



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



Université de BLIDA 1

Faculté Des **Sciences** de la **Nature** et de la **Vie**
Département de **Biologie** Et **Physiologie** **Cellulaire**
Institut Pasteur Algérie

MEMOIRE

De : **F**in d'**E**tude en **V**ue de l'**O**btention Du **D**iplôme de **M**aster

Option : **BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE.**

Sous le sujet de recherche :

Place du **SNP** **IRF5** « **rs752637** » dans la susceptibilité au **Lupus**
érythémateux **systémique** chez les patients **Algériens**

Présenté par :

M^{elle} : Imène CHABANNE

Soutenue le : 24/06/2018

Devant le jury composé de :

M^{me} BENCHABANE S	MCB	Présidente
M^{me} RAHIM I	MCB	Examineur
M^{me} BENDIR M	Institut Pasteur Algérie	Promoteur
M^{me} BELABED M	Institut Imagine Paris	Co-promoteur
M^{me} SAADI L	MCA	Chef d'Option

Remerciements

Au terme de ce mémoire, je remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son élaboration.

Tout d'abord je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et la persévérance pour mener à bien ce mémoire.

Je remercie énormément tout particulièrement ma co-promotrice Madame Belabed Meriem, doctorante à l'Institut Imagine de Paris, pour son aide précieux, qui m'a accompagné tout au long de mon travail, pour ses valeureux conseils, sa disponibilité, pour sa patience et son soutien précieux afin de mener ce travail à bon port.

Je tiens à remercier ma promotrice Dr Benidir Mounira, ainsi que le Pr Sallah Sofiane, et le Pr Attal Nabila, de m'avoir accueilli au sein du service d'immunologie de l'institut Pasteur d'Alger.

Un grand merci encore une fois au Pr Sallah, pour son aide, ses conseils, et sa disponibilité.

Mes vifs remerciements vont à Mme Saadi Leila « MCA » Chef d'option Biologie moléculaire et cellulaire, et chef du département de Biologie et Physiologie Cellulaire, pour son aide, son écoute, ses précieux conseils et ses encouragements.

Je remercie Madame Benchabane « MCB », d'avoir accepté de présider les membres du jury. Egalement Madame Rahim I « MCB » au département de Biologie et Physiologie Cellulaire d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce présent travail.

Je remercie le directeur et les responsables de l'Institut Pasteur de Delly Brahim, de m'avoir bien accueilli au sein de leur établissement.

Je remercie Madame Aissani R, pour son aide précieux, et à toute l'équipe du service Immunologie de l'IPA pour leur accueil, leur respect et leur gentillesse.

Je remercie mes parents qui ont toujours été présentent, leurs soutiens était la raison majeure pour surmonter tous les obstacles. Je les remercie énormément de s'être sacrifié afin de financer mes études.

A ma sœur Dila,.....A tous mes amis,..... Merci

Résumé

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune systémique complexe causée à la fois par des facteurs génétiques, endocriniens, immunologiques, et environnementaux. Le LES est caractérisé par des atteintes multi-viscérales, une rupture de tolérance vis-à-vis de l'antigène du soi, et une production accrue d'auto-anticorps. L'anomalie majeure en sérologie chez les patients est la production accrue d'interféron de type I (IFN-I), une cytokine ayant des effets stimulants puissants sur le système immunitaire.

L'analyse du génome et les études d'association chez des familles atteintes de LES ont mis en évidence des régions chromosomique hébergeant, potentiellement, des gènes de susceptibilité au LES. Cependant, le facteur régulateur de l'INF-I 5 (IRF5) sort comme le candidat idéal du fait de son implication dans la production de l'INF-I, cytokine grandement impliquée dans le développement de la pathologie.

L'objectif de cette étude est d'une part d'identifier par technologie TaqMan les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme mono-nucléotidique (SNP) « rs752637 » du gène IRF5 en position -2716 chez 87 patients lupiques, 189 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) qui servent de contrôle, et 126 individus sains non apparentés à aucune maladie articulaire ni au LES. Et d'autre part de rechercher une corrélation entre ce SNP et la production d'auto-anticorps chez les patients lupiques en se basant sur leurs données sérologiques.

Les résultats de cette étude démontrent que dans ce polymorphisme, l'allèle C et le génotype « CC » sont plus fréquents à la fois chez la population lupique, et chez le groupe contrôle par rapport au groupe de sujets sains. Ce polymorphisme n'est donc pas spécifique au LES mais pourrait influencer le déterminisme génétique du lupus érythémateux systémique et de polyarthrite rhumatoïde. De plus, ce génotype et cet allèle sont retrouvés à la fois chez les patients lupiques producteurs et non producteurs d'auto-anticorps, signifiant ainsi qu'une corrélation positive entre ce polymorphisme et la production d'auto-anticorps ne peut être faite. Le génotype « CT » pourrait en revanche avoir une implication protectrice vis-à-vis de la progression et la sévérité de la maladie lupique, étant donné qu'il est plus fréquent chez les patients lupiques non producteurs d'auto-anticorps et chez le groupe des sains. Néanmoins, les conséquences possibles de ce polymorphisme mono-nucléotidique sur l'expression de l'IRF5, et son impact fonctionnel restent à élucider expérimentalement, afin d'améliorer les technologies de la « Médecine de précision ».

Mots clés : Lupus érythémateux systémique ; maladies auto-immunes ; SNP ; IRF5 ; IFN-I ; auto-anticorps.

Summary

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex systemic autoimmune disease caused by genetic, endocrine, immunological, and environmental factors. SLE is characterized by multi-visceral involvement, tolerance to self-antigen, and increased autoantibody production. The major serologic abnormality in patients is increased production of type I interferon (INF-I), a cytokine with potent stimulatory effects on the immune system. Genome scans, as well as association studies in SLE families, indicate multiple potential chromosomal regions that harbor LES susceptibility genes. However, the regulatory factor of INF-I (IRF5) comes out as the ideal candidate because of its involvement in the production of INF-I, a cytokine that is greatly involved in the development of the pathology.

The objective of this study is to identify by TaqMan technology the allelic and genotypic frequencies of the single-nucleotide polymorphism (SNP) "rs752637" of the IRF5 gene at position -2716 in 87 lupus patients, 189 patients with rheumatoid arthritis (RA) controls, and 126 healthy individuals unrelated to any joint disease or SLE. Moreover, in the other hand to look for a correlation between this SNP and the production of autoantibodies in lupus patients based on the serological data of the patients.

The study demonstrates that in this polymorphism, the C allele and the "CC" genotype are more frequent in the lupus population, and control patients that have Algerian origin compared to healthy subjects. This polymorphism is therefore not specific to SLE but it could influence the genetic determinism of these two pathologies. Moreover, this genotype and this allele are found both in lupus producing and non-producing autoantibodies, thus indicating that a positive correlation between this polymorphism and the production of autoantibodies cannot be made. While the "CT" genotype appears to have a protective implication with respect to the progression and severity of lupus disease, as long as it is more common in non- producing autoantibody and healthy patients. Nevertheless, the possible consequences of this mononucleotide polymorphism on the expression of IRF5, and its functional impact remain to be elucidated experimentally, in order to improve the technologies of "Precision Medicine".

Key words: systemic lupus erythematosus, autoimmune diseases, SNP, IRF5, INF I, autoantibodies

المخلص

مرض الذئبة الحمراء او مرض الذئبة الحمامية الجهازية الشاملة هو مرض من أمراض المناعة الذاتية المعقدة الناجمة عن عوامل جينية، هرمونية، مناعية ، وبيئية. يتميز مرض الذئبة الحمراء باصابات متعددة ، ومهاجمة المستضدات للانسجة الذاتية الحية .

بالإضافة إلى زيادة إنتاج الاجسام المضادة. أما السبب الرئيسي للمرض هو زيادة في إنتاج النوع الأول من الأنترافرون، السيوكين ذو التأثيرات التنشيطية القوية على جهاز المناعة.

تشير فحوصات الجينوم، بالإضافة إلى دراسات الارتباط في العائلات المصابة بهذا المرض، وجود العديد من مناطق كروموزومية تؤوي متعددات الأشكال الجينية التي تشكل خطر قابلية تطوير مرض الذئبة لدى حاملها، كما أن العامل التنظيمي لعمل الأنترافرون 5 (IRF5) يصنف كمرشح مثالي بمأنه يحفز الإفراز الهائل للأنترافرون الذي يشارك بامتياز في تطوير هذا المرض.

الهدف من الدراسة يتمثل من جهة في تحديد الانماط الاليلية و الجينية للأشكال النووية المنفردة (SNP) في جين ال 'IRF5' ذو التردد (rs752637) و تموضع (-2716-) باستعمال تقنية التهجين TaqMan و ذلك عند 87 مصاب بمرض الذئبة، 189 مصاب بمرض التهاب المفاصل الروماتيزي يمثلون الشواهد، بالإضافة إلى 126 من الأفراد الأصحاء الذين لا يحتويون اي ارتباط وراثي او ظاهري للمرض . و من جهة اخرى هذه الدراسة تقوم بمقارنة نتائج التحديد الجيني و الاليلي لمصابوا الذئبة، بالنسبة لإنتاج الأجسام المضادة الذاتية استنادا لبياناتهم المصلية.

توضح نتائج هذه الدراسة ان النمط الاليلي "C" و النمط الجيني "CC" يتواجدون بكثرة و الأكثر شيوعا عند الافراد الجزائريين المصابين بمرض الذئبة و الشواهد مقارنة و الافراد الاصحاء . و منه نستنتج ان هذا التعدد هو بالتالي غير خاص بمرض الذئبة لكن يمكنه ان يكون عاملا مهما في التحديد الوراثي للمرضين. وعلاوة على ذلك هذان النمط الجيني و الاليلي يتواجدان عند المرضى مصابوا الذئبة المنتجون و الغير المنتجون للاجسام المضادة الذاتية. ومنه لا يمكن تأكيد وجود علاقة إيجابية بين هذا التعدد وإنتاج الأجسام المضادة. اما النمط الجيني "CT" له تأثير وقائي فيما يتعلق بتقدم وشدة مرض الذئبة ، طالما أنه أكثر شيوعاً عند الافراد غير المنتجين للأجسام المضادة الذاتية و مجموعة الأشخاص الأصحاء. ومع ذلك، تبقى العواقب المحتملة لهذا التعدد النوكليوتيدي المنفرد على التعبير عن IRF5 وتأثيره الوظيفي يحتاج إلى توضيح تجريبي لتحسين تقنيات "الطب الدقيق".

الكلمات المفتاحية: مرض الذئبة الحمراء; أمراض ذاتية المناعة; الاجسام المضادة الذاتية; العامل التنظيمي لعمل الأنترافرون 5; الأنترافرون; متعددات الأشكال.

SOMMAIRE

Introduction	1
Rappels bibliographiques	3
I. Réponse immunitaire et l'Auto-immunité	3
II. Lupus érythémateux systémique.....	3
II.1. Définition et historique	4
II.2. Épidémiologie	5
II.3. Les facteurs contribuant au développement de la maladie	6
II.4. Physiopathologie cellulaire et moléculaire du LES	6
III. IRF5, production d'IFN de type I et implications dans LES.....	9
III.1. Rôle du facteur de transcription IRF5 en physiopathologie du LES	10
III.2. IRF5 et la polarisation des macrophages.....	11
III. 3. IRF5, et les lymphocytes B	12
III. 3. Études génétiques des polymorphismes d'IRF5.....	12
Matériel et Méthodes	16
I. Matériel.....	14
I.1. Matériel biologique	14
I.2. Matériel non biologique	14
II. Méthodes.....	17
II.1. Extraction d'ADN.....	17
II.2. Quantification de l'ADN extrait	19
II.3. Étude du Single Nucleotide Polymorphism (SNP) par la technologie TaqMan.....	20
II.4. Recherche d'une association entre le polymorphisme SNP IRF5 (rs752637) et la susceptibilité à développer le LES	24
III. Analyse statistique	25
Résultats et discussion	27
I. Résultats	27

I. 1. Epidémiologie « Caractéristiques générales, cliniques et immunologiques des patients »	27
I. 1.1. Répartition des patients lupiques selon le sexe.....	27
I.1.2. Répartition des patients lupiques selon la tranche d'âge.....	28
I.2. Clinique	28
I.3. Profil immunologique.....	29
I.3.1. Expression des facteurs anti-nucléaires chez les patients lupiques.....	29
I.3.2. Expression des auto-anticorps anti-antigènes nucléaires solubles chez les patients lupiques	30
I.4. SNP IRF5 (rs752637) et la susceptibilité à développer le LES	32
I.5. Recherche d'une association entre le polymorphisme SNP IRF5 (rs752637) et la production des auto-anticorps spécifiques du LES	35
II. Discussion.....	42
Conclusion.....	49
Références.....	50

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ACR	Collège Américain de Rhumatologie
ADN	Acide Désoxyrébonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNn	ADN native
AEG	Altération de l'état générale
Ag	Antigène
ANA	Anticorps anti-nucléaires
Blimp-1	Protéine de maturation induite des lymphocytes B
CTS	Centre de transfusion sanguine
DAI	Activateur dépendant de l'ADN
EBV	virus d'Epstein-Barr
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	Femme
FAN	Facteurs anti-nucléiques
FC	Fragment constant
FT	Facteurs de transcription
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes
GN	Glomérulonéphrite
H	Homme
HLA	Antigène leucocytaire humain
HTA	Hypertension artérielle
IFN I	Interféron de type I
IFI	Immunofluorescence indirecte
IgG	Immunoglobuline G
IL1	Interleukine 1
IPA	Institut Pasteur d'Alger
IRF	Facteur régulateur d'interféron
ISRE	Éléments de réponse stimulés par l'interféron
LED	Lupus Erythémateux disséminé
LES	Lupus Erythémateux systémique

MAD5	Mélanome associé à la différenciation du gène-5
MØ	Macrophages
NaCl	Chlorure de sodium
NETs	Pièges extracellulaires des neutrophiles
NOD	Domaine d'oligomérisation de nucléotides
OMI	œdèmes des membres inférieures
PBR	Ponction biopsie rénale
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PKR	Protéine kinase inductible par l'interféron régulée par l'acide ribonucléique
PN	Polynucléaire neutrophile
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
RIG	Gène inductible à l'acide rétinoïque
rs	Référence du polymorphisme de nucléotide unique
SLR	Solution de lyse des globules rouges
Sm	Smith
SNP	Polymorphisme de nucléotide unique
SP	Protéine de spécificité
SS	Sujets sains
SS-A	Spondylarthropathie séronégative
SS-B	Protéine de liaison à l'acide désoxyribonucléique simple brin
TAM	Tyro3, Axl, et Mer (Récepteur tyrosine
TLR	Récepteur de type Toll
TNFα	Facteur de nécrose tumoral alpha.

Glossaire

Allèle : Version variable d'un même gène ou d'un même locus génétique, c'est-à dire une forme variée qui peut être distinguée par des variations de sa séquence nucléotidique.

Apoptose : Processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire.

Arthralgie : Douleur articulaire.

Arthrite : Désigne plus d'une centaine d'affections différentes qui se caractérisent par des douleurs à des articulations, des ligaments, des tendons, des os ou d'autres éléments du système musculosquelettique.

Gène : Unité définie localisée sur un chromosome, grâce à laquelle se transmet un caractère héréditaire.

Génotype : L'ensemble des caractéristiques génétiques d'un individu.

Glomérulonéphrite : Affection (souvent d'origine inflammatoire) du glomérule, composante du néphron, l'unité fonctionnelle du rein. Ses manifestations affectent les deux reins de manière égale.

Haplotype : Groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble.

Nécrose : La nécrose correspond à la mort anormale et non programmée d'une cellule ou d'un tissu. Elle s'oppose donc à l'apoptose et caractérise un état pathologique : infection bactérienne ou fongique.

NETose : La NETose suicidaire diffère des autres morts cellulaires par l'expulsion d'ADN nucléaire mélangé à des protéines préalablement citrullinées par l'arginine déiminase 4 des neutrophiles.

Péricardite : Inflammation du péricarde, la membrane entourant le cœur. Elle peut s'accompagner ou non d'un épanchement péricardique. On la distingue d'un épanchement péricardique, qui correspond à la présence de liquide dans le péricarde, sans obligatoirement d'inflammation.

Polymorphisme : Le polymorphisme génétique se définit par l'existence de plusieurs allèles dans une population. Ce phénomène résulte des mutations génétiques.

Prédisposition génétique : Configuration génétique d'un organisme qui le rend vulnérable à un problème de santé, l'environnement et les relations de l'organisme avec celui-ci ayant également une influence plus ou moins importante sur l'apparition ou non du problème.

Punch rénale : Stade avancé de l'atteinte rénale.

Susceptibilité génétique : Une sensibilité latente à une maladie au niveau génétique qui pourrait être déclenchée dans certaines conditions.

Syndrome de Raynaud : Maladie de Raynaud ou syndrome de Raynaud, sont deux affections légèrement différentes, ce n'est pas seulement avoir les mains ou les pieds froids. Il s'agit d'un trouble chronique de la circulation du sang dans les extrémités, qui survient de façon périodique, en cas d'exposition au froid et, plus rarement, en cas de stress émotionnel.

Tolérance : Etat de non réponse immunitaire à un antigène. Normalement, l'organisme est tolérant à ses propres constituants (Tolérance du soi, ou auto-tolérance).

Ulcération buccale : Les ulcérations buccales et l'inflammation de la bouche (stomatite) sont variables dans leur aspect et leur taille et peuvent toucher n'importe quelle partie de la bouche, y compris les lèvres. Certaines personnes peuvent présenter un gonflement et une rougeur de la muqueuse buccale ou des ulcérations isolées et douloureuses.

Variant génétique : Région du génome qui est variable d'un individu à l'autre. Il peut s'agir d'une variation mononucléotidique, où dans une localisation donnée du génome deux nucléotides différents peuvent être observés dans la population (A/T, A/G, A/C, G/C, G/T ou T/C). Classiquement, lorsqu'un variant génétique est fréquent (> 1 % de la population) on parle de polymorphisme, lorsqu'il est rare on utilise plutôt le terme mutation. Les variants génétiques les plus fréquemment étudiés dans GWAS à ce jour sont les polymorphismes mononucléotidiques (SNP).

Vespertilio : Variété de pathologie cutanée appartenant aux lupus érythémateux. Cette affection se traduit par une rougeur, accompagnée de plaques de peau, localisée sur les pommettes, la tranche du nez, le front, le cou et parfois la région du décolleté.

Y RNAs : Petits ARN non codants, composants de la particule ribonucléoprotéique Ro 60 qui est une cible d'anticorps auto-immuns chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé. Ils sont également nécessaires à la réplication de l'ADN par des interactions avec la chromatine et les protéines d'initiation.

Liste des figures

Figure 1	Les manifestations dermatologiques dans le LES (BUXERAUD <i>et al.</i> , 2016).	Page4
Figure 2	Historique du LES (Originale, 2018).	Page5
Figure 3	Physiopathologie cellulaire et moléculaire du LES (Originale, 2018).	Page7
Figure 4	Implication des IRF dans les voies de signalisation des TLR menant à la production d'IFN de type 1 et de cytokines inflammatoires (original).	Page8
Figure 5	Présentation Schématique de la structure du gène IRF5 (adapté de Lazari <i>et al.</i> , 2014).	Page10
Figure 6	Rôle du facteur de transcription IRF5 en physiologie (Originale, 2018).	Page10
Figure 7	Illustration schématique du gène IRF5 avec les positions des différents polymorphismes étudiés (Richez <i>et al.</i> , 2010).	Page12
Figure 8	Différentes étapes du génotypage par la technologie TaqMan (www.thermofisher.com).	Page21
Figure 9	Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence (original).	Page23
Figure 10	Répartition des patients lupiques selon le sexe.	Page27
Figure 11	Répartition des patients lupiques selon les tranches d'âge.	Page28
Figure 12	Répartition graphique des patients selon les manifestations cliniques.	Page30
Figure 13	Représentation graphique des différents aspects retrouvés chez les patients atteints de lupus systémique par IFI sur cellules Hep-2, pour les facteurs anti-nucléaires	Page31
Figure 14	Représentation graphique des expression des Auto Ac chez les patients lupiques A : anti-antigènes nucléaires solubles, B : Anti ADN natif	Page32
Figure 15	Représentation graphique des fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752635) chez les Patients atteints de LES vs. Sujets Sains, et sujets contrôles.	Page35
Figure 16	Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets sains, en fonction de la production des anti SSA.	Page36
Figure 17	Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti SSB.	Page37
Figure 18	Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti Sm.	Page38
Figure 19	Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti Scl-70.	Page39

- Figure 20** Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti CENP. Page40
- Figure 21** Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs sujets sains, en fonction de la production des anti ADNn. Page41

Liste des tableaux

Tableau I	Incidence des principaux anticorps antinucléaires et anticytoplasmes au cours du lupus érythémateux systémique adapté de : (Mayer <i>et al.</i> , 2005).	Page4
Tableau II	Principales études génétiques retrouvant des polymorphismes d'IRF5 associés à un risque accru de développer un lupus érythémateux systémique et leurs conséquences fonctionnelles (Originale., 2018).	Annexe4
Tableau III	Mélange réactionnel pour la PCR.	Page22
Tableau IV	Programme de la RT-PCR.	Page23
Tableau V	Comparaison des caractéristiques de la population lupique avec le groupe contrôle et le groupe sain.	Page29
Tableau VI	Fréquence des manifestations cliniques chez les patient lupiques.	Page30
Tableau VII	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752635) chez les Patients atteints de LES vs. Sujets Sains.	Page33
Tableau VIII	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets contrôles.	Page34
Tableau IX	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti SSA.	Page35
Tableau X	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti SSB.	Page36
Tableau XI	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti Sm.	Page37
Tableau XII	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti Scl-70.	Page38
Tableau XIII	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti CENP.	Page40
Tableau XIV	Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production d'anti ADNn.	Page41

Introduction

Le Lupus Erythémateux systémique ou disséminé (LES ou LED) est une maladie auto-immune non spécifique d'organe chronique, et complexe dont les causes précises restent mal connues. L'étiologie du LES est multifactorielle, elle inclut les contributions de l'environnement (tabac, infections par le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou *Porphyromonasgingivalis*, ...), les facteurs immunologiques, et la susceptibilité génétique (gènes HLA et non-HLA) (George *et al.*, 2016). Sa prévalence dans la population générale est estimée à 40 par 100 000 habitants selon les ethnies (Klein-Gitelman *et al.*, 2016).

Le LES est caractérisé par des atteintes multi-viscérales, une rupture de tolérance vis-à-vis de l'antigène du soi, et une production accrue d'auto-anticorps en réponse à des auto-antigènes (auto-Ag) nucléaires, dirigés en particulier contre l'ADN double brin (ADNdb) (Rumore *et al.*, 1990), les composants nucléaires (tels que les anticorps anti-nucléaires (ANA), et les ribonucléoprotéines) exposés à la surface des cellules apoptotiques où ils peuvent être reconnus par le système immunitaire (Baumann *et al.*, 2002). Un défaut de clairance du matériel apoptotique et nécrotique prolonge l'exposition de ces auto-antigènes au système immunitaire, et par conséquent une immuno-stimulation et une production d'auto-anticorps, entraînant la formation de complexes immuns qui se déposent dans différents tissus et organes (peau, articulations, reins, séreuses, système nerveux central, et cellules sanguines) provoquant des lésions tissulaires (Lazzari *et al.*, 2014).

Chez les patients lupiques, l'anomalie majeure en sérologie étant la présence d'auto-anticorps circulants considérés comme pathogènes, du moment où ils peuvent délivrer des acides nucléiques aux récepteurs antiviraux endosomiques de type Toll (TLR), suite à l'internalisation du complexe immunitaire via le récepteur Fc. L'implication des TLR 2, 4, 7, et 9 dans la pathogénèse du LES a été démontrée par de nombreuses études (Papadimitraki *et al.*, 2006 ; Subramanian *et al.*, 2006).

L'activation des voies TLR antivirales entraîne la production d'interféron de type I (IFN I), une famille de cytokines ayant des effets stimulants puissants sur les cellules immunitaires et critiques pour l'élimination des infections virales (Moulton *et al.*, 2017).

Au cours des trois dernières décennies, les preuves de l'implication de l'interféron de type I (IFN-I) dans la pathogénèse du lupus érythémateux systémique ont émergé (Kyogoku *et*

Tsuchiya., 2007), et environ 50% des patients ont montré une expression dérégulée des gènes impliqués dans la voie IFN appelée « signature d'interféron » (Baechler et *al.*, 2003).

Les facteurs régulateurs d'interféron (IRF) constituent une famille de facteurs de transcription, l'IRF5 faisant partie de ce groupe, régule la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN.

Fait intéressant, les polymorphismes du gène IRF5 chez l'homme peuvent entraîner des risques ou des haplotypes protecteurs vis-à-vis de la susceptibilité au LES (Zervou et *al.*, 2017), l'association entre les polymorphismes d'IRF5 et le LES est la première à avoir été détectée suite à un criblage de gènes impliqués dans la voie de l'IFN de type I chez les patients suédois, islandais et finlandais (Sigurdsson et *al.*, 2005 ; Lazzari et *al.*, 2014).

À ce jour plusieurs études de cas témoins ont été réalisées dans diverses populations, avec des ascendances ethniques variées pour mieux comprendre la physiopathologie moléculaire et cellulaire du LES. La présente étude a pour objectifs :

- La recherche d'une association entre le polymorphisme de type polymorphisme de nucléotide unique (SNP) IRF5 « rs752637 » et la susceptibilité à développer le LES chez les patients Algériens et de comparer les fréquences alléliques et génotypiques entre les patients et les sujets sains.

- La recherche d'une corrélation entre le SNP et la production d'auto-anticorps chez les patients ayant le LES, en se basant sur leurs données sérologiques.

L'Immunologie est « la science de la défense contre le non-soi dans le respect de soi ».

Jean Dausset (Klein., 1982).

I. Réponse immunitaire et auto-immunité

Le fonctionnement du système immunitaire est rapide et hautement spécifique. Dans sa globalité, il implique tellement d'organes, de molécules, de cellules, et de voies tout au long de processus interconnectés et parfois circulaires. Il a pour objectif la protection contre les micro-organismes, les matières étrangères et toxiques, ainsi que les cellules malignes. L'immunologie contemporaine distingue deux types d'immunité, l'une dite « innée » et l'autre dite « adaptative ».

Au début du vingtième siècle, Paul Ehrlich a réalisé que le système immunitaire pouvait présenter des dysfonctionnements. Ainsi, au lieu de réagir uniquement contre des antigènes étrangers, il pouvait s'attaquer au Soi. Cet état, qu'il a appelé « *horrorautotoxicus* », correspond à un syndrome clinique ayant pour nom générique « auto-immunité ».

Cette réponse inappropriée du système immunitaire, dirigeant son activité humorale liée à la production d'anticorps et/ou son activité cellulaire, par l'intermédiaire des cellules T, contre des composants du Soi est la cause des maladies auto-immunes spécifiques d'organes ou non spécifiques d'organes, tel que le Lupus Érythémateux Systémique (Owen., 2014).

II. Lupus érythémateux systémique

II.1. Définition et historique

Le lupus tire son nom du mot latin qui signifie « Loup » en référence à l'éruption écarlate en forme de masque sur le visage, caractéristique de la maladie (Figure 1) (Meyer et *al.*, 2005).

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune non spécifique d'organe qui sous forme d'inflammation chronique, se caractérise par une production d'auto-anticorps. Plusieurs mécanismes pathogéniques contribuent : à la production de ces auto-anticorps dirigés principalement contre des antigènes nucléaires du soi (Tableau 1), à la diminution de clairance des complexes immuns formés, ainsi qu'à des anomalies d'activation des lymphocytes B et T, et sont responsables de la majorité des manifestations cliniques viscérales, qui diffèrent d'un sujet à un autre (Yogita et *al.*, 2015 ; Moulton et *al.*, 2017 ; Zervou et *al.*, 2017).



Figure 1 : Les manifestations dermatologiques dans le lupus érythémateux systémique (Buxeraud *et al.*, 2016).

Tableau I : Incidence des principaux anticorps anti-nucléaires et anti-cytoplastes au cours du lupus érythémateux systémique (adapté de Mayer *et al.*, 2005).

Type d'anticorps	Fréquence (%)	Spécificité (0 à +++)
Antinoyaux (dépistage)	98	0
ADN :		
* natif	70	+++
* dénaturé	70-100	0
Histones (H2A-H2B)	50-80	+ (médicament)
Nucléosomes (chromatine)	60-80	++
Sm	5-30	+++
RNP	30-40	+
SSA	30	0
SSB	10	0
Ribosomes	10-20	+
Protéine P ribosomale	5-20	++
Cardiolipine/phospholipides	40	0

Il est communément admis qu'un patient est atteint de LES lorsqu'il remplit quatre critères au moins, simultanément ou successivement, des critères révisés du collège américain de rhumatologie (ACR) (Annexe 1) (Klein-Gitelman *et al.*, 2016).

La chronologie des découvertes les plus importantes liées au LES est résumée en Figure 2 et en Annexe 2.

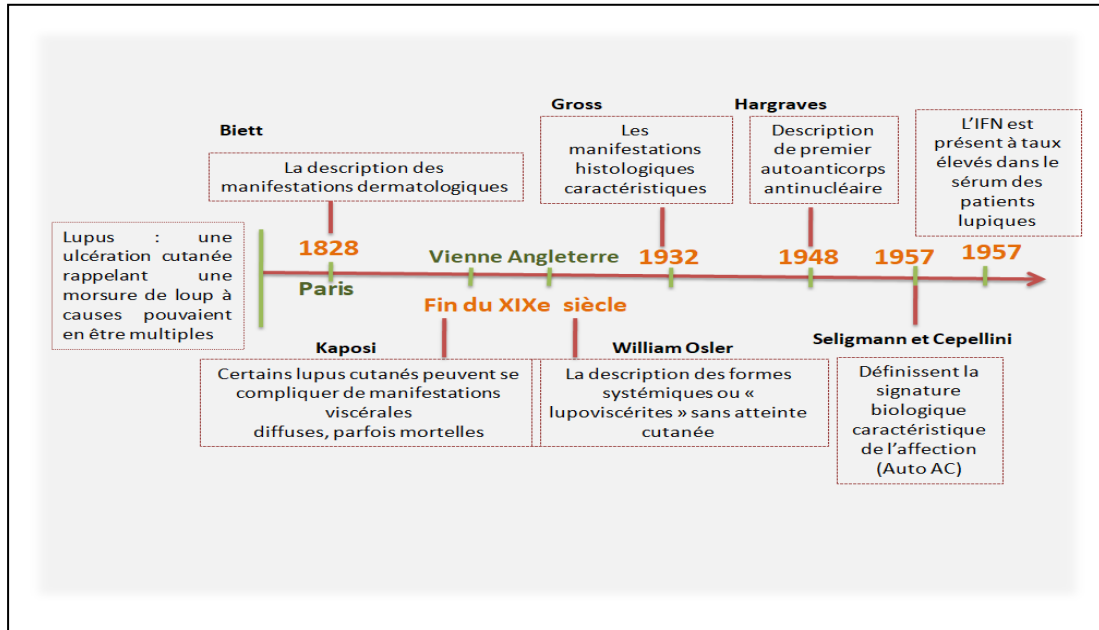


Figure 2 : Historique du lupus érythémateux systémique (originale, 2018).

II.2. Épidémiologie

Le LES est une maladie systémique, protéiforme, grave en l'absence de traitement, qui touche avec prédilection la femme jeune en période d'activité ovulatoire (20-40ans), l'œstrogène et la prolactine renforcent les réponses immunitaires (Cunningham *et al.*, 2011 ; Shelly *et al.*, 2012), avec un sex-ratio de 9 femmes pour 1 homme, mais elle peut débuter aussi chez les enfants et les personnes âgées (Mathian *et al.*, 2014). Sa prévalence dans la population générale est estimée à 40 par 100 000 habitants selon les ethnies (Petri *et al.*, en 2002 ; Klein-Gitelman *et al.*, 2016).

D'après Pineles *et al.*, en 2011, qui a résumé plus de neuf études ayant décrit l'incidence du lupus de 0,36 à 2,5 par 100 000 individus. Ces derniers comprenaient des données provenant d'Amérique du Nord, d'Europe et d'Asie, avec un taux de 3,6 pour 100 000 pour les Afro-Américains, et 0,5 pour 100 000 pour les Caucasiens

De grands progrès ont été réalisés au cours des 50 dernières années et la mortalité n'est plus que de 10% en 10 ans (contre 50% en 3 ans dans les années 1960) (Petri *et al.*, en 2002).

II.3. Facteurs contribuant au développement de la maladie

Une meilleure compréhension des facteurs contribuant au développement du LES s'est traduite ces dernières années par des progrès considérables dans la prise en charge des patients

lupiques, tant sur le plan diagnostique, pronostique que thérapeutique. C'est l'étroite interaction entre ces facteurs : immunologiques, environnementaux, et génétiques qui explique le développement et l'exacerbation de la pathologie lupique (Perdriger et *al.*, 2002 ; Dieudé et *al.*, 2012).

Cet important désordre immunologique résulte vraisemblablement d'interactions entre des gènes de susceptibilité et des facteurs d'environnement. Une prédisposition génétique est attestée par le caractère familial de l'affection observé dans environ 10 % des cas. Plusieurs gènes sont probablement impliqués, la plupart n'étant pas encore identifiés (voir Annexe 3). Parmi les facteurs d'environnement sont notamment incriminés les rayons ultraviolets, la prise d'œstrogènes, le desbiose, le tabac, voir l'infection par le virus Epstein-Barr. Le rôle nocif du stress n'est pas évaluable à ce jour (George et *al.*, 2016 ; Klein-Gitelman et *al.*, 2016).

II.4. Physiopathologie cellulaire et moléculaire du LES

Les progrès dans la compréhension du LES ont été entravés par l'hétérogénéité de la maladie (George et *al.*, 2016). Des anomalies génétiques prédisposent le système immunitaire dans un environnement particulier et sous l'influence d'événements aléatoires, au développement progressif et chronique d'une réponse immunitaire anormale (Figure 3) (Perdriger et *al.*, 2002).

La majorité des patients lupiques présentent un défaut intrinsèque dans la clairance et/ou un excès de production de substances apoptotiques et nécrotiques (mort prématurée et non programmée des cellules dans un tissu vivant respectivement). Ce défaut prolonge l'exposition des auto-antigènes au système immunitaire (Perniok et *al.*, 1998 ; Poon et *al.*, 2014). Plusieurs déficits sont actuellement décrits permettant d'expliquer ce défaut de clairance. Parmi eux :

- Les déficits (quantitatifs et/ou qualitatifs) des composants précoces de la cascade classique du complément (C1q, C1r/s, C2, C4A...), qui dans le cas normal participent à l'élimination des cellules apoptotiques, et à l'activation des cellules B et T (Truedsson et *al.*, 2007).
- Les déficits (quantitatifs et/ou qualitatifs) dans de nombreux ligands et récepteurs responsables de l'internalisation des corps apoptotiques, comme par exemple le composant du complément C1q (Slingsby et *al.*, 1996), et la protéine S qui est le ligand

des récepteurs Tyro3, Axl et Mer (TAM) exprimée par les macrophages (MØ) (Suh et *al.*, 2010).

Les polynucléaires neutrophiles (PN) sont une autre source d'auto-Ag. Ces derniers ont une propriété cellulaire consécutive à leur activation, la NETose, qui est un processus permettant la formation et la libération de pièges extracellulaires (NETs), composés de fragments d'ADN recouverts de protéines très diversifiées. Ces NETs ont un rôle bien décrit dans l'immunité anti-infectieuse, puisqu'ils sont capables de piéger et de détruire les agents pathogènes extracellulaires (Yogita et *al.*, 2015), en induisant la production d'IFN-I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) suite à l'activation des TLR9 (Garcia-Romo et *al.*, 2011 ; Villanueva et *al.*, 2011).

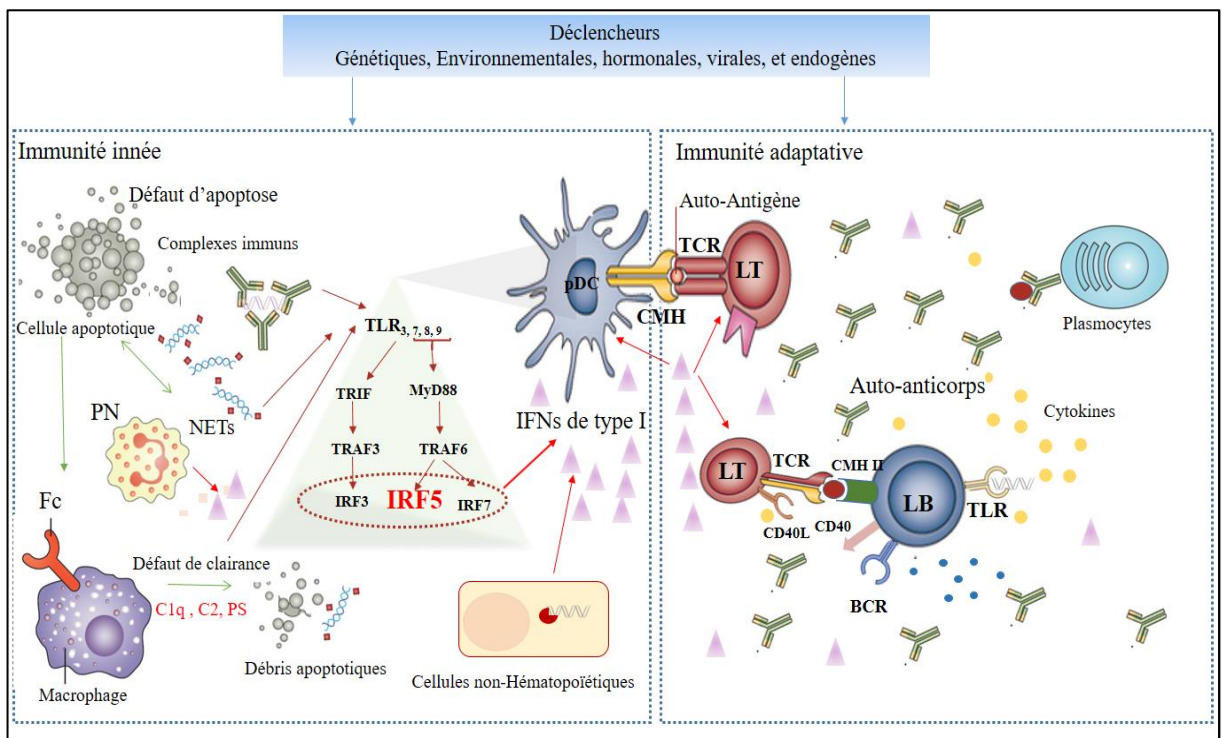


Figure 3 : Physiopathologie cellulaire et moléculaire du LES (Originale, 2018).

Les cellules dendritiques myéloïdes suite à l'internalisation de ces auto-antigènes (auto-Ag) sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1...), qui activent les lymphocytes T auto-réactifs qui par la suite attaquent les cellules du soi et contrôlent l'activation et la sécrétion d'auto-Ac par les lymphocytes B (Herrmann et *al.*, 1998 ; Mathian et *al.*, 2014 ; Moulton et *al.*, 2017).

De plus, les TLR de ces cellules présentatrices d'auto-ag sont activés suite à l'internalisation du complexe immun via le récepteur Fc, permettant ainsi le développement d'une réponse antivirale. De nombreuses études ont démontré que chez l'humain l'activation du TLR2, du TLR4, du TLR7, et du TLR9 par l'ADNdb par exemple, participe à la pathogénèse du LES (Lartigue *et al.*, 2009 ; Moulton *et al.*, 2017 ; Tsokos *et al.*, 2016). L'une des conséquences majeures de l'activation de la voie TLR antivirale est l'augmentation de production de l'INF de type I, qui avec la présence d'auto-anticorps présentent les anomalies majeures en sérologie. L'INF- α décrite comme étant la cytokine chef d'orchestre de la réaction auto-immune en favorisant la perte de tolérance en diminuant le développement des lymphocytes T régulateurs (Ohl et Tenbrock., 2015), et en favorisant la différenciation des LB, qui amplifient la réponse inflammatoire par la sécrétion d'auto-AC (Mathian *et al.*, 2014).

L'implication des IRF dans la production d'INF de type 1 et de cytokines inflammatoires par le biais des voies de signalisation des TLR est représentée dans la figure 3.

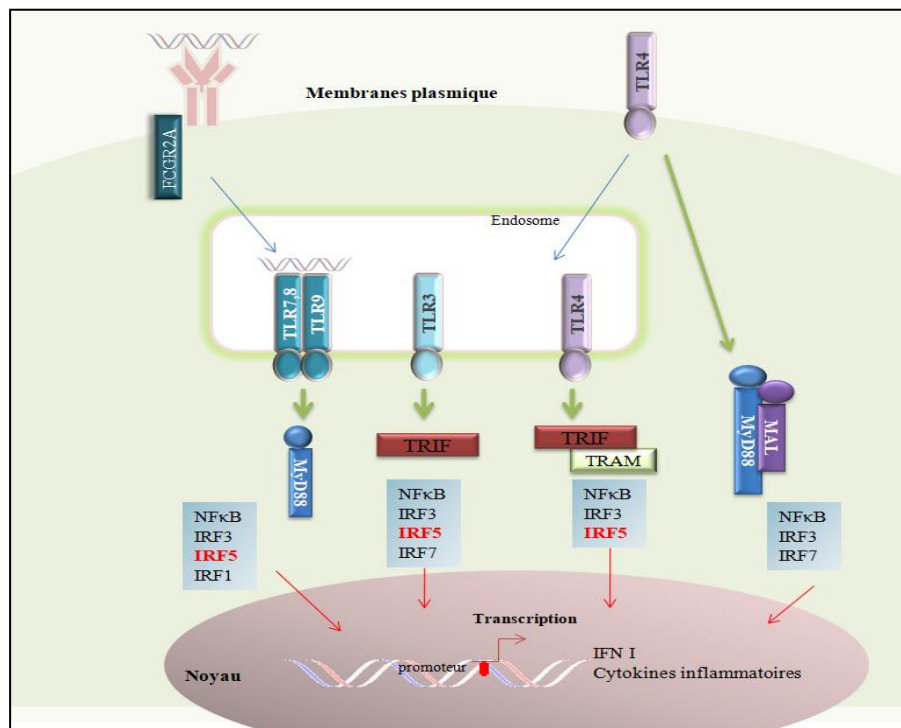


Figure 4 : Implication des IRF dans les voies de signalisation des TLR menant à la production d'IFN de type 1 et de cytokines inflammatoires (originale, 2018).

Une prédisposition génétique est attestée par le caractère familial de l'affection observé dans environ 10 % des cas. Plusieurs gènes sont donc impliqués (voir annexe 3).

Au cours des trois dernières décennies, des preuves de l'implication de l'interféron de type I (IFN-I) dans la pathogenèse du SLE ont émergé (Kyogoku et Tsuchiya., 2007), et environ 50% des patients ont montré une expression dérégulée des gènes impliqués dans la voie IFN appelée « signature d'interféron » (Baechler et *al.*, 2003).

III. IRF5, production d'IFN de type I et implications dans LES

Les IRF constituent une famille de facteurs de transcription qui régulent la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN. Ils sont stimulés par les récepteurs de type Toll et les récepteurs intra-cytoplasmiques reconnaissant des motifs d'acides nucléiques viraux ou bactériens (les hélicases de type RIG [RIG-1, MAD5], les récepteurs de type NOD et le récepteur DAI),

Les IRF sont impliqués dans la défense innée antimicrobienne, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Sigurdsson et *al.*, 2005 ; Niewold et *al.*, 2011).

Neuf protéines distinctes sont retrouvées chez l'humain, en plus de l'IRF3 et 7, le facteur de transcription IRF5 a été impliqué dans la production d'IFN de type I (Barnes et *al.*, 2001 ; 2003).

Le gène IRF5 se situe sur le chromosome 7 (7q32.1). La protéine est un polypeptide de 60-63 kDa, composé d'un domaine en N-terminal de liaison à l'ADN (DBD), caractérisé par la présence de 5 résidus tryptophane formant un motif (Helix-Turn-Helix), un domaine d'association d'IRF en C-terminal (IAD), et une région centrale reliant le DBD et le IAD. Avant le domaine BDB, un domaine de liaison des facteurs régulateurs de la voie d'IFN (IRFE) est retrouvé, ainsi qu'un autre domaine, l'élément de réponse stimulé par l'INF (ISRE) (Fujii et *al.*, 1999) (Figure4).

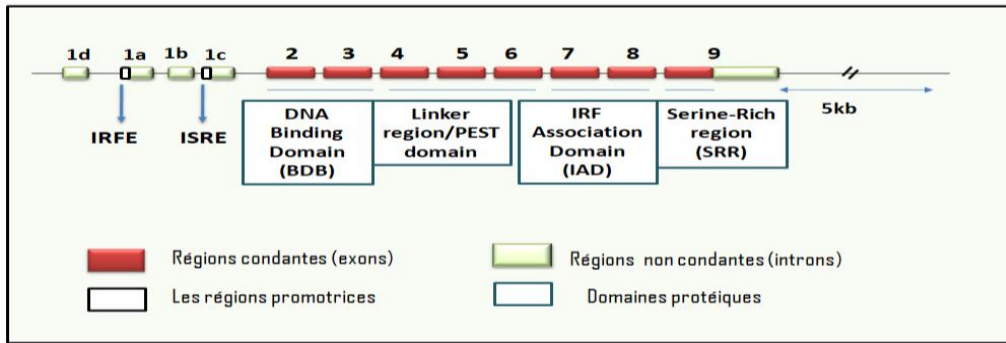


Figure 5 : Présentation Schématique de la structure du gène IRF5 (adapté de Lazari *et al.*, 2014).

IRF5 est constitutivement exprimé dans les lymphocytes B, les CD et les macrophages. Son expression est également inducible par les IFNs de type I et les TLRs (Schoenemeyer *et al.*, 2005 ; Takaoka *et al.*, 2005).

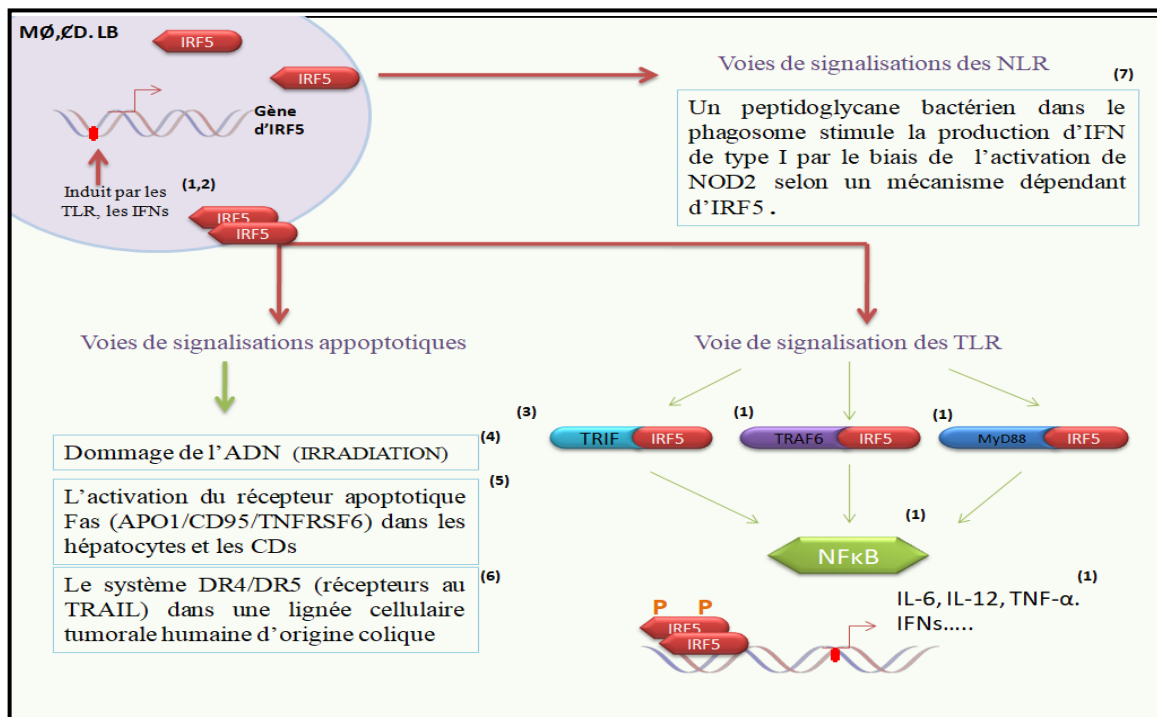


Figure 6 : Rôle du facteur de transcription IRF5 en physiologie (Originale, 2018).

III.1. Rôle du facteur de transcription IRF5 en physiopathologie du LES

De nombreuses publications confirment l'implication du facteur de transcription IRF5 dans les voies de signalisation des TLRs (Schoenemeyer et *al.*, 2005 ; Takaoka et *al.*, 2005), dans les processus apoptotiques induites (Yanai et *al.*, 2007 ; Couzinet et *al.*, 2008 ; Hu et *al.*, 2009), ainsi que dans d'autres voies telle que la voie de signalisation dépendante du récepteur NOD (Pandey et *al.*, 2009) (figure 5).

IRF5 est essentiel pour la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires en aval de l'activation des TLRs. Comme précisé précédemment, les TLRs, les IFNs de type I, et les cytokines inflammatoires jouent un rôle primordial dans les maladies auto-immunes, dont le LES notamment. Il était donc logique de s'intéresser au rôle de ce facteur de transcription dans cette présente étude cas-témoins.

De plus, étant donné que les gènes d'IRF5 sont altérés préférentiellement dans le LES, indiquant aussi que plusieurs variants de risque d'IRF5 semble être liés à plusieurs phénomènes mécanistes de cette maladie, cela suggère que la contribution de l'IRF5 au LES ne se limite pas à la régulation d'IFN, ce FT est peut-être impliqué dans d'autres voies potentiellement corrélées au développement du LES.

III. 2. IRF5 et polarisation des macrophages

Tout comme les cellules T, les macrophages peuvent être divisés en macrophages M1 et M2. Et comme les cellules Th1, les M1 ont un phénotype plus agressif et peuvent induire de puissantes réponses inflammatoires. Tandis que les macrophages M2 aident les cellules Th2 à induire des réponses plus légères et moins inflammatoires et favorisent la prolifération cellulaire et la réparation des tissus en sécrétant de l'IL-10, TNF- α , et l'IL-6 (Mantovani et *al.*, 2005).

Fait intéressant, l'IRF5 s'est récemment avéré être l'un des principaux facteurs de transcription impliqué dans la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 (Krausgruber et *al.*, 2011).

Des stimuli inflammatoires tels qu'une infection bactérienne et un traitement des monocytes avec le facteur stimulant les colonies de granulocytes (GM-CSF) polarisant M1 peuvent réguler l'expression de l'IRF5, qui à son tour intervient dans la transcription des marqueurs M1 typiques tels que l'IL-12, le TNF- α , l'IFN- γ et la répression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, favorisant l'expansion et l'activation TH1 en induisant la sécrétion d'IL-

23, et les TH17 hautement inflammatoires, dont la différenciation est déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, IL-6 et IL-23 (Krausgruber et *al.*, 2010 ; 2011).

III.3. IRF5 et lymphocytes B

Le rôle de l'IRF5 dans le développement des cellules B a été étudié chez des souris IRF5^{-/-} après observation que ces souris présentaient une accumulation de cellules B immatures, des niveaux réduits de plasmocytes, et une diminution du titre d'anticorps (Lien et *al.*, 2010).

IRF5 régulerait la transcription d'une protéine de maturation induite des lymphocytes B (Blimp-1), critique pour la différenciation des cellules B en plasmocytes et la sécrétion d'IgG, contrôlant ainsi indirectement la commutation de classe d'IgG vers les sous-types IgG2a et IgG2b plus pathogènes (Fang et *al.*, 2012).

III. 4. Études génétiques des polymorphismes de l'IRF5

Deux grandes études ont montré qu'un haplotype d'IRF5 particulier, constituait un facteur de risque important du LES (Sigurdsson et *al.*, 2005 ; Graham et *al.*, 2006). Ces données ont été confirmées par d'autres équipes qui ont également identifié d'autres polymorphismes d'IRF5 à risque chez plusieurs populations, en particulier dans des populations caucasiennes (Richez et *al.*, 2010) (Figure 6).

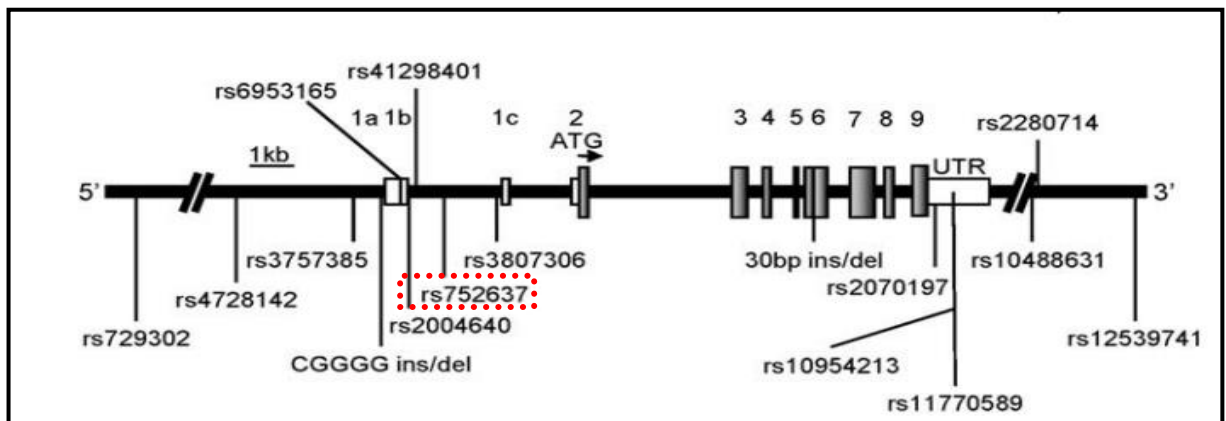


Figure 6 : Illustration schématique du gène IRF5 avec les positions des différents polymorphismes étudiés (Richez et *al.*, 2010).

Chez l'homme, l'IRF5 s'exprime sous la forme de multiples variants dont certains sont inactifs sur le plan transcriptionnel pouvant ainsi fonctionner comme des mutants dominants négatifs (Mancl et *al.*, 2005). Les individus en fonction de leur combinaison de ces multiples

polymorphismes, ont donc un risque plus ou moins important de développer un lupus (Graham et *al.*, 2007 ; Rhodes et *al.*, 2008) (Tableau II de l'annexe 4).

Ces polymorphismes sont responsables :

- De l'expression de différents isoformes d'IRF5 avec notamment la création d'un nouveau site d'épissage conduisant à l'expression du variant 1B responsable de l'expression élevée d'IRF5 dans les tissus cibles (rs2004640*allèle T) (Sigurdsson et *al.*, 2005 ; Graham et *al.*, 2006).

- De la création d'un site de polyadénylation responsable de l'expression d'un variant de transcription plus court et plus stable, donc d'une expression accrue d'IRF5 (rs10954213*allèle A) (Graham et *al.*, 2007 ; Kawasaki et *al.*, 2008).

- De modification de la transcription des gènes cibles (30pb insertion/délétion de l'exon 6), qui modifie une région du domaine riche en proline, en acide glutamique, en sérine et en thréonine, ce qui modifie la longueur de la 3'UTR et la stabilité des ARNm d'IRF5 (Graham et *al.*, 2007 ; Kawasaki et *al.*, 2008).

- De la création d'un site supplémentaire de fixation d'un facteur de transcription (FT), la protéine de spécificité 1 (SP1), une protéine qui joue un rôle majeur dans plusieurs processus physiologiques y compris l'apoptose et la différenciation cellulaire, et par conséquent une augmentation de la liaison protéique à cet allèle. Par exemple, les éléments de réponse au stimuli par l'IFN (ISRE) sont connus pour interagir avec les sites de liaison SP1 pour augmenter l'expression du gène PKR (protéine kinase inductible par l'IFN régulée par l'ARN) (Sigurdsson et *al.*, 2008).

Il s'agit d'une étude de cas-témoins ayant pour objectif principal de rechercher une association entre le polymorphisme du gène IRF5 (un polymorphisme ponctuelle C ou T sur les deux allèles du gène IRF5, en position -2716, ce SNP a pour référence : rs752637) et la susceptibilité au développement du LES chez une population Algérienne, en comparant les fréquences alléliques (fréquence à laquelle se trouve l'allèle d'un variant dans une population), et génotypiques (fréquence des compositions alléliques de tous les gènes), entre des patients atteints du LES, des sujets contrôles atteints de Polyarthrite rhumatoïde, et des sujets sains.

Rechercher chez les patients atteints du LES une corrélation entre ce polymorphisme et le profil en auto-anticorps, notamment : l'anti-ADN natif, l'anti-SSA/Ro et l'anti SSB/La, Sm, Scl-70, CENP. Ces auto-anticorps anti SSA, et SSB reconnaissent des polypeptides fixés sur de petits ARN appelés YRNA nécessaires à la réplication de l'ADN.

La présente étude est réalisée au niveau du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Alger, au sein du laboratoire d'auto-immunité, et du laboratoire HLA-Immuno-génétique entre le mois d'Avril 2018 à Juin 2018.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Il s'agit d'une étude de cas-témoins faite sur 402 sujets appartenant à une population d'origine algérienne comprenant :

- **87** patients atteints d'un Lupus érythémateux systémique (LES).
- **189** patients atteints d'une Polyarthrite Rhumatoïde (PR), qui représentent la population contrôle.
- **126** sujets sains.

Un prélèvement du sang veineux est d'abord réalisé chez l'ensemble des patients et des contrôles sur tube à anticoagulant (EDTA) dans le but d'extraire l'ADN par la suite.

Il faut noter que tous les patients lupiques remplissent au minimum quatre critères de l'ACR, une fiche de renseignements cliniques est donc établie pour chaque patient recruté au niveau de l'Institut Pasteur prise en charge au niveau de l'hôpital de douera, après consentement

écrit du patient. Les sujets sains sont quant à eux recrutés au sein des centres de transfusion sanguine (CTS).

La protéinase K (10mg/mL), ainsi que la *Taq* polymérase isolée de *Thermus aquaticus* sont utilisées.

I.2. Matériel non biologique :

La réalisation de cette étude nécessite l'utilisation d'une variété d'appareillages et de réactifs. L'ensemble du matériel est cité dans l'annexe 5.

II. Méthodes

II.1. Extraction d'ADN

L'ADN utilisé comme matrice d'amplification pour les réactions PCR est extrait à partir du sang total prélevé. Pour cela, la technique du relargage des protéines à force ionique élevée est utilisée: la technique de Salting-Out (Technique au chlorure de sodium saturé). Dans cette technique, l'ADN est extrait après lyse des globules rouges et blancs (Miller et *al.*, 1987).

Principe :

Cette méthode implique le « relargage » des protéines cellulaires « Salting out » : c'est à dire une déshydratation suivie d'une précipitation des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée (NaCl à 6M). Après précipitation des protéines, l'ADN est précipité par de l'éthanol absolu glacial (-20°C), l'ADN prend alors l'aspect d'une méduse qui est re-suspendu dans de l'eau distillée

Protocole :

A / Lyse des globules rouges :

Une solution de lyse des globules rouges (SLR) est préparée, elle est composée de :

- ❖ EDTA : (0,5M, pH : 8) = 10mL
- ❖ Tris : (1M, pH :8) = 5mL
- ❖ Eau distillée : Quantité suffisante pour 500mL à pH : 7.

Cette préparation doit être conservée à 4°C, et peut rester stable pendant deux mois.

Un volume de 10mL de la SLR est ajouté à 5mL du prélèvement sanguin, puis le mélange est agité énergiquement et laissé 20min dans de la glace à -20°C en agitant toutes les 5min. Ce choc thermique va fragiliser la paroi des globules rouges. Le mélange est ensuite centrifugé à température ambiante pendant 10min à 2500 tours/min, et le surnageant est éliminé. Dans le but d'avoir un culot bien blanc de globules blancs, ce dernier est lavé deux ou trois fois. Suite à ça, 20mL de la SLR sont ajoutés au culot dans le but de le casser, et à nouveau 25mL de la SLR sont ajoutés au mélange qui est incubé pendant 10min à 20°C, agité énergiquement, puis incubé à nouveau 10min à 20°C. Une centrifugation à température ambiante de 10min à 4000 tours/min est réalisée, le surnageant est jeté, et le culot de globules blancs est gardé à -20°C.

B / Lyse des globules blancs :

Une solution de lyse des globules blancs (SLB) est préparée, elle est composée de :

- ❖ EDTA : (0,5 M, pH : 8) = 5mL
- ❖ Tris : (1M, pH : 8) = 5mL
- ❖ Eau distillée : Quantité suffisante pour 500ml (pH : 7)

La solution doit être préparée dans des conditions stériles et conservée à 4°C.

Le bain marie (ALTROD) est préalablement allumé, et la protéinase K à 10mg/mL est reconstituée avec 1mL d'eau distillée. Le culot de globules blancs est ensuite repris dans 3mL de la SLB, 40µL de protéinase K, et 600µL de SDS à 10%. Ce mélange est agité délicatement et incubé une nuit au bain marie à 37°C.

C / Extraction de l'ADN :

Afin d'extraire l'ADN, 500µL de NaCl à 6M sont d'abord ajoutés à la solution de globules blancs. Le mélange est ensuite agité fortement, puis centrifugé à température ambiante pendant 25min à 3500 tours/min. Le surnageant est gardé, et transféré dans un tube neuf pour pouvoir ajouter 3 mL d'éthanol absolu glacial. Le tube est ensuite mélangé délicatement à l'aide d'une

pipette Pasteur pour pouvoir récupérer l'ADN qui va se coller dessus. En parallèle, 1 mL d'éthanol à 70% est déposé dans un eppendorf neuf. La pipette Pasteur contenant la « méduse » d'ADN est cassée dans l'eppendorf d'éthanol. Ce dernier est centrifugé deux fois 1 à 2min. L'éthanol est alors jeté, l'eppendorf est séché, 500 µL d'eau distillée sont ajoutés. Enfin, les tubes sont laissés sur un agitateur pendant 2 jours pour bien diluer l'ADN.

II.2. Quantification de l'ADN extrait

Le dosage de l'ADN s'effectue grâce au Nanodrop, un spectrophotomètre qui mesure l'absorbance (ou densité optique « DO ») des acides nucléiques à 260 nm. Parallèlement à ça, il est indispensable d'évaluer la pureté de l'ADN en mesurant l'absorption à 280 nm permettant ainsi de détecter une éventuelle contamination de l'extrait par des protéines ou de l'ARN. La solution d'ADN est considérée comme étant pure si le rapport DO 260/280 donne une valeur entre 1,8 et 2,2. En revanche, si ce rapport est : inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par des protéines, ou supérieur à 2,2: l'ADN est contaminé par de l'ARN.

Les échantillons d'ADN doivent par la suite avoir la même concentration finale de 20ng/mL. Pour cela, une dilution à l'eau distillée est réalisée en se basant sur la loi de conservation des concentrations : ($C_I V_I = C_F V_F$).

II.3. Étude du Single Nucleotide Polymorphism (SNP) par la technologie TaqMan

Le polymorphisme de nucléotide unique (SNP) étudié dans ce travail est génotypé par réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-PCR). Cette dernière repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent étant directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés, en mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice) (Poitras et Houde., 2002).

Les produits d'amplification par PCR peuvent être détectés selon deux grands principes : Par marquage non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Syber Green I), ou marquage spécifique du produit de la PCR à l'aide d'une ou de deux sonde(s) fluorescente(s) "Sondes TaqMan ou balises moléculaires". Dans cette présente étude, la technologie TaqMan est utilisée.

Principe de la technologie TaqMan:

La technologie TaqMan repose sur l'utilisation d'une sonde « TaqMan », un oligonucléotide dont l'extrémité 5' contient un fluorochrome attaché de manière covalente, et l'extrémité 3' porte un désactivateur (Quencher non fluorescent « NFQ »). Ce dernier a pour fonction d'inhiber (d'éteindre) la fluorescence émise par le fluorochrome suite à une excitation par la source lumière du thermocycleur. Ainsi, tant que le fluorochrome et le désactivateur sont à proximité l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le désactivateur. La sonde TaqMan s'hybride avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une paire d'amorces spécifiques, l'interaction du duplex "ADN cible – sonde spécifique" se stabilise grâce à une molécule (MGB) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex. L'enzyme *Taq* polymérase d'une part élonge l'amorce pour synthétiser le brin néoformé de l'extrémité 3' vers 5' du brin complémentaire. D'autre part, l'enzyme possède également une activité exonucléase 5'–3' et dégrade donc la sonde hybridée au brin matrice permettant le relargage de la fluorescence en cassant la proximité avec le quencher. La fluorescence détectée est proportionnelle au relargage du fluorochrome et donc à la quantité d'ADN d'intérêt présente dans le produit de la PCR (Figure 8) (Zhuo et *al.*, 2015).

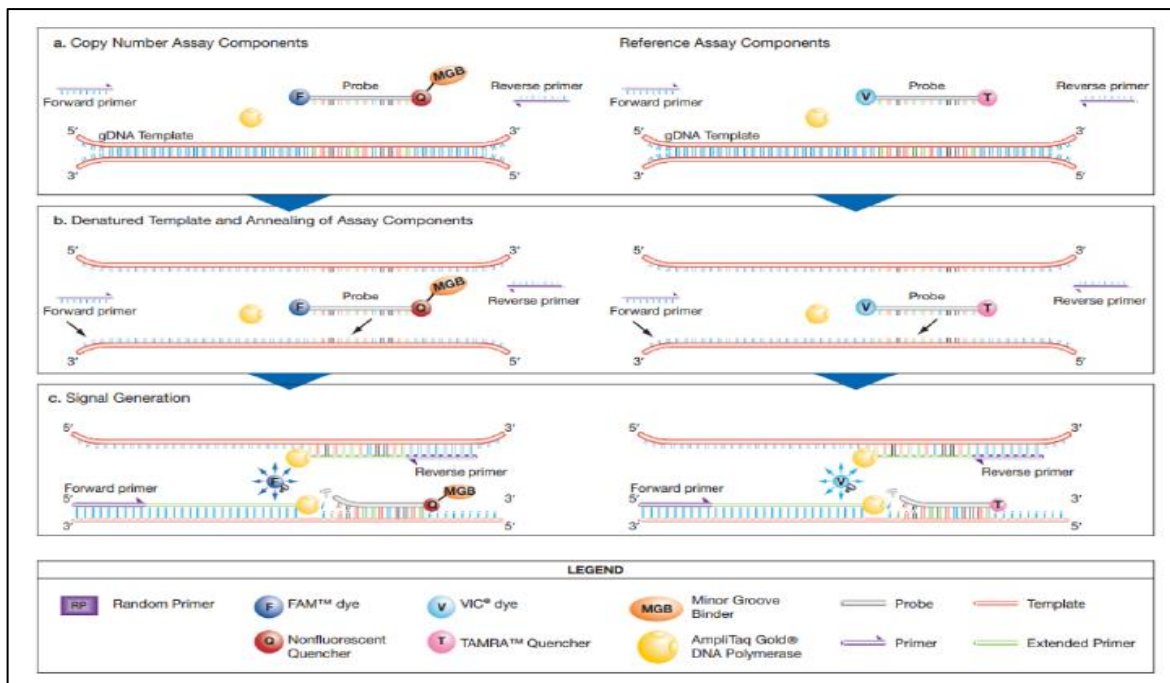


Figure 8 : Différentes étapes du génotypage par la technologie TaqMan

(www.thermofisher.com).

Protocol :

Afin de préparer le mix PCR, deux mélanges sont préalablement posés 30 min à température ambiante, le TaqMan Universal PCR Master Mix (contenant l'enzyme *Taq* ADN polymérase, les dNTPs, le MgCl₂, et une solution tampon à un pH constant adéquat pour la réaction de polymérisation), et l'AD-Mix TaqMan SNP Genotyping Assays (contenant deux sondes TaqMan contenant des colorants fluorescents distincts, la molécule MGB spécifique à l'allèle, et une paire d'amorces PCR pour détecter des cibles SNP spécifiques). Puis, le mix d'amplification est préparé en fonction du nombre d'échantillon plus deux (à cause d'une éventuelle différence que peut procurer le pipetage) (voir le Tableau III). Suite à ça, 6.875 µL du mix et 2 µL d'ADN sont déposés dans chaque puit d'une microplaque 96 puits. Comme témoins négatifs, 1 µL d'eau distillée est déposé dans les deux derniers puits de la plaque. En fin, la plaque est fermée hermétiquement avec une feuille thermocollante, centrifugée rapidement, pour être placée dans le thermocycleur, un appareil programmable qui permet d'exposer la microplaque à des températures choisies et à des durées déterminées pour favoriser les différentes étapes d'une réaction PCR (Tableau IV).

Tableau III : Mélange réactionnel pour la d'une réaction en chaine de la polymérase en temps réel.

Composant	Quantité / 100 puits	Quantité /puit
AD Mix	12.5 µl	0.125µl
Master Mix	250µl	2.5µl
Eau distillée stérile	425µl	4.25µl

Tableau IV : Programme favorisant les différentes étapes d'une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel.

Température	Durée du cycle	Mécanismes
60°C	1min	Activation de la Taq polymérase
95°C	10min	Dénaturation initiale
95°C (40fois)	15s	Dénaturation des sondes amplifiées
60°C	1min	Hybridation-Elongation
60°C	1min	Activation des fluorochromes et préparation à la lecture.

La fluorescence lors de la RT-PCR est émise des deux sondes TaqMan, chacune de ces sondes renferment : un fluorochrome à l'extrémité 5' spécifique de chaque type d'allèle. Deux sondes fluorescentes discriminantes sont donc utilisées : 2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein (VIC) et 6-carboxyfluoresceine, acronyme (FAM).

Cette fluorescence est ensuite captée par un détecteur couplé au thermocycleur, puis traitée grâce au logiciel 7500 softwares v2.0.1 de l'ordinateur lié au détecteur (AppliedBiosystems™).

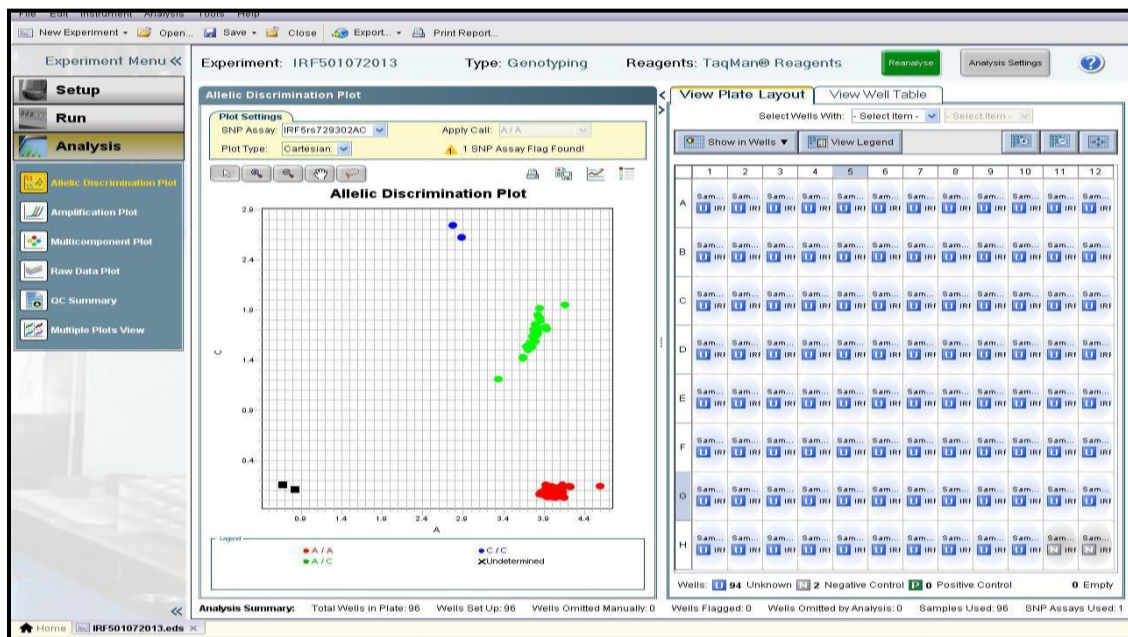


Figure 9 : Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence (originale).

Interprétation :

Chaque échantillon étant représenté par un point, le profil de fluorescence de chaque point est défini par la suite. Par exemple, le nuage de point exprimant majoritairement la fluorescence FAM de couleur bleu correspond à des échantillons homozygotes pour l'un des deux allèles. Le nuage rouge correspond à une fluorescence VIC majoritaire, et donc à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle. Tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences, correspond donc à des échantillons hétérozygotes pour le SNP considéré. Quant aux points noirs, ils correspondent à une PCR qui n'a pas marché ou à un positionnement ambigu des amorces, et donc une hybridation non spécifique (Figure 9).

Il faut noter que pour chaque mix, le fournisseur précise à quel allèle sauvage ou muté est associé chacune des sondes VIC et FAM.

II.4. Recherche d'une association entre le polymorphisme SNP IRF5 (rs752637) et la susceptibilité à développer le LES

L'étude est réalisée sur des malades atteints du LES, ils présentent également diverses manifestations pathologiques. L'analyse des données des patients comprend l'aspect épidémiologique, clinique et immunologique, afin d'asseoir une association entre le polymorphisme et la susceptibilité à développer le lupus érythémateux systémique, et d'établir d'éventuelles associations entre ce SNP et la production d'auto-anticorps spécifiques à cette maladie. Pour cela, les résultats de la recherche des auto-anticorps nucléaires sont traités, ces derniers ont été révélés auparavant par les techniques suivantes :

1/Immunofluorescence indirecte (IFI) qui est une technique d'immuno-marquage, qui utilise deux anticorps l'un spécifique à la protéine d'intérêt et le second anti Ac primaire, permet de révéler une protéine spécifique directement dans la cellule, mais aussi sa localisation dans la cellule, ou le tissu analysé. L'IFI est utilisée comme test de dépistage, en utilisant une lignée cellulaire humaine épithéliale de type 2 (HEp-2) :

La lecture au microscope à fluorescence permet d'identifier l'aspect de la fluorescence obtenue et de donner un titre en cas de positivité. Le titrage se faisant comme suit : 1:80, 1:160, 1:320, 1:1000 et > 1:1000 pour la recherche des auto-anticorps anti-nucléaire (ANA) appelés également facteur anti-nucléaire (FAN). Pour les aspects de la fluorescence, l'aspect homogène

évoque des anti-ADN (ADN natif), des anti-histones ou des anti-nucléosomes, et l'aspect moucheté évoque des anti-SSA ou des anti-SSB, Sm, Scl-70, et Anti-Jo-1.

2/ Recherche des anticorps anti-antigènes solubles et anti-ADN natif par ELISA :

Ces anticorps sont dosés par la technique immuno-enzymatique ELISA, qui permet le dépistage quantitatif *in vitro* des auto-anticorps spécifiques IgG dirigées contre les Ag nucléaires extractibles (ENA): SSA/Ro (60KD), SSB/La, Sm, Scl-70, Jo-1 et contre l'ADN natif dans le sérum des patients.

Ces résultats sont analysés et comparés séparément avec les fréquences alléliques et génotypiques dans le but de rechercher une éventuelle association avec le développement de la maladie lupique étudiée.

III. Analyse statistique

- Le calcul des fréquences génotypiques et alléliques se fait comme suit :

Fréquence allélique = nombre de copies de l'allèle considéré/2 x nombre total de sujets.

Fréquence génotypique = nombre de sujets portant le génotype considéré/ nombre total de sujets.

- Les allèles ne se distribuent aléatoirement que sous certaines conditions, dont l'absence de sélection. Quand ces conditions sont vérifiées, la population vérifie le modèle de Hardy-Weinberg (équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre), ce dernier est évalué par un test χ^2 .

- L'analyse des fréquences génotypiques, et alléliques entre patients et témoins (avec ou sans stratification) est faite à l'aide du test du χ^2 :

- Une différence est considérée "statistiquement significative" pour des valeurs de p ou pc (corrigé) par la correction de Yates (pour les faibles effectifs), inférieures à 0,05.

- L'Odds Ratio (OR) ou risque relatif rapproché, se définit comme le rapport des chances qu'un événement arrivant à un groupe de personnes « A », arrive également à un autre groupe « B ». Il est calculé dans le cas où le pc < 0,05 ainsi que son intervalle de confiance à 95% (IC

95%). Un $OR < 1$ est en faveur d'un effet protecteur, lorsqu'il est > 1 il est en faveur d'un risque plus élevé, alors qu'un OR proche de 1 est en faveur d'une absence d'effet.

- L'intervalle de confiance pour l'OR à 95% est déterminé selon le test exact de FISHER.
- Le P est corrigé selon la correction de Yates (pour les faibles échantillons).
- Le logiciel Compare 2 est utilisé pour tous les calculs statistiques, GraphPad Prism7 est utilisé pour le traçage des présentations graphiques.

L'étude est réalisée sur des malades atteints de LES qui présentent également diverses manifestations pathologiques. Ces patients sont recrutés au sein du service d'immunologie de l'hôpital de Douera et recueillis au niveau de l'IPA, après la mise en évidence et le dosage des auto-anticorps anti-nucléaire et anti ADN natif dans le sérum de ces patients.

Différents aspects sont abordés dans cette étude, la technologie TaqMan permet d'abord de déterminer les fréquences alléliques et génotypiques de l'SNP du gène de l'IRF5 (C/T : rs752637) en position -2716 au sein de la population. Par la suite, le traitement des données de ces patients permet de réaliser une analyse épidémiologique, clinique et immunologique, afin d'asseoir une association entre le polymorphisme et la susceptibilité à développer le lupus érythémateux systémique, et d'établir d'éventuelles associations entre ce SNP et la production d'auto-anticorps spécifiques de cette maladie.

I. Résultats

I. 1. Epidémiologie « Caractéristiques générales, cliniques et immunologiques des patients »

I. 1.1. Répartition des patients lupiques selon le sexe

La présente étude est réalisée sur 87 patients lupiques, la pathologie semble affecter les femmes plus que les hommes dont les pourcentages sont respectivement 91.95 % et 8.05 % avec un sexe ratio femme/homme de 11/1 (figure 10).

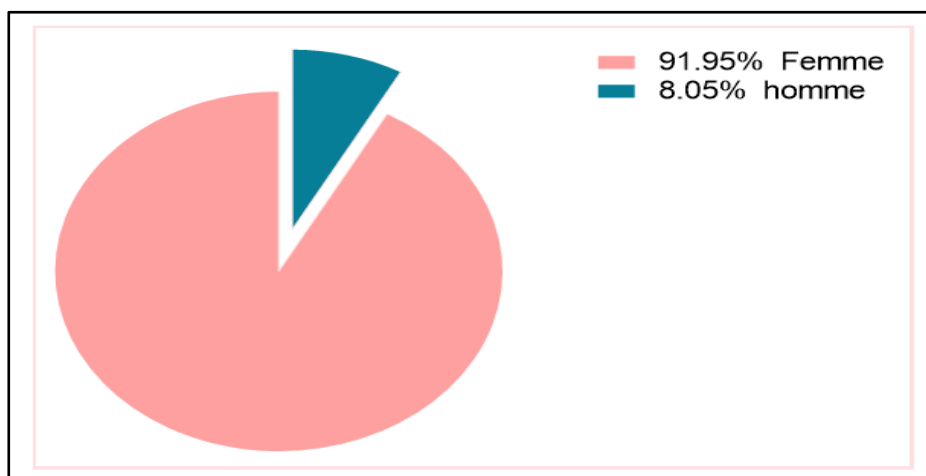


Figure 10 : Répartition des patients lupiques selon le sexe.

I.1.2. Répartition des patients lupiques selon la tranche d'âge

Selon le résultat représenté dans la figure 11, la majorité de ces patients sont âgés entre 20 et 44 ans (26,19%) avec un âge moyen de 31.65 ans. Il faut noter également que la pathologie peut affecter les moins de 20 ans et les plus de 50 (Figure 11).

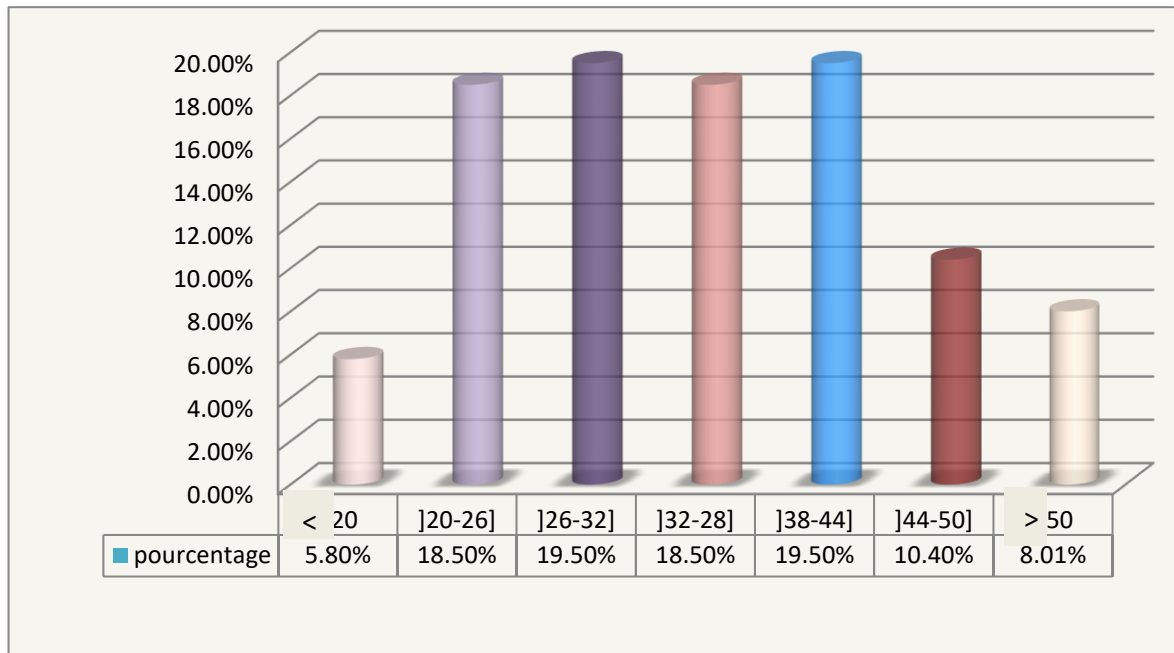


Figure 11 : Répartition des patients lupiques selon les tranches d'âge.

La population contrôle comprend 189 patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde (PR), qui répondent aussi aux critères du collège américain de rhumatologie (ACR) de 2008 avec une moyenne d'âge de 49 ans, des extrêmes de 21 à 80 ans, et un sexe ratio de 1 : 4 (homme : femme). La population témoin quant à elle comprend 126 sujets sains, donneurs de sang sans antécédents personnels ou familiaux de maladies rhumatismales ou autres, avec une moyenne d'âge de 31.16 ans, des extrêmes allant de 6 à 64 ans et un sexe ratio de 1 : 4 (homme : femme) (Tableau V).

Tableau V : Comparaison des caractéristiques de la population lupique avec le groupe contrôle et le groupe sain.

	Patients LES	Population contrôle (patients PR)	Témoins (sujets saines)
Nombre	87	189	126
Moyenne d'Age	35.1	49	35.16
Sexe Ratio (homme /femme)	1 : 11	1 : 4	1 :4

I.2. Clinique

Une variété de symptômes cliniques est présente chez les patients lupiques, phénotypiques externes, systémiques, et d'autres au niveau des organes internes y compris le rein. D'après les motifs de consultations, l'arthrite est présente chez 41.38 % des cas, des atteintes rénales sont aussi présentes chez 32.18 %, les atteintes cutanées sont retrouvées chez environ 54.04% (atteintes cutanées + Vespertilio), les atteintes articulaires (Arthrite, Arthralgie, et polyarthralgie) chez 52.88%, et les atteintes dues à la photosensibilité chez 39.1% des cas lupiques. Phénomène de Raynaud est très fréquent aussi dans cette population en affectant 36.78% des cas. Les autres atteintes sont de faibles proportions comme l'atteinte cardio-pulmonaire (10.34%), l'ulcération buccale (9,2%), et l'atteinte hématologique (19.54%) (Tableau VI et figure 12).

Il faut noter que les données cliniques sont analysées à partir des fiches remplies par le médecin traitant, et qui sont archivées au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger.

La figure 12 présente les principales atteintes retrouvées chez la population lupiques, tout en jumelant les différentes formes des atteintes en fonction de l'organe touché, par exemple l'atteinte articulaire englobe de dans tout ce qui est Arthrite, Arthralgie, polyarthralgie.etc

Tableau VI : Fréquence des manifestations cliniques chez les patients lupiques.

Clinique	Pourcentage (%)	Effectif
Arthrite/Arthralgie/Polyarthralgie	41.38	36
Atteinte cutanée / Vespertilio	5.74 / 48.28	5 / 42
Atteinte rénale (Punch rénale, PBR, GN)	32.18	28
Atteinte cardio-pulmonaire (+ Péricardite)	10.34	9
Atteinte articulaire /HTA	2.3 / 9.2	2/ 8
Photosensibilité	39.1	34
Phénomène de Raynaud	36.78	32
Ulcération buccale + Aptose buccale	9.2	8
Atteint hématologique + Anémie	19.54	17
Lupus discoïde	2.3	2
Alopécie / dyspnée / Pancytopénie	39 / 8 / 3.44	34 / 7 / 3
Hépatite / Diabète NID	1.15	1 / 4
Altération d'état générale (AEG) / OMI (œdèmes des membres inférieures / doigt boudinée	11.5 / 13.8 / 5.75	10 / 12/5
Thrombose (veineuse profond), Thrombopénie	8 / 4.6	7/ 4

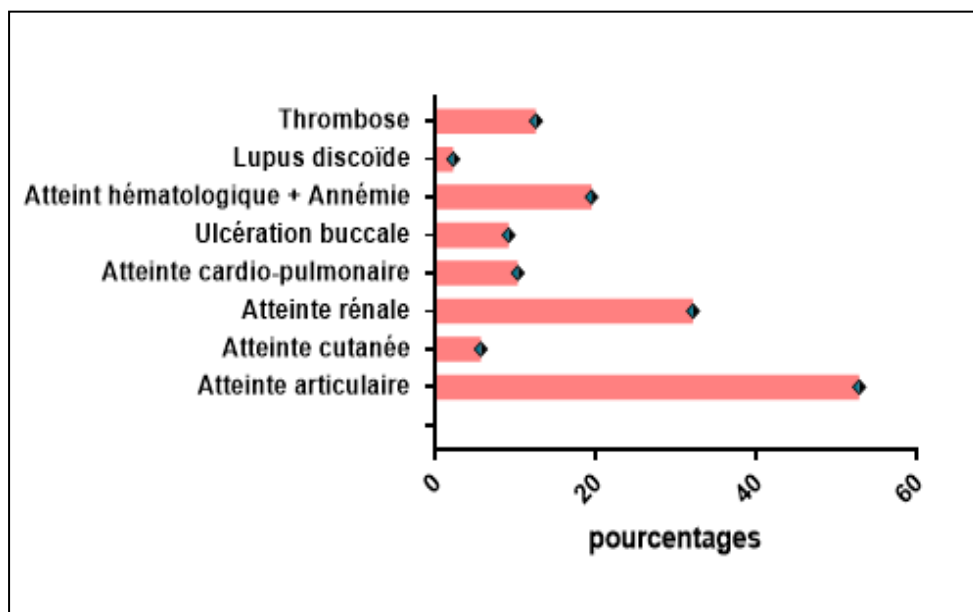


Figure 12 : Répartition graphique des patients selon les manifestations cliniques.

I.3. Profil immunologique

I.3.1. Expression des facteurs anti-nucléaires chez les patients lupiques

La recherche des facteurs anti-nucléaires (FAN) est réalisée chez tous les patients, et s'est révélée à des titres supérieur à 1/80 ce qui représente la positivité. L'analyse révèle que l'aspect moucheté est le plus dominant comme le montre la figure 13.

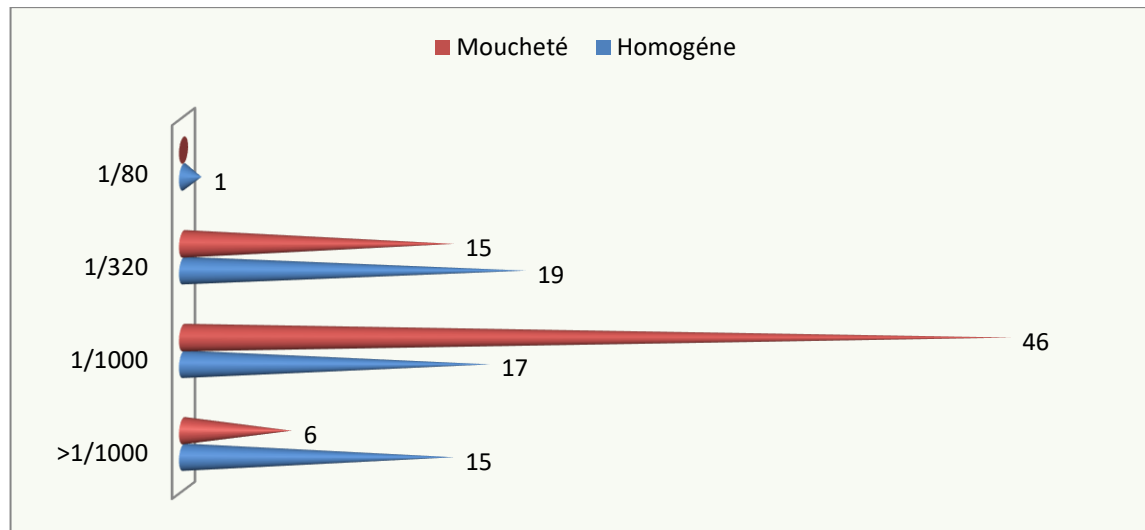


Figure 13 : Représentation graphique des différents aspects retrouvés chez les patients atteints de lupus systémique par IFI sur cellules Hep-2, pour les facteurs anti-nucléaires (FAN).

I.3.2. Expression des auto-anticorps anti-antigènes nucléaires solubles chez les patients lupiques

Les Ac anti-antigènes nucléaires solubles ont une forte valeur prédictive pour le diagnostic du LES, ainsi les Ac Anti-SSA sont retrouvés chez 64.36% des patients, les Ac Anti-SSB, les Anti-Sm, et les anti CENP sont présents chez 25.28%, 49.42%, et 5.7% respectivement. Quant aux Ac Anti-Scl-70 et aux Anti-Jo-1, ils sont présents chez un nombre faible de malades 2.3 %. L'anticorps anti ADN natif (ADNn) figure avec un pourcentage de 62 % de la population lupique (Figure 14).

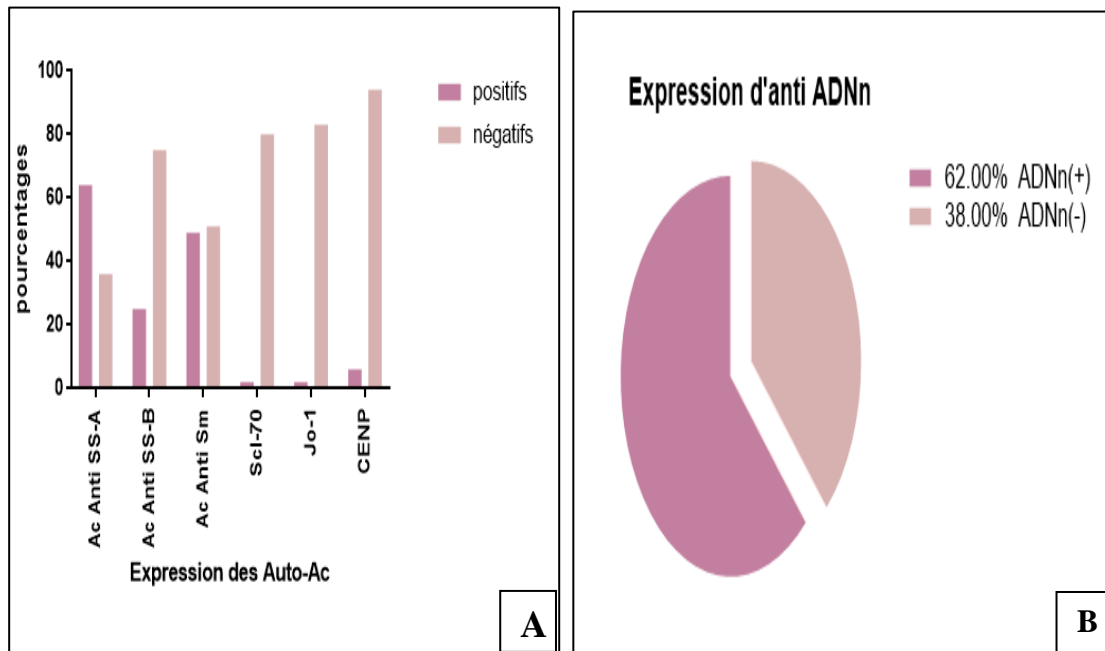


Figure 14 : Représentation graphique de l’expression chez les patients lupiques des anti-antigènes nucléaires solubles (A), et Anti ADN natif (B).

I.4. SNP IRF5 (rs752637) et la susceptibilité à développer le LES

Fait intéressant, dans chaque groupe considéré, la distribution génotypique est conforme à l’équilibre de Hardy Weinberg ($p > 0.05 =$ équilibre HW respecté, $\chi^2 = 0.772$).

Les fréquences alléliques et génotypiques de ce SNP chez les patients lupiques et sains sont résumées dans le tableau VII :

Tableau VII : Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains.

Sujets LES vs SS							
	LES (n= 87)	Sujets Sains (SS) (n= 126)	χ^2	P	OR	OR IC 95%	Pc (P de Yates)
Allèles (n x 2)							
C	119 (68.4%)	138 (55%)	7.988	0.005	1.79	1.19	0.006
T	55 (31.6 %)	114 (45%)	7.988	0.005	0.56	0.37	0.006
Génotypes (n)							
CC	44 (50.6%)	40 (32%)	7.639	0.006	2.20	1.25	0.009
CT	31 (35.6%)	58 (46%)	2.288	0.13	-	-	-
TT	12 (13.8%)	28 (22%)	2.397	0.122	-	-	-

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 en position -2716 rs 752637 montre que l'Allèle C est significativement plus fréquent chez les sujets atteints du LES par rapport au sujets sains 68.4% et 55% respectivement ($\chi^2 = 7.988$; $p < 0,05$; OR = 1.79) et serait probablement de ce fait associé à une susceptibilité à développer le lupus érythémateux systémique. En revanche, l'allèle T est significativement plus fréquent chez les sujets sains en comparant avec la population lupique (45 % et 31.6% respectivement) ($\chi^2 = 7.988$; $p < 0,05$; OR = 0.56), et pourrait être de ce fait associé à une protection contre le développement du lupus érythémateux systémique.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques de ce polymorphisme SNP, elle révèle que le génotype « CC » est significativement plus fréquent chez les patients lupiques (50.6%) que chez la population saine (32%) ($\chi^2 = 7.639$; $p < 0,05$; OR = 2.20), suivie des génotypes « CT » et « TT » qui sont présents à la fois chez les sujets sains et lupiques sans qu'il y ait de différence significative avec 46%, 22% vs. 35.6%, et 13.8% respectivement et un $p > 0,05$.

Afin d'établir d'éventuelles conclusions sur l'association de l'SNP IRF5 rs 752637 avec la maladie lupique, et d'essayer de voir si ce dernier ou plus précisément si ces fréquences alléliques, et génotypiques sont associées spécifiquement à cette pathologie ou à d'autres maladies auto-immunes, l'étude compare les fréquences alléliques et génotypiques de ce

polymorphisme chez une population contrôle composée de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune inflammatoire chronique caractérisée par une inflammation systémique et la production d'auto-anticorps dirigés contre le facteur rhumatoïde (FR) et les peptides citrullinés (ACPA) notamment.

Les fréquences alléliques et génotypiques de ce SNP chez les patients lupiques et les sujets contrôles sont présentées dans le tableau IIIV :

Tableau IIIV : Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets contrôles.

			Sujets LES Vs contrôles				
	LES (n= 87)	Sujets contrôles (PR) (n= 189)	χ^2	P	OR	OR IC 95%	Pc (P de Yates)
Allèles (n x 2)							
C	119 (68.4%)	245 (65%)	0.678	0.410	-	-	-
T	55 (31.6 %)	133 (35%)	0.678	0.410	-	-	-
Génotypes (n)							
CC	44 (50.6%)	81 (43%)	1.432	0.231	-	-	-
CT	31 (35.6%)	83 (13%)	1.686	0.194	-	-	-
TT	12 (13.8%)	25 (44%)	0.016	0.898	-	-	-

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 en position -2716 rs 752637 ne montre aucune différence significative entre les deux groupes. Concernant les fréquences alléliques, l'Allèle C est retrouvé chez 68.4% des patients lupiques et 65% du groupe contrôle ($\chi^2 = 0.678$; $p > 0,05$), et l'allèle T est retrouvé chez 35 % des patients atteints de PR et 31.6% des patients LES ($\chi^2 = 0.678$; $p > 0,05$). Quant aux fréquences génotypiques de ce polymorphisme SNP, elle révèle que le génotype « CC » et « CT » sont présents à la fois chez les patients lupiques et la population PR avec 50.6% contre 43% ($\chi^2 = 1.432$; $p > 0,05$), et 13% contre 35.6% ($\chi^2 = 1.686$; $p > 0,05$) respectivement. Le génotype « TT » par contre est présent chez 44% des sujets contrôles, et 13.8% des sujets lupiques avec un $p > 0,05$, un χ^2 égale à 0.016.

Les fréquences alléliques et génotypiques de l'SNP IRF5 rs 752637 comparées entre les patients lupiques, les sujets sains, et la population contrôle sont représentées dans la figure suivante (Figure15) :

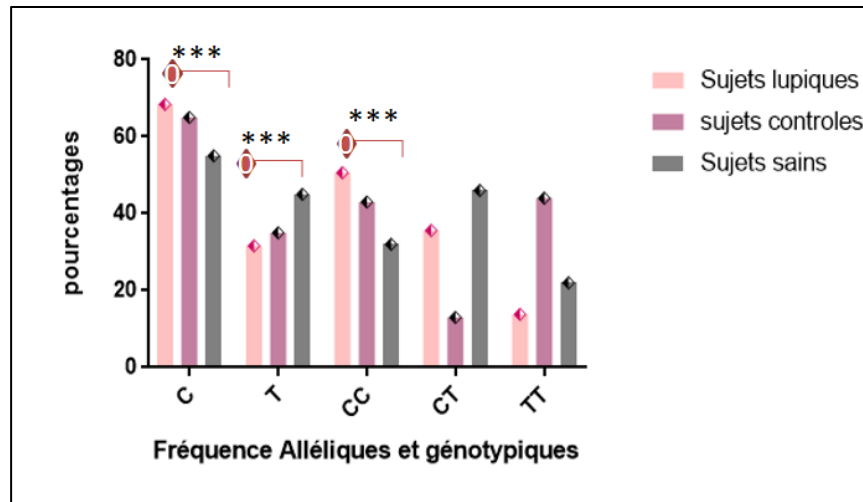


Figure 15 : Représentation graphique des fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES vs. Sujets Sains, et sujets contrôles.

I.5. Recherche d'une association entre le polymorphisme SNP IRF5 (rs752637) et la production des auto-anticorps spécifiques du LES

I.5.1. SNP IRF (rs752637) et la production des anticorps anti SS-A

Les fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients lupiques et les sujets sains en fonction de la production ou non des anti-SS-A sont résumées dans le tableau IVV et la figure 16.

Tableau IVV : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti SSA.

	SS-A (+) (n = 57)	SS-A (-) (n =28)	Sujets Sains (n = 126)	SS-A (+) Vs. SS		SS-A (-) Vs. SS		SS-A (+) Vs. (-)	
				χ^2	P	χ^2	p	χ^2	P
Génotypes									
CC	32(56.14%)	12 (42.8%)	40 (32%)	9.786	0.002	1.265	0.261	1.327	0.249
CT	19(33.33%)	11(39.2%)	58 (46%)	2.597	0.107	0.422	0.516	0.291	0.589
TT	6(10.52%)	5(18%)	28 (22%)	3.549	0.060	0.259	0.611	0.896	0.344

L'analyse du polymorphisme étudié dans le groupe des patients lupiques en fonction de la production des auto-anticorps anti-SSA démontre que le génotype « CC » est significativement plus fréquent chez le groupe lupique SSA positif (+) comparé aux sujets sains, avec 56.14% et 40% respectivement ($\chi^2 = 9.786$; $p < 0,05$). Etant donné que ce même génotype est également présent chez le groupe SSA (-) (42.8%), une corrélation entre ce polymorphisme et la production d'auto-Ac anti-SSA ne peut être conclue. En revanche, les génotypes « CT et TT » chez le groupe producteur d'auto-AC, non producteur d'auto-AC, et sain ne présentent aucune différence significative.

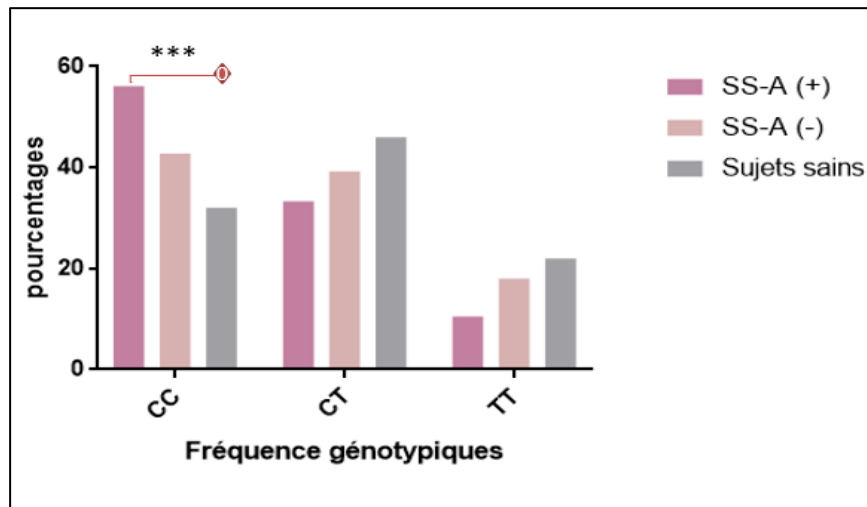


Figure 16 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets sains, en fonction de la production des anti SSA, *** : $P < 0.01$.

I.5.2. SNP IRF (rs752635) et la production des anticorps anti SS-B

Les fréquences génotypiques du SNP IRF (rs752637) chez les patients lupiques et les sujets sains en fonction de la production ou non des anti-SS-B sont représentées dans le tableau X et la figure 17.

Tableau X : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti SSB.

	SS-B (+) (n = 27)	SS-B (-) (n = 58)	Sujets Sains (n = 126)	SS-B (+) Vs. SS		SS-B (-) Vs. SS		SS-B (+) Vs. (-)	
				χ^2	P	χ^2	p	χ^2	P
Génotypes									
CC	16(59.3%)	28 (48.3%)	40 (32%)	7.254	0.007	4.568	0.031	0.890	0.345
CT	7(25.9%)	23(39.7%)	58 (46%)	3.679	0.055	0.655	0.418	1.521	0.218
TT	4(14.8%)	7(12.1%)	28 (22%)	0.738	0.390	2.658	0.103	0.123	0.725

L'analyse du polymorphisme étudié dans le groupe des patients lupiques en fonction de la production des auto-anticorps anti-SSB montre que le génotype « CC » est significativement plus fréquent chez ce groupe de patients (n=27), avec 59.3% contre 32% des sujets sains ($\chi^2 = 7.254$; $p < 0,05$). Par ailleurs, ce génotype est également significativement plus fréquent chez le groupe lupiques SSB négatif (-) comparé au groupe de sujets sains, où il est présent chez 48.3% ($\chi^2 = 4.568$; $p < 0,05$). Cela signifie qu'aucune corrélation positive entre ce génotype, et la production d'Ac anti-SSB ne peut être conclue. En revanche, le génotypes « CT » de ce même polymorphisme est significativement moins fréquent chez le groupe LES producteurs d'anti-SSB par rapport aux patients non producteurs de l'auto-Ac, et les patients sains.

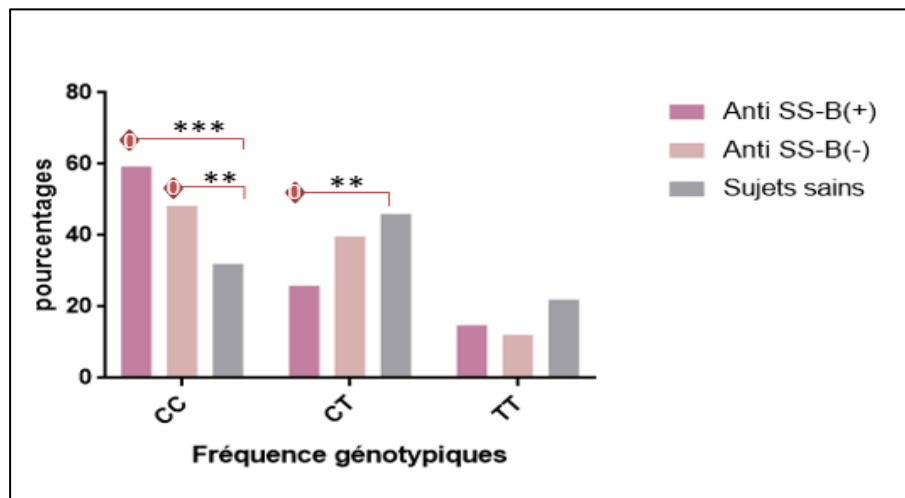


Figure 17 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti SSB. ** : $P < 0.05$; *** : $P < 0.01$.

I.5.3. SNP IRF (rs752637) et la production des anticorps anti-Sm

Les fréquences génotypiques du SNP IRF (rs752637) chez les patients lupiques et les sujets sains en fonction de la production ou non des anti-Sm sont résumées dans le tableau XI et la figure 18.

Tableau XI : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti Sm.

Génotypes	Anti-Sm (+) (n = 43)	Anti-Sm (-) (n = 42)	Sujets Sains (n = 126)	Anti-Sm (+) Vs. SS		Anti-Sm (-) Vs. SS		Anti-Sm (+) Vs. (-)	
				χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P
CC	24(55.8%)	20(47.6%)	40 (32%)	7.893	0.005	3.457	0.063	0.571	0.450
CT	14(32.6%)	16(38%)	58 (46%)	2.380	0.123	0.805	0.370	0.285	0.593
TT	5(11.6%)	6(14.2%)	28 (22%)	2.290	0.130	1.229	0.268	0.133	0.715

L'analyse des génotypes montre qu'en matière de production des anti-Sm, le génotype CC est significativement plus fréquent chez le groupe producteur des anti-Sm par rapport au groupe de patients sains (55.8% vs. 32% ; $p > 0,05$), Etant donné que ce même génotype est également présent chez le groupe Sm (-)(47.6%), une corrélation entre ce polymorphisme et la production d'auto-Ac anti-SSA ne peut être conclue cela signifie qu'aucune corrélation positive entre ce génotype et la production d'Ac anti-Sm ne peut être attribuée. En revanche, les génotypes « CT et TT » chez le groupe producteur, et non producteur de l'auto-AC, ainsi que le groupe sain ne présente aucune différence significative.

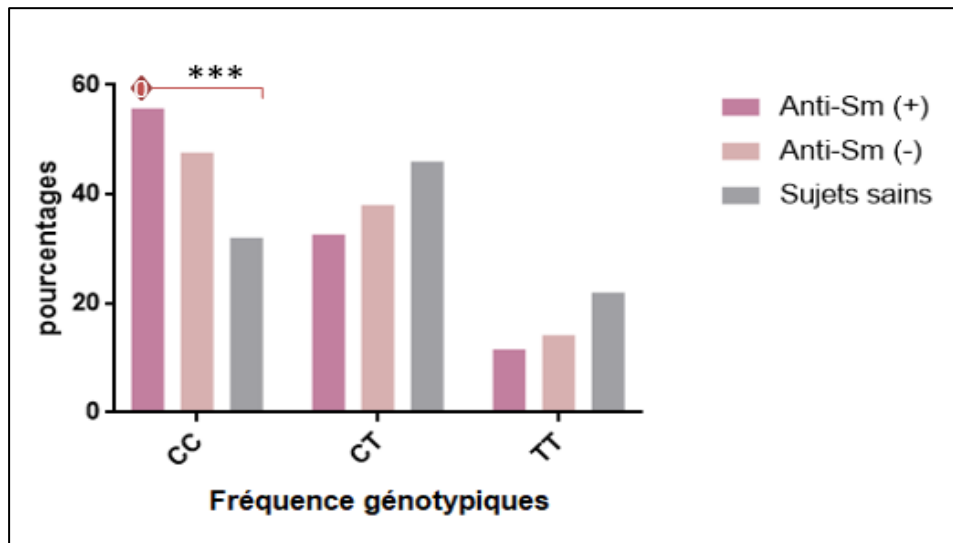


Figure 18 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti Sm. *** : $P < 0.01$.

I.5.4. SNP IRF (rs752635) et la production des anticorps anti-Scl-70

Les fréquences génotypiques du SNP IRF (rs752635) chez les patients lupiques et les sujets sains, en fonction de la production ou non des anti-Scl-70 sont présentées dans le tableau XII et la figure 19.

Tableau XII : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752635) chez les Patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti Scl-70.

Génotypes	Anti-Scl-70 (+) (n = 5)	Anti-Scl-70 (-) (n = 80)	Sujets Sains (n = 126)	Anti-Scl-70 (+) Vs. SS		Anti-Scl-70 (-) Vs. SS		Anti-Scl-70 (+) Vs. (-)	
				χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P
CC	1(20%)	43(62%)	40 (32%)	0.309	0.579	9.849	0.002	2.147	0.143
CT	4(80%)	26(37.7%)	58 (46%)	2.226	0.136	3.710	0.054	4.649	0.031
TT	00(00%)	11(16%)	28 (22%)	1.413	0.235	-	-	0.790	0.374

Les Ac anti-Scl-70 sont exprimés que chez seulement 5 des patients lupiques, contre 69 patients non producteurs. L'analyse des génotypes montre qu'en matière de production des anti-Scl-70 chez les patients lupiques, le génotype CC est significativement plus fréquent chez les non producteurs de cet auto-Ac avec 62% contre 32% chez les patients sains et 20% chez les patients anti Scl-70(+) ($\chi^2 = 9.849$; $p < 0,05$). Le génotype CT est par contre significativement plus fréquent chez les patients sains que chez les patients lupiques producteurs ou non des anti-Scl-70 ($p=0.05$) (46% vs. 37.7 % ; $p < 0,05$).

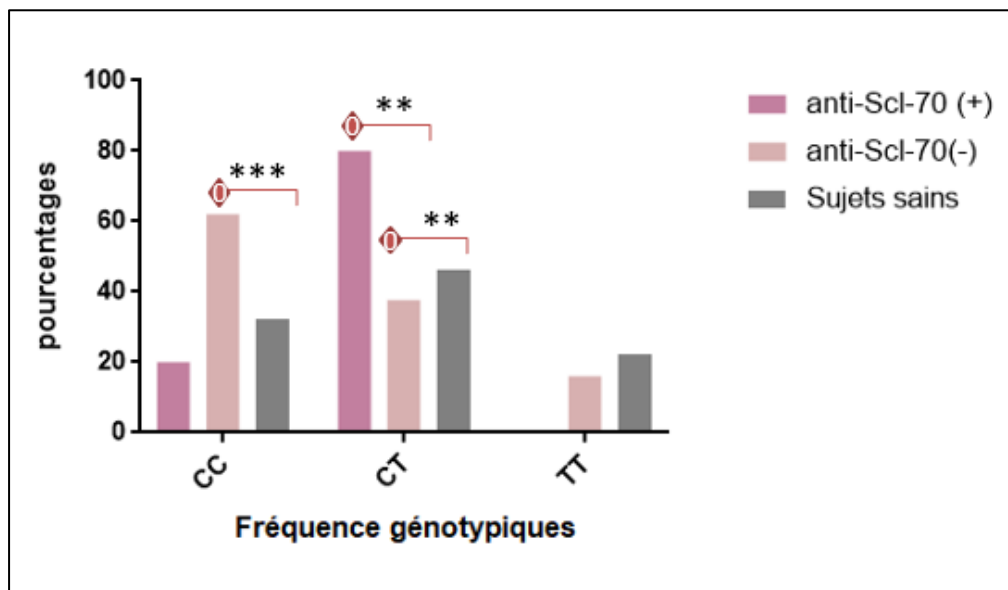


Figure 19 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs. Sujets sains, en fonction de la production des anti Scl-70. ** : $P < 0.05$; *** : $P < 0.01$.

I.5.5. SNP IRF (rs752635) et la production des IgG dirigées contre le Centromère B « CENP »

Les fréquences génotypiques du SNP IRF (rs752637) chez les patients lupiques et les sujets sains, en fonction de la production des IgG dirigées contre le centromère B sont représentées dans le tableau XIII et la figure 20.

Tableau XIII : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production des anti CENP.

	Anti-CENP (+) (n = 5)	Anti-CENP (-) (n =78)	Sujets Sains (n = 126)	Anti-CENP (+) Vs. SS		Anti-CENP (-) Vs. SS		Anti-CENP (+) Vs. (-)	
				χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P
Génotypes									
CC	5(100%)	38(48.7%)	40 (32%)	9.935	0.002	5.876	0.015	6.144	0.013
CT	00(%)	29(37.17%)	58 (46%)	-	-	1.543	0.214	-	-
TT	00(%)	11(14.10%)	28 (22%)	-	-	2.054	0.152	-	-

L'Anti-Centromère B est réalisée que sur 5 patients, qui ont un CENP (+), il serait donc intéressant de confirmer ces résultats sur un effectif plus important, mais malgré cette différence d'effectif des deux groupes, la comparaison entre les CENP (+) et les CENP (-) montre une différence significative, le génotype CC est plus fréquent chez les patients CENP (+) que chez les patients CENP (-) $\chi^2=6.144$; $P < 0.05$, et chez les sujets sains avec un $\chi^2=9.935$; $P < 0.05$. En revanche, les génotypes « CT et TT » chez le groupe producteur, non producteur de l'auto-AC, et sain ne présente aucune différence significative. Et aucune conclusion ne peut être attribuée.

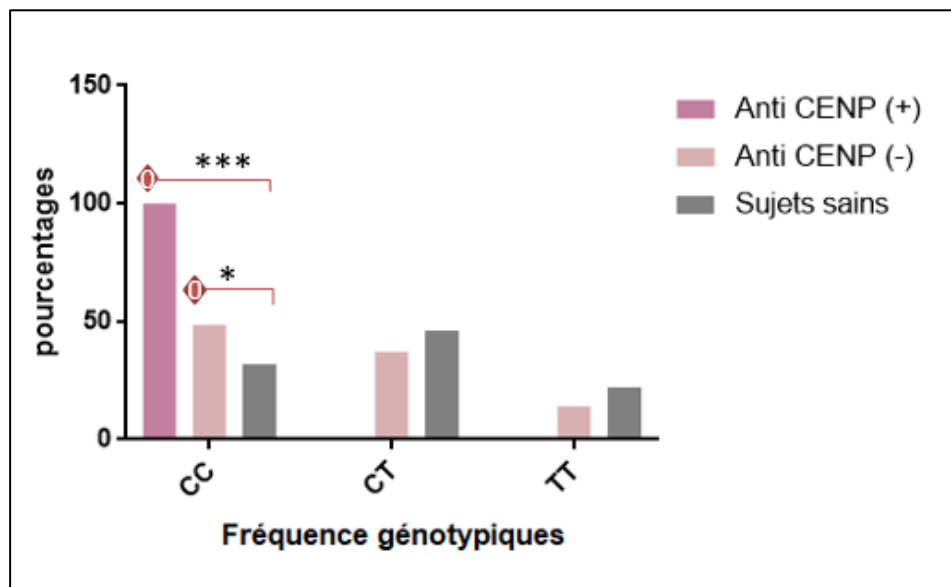


Figure 20 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les Patients atteints de LES vs. Sujets Sains, en fonction de la production des anti CENP, * : $P < 0.1$; *** : $P < 0.01$.

I.5.6. SNP IRF (rs752637) et la production des anticorps anti-ADNn

Les fréquences génotypiques du SNP IRF (rs752637) chez les patients lupiques et les sujets sains, en fonction de la production ou non d'anti-ADNn, figurent dans le tableau XIV et la figure 21.

Tableau XIV : Fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES Vs. Sujets sains en fonction de la production d'anti ADNn.

	Anti-ADNn (+) (n = 54)	Anti-ADNn (-) (n =33)	Sujets Sains (n = 126)	Anti ADNn (+) Vs. SS		Anti ADNn (-) Vs. SS		Anti ADNn (+) Vs. (-)	
				χ^2	p	χ^2	p	χ^2	P
Génotypes									
CC	24 (44.4%)	20 (60.6%)	40 (32%)	2.660	0.103	9.270	0.002	2.140	0.143
CT	22(41%)	9(27%)	58 (46%)	0.429	0.513	3.774	0.052	0.62	0.203
TT	8(14.44%)	4(12%)	28 (22%)	1.296	0.255	1.660	0.198	0.125	0.724

Les patients lupiques non producteurs d'anti ADNn, portent le génotype CC avec une fréquence significative par rapport aux sujets sains ($\chi^2=9.270$; **P <0.05**), le génotype CT est significativement plus fréquent chez le groupe sain comparé au groupe ADNn (+) ($\chi^2=3.774$; **P=0.05**).

En fin, l'analyse du génotype TT ne montre aucune différence significative en comparant les patients producteurs et non producteurs d'anti ADNn avec le groupe de patients sains.

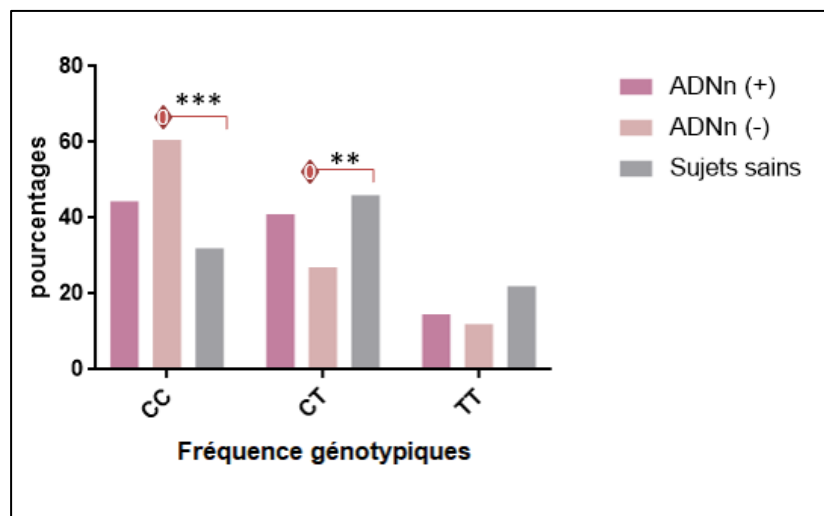


Figure 21 : Représentation graphique des fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients atteints de LES vs sujets sains, en fonction de la production des anti ADNn. ** : P <0.05 ; *** : P <0.01

II. Discussion

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique complexe causée à la fois par des facteurs génétiques, environnementaux, endocriniens, et immunologiques. Les scans du génome dans les familles atteintes de LES indiquent de multiples régions chromosomiques potentielles qui hébergent des gènes de susceptibilité à cette maladie. La production accrue d'interféron de type I (INF-I), et l'expression des gènes inductibles par l'IFN sont couramment observées dans le LES et peuvent être déterminantes dans la pathogenèse moléculaire de la maladie.

Les études d'association génétique fournissent un outil potentiellement puissant pour identifier les variations génétiques qui influencent la susceptibilité aux maladies. Dans le cas de l'association du variant IRF5 avec le LES, des répliques supplémentaires entre des groupes distincts de patients d'origines ethniques différentes, permettent des gains significatifs dans le rétrécissement de l'intervalle associé à la maladie en raison de différents schémas de déséquilibre de liaison.

Le présent travail s'agit d'une étude cas-témoins ayant pour objectif principal de rechercher une association entre le polymorphisme de nucléotide unique du gène IRF5 SNP rs752637, et la susceptibilité au développement du LES, mais également de rechercher une corrélation entre ce polymorphisme et la production d'auto-anticorps chez les patients atteints de cette pathologie.

La présente étude est réalisée sur 87 patients lupiques, la pathologie semble avoir une prédominance féminine, avec un sexe ratio femme/homme de 11/1. Ces résultats rejoignent de nombreux travaux notamment ceux de Tsokos et *al.*, en 2011 et Arnaud et *al.*, en 2013 qui démontrent que chez la population française lupique, la prédominance est féminine

D'après Othmani et *al.*, en 2002, cette prédominance féminine peut être causée par les hormones sexuelles comme les œstrogènes, l'augmentation des taux plasmatiques de 17 β -estradiol, et la diminution des concentrations plasmatiques de testostérone (Perdriger et *al.*, 2005), mais également à cause de la grossesse au cours de laquelle les poussées lupiques sont aussi déclenchées au péri et post-partum, et à l'utilisation de la pilule progestative (Othmani et *al.*, 2002). Le mécanisme d'action des hormones sexuelles est inconnu, mais ces dernières ont des effets sur les réponses immunitaires (Lemaire et *al.*, 2010). 26,19% des patients lupiques de cette étude sont âgés entre 20 et 44 ans, dont l'âge moyen est de 31.65 ans. Ceux-ci rejoint

les travaux de Cunningham et *al.*, en 2011 et Shelly et *al.*, en 2012 qui ont rapporté que le LES affecte préférentiellement les femmes jeunes en période d'activité ovulatoire (20-40ans).

Il faut noter que cette pathologie peut aussi s'observer chez les enfants et les personnes âgées jusqu' à un âge avancé dans la vie (Arnaud et *al.*, 2013).

De nombreuses atteintes s'observent au cours du lupus érythémateux systémique, qui diffèrent d'un sujet à un autre. En outre les symptômes cliniques de la maladie n'apparaissent qu'après plusieurs années d'évolution des mécanismes immunologiques pathogènes. À ce titre, les anticorps anti-nucléaires, véritables empreintes biologiques de la maladie, sont détectables plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques, leur spécificité se diversifie et leur titre augmente progressivement au cours du temps avant l'apparition des premiers symptômes cliniques (Arbuckle et *al.*, 2003), et c'est ce qui est le cas dans la population étudiée dans cette étude immunogénétique clinique.

Une variété de symptômes cliniques est présente chez les patients lupiques, phénotypiques externes, systémiques, et d'autres au niveau des organes internes y compris le rein. La présentation clinique est polymorphe. Les tissus et les organes le plus souvent atteints sont la peau, les articulations, les reins, et les cellules sanguines. Ces résultats rejoignent les travaux de Yee et *al.*, en 2007.

Les atteintes articulaires, et rénales sont plus marquées chez les malades, ces mêmes observations ont été rapportées par Karass et *al.*, en 2012, avec un faible taux des autres atteintes, cela pourrait être dû au manque de services spécialisés, ou à des effets secondaires des traitements administrés.

La recherche des facteurs anti-nucléiques (FAN) est réalisée chez tous les patients, et s'est révélée positive dans la majorité de la population, l'aspect moucheté est le plus dominant. L'anticorps Anti-SSA est retrouvé chez 67.8% des patients, rejoignant ainsi les résultats de Ghedira et *al.*, en 2002 ; et Louzir et *al.*, en 2003 qui ont démontré que la fréquence des anti-SSA et anti-SSB varie entre 20 à 60 %. D'après Petri et *al.*, en 2002, ces auto-anticorps ont une forte valeur prédictive pour le diagnostic du LES.

Les anticorps Anti-SSB et les Anti-Sm sont présents chez 25.28% et 49.42% des patients respectivement. Ces mêmes résultats sont indiqués par Haddouk et *al.*, en 2006, montrant que les anticorps anti-Sm sont très spécifiques du LES, et sont inclus dans les critères sérologiques

de la maladie tout comme les anticorps anti-ADNdb. Ces derniers sont aussi présents avec un pourcentage de 62% chez le groupe malade, et sont en accord avec ceux de Kavanaugh et *al.*, en 2002, qui ont montré que 70 % des patients lupiques présentent des anticorps anti-ADNn. Quant aux anticorps Anti-Scl-70 et aux Anti-Jo-1, ils sont présents chez un nombre faible de malades 2.3 % seulement, par contre Louzir et ses collaborateurs., en 2003, démontrent que ces mêmes autoanticorps sont présents chez 66% de malades lupiques tunisiens. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effectif faible de nos patients.

La population étudiée dans la présente étude est choisie aléatoirement, les échantillons sanguins sont d'abord recueillis, les ADN extraits par la méthode de Salting-Out, pour être répliqués par la technologie TaqMan.

La présente étude démontre que l'Allèle C et le géotype CC du polymorphisme unique de nucléotide de l'IRF5 -2716 C/T (rs752637) sont significativement plus fréquents chez les patients atteints de LES comparés aux sujets sains ($\chi^2 = 7.988$; $p < 0,05$; OR = 1.79), ($\chi^2 = 7.639$; $p < 0,05$; OR = 2.20) respectivement, et seraient probablement de ce fait associés à une susceptibilité à développer le lupus érythémateux systémique. En revanche, l'allèle T est significativement plus fréquent chez les sujets sains par rapport groupe lupique (45 % et 31.6% respectivement) ($\chi^2 = 7.988$; $p < 0,05$; OR = 0.56), et pourrait être de ce fait associé à une protection contre le développement du lupus érythémateux systémique.

L'analyse des fréquences génotypiques de ce polymorphisme SNP révèle que les géotypes « CT » et « TT » sont présents à la fois chez les sujets sains et lupiques sans qu'il y ait de différence significative avec 46%, 22% vs. 35.6%, et 13.8% respectivement et un $p > 0,05$.

Ces résultats rejoignent les données de la littérature, y compris l'étude de Sigurdsson et *al.*, en 2005, où ils démontrent une association entre l'SNP IRF5 -2716 C/T et le développement du LES dans la population finlandaise avec un OR = 1,6. Le même auteur et ces collaborateurs en 2008 suivie de Kely et *al.*, en 2008 ont démontré une association entre l'allèle C et le LES chez la population espagnole et américaine respectivement avec un OR= 1.3. Graham DS et ses collègues., et Ferreiro-Neira et son équipe en 2007 ont montré aussi cette association chez la population britannique ($p=0.011$) et suédoise (OR=1.4) respectivement.

Pour reproduire l'association avec LES dans une population asiatique, Shin et *al.*, en 2007 ont examiné les effets génétiques dans une cohorte lupique d'une population coréenne,

avec une population d'étude composée de 1565 sujets, comprenant de 593 cas lupiques et de 972 témoins génotypés également à l'aide de la méthode TaqMan. Les résultats de cette équipe ont révélé que l'effet génétique sur la susceptibilité à développer le LES médié par les variants de l'IRF5 peut être retrouvé dans la population blanche comme dans la population asiatique et l'allèle C de l'SNP rs752637 est plus dominant chez la population malade avec un OR=1.27.

Afin d'établir d'éventuelles hypothèses sur l'association de l'SNP IRF5 rs 752637 avec la maladie lupique, et de comprendre si ce SNP ou plus précisément si ses fréquences alléliques, et génotypiques sont associées spécifiquement à cette pathologie ou à une autre maladie auto-immune, la présente étude compare les fréquences alléliques et génotypiques de ce polymorphisme avec une population contrôle composée de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques ne montre aucune différence significative entre la population contrôle et la population lupique, révélant ainsi une association entre la maladie lupique et la PR. Ce polymorphisme n'est donc pas spécifique au LES mais pourrait influencer le déterminisme génétique de ces deux pathologies. En soutenant l'hypothèse selon laquelle les mécanismes par lesquels les gènes de susceptibilité confèrent une susceptibilité aux maladies auto-immunes peuvent en partie être spécifiques à la maladie, comme ils peuvent être partagés.

En revanche Maalej et *al.*, en 2008 démontre l'absence d'association entre ce polymorphisme SNP rs752637 de l'IRF5 et la polyarthrite rhumatoïde.

Dans ce cas alors, il serait intéressant de confirmer ces résultats avec un effectif plus important, pour définir d'éventuelles conclusions de l'association de ce polymorphisme et la susceptibilité à développer le LES et la polyarthrite rhumatoïde chez la population Algérienne en les comparant à d'autres maladies auto-immunes qui ne présentent aucun lien avec ce polymorphisme. Par exemple, Li et ses collègues., en 2009 dans une étude chinoise ont montré qu'il n'existe aucune différence significative entre les fréquences alléliques des polymorphismes rs2280714 et rs752637 chez les patients atteints de la maladie de Behçet et les contrôles normaux ($p = 0,647$ et $p = 0,105$, respectivement). Les fréquences génotypiques du rs2280714 et du rs752637 n'étaient pas différentes aussi entre les patients et les témoins normaux ($p = 0,233$ et, $p = 0,266$, respectivement).

Dans le but de rechercher une association entre le polymorphisme SNP IRF5 (rs752637) et la production d'auto-anticorps spécifiques au LES, les fréquences génotypiques du SNP IRF5 (rs752637) chez les patients lupiques sont comparées entre les sujets sains, les sujets lupiques producteurs, et non-producteurs d'auto-anticorps.

L'analyse du polymorphisme étudié dans le groupe des patients lupiques démontre que le génotype « CC » est significativement plus fréquent chez le groupe lupique producteur d'anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, et anti-CENP par rapport au groupe sains ($p < 0,05$). Mais étant donné que ce même génotype est également présent chez le groupe de patients non producteurs d'auto-anticorps, et qu'il est significativement plus fréquent chez les patients anti SSB (-), anti Sm (-), anti Scl-70(-), et anti ADNn (-) par rapport aux sujets sains, une corrélation entre ce polymorphisme et la production d'auto-anticorps ne peut être conclue. En revanche, le génotype « CT » est significativement plus fréquent chez le groupe non producteur d'auto-anticorps, et sain par rapport au groupe producteur d'auto-anticorps, ce résultat pourrait laisser penser que ce génotype pourrait avoir une implication protectrice vis-à-vis de la progression de la maladie lupique et la sévérité de cette manifestation polymorphe. Malheureusement, l'étude ne peut pas être comparée aux données mondiales ou maghrébines, car la majorité des études publiées analysent plusieurs SNP en même temps, et favorisent les analyses des haplotypes de risque.

Enfin, l'association des polymorphismes d'IRF5 à la susceptibilité au développement du LES et des autres maladies auto-immunes, et la compréhension des fonctions possibles des variants alléliques du gène IRF5 au niveau moléculaire, nécessite d'autres études expérimentales et fonctionnelles.

Les facteurs de transcription de la famille IRF jouent un rôle essentiel dans la régulation des gènes induits par l'infection virale et l'immuno-stimulation, en plus de la régulation de la croissance cellulaire, l'IRF5 a été initialement identifié comme un régulateur de l'expression du gène IFN de type I,

L'IRF5 régule la sécrétion de l'IFN de type I, indiquant une voie de régulation importante pour l'induction contrôlée de plusieurs gènes immuno-modulateurs. L'expression constitutive d'IRF5 est limitée aux organes lymphoïdes, aux cellules dendritiques et aux lymphocytes du sang périphérique. Cependant, elle est absente dans de nombreuses lignées cellulaires de leucémie et de lymphome, ce qui pourrait indiquer une propension à la délétion du gène IRF5, ou éventuellement un silençage par méthylation dans ces malignités. IRF5 est phosphorylé dans le LES, ce qui entraîne l'activation d'un spectre de gènes IFN.

Ainsi, le polymorphisme au sein du gène IRF5 pourrait affecter plusieurs fonctions cellulaires importantes pour le développement d'une maladie auto-immune, y compris le LES (Mancl *et al.*, 2005).

Kraus Gruber et ses collaborateurs, en 2010 et en 2011 montrent le rôle critique de l'IRF5 dans la polarisation des macrophages M1 et définissent une fonction précédemment inconnue pour l'IRF5 en tant que répresseur transcriptionnel (Kraus Gruber *et al.*, 2011).

Les stimuli inflammatoires tels que l'infection bactérienne et le traitement des monocytes avec le GM-CSF (facteur de polarisation des macrophages M1) peuvent réguler l'expression de l'IRF5, qui à son tour intervient dans la transcription de marqueurs M1 typiques tels que l'IL-12, TNF α , IFN γ et la répression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Par contre d'après Aleth Perdriger *et al.*, en 2002, les patients LES présentent une augmentation de production des deux cytokines IL-10 et TNF α (en plus de l'IL6, IL4 et IL1Ra).

Une étude Italienne sur un modèle animal (porc) à identifier aussi un SNP faux-sens dans la région de liaison au peptide du gène IRF5, et serait associé au taux d'IL-10 et IFN-c (Liu *et al.*, 2018).

Suivant ces analyses, il serait intéressant d'évaluer les taux sériques d'IL-10 et de TNF-alpha chez les patients LES Algériens, dans le but de trouver une éventuelle association entre le polymorphisme d'IRF5 et la production de ces cytokines.

Conclusion

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune systémique complexe, la présente étude est réalisée sur 87 patients lupiques, avec une prédominance féminine, et un sexe ratio femme/homme de 11/1, le LES touche électivement l'adulte jeune de 20 à 40 ans. Cette maladie non spécifique d'organe et hétérogène touche avec prédilection la peau, les articulations, et entraîne notamment des néphropathies rénales.

En analysant le polymorphisme du facteur régulateur de l'IFN de type I 5 « IRF5 », la présente étude démontre que l'allèle C et le génotype « CC » sont plus fréquents chez la population lupique, et contrôle d'origine Algérienne par rapport aux sujets sains. Ce polymorphisme n'est donc pas spécifique au LES mais pourrait influencer le déterminisme génétique de ces deux pathologies. En voulant rechercher si ce génotype détecté est associé à une production d'auto-anticorps nucléaires chez les patients lupiques, aucune corrélation positive n'a pu être conclue. Alors que le génotype « CT » semble avoir une implication protectrice vis-à-vis de la progression et la sévérité de la maladie lupique, étant donné qu'il est plus fréquent chez les patients non producteurs des auto-anticorps et chez le groupe sain.

Les conséquences possibles du variant protéique de ce polymorphisme mono-nucléotidique sur l'expression de l'IRF5, et son impact fonctionnel restent à élucider expérimentalement.

Les études d'association génétique fournissent un outil potentiellement puissant pour identifier les variations génétiques qui influencent la susceptibilité aux maladies communes, et l'association de l'IRF5 avec le LES, renforcent encore l'idée que le système IFN de type I est essentiel dans l'étiopathogénie de cette maladie auto-immune.

En conclusion, une compréhension accrue des mécanismes cellulaires, notamment de l'expression génétique et des voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'apparition et au développement du LES est nécessaire, afin d'améliorer les technologies de la « Médecine de précision », et les techniques de la thérapie géniques et ciblées.

Références

ARNAUD, Laurent, FAGOT, Jean-paul, PAÏTA, Michel, et al. Incidence and Prevalence Of Systemic Lupus Erythematosus: A 2010 Nation-wide Population-based Study Using French National Administrative Databases. *Arthritis & Rheumatism*, 2013, vol. 65, p. S456.

BAECHLER, Emily C., BATLIWALLA, Franak M., KARYPIS, George, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no 5, p. 2610-2615.

BARNES, Betsy J., MOORE, Paul A., et PITHA, Paula M. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon α genes. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no 26, p. 23382-23390.

BARNES, Betsy J., FIELD, Ann E., et PITHA-ROWE, Paula M. Virus-induced Heterodimer Formation between IRF-5 and IRF-7 Modulates Assembly of the IFN α Enhanceosome in Vivo and Transcriptional Activity of IFN α Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no 19, p. 16630-16641.

BAUMANN, Irith, KOLOWOS, Wasilis, VOLL, Reinhard E., et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 2002, vol. 46, no 1, p. 191-201.

BUXERAUD, Jacques. Le lupus érythémateux systémique. *Actualités Pharmaceutiques*, 2016, vol. 55, no 560, p. 45-47.

GRAHAM, Deborah S. Cunninghame, MANKU, Harinder, WAGNER, Susanne, et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Human molecular genetics*, 2006, vol. 16, no 6, p. 579-591.

CUNNINGHAM, Melissa et GILKESON, Gary. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2011, vol. 40, no 1, p. 66-73.

COUZINET, Arnaud, TAMURA, Kaoru, CHEN, Hui-min, et al. A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no 7, p. 2556-2561.

FANG, C. M., ROY, S., NIELSEN, E., et al. Unique contribution of IRF-5-Ikaros axis to the B-cell IgG2a response. *Genes and immunity*, 2012, vol. 13, no 5, p. 421.

FERREIRO-NEIRA, I., CALAZA, M., ALONSO-PEREZ, E., et al. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE. *Genes and immunity*, 2007, vol. 8, no 5, p. 429.

FUJII, Yoshifumi, SHIMIZU, Toshiyuki, KUSUMOTO, Masahiro, et al. Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO journal*, 1999, vol. 18, no 18, p. 5028-5041.

- GARCIA-ROMO, Gina S., CAIELLI, Simone, VEGA, Barbara, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*, 2011, vol. 3, no 73, p. 73ra20-73ra20.
- GHEDIRA, I., SAKLY, W., et JEDDI, M. Caractéristiques cliniques et sérologiques du lupus érythémateux systémique: à propos de 128 cas. *Pathologie Biologie*, 2002, vol. 50, no 1, p. 18-24.
- GHODKE-PURANIK, Yogita et NIEWOLD, Timothy B. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*, 2015, vol. 64, p. 125-136.
- GRAHAM, Deborah S. Cunninghame, MANKU, Harinder, WAGNER, Susanne, et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Human molecular genetics*, 2006, vol. 16, no 6, p. 579-591.
- GRAHAM, Robert R., KOZYREV, Sergey V., BAECHLER, Emily C., et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 2006, vol. 38, no 5, p. 550.
- GRAHAM, Robert R., KYOGOKU, Chieko, SIGURDSSON, Snaevar, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, vol. 104, no 16, p. 6758-6763.
- HADDOUK, S., AYED, M. Ben, BAKLOUTI, S., et al. Autoanticorps dans le lupus érythémateux systémique: profil et corrélations cliniques. *Pathologie Biologie*, 2005, vol. 53, no 6, p. 311-317.
- HARLEY, Isaac TW, KAUFMAN, Kenneth M., LANGEFELD, Carl D., et al. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 2009, vol. 10, no 5, p. 285.
- HERRMANN, Martin, VOLL, Reinhard E., ZOLLER, Otmar M., et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 1998, vol. 41, no 7, p. 1241-1250.
- HU, Guodong et BARNES, Betsy J. IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no 5, p. 2767-2777.
- Marisa Klein-Gitelman, Jerome Charles Lane. Systemic lupus erythematosus. In: Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn LR editors. Seventh edition, *Textbook of Pediatric Rheumatology*. Philadelphia, PA : Elsevier Saunders; 2016; pp285-317.
- KARRAS, Alexandre. Atteinte rénale du lupus érythémateux disséminé. *La Presse Médicale*, 2012, vol. 41, no 3, p. 260-266.

- KELLY, J. A., KELLEY, J. M., KAUFMAN, K. M., et al. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes and immunity*, 2008, vol. 9, no 3, p. 187.
- KYOGOKU, C. et TSUCHIYA, N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes and immunity*, 2007, vol. 8, no 6, p. 445.
- KLEIN, J., Mursic, M., and Nagy, Z. (1982). *Transplant. Porc*, 16, 581-582.
- KRAUSGRUBER, Thomas, SALIBA, David, RYZHAKOV, Grigory, et al. IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells. *Blood*, 2010, vol. 115, no 22, p. 4421-4430.
- KRAUSGRUBER, Thomas, BLAZEK, Katrina, SMALLIE, Tim, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH 1-TH 17 responses. *Nature immunology*, 2011, vol. 12, no 3, p. 231.
- KAWASAKI, Aya, KYOGOKU, Chieko, OHASHI, Jun, et al. Association of IRF5 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis & Rheumatology*, 2008, vol. 58, no 3, p. 826-834.
- KRAUSGRUBER, Thomas, BLAZEK, Katrina, SMALLIE, Tim, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH 1-TH 17 responses. *Nature immunology*, 2011, vol. 12, no 3, p. 231.
- LARTIGUE, Aurelia, COLLIOU, Natacha, CALBO, Sébastien, *et al.* Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in *lpr* mutation-induced mouse lupus. *The Journal of Immunology*, 2009, vol. 183, no 10, p. 6207-6216.
- LAZZARI, Elisa et JEFFERIES, Caroline A. IRF5-mediated signaling and implications for SLE. *Clinical Immunology*, 2014, vol. 153, no 2, p. 343-352.
- LEMAIRE, Véra. *Maladies systémiques. Réflexions*, 2010, vol. 14, p. 24.
- LIEN, Chunyang, FANG, Chee-Mun, HUSO, David, et al. Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no 10, p. 4664-4668.
- LOUZIR, B., OTHMANI, S., ABDELHAFIDH, N. Ben, et al. Le lupus érythémateux systémique en Tunisie. Etude multicentrique nationale. A propos de 295 observations. *La revue de médecine interne*, 2003, vol. 24, no 12, p. 768-774.
- LI, Haijun, YANG, Peizeng, JIANG, Zhengxuan, et al. Lack of association of two polymorphisms of IRF5 with Behcet's disease. *Molecular vision*, 2009, vol. 15, p. 2018.
- LIU, Yang, XIE, Rui, LI, Hejun, et al. Expression, polymorphism of IRF5 gene and association with serum cytokine levels in pig. *Italian Journal of Animal Science*, 2018, p. 1-5.

- MANCL, Margo E., HU, Guodong, SANGSTER-GUITY, Niquiche, et al. Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 22, p. 21078-21090.
- MANCL, Margo E., HU, Guodong, SANGSTER-GUITY, Niquiche, et al. Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 22, p. 21078-21090.
- MATHIAN, A., ARNAUD, L., et AMOURA, Z. Physiopathologie du lupus systémique: le point en 2014. *La Revue de médecine interne*, 2014, vol. 35, no 8, p. 503-511.
- MANTOVANI, Alberto, SICA, Antonio, et LOCATI, Massimo. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, 2005, vol. 23, no 4, p. 344-346.
- MAALEJ, A., HAMAD, M. Ben, REBAI, A., et al. Association of IRF5 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Tunisian population. *Scandinavian journal of rheumatology*, 2008, vol. 37, no 6, p. 414-418.
- MEYER, Olivier. Critères de classification: mode d'emploi pour le diagnostic de lupus systémique. *Revue du rhumatisme*, 2005, vol. 72, no 2, p. 142-149.
- MOULTON, Vaishali R., SUAREZ-FUEYO, Abel, MEIDAN, Esra, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective. *Trends in molecular medicine*, 2017, vol. 23, no 7, p. 615-635.
- NIEWOLD, Timothy B., KELLY, Jennifer A., KARIUKI, Silvia N., et al. IRF5 haplotypes demonstrate diverse serological associations which predict serum interferon alpha activity and explain the majority of the genetic association with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 2011, p. annrheumdis-2011-200463.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., et POLESKY, H. F. R. N. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 1988, vol. 16, no 3, p. 1215.
- OHL, Kim et TENBROCK, Klaus. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology*, 2015, vol. 45, no 2, p. 344-355.
- OTHMANI, S., LOUZIR, B., et al. Lupus systémique chez 24 hommes tunisiens: analyse clinicobiologique et évolutive. *La revue de médecine interne*, 2002, vol. 23, no 12, p. 983-990.
- OUYANG, Xinshou, NEGISHI, Hideo, TAKEDA, Rie, et al. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, vol. 354, no 4, p. 1045-1051.
- OWEN, Judy, PUNT, Jenni, et STRANFORD, Sharon. *Immunologie-7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Dunod, 2014.

- PAPADIMITRAKI, Eva D., CHOULAKI, Christianna, KOUTALA, Eleni, et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: Implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis & Rheumatology*, 2006, vol. 54, no 11, p. 3601-3611.
- PANDEY, Amit K., YANG, Yibin, JIANG, Zhaozhao, et al. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 2009, vol. 5, no 7, p. e1000500.
- PERDRIGER, Aleth, WERNER-LEYVAL, Stéphanie, et ROLLOT-ELAMRANI, Karine. The genetic basis for systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine*, 2003, vol. 70, no 2, p. 103-108.
- PERDRIGER, Aleth. Génétique du lupus et environnement. *Revue du rhumatisme*, 2005, vol. 72, no 2, p. 120-125.
- PERNIOK, A., WEDEKIND, F., HERRMANN, M., et al. High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 1998, vol. 7, no 2, p. 113-118.
- PETRI, Michelle. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best practice & research Clinical rheumatology*, 2002, vol. 16, no 5, p. 847-858.
- POON, Ivan KH, LUCAS, Christopher D., ROSSI, Adriano G., et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 2014, vol. 14, no 3, p. 166.
- RHODES, B. et VYSE, T. J. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology*, 2008, vol. 47, no 11, p. 1603-1611.
- RICHEZ, Christophe, BARNETCHE, Thomas, MICELI-RICHARD, Corinne, et al. Implication de la famille des facteurs de transcription IRF dans l'auto-immunité. *Revue du rhumatisme*, 2010, vol. 77, no 6, p. 556-562.
- RUMORE, Peter M. et STEINMAN, Charles R. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *The journal of clinical investigation*, 1990, vol. 86, no 1, p. 69-74.
- SHELLY, Shahar, BOAZ, Mona, et ORBACH, Hedi. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 2012, vol. 11, no 6-7, p. A465-A470.
- SHIN, Hyoung Doo, SUNG, Yoon-Kyoung, CHOI, Chan-Bum, et al. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. *Arthritis research & therapy*, 2007, vol. 9, no 2, p. R32.
- SIGURDSSON, Snaevar, NORDMARK, Gunnel, GÖRING, Harald HH, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic

lupus erythematosus. *The American Journal of Human Genetics*, 2005, vol. 76, no 3, p. 528-537.

SIGURDSSON, Snaevar, GÖRING, Harald HH, KRISTJANSDOTTIR, Gudlaug, et al. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 17: 872–881. 2008.

SUBRAMANIAN, Srividya, TUS, Katalin, LI, Quan-Zhen, et al. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no 26, p. 9970-9975.

SCHOENEMEYER, Annett, BARNES, Betsy J., MANCL, Margo E., et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no 17, p. 17005-17012.

SLINGSBY, Jason H., NORSWORTHY, Peter, PEARCE, Glen, et al. Homozygous hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus: a new family and the molecular basis of C1q deficiency in three families. *Arthritis & Rheumatology*, 1996, vol. 39, no 4, p. 663-670.

SUH, Chang-Hee, HILLIARD, Brendan, LI, Sophia, et al. TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 2010, vol. 12, no 4, p. R146.

TAKAOKA, Akinori, YANAI, Hideyuki, KONDO, Seiji, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 2005, vol. 434, no 7030, p. 243.

TRUEDSSON, Lennart, BENGTSSON, Anders A., et STURFELT, Gunnar. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 2007, vol. 40, no 8, p. 560-566.

TSOKOS, George C., LO, Mindy S., REIS, Patricia Costa, et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, vol. 12, no 12, p. 716.

VILLANUEVA, Eneida, YALAVARTHI, Srilakshmi, BERTHIER, Celine C., et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 2011, vol. 187, no 1, p. 538-552.

YANAI, Hideyuki, CHEN, Hui-min, INUZUKA, Takayuki, et al. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, vol. 104, no 9, p. 3402-3407.

YEE, Chee-Seng, FAREWELL, Vernon, ISENBERG, David A., et al. British Isles Lupus Assessment Group 2004 index is valid for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 2007, vol. 56, no 12, p. 4113-4119.

ZERVOU, M. I., DORSCHNER, J. M., GHODKE-PURANIK, Y., et al. Association of IRF5 polymorphisms with increased risk for systemic lupus erythematosus in population of Crete, a southern-eastern European Greek island. *Gene*, 2017, vol. 610, p. 9-14.

ZHUO, Ran, HASING, Maria Eloisa, PANG, Xiaoli, et al. A single nucleotide polymorphism at the TaqMan probe-binding site impedes real-time reverse transcription-PCR-based detection of norovirus GII. 4 Sydney. *Journal of clinical microbiology*, 2015, vol. 53, no 10, p. 3353-3354.

Annexe 1 : Critères de classification du lupus érythémateux systémique proposé par le Collège Américain de Rhumatologie (ACR), 1982, modifié en 1997 par HOCHBERG (Marisa Klein-Gitelman., 2016).

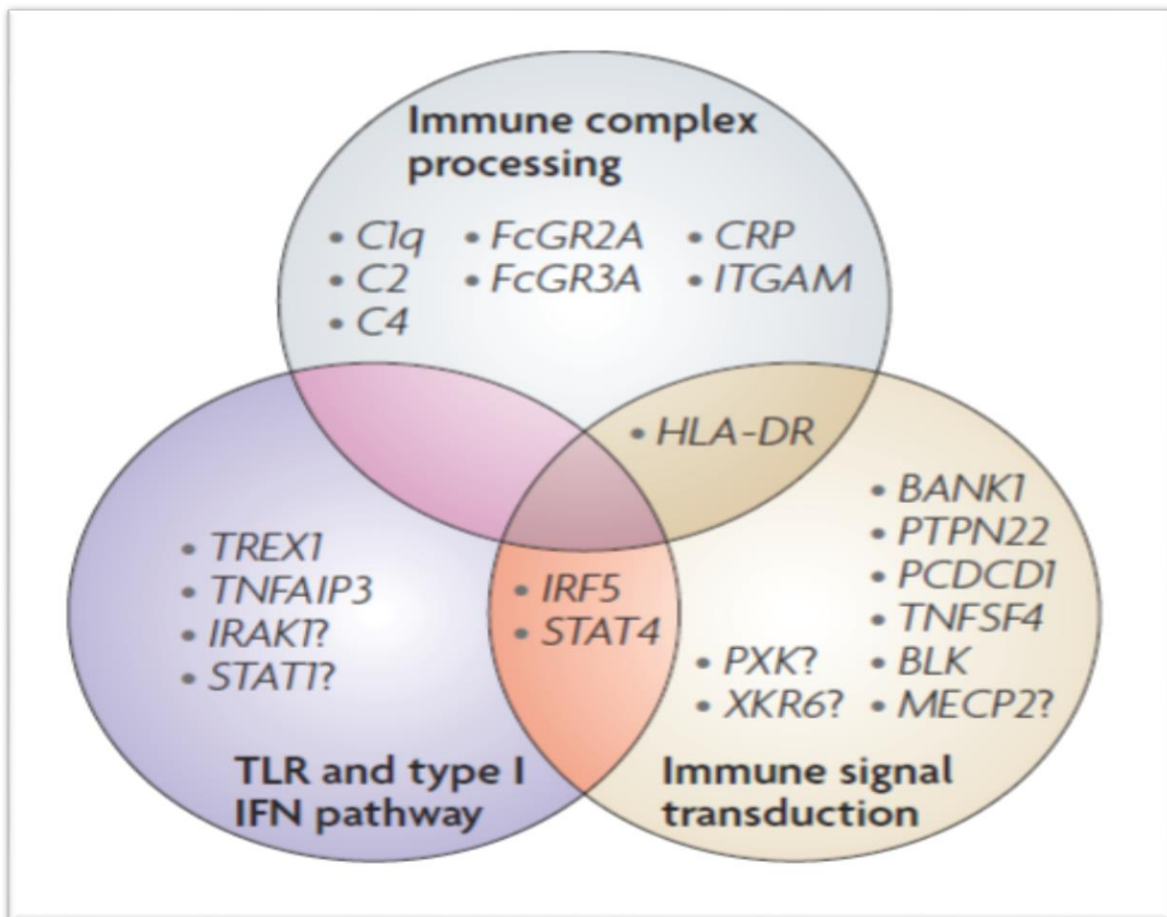
Critères	Définitions
1. Eruption	malaire Erythème malaire en aile de papillon
2. Lupus discoïde	Erythème en placards avec des squames kératosiques adhérentes
3. Photosensibilité	Eruptions cutanées résultant d'une réaction inhabituelle au soleil
4. Ulcérations buccales ou nasopharyngiennes	Ulcères oraux ou nasopharyngées habituellement douloureux
5. Polyarthrite non érosive	Impliquant au moins deux articulations périphériques et caractérisée par des douleurs, une augmentation de volume ou un épanchement articulaire
6. Atteinte des séreuses (pleurésie ou péricardite)	– Pleurésie : épanchement pleural – Péricardite : documenté par un E.C.G.
7. Atteinte rénale – Protéinurie > 0,5 g/jour	– Présence de cylindres dans les urines (G.R., hémoglobine, leucocytes, cellules tubulaire...)
8. Atteinte neurologique	– Psychose – Convulsion
9. Atteinte hématologique	– Anémie hémolytique avec une hyperréticulose – Ou leucopénie < 4000/mm ³ – Ou lymphopénie < 1500/mm ³ – Ou thrombocytopénie < 100 000/mm ³ En l'absence de cause médicamenteuse
10. Désordre immunologique	– Présence d'anticorps anti-ADN natif – Ou d'Ac Anti-Sm – Ou fausse sérologie syphilitique
11. Anticorps antinucléaires	Taux anormal d'anticorps antinucléaires en l'absence de médicaments inducteurs de lupus

NB : Cette classification est particulièrement utilisée pour définir la population à inclure dans les essais cliniques dans le lupus.

Annexe 2 : IFN dans la physiopathologie du lupus systémique : les dates importantes

Année	Nature de la découverte
1957	Description de l'IFN, facteur soluble induisant la résistance cellulaire aux virus
1972	Première description d'un effet immunologique de l'IFN
1975	L'IFN est présent à taux élevés dans le sérum des patients lupiques
1976	Identification des IFN de type I (IFN et)
1976	L'IFN/ induit, chez les souris, une glomérulonéphrite à complexes immuns
1978	La neutralisation de l'IFN/ inhibe le développement de la glomérulonéphrite à complexes immuns induite chez les souris par le virus LCMV
1980	Premières identifications et séquençage, séquences d'ADNc d'IFN
1982	L'IFN est l'IFN le plus souvent augmenté dans le sérum des patients lupiques
1990	Les taux sériques d'IFN sont corrélés à l'activité clinique du LS. Première description de lupus induit par un traitement par IFN chez l'homme.
90/96	Identification et caractérisation des composants du récepteur de l'IFN/
1999	Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes comme étant les principales cellules productrices d'IFN/
98/99	Les sérums lupiques contiennent des complexes immuns (constitués d'acides nucléiques et d'Ig) induisant la sécrétion d'IFN par les cellules dendritiques plasmacytoïdes
2001	Les monocytes des patients lupiques acquièrent, secondairement à leur exposition à l'IFN in vivo, toutes les caractéristiques de cellules dendritiques immunogéniques
2003	L'inactivation du récepteur de l'IFN/ prévient le développement du lupus murin. Présence de la « signature interféron » chez la majorité des patients lupiques
2005	Accélération franche du lupus murin par un traitement continu par IFN
2006	Premier essai thérapeutique neutralisant directement l'IFN dans le LS (phase 1)
2007	Description de mutations du gène codant une exonucléase (TREX1) à l'origine du syndrome d'Aicardi-Goutières
2011	Description de mutations du gène codant une phosphatase acide tartrate résistante à l'origine de la spondyle chondrodysplasie

Annexe 3 : Principaux gènes candidats, et les voies de signalisations déstabilisés dans le LES (Isaac *et al.*, 2009).



Annexe 4 :

Tableau II : Principales études génétiques qui démontrent des polymorphismes d'IRF5 associés à un risque accru de développer un lupus érythémateux systémique et leurs conséquences fonctionnelles (Original).

Références	Origines	Effectifs	Nbr de polymorphismes étudié	Résultats	Conséquences fonctionnelles
Sigurdsson, S et al., 2008	Caucasoïdes (Suède, Finlande, et Islande)	679 LES vs 798 parents sains et 438 témoins non apparentés	6 SNPs	Association significative avec rs729302, rs2004640 et rs752637	Altération du splicing de l'exon 1 d'IRF5 suggérée
Graham, RR et al., 2006	Analyse poolée (États-Unis, Espagne, Suède, Argentine)	1661 LES versus 2508 témoins	2 SNPs	Association significative avec rs2004640	Les patients porteurs de l'allèle T, rs2004640 sont les seuls à transcrire l'exon 1B. Une association avec l'allèle T, rs2280714, qui est lié à une expression accrue de l'ARNm d'IRF5 définit un haplotype conférant un risque accru de développer un LES
Cunningham, G et al., 2011	Caucasoïdes (Royaume-Uni)	380 familles SLE	8 SNPs	Association haplotypique avec motif TAT (rs2004640, rs10954213, rs2280714) Association avec rs10954213*allèle A	Association du motif haplotypique TAT avec le niveau d'expression de l'ARNm. Création d'un site de polyadénylation responsable de l'expression d'un variant de transcription (rs10954213*allèle A)
Graham, RR et al., 2007	Caucasoïdes (UE, Royaume-Uni et Suède)	555 familles trios et 2188 SLE versus 3596 témoins	16 SNPs + région de 30pb ins/del de l'exon 6	Association significative avec haplotype TInsCA (rs2004640, rs2070197, ins/del exon 6 et rs10954213)	Association du rs10954213A avec des taux élevés d'expression de l'ARNm d'IRF5
Sigurdsson, S et al., 2008	Caucasoïdes (Suède)	485 LES versus 563 témoins	24 SNPs et 3 polymorphismes de longueur	Association significative avec rs10488631 et CGGGG ins/del	Pas d'étude fonctionnelle. Les auteurs retrouvent un risque fortement accru de développer un LES chez les sujets porteurs de plusieurs allèles à risque d'IRF5 et de STAT4
Niewold TB, et al., 2008	Caucasoïdes et hispaniques	199LES	4 SNPs	Haplotypes définis selon les SNPs rs2004640, rs3807306, rs10488631 et rs2280714	Activité de l'IFN-sérique accrue chez les patients porteurs d'un génotype TACA/TACA, TACA/TATA et TACA/TCTA comparée aux autres génotypes

Annexe 5 :

Matériel non biologique :

- Micropipettes calibrées (10ml, 100ml, 1000ml).
- Tubes à essai en verre.
- Portoir pour tubes à essai.
- Agitateur magnétique (vortex).
- Aggiteateur des ependorfs
- Flacon de lavage en plastique.
- Centrifugeuse.
- Spectrophotomètre.
- Micropipettes multi canons
- Eau distillée stérile (H₂O)
- Gants en latex
- Chronomètre (AB :Applied biosysteme).
- Chambre froide.
- Godés en plastique.
- Embouts jetables pour micropipettes
- Eprouvettes en verre, bécber
- Ependorfs.
- Chambre pré PCR
- TaqMan Universal PCR Master Mix (contenant l'enzyme Taq ADN polymérase, les dNTPs, le MgCl₂, et une solution tampon à un pH constant adéquat pour la réaction de polymérisation).
- AD-Mix TaqMan SNP Genotyping Assays (contenant deux sondes TaqMan contenant des colorants fluorescents distincts, la molécule MGB spécifique à l'allèle, et une paire d'amorces PCR pour détecter des cibles SNP spécifiques).
- Microplaque 96 puits.
- Thermocycleur couplé au détecteur de la fluorescence, et un traiteur : logiciel 7500 softwares v2.0.1 de l'ordinateur lié au detecteur (AppliedBiosystemsTM).
- Dossiers médicales des patients.
- Spectrophotomètre (Nanodrobe).
- Portoir pour les épendorfs



Thermocycleur couplé au détecteur de la fluorescence, et un traiteur : logiciel 7500 softwares v2.0.1 de l'ordinateur lié au détecteur (AppliedBiosystems™).

