GG	TT	GT
	n (%)	n (%)	n (%)
	169 (64%)	11 (4%)	84 (32%)

Tableau XIV : Distribution génotypique du gène IRF5 dans la population étudiée.

Fréquence génotypique	GG	TT	GT
	n (%)	n (%)	n (%)
	58 (22%)	85 (32%)	121 (46%)

Tableau XV : Distribution génotypique du gène STAT4 chez les deux sexes.

Fréquence génotypique	GG n (%)	TT n (%)	GT n (%)
F	79 (65%)	4 (3%)	38 (32%)
H	90 (63%)	7 (5%)	46 (32%)
P	0.692	0.520	0.895

Tableau XVI: Distribution génotypique du gène IRF5 chez les Femmes et les Hommes.

Fréquence génotypique	GG n (%)	TT n (%)	GT n (%)
F	29 (24 %)	38 (31%)	54 (45%)
H	29 (20%)	47 (33%)	67 (47%)
P	0.471	0.800	0.718

Tableau XVII: La fréquence des sujets portant les deux polymorphismes en même temps.

Génotype homozygote (TT) STAT4 + IRF5	
N (%)	2 (0.76%)

Fiche de renseignements (Témoins)

N° :

Date du prélèvement : .././.....

Nom :

Prénom :

Sexe :

Age :

Région d'origine :

❖ Antécédents :

➤ ATCD personnels :

Arthralgies : oui non Maladie auto-immune : oui non

Si oui, préciser :

➤ ATCD familiaux :

Maladie auto-immune : oui non Polyarthrite rhumatoïde : oui non

Glossaire

Agglutination : Réaction spécifique de défense de l'organisme, caractérisée par le rassemblement en petits amas de globules rouges, de bactéries ou d'autres éléments, en présence de l'anticorps correspondant.

Allèle : Se dit d'une variante d'un gène, tout gène peut avoir plusieurs allèles, qui déterminent souvent l'apparition de caractères héréditaires différents.

Amorce : Courte séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire du début et de la fin d'une région à amplifier, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase.

Amplicon : Fragments d'ADN synthétisés par une technique d'amplification.

FAM : C'est une carboxy-fluorescéine un colorant fluorescent le plus commun pour le marquage de biomolécules, il est utilisé comme un fragment rapporteur dans les sondes TaqMan.

Fluorophore : Molécule possédant la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission).

Lupus érythémateux systémique : Maladie auto-immune non spécifique d'organe, caractérisée par l'association de manifestations cliniques protéiformes et par la production d'une grande variété d'auto-anticorps.

PCR en temps réel : Méthode de PCR en temps continu (mesure continue du produit d'amplification).

Polyarthrite rhumatoïde : Atteinte inflammatoire et relativement symétrique d'au moins trois articulations, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations.

Quencher : Entité moléculaire qui désactive un état excité d'une autre entité moléculaire, par transfert d'énergie, transfert d'électron ou par mécanisme chimique.

Sclérodermie systémique : C'est une maladie du collagène, caractérisée par des lésions du tissu conjonctif des téguments et des viscères : en particulier la peau se durcit et se sclérose.

Syndrome de Gougerot sjögren : Exocrinopathie auto-immune fréquente qui peut être soit isolée et primitive ou secondaire à une autre maladie auto-immune.

VIC : Fluorophore de couleur vert extrait à partir de l'espèce *Aequorea victoria* c'est une méduse bioluminescente.