

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFIQUE

Université Blida -1-



Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

## *Mémoire De Fin D'Etude*

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II en Biologie  
Option : Génétique-Physiologie

Thème :

# **Polymorphisme des gènes de cytokines pro et anti-inflammatoires dans les thyroïdites auto-immunes**

Présenté par : M<sup>lle</sup> ABERKAN Djawhar

Soutenance prévue le : 19 Mai 2016

Devant le jury :

Présidente :	M <sup>me</sup> . EDDAIKRA A.	MAA	USDB1
Promotrice :	Dr. ZAABAT N.	MAA	IPA
Co-promotrice :	Pr. ACHIR S.	MCA	CPMCA
Examinatrice :	M <sup>me</sup> . KESKAS S.	MAA	USDB1

Promotion 2014 – 2015

## Remerciements

Je remercie Dieu, le Tout Puissant, qui nous à donné santé, courage et patience pour mener à bien ce modeste travail.

Je remercie Pr ATTAL N. le chef de département d'immunologie à l'Institut Pasteur, pour m'avoir accepté au sein de son département.

Je remercie vivement ma promotrice, Dr. ZAABAT N. Maitre-assistant A en Immunologie, à l'Institut Pasteur d'Algérie, d'avoir accepté de m'encadrer et pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, ses précieux conseils, sa disponibilité, sa patience, son encouragement, sa sympathie et pour le temps qu'elle a bien consacré.

Je remercie également ma co-promotrice Pr ACHIR S. Maitre de conférence A en endocrinologie au niveau du CPMC Alger, pour ses conseils, son encouragement, son temps, et son aide.

Je remercie Pr MIMOUNI S. pour m'avoir accepté au sein de son service et m'avoir assuré toutes les conditions afin que je puisse recruter les patients dans des meilleures conditions.

Je rends hommage à Mme EDDAIKRA A. Maitre-assistant A, dont j'ai été l'élève pendant deux ans. Je la remercie pour sa participation et sa présidence de ce jury.

Je tiens aussi à remercier Mme KESKAS S. Maitre-assistant A, d'avoir accepté de participer au jury de ce PFE et d'évaluer ce travail.

Je remercie vivement Pr SALAH SS. pour m'avoir donné des témoins afin que je puisse effectuer mon PFE.

Je remercie Dr MANSOURI A. du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA), pour son aide, ses conseils et sa patience.

Ce mémoire a été effectué au sein de l'Institut Pasteur à Dely brahim. Je tiens à adresser mes vifs remerciements à son directeur général.

Je remercie Mr AISSOU A, Technicien principale à l'unité d'hormonologie à l'institut pasteur d'Algérie pour son aide et son encouragement.

Je remercie tout le personnel de l'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier les biologistes, les résidentes et le résident du département d'Immunologie, pour leur aide durant la période de ma formation. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux.

Enfin, je remercie profondément tous les enseignants qui m'ont encouragé et soutenu pendant mon cursus.

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- ✓ A mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, Vous avez tout sacrifié pour vos enfants. « Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance .Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière ».
- ✓ A mes frères et sœurs, pour leur soutien et leurs encouragements.
- ✓ A toute ma famille, grand père et grand mère maternelle, grand mère paternelle, tantes, oncles, cousins et cousines.
- ✓ A tous mes ami(e)s que j'adore, pour leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.
- ✓ A mon amie « Manissa »pour tous les moments de délire, de stress, de joie passés ensemble.
- ✓ A tous les intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Djawhar

## Résumé

La thyroïdite de Hashimoto et la maladie de graves (Basedow) sont des maladies auto-immunes de la thyroïde et elles sont plus fréquentes chez le sexe féminin. Le mécanisme physiopathologique implique des facteurs environnementaux et plusieurs facteurs génétiques de susceptibilité. De nombreuses études ont été réalisées pour trouver une éventuelle association entre les polymorphismes génétiques et le développement des MAIT. Dans ce cadre, nous nous sommes proposé d'étudier le polymorphisme des gènes de cytokines (TNF- $\alpha$ , l'INF- $\gamma$ , l'IL-6, IL-10 et le TGF- $\beta$ 1) dans les thyroïdites auto-immunes. L'étude a concerné 42 patients (27 patients atteints de la thyroïdite de Hashimoto et 15 patients atteints de la maladie de Basedow) et 35 sujets apparemment sains. Cette étude a été effectuée par la technique de PCR-SSP « Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers ». On note au vu des résultats, que l'allèle 'C' en position (-819 T/C), (-592A/C) dans le gène de l'IL-10 est plus fréquent chez les patients surtout chez les patients atteints de GD par rapport aux témoins avec un OR=3,84, et la fréquence des patients génotypés comme étant homozygotes pour l'allèle 'C' prédisposant à la maladie (GD) au niveau de polymorphisme étudié, est significativement plus élevée par rapport aux témoins (73,33% versus 31,43%). La comparaison entre les fréquences selon le sexe a montré que le polymorphisme (-308A/G) du gène TNF-A pour la fréquence génotypique hétérozygote 'AG' semble être facteur de risque chez les hommes malades avec un OR= $\infty$ . Par contre, la comparaison des fréquences dans le polymorphisme (+874 T/A) du gène d'IFN-G est statistiquement significative chez le sexe féminin dont l'allèle 'A' prédispose aux MAIT et l'allèle 'T' protège contre la maladie et aussi la sécrétion élevée du TGF- $\beta$ 1 augmente le risque de développer une thyroïdite auto-immune (OR=3,73). Dans notre population, les patients atteints de TH expriment une forte expression du TNF- $\alpha$  en position (-308A/G). En conclusion, nos résultats suggèrent que le polymorphisme en position (-308A/G) du gène TNF-A semble être associé au développement des thyroïdites auto-immunes en particulier la thyroïdite de Hashimoto. Tandis que, le polymorphisme en position (-819T/C) et (-592A/C) du gène de l'IL-10 peut être un facteur de risque pour la maladie de Basedow. En plus, les polymorphismes (10T/C), (25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 et (+874T/A) pour le gène d'IFN-G sont liés aux thyroïdites auto-immunes chez le sexe féminin dans notre population analysée.

**Mots clés :** Polymorphisme, Thyroïdite de Hashimoto, Maladie de graves (Basedow), cytokines pro-inflammatoires, cytokines anti-inflammatoires, PCR-SSP.

## Abstract

Hashimoto's thyroiditis and Graves disease are specific autoimmune thyroid disease and they are more frequent in the female sex. The pathophysiological mechanism involves several environmental factors and genetic susceptibility factors. Many studies have been conducted to find any association between genetic polymorphisms and development of MAIT. In the context of our study on the polymorphism of cytokine genes (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$ 1) in autoimmune thyroiditis, a population 42 patients (27 patients with Hashimoto's thyroiditis and 15 patients with Graves' disease) are selected and compared with 35 apparently healthy subjects. This study was performed by PCR-SSP technique "Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers".

According to our results, the allele 'C' in (-819 T / C), (-592A / C) in the gene for IL-10 is more common in patients especially in patients GD compared to controls with an OR = 3.84, and the frequency of patients genotyped as homozygote for the C allele predisposes to disease (GD) of the studied polymorphism was significantly higher compared to healthy controls (73,33% versus 31.43). The comparison between the frequencies by gender has shown that the polymorphism (-308A / G) TNF-A gene for genotype frequency heterozygous AG 'seems to be a risk factor in patients with OR = men to the infinite. On the other hand, comparison of frequencies polymorphism (+874 T / A) IFN-G gene is statistically significant in females whose allele predisposes to MAIT and the T allele protects against disease and also high secretion of TGF- $\beta$ 1 increases the risk of developing autoimmune thyroiditis (OR = 3.73). In our population, patients with TH express a high expression of TNF- $\alpha$  in position (-308A / G). In conclusion, our results suggest that the polymorphism at position (-308A / G) TNF-A gene seems to be associated with the development of autoimmune thyroiditis in particular Hashimoto's thyroiditis. While, the polymorphism at position (-819T / C) and (-592A / C) of the gene of IL-10 may be a risk factor for Graves' disease. In addition, polymorphisms (10T / C), (25C / G) of TGF- $\beta$ 1 gene and (+ 874T / A) for IFN-G gene are linked to autoimmune thyroiditis in females in our population analyzed.

**Keywords:** Polymorphism, Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, PCR-SSP.

## ملخص

التهاب الغدة الدرقية هاشيموتو ومرض جريفز ( بازدو) أكثر أمراض التهاب الغدة الدرقية للمناعة الذاتية وهي أكثر انتشارا عند النساء.

الآلية الفيزيولوجية لتطور هذه الأمراض تستلزم توفر عدة عوامل أبرزها العوامل البيئية وعوامل وراثية أجريت العديد من الدراسات بهدف إيجاد علاقة بين تعدد الأشكال للجينات الوراثية وتطور أمراض الغدة الدرقية للمناعة الذاتية.

في هذا الإطار أننا نقترح دراسة تعدد أشكال الآليات داخل المورثات الخاصة بالسيتوكينات (  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $INF-\gamma$ ,  $TGF-\beta$ ,  $IL-10$ ) في الغدة الدرقية للمناعة الذاتية .

الدراسة شملت 42 مريضا ( 27 مريضا مصاب بالتهاب الغدة الدرقية هاشيموتو و15 مريضا يعانون من مرض جريفز و35 شخصا بصحة جيدة.

أجريت هذه الدراسة باستخدام Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers PCR-SSP

وفقا لنتائجنا الأليل « C » في مستوى الجين IL-10

أعلى بكثير عند المرضى خاصة المرضى المصابين بمرض جريفز مقارنة مع الأصحاء المهيب للمرض ( مرض جريفز) من تعدد الأشكال « CC » ونسبة المرضى المحددين كمتماثلين الأليل المدروسة هو أعلى بكثير مقارنة بتلك الموجودة عند الأصحاء 73,33 بالمئة مقابل 31,43 بالمئة ) وأظهر المقارنة بين النسب عند الجنسين أن تعدد الأشكال عند في حين من أجل تردد النمط الغير الأليل يبدو أنه يمثل أحد عوامل الخطر لدى الرجال المرضى على عكس ذلك، مقارنة النسب متماثلا عند تعدد الأشكال في حين هي ذات دلالة إحصائية لدى جنس النساء. فيما يخص الأليل الذي يهيب الأمراض التهاب الغدة الدرقية للمناعة الذاتية

في دراستنا المرضى المصابين بمرض التهاب الغدة الدرقية هاشيموتو يعبرون عن إنتاج عال من عند

TNF- $\alpha$  عند 308A/G

في الختام تشير نتائجنا إلى تعدد الأشكال عند في بعض الجينات قد يكون أحد عوامل الخطر لمرض جريفز

زيادة على ذلك تعدد الأشكال ظهر عند بعض الجينات مرتبط بالتهاب الغدة الدرقية للمناعة الذاتية عند النساء في مجموعتنا المدروسة .

**كلمات مفتاحية:** تعدد الأشكال ، التهاب الغدة الدرقية هاشيموتو مرض جريفز ، السيتوكينات المساعدة للالتهابات ، السيتوكينات المضادة للالتهابات

## Sommaire

Introduction	
générale.....	1
<b>Chapitre I : Rappels bibliographiques.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Système thyroïdien.....</b>	<b>2</b>
1.1. La Glande thyroïde.....	2
1.2. Les hormones thyroïdiennes .....	2
1.2.1. La composition des hormones thyroïdiennes.....	3
1.2.2. La thyroglobuline.....	3
1.2.3. L'Iode.....	3
1.2.4. La thyroperoxydase.....	4
1.3. La biosynthèse des hormones thyroïdiennes .....	4
1.4. Rôle de la thyroïde .....	6
<b>2. Thyroïdites auto-immunes.....</b>	<b>7</b>
2.1. Définitions.....	7
2.1.1. La maladie de Graves (Maladie de Basedow) .....	7
2.1.2. La thyroïdite de Hashimoto.....	7
2.2. Les symptômes des Thyroïdites auto-immunes.....	8
2.3. Etiologie.....	9
2.3.1. Facteurs endogènes.....	9
2.3.2. Facteurs d'environnementaux.....	10
2.3.3. Facteurs de susceptibilité génétique.....	11
2.4. Thyroïdites auto-immunes.....	14
2.4.1. Marqueurs de l'auto-immunité antithyroïdienne.....	14
2.4.2. Physiopathologie des maladies auto-immunes de la thyroïde.....	16
<b>3. Cytokines et thyroïdites auto-immunes.....</b>	<b>19</b>
3.1. Définition des cytokines.....	19
3.2. Participation des cytokines à la pathogénèse des thyroïdites auto-immunes.....	20
3.3. Polymorphisme des gènes de cytokines pro et anti-inflammatoires dans les MAIT.....	21
3.3.1. Gènes des cytokines pro-inflammatoires.....	21
3.3.2. Gènes des cytokines anti-inflammatoires.....	23
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes.....</b>	<b>25</b>

1. Matériels.....	25
1.1. Témoins.....	25
1.2. Patients.....	25
1.2.1. Caractéristiques démographiques de la cohorte : Age et sexe.....	26
1.3 Matériel biologique.....	27
1.4 Matériel et appareillages.....	27
2. Méthodes .....	27
2.1Extraction d'ADN par méthode saline (“Salting_out”) .....	28
2.1.1 Principe .....	28
2.1.2 Mode opératoire .....	28
2.2. Géotypage des cytokines par PCR-SSP.....	29
2.2.1 Principe .....	29
2.2.2 Mode opératoire .....	29
2.3.Dosage des hormones et les anticorps thyroïdiens par Chimiluminescence.....	33
2.3.1Matériel biologique.....	33
2.3.2Matériel non biologique.....	33
3. Analyse statistique .....	36
<b>Chapitre III : Résultats.....</b>	<b>37</b>
2. Dosage hormonaux et dosage des anticorps spécifiques de la thyroïde.....	37
2. Etude du géotypage des cytokines (IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, et TGF- $\beta$ 1) dans les thyroïdites auto-immunes.....	37
2.1. Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et témoins.....	37
2.2. Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et témoins selon le sexe.....	41
2.3. Comparaison selon la maladie entre les fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques.....	47
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>52</b>
Conclusion.....	60
Références bibliographiques	



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : l'emplacement de la glande thyroïdienne .....	2
<b>Figure2</b> : Structure des dérivés tyrosyles mono et di-iodés (MIT et DIT) et des hormones thyroïdiennes iodées.....	3
<b>Figure 3</b> : la synthèse des hormones thyroïdiennes.....	5
<b>Figure 4</b> : Les différents facteurs impliqués dans le développement de MAI.....	14
<b>Figure 5</b> : Cartographie chromosomique de 6p21.3, contenant la région du <i>HLA</i> de classe II.....	12
<b>Figure 6</b> : Pathogénie des thyroïdites auto-immunes.....	16
<b>Figure 7</b> : La pathogénèse de la Thyroïdite de Hashimoto et la Maladie de Basedow.....	19
<b>Figure 8</b> : Répartition des patients en fonction du sexe .....	26
<b>Figure9</b> : Histogramme représentatif de répartition des patients en fonction des classes d'âge.....	26
<b>Figure10</b> :Modèle d'une plaque du PCR-SSP.....	30
<b>Figure11</b> : Exemple d'un résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose par PCR-SS.....	32

## Liste des tableaux

<b>Tableau1</b> : Classification clinique des maladies thyroïdiennes auto-immunes.....	8
<b>Tableau 2</b> : Gènes associés aux maladies auto-immunes de la thyroïde.....	13
<b>Tableau3</b> : Résultats du dosage hormonaux et des anticorps spécifiques de la thyroïde .....	37
<b>Tableau4</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF-A entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins .....	38
<b>Tableau5</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins .....	38
<b>Tableau6</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN- $\gamma$ entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins .....	39
<b>Tableau7</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.....	39
<b>Tableau8</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.....	40
<b>Tableau9</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$ entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.....	41
<b>Tableau10</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.....	42
<b>Tableau11</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN- $\gamma$ entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.....	42
<b>Tableau12</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.....	43
<b>Tableau13</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.....	43
<b>Tableau14</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'TNF- $\alpha$ entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.....	44
<b>Tableau15</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.....	44
<b>Tableau16</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.....	45
<b>Tableau17</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène d'IFN- $\gamma$ entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.....	46

<b>Tableau18</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.....	47
<b>Tableau19</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$ entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.....	48
<b>Tableau20</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.....	48
<b>Tableau21</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène IFN-G entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.....	49
<b>Tableau22</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins .....	49
<b>Tableau23</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins .....	50
<b>Tableau24</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$ entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.....	51
<b>Tableau25</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.....	52
<b>Tableau26</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN-G entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.....	52
<b>Tableau27</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.....	53
<b>Tableau28</b> : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins .....	53
<b>Tableau29</b> : tableau comparatif entre les résultats obtenus de différentes études pour le polymorphisme (-308A/G) du gène TNF- $\alpha$ chez les patients atteints de MAIT.....	55
<b>Tableau30</b> : tableau comparatif entre les résultats obtenus de différentes études pour le polymorphisme (-174C/G) du gène de l'IL-6 chez les patients atteints de MAIT.....	56

## Liste des abréviations:

**ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique  
**Anti-TPO** : Anticorps Anti-Thyroperoxydase  
**Anti-Tg** : anticorps Anti-Thyroglobuline  
**CD** : Cellule Dendritique  
**CMH II** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra-Acétique  
**FT3** : Triiodothyronine  
**FT4** : Thyroxine Libre  
**GD** : Maladie de Graves  
**HLA** : Humain Leukocyte Antigen  
**HT** : Thyroïdite d'Hashimoto  
**IFN- $\gamma$**  : Interféron- $\gamma$   
**IL-6** : Interleukine-6  
**IL-10** : Interleukine-10  
**LT4** : Lymphocyte T4  
**MAIT** : Maladie Auto-immune de la Thyroïde  
**PCR-SSP** : Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers  
**PK** : Protéine Kinase  
**SDS** : Sodium Dodécyl Sulfate  
**SLB** : Solution de Lyse des globules Blanc  
**SLR** : Solution de Lyse des globules Rouges  
**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism  
**TBE** : Tris Borate EDTA  
**Tg** : Thyroglobuline  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**Th** : les cellules *T helper*  
**TL8**:Lymphocyte T8  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ .  
**T reg** : Lymphocyte T régulateur  
**TSH** : Hormone Thyroïde-Stimulante  
**TSH R**:Récepteur d'Hormone Thyroïde-Stimulante





## Introduction générale

Les maladies auto-immunes sont les maladies provoquées par une rupture de tolérance au soi, entraînant une réponse du système immunitaire contre des antigènes du soi et déclenchant des lésions cellulaires et tissulaires. Elles affectent 5 à 7% de la population et sont souvent responsable d'invalidité grave et représentent une cause majeure de maladie chronique et un sérieux problème de santé (Sinha *et al.*,1990).

Les maladies auto-immunes de la thyroïde (MAIT) sont les maladies auto-immunes spécifiques d'organes les plus courantes (Caturegli *et al.*,2007).

La thyroïdite de Hashimoto(HT) et la maladie de Basedow (GD) représentent la majeure partie de présentations cliniques dans un large éventail de maladies auto-immunes thyroïdiennes, qui aboutissent à un dysfonctionnement de la thyroïde (Ganesh *et al.*,2011).

La HT est médiée par les lymphocytes T et caractérisée par une infiltration lymphocytaires qui mène à la perte des cellules thyroïdiennes, cliniquement exprimée par une hypothyroïdie (Weetman, 2000).En revanche, la GD est exprimée par une hyperthyroïdie qui est due à une sécrétion excessive d'hormones thyroïdiennes induite par des anti-anticorps spécifiques au récepteur de la thyrotropine (TSHR) produite par les cellules B activées (Menconi et Tomer, 2008).

On sait actuellement que la susceptibilité génétique à la HT et GD implique des gènes partagés et uniques (Huber *et al.*, 2008). Plusieurs facteurs, y compris génétiques, hormonaux, environnementaux, et des éléments nutritionnels sont impliqués dans l'initiation et / ou développement de MAIT, mais les modifications physiopathologiques vues dans les MAIT sont médiés par des cytokines inflammatoires (pro et anti-inflammatoires) (Ganesh *et al.*,2011).

-Les cytokines pro et anti-inflammatoires jouent un rôle important dans le processus immunologique impliqué dans HT et GD en tant que composantes de la réponse auto-immune (Bednarczuk *et al.*,2004, Liu *et al.*,2010).Diverses cytokines et polymorphismes génétiques ont été signalés pour être associé avec les MAIT, mais les résultats sont discordantes (Liu *et al.*,2010,Inoue *et al.*,2011, Anvari *et al.*,2010).

Nous nous sommes proposés une étude cas /témoins a porté sur 42 patients atteints des thyroïdites auto-immunes (HT et GD) et 35 témoins sains afin d'étudier l'association éventuelle entre les polymorphismes de gènes de cytokines (INF- $\gamma$ ,TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-10 et TGF- $\beta$ 1) et le développement de thyroïdites auto-immunes (HT et GD).

Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé une méthode de biologie moléculaire qui est La «Polymerase Chain Reaction Sequence Spécifique Oligonucleotide»PCR-SSP pour effectuer le génotypage des cytokines (INF- $\gamma$ ,TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-10 et TGF- $\beta$ 1) .

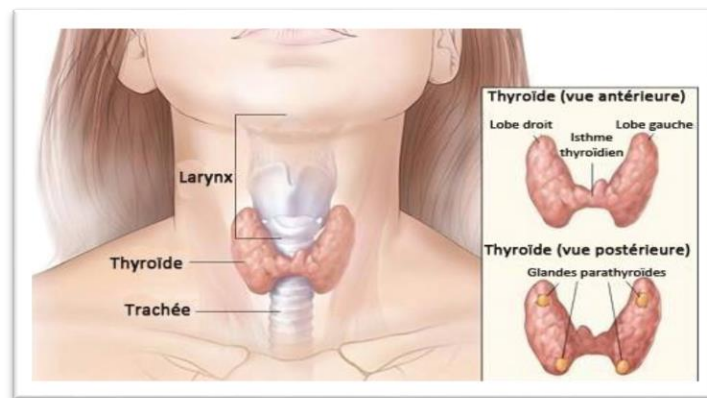
Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire, au sein de département d'Immunologie à l'Institut Pasteur d'Algérie(IPA).

## Chapitre I : Rappels bibliographiques

### 1. Système thyroïdien

#### 1.1. Glande thyroïdienne :

La glande thyroïde est une glande endocrine impaire et médiane située dans la partie antérieure du cou, dans la région sous hyoïdienne. Elle repose sur la trachée, juste en dessous du cartilage thyroïdien. Organe en forme de papillon, elle est constituée de deux lobes droit et gauche, réunis par l'isthme thyroïdien (Marieb ,1999). C'est une glande multi cellulaire comportant des cellules glandulaires disposées le plus souvent en cordons, îlots ou travées au sein d'un stroma conjonctif contenant des capillaires sanguins fenêtrés. La disposition des cellules glandulaires en follicules est propre à la glande thyroïde (Leenhardt ,2003). Elle est de consistance ferme, de couleur brun rougeâtre, friable, enveloppée par une capsule fibreuse qui lui adhère. Elle pèse 30 g (légèrement plus chez les femmes). Sa hauteur est d'environ 6cm pour une longueur de 6 à 8cm au niveau des lobes, avec l'isthme qui fait environ 1 cm de large sur 1.5 cm de haut (Schaffler et Menche ,2004).



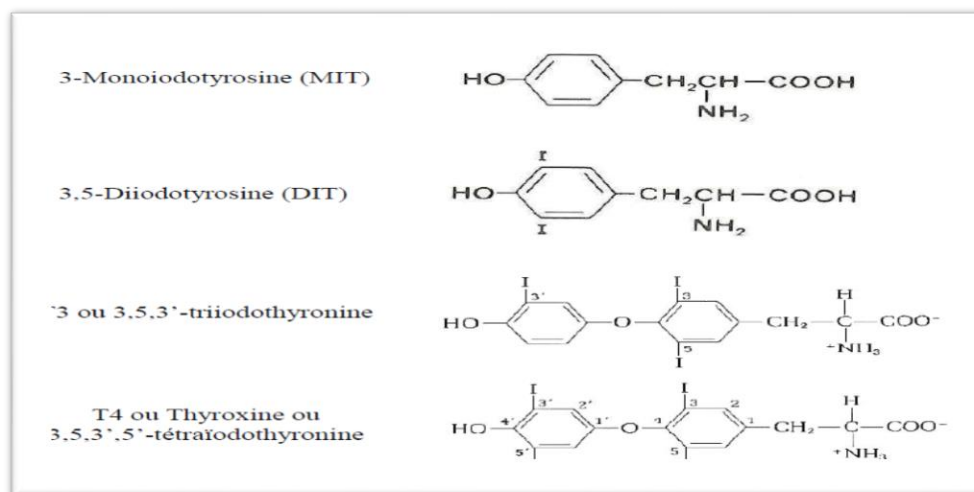
**Figure1** : l'emplacement de la glande thyroïdienne.

(<http://amelioretasante.com/wp-content/uploads/2014/04/Thyro%C3%AFde-500x319.jpg>)

#### 1.2. Les hormones thyroïdiennes :

Les principales hormones thyroïdiennes synthétisées et secrétées par la thyroïde sont : la tri-iodothyronine 3,5,3' (T3) et la tétra-iodothyronine 3,5',3',5' ou thyroxine (T4) qui résultent du couplage des mono-iodotyrosines (MIT) et des di-iodotyrosines (DIT). Elles contiennent respectivement trois et quatre atomes d'iode par molécule (**figure2**) (Murray et *al.*, 1993).





**Figure2** : Structure des dérivés tyrosyles mono- et di-iodés (MIT et DIT) et des hormones thyroïdiennes iodées (Murray et *al.*,1993).

### 1.2.1. La composition et biosynthèse des hormones thyroïdiennes :

Les hormones thyroïdiennes requièrent la présence de deux molécules clés qui interviennent dans leur composition et tout un équipement enzymatique membranaire :

### 1.2.2. La thyroglobuline :

La thyroglobuline est une glycoprotéine spécifique de la thyroïde, stockée dans la lumière folliculaire où elle constitue jusqu'à 95% du colloïde. Elle est synthétisée par les thyrocytes et excrétée dans la lumière folliculaire (Sternberg, 1997). On peut la considérer comme une prohormone thyroïdienne car c'est l'iodation de ses résidus tyrosyls terminaux qui est à l'origine de la formation des hormones thyroïdiennes proprement dites (Leclère et *al.*,2001 ).

### 1.2.3. L'iode :

- L'iode est le constituant essentiel à la synthèse des hormones thyroïdiennes. En nutrition, l'iode appartient à la famille des oligo-éléments. Ce sont des minéraux présents dans les tissus vivants à des doses infinitésimales mais essentiels aux métabolismes des êtres vivants. (Thebault ,2005).

Une thyroïde « normale » en contient environ 10g, principalement sous forme organique puisque moins de 1% se trouve sous forme de iodure I<sup>-</sup>. L'apport iodé principal est l'alimentation (crustacés et poissons surtout, ou ajouté au sel de table).

-Il existe également une production endogène d'iode, par désiodation périphérique et intrathyroïdienne des hormones thyroïdiennes.

L'iode contribue à la stéréospécificité hormonale et représente 64% du poids moléculaire de la thyroxine et 59% de la tri-iodothyronine (Schlienger et *al.*,1997).

Une surcharge iodée entraîne une inhibition de l'organification de l'iode et une réduction de la synthèse hormonale (effet Wolff-Chaikoff). En cas de carence iodée :

- La thyroglobuline est faiblement iodée
- Le rapport MIT/DIT augmente
- La synthèse de T3 est favorisée par rapport à T4.

#### **1.2.4. La thyroperoxydase (TPO) :**

La thyroperoxydase est une enzyme spécifique liée à la membrane des cellules thyroïdiennes qui permet de catalyser la première étape de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes .Cette enzyme a une activité optimale en présence d'eau oxygéné (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et elle est identifiée comme cible des auto-anticorps caractéristiques de maladies auto-immunes thyroïdiennes (Ruf et Carayon ,2006)(Prummel et Wiersinga,2005).

#### **1.3. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes :**

La biosynthèse des hormones thyroïdiennes se déroule en plusieurs étapes représentées sur la figure3 :

- ✓ iodation des résidus tyrosyl de la thyroglobuline qui est une protéine glycosylée de 670 Kda.
- ✓ couplage de ces résidus pour former la T3 et la T4.
- ✓ libération des hormones par hydrolyse de la thyroglobuline (Belshaw et Ettinger ,1983).

-L'iode, lors de son absorption digestive est transformé en ion iodure (I<sup>-</sup>) puis est transformé sous forme ionisé par les protéines plasmatiques. Grâce à une pompe à iode (transport actif), située sur la membrane basale du thyrocyte, l'iode est concentré cent à deux cent fois plus que dans la circulation sanguine.

-Les ions I<sup>-</sup> sont ensuite transportés jusqu'au pôle apical de la cellule où ils sont sécrétés dans la lumière ; ils sont alors peroxydés par la thyroperoxydase en ion iodium I<sup>+</sup>.

Une protéine, la thyroglobuline, est aussi synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique granuleux à partir d'acides aminés captés depuis la circulation sanguine (notamment la tyrosine) puis glycosylée au niveau de l'appareil de Golgi. Elle est ensuite sécrétée dans la lumière où elle forme une substance acidophile et amorphe, la colloïde.

-Au sein de la colloïde, la thyroglobuline subit plusieurs modifications. Elle est d'abord iodée par l'addition d'ions  $I^+$  en une thyroglobuline iodée, riche en MIT et en DIT. Les résidus tyrosine iodés se condensent deux à deux sur la thyroglobuline. La condensation de MIT et de DIT forme la T3 et celle de deux MIT forme la T4. La T3 et T4 restent prisonnières de la molécule de thyroglobuline iodée (Guyot *et al.*, 2007).

-La thyroglobuline iodée du colloïde est alors internalisée par le thyrocyte par endocytose. Des lysosomes se déversent dans le phagosome pour constituer un phagolysosome dans lequel la thyroglobuline est dégradée par des enzymes protéolytiques. A la fin, les hormones T3 et T4 sont libérés et excrétés dans le sang où elles sont transportées par des protéines plasmatiques, pour atteindre les tissus cibles périphériques (Massart *et al.*, 2006).

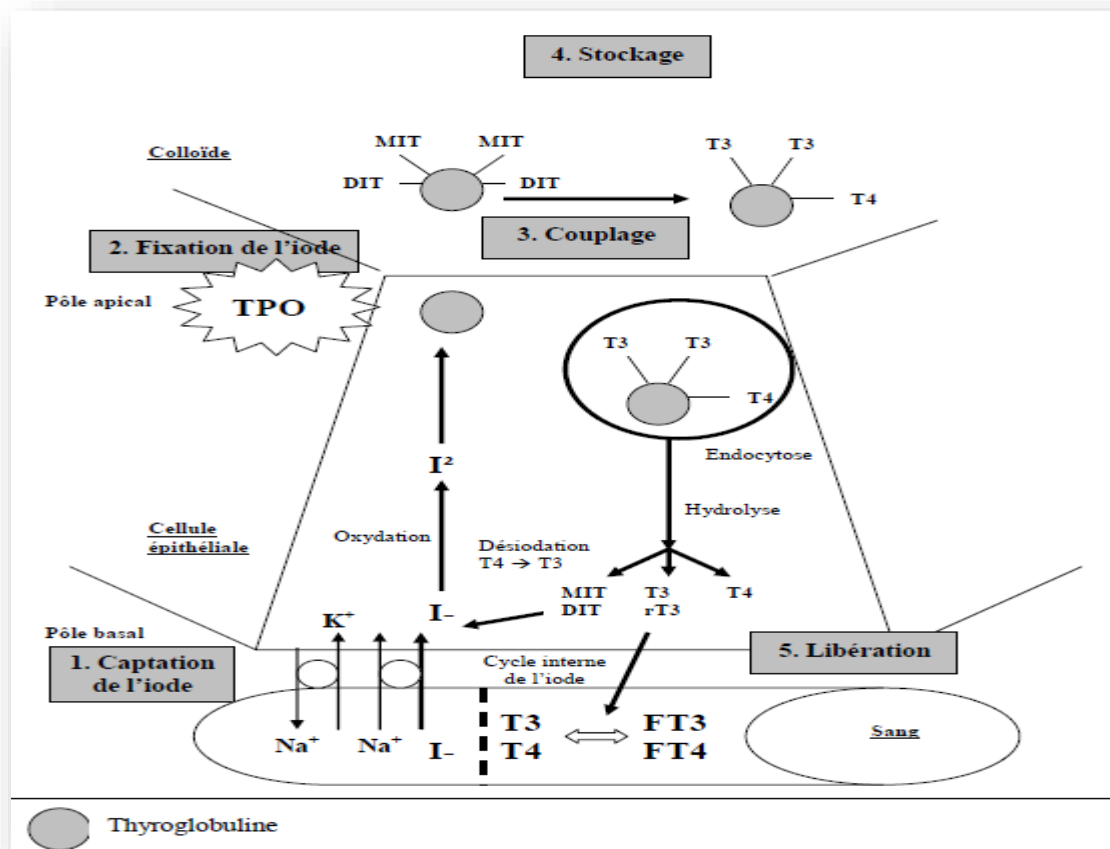


Figure 3 : la synthèse des hormones thyroïdiennes (Guyot *et al.*, 2007).

### 1.4.Rôle de la thyroïde :

La glande thyroïde agit sur tout le métabolisme grâce à deux hormones. Ces hormones ont un rôle général d'accélérateur des métabolismes, mais aussi des effets spécifiques au niveau de différents tissus.

#### 1.4.1. Effets sur les métabolismes :

- Elles augmentent la consommation d'oxygène et la thermogénèse.
- La lipogénèse et la lipolyse sont sous la dépendance du fonctionnement de la thyroïde.
- L'hyperthyroïdie provoque une augmentation de la production de glucose et de son utilisation ayant pour conséquence une glycosurie et une hyperglycémie postprandiale excessive en cas de sur-plus d'hormones thyroïdiennes.
- Sur le métabolisme des protéines, on observe qu'à doses physiologiques, les hormones thyroïdiennes sont anabolisantes grâce à une action directe et indirecte, en stimulant d'autres substances anabolisantes comme les glucocorticoïdes. Cependant, à doses trop élevées, elles ont un effet catabolisant.

#### 1.4.2. Effets spécifiques au niveau de différents tissus :

- **Os et squelette** : Les hormones thyroïdiennes agissent à la fois sur la synthèse et la destruction osseuse, la destruction étant quand même un peu plus active que la synthèse. Par conséquent, une ostéoporose peut apparaître dans les hyperthyroïdies, réversible au retour à l'euthyroïdie.
- **Muscles et cœur** : Ces hormones ont une action sur les protéines musculaires, en particulier la myosine. Au niveau cardiaque, la T3 et la T4 ont un effet chronotrope, ionotrope, et dromotrope. Les muscles lisses sont également concernés, comme ceux impliqués dans la motilité intestinale : une augmentation du métabolisme thyroïdien les stimule, accélérant le transit jusqu'à provoquer une diarrhée.
- **Le système nerveux** : Elles jouent un rôle important dans le développement et la maturation du système nerveux. Une carence peut conduire à un retard mental plus ou moins important. Chez l'adulte, un manque d'hormones va ralentir l'intellect, le sujet devient léthargique. Au contraire, un sujet qui reçoit un excès d'hormones thyroïdiennes est hyper-irritable et réagit excessivement à son environnement.
- **Le système reproducteur** : La thyroïde intervient dans le déroulement de la puberté (Hazard et Perlemuter, 2000, Lectère et *al.*,2001,Gallois,2008).

## 2. Thyroïdites auto-immunes :

Comme le suggère leur nom, Les thyroïdites sont un ensemble d'affections causées par un processus infectieux ou inflammatoire de la thyroïde. Elles sont les maladies auto-immunes spécifiques d'organe affectant environ 5% de la population globale (Caturegli et *al.*, 2007). On distingue principalement la maladie de Basedow appelée aussi maladie de Graves (GD) et la thyroïdite de Hashimoto (HT).

### 2.1. Définitions :

#### 2.1.1. Maladie de Basedow :

Egalement appelée maladie de Graves, du nom du médecin Irlandais qui l'a décrite dans le London Medical Journal, en 1835. Cette affection avait déjà été décrite quelques années auparavant par le médecin anglais Caleb Hilier Parry.

En Europe continentale, elle est connue sous le nom de maladie de Basedow du nom de Carl Von Basedow (médecin allemand) qui l'a décrite en 1840. Dans tous les pays, elle est aussi appelée goitre exophtalmique ou thyrotoxicose (Lokrou ,1990). La maladie de Graves est la principale cause d'hyperthyroïdie dans le monde .Même si cette maladie a une composante héréditaire, tous les membres d'une même famille qui en est atteinte, n'en souffriront pas nécessairement (Moro,2002).La fréquence de la maladie est de moins de 1% avec une prédominance féminine de 5-10/1 homme et elle peut toucher tout le monde, mais essentiellement les individus entre 40 et 60 ans et plus rarement à l'adolescence (Weetman,2000). Elle est due à des anticorps stimulants le récepteur de la TSH. Elle est marquée par l'existence d'un ou plusieurs signes suivants :

- syndrome de thyrotoxicose;
- goitre, ophtalmopathie;
- dermopathie ou acropathie (Lokrou ,1990).

#### 2.1.2. Thyroïdite de Hashimoto :

Cette thyroïdite a été décrite pour la première fois en 1912 par Haraku Hashimoto, un chirurgien japonais (Willem ,2010). La thyroïdite de Hashimoto (TH) est la plus fréquente des thyroïdites lymphocytaires chroniques et elle est la première cause de l'hypothyroïdie.

Chez le patient atteint de maladie de Hashimoto, le goitre est causé par une accumulation de globules blancs et de liquide (inflammation) dans la thyroïde, ce qui entraîne la destruction des

cellules thyroïdiennes et, finalement, une insuffisance thyroïdienne (hypothyroïdie)(Klein,2007). Au début, la production d'hormones thyroïdiennes diminue, ce qui fait diminuer leur concentration sanguine et provoque la libération accrue de TSH et l'apparition possible d'un goitre. À un stade avancé, le goitre peut disparaître en raison de la destruction progressive de la glande thyroïde. Elle est plus fréquente chez la femme, surtout entre 30 et 60 ans ( Leclère et *al.*,1992). Elle est associée à certains groupes HLA : DR3 dans sa forme atrophique, DR5 dans sa forme avec goitre (Léger , 2001).

## 2.2. Les symptômes et signes des thyroïdites auto-immunes :

l'hyperthyroïdie se traduit par de nombreux signes cliniques en rapport avec les rôles des hormones thyroïdiennes au sein de l'organisme ; l'excès d'hormones thyroïdiennes entraîne une asthénie, une perte de poids, une exophtalmie, une diarrhée motrice, un état de nervosité avec de l'anxiété, des troubles cardiaques (palpitations, tachycardie, hypertension artérielle voire fibrillation auriculaire), une infertilité avec diminution de la libido (Krassas et Pontikides ,2004),une intolérance à la chaleur ainsi que des troubles cutanés (ongles mous, cheveux fins et cassants et moiteur de la peau)( Thirion ,2006) .

Tandis que les patients atteints d'hypothyroïdie présentent les signes cliniques suivants : la fatigue, gain de poids, l'intolérance au froid, la constipation, la peau sèche et froide au toucher, un myxoedème, des dysfonctionnements cérébraux, une myopathie avec des douleurs articulaires, un dysfonctionnement cardiaque, une hypertension... Parfois une anémie, un trouble de la coagulation, un iléus paralytique, une ascite, une hypercholestérolémie ou une hyponatrémie peuvent être révélateurs d'une hypothyroïdie (Sawin ,1985) .

**Le tableau1** : Classification clinique des maladies thyroïdiennes auto-immunes (Quarantino, 2004).

<b>Hypothyroïdie</b>	<b>Hyperthyroïdie</b>
Prise de poids Sensibilité au froid Crétinisme Motricité ralentie Peau sèche Cheveux secs et cassants	Perte de poids Exophtalmie Tachycardie Tremblements Ophtalmopathie
Augmentation de la concentration sérique de TSH Diminution de la concentration sérique de T4	Diminution de la concentration sérique de TSH Augmentation marqué des titres sériques de T4 Sérologie anti-R-TSH positive
Infiltrat inflammatoire de la thyroïde constitué de lymphocytes T	Infiltrat inflammatoire de la thyroïde constitué de lymphocytes T et B

### 2.3. Etiologie :

Ces maladies sont multifactorielles incluant un terrain génétique prédisposant et des facteurs environnementaux (**Figure 4**) (Nedlec, 2012).

#### ❖ Les facteurs endogènes :

- Le premier point à mentionner est la forte **prédominance féminine** des MTAI.
- Les **œstrogènes** en sont en partie responsables.
- Un autre facteur pourrait être l'existence d'un **biais dans l'inactivation du chromosome X**.
- La grossesse, et les modifications biphasiques de l'économie du système immunologique qu'elle entraîne, joue aussi un rôle d'autant plus marqué que la grossesse représente un stress pour la thyroïde.
- Les **glucocorticoïdes endogènes** peuvent moduler l'activité du système immunologique et provoque l'apparition de MTAI ou l'augmentation des taux d'anticorps antithyroïde (Niepmniszcze et *al.*,2002).

#### ❖ Facteur d'environnement :

Ils sont théoriquement responsables d'environ 20 % du risque de MTAI (Brent, 2010).

##### ✓ Les radiations :

L'irradiation externe induit l'apparition ultérieure d'anticorps antithyroïde et de MTAI, thyroïdite avec hypothyroïdie aussi bien que maladie de Basedow. De même, l'iode radioactif en traitement d'un goitre toxique peut favoriser l'apparition, plusieurs années plus tard, de maladie de Basedow et même d'orbitopathie basedowienne (Dunkelmann et *al.*,2004).

##### ✓ L'Iode :

D'une façon générale, les MTAI tendent à être plus fréquentes dans les régions d'apport suffisant en iode. De même, la supplémentation en iode, même prudente, de populations précédemment déficientes s'accompagne de l'augmentation transitoire de l'incidence de formes infracliniques d'hypo et d'hyperthyroïdie (Laurberg et *al.*,2006).

##### ✓ Le Tabac :

La consommation de cigarettes a été associée à la maladie de Basedow et, plus fortement, à l'orbitopathie Basedowienne (Prummpel et Wiersinga,1993 , Bartalena et *al.*,1993).

✓ **Les infections :**

Des études épidémiologiques et sérologiques ont suggéré la possibilité d'un lien entre maladie de Basedow et infection à *Yersina enterocolitica*, avec même possibilité de mimétisme moléculaire entre un antigène de l'agent infectieux et le R-TSH (Cover et Aber ,1998).

✓ **Le stress :**

Au cours du stress, les glucocorticoïdes et les catécholamines libérées par l'axe hypothalamo-hypophysaire vont modifier l'équilibre des balances cytokiniques Th1/Th2 et Th17/T reg et être à l'origine d'une inhibition de l'immunité cellulaire, d'une diminution de la tolérance immunitaire et d'une stimulation de l'immunité humorale. Ces modifications exposent les individus entre autre aux maladies auto-immunes (Delévaux et *al.*, 2012).

✓ **Agents chimiques :**

-Le traitement par le **lithium** s'accompagne d'une prévalence accrue d'anticorps antithyroïde, d'hypothyroïdie et, à un moindre degré, de maladie de Basedow car Il exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion thyroïdienne (Lazarus ,2009).

-L'un des effets indésirables les plus fréquents, jusqu'à 40 % des cas, de **l'interféron alpha** utilisé en particulier en traitement de l'hépatite C est la thyroïdite auto-immune, plus rarement de type toxique non immunologique. Des cas de maladie de Basedow peuvent aussi s'observer. Le rôle propre du virus de l'hépatite C virus a été suggéré (Tomer et Menconi ,2009).

-Deux autres situations thérapeutiques peuvent induire une MTAI, dans ces cas, une maladie de Basedow :

❖ Il s'agit d'une part du traitement de la sclérose en plaques par le campath, anticorps monoclonal anti-cellule T,

❖ D'autre part du traitement du SIDA par trithérapie.

Dans les deux cas, la maladie de Basedow apparaît lors de la reconstitution lymphocytaire, ce qui suggère, lors de cette étape, un déséquilibre en faveur d'une réponse immunitaire de type Th2 associée à un défaut de la régulation immunitaire (Weetman ,2009).



### ❖ Facteur de susceptibilité génétique:

Les gènes impliqués dans les maladies auto-immunes de la thyroïde sont regroupés en deux grandes classes :

- Gènes spécifiques impliqué dans la régulation du système immunitaire
- Gènes spécifiques de la thyroïde.

Ces gènes associés à la susceptibilité aux MTAI et à la présence des anticorps antithyroïde sont énumérés dans le **tableau2**.

- **Gènes spécifiques de la thyroïde :**

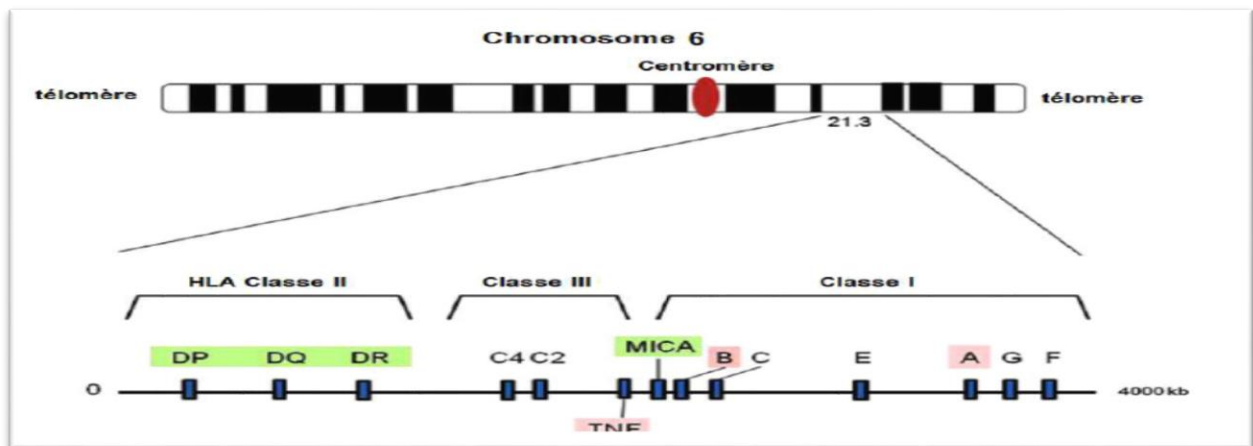
- ✓ **Le gène Tg :** est localisé sur le chromosome 8q24.22, et il code une glycoprotéine produite principalement par la glande thyroïde. Les polymorphismes de ce gène sont associés à la susceptibilité aux maladies thyroïdiennes auto-immunes (AITD) telles que la maladie de Graves et de thyroïdite de Hashimoto. Donc, La Tg est l'une des principales cibles de la réponse immunitaire dans les thyroïdites auto-immunes (Tomer, 2010).

- ✓ **Le gène TSHR :** est situé sur le chromosome 14q31.1, et il code une protéine membranaire. Cette protéine est une protéine régulatrice importante du métabolisme des cellules de la thyroïde. La protéine codée est un récepteur de la thyroïdostimuline, et son activité est médiée par l'adénylcyclase. Le TSHR a été le premier gène (après HLA) à tester pour l'association avec GD. Trois variantes de transcription codant pour différentes isoformes ont été trouvées pour ce gène (Tomer ,2010).

- **Gènes de la régulation du system immunitaire :**

- ✓ **Le gène HLA :** Le système *HLA* est situé dans une région chromosomique localisée chez l'Homme dans le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) appelé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce complexe comprend plus de 200 gènes dont un peu plus de la moitié sont fonctionnels et dont une quarantaine code pour les molécules du système *HLA* proprement dit. La région CMH de classe II est en position centromérique.

Elle compte trois principaux loci : *HLA-DR*, *HLA-DQ* et *HLA-DP* et elle est très polymorphe (**figure5**) (Kuby *et al.*, 2007). Les premières études ont analysé la grande classe d'allèles HLA II dans les thyroïdites auto-immunes (Jacobson *et al.*, 2008). Ces études ont démontré une association significative de GD avec HLA-DR3 mais les données sur les allèles HLA dans HT ont été moins concluantes que dans GD, avec plusieurs allèles HLA-DR associés (Tomer, 2010).



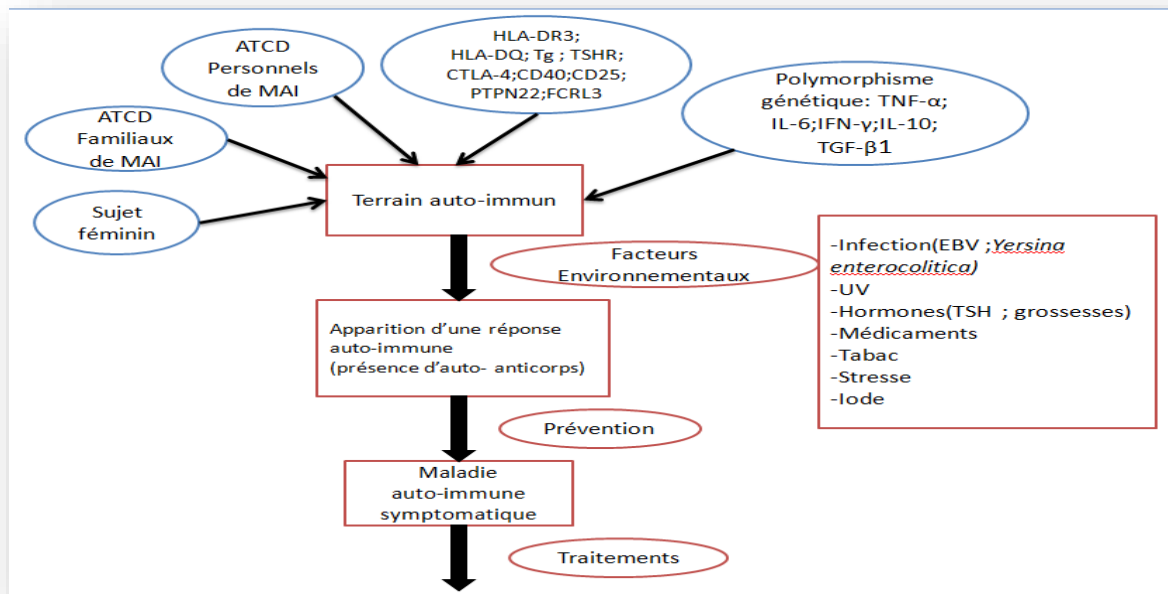
**Figure 5:** Cartographie chromosomique de 6p21.3, contenant la région du *HLA* de classe II (Song et Kang, 2012).

- ✓ **Le gène CTLA-4 :** est localisé sur le chromosome 2 (2q33). C'est un membre de la superfamille des immunoglobulines et code pour une protéine qui émet un signal d'inhibition à des lymphocytes T. La protéine contient un domaine V, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Des mutations de ce gène ont été associées à la maladie de Graves, la thyroïdite de Hashimoto, et d'autres maladies auto-immunes (Tomer, 2010).
- ✓ **Le gène CD40 :** Ce gène est localisé sur le chromosome 20 (20q13.12). Le CD40 est exprimé principalement sur les cellules B et d'autres cellules présentatrices d'antigène, et joue un rôle fondamental dans l'activation des cellules B et la sécrétion d'anticorps. Cartographie fine a identifié le gène CD40 comme gène de susceptibilité dans la maladie de Basedow et d'autres maladies auto-immunes car de nombreux polymorphismes ont été observés dans ce gène (Tomer, 2010).

- ✓ **L'IL-2 récepteur alpha (CD25) :** Les cellules T reg naturelles sont caractérisées par une expression constitutive de niveaux élevés de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25). Des études récentes ont montré une association entre le gène CD25 et Diabète de type I ainsi qu'avec GD (Tomer, 2010).
- ✓ **Proteine tyrosine phosphatase, non receptor type, 22 (PTPN22) :** Ce gène est localisé sur le chromosome 1p13.2, et code pour la synthèse d'une protéine tyrosine phosphatase appelée la phosphatase spécifique de lymphocyte (Lyp) (Tomer, 2010).
- ✓ **Le gène FCRL3 :** est le gène essentiel à la différenciation des lymphocytes T dans des cellules T reg naturelles. C'est un gène candidat impliqué dans le développement des thyroïdites auto-immunes. Le gène FOXP3 est situé dans une région du chromosome Xp11.23 qui a été montré pour être liés à MTAI (Tomer, 2010).

**Tableau 2:** Gènes associés aux MTAI (Davies et *al.*, 2012).

<u>Chromosome</u>	<u>Gène</u>	<u>Dénomination du gène</u>
Gènes immuno-régulateurs		
6p	<i>HLA class II</i>	Complexe majeur d'histocompatibilité
2q	<i>CTLA-4</i>	« Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 »
2p	<i>PTPN22</i>	« Proteine tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 »
20q	<i>CD40</i>	Molécule CD40 (« TNF receptor superfamily member 5 »)
10p	<i>IL-2RA / CD25</i>	Récepteur alpha de l'interleukine 2
1q	<i>FCRL3</i>	« Fc receptor-like 3 »
Gènes spécifiques de la thyroïde		
8q	<i>Tg</i>	Thyroglobuline
14q	<i>TSHR</i>	Récepteur de la TSH



**Figure 4:** Les différents facteurs impliqués dans le développement de MAIT (Nedlec, 2012).

## 2.4. Auto-immunité thyroïdienne :

Les MAIT se caractérisent par un infiltrat lymphocytaire intra-thyroïdien (Composante cellulaire) et la présence de titres significatifs d'auto-anticorps antithyroïdiens (composante humorale).

### 2.4.1. Marqueurs de l'auto-immunité antithyroïdienne:

Lors des maladies thyroïdiennes auto-immunes, des anticorps de haute affinité et de forte concentration se forment contre principalement des antigènes du follicule thyroïdien : la Thyroperoxydase, la Thyroglobuline et le récepteur à la TSH.

### Anticorps Anti-Thyroperoxydase :

L'Anticorps anti- thyroperoxydase est un marqueur de la maladie de la thyroïde auto-immune. Les anticorps anti-TPO sont présents dans presque tous les patients atteints de la thyroïdite de Hashimoto et dans 75% des patients souffrant d'hyperthyroïdie au cours de la maladie de Graves. La Thyroperoxydase est une enzyme clé impliquée dans l'hormonogénèse de la thyroïde. Cet antigène est identique à l'antigène microsomal thyroïdien, les auto-anticorps observés en cas de maladie thyroïdienne auto-immune étant dirigés contre sa partie extracellulaire. Les niveaux des anticorps anti-TPO sont associés à l'expression du CMH sur des thyrocytes et avec un degré

d'infiltration par des lymphocytes, ce qui peut sensibiliser et déclencher la synthèse d'auto anticorps. Les anticorps sont produits principalement par des lymphocytes infiltrant la glande thyroïde et dans une faible mesure par les ganglions lymphatiques locaux ou de la moelle osseuse. Ils sont capables d'induire le système du complément et de cytotoxicité cellulaire. Il existe une forte corrélation entre la concentration d'anticorps anti-TPO et la présence d'une infiltration lymphocytaire de la glande thyroïde (Mikoś et *al*, 2014).

### **Anticorps Anti-Thyroglobuline :**

Historiquement, ce sont les premiers anticorps antithyroïdiens reconnus. Ils n'ont pas de rôle pathogène, ne fixent pas le complément. La détermination des anticorps anti-thyroglobuline est utilisée principalement dans le diagnostic d'une suspicion de thyroïdite auto-immune. Une concentration élevée des anticorps anti-Tg et anti-TPO est évocatrice d'une thyroïdite auto-immune, soit de forme hypertrophique, soit de forme atrophique. Les anticorps anti-Tg sont présents chez 10% de la population générale, mais seulement 3% de la population présente des anticorps anti-Tg sans anticorps anti-TPO détectables (Hollowell et *al*.2002).

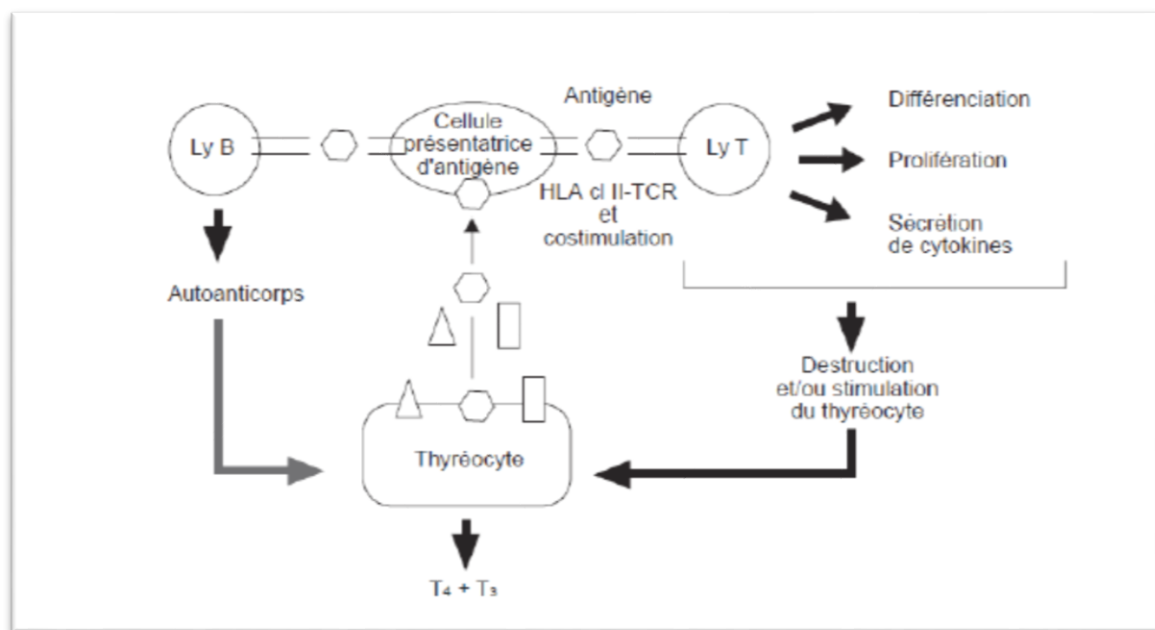
### **Anticorps anti-récepteur de la thyrotropine :**

L'Anticorps anti-récepteur de la TSH (TSHR) imite la fonction de la TSH et provoque une maladie en se liant au récepteur de la TSH et de stimuler ou inhiber des cellules de la thyroïde en termes de T3 et production de T4. Contrairement aux anticorps anti-TPO et anti-Tg, Ils sont pathogènes, en stimulant ou en inhibant les actions du récepteur de la TSH (Mikoś et *al*, 2014). Les anticorps stimulants et bloquants peuvent coexister chez le même patient, et leur concentration changer dans le temps. La présentation clinique (hyperthyroïdie ou hypothyroïdie) dépend de l'affinité et de la concentration relative de l'anticorps dominant (Charrie, 2005). La maladie de Graves est caractérisée par la production d'auto-anticorps stimulant TSHR et un autre groupe de patients atteints de la maladie de la thyroïde auto-immune peut avoir des auto-anticorps qui bloquent l'activation de TSHR (Mikoś et *al*, 2014).

### **2.4.2. Physiopathologie des thyroïdites auto-immunes**

Afin de comprendre le rôle des cytokines dans l'initiation ou la suppression des thyroïdites auto-immunes, il est important de comprendre les événements immunologiques qui déclenchent la réponse auto-immune associée au développement de la pathologie.

Le processus auto-immun implique une interaction entre la cellule présentatrice d'antigène (CPA), le lymphocyte B-cellule productrice d'anticorps, le lymphocyte T CD4+, et la cellule cible : le thyrocyte (**Figure 6**). La CPA présente des antigènes thyroïdiens aux lymphocytes au niveau des ganglions lymphatiques, ce qui conduit à l'activation et la prolifération de lymphocytes T et B auto-réactifs. Ainsi, les lymphocytes T Helpers CD4+ activés, aident à la formation de TCD8+ cytotoxiques et activent les lymphocytes B qui produisent les auto-anticorps, créant des centres ectopiques de prolifération.



**Figure6** : Pathogénie des thyroïdites auto-immunes (Tunbridge et *al.*, 1977).

La TH est caractérisée par une hypothyroïdie liée à une destruction de la thyroïde par des lymphocytes T auto-réactifs spécifiques de la thyroglobuline. Au contraire, la maladie de GB elle, est caractérisée par une hyperthyroïdie due à une production excessive d'hormones thyroïdiennes induite par des auto-anticorps stimulants spécifiques au récepteur de la thyrotropine.

Dans la TH, des auto-anticorps et des lymphocytes auto-réactifs contre les antigènes thyroïdiens tels que la thyroglobuline (Tg) et la peroxydase thyroïdienne (TPO) sont induits. L'insuffisance thyroïdienne (hypothyroïdie) est expliquée par une infiltration par des lymphocytes cytotoxiques TC8+ et d'autres cellules immunitaires provoquant l'élargissement de la thyroïde et la destruction progressive des thyrocytes (Weetman, 2003). Lors de l'initiation de la réponse immunitaire à la Tg, les lymphocytes T spécifiques de la thyroïde migrent vers la glande et par le biais de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  induisent l'expression des molécules du CMH II par les

thyrocyte. Cela se traduit par une expansion des lymphocytes T auto-réactifs et la réponse inflammatoire conduisant à l'accumulation de cellules TCD4+ et CD8+ activées, des lymphocytes B, des plasmocytes et des macrophages dans la thyroïde.

L'induction de la réponse auto-immune serait initiée par un déclencheur environnemental (Weetman, 2003). Les produits microbiens peuvent induire l'activation des CPA comme les cellules dendritiques (CD) pour produire des cytokines inflammatoires et activer d'autres cellules du système immunitaire inné, en augmentant les niveaux d'expression des molécules du CMH et/ou des molécules de co-stimulation. Ces cytokines peuvent aussi réguler positivement l'expression des molécules du CMH sur les cellules cibles. Les CPA activées présentent l'auto-antigène et activent les cellules T naïves auto-réactives déclenchant ainsi une réponse auto-immune qui par la suite, peut être entretenue par la présentation d'auto-antigènes par les cellules cibles.

Dans la maladie de Basedow, la perte de la tolérance au récepteur de la TSH (TSHR) entraîne la production d'auto-anticorps contre le TSHR, suite à la maturation d'affinité de ces anticorps, certains lient avec une forte affinité des régions du TSHR et agiront comme des agonistes de la TSH et causent l'hyperthyroïdie.

Les lymphocytes TCD4+ sont le principal type d'infiltrat cellulaire dans les MAIT. Les TCD4+ comprennent, à la fois, une population fonctionnellement hétérogène de T effecteurs responsable du développement des thyroïdites et une population plus petite (10%) des T reg exprimant CD25 (IL-2Ra) qui est essentiel pour le maintien de la tolérance périphérique (Sakaguchi et al., 2008).

Les T reg sont identifiés par leur expression de FOXP3, un facteur de transcription qui est nécessaire et suffisant pour leur développement (Zheng et Rudensky, 2007).

Par ailleurs, Les Treg naturels (nT reg), est une autre sous-population de CD4+Treg qui n'exprime pas le facteur FOXP3 mais secrète les cytokines Il-10 et TGF- $\beta$  pour induire une tolérance.

Les cytokines sécrétées par diverses sources cellulaires du système immunitaire principalement, les CD4+, les TCD4+ ont des effets profonds sur la fonction l'un de l'autre et jouent un rôle crucial dans la détermination du devenir de la réponse immunitaire (Balaji et al., 2011).

Actuellement, trois sous-populations de lymphocytes TCD4+ effecteurs sont bien caractérisées : Th1, Th2 et Th17. Le développement des Th1 dépend de la cytokine IL-12, des Th2 de l'IL-4, des Th17 de l'IL-6 et du TGF- $\beta$ .

Les Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , qui conduit à l'activation des macrophages et des TCD8+ cytotoxiques. Les Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, qui inhibent la production des cytokines Th1, mais aussi stimulent principalement les lymphocytes B pour produire les anticorps et l'activation de molécules anti-apoptotiques.

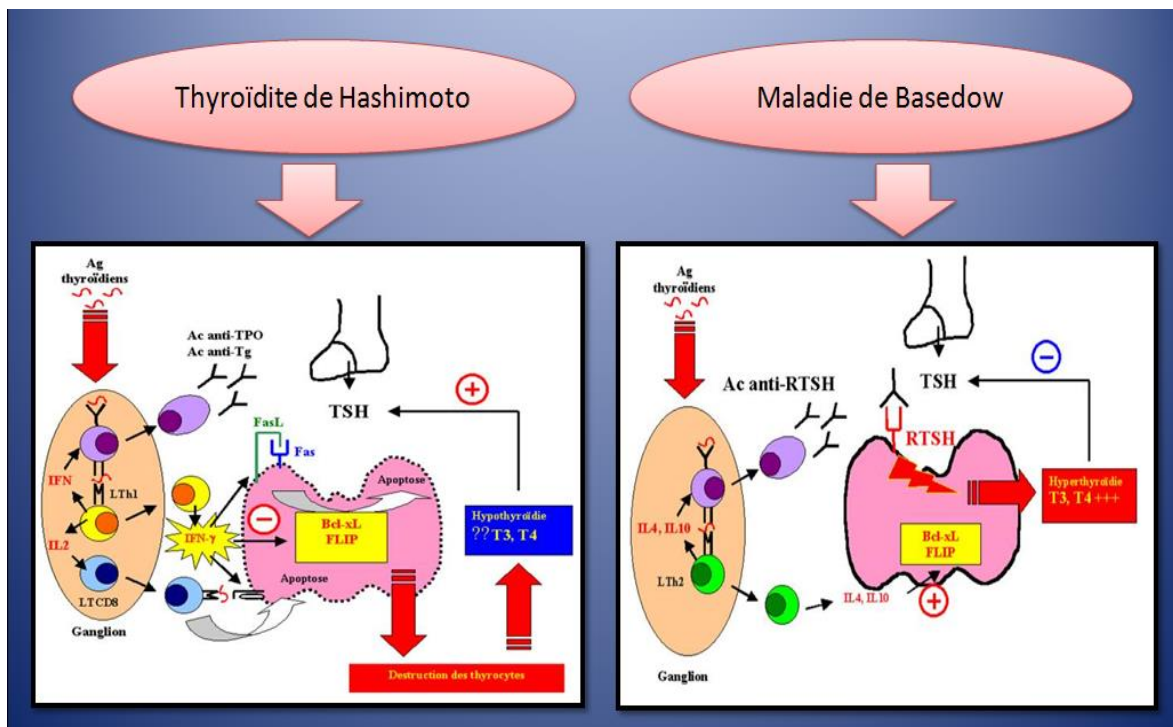
Dans la HT, la réponse Th1 prédomine favorisant le développement d'une immunité à médiation cellulaire, et la mort des cellules folliculaires thyroïdiennes par apoptose. Des récepteurs et ligands de mort pro-apoptotiques, comme TNF, Fas-L et TRAIL sont présents sur les thyrocytes mais inactifs dans des conditions physiologiques. Toutefois, l'expression du Fas en réponse aux cytokines pro-inflammatoires Th1 (IFN $\gamma$ , TNF et IL-1 $\beta$ ) active l'apoptose des cellules thyroïdiennes.

Dans la GD, la réponse Th2 prédomine favorisant la réponse humorale et induisant la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les cytokines Th2 inhibent l'expression du Fas et résulte en l'activation de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 qui protège les thyrocytes de l'apoptose, mais augmente l'apoptose des lymphocytes cytotoxiques infiltrant la glande thyroïde. La pathogénèse des thyroïdites auto-immunes est illustrée dans la figure 5 (Mikoś et al, 2014).

Une nouvelle sous-population de T helper, les Th17 semble aussi être impliquée dans la pathogénèse de la GD. Ces cellules sécrètent de l'IL-17, IL-17-F, IL-21, IL-22 et jouent un rôle important dans maladies inflammatoires chroniques.

Finalement, le phénotype de la MAIT vers la TH ou la GD dépend largement de la balance cytokinique Th1 ou Th2 induite en début de réponse immune. Le fait que ces deux états fonctionnellement opposés peuvent se développer chez une même personne à des périodes différentes, suggère que la balance Th1/Th2 et le profil cytokinique correspondant est un processus dynamique évoluant sous l'influence de facteurs externes opérant dans l'environnement local de la glande thyroïde (Balaji et al., 2011).





**Figure7** : La pathogénèse de la Thyroïdite de Hashimoto et la Maladie de Basedow modifiée D'après (Mikoś et *al*, 2014).

### 3. Cytokines et Thyroïdites auto-immunes :

#### 3.1. Définition :

Les cytokines sont de petites glycoprotéines secrétées par divers types cellulaires notamment les cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes T, B et les cellules NK ...). Elles contrôlent de nombreux processus tels que la prolifération, la différenciation, la sécrétion de substances biologiquement importantes...

Chaque cytokine agit via un récepteur unique ou partagé avec d'autres cytokines, et la liaison au récepteur déclenche une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la régulation positive ou négative de facteurs de transcription régulant l'expression de divers gènes.

#### 3.2. Participation des cytokines à la pathogénèse des thyroïdites auto-immunes :

Les cytokines jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire et influencent l'équilibre entre le maintien de la tolérance et l'auto-immunité (Mikoś et *al*, 2014). En plus de leurs propriétés hormones-like, elles sont impliquées dans le processus de l'hématopoïèse, elles

affectent les fonctions d'autres types cellulaires et sont des médiateurs de l'inflammation et de réponses immunitaires, mais aussi de défense et de réparation (Arend, 2002).

Les cytokines sont impliquées dans la pathogenèse des maladies de la thyroïde. Elles participent à l'induction et à la phase effectrice de la réponse immunitaire et de l'inflammation ; et jouent un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie auto-immune de la thyroïde, y compris la thyroïdite de Hashimoto et la maladie de Graves. Au niveau des cellules inflammatoires et des cellules folliculaires de la thyroïde, la présence de multiples cytokines: IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 IL-14, le TNF-a et IFN- $\gamma$  a été démontrée.

Le profil de sécrétion de cytokine peut être considéré comme un pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, pro-apoptotique ou anti-apoptotique. (Mikoś et al, 2014).

Sous l'influence d'un challenge antigénique chronique, les lymphocytes T CD4 + peuvent être divisés en cellules Th1 produisant des cytokines impliquées dans la réponse cellulaire (IL-2, IFN- $\gamma$ , du TNF-a, l'IL-1b), ou des sous-populations de lymphocytes Th2, qui sécrètent des cytokines associées à la réponse humorale (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) et Th17 produisant de l'IL-17, IL-21, l'IL-22. Les T reg elles, produisent principalement du TGF et jouent un rôle important dans la protection contre l'apparition de maladies auto-immunes. En dépit de tentatives de classification des maladies auto-immune de la thyroïde comme Th1 ou Th2 dépendante, il y a une réponse immunitaire mixte Th1 / Th2 à la fois dans HT et GD (Mikoś et al, 2014).

Les cytokines sont produites par les lymphocytes et les cellules folliculaires thyroïdiennes. Les expériences menées in vitro ont confirmé la production de cytokines suite à la stimulation des cellules folliculaires de la thyroïde par l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , ce qui suggère une augmentation de l'activité et une augmentation de l'infiltration par des cellules pro-inflammatoires in vivo. Ces cytokines augmentent l'expression des molécules d'adhérence molécules sur la surface des cellules folliculaires de la thyroïde, et peuvent également stimuler la production d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine (PG), augmentant la réponse inflammatoire dans les MAIT. Au niveau du tissu thyroïdien, les cytokines jouent un rôle dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T en augmentant l'expression du CMH de classe I et II à la surface des cellules folliculaires de la thyroïde, ce qui conduit à la destruction du glande thyroïde par cytotoxicité cellulaire. Dans l'ophtalmopathie thyroïdienne, il existe une action pathogénique des cytokines: IL- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , en exacerbant l'inflammation et la prolifération des fibroblastes, ce qui entraîne l'accumulation de glycosaminoglycanes au niveau de l'orbite.

Toutefois, les cytokines ont des effets pleiotropiques et souvent ont des fonctions immunostimulantes et immunosuppressive selon le type et la localisation de la cible.

### **3.3. Polymorphisme des gènes de cytokines pro et anti-inflammatoires dans les MAIT:**

#### **3.3.1 Gènes de cytokines pro-inflammatoires :**

Les cytokines constituent des régulateurs clé de la réponse immune et inflammatoire, et de ce fait, les polymorphismes fonctionnels (affectant le niveau d'expression) au niveau des gènes codant les cytokines pourraient constituer des facteurs de risque potentiels pour le développement des TAI. Nous nous sommes proposé de rechercher une éventuelle association entre les polymorphismes des gènes des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-6, et de cytokines anti-inflammatoires TGF- $\beta$  et IL-10 dans les TAI en supposant qu'un éventuel déséquilibre de la balance cytokines pro-inflammatoire et anti-inflammatoire pourrait constituer un facteur favorisant le développement de MAIT.

#### **Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ):**

Le gène de TNF  $\alpha$  humain (TNF-A) est localisé sur le chromosome 6p21.3, au niveau de la région HLA III du CMH (Complexe Majeure d'Histocompatibilité). En tant que cytokine pro-inflammatoire, un rôle effecteur du TNF- $\alpha$  dans le développement de TAI a été suggéré. Les ARNm du TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  ont été détectés dans thyrocytes et le tissu orbitaire chez des patients atteints de TAI et d'ophtalmopathie de GD.

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) ont été identifiés dans le gène de TNF humain, en particulier dans la région du promoteur, l'implication de ces polymorphismes dans l'étiologie de GD présente maintenant un intérêt majeur. Le plus largement étudié des SNP du gène de TNF-A sont en position -238, -308 et -376, qui sont tous des substitutions guanine (G) / adénine (A). Plusieurs études ont démontré que les génotypes TNF-A G-308A et G-238A étaient fortement associés à GD (Gu et *al.*2010). Comme il existe un fort déséquilibre de liaison au niveau de la région HLA- dont la contribution génétique à la susceptibilité aux TAI a été bien

décrite-, il n'est pas à exclure que l'association entre variants du TNF-A et TH et GD ne serait pas due au polymorphisme lui-même mais plutôt à un variant d'un gène lié (Duraes et *al.*,2014).

### **Interférons- $\gamma$ (IFN $\gamma$ ) :**

IFN- $\gamma$  est une cytokine multifonctionnelle produite par les lymphocytes T auxiliaires Th1 et les cellules NK, qui définit également le développement des cellules Th1. Le gène de l'IFN- $\gamma$  humain est situé sur le chromosome 12 q24.1. Ce gène enjambe 5,4 kb et contient quatre exons codant pour une protéine de 146 acides aminés. Comme d'autres cytokines, la région codant pour l'IFN- $\gamma$  est invariante, cependant, plusieurs polymorphismes dans les régions non codantes, telles que + 874A / T, CA répétition microsatellite et -179 G / T dans la région du promoteur, ont été rapportés. Parmi ceux-ci l'IFN- $\gamma$  +874, un polymorphisme biallélique, changement d'une adénine par une thymidine dans le premier intron du gène de l'IFN- $\gamma$  passant d'une faible à une forte production d'IFN- $\gamma$ , a été impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires (Singh et *al.*2016).

### **Interleukine-6(IL-6) :**

Le gène d'IL-6 humain est situé sur le chromosome 7 (7p21) sur une longueur d'environ 5Kb. Il est constitué de 5 exons. De nombreux sites de régulation de la transcription ont été identifiés en amont du gène de l'IL-6. C'est une cytokine inflammatoire produite par diverses cellules (des monocytes, des cellules T et des cellules ubiquitaires), capable d'induire la sécrétion d'immunoglobulines par des cellules B normales ou transformées, la génération de lymphocytes cytotoxiques, la production de protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes; l'IL-6 influence également l'hématopoïèse.

-La production d'IL-6 est déclenchée par de multiples signaux : lipopolysaccharides bactériens (LPS), virus à ARN bicaténaire, HIV, Tumor Necrosis Factor (TNF), IL-1, plateled derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), prostaglandine E2, rayonnement UVB, etc... (Galanaud et *al.* 1989).

-Dans la production des anticorps, l'IL-6 agit sur le lymphocyte B après que celui-ci ait reçu le signal antigénique et une première aide de la part des lymphocytes T helper.

- l'IL-6, comme l'IL- 1, potentialise l'effet de l'IL-2 en augmentant l'expression du récepteur de cette interleukine sur les lymphocytes T activés.

Chez les patients atteints de GD, le taux d'anticorps anti-récepteur de TSH sérique (TRAb) est corrélé avec le nombre de cellules T périphérique sécrétant l'IL-6(Corrales et *al.*1997).

Le polymorphisme dans la régions régulatrice de l'IL-6 -174 C/G a été impliqué pour moduler le risque de maladies auto-immunes, éventuellement en influençant l'expression de la protéine et pourrait être critique pour l'étiologie de l'HT ( Baki et *al.*2012).

### 3.3.2 Gènes des cytokines anti-inflammatoires :

#### **Interleukine-10(IL-10):**

Le gène de l'IL-10 contient cinq exons qui sont séparés par quatre introns et occupe environ 5,1 kb sur le chromosome 1, entre 1q31 et 1q32. Trois polymorphismes bialléliques de type SNP ont été décrits dans la région du promoteur : -1082 (G / A), -819 (C / T) et -592 (C / A). Il existe un déséquilibre de liaison entre les SNP -819 et -592 parce que l'allèle C de -819 est toujours présent quand il existe un allèle C -592, tandis que l'allèle T est toujours présent dans -819 lorsque l'allèle A est en -592 (da Silva et *al.*2015). Le polymorphisme dans les régions régulatrice de l'IL-10 -1082 A/G a été impliqué dans la modulation du risque de maladies auto-immunes, éventuellement en influençant l'expression de la protéine et pourrait être critique dans la susceptibilité à la HT (Baki et *al.*2012).

L'IL-10 est produite par les monocytes, les lymphocytes Th2 et les cellules B. Cette cytokine inhibe la production des cytokines des lymphocytes Th1 et des cellules T CD8+, mais pas celle des lymphocytes Th2. Néanmoins, l'IL-10 n'affecte pas la prolifération des lymphocytes Th1 et T CD8 +, mais induit la prolifération des cellules B et la production d'immunoglobulines. IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire (da Silva et *al.*2015).

#### **Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ 1):**

Le gène humain TGF $\beta$ 1, situé sur le chromosome 19q13, contient sept exons qui donnent naissance à une protéine précurseur de 390 acides aminés. À ce jour, plusieurs SNP dans le gène TGF- $\beta$ 1 ont été identifiés [14]. Parmi ceux-ci, deux sont situés dans l'exon 1 changeant la séquence d'acides aminés du peptide signal (aux positions + 869 à + 915) résultant en des substitutions Leucine/ Proline en position 10 et Arginine/Proline en position 25, respectivement. Plusieurs chercheurs ont rapporté que ces polymorphismes sont liés à des niveaux plus élevés de TGF- $\beta$ 1 et sont liés à diverses maladies auto-immunes (Vural et *al.* 2015). Sur la base des effets modulateurs du TGF- $\beta$ 1 dans le système immunitaire et en particulier sur les cellules thyroïdiennes et le récepteur de la TSH, nous avons cherché à déterminer si les polymorphismes

au niveau des positions 10 et 25 sont des facteurs de risque pour le développement de GD et HT (Vural *et al.* 2015) ( Doru-Abbasoğlu *et al.*2014).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce présent travail, s'est déroulé au niveau du Laboratoire d'immunochimie et de neuroimmunologie et d'immunogénétique, au sein du département d'immunologie à l'Institut Pasteur d'Algérie. Il consiste en une étude cas-témoins, qui a pour but de rechercher une éventuelle association entre les polymorphismes de gènes des cytokines pro et anti-inflammatoires (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 et TGF- $\beta$ 1) et les thyroïdites auto-immunes.

### 1. Matériel

#### 1.1. Les témoins

35 sujets sains, donneurs de sang ont été pris comme témoins. Ils n'ont pas d'antécédents de maladies auto-immunes thyroïdiennes. Ils sont recrutés depuis octobre 2015 jusqu'au Mars 2016. L'âge moyen est de 35,43 avec des extrêmes de 23 à 65 ans.

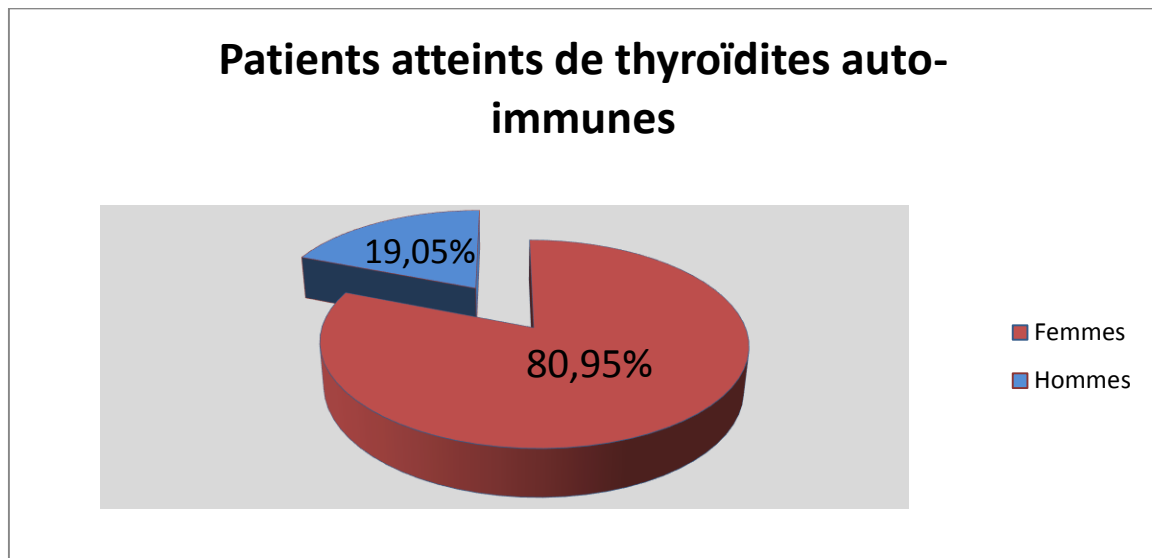
Pour chaque témoin, nous avons fait un bilan thyroïdien complet et nous avons exclu de l'étude ce qui ont des résultats positifs.

#### 1.2. Les patients

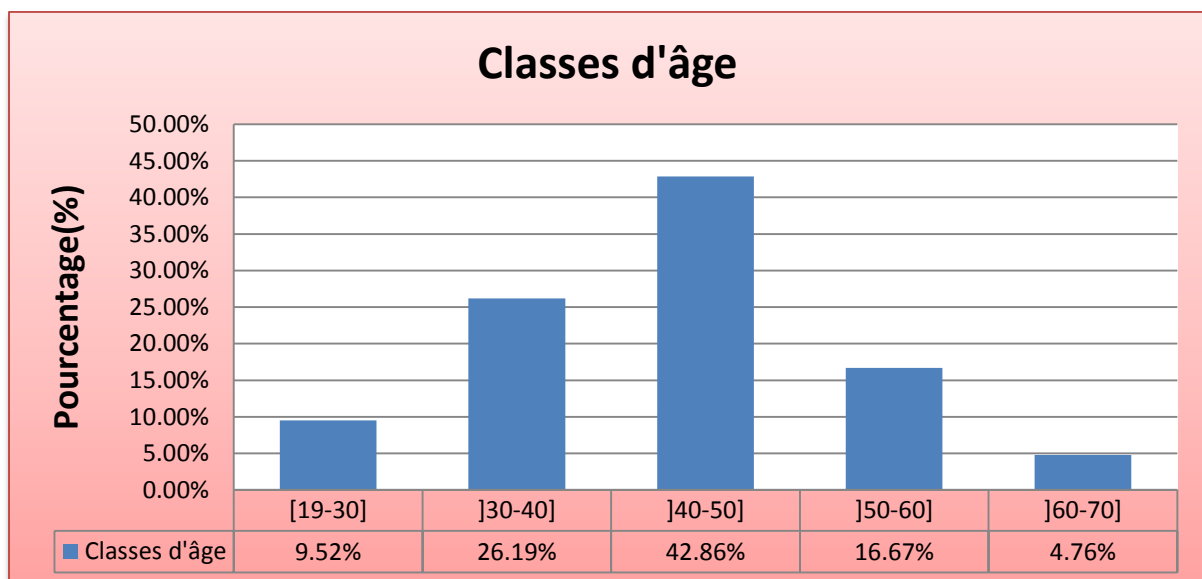
Notre étude a porté sur 42 patients atteints de thyroïdite auto-immune (34 femmes et 8 hommes). Le recueil des renseignements cliniques s'est fait grâce à une fiche de renseignement qui a été remplie pour chaque patient par moi-même plus une fiche de consentement signée par le patient (**Annexe 1,2**). Le recrutement des patients a été réalisé après la vérification du dossier médical (la maladie a été confirmée par le médecin traitant plus des examens biologiques complémentaires). Ils sont recrutés depuis novembre 2015 jusqu'au Mars 2016 au niveau du CPMC service endocrinologie et l'Hôpital du jour.

### 1.2.1. Caractéristiques démographiques de la cohorte : Age et sexe

Notre population est répartie en 34 femmes et 8 hommes avec des proportions de 80,95% et 19,05% respectivement (**Figure8**). Selon l'âge, notre cohorte est caractérisée par un pic d'âge aux alentours de 40 à 50 ans (**Figure9**).



**Figure8:** Répartition des patients de thyroïdites auto-immunes en fonction du sexe.



**Figure9:** Histogramme représentatif de la répartition des patients de thyroïdites auto-immunes en fonction des classes d'âge.



### 1.3. Matériel biologique

Le sang des patients et des témoins a été prélevé dans des tubes avec anticoagulant : Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) (0.5M, pH=8) au 1/20<sup>ème</sup> (15 ml de sang pour 500  $\mu$ l d'anticoagulant).

### 1.4. Matériel et appareillage :

La liste du matériel et d'appareillage utilisés dans notre étude est représentée en(Annexe3).

## 2. Méthodes

L'extraction d'ADN est un pré-requis indispensable à une très large gamme de techniques de biologie moléculaire, intéressant à la fois le domaine médical (diagnostic) et le domaine de la recherche.Ce procédé peut se faire à partir de divers matériels biologiques dont essentiellement le sang.

L'extraction d'ADN a été faite par le relargage salin « Salting out ». Le génotypage des cytokines a été réalisé par la méthode PCR-SSP qui permet l'amplification des séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées dans l'étude des polymorphismes suivants :

- TNF- $\alpha$  -308 A/G
- TGF- $\beta$  10 T/C
- TGF- $\beta$  25 C/G
- IL-10 -1082 A/G
- IL-10 -819 T/C
- IL-10 -592 A/C
- IL-6 -174 C/G
- IFN- $\gamma$  +874 T/A

## 2.1 Extraction d'ADN par méthode saline (“Salting\_out”)

### 2.1.1 Principe

L'extraction de l'ADN se fait en deux temps : en premier temps, la lyse des globules rouges et blancs, et en second temps, la purification de l'ADN. La lyse des cellules en utilisant les solutions de lyse permet de mettre l'ADN en solution. Après l'étape de l'élimination des contaminants de l'ADN (protéines, lipides, ARN) en utilisant une solution à forte concentration saline, la précipitation de l'ADN se fait par addition de l'alcool qui fait apparaître la méduse d'ADN.

### 2.1.2 Mode opératoire :

#### ❖ Lyse des cellules :

Pour lyser les globules rouges, on ajoute 45 ml de la solution de lyse “Tris 5 ml(1M ;pH :08), EDTA 10 ml(0.5M ;pH :08),500 ml d'eau distillée” à 15 ml de sang, puis on le laisse 20 min dans la glace (-20°C) en agitant toutes les 5 min. À la fin de l'incubation on centrifuge pendant 10 min à 2500 tr/min à température ambiante. On élimine le surnageant et on refait cette étape deux fois de plus, jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.

Pour lyser les globules blancs, on resuspend parfaitement le culot obtenu dans 1,5 ml de solution de lyse “Tris 5 ml (1M ;pH :08), EDTA 5 ml(0,5M ;pH :08),500 ml d'eau distillée” avec 150 µl de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10% et 10 µl de Protéinase K (PK) (10 mg/ml) puis on incube le mélange une nuit au bain marie à 37°C.

#### ❖ Purification de l'ADN :

On ajoute 500 µl de NaCl 6M (35g de NaCl et 100 ml d'eau distillée), puis on agite fortement et on centrifuge 25 min à 3500 tr/min à température ambiante. On reprend le surnageant dans un nouveau tube et on ajoute 3 ml d'éthanol absolu glacial, ensuite on mélange délicatement par retournement jusqu'à l'apparition de la méduse d'ADN. On met la méduse à -20°C pendant 20 min, après on centrifuge à 3500 tr/min, puis on jette le surnageant, on ajoute 1 ml d'éthanol à 70%, et on centrifuge à 3500 tr/min pendant 10 min. l'éthanol est éliminé et on laisse sécher à température ambiante. On resuspend l'ADN dans 200 µl d'eau distillée stérile et on procède au dosage et le contrôle de la solution d'ADN qui est ensuite conservée à +4°C.

### ❖ Dosage et contrôle de qualité de la solution d'ADN

La concentration et la qualité de l'ADN ont été déterminées par spectrophotométrie à l'aide de l'appareil nano de la firme Maestrogen. Le dosage consiste à déposer 2 µl d'ADN dans l'appareil après avoir préalablement introduit un blanc (Eau distillée). Un ADN est considéré de bonne qualité si le rapport de l'absorbance A260/A280 est compris entre 1,8 et 2,0.

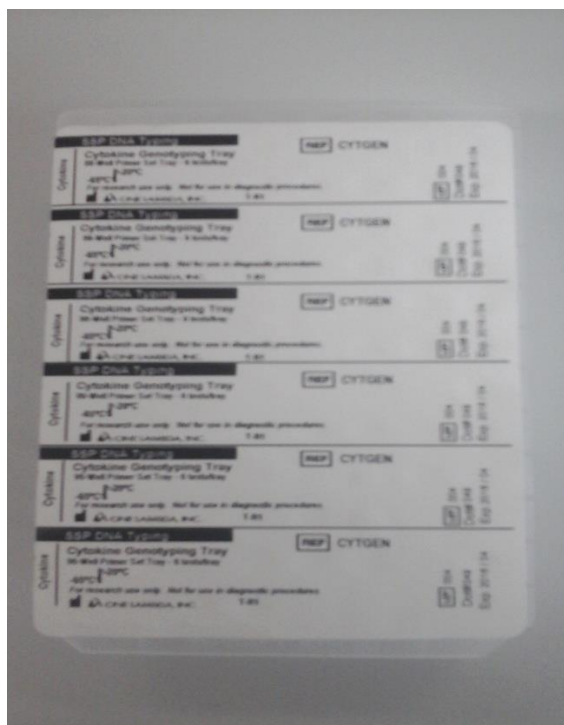
## 2.2. Le génotypage de cytokines par PCR-SSP :

### 2.2.1 Principe :

La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées sont amplifiées. Ces couples d'amorces sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles. Donc, les couples d'amorces hybridées ou presque totalement hybridées permettent l'amplification (résultat positif), tandis que les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif). Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés par coloration au bromure d'éthidium (BET) sous lumière UV, puis photographiés et interprétés. L'interprétation des résultats de PCR-SSP se base sur la présence ou l'absence de produit(s) spécifique(s) de PCR.

### 2.2.2. Mode opératoire

Pour réaliser le génotypage des cytokines par PCR-SSP, on a utilisé le kit «Onelambda». Le kit contient des plaques de 96 puits contenant les amorces spécifiques des allèles des gènes de cytokine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, l'IL-10, l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  et du gène de la globine (qui sert de contrôle interne positif de la réaction de PCR) (**Figure10**), d'un mélange global (« Ready PCR ») et des films adhésifs.



**Figure 10:** Modèle d'une plaque du PCR-SSP.

### 2.2.2.1. Etape pré-PCR :

#### Amplification d'ADN :

- On équilibre le D-mix avec la température du laboratoire : on doit sortir 30min avant la manipulation.
- On ajoute au tube de D-mix (contient 180 $\mu$ l de D-mix) 1 $\mu$ l de Taq polymérase (5UI/ $\mu$ l) ensuite on vortexe le « mix » et on dépose 9 $\mu$ l dans le puits du témoin négatif de la plaque PCR (puits N°1, indiqué par un point rouge).
- On ajoute 1 $\mu$ l d'eau distillée dans le puits du témoin négatif (puits N°1, indiqué par point rouge).
- On vortexe légèrement l'ADN et on ajoute 19 $\mu$ l d'ADN au mix déjà préparé puis on vortexe le « mix final » et on dépose 10 $\mu$ l dans le puits restants (sauf le puits négatif). On suit le même protocole avec les autres puits.
- A la fin, on met la plaque de PCR dans le thermocycleur : selon le programme suivant

- 1 cycle :  
96°C pendant 130 sec  
63°C pendant 60 sec
- 9 cycles :  
96°C pendant 10 sec  
63°C pendant 60 sec
- 32 cycles :  
96°C pendant 10 sec  
59°C pendant 50 sec  
72°C pendant 30 sec
- 1 cycle :  
15°C à l'infini

### **2.2.2.2 .Etape post-PCR (Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose)**

#### **a. Préparation du gel à 2,5%**

On dissout 1,25 g de poudre d'agarose dans 50 ml de tampon TBE 1X [1L de TBE 5X(Tris 54 g ;acide borique 27,5 g ;EDTA 20 ml et 1L d'Eau distillée) et 4L d'eau distillée], on chauffe le mélange au micro-onde pendant 2 min, on ajoute une goutte de Bromure d'éthidium (BET) à 0,07% prêt à l'emploi puis on homogénéise le tout. On verse délicatement la préparation dans le portoir du gel (Micro SPP™ Gel system de One Lambda, Inc) et on met les peignes pour creuser les puits et à la fin, on laisse solidifier le gel pendant 20 min au minimum.

#### **b.Révélation des puits d'amplification et migration**

On retire les peignes du gel .on verse 30 ml du tampon TBE sur le gel(le gel doit être submergé dans le tampon). On retire la plaque de la PCR du thermocycleur.Puis, on dépose 10 µl de produits d'amplification dans les puits du gel correspondants ensuite on laisse migrer pendant 5 min à 120V. On visualise les bandes d'ADN sous lumière UV à l'aide d'un transilluminateur UV« GEL DOC ».

### c. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats de la PCR-SSP est basée sur la présence ou non, dans chaque puits, des bandes qui correspondent à des fragments spécifiques des allèles des gènes des cytokines TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, l'IL-10, l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$ . Les puits positifs sont déterminés par la présence de deux bandes, la bande de contrôle positive interne et la bande spécifique d'un allèle correspondant à un génotype donné. Dans l'exemple mentionné dans la **figure 9**, les puits positifs sont : 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 15. À l'aide des informations contenues dans les tableaux de spécificité et d'interprétation et selon le profil de positivité des puits on peut définir le résultat de génotypage des cytokines étudiées (**voir annexe 4**).

Dans l'exemple précédent (**Figure 9**) les puits positifs correspondent aux génotypes suivants :

- ✓ TNF- $\alpha$  G/A(High),
- ✓ TGF- $\beta$ 1 T/C G/G (High) :
- ✓ IL-10 GCC/GCC(High) :
- ✓ IL-6 G/G (High) ;
- ✓ IFN- $\gamma$  T/T(High) :



**Figure 11:** Exemple d'un résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose par PCR-SSP.

## **2.3. Dosage des hormones et les anticorps thyroïdiens :**

### **2.3.1. Matériel biologique :**

Le dosage s'effectue sur le sérum uniquement, recueilli sur des tubes secs.

Pour récupérer le sérum, on centrifuge le sang à 3500 t/min pendant 5 min à température ambiante, Après on vérifie le sérum (Absence de l'hémolyse ou de lipémie), ensuite le sérum est fractionné dans des épindorfs et congelé à -20°C avant être analysé. Il sera décongelé à température ambiante juste avant l'utilisation.

Le dosage doit être réalisé sur les automates de la gamme LIAISON® Analyser.

### **2.3.2 .Matériel non biologique :**

#### **2.3.2.1. Dosage de TSH:**

##### **Principe du dosage:**

La méthode de détermination quantitative de TSH est un dosage immunologique de type sandwich par chimiluminescence. Les particules magnétiques (phase solide) sont revêtues d'un anticorps monoclonal spécifique de la souris, un autre anticorps monoclonal est lié à un dérivé d'isoluminol (conjugué anticorps-isoluminol). Pendant l'incubation, la TSH présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles se lie à un anticorps monoclonal lié à la phase solide, et un anticorps conjugué réagit avec la TSH est lié à la phase solide. Après l'incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Ensuite, la réaction de chimiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs Starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence (RLU, Relative Light Units) et indique la concentration de TSH présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

### 2.3.2.2. Dosage de l'hormone FT4 :

#### Principe du dosage:

La méthode de détermination quantitative de la FT4 repose sur la méthode de SPALT (Solide Phase Antigen Linked Technique).

Les particules magnétiques (phase solide) sont revêtues d'un complexe T4-protéine ; un anticorps monoclonal est lié à un dérivé de l'isoluminol (conjugué anticorps-isoluminol).

Pendant l'incubation, la FT4 entre en compétition avec le complexe T4-protéine pour les sites de liaison sur l'anticorps marqué. Après l'incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Ensuite, la réaction de chimiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs Starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence (RLU, Relative Light Units) et indique la concentration de FT4 présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

### 2.3.2.3. Dosage de l'hormone FT3 :

#### Principe du dosage :

La méthode de détermination quantitative de la FT3 repose sur la méthode SPALT (Solide Phase Antigen Linked Technique). Les particules magnétiques (Phase Solide) sont revêtues d'un complexe T3-protéine ; un anticorps monoclonal est lié à un dérivé de l'isoluminol (conjugué).

Pendant la première incubation, l'hormone libre (FT3) présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles se lie à l'anticorps monoclonal (conjugué). Pendant la seconde incubation, le conjugué réagit avec le complexe T3-protéine lié à la phase solide. Après l'incubation, le matériel non lié est éliminé par cycle de lavage. Ensuite, la réaction de chimiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs Starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence



(RLU,Relative Light Units) et indique la concentration de FT3 présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

#### **2.3.2.4. Dosage des anti-TPO :**

##### **Principe du dosage:**

La méthode de détermination quantitative des anti-TPO est un dosage immunologique de type sandwich par chimiluminescence. Les particules magnétiques (phase solide) sont revêtues de TPO recombinante ;des anti-IgG humaines sont liés à un dérivé de l'isoluminol(conjugué anticorps-isoluminol).

Les échantillons sont prédilués par l'automate d'immunoanalyse. Pendant la première incubation, la TPO revêtant les particules magnétiques se lie aux anticorps anti-TPO .Après l'incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Pendant la seconde incubation, les anticorps anti-IgG humaines se lient aux complexe TPO/anti-TPO.Après l'incubation,le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Ensuite,la réaction de chimiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs Starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol,est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence(RLU,Relative Light Units)et indique la concentration d'anti-TPO présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

#### **2.3.2.5. Dosage des anti-Tg :**

##### **Principe du dosage :**

La méthode de détermination quantitative des anti-Tg est un dosage immunologique de type sandwich par chimiluminescence. Les particules magnétiques (phase solide) sont revêtues de Tg ; un anti-IgG humaine est lié à un dérivé de l'isoluminol(conjugué anticorps-isoluminol).

Les échantillons sont prédilués par l'automate d'immunoanalyse. Pendant la première incubation, la Tg revêtant les particules magnétiques se lie aux anticorps anti-Tg .Après l'incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Pendant la seconde incubation, les anticorps anti-IgG humaines se lient aux complexe Tg/anti-Tg.Après l'incubation,le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage.

Ensuite, la réaction de chimiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs Starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence (RLU, Relative Light Units) et indique la concentration d'anti-Tg présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

### 3. Analyse statistique :

Les fréquences alléliques des gènes de cytokines (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 et TGF- $\beta$ 1) chez les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins ont été calculées selon la formule suivante : fréquence de l'allèle X = Nombre de l'allèle X / 2N (N étant le nombre de patients ou de témoins). La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients et les témoins a été faite à l'aide du test khi-deux de Pearson et du test exact de Fisher, lorsque l'effectif est inférieur à 5, on a utilisé la correction de Yates (elle consiste à soustraire la valeur 0.5 des effectifs puis calculer le khi-deux de Pearson). Les valeurs « p » inférieures à 0,05 (<0,05), calculées avec le test khi-deux de Pearson ou après correction (Pc), ont été considérées statistiquement significatives. Devant une différence statistiquement significative, on a calculé l'Odds ratio (OR) et son intervalle de confiance (IC) à 95 % ; l'OR permet d'apprécier le degré de causalité de l'allèle en question avec la maladie. Quand le OR et son IC sont supérieurs à 1 (>1) on parle de prédisposition de l'allèle du gène étudié, et quand le OR et son IC sont inférieurs à 1 (<1) on parle d'effet de protection de l'allèle étudié.

L'ensemble des calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Compare2-Winpepi version 11,44 (Abramson, 2011).

### Chapitre III : Résultats

#### 1. Les taux d'hormones et des anticorps spécifiques de la thyroïde :

Les résultats du dosage hormonaux et le dosage des anticorps spécifiques de la thyroïde ont été réalisés par l'automate de la gamme LIAISON® Analyser (Chimiluminescence) (Voir **Tableau3**)

**Tableau 3:**Taux de TSH, FT4, FT3 et taux des anti-TPO et anti-Tg chez les patients.

Taux	TSH ( $\mu$ UI/ml)	FT4 (pmol/l)	FT3 (pmol/l)	Anti-TPO (UI/ml)	Anti-Tg (UI/ml)
Moyenne	12,93	12,88	4,75	551,94	1040,31
Ecartype	39,41	3,59	1,16	712,17	1686,39

#### 2. Etude du génotypage des cytokines (IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, et TGF- $\beta$ 1) dans les thyroïdites auto-immunes :

##### 2.1. Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et témoins:

###### ✓ Polymorphisme en position (-308) du gène TNF-A:

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques de polymorphisme (-308A/G) du gène de TNF-A chez les patients atteints des thyroïdites auto-immunes, comparée aux témoins, montre une différence statistiquement significative pour :

Le phénotype « High » est plus fréquent chez les patients (40,48% versus 17,14%,  $P_c=0,048$ ,  $OR=3,29$ ,  $IC=1,02-11,64$ ).cet résultat suggère que le phénotype « High » est susceptible au développement des MAIT.Le phénotype « Low » est plus fréquent chez les témoins (59,52% versus 82,86%,  $P_c=0,048$ ,  $OR=0,3$ ,  $IC=0,09-0,98$ ), ce dernier semble être un protecteur.

(Voir **Tableau4**)

**Tableau4:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF-A (-308 A/G) entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Patients (%) (n=42)	Témoins(%) (n=35)	P	OR	IC
TNF- $\alpha$ (-308)					
Fréquence de l'allèle A	17(20,24)	7(10)	0,128	—	—
Fréquence de l'allèle G	67(79,76)	63(90)	0,128	—	—
GG	26(61,90)	29(82,86)	0,076	—	—
AG	15(35,71)	5(14,29)	0,061	—	—
AA	1(02,38)	1(02,38)	1	—	—
Low	25(59,52)	29(82,86)	0,048	0,3	0,09-0,98
High	17(40,48)	6(17,14)	0,048	3.29	1.02-11,64

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

✓ **Polymorphismes de l'IL-6, IFN- $\gamma$  et TGF- $\beta$ 1 :**

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques ne montre aucune différence significative en position (-174 C/G) du gène IL-6, (+874T/A) du gène de l'IFN-G et en position (10C/T), ( 25 C /G) du gènes de TGF- $\beta$ 1 chez les patients atteints des thyroïdites auto-immunes, comparée aux témoins (**Voir Tableau 5,6,7**).

**Tableau5:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Patients (%) (n=42)	Témoins(%) (n=35)	P
IL-6 (-174)			
Fréquence de l'allèle G	71(84,52)	60(85,71)	1
Fréquence de l'allèle C	13(15,48)	10(14,29)	1
GG	34(80,95)	26(74,29)	0,67
CG	3(07,14)	8(22,86)	0,102
CC	5(11,90)	1(02,86)	0,295
Low	5(11,90)	1(02,86)	0,295
High	37(88,10)	34(97,14)	0,295

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 6:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN- $\gamma$  entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Patients (%) (n=42)	Témoins(%) (n=35)	P
IFN- $\gamma$ (+874)			
Fréquence de l'allèle T	38(45,24)	30(42,86)	0,894
Fréquence de l'allèle A	46(45,76)	40(57,86)	0,894
TT	12(28,57)	7(20)	0,546
TA	14(33,33)	16(45,71)	0,382
AA	16(38,10)	12(34,29)	0,914
Low	16(38,10)	12(34,29)	0,914
High	12(28,57)	7(20)	0,546
Intermediate	14(33,33)	16(45,71)	0,382

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 7:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Patients (%) (n=42)	Témoins(%) (n=35)	P
TGF- $\beta$ (10)			
Fréquence de l'allèle T	51(60,71)	38(54,29)	0,522
Fréquence de l'allèle C	33(39,29)	32(45,71)	0,522
TT	14(33,33)	11(31,43)	1
CT	23(54,76)	16(45,71)	0,574
CC	5(11,90)	8(22,86)	0,331
TGF- $\beta$ (25)			
Fréquence de l'allèle G	80(95,24)	63(90)	0,346
Fréquence de l'allèle C	4(04,76)	7(10)	0,346
GG	38(90,84)	28(80)	0,327
CG	4(09,52)	7(20)	0,327
CC	0(0)	0(0)	
Low	1(02,38)	2(5,71)	0,872
High	34(80,95)	22(62,86)	0,129
Intermediate	7(16,67)	11(31,43)	0,21

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

✓ **Polymorphisme de l'IL-10 :**

Le polymorphisme (-1082G/A) du gène de l'IL-10 ne montre aucune différence significative lors de la comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins dans cette position.

Tandis que les comparaisons en position (-819T/C) et (-592A/C) du même gène montrent une différence statistiquement significative pour les fréquences génotypiques (38,10% versus 62,86% , $P_c=0,053$ , $OR=2,91$ , $IC=1,04-8,33$  pour le génotype 'TC' ; 57,14% versus 31,43%, $P_c=0,043$ , $OR=$ , $IC=$  pour le génotype 'CC' ).Ceux-ci suggère que le génotype homozygote (CC) dans le polymorphisme en position (-819T/C) et (-592A/C) est un facteur de susceptibilité génétique aux développements des MAIT(**Voir tableau 8**).

**Tableau 8 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Patients (%) (n=42)	Témoins(%) (n=35)	P	OR	IC
IL-10 (-1082)					
Fréquence de l'allèle G	37(44,05)	26(37,14)	0,482	—	—
Fréquence de l'allèle A	47(55,95)	44(62,86)	0,482	—	—
GG	8(19,05)	4(11,43)	0,547	—	—
AG	21(50)	18(51,43)	1	—	—
AA	13(30,95)	13(37,14)	0,741	—	—
IL-10(-819)					
Fréquence de l'allèle T	20(23,81)	26(37,14)	0,105	—	—
Fréquence de l'allèle C	64(76,19)	44(62,86)	0,105	—	—
TT	2(04,76)	2(05,71)	1	—	—
TC	16(38,10)	22(62,86)	0,053		
<b>CC</b>	<b>24(57,14)</b>	<b>11(31,43)</b>	<b>0,043</b>	<b>2,91</b>	<b>1,04-8,33</b>
IL-10(-592)					
Fréquence de l'allèle A	20(23,81)	26(37,14)	0,105	—	—
Fréquence de l'allèle C	64(76,19)	44(62,86)	0,105	—	—
AA	2(04,76)	2(05,71)	1	—	—
AC	16(38,10)	22(62,86)	0,053		
<b>CC</b>	<b>24(57,14)</b>	<b>11(31,43)</b>	<b>0,043</b>	<b>2,91</b>	<b>1,04-8,33</b>
Low	13(30,95)	13(37,14)	0,741	—	—
High	8(19,05)	4(11,43)	0,547	—	—
Intermediate	21(50)	18(51,43)	1	—	—

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

## 2.2. Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints des thyroïdites auto-immunes et témoins selon le sexe :

### A) Hommes :

#### ✓ Polymorphisme (-308A/G) du gène TNF-A:

Une différence statistiquement significative a été observée en position (-308A/G) du gène TNF- A pour le génotype « AG » qui est très fréquent chez les hommes atteints de MAIT avec un  $P=0,031$ ,  $OR=\infty$ ,  $IC=1,3253-\infty$ . Ce résultat suggère que les hommes porteur d'un génotype hétérozygote « AG » peuvent avoir un risque de développer une thyroïdite auto-immune (Voir Tableau 9).

**Tableau9 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$  entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Hommes(Malades)% (n=8)	Hommes(Témoins)% (n=8)	P	OR	IC
TNF- $\alpha$ (-308)					
Fréquence de l'allèle A	5(31,25)	2(12,50)	0,392	—	—
Fréquence de l'allèle G	11(68,75)	14(87,50)	0,392	—	—
GG	3(35,50)	7(87,50)	0,121	—	—
<b>AG</b>	<b>5(62,50)</b>	<b>0(0)</b>	<b>0,031</b>	<b>Infinity</b>	<b>1,3253-Infinity</b>
AA	0(0)	1(12,50)	1	—	—
Low	3(37,50)	7(12,50)	0,121	—	—
High	5(62,50)	1(12,50)	0,121	—	—

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

#### ✓ Polymorphismes des gènes de l'IL-6, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10 et TGF- $\beta$ 1 :

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques au niveau de polymorphisme en position (-174G/C) du gène IL-6, (+874T/A) du gène IFN-G et en position

(-1082A/G),(-819 T/C) et (-592A/C) du gène IL-10 et (10T/C)(25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 ne montre aucune différence statistiquement significative (**Voir Tableau 10,11,12,13**).

**Tableau 10:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Hommes(Malades)% (n=8)	Hommes(Témoins)% (n=8)	P
IL-6 (-174)			
Fréquence de l'allèle G	1(06,25)	3(08,57)	0,593
Fréquence de l'allèle C	15(93,75)	13(81,25)	0,593
GG	7(87,50)	5(62,50)	0,564
CG	1(12,50)	3(37,50)	0,564
CC	0(0)	0(0)	
Low	0(0)	0(0)	
High	8(100)	8(100)	

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau11 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN- $\gamma$  entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Hommes(Malades)% (n=8)	Hommes(Témoins)% (n=8)	P
IFN- $\gamma$ (+874)			
Fréquence de l'allèle T	9(57,25)	9(57,25)	1
Fréquence de l'allèle A	7(43,75)	7(43,75)	1
TT	3(37,50)	1(12,50)	0,564
TA	1(12,50)	5(62,50)	0,121
AA	4(50)	2(25)	0,606
Low	4(50)	2(25)	0,606
High	3(37,50)	1(12,50)	0,564
Intermediate	1(12,50)	5(62,50)	0,121

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.



**Tableau12 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Hommes(Malades)% (n=8)	Hommes(Témoins)% (n=8)	P
IL-10 (-1082)			
Fréquence de l'allèle G	5(31,25)	6(37,50)	1
Fréquence de l'allèle A	11(68,75)	10(62,50)	1
GG	1(12,50)	1(12,50)	1
AG	3(37,50)	4(50)	1
AA	4(50)	3(37,50)	1
IL-10(-819)			
Fréquence de l'allèle T	4(25)	8(50)	0,273
Fréquence de l'allèle C	12(75)	8(50)	0,273
TT	1(12,50)	1(12,50)	1
TC	2(25)	6(75)	0,134
CC	5(62,50)	1(12,50)	0,121
IL-10(-592)			
Fréquence de l'allèle A	4(25)	8(50)	0,273
Fréquence de l'allèle C	12(75)	8(50)	0,273
AA	1(12,50)	1(12,50)	1
AC	2(25)	6(75)	0,134
CC	5(62,50)	1(12,50)	0,121
Low	4(50)	3(37,50)	1
High	1(12,50)	1(12,50)	1
Intermediate	3(37,50)	4(50)	1

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 13:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF-β1 entre les hommes atteints des thyroïdites auto-immunes et les hommes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Hommes(Malades)% (n=8)	Hommes(Témoins)% (n=8)	P
TGF-β (10)			
Fréquence de l'allèle T	9(56,25)	11(68,75)	0,715
Fréquence de l'allèle C	7(43,75)	5(31,25)	0,715
TT	2(25)	4(50)	0,606
CT	5(62,50)	3(37,50)	0,617
CC	1(12,50)	1(12,50)	1
TGF-β (25)			
Fréquence de l'allèle G	15(93,75)	15(93,75)	1
Fréquence de l'allèle C	1(06,25)	1(06,25)	1
GG	7(87,50)	6(75)	1
CG	1(12,50)	2(25)	1
CC	0(0)	0(0)	
Low	0(0)	0(0)	
High	6(75)	7(87,50)	1
Intermediate	2(25)	1(12,50)	1

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**B) Femmes :****✓ Polymorphismes de l'TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-10 :**

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques pour les polymorphismes des gènes de TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et l'IL-10 chez les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes, comparée aux femmes témoins, ne montre aucune différence significative (**voir Tableau 14**).

**Tableau 14:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'TNF- $\alpha$  entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Femmes(Malades)% (n=34)	Femmes(Témoins)% (n=27)	P
TNF- $\alpha$ (-308)			
Fréquence de l'allèle A	12(17,65)	5(9,26)	0,287
Fréquence de l'allèle G	56(82,35)	49(90,74)	0,287
GG	23(67,65)	22(81,48)	0,354
AG	10(29,41)	5(18,52)	0,495
AA	1(02,94)	0(0)	1
Low	22(64,71)	22(81,84)	0,244
High	12(35,29)	5(18,52)	0,244

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 15:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Femmes(Malades)% (n=34)	Femmes(Témoins)% (n=27)	P
IL-6 (-174)			
Fréquence de l'allèle G	12(17,65)	7(12,96)	0,647
Fréquence de l'allèle C	56(82,35)	47(87,04)	0,647
GG	27(79,41)	21(77,78)	1
CG	2(05,88)	5(18,52)	0,257
CC	5(14,71)	1(03,70)	0,317
Low	5(14,71)	1(03,70)	0,317
High	29(85,29)	26(96,3)	0,317

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau16 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Femmes(Malades)% (n=34)	Femmes(Témoins)% (n=27)	P
IL-10 (-1082)			
Fréquence de l'allèle G	32(47,06)	20(37,04)	0,354
Fréquence de l'allèle A	36(52,94)	34(62,96)	0,354
GG	7(20,59)	3(11,11)	0,519
AG	18(52,94)	14(51,85)	1
AA	9(26,47)	10(37,04)	0,544
IL-10(-819)			
Fréquence de l'allèle T	15(22,06)	18(33,33)	0,235
Fréquence de l'allèle C	53(76,47)	36(66,67)	0,235
TT	1(02,44)	1(03,70)	1
TC	14(41,18)	16(59,26)	0,252
CC	19(55,88)	10(37,04)	0,228
IL-10(-592)			
Fréquence de l'allèle A	16(23,53)	18(33,33)	0,319
Fréquence de l'allèle C	52(76,47)	36(66,67)	0,319
AA	1(02,94)	1(14,29)	0,76
AC	14(41,18)	16(59,26)	0,252
CC	19(55,88)	10(37,04)	0,228
Low	9(26,47)	10(37,04)	0,513
High	7(20,59)	3(11,11)	0,513
Intermediate	18(40,91)	14(51,85)	0,513

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

#### ✓ Polymorphisme de l'INF- $\gamma$ (+874) :

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques au niveau de polymorphisme (+874T/A) du gène de l'IFN-G chez les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes, comparée aux femmes témoins, montre que la différence est statistiquement significative uniquement pour les fréquences alléliques :

L'allèle 'T' est fréquent chez les témoins (45,59% versus 90,74%,  $P_c=0$ , OR= 0,09, IC=0,02-0,26). Et l'allèle 'A' est fréquent chez les femmes malades (54,41% versus 09,62 %,  $P_c=0$ , OR=11,70, IC= 3,92-41,42). Ceux-ci signifient que l'allèle 'A' prédispose aux MAIT chez les femmes atteintes. Tandis que l'allèle T protège contre les MAIT chez les femmes témoins (voir Tableau 17).

**Tableau17** : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène d'IFN- $\gamma$  entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Femmes(Malades)% (n=34)	Femmes(Témoins)% (n=27)	P	OR	IC
IFN- $\gamma$ (+874)					
Fréquence de l'allèle T	31(45,59)	49(90,74)	0	0,09	0,02-0,26
Fréquence de l'allèle A	37(54,41)	5(09,26)	0	11,70	3,92-41,42
TT	9(26,47)	6(22,22)	0,934	—	—
TA	13(38,24)	11(40,74)	1	—	—
AA	12(35,29)	10(37,04)	1	—	—
Low	12(35,29)	10(37,04)	1	—	—
High	9(26,47)	6(35,29)	0,744	—	—
Intermediate	13(38,24)	11(40,74)	1	—	—

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

#### ✓ Polymorphisme de TGF- $\beta$ 1 :

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques des gènes de cytokines chez le sexe féminin, montre que la différence est statistiquement significative pour la fréquence phénotypique dans le polymorphisme (10 T/C) et (25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 (82,35% versus 55,56% ;  $P_c=0,046$  ; OR= à l'infinie ; IC= pour le phénotype 'High' et 14,71 versus 40,74 ;  $P_c=0,045$  ; OR=, IC= pour le phénotype Intermediate). Nos résultats suggèrent que le phénotype « High » est un facteur de risque chez les femmes atteintes et le phénotype « Intermediate » protège les femmes non malades contre les MAIT (voir **Tableau 18**).

**Tableau 18:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$ 1 entre les femmes atteintes des thyroïdites auto-immunes et les femmes témoins.

Polymorphisme/Fréquences	Femmes(Malades)% (n=34)	Femmes(Témoins)% (n=27)	P	OR	IC
TGF- $\beta$ (10)					
Fréquence de l'allèle T	42(61,76)	27(50)	0,263	—	—
Fréquence de l'allèle C	26(38,24)	27(50)	0,263	—	—
TT	12(35,24)	7(25,93)	0,613	—	—
CT	18(52,94)	13(48,15)	0,909	—	—
CC	4(11,76)	7(25,93)	0,274	—	—
TGF- $\beta$ (25)					
Fréquence de l'allèle G	3(04,41)	6(11,11)	0,29	—	—
Fréquence de l'allèle C	65(95,59)	48(88,89)	0,29	—	—
GG	31(91,18)	21(77,78)	0,27	—	—
CG	3(08,82)	6(22,22)	0,27	—	—
CC	0(0)	0(0)			
Low	1(02,94)	1(03,70)	1	—	—
High	28(82,35)	15(55,56)	0,046	3,73	1,02-14,46
Intermediate	5(14,71)	11(40,74)	0,045	0,25	0,06-0,97

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

### 2.3. Comparaison selon la maladie entre les fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques :

#### A).Maladie de Basedow :

##### ✓ Polymorphismes de l'TNF- $\alpha$ , l'IL-6, IFN- $\gamma$ et TGF- $\beta$ 1 :

Pour le polymorphisme (-308A/G) du gène TNF-A,(-174C/G) du gène IL-6,(+874T/A)IFN-G et (10T/C)(25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 , La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins, ne montre aucune différence statistiquement significative (**voir Tableau 19, 20, 21,22**).

**Tableau 19:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$  entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	GD (%) (n=15)	Témoins (%) (n=35)	P
TNF- $\alpha$ (-308)			
Fréquence de l'allèle A	5(16,67)	7(10)	0,546
Fréquence de l'allèle G	25(83,33)	63(90)	0,546
GG	10(66,67)	29(82,86)	0,371
AG	5(33,33)	5(14,29)	0,247
AA	0(0)	1(02,86)	1
Low	10(66,67)	29(82,86)	0,371
High	5(33,33)	6(17,14)	0,371

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau20 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	GD (%) (n=15)	Témoins (%) (n=35)	P
IL-6 (-174)			
Fréquence de l'allèle G	28(93,33)	60(85,71)	0,46
Fréquence de l'allèle C	2(06,67)	10(14,29)	0,46
GG	13(86,67)	26(74,29)	0,551
CG	2(13,33)	8(22,86)	0,7
CC	0(0)	1(02,86)	1
Low	0(0)	1(02,86)	1
High	15(100)	34(97,14)	1

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 21** : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du polymorphisme +847 du gène IFN- $\gamma$  entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	GD (%) (n=15)	Témoins (%) (n=35)	P
IFN- $\gamma$ (+874)			
Fréquence de l'allèle T	16(53,33)	30(42,86)	0,457
Fréquence de l'allèle A	14(46,67)	40(57,14)	0,457
TT	4(26,67)	7(20)	0,882
TA	8(53,33)	16(45,71)	0,853
AA	3(20)	12(34,29)	0,501
Low	3(20)	12(34,29)	0,501
High	4(26,67)	7(20)	0,882
Intermediate	8(53,33)	16(45,71)	0,853

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 22** : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$  1 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	GD (%) (n=15)	Témoins (%) (n=35)	P
TGF- $\beta$ (10)			
Fréquence de l'allèle T	17(56,67)	38(54,29)	1
Fréquence de l'allèle C	13(43,33)	32(45,71)	1
TT	3(20)	11(31,43)	0,63
CT	11(73,33)	16(45,71)	0,137
CC	1(06,67)	8(22,86)	0,335
TGF- $\beta$ (25)			
Fréquence de l'allèle G	28(93,33)	63(90)	0,879
Fréquence de l'allèle C	2(06,67)	7(10)	0,879
GG	13(86,67)	28(80)	0,872
CG	2(13,33)	7(20)	0,872
CC	0(0)	0(0)	
Low	1(06,67)	2(05,71)	1
High	13(86,67)	22(62,86)	0,178
Intermediate	1(06,67)	11(31,43)	0,129

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

#### ✓ Polymorphisme de l'IL-10 :

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques au niveau de polymorphisme (-1082G/A) du gène de l'IL-10 ne montre aucune différence significative.

Mais au niveau de polymorphisme en position (-819T/C) et en position (-592A/C) du même gène, la comparaison montre une différence statistiquement significative pour les fréquences alléliques :

L'allèle C en position (-819T/C) et en position (-592A/C) est plus fréquent chez patients ( $P=0,032$ ,  $OR=3,84$ ,  $IC=1,13-16,63$ ) ce qui signifie que cet allèle semble être susceptible au développement de GD. Tandis que l'allèle « T » en position (-819T/C) et l'allèle « A » en position (-592A/C) sont plus fréquents chez témoins ( $P=0,032$ ,  $OR=0,26$ ,  $IC=0,06-0,88$ ) et ils seraient être des allèles protecteurs de la maladie.

Aussi une différence significative pour les fréquences génotypiques en position (-819T/C) et même en position (-592G/C) :

Le génotype « CC » en position (-819T/C) et en position (-592A/C) est plus fréquents chez les patients atteints de GD ( $P=0,015$ ,  $OR=6$ ,  $IC=1,33-30,69$ ). De plus, le génotype « TC » en position (-819T/C) et le génotype « AC » en position (-592A/C) sont plus fréquents chez les témoins ( $P=0,040$ ,  $OR=0,21$ ,  $IC=0,04-0,95$ ) (voir **Tableau 23**).

**Tableau 23** : Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints de la maladie de Basedow et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	GD (%) (n=15)	Témoins (%) (n=35)	P	OR	IC
IL-10 (-1082)					
Fréquence de l'allèle G	17(56,67)	26(37,14)	0,113	—	—
Fréquence de l'allèle A	13(43,33)	44(62,86)	0,113	—	—
GG	4(26,67)	4(11,43)	0,354	—	—
AG	9(60)	18(51,43)	0,804	—	—
AA	2(13,33)	13(37,14)	0,178	—	—
IL-10(-819)					
Fréquence de l'allèle T	4(13,33)	26(37,14)	0,032	0,26	0,06-0,88
Fréquence de l'allèle C	26(86,67)	44(62,86)	0,032	3,84	1,13-16,63
TT	0(0)	2(05,71)	0,875	—	—
TC	4(26,67)	22(62,86)	0,040	0,21	0,04-0,95
CC	11(73,33)	11(31,43)	0,015	6	1,33-30,69
IL-10(-592)					
Fréquence de l'allèle A	4(13,33)	26(37,14)	0,032	0,26	0,06-0,88
Fréquence de l'allèle C	26(86,67)	44(62,86)	0,032	3,84	1,13-16,63
AA	0(0)	2(05,71)	0,875	—	—
AC	4(26,67)	22(62,86)	0,040	0,21	0,04-0,95
CC	11(73,33)	11(31,43)	0,015	6	1,33-30,69
Low	2(13,33)	13(37,14)	0,178	—	—
High	4(26,67)	4(11,43)	0,354	—	—
Intermediate	9(60)	18(51,43)	0,804	—	—

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.



**B).La thyroïdite de Hashimoto :****✓ Polymorphisme de l'TNF- $\alpha$  :**

Une différence statistiquement significative est observée en position (-308A/G) du gène TNF-A pour les fréquences phénotypiques :

le phénotype « High » est plus fréquent chez les patients atteints de TH (44,44% versus 17,14%,  $P_c=0,039$ ,  $OR=3,87$ ,  $IC=1,06-14,94$ ). Tandis que le phénotype « Low » est fréquent chez les témoins (55,56% versus 82,86% ,  $P_c=0,039$ ,  $OR=0,26$  ,  $IC= 0,07-0,94$  (**voir Tableau 24**). Ces résultats suggèrent que l'expression élevée du gène de TNF-A est un facteur de risque dans le développement de TH .mais l'expression diminuée du gène étudié est considérée comme un facteur de protection contre la maladie de TH chez les témoins.

**Tableau 24:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TNF- $\alpha$  entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	TH(%) (n=27)	Témoins (%) (n=35)	P	OR	IC
TNF- $\alpha$ (-308)					
Fréquence de l'allèle A	12(22,22)	7(10)	0,105	—	—
Fréquence de l'allèle G	42(77,78)	63(90)	0,105	—	—
GG	16(59,26)	29(82,86)	0,075	—	—
AG	10(37,04)	5(14,29)	0,076	—	—
AA	1(03,70)	1(02,86)	1	—	—
<b>Low</b>	<b>15(55,56)</b>	<b>29(82,86)</b>	<b>0,039</b>	<b>0,26</b>	<b>0,07-0,94</b>
<b>High</b>	<b>12(44,44)</b>	<b>6(17,14)</b>	<b>0,039</b>	<b>3,87</b>	<b>1,06-14,94</b>

P : p de Khi-deux de Pearson ou  $p_c$  (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

✓ **Polymorphismes des gènes de l'IL-6, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10 et TGF- $\beta$ 1 :**

La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques au niveau de polymorphisme des gènes de l'IL-6, l'IFN-G, l'IL-10 et TGF- $\beta$ 1 chez les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto, comparée aux témoins, ne montre aucune différence statistiquement significative (voir **Tableau 25,26,27,28**).

**Tableau25 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-6 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	TH(%) (n=27)	Témoins (%) (n=35)	P
IL-6 (-174)			
Fréquence de l'allèle G	43(79,63)	60(85,71)	0,513
Fréquence de l'allèle C	11(20,37)	10(14,29)	0,513
GG	21(80,77)	26(74,29)	0,774
CG	1(03,70)	8(22,86)	0,079
CC	5(18,52)	1(02,86)	0,102
Low	5(18,52)	1(02,86)	0,102
High	22(81,48)	34(97,14)	0,102

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau26 :** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IFN-G entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	TH(%) (n=27)	Témoins (%) (n=35)	P
IFN- $\gamma$ (+874)			
Fréquence de l'allèle T	32(59,26)	40(57,14)	0,958
Fréquence de l'allèle A	22(40,74)	30(42,86)	0,958
TT	8(29,63)	7(20)	0,563
TA	6(22,22)	16(45,71)	0,099
AA	13(48,15)	12(34,29)	0,4
Low	13(48,15)	12(34,29)	0,4
High	8(29,63)	7(20)	0,563
Intermediate	6(22,22)	16(45,71)	0,099

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 27:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de l'IL-10 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	TH(%) (n=27)	Témoins (%) (n=35)	P
IL-10 (-1082)			
Fréquence de l'allèle G	20(37,04)	26(37,14)	1
Fréquence de l'allèle A	34(62,96)	44(62,86)	1
GG	4(14,81)	4(11,43)	0,99
AG	12(44,44)	18(51,43)	0,772
AA	11(40,74)	13(37,14)	0,98
IL-10(-819)			
Fréquence de l'allèle T	16(29,63)	26(37,14)	0,493
Fréquence de l'allèle C	38(70,37)	44(62,86)	0,493
TT	2(07,41)	2(05,71)	1
TC	12(44,44)	22(62,86)	0,235
CC	13(48,15)	11(31,43)	0,281
IL-10(-592)			
Fréquence de l'allèle A	15(28,85)	26(37,14)	0,444
Fréquence de l'allèle C	37(71,15)	44(62,86)	0,444
AA	2(07,41)	2(05,71)	1
AC	12(44,44)	22(62,86)	0,235
CC	13(48,15)	11(31,43)	0,281
Low	11(40,74)	13(37,14)	0,98
High	4(14,81)	4(11,43)	0,99
Intermediate	12(44,44)	18(51,43)	0,772

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

**Tableau 28:** Comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques du gène de TGF- $\beta$  1 entre les patients atteints de thyroïdite de Hashimoto et les témoins.

Polymorphisme/Fréquences	TH(%) (n=27)	Témoins (%) (n=35)	P
TGF- $\beta$ (10)			
Fréquence de l'allèle T	34(53,13)	38(54,29)	1
Fréquence de l'allèle C	30(46,87)	32(45,71)	1
TT	11(40,74)	11(31,43)	0,623
CT	12(44,44)	16(45,71)	1
CC	4(14,81)	8(22,86)	0,638
TGF- $\beta$ (25)			
Fréquence de l'allèle G	52(96,30)	63(90)	0,322
Fréquence de l'allèle C	2(03,70)	7(10)	0,322
GG	25(92,59)	28(80)	0,302
CG	2(07,41)	7(20)	0,302
CC	0(0)	0(0)	
Low	0(0)	2(05,71)	0,591
High	21(77,78)	22(62,86)	0,324
Intermediate	6(22,22)	11(31,43)	0,604

P : p de Khi-deux de Pearson ou pc (correction de Yates) si le nombre d'effectifs est inférieur à 5.

### Chapitre IV : Discussion

Les cytokines jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Elles participent aussi dans la pathogénèse des maladies auto-immunes de la thyroïde. Plusieurs polymorphismes dans les gènes de cytokines ont été évoqués comme étant impliqués dans la modulation du risque de développer des maladies auto-immunes. Pour cela de nombreuses études ont été réalisées afin d'expliquer et illustrer la relation entre les niveaux d'expression des cytokines et le développement de ces maladies. Notre étude (cas /témoins) porte sur le polymorphisme des gènes de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1) dans les thyroïdites auto-immunes, et a pour but d'identifier une éventuelle association entre ces polymorphismes et les MAIT. Elle a porté sur 42 patients (27 patients atteints de TH et 15 patients atteints de GD) et 35 témoins. L'analyse des résultats montre certaines associations positives qui sont discutées ci-après.

#### Polymorphisme en position -308A/G du gène de TNF-A :

Le phénotype « High » (fort producteur de TNF- $\alpha$ ) était plus fréquent chez les patients MAIT, alors que le phénotype « Low » (faible producteur de TNF- $\alpha$ ) était plus fréquent chez les sujets témoins ( $P_c=0,048$ , OR=3,29, IC=1,02-11,64) ; ( $P_c=0,048$ , OR=0,3, IC=0,09-0,98). Une même différence a été observée en comparant les patients atteints de TH vs Témoins ( $P_c=0,039$ , OR=3,87, IC=1,06-14,94) pour le phénotype « High » et ( $P_c=0,039$ , OR=0,26, IC=0,07-0,94) pour le phénotype « Low ». Ceci suggère que le phénotype « High » serait un facteur de susceptibilité au développement de MAIT spécifiquement la TH, et que le phénotype « Low » serait quant à lui protecteur. Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autres études ayant porté sur le polymorphisme (-308A/G) du gène de TNF- $\alpha$  chez les patients atteints des MAIT (TH et GD) (**voir Tableau29**).

Ces résultats suggèrent que le polymorphisme (-308A/G) du gène de TNF- $\alpha$  semble être un facteur de susceptibilité aux MAIT. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire et la forte synthèse de cette dernière peut provoquer un déséquilibre de la balance entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et ce déséquilibre serait un facteur de risque de développer une thyroïdite auto-immune en particulier la thyroïdite de Hashimoto.

**Tableau29** : tableau comparatif entre les résultats obtenus de différentes études pour le polymorphisme (-308A/G) du gène TNF- $\alpha$  chez les patients atteints de MAIT.

<b>Auteurs</b>	<b>Population analysée</b>	<b>Témoins</b>	<b>Résultats</b>
<b>Notre étude, 2016</b>	42 patients dont 27 patients atteints de TH et 15 atteints de GD (population Algérienne).	35 sujets sains	-Le phénotype « High » était plus fréquent chez les patients. -Le phénotype « Low » était plus fréquent chez les sujets témoins. - Une même différence a été observée en comparant les patients atteints de TH vs Témoins.
<b>Backi et al.,2012</b>	190 patients atteints de TH d'une population turquise.	231 témoins	- Aucune différence significative n'a été trouvée pour les fréquences alléliques A/G, fréquences génotypiques et phénotypiques pour ce polymorphisme.
<b>Gu et al.,2010</b>	436 patients atteints de GD d'une population Chinoise.	316 témoins	-Aucune différence significative n'a été trouvée lors de la comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques dans le polymorphisme (-308A/G) du gène de TNF- $\alpha$ .

#### **Polymorphisme en position (-174 C/G) du gène de l'IL-6 :**

Dans notre étude, la comparaison des fréquences alléliques, génotypiques et phénotypique selon le sexe et selon le type de la maladie vs témoins ne montre aucune différence statistiquement significative pour le polymorphisme en position (-174C/G) du gène de l'IL-6. Ces résultats peuvent être influencés par la taille échantillonnale qui est très faible (27 TH et 15 GD). La comparaison entre nos résultats et ceux d'autres études sont illustrés dans le **tableau 30**. Il a été suggéré que l'allèle C en (-174C/G) semble être lié au risque de

développer une TH mais non pas la GD. La cytokine pro-inflammatoire l'IL-6 a un rôle important dans la pathogénèse des MAIT car elle induit principalement la différenciation des lymphocytes B et la prolifération des lymphocytes T. Il est souvent considéré que GD est un trouble dans l'immunité humorale tandis que, la TH est un Th2 le trouble dans l'immunité cellulaire. Donc, une faible sécrétion d'une cytokine IL-6 à cause d'un polymorphisme du gène de l'IL-6 peut induire l'augmentation de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires ce qui frappe la balance entre les deux classes des cytokines et l'apparition d'un risque de développer des MAIT. Nos données doivent être confirmées avec une autre étude dont le nombre d'échantillon serait plus grand.

**Tableau30 :** tableau comparatif entre les résultats obtenus de différentes études pour le polymorphisme (-174C/G) du gène de l'IL-6 chez les patients atteints de MAIT.

Auteurs	Population analysée	Témoins	Résultats
<b>Notre étude, 2016</b>	42 patients dont 27 patients atteints de TH et 15 atteints de GD (population Algérienne).	35 sujets sains	-Aucune différence n'a été trouvée dans l'étude de polymorphisme (-174C/G) du gène de l'IL-6 chez les patients atteints de TH et de GD.
<b>Inoue <i>et al.</i>,2011</b>	52 patients de GD, 56 patients de TH d'une population Japonaise.	91 témoins	- le polymorphisme étudié : (-572C/G) -Elle a montré une fréquence plus élevée du génotype homozygote « CC » (faible producteur IL-6) chez les patients atteints de GD seulement avec un P=0,0198, OR=2, IC=1,11-3,49.
<b>Duraes <i>et al.</i>,2014</b>	420 patients atteints de TH et 111 patients atteints de GD indépendant du Portugal.	735 témoins	Cette étude a montrée une fréquence plus élevée du génotype « CC » avec un P=8,3.10 <sup>-3</sup> et un OR=1,69, IC=1,15-2,51 chez les patients atteints de TH (Allèle C en position (-174 C/G) du gène de l'IL-6 semble être associé au développement de TH).

**Polymorphisme en position (+874 T/A) du gène de l'IFN- $\gamma$ :**

Nos résultats montrent une fréquence de l'allèle A du polymorphisme en position (+874T/A) du gène de l'IFN-G chez les femmes malades, avec un OR =11,70. Cet allèle semble être un allèle de susceptibilité génétique aux MAIT chez les femmes, Tandis que l'OR=0,09 pour l'allèle T montre un effet protecteur de la maladie chez les femmes. Aucune différence n'a été observée en comparant les patients MAIT et témoins. Ce résultat devra être confirmé sur un plus grand échantillonnage. De plus, il existerait peut être d'autres facteurs chez la femme qui pourrait expliquer cette discordance.

Une étude de Rekha et al qui a porté sur 190 patients (104 patients atteints de TH, 26 non TH et 60 patients atteints de GD) et 150 témoins d'une population indienne , a montré que l'allèle T prédisposerait à la TH avec un OR=3,221 mais protègerait contre la GD .Par contre, l'allèle A prédisposerait à la GD avec un OR=1,974 mais protègerait contre la TH (Rekha et *al.*,2006). Cette étude a suggéré que la forte expression du gène de l'IFN-G est impliquée dans l'inhibition des gènes de la thyroglobuline(Tg) et la thyroïde peroxydase (TPO) conduisant automatiquement à une diminution dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Également la régulation négative de TSHR en présence des niveaux élevés d'IFN- $\gamma$  contribue à l'expression inadéquate de TSHR sur les thyrocytes provoquant une stimulation inappropriée de la glande thyroïde par la TSH. On peut donc noter que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression du gène TSHR. Bien qu'une réponse mixte en cytokines est rapportée en MAIT, quelques études menées par les différents chercheurs font état d'une prédominance de la réponse immunitaire TH1 (déclenchée par les IL-2 et IFN- $\gamma$ ) à médiation cellulaire provoquant la destruction de la thyroïde et conduisant à l'hypothyroïdie (TH), alors que la réponse Th2 (déclenchée par les cytokines anti-inflammatoires) est signalé à être prédominantes dans GD. La prédominance des allèles (A) de faible production du gène de l'IFN-G dans GD comme observé dans cette étude pourrait être la raison de la présence d'une réponse Th2 relativement réponse élevée chez les patients avec GD. Ils ont été proposés le gène d'IFN-G comme l'un des gènes candidats impliqués dans la prédisposition et la pathogénèse de MAIT car son rôle est bien établi dans l'étiologie des MAIT (Rekha et *al.*, 2006).

**Polymorphisme en position (-1082A/G) (-819T/C) et (-592A/C) du gène de l'IL-10 :**

Notre étude a montrée une différence significative pour les fréquences génotypiques « CC » en position (-819T/C) et aussi en position (-592G/C) du gène de l'IL-10 à partir d'une comparaison « Patients atteints des MAIT vs Témoins » avec un  $P=0,043$ ,  $OR=2,91$ ,  $IC=1,04-8,33$ . A partir d'une comparaison « Patients atteints de GD vs Témoins », nous avons observé une différence significative pour les fréquences alléliques en position (-819T/C) et même en position (-592G/C) :

L'allèle « C » en position (-819T/C) et en position (-592A/C) est plus fréquent chez patients ( $P=0,032$ ,  $OR=3,84$ ,  $IC=1,13-16,63$ ) ce qui signifie que cet allèle semble être un facteur de susceptibilité à la GD. Tandis que l'allèle « T » en position (-819T/C) et l'allèle « A » en position (-592A/C) sont plus fréquents chez témoins ( $P=0,032$ ,  $OR=0,26$ ,  $IC=0,06-0,88$ ) et ils seraient être des allèles protecteurs de la maladie.

Nos résultats ont montré aussi une différence significative pour les fréquences génotypiques en position (-819T/C) et même en position (-592G/C) :

Le génotype « CC » en position (-819T/C) et en position (-592A/C) est plus fréquents chez les patients atteints de GD ( $P=0,015$ ,  $OR=6$ ,  $IC=1,33-30,69$ ). De plus, le génotype « TC » en position (-819T/C) et le génotype « AC » en position (-592A/C) sont plus fréquents chez les témoins ( $P=0,040$ ,  $OR=0,21$ ,  $IC=0,04-0,95$ ). Selon nos résultats, les individus porteurs de génotypes homozygotes « CC » en position (-819T/C) et (-592A/C) du gène de l'IL-10 développent un MAIT en particulier GD. Mais aucune différence significative n'a été trouvée pour le polymorphisme en position (-1082A/G).

Une autre étude sur une population taïwanaise (190 patients atteints de TH et 231 témoins) n'a pas été trouvée une différence pour les fréquences alléliques, génotypiques et phénotypiques dans l'étude de polymorphisme en position (-1082A/G) du gène de l'IL-10 chez les patients atteints de TH comparés aux témoins (Backi et *al.*, 2012). Nos résultats concordent aussi avec les résultats obtenus dans une autre étude sur une population taïwanaise (137 patients atteints de GD et 189 témoins) qui a retrouvé une fréquence de l'allèle C en position (-819) chez les GD. Il est suggéré que les individus porteurs de cet allèle peuvent sécréter plus d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire, favorise l'immunité humorale) et que l'IL-10 peut jouer un rôle dans la pathogenèse de GD parce que l'IL-10 peut agir comme un inhibiteur à la fois de la prolifération des cellules Th1 et Th2 et les réponses



de cytokines en fonction de la nature de la réponse immunitaire initiatrice (Schiau et *al.*,2007)

### **Polymorphisme en codon (10C/T) et codon (25G/C) du gène de TGF-B1 :**

Le phénotype « High » (fort producteur de TGF- $\beta$ ) semble être associée à la thyroïdite auto-immune chez les femmes (P=0,046 ; OR=3,73 ; IC=1,02-14,46). Par contre, le phénotype « Intermediate » protégerait de la maladie chez les femmes (P=0,045 ;OR=0,25 ;IC=0,06-0,97). Ce résultat semble un peu discordant puisque le TGF- $\beta$  est une cytokine anti-inflammatoire, et une forte production serait inhibitrice des réponses immunes. Toutefois, cette cytokine est nécessaire au développement des Th17 une sous-population retrouvée dans la pathologie inflammatoire chronique.

Nos résultats discordent avec ceux d'une autre étude effectuée sur 178 patients atteints de TH et 197 témoins (une population de Turquie). Il a été montré une différence statistiquement significative pour la fréquence allélique C en position (25C) avec un P=0,03 ; OR=1,87 ;IC=1,23-2,84 ;et aussi pour la fréquence génotypique hétérozygote C /G au niveau de ce polymorphisme avec un P=0,001,OR=2,53,IC=1,57-4,05 (Vural et *al.*,2015). Il a été suggéré que l'allèle C et le génotype hétérozygote C/G pourraient être de facteurs de susceptibilité génétique à la TH dans cette étude.

Le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine anti-inflammatoire est nécessaire pour maintenir l'homéostasie immunitaire et elle est impliquée dans l'infiltration des lymphocytes, la production d'auto-anticorps et la destruction de thyrocyte observée chez les patients atteints HT. TGF- $\beta$ 1 exerce des effets immunosuppresseurs puissants par l'inhibition de l'expression de cytokines pro-inflammatoires à partir des cellules immunitaires. Elle inhibe aussi l'absorption de l'iode impliqué dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes .Cette cytokine a un certain nombre d'effets spécifiques sur les cellules B et T (l'inhibition de la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, la diminution de production d'anticorps par les lymphocytes B).La carence en TGF- $\beta$ 1 peuvent contribuer au développement de MAIT car elle modifie la balance entre la réponse Th1 et Th2 et soutient l'activité de suppression physiologique normale de cellule T reg (Vural et *al.*,2015) (Akinçi et *al.*,2008).Notre étude ne montre aucune différence significative pour le polymorphisme en position (10C/T) et (25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 lors de comparaison des fréquences alléliques, génotypiques, phénotypiques chez les

patients de TH et les témoins. Vu notre faible échantillonnage (27 patients atteints de TH) il serait souhaitable d'élargir la population étudiée afin de confirmer ou d'infirmier nos résultats.

## CONCLUSION

---

### Conclusion :

Les thyroïdites auto-immunes sont des maladies spécifiques d'organes dont l'étiologie implique plusieurs facteurs tels que les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques essentiellement les gènes du CMH II. Les cytokines jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Elles sont impliquées aussi dans la physiopathologie de ces maladies.

Dans ce cadre, nous avons réalisé une étude cas/témoins portée sur 42 patients atteints des thyroïdites auto-immunes dont 27 patients touchés par la TH et 15 patients atteints de la GD comparés aux 35 témoins sains. Cette étude a pour but de trouver une éventuelle association entre les polymorphismes des gènes de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et l'IL-6) et anti-inflammatoires (l'IL-10 et TGF- $\beta$ 1) et les thyroïdites auto-immunes.

Selon nos résultats, le polymorphisme en position (-308A/G) du gène TNF-A semble être associé au développement des thyroïdites auto-immunes en particulier la thyroïdite de Hashimoto. Tandis que, le polymorphisme en position (-819T/C) et (-592A/C) du gène de l'IL-10 peut être un facteur de risque pour la maladie de Basedow. En plus, les polymorphismes (10T/C) (25C/G) du gène TGF- $\beta$ 1 et (+874T/A) pour le gène d'IFN-G sont liés aux thyroïdites auto-immunes chez les femmes atteintes dans notre population mais ces résultats sont à confirmer sur une autre population plus large.

Notre étude pourrait être complétée par :

- Une analyse de l'association de ces polymorphismes avec la sévérité des thyroïdites auto-immunes.
- Une étude de l'association entre les haplotypes dans ces polymorphismes et les thyroïdites auto-immunes.
- Il sera important aussi de mener des études sur les niveaux des cytokines (concentrations sériques).
- L'identification des facteurs génétiques de susceptibilité ou de résistance aux MAIT pourrait apporter de nouveaux outils thérapeutiques pour les patients atteints.

## Références Bibliographiques

Abramson, J. H. (2011). WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov.* 8. 1.

Anvari M, Khalilzadeh O, Esteghamati A, Momen-Heravi F, Mahmoudi M, et al. (2010) Graves' disease and gene polymorphism of TNF-alpha, IL-2, IL-6, IL-12, and IFN-gamma. *Endocrine* 37: 344–348.

Arend, W. P. (2002). *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 323.

Balaji B. Ganesh, Palash Bhattacharya, Anupama Gopisetty, and Bellur S. Prabhakar (2011). Role of Cytokines in the Pathogenesis and Suppression of Thyroid Autoimmunity. *31.721-731*.

Bartalena L., Marocci C., Tanda M.L., Manetti L., Dell'Unto E., Bartolomei M., et al. (1998). Cigarette smoking and treatment outcomes in Graves ophthalmopathy. *Ann. Intern. Med.* 129, 632-5.

Baki, M., Fevziye E. Akman , Pervin Vural , Semra Doğru-Abbasoğlu , Ayşenur Özderya , Berrin Karadağ , Müjdat Uysal ., (2012). The combination of interleukin-10 –1082 and tumor necrosis factor  $\alpha$  –308 or interleukin-6–174 genes polymorphisms suggests an association with susceptibility to Hashimoto's thyroiditis . *International Immunopharmacology* 12 543–546 .

Bednarczuk T, Kurylowicz A, Hiromatsu Y, Kiljanskic J, Telichowska A, et al. (2004). Association of G-174C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter with Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* 37: 223–226.

Belshaw BE, Ettinger SE. (1983). Thyroid diseases. Ettinger S. E. eds. *Textbook of veterinary internal medicine*, 2nd ed. Philadelphia, Saunders W. B. 1592-1614.

Brent G.A. (2010). Environmental Exposures and Autoimmune Thyroid Disease. *Thyroid*, 20, 755-61.

Caturegli P, Kimura H, Rocchi R, Rose NR (2007). Autoimmune thyroid diseases. *Current Opinion in Rheumatology* 19: 44–48.

Charrie A. (2005). Le point sur l'auto-immunité thyroïdienne, *Spectra Biologie* n° 143.

Corrales JJ, Orfao A, Lopez A, Mories MT, Miralles JM, Ciudad J. (1997). Analysis of IL-2 and IL-6 binding to peripheral blood lymphocytes in Graves disease: relationship with disease activity. *Cytometry* ; 30:118–23.

Cover T.L., Aber R.C. (1989) — *Yersinia enterocolitica*. N. Engl. J. Med., 321, 16-24.

Delévaux I, Chamoux A, Aumaître O. (2012). Stress and auto-immunity. *La Revue de médecine interne* xxx, 1–6.

Dunkelmann S., Wolf R., Koch A., Kittner C., Groth P., Schuemichen C. (2004) .Incidence of radiation-induced Graves' disease in patients treated with radioiodine for thyroid autonomy before and after introduction of a high-sensitivity TSH receptor antibody assay. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 31, 1428-34.

Doğru-Abbasoğlu, S., Pervin Vural , Merve Baki , Ayşenur Özderya , Berrin Karadağ , Müjdat Uysal ., (2014) Arg25Pro (c.915GNC) polymorphism of transforming growth factor  $\beta$ 1 gene increases the risk of developing Graves' disease. *International Immunopharmacology* 20 :366–369.

Duraes, C., et al.,(2014). Genetic Risk Factors of Autoimmune Thyroid Disease. *Plos August*. Volume 9 | Issue 8 | e105492).

Galanaud, P., Émilie, D., Leprince, C., (1989) .Une cytokine aux frontières de l'inflammation et de l'immunologie. : l'interleukine-6 (IL-6). *médecine/sciences*; 5 : 338-340

Gallois M., (2008). L'hypothyroïdie : quand la thyroïde se dérègle ?, thèse de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie de Lille 2.

Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar BS (2011) Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* 31: 721–731.

Gu,L.Q., Wei Zhu , Chun-Min Pan, Lin Zhao, Min-Jia Zhang, Jian-Min Liu, Huai-Dong Song,Guang Ning, Yong-Ju Zhao., (2010). Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) polymorphisms in Chinese patients with Graves' disease. *Clinical Biochemistry* 43 223–227.

Guyot, H., RF. (2007) Le diagnostic des carences en sélénium et iode chez les bovins. *Ann. Méd. Vét.*, 151 : 166-191.

Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y (2008) Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev* 29: 697–725.

Hazard J., Perlemuter L., (2000). *Endocrinologie*, 4ème édition, Editions Masson 484 pages, p.125 à 222.

Hollowell, JG., Staehling, NW., Flanders, WD., Hannon, WH., Gunter, EW., Spencer CA, et al. (2002) .Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. Feb 1;87(2):489 99.

Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tatusmi K, Hidaka Y, et al. (2011) Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 163: 318–323.

Klein M. (2007). Thyroïdites dans Traite d'endocrinologie. Médecine-Sciences Flammarion; Krassas, G.S., Pontlkides N. (2004) . Male reproductive function in relation with thyroid alterations. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 18 (2), 183-195.

Kuby, J., Kindt, T. J., Goldsby, R. A. et Osborne, B. A. (2007). Immunologie le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Dunod, Paris. 684.

Laurberg P., Jørgensen T., Perrild H., Ovesen L., Knudsen N., Bülow Pedersen I., et al. (2006) —The danish investigation on iodine intake and thyroid disease, DanThyr: status and perspectives. Eur. J. Endocrinol., 155, 219-28.

Lazarus, J.H., (2009).Lithium and thyroid. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 23,723-33.

Leenhardt, L., Schlumberger, M., (2003). Cancer de la thyroïde. DGS/GTND0.

Leclère J., ORGIAZZI J., ROUSSET B., et al. (1992) La thyroïde : de la physiologie cellulaire aux dysfonctions, des concepts à la pratique clinique.Paris 6<sup>ème</sup> : Expansion Scientifique Française, 573 p.

Leclère J. et al.,(2001) La thyroïde : des concepts à la pratique clinique, 2ème édition, Editions Elsevier, 617 pages, passim.

Léger, A., (2001).Pathologie thyroïdienne : diagnostic et traitement.4<sup>ème</sup> édition .Paris : Flammarion Médecine-Science, 225 p.

Liu, N., Li, X., Liu, C., Zhao, Y., Cui, B., et al. (2010) The association of interleukin-1alpha and interleukin-1beta polymorphisms with the risk of Graves' disease in a case-control study and meta-analysis. Hum Immunol 71: 397–401.

Lokrou A. (1990). La maladie de Basedow en Côte d'Ivoire. Réflexions à propos de 32 cas. Rev. Franç. Endocrinol. Clin.,31, 2 :151-15

Marieb, E.N. (1999). Anatomie et physiologie humaine. 4e édition, Edition du renouveau pédagogie Inc. Département De Boeck Université, Paris, Bruxelles. pp. 604-608.

Massart, C., Corbineau, E. (2006) .Transporteurs d'iodures et fonction thyroïdienne. Immuno-analyse et Biologie spécialisée, 21 : 138-143

Menconi F OY, Tomer Y. (2008) Graves' disease. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. Y. Shoenfeld, R. Cervera, M.E. Gershwin ed. Totowa,NJ: Humana Press. pp. 231–235.

Mikoś, H., Mikoś,M., Obara-Moszyńska, M, Niedziela,M,. ( 2014) The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). Postgraduate education 65150-155.

Mizokami T., Wu LiA., El-Kaissi S., Wall J.R. (2004). Stress and thyroid autoimmunity. *Thyroid*, 14, 1047-55.

Moro C. (2002) .La maladie de Basedow en Côte d'Ivoire, réflexions et perspectives Thèse.Méd. Abidjan , n°3024,221 p

Murray, R.K., Granner D.K., MAYES P.A. et al. (1993) .Harper's Biochemistry, 23ème ed., Norwalk,Connecticut, U.S.A. : Appleton & Lange, 919 p.

Nedlec A. (2012). Les différents facteurs impliqués dans le développement de maladies auto-immunes [Image en ligne]. 20 aout 2012 [cité le 27 novembre 2012]. Disponible: <http://www.memobio.fr/images/immu/general.jpg>.

Niepmniszcze H., PitoiaF.,Katz S.B.,ChervinR.,BrunoO.D. (2002) —Primary thyroid disorders in endogenous Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*147, 305-11.

Oliveira da Silva, N.M., Fabiana Nunes Germano , Beatris Maria Vidales-Braz ,Ricardo do Carmo Zanella , Deise Machado dos Santos , Rubens Lobato , Ana Maria Barral de Martinez . (2015). Polymorphisms of IL-10 gene in patients infected with HCV under antiviral treatment in southern Brazil. *Cytokine* 73 253–257.

Prummpel M.F.,WiersingaW.M. (1993).Smoking and Risk of Graves' Disease. *JAMA*, 269,479-82.

Prummel MF, Wiersinga WM. (2005).Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* .19: 1–15.

Quarantino, S., (2004).Models of Autoimmune thyroiditis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1 (4),417-423.

Rekha, P. L., Ishaq, M., Valluri, V., (2006) .A Differential Association of Interferon- $\gamma$  High-Producing Allele T and Low-Producing Allele A (+874 A/T) with Hashimoto's Thyroiditis and Graves' Disease. *Scandinavian Journal of Immunology* 64 :438–443.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. (2007). Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S116–S123.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5):775–787.

Sawin,C.T., (1985) .Hypothyroidism. *Medical Clinics of North America*, 69, 989-1004.

Schaffler, A., Menche, N.,(2004). Anatomie, physiologie, biologie. 2e édition française, collection « Diplôme et études infirmiers» Maloine, 27, rue de l'école-de- médecine, 75006 Paris, France. PP. 229-231.

(<http://amelioretasante.com/wp-content/uploads/2014/04/Thyro%C3%AFde-500x319.jpg>)

Schlenger, J.L., Golchot B., Grunenberger, F.(1997). Iode et fonction thyroïdienne. *Rev Méd Interne*, 18 : 709-716.

- Shiau, M. Y., Huang, C.N., Yang, T. P., Hwang, C.Y., Tsai, K.J., Chi, C.J., Chang, Y.H., (2007). Cytokine promoter polymorphisms in Taiwanese patients with Graves' disease. *Clinical Biochemistry* 40 :213–217.
- Singh, S., Sharma, A., Sunil, K. A., (2016). Combination of low producer AA-genotypes in IFN- $\gamma$  and IL-10 genes makes a high risk genetic variant for HIV disease progression. *Cytokine*.77.135–144.
- Sinha A.A., Lopez, M.T., McDevitt, H.O.(1990) Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 248: 1380–1388.
- Sternberg, S.S. (1997). *Histology for pathologists*. Lippincott-Raven Publ. 1200.
- Thebaulta.(2005). Principales carences en oligo-éléments. *Action vét.*(1708) :13-16
- Thirion, M., Percheron, S., Mira, J.P. (2006). Thyrotoxicose. *Réanimation*, 15, 497-505.
- Tomer, Y., Menconi, F.(2009). Interferon induced thyroiditis, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*23, 703-12.
- Tomer, Y.(2010). Genetic Susceptibility to Autoimmune Thyroid Disease: Past, Present, and Future. *Mary Ann Liebert, Inc.*20.715-725.
- Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. (1977). The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol. Dec*;7(6):481–93.
- Vural, P., Değirmencioğlu, S., Dođru-Abbasođlu, S., Merve Baki , Ayşenur Özdeyrya , Berrin Karadađ , Müjdat Uysal.(2015) . Arg25Pro (c.915GNC) polymorphism of transforming growth factor  $\beta$ 1 gene suggests an association with increased risk for Hashimoto's thyroiditis. *International Immunopharmacology* 28 521–524.
- Willem, J.P.(2010) *Les pathologies de la thyroïdes, les comprendre, les traiter*, Editions du Dauphin 172 pages, passim.
- Weetman ,A.P.(2000). Chronic autoimmune thyroiditis. *Werner and Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Braverman LE, Utiger RD ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 721–732.
- Weetman, AP.(2000). « Graves' disease » *N Engl J Med.* ;343:1236-48.
- Weetman, AP. (2003). Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 148(1):1–9.
- Weetman, A.P. (2009). Immune reconstitution syndrome and the thyroid. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*23, 693-702.
- Zheng, Y., Rudensky, AY. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunol* 8(5):457–462.



# ANNEXES

---

## **Annexe1 : Fiche de renseignement (Thyroïdites auto-immunes)**

### **Fiche de renseignements (thyroïdites auto-immunes).**

Nom :

Prénom :

Age :

Sexe :

Profession :

Adresse :

N° de téléphone :

Diagnostic retenu :

Date de début de la maladie :

Antécédents familiaux :

Renseignements cliniques :

- Goitre : homogène/hétérogène
- Nodules thyroïdiens
- Exophtalmie
- Maladies associées :

Echographie thyroïdienne :

Bilan biologique :

- TSH
- fT3
- fT4
- Anti-TG
- Anti-TPO
- TSI
- Autre :

Traitement :

# ANNEXES

---

## **Annexe2 : Formulaire de consentement éclairé du patient**

### **Formulaire de consentement éclairé du patient**

Je soussigné(e) Mr/ Mme.....donne mon consentement pour la participation à une étude menée au sein du Département d'Immunologie à l'Institut Pasteur d'Algérie. J'ai été informé(e) de la nature et du but de l'étude et accepte de ce fait qu'un échantillon sanguin soit prélevé et utilisé à cette fin.

Alger, le .. / .. / 201

Signature

# ANNEXES

---

## **Annexe3 : Matériel non biologiques (Appareillage)**

- Centrifugeuse GT4.11 de la firme Jouan.
- Centrifugeuse
- Bain marie Memmert de la firme Schwabach.
  
- Réfrigérateurs (+4°C, -20°C).
  
- Vortex K3S de la firme Kartell.
- Spectrophotomètre Nano-Drop de la firme Maestrogen.
- Balance PG603-S de la firme Mettler Toledo.
- Micro-onde.
- Cuve d'électrophorèse de type EC 250-90 de la firme E-C apparatus corporation.
- Equipement de capture de photo Gel Doc XR de la firme Biorad.
- Thermocycleur (PCR) Tprofessional Thermocycler de la firme Biometra.
- L'automate de la gamme LIAISON® Analyser(Chimiluminescence).

# ANNEXES

---



**Bain marie memmert**



**Spectrophotomètre NanoDrop**



**Balance PG603-S**



**Cuve d'électrophorèse EC 250-90**



**Centrifugeuse GT 4.11**



**Vortex K3S de la firme Kartell**



**Centrifugeuse**



**Thermocycleur**

## ANNEXES

---



**Equipement de capture de photo GEL DOC XR Biorad**



**L'automate de la gamme LIAISON® Analyser(Chimiluminescence).**

## ANNEXES

---

**Annexe4 : Exemple de feuille d'interprétation d'un résultat de génotypage des gènes de cytokines par PCR-SSP.**



**WORKSHEET**  
**Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004**



Cat. # CYTGEN, PCYTGEN

TNF- $\alpha$  Results \_\_\_\_\_  
 TGF- $\beta$ 1 Results \_\_\_\_\_  
 IL-10 Results \_\_\_\_\_  
 IL-6 Results \_\_\_\_\_  
 IFN- $\gamma$  Results \_\_\_\_\_

Tray Exp. Date \_\_\_\_\_  
 Tray Lot # \_\_\_\_\_  
 D-mix Lot #/Batch # \_\_\_\_\_

Name \_\_\_\_\_  
 Patient  Male  
 Donor  Female  
 Race \_\_\_\_\_ Birthdate \_\_\_\_\_ ABO/Rh \_\_\_\_\_

Sample I.D. \_\_\_\_\_  
 Relationship to Patient \_\_\_\_\_  
 Disease \_\_\_\_\_

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
<b>RESULTS</b> (mark positive locations)																
<b>PRODUCT SIZE (bp)</b>	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
<b>SPECIFICITY *</b>	Neg Ctrl	TNF- $\alpha$ promoter -308A	TNF- $\alpha$ promoter -306G	TGF- $\beta$ 1 codon 10T	TGF- $\beta$ 1 codon 10C	TGF- $\beta$ 1 codon 25C	TGF- $\beta$ 1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN- $\gamma$ intron 1 +874A	IFN- $\gamma$ intron 1 +874A
TNF- $\alpha$	G/G (low)															
	G/A (high)															
	A/A (high)															
	T/T G/G (high)															
	T/C G/G (high)															
	T/C G/C (intermediate)															
	C/C G/G (intermediate)															
TGF- $\beta$ 1	T/T G/C (intermediate)															
	C/C G/C (low)															
	C/C C/C (low)															
	T/T C/C (low)															
	T/C C/C (low)															
	GCC/GCC (high) *															
	GCC/ACC (intermediate)															
IL-10	GCC/ATA (intermediate)															
	ACC/ACC (low)															
	ACC/ATA (low)															
	ATA/ATA (low)															
IL-6	G/G (high)															
	G/C (high)															
	C/C (low)															
IFN- $\gamma$	T/T (high)															
	T/A (intermediate)															
	A/A (low)															

Test Performed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
 Read by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
 Reviewed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

\* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels.

Fiche de renseignements (thyroïdites auto-immunes).

Nom :

Prénom :

Age :

Sexe :

Profession :

Adresse :

N° de téléphone :

Diagnostic retenu :

Date de début de la maladie :

Antécédents familiaux :

Renseignements cliniques :

- Goitre : homogène/hétérogène
- Nodules thyroïdiens
- Exophtalmie
- Maladies associées :

Echographie thyroïdienne :

Bilan biologique :

- TSH
- FT3
- FT4
- Anti-TG
- Anti-TPO
- TSI
- Autre :

Traitement :



Formulaire de consentement éclairé du patient

Je soussigné(e) Mr/ Mme.....donne mon consentement pour la participation à une étude menée au sein du Département d'Immunologie à l'Institut Pasteur d'Algérie. J'ai été informé(e) de la nature et du but de l'étude et accepte de ce fait qu'un échantillon sanguin soit prélevé et utilisé à cette fin.

Alger, le ..... 200

Signature