

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLEB de BLIDA

Faculté de Science de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme Master II en Science de la Nature et de la Vie

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

THEME

**Etude du polymorphisme -3835 G/T du gène
IRF-5 (rs2004640) chez des patients Algériens
atteints de sclérodermie systémique**

Présenté par :

Soutenu le : **09.07.2020**

- **Bellouti Manel Zahida**
- **Djemmal Chahinez**

Devant le Jury :

MOKRAN A.	Maitre de Conférences B	USDB1	Présidente
BENYAHIA N.	Maitre-Assistant A	USDB1	Examineur
BENIDIR M.	Maitre-Assistante A	IPA	Promotrice
AÏSSANI-ELFERTAS R.	Maitre de Conférences B	USDB1	Co-Promotrice

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

En guise de reconnaissance, on tient à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de notre travail de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste mémoire.

Nous voudrions, dans un premier temps remercier notre responsable et chef du département BMC le Dr. SAADI Leila qui a consacré son temps, tout au long de notre cursus universitaire, à nous prodiguer une formation pertinente et de haut niveau. Nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance et notre gratitude pour son aide, ses précieux conseils et son soutien indéfectible.

Nous adressons nos sincères remerciements à nos deux encadreur Dr. BENIDIR Mounira et Dr. AÏSSANI ELFARTAS Radia pour leur soutien, patience, disponibilité et surtout leurs judicieux conseils.

Nous voudrions remercier les membres de jury, la présidente Mme MOKRANE A., Maitre de Conférences B à l'USDBI et l'examineur Mr. BENYAHIA N., Maitre-Assistant A à l'USDBI, pour l'honneur qu'ils nous ont en acceptant de lire et d'examiner ce modeste travail. Nous comptons sur vos remarques sans doute enrichissantes.

Nous remercions chaleureusement toute l'équipe du Dr. BENIDIR Mounira, du laboratoire d'auto-immunités de l'Institut Pasteur pour leur orientation et accueil sympathique lors du stage.

Nous tenons aussi à remercier le Pr SALAH Sofiane Samir et le Dr. BENANI Sid Ahmed, mon oncle à moi Manel de nous avoir bien conseillé et orienté.

Nous remercions chaleureusement, tout le corps professoral de notre université, pour la qualité de la formation qu'ils nous ont offert, le travail et l'effort consenti à créer les conditions les plus favorables pour le déroulement de nos études.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

A nos très chers parents

*BELLOUTI Rafik et BENANI Maniya
DJEMMAL Mohamed et LAZHARI Fatima Zohra*

A ceux qui nous ont tout donné sans compter, à ceux qui nous ont soutenus durant toute notre vie, Aucune dédicace ne saurait exprimer notre profond amour.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que nous ne vous en acquitterai jamais assez. Vos prières ont été pour nous un grand soutien moral tout au long de nos études. On espère rester toujours dignes de votre estime.

Puisse Allah Le Tout Puissant vous préserve du mal, vous comble de santé, de bonheur et vous accorde longue et heureuse vie que vous puissiez nous guider vers d'autres pas si sereinement et affectueusement

A nos très chers sœurs: BELLOUTI Maria, Madina, Maissa et DJEMMAL Sarah et son mari HAMADAN Farouk,, Israa, Hanene ; et nos frères : BELLOUTI Mahieddine et DJEMMAL Mohamed Amine et sa merveilleuse femme SALEM Leila.

A mon cher fiancé IZRI Zineddine, moi Manel Je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant toutes ces longues années d'études.

A ma nièce adorable, ma belle rose DJEMMAL Eliane, qui vient de naître, moi Chahinez, je t'exprime à travers ce travail ma grande affection, mon grand amour. Je te souhaite une vie heureuse pleine de joie de bonheur et de succès.

A nos chers grands-parents tantes et oncles.

Résumé

La sclérodermie systémique est une connectivite caractérisée par une accumulation de tissu fibrotique au niveau de la peau et des organes internes, des phénomènes auto-immuns et vasculaires, impliquant des facteurs environnementaux et des gènes de susceptibilités. Nous avons réalisé une étude rétrospective de cas-témoins concernant 275 sujets de la population Algérienne (99 patients et 176 sujets sains). Nous avons pour objectif principal la recherche d'une association entre le polymorphisme 3835 G/T du gène *IRF-5* (rs2004640) et la susceptibilité au développement de la sclérodermie systémique. Le profil en auto-anticorps anti-nucléaires (AAN) a aussi été déterminé ; il fut concordé à l'expression du SNP et le développement de la forme diffuse et limitée de la SSc. La recherche des AAN a été réalisée par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI). Le polymorphisme du gène de l'*IRF5* a été déterminé par PCR en temps réel en utilisant la technologie TaqMan. Les résultats révèlent que les formes cutanées diffuses étaient plus fréquentes que les formes cutanées limitées, les AAN étaient présents chez tous les patients avec des aspects centromériques, nucléolaires homogène et nucléolaires respectivement décroissant d'IFI. Toutefois, aucune différence statistiquement significative entre les patients et sujets sains, concernant les fréquences alléliques et génotypiques polymorphisme 3835 G/T du gène *IRF-5* (rs2004640) n'a été retrouvée. L'association entre le SNP de l'*IRF5* et la survenue de la SSc n'a pas été mise en évidence. Il est probable que c'est la concurrence de nombreux gènes et de polymorphismes chez un même individu, qui marquerait cette susceptibilité.

Mots clés : Sclérodermie systémique, auto-anticorps, AAN, polymorphisme, *IRF5*.

Abstract :

Systemic sclerosis is a connective tissue disorder characterized by microvascular damages, autoimmune phenomena and excessive fibrosis in the skin and internal organs. Involving environmental factors and susceptibility genes. We carried out a retrospective case-control study concerning 275 subjects from the Algerian population (99 patients and 176 healthy subjects). Our main objective was to find an association between the 3835 G / T polymorphism of the IRF-5 gene (rs2004640) and the susceptibility to the development of systemic scleroderma. The anti-nuclear autoantibody (ANA) profile also determined; it was correlated with the expression of SNP and the development of the diffuse and limited form of SS. The search for ANA was carried out using the indirect immunofluorescence (IFI) technique. The polymorphism of the IRF5 gene was determined by real-time PCR using TaqMan technology. The results reveal that the diffuse cutaneous forms were more frequent than the limited forms, the ANA were present in all the patients with centromeric, homogeneous nucleolar and nucleolar aspects decreasing respectively of IFI. However, no statistically significant difference between patients and healthy subjects regarding the allelic and genotypic frequencies 3835 G / T polymorphism of the IRF-5 gene (rs2004640) was not found. The association between the IRF5 SNP and the onset of SSc has not been highlighted. It is likely that it is the competition of many genes and polymorphisms in the same individual, which would mark this susceptibility.

Key words: Systemic scleroderma, autoantibodies, ANA, polymorphism, IRF5.

ملخص

التصلب الجلدي النظمي هو اضطراب للنسيج الضام يتميز بإصابة الأوعية الدموية الدقيقة. ظواهر المناعة الذاتية و التليف المفرط في الجلد و الأعضاء الداخلية، تنطوي على عوامل بيئية و مورثات ذات قابلية. هي دراسة استعادة لمريض-شاهد، هدفها تحديد العالقة بين الأشكال المتعددة للتركيبات النووية المنفردة (SNP) 3835G / T للمورثة IRF5(rs2004640) وقابلية تطور تصلب الجلد النظم، تحديد الأجسام المضادة الذاتية و العالقة بين تعبير هذا ال SNP و تطوير الشكل المحدود و المنتشر من المرض ، فيما يتعلق ب275 شخص(99 مريض و 176 شاهد).

تم إجراء البحث عن الأجسام المضادة للنواة باستخدام تقنية التآلق المناعي غير المباشر (IFI) و عن مولدات الضد النووية بتقنية قياس التدفق المناعي، و تمت دراسة ال SNP للمورثة IRF5 بواسطة ال PCR في الوقت الحالي بتكنولوجيا TaqMan.

كنتيجة كانت الأشكال الجلدية المنتشرة أكثر توترا من الأشكال الجلدية المحدودة، و كانت الأجسام المضادة الذاتية موجودة عند جميع المرضى مع مظهر مركزي، نوات متجانس و نواتي على التوالي، اما مولد الضد الذاتي الأكثر تواجد كان الScI70، و لم يكن هنالك فرق ذو معنى في الإحصائيات بين المرضى و الشواهد في توزيع الآليات و الأنماط الجينية، و منه نستنتج انه لم يتم العثور على أي ارتباط بين ال SNP للمورثة IRF5 (rs2004640) و حدوث التصلب الجلدي النظمي. في الأخير والن ال IRF5 متعدد الجينات، فمن المحتمل أن وجود العديد من الأشكال المتعددة في نفس الفرد هو الذي يساهم في خطر المرض و بما انه أخذ في عزلة في هذه الدراسة فان تأثيره كان ضعيفا.

الكلمات الاساسية: التصلب الجلدية النظمي، الجسم المضاد الذاتية للنواة، تعدد الأشكال النووية، المورثة IRF5.

Liste des abréviations

AAN	: Anticorps anti-nucléaires	IFN	: Interféron
Ac	: Anticorps	ISG	: IFN Stimulated Gene
ACA	: Ac anti-Centromère	ISRE	: IFN Stimulated Response Elements
ADN	: Acide Désoxyribo-Nucléique	LB	: Lymphocyte B
AFA	: Ac anti-Fibrillarine	LT	: Lymphocyte T
ARN	: Acide Ribo-Nucléique	MAI	: Maladie Auto-Immune
ARNm	: ARN messenger	MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein-1
ATA	: Ac anti-Topo-Isomérase I	MEC	: Matrice Extra-Cellulaire
BAFF	: B cell Activating Factor	MyD88	: Myeloid Differentiation 88
BCR	: B Cell Receptor	PBS	: Phosphate Buffer Salin
CD4	: Cluster of differentiation 4	PCR	: Polymerase Chain Reaction
CE	: Cellule Endothéliale	PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
DC	: Dendritic Cell	PID	: Pneumopathie Interstitielle Diffuse
EDTA	: Éthylène Diamine Tétra-Acétique	PNN	: Polynucléaires Neutrophiles
EPC	: Endothelial Progenitor Cells	PR	: Polyarthrite Rhumatoïde
ET-1	: Endothéline-1	RGO	: Reflux Gastro-Oesophagien
FAK	: Focal Adhesion Kinase	RNP	: Ribo-Nucléo-Protéine
Fli-1	: Friend leukemia integration-1	ROS	: Reactive Oxygen Species
GWAS	: Genome Wide Association Study	RT-PCR	: Real Time PCR
HSV-1	: Herpes Simplex Virus-1	SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
HTAP	: Hypertension Artérielle Pulmonaire	TLR	: Toll Like Receptor
IFI	: Immunofluorescence Indirecte		

Liste des figures

Figure 1	Caractéristiques cliniques de la SSc.....	3
Figure 2	Différentes formes de la Sclérodémie Systémique (SSc).....	5
Figure 3	Activation des fibroblastes, majeure clé de la pathogenèse de la SSc.....	8
Figure 4	Rôle de l'IRF5 dans les voies de signalisation des TLRs.....	12
Figure 5	Rôle des interférons de type I dans l'étiopathogénie de la Sclérodémie Systémique	14
Figure 6	Rôle de la méthylation de l'ADN et MeCP2 dans la Sclérodémie Systémique.....	16
Figure 7	Principe de l'IFI sur cellules HEp2000.....	20
Figure 8	Détection des anticorps en immunofluorimétrie en flux.....	21
Figure 9	Principe de l'immunofluorimétrie en flux.....	22
Figure 10	Différentes étapes du génotypage par la technique TaqMAN.....	24
Figure 11	Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.....	26
Figure 12	Distribution des formes de SSc dans la population malade.....	28
Figure 13	Principales manifestations cliniques observées chez les patients SSc.....	29
Figure 14	Aspects les plus fréquents des AAN obtenus en IFI sur cellules HEp2000.....	29
Figure 15	Cibles antigéniques des AAN identifiées par IFF (Technologie Multiplex).....	30

Liste des tableaux

Tableau I	Mélange réactionnel pour la PCR.....	25
Tableau II	Programme de la RT-PCR.....	25
Tableau III	Caractéristiques de la population étudiée.....	27
Tableau IV	Principales manifestations cliniques observées chez les patients SSc étudiés....	28
Tableau V	Cibles antigéniques des AAN identifiées par IFF (Technologie Multiplex).....	30
Tableau VI	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc vs. Population contrôle.....	31
Tableau VII	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des ATA vs. Sujets sains.....	32
Tableau VIII	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des ACA vs. Sujets sains.....	33
Tableau IX	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des anti-nucléoles vs. Sujets sains.....	33
Tableau X	Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la forme clinique.....	34
Tableau XI	Différentes études portant sur le SNP IRF5 (-3835 G/T) rs2004640 dans la Sclérodémie Systémique.....	38

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

I Synthèse bibliographique

I-1. Sclérodémie systémique	2
I. 1-1. Généralités et épidémiologie.....	2
I. 1-2. Manifestations cliniques et classification de la Sclérodémie Systémique.....	3
I. 1. 2-1. Manifestations cutanées de la SSc.....	3
I. 1. 2-2. Manifestations extra-cutanées de la SSc.....	4
I-2. Physiopathologie de la sclérodémie systémique.....	5
I. 2-1. Dysfonctionnement vasculaire.....	5
I. 2-2. Dysfonctionnement fibroblastique.....	6
I. 2-3. Dysfonctionnement du Système Immunitaire.....	8
I-3. Facteurs étiopathologique de la sclérodémie systémique.....	9
I. 3-1. Facteurs environnementaux.....	9
I. 3-2. Facteurs génétiques.....	10
I. 3. 2-1. Facteur régulateur des interférons « IRF5 ».....	11
I. 3. 2-2. Voie de signalisation des TLRs.....	11
I. 3. 2-3. Implications de l'IRF5 en pathologie humaine.....	12
I. 3-3. Épigenétique.....	15
I-4. Traitement de la sclérodémie systémique.....	17
I. 4-1. Traitement palliatif et symptomatiques.....	17
I. 4-2. Traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs.....	17
I. 4. 2-1. Corticothérapie générale.....	17
I. 4. 2-2. D-Pénicillamine.....	17
I. 4. 2-3. Nintédanib.....	17
I. 4-3. Autogreffe de moelle osseuse.....	17

II Matériel et Méthodes

II-1. Matériel.....	19
II. 1-1. Matériel biologique.....	19

II. 1-2. Matériel non biologique.....	19
II-2. Méthodes.....	19
II. 2-1. Étude sérologique.....	19
II. 2. 1-1. Recherche des anticorps anti-nucléaires (AAN).....	19
II. 2-2. Étude génétique.....	22
II. 2. 2-1. Extraction de l'ADN génomique.....	22
II. 2. 2-2. Étude du SNP <i>IRF5</i> rs2004640 par la technologie TaqMAN.....	23
II-3. Analyse statistique.....	26

III Résultats

III-1. Caractéristiques de la population étudiée.....	27
III. 1-1. Principales manifestations cliniques.....	27
III. 1-2. Profil en anticorps anti-nucléaires de la population malade.....	29
III-2. Recherche d'une association entre le SNP <i>IRF5</i> (-3835 G/T) rs2004640 et la susceptibilité à développer la SSc dans la population étudiée.....	31
III. 2-1. Comparaison entre les patients SSc et sujets sains.....	31
III-3. Recherche d'une association entre le SNP <i>IRF5</i> (-3835 G/T) rs2004640 et la production des auto-anticorps spécifiques de la SSc.....	31
III. 3-1. Production des anticorps anti-Topo-Isomérase I.....	31
III. 3-2. Production des anticorps anti-Centromère.....	32
III. 3-3. Production des anticorps anti-Nucléoles.....	33
III-4. Recherche d'une association entre le SNP <i>IRF5</i> (-3835 G/T) rs2004640 et l'apparition des formes clinique de la SSc.....	34
IV. Discussion.....	35
Conclusion	39
Références Bibliographiques	40

Annexes

Introduction

Introduction

La Sclérodémie Systémique est un trouble hétérogène complexe caractérisée par le durcissement cutané, manifestation clinique majeure et une atteinte fonctionnelle des organes vitaux (Camille et *al.*, 2002 ; Carwile LeRoy, 1997). Le terme de sclérodémie apparaît pour la première fois, dans la littérature médicale, au 19^{ème} siècle, même si elle était connue depuis longtemps (Marie et Cabane, 2002).

Cette affection est caractérisée par des anomalies de la matrice extracellulaire conduisant à une production excessive de collagène, à des altérations micro-vasculaires et à une activation anormale du système immunitaire. Cette pathologie est aussi marquée par la production d'auto-anticorps anti-nucléaires et nucléolaires, la plaçant comme une maladie auto-immune (Katarzyna et *al.*, 2019 ; Jingxiao et *al.*, 2014). L'étiologie de la sclérodémie est multifactorielle et des mécanismes complexes interviennent dans sa genèse. Des facteurs environnementaux tels que la silice et d'autres génétiques impliquant, de nombreux gènes, confèrent une susceptibilité de l'individu porteur de polymorphisme à la Sclérodémie Systémique. Citons l'exemple des polymorphismes du gène codant le facteur régulateur des interférons l'IRF5 souvent associés à cette pathologie (IRF5) (Mayes et *al.*, 2003).

Les thérapeutiques conventionnelles reposent sur l'emploi de molécules immuno-modulatrices et sur une prise en charge symptomatique des manifestations de la maladie, mais se révèlent souvent insuffisantes, notamment, pour des patients souffrant de forme sévères et rapidement évolutifs.

Dans ce contexte, nous avons mené une étude rétrospective de cas-témoins concernant la Sclérodémie Systémique. Dans laquelle nous avons recherché l'existence d'une association entre le SNP IRF5 rs2004640 et :

1. La susceptibilité à développer la SSc ;
2. La production des auto-anticorps spécifiques de la SSc : anti-nucléoles, anti-Topo-Isomérase I (ATA) et anti-Centromère (ACA) ;
3. La forme de SSc : limitée (l-SSc) et diffuse (d-SSc).

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I-1. Sclérodermie systémique

I. 1-1. Généralités et épidémiologie

La Sclérodermie Systémique (Systemic Sclerosis, SSc) ou sclérose systémique, du grec skleros (dur) et derma (derme), est une connectivite rare et multifactorielle, caractérisée par une fibrose de la peau et de différents organes internes, une vasculopathie systémique et des stigmates d'auto-immunité. Le patient présente un dysfonctionnement endothélial, fibroblastique et lymphocytaire. Cette pathologie implique des facteurs environnementaux et génétiques (Didier et *al.*, 2019 ; Allanore, 2016 ; Saigusa et *al.*, 2015).

Le taux de survie à 10 ans des patients atteints de SSc est estimé à 66%. Ce taux diminue à 38% pour ceux ayant une atteinte des organes internes (viscères). Les atteintes pulmonaires représentent la cause principale de décès (environ 15% des patients). L'atteinte cardiaque est retrouvée chez 15% à 35% des patients responsable, ainsi, d'un mauvais pronostic justifié par un taux de mortalité de près de 70% à 5 ans (Korman et Criswell, 2015).

C'est une maladie qui touche 50 à 300 cas par million d'habitants dans le monde, dans les populations américaines et caucasiennes seulement 2,6% des parents des patients sclérodermiques développent la sclérodermie (Korman et Criswell, 2015).

I. 1-2. Manifestations cliniques et classification de la Sclérodermie Systémique

Les symptômes majeurs de la SSc sont le phénomène de Raynaud, l'épaississement de la peau des doigts (sclérodactylie), la production d'auto-anticorps sériques et une atteinte viscérale (pulmonaire, rénale ou cardiaque) évocatrice (Korman et Criswell, 2015 ; Sibia, 2004) (**Figure 1**).

Le syndrome de Raynaud est un trouble de la circulation sanguine qui se manifeste par un spasme artériolaire conduisant à des phases successives blanches, violacées puis rouges avec engourdissement ou des douleurs, affectant les extrémités comme les doigts, les orteils, le nez, ou les oreilles (Allanore, 2016). Ce phénomène est un signe précoce de la SSc et est observé chez plus de 95% des patients atteints de cette maladie (Rotimi et *al.*, 2020).

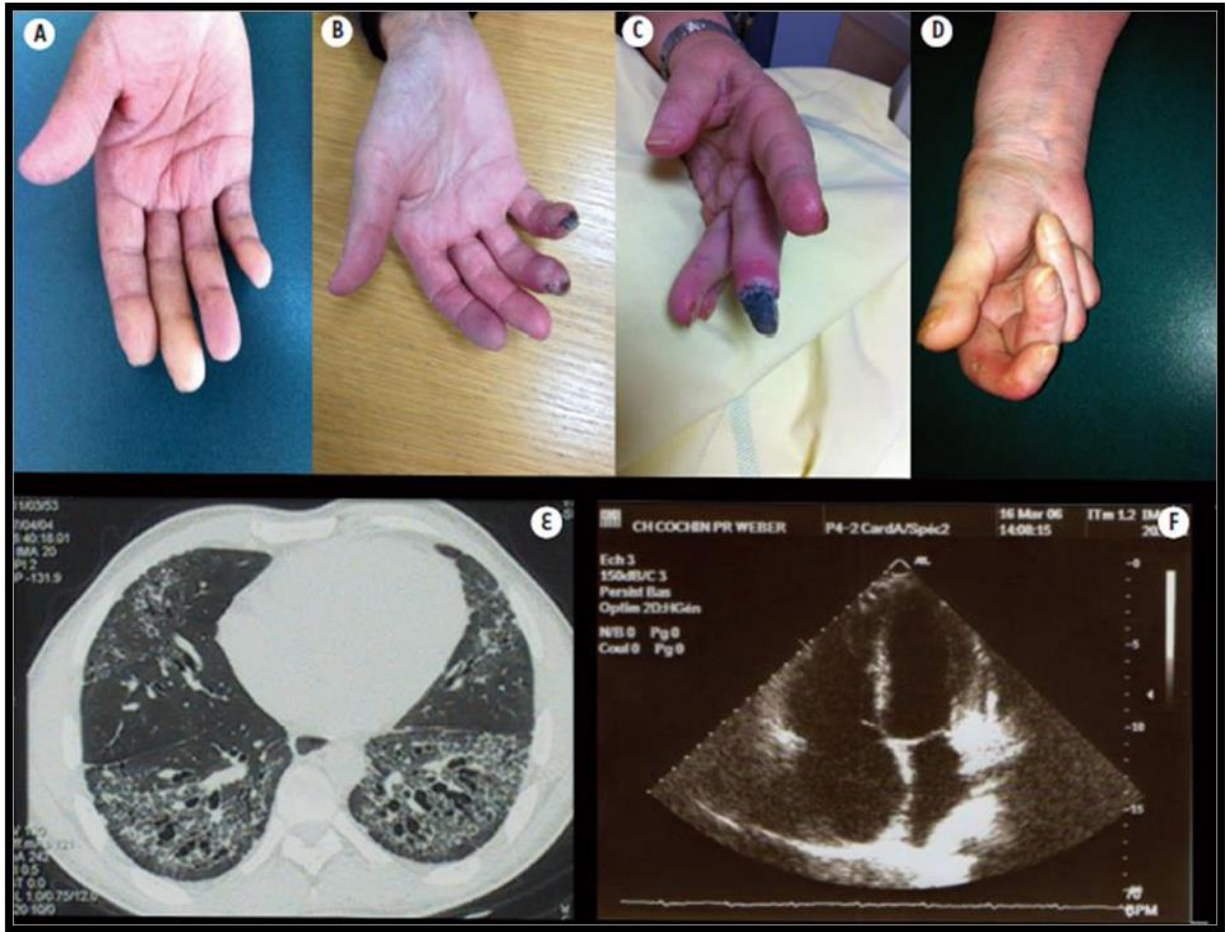


Figure 1. Caractéristiques cliniques de la SSc (Allanore, 2016).

Syndrome de Raynaud avec spasme des doigts et phase ischémique notamment du majeur (A), puis aggravation des troubles vasculaires avec nécrose digitale (B) et gangrène (C). Lésions déformantes sévères intégrant une sclérose cutanée majeure et des déformations articulaires (D) avec aspect évocateur de rétraction digitale. Lésions d'organes internes avec fibrose pulmonaire (E) et dilatation de la cavité cardiaque droite dans le cadre d'une hypertension artérielle pulmonaire (F).

I. 1. 2-1. Manifestations cutanées de la SSc

Ce type de manifestations représente la forme cutanée limitée de la SSc qui représente environ 60% des patients (Comacle et *al.*, 2011) appelé, autrefois, syndrome de CREST (Calcinose, phénomène de Raynaud, dysmotilité Œsophagienne, Sclérodactylie et Téliangiectasie). Les patients qui ont ce type de manifestations présentent (Arletta et *al.*, 2014 ; Sibilia, 2004) : (**Figure 2**)

- Un syndrome de Raynaud, depuis plus de 10 ans ;
- Une atteinte cutanée limitée aux extrémités (mains, pieds, avant-bras) ainsi que la face et le cou ;

- Une atteinte tardive de la vascularisation pulmonaire : Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) avec ou sans pneumopathie interstitielle (PID) ;
- Une calcinose cutanée ;
- Des télangiectasies ;
- Une incidence élevée d'anticorps anti-centromères (ACA).

La SSc peut être diagnostiquée sans aucune atteinte cutanée mais un phénomène de Raynaud, des anomalies à la capillaroscopie péri-unguéale (dilatation capillaires et/ou zones avasculaires) et/ou des auto-Ac sont spécifiques de la SSc.

Ces SSc dites limitées, pourraient constituer des formes très précoces de la maladie. Cependant, certains patients ne développent, jamais, de lésions de sclérose cutanée même après plusieurs années d'évolution, répondant alors aux critères de SSc « Sine Scleroderma ». Ces patients ne sont, cependant, pas indemnes de risque d'ulcération digitale ou de complications cardio-pulmonaires (LeRoy et Medsger, 2001).

I. 1. 2-2. Manifestations extra-cutanées de la SSc

Ces manifestations représentent la forme cutanée diffuse qui touche environ 40% des patients qui présentent (**Figure 2**) :

- Un syndrome de Raynaud ayant débuté moins d'un an avant le début des signes cutanés (sclérose ou œdème) ;
- Une atteinte sclérodermique axiale et proximale ;
- Un crissement tendineux ;
- Une atteinte précoce et significative des viscères : Pneumopathie Interstitielle Diffuse (PID), insuffisance rénale, atteinte gastro-intestinale diffuse, atteinte myocardique ;
- Une absence d'anticorps anti-centromères (ACA) ;
- À la capillaroscopie : dilatation et destruction des anses capillaires ;
- Des anticorps anti-topo-isomérase I (Scl70) (Arlettaz et *al.*, 2014 ; Bussone et *al.*, 2012 ; Sabilia, 2004).

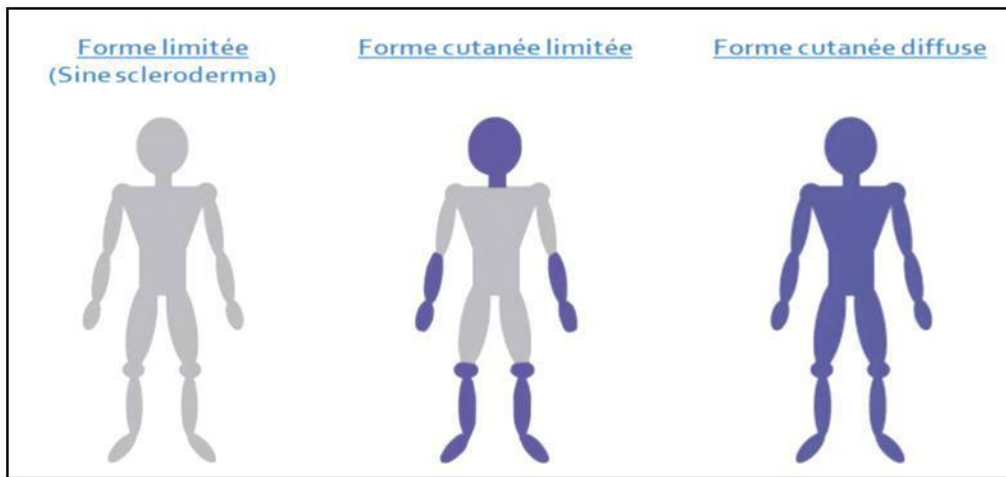


Figure 2. Différentes formes de la Sclérodémie Systémique (Arlettaz et *al.*, 2014).

I-2. Physiopathologie de la sclérodémie systémique

La pathogenèse de la SSc associe des désordres vasculaires (microangiopathie), inflammatoires et immunologiques (auto-immunité). De nombreux médiateurs à action paracrine ou autocrine interviennent dans cette pathologie. Les interactions entre les différents acteurs cellulaires et moléculaires sont, toutefois, mal élucidées mais elles pourraient expliquer l'extrême hétérogénéité qui caractérise cette maladie (Allanore, 2016).

I. 2-1. Dysfonctionnement vasculaire

L'atteinte vasculaire semble être parmi les événements les plus précoces de la maladie. Un syndrome de Raynaud et une microangiopathie sont présents dans plus de 90% des cas de SSc (Allanore et *al.*, 2016). Un dysfonctionnement et des anomalies de l'homéostasie des cellules endothéliales (CE) entraînent une altération de la barrière physiologique endothéliale et des anomalies de régulation du tonus vasculaire. L'atteinte de l'endothélium est, probablement, très précoce et constitue un facteur majeur, dans le développement de la SSc (Chora et *al.*, 2017)

Les lésions vasculaires endothéliales dans la SSc et les changements pathologiques dans les vaisseaux sanguins dont l'hyperplasie de l'intima et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses, conduisent à la perte progressive de l'élasticité des capillaires et le remodelage vasculaire des vaisseaux artériolaires. Ceci entraîne un ralentissement dans la circulation sanguine provoquant, ainsi, une hypoxie chronique sévère (Didier et *al.*, 2019).

En réponse à l'hypoxie, des mécanismes cellulaires et moléculaires complexes, tels que l'angiogenèse, par l'expression du VEGF, principalement, sont induits, dans le but de récupérer la

fonction des CE et la perfusion tissulaire. Cependant, chez les patients SSc, des altérations de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques, des cellules impliquées dans l'angiogenèse et la vasculogenèse et un épuisement progressif des cellules progénitrices endothéliales (EPC) du à un dysfonctionnement et une apoptose précoce, sont observés. D'autres facteurs ayant une action anti-angiogénique comme l'endostatine, la thrombospondine 1 et le CXCL-4 pourraient également intervenir dans le dysfonctionnement angiogénique (Van Bon *et al.*, 2014 ; Hebbar *et al.*, 2000).

Au début de la maladie, les CE libèrent d'importantes quantités de chimiokines (MCP-1) et expriment des molécules d'adhésion (E-Selectine, ICAM-1 et VCAM-1), actions souvent corrélées avec la sévérité de la microangiopathie (Distler *et al.* 2005 ; Valim *et al.*, 2004). Les concentrations sériques des fragments cellulaires issus des CE appelés microparticules endothéliales pourraient être impliquées dans la régulation de l'inflammation, la coagulation, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Maugeri *et al.*, 2018).

Au cours de la SSc, des concentrations plasmatiques élevées d'endothéline-1 (ET1) sont observées. Ce peptide aux propriétés vasoconstrictrices, pourrait participer au développement des phénomènes ischémiques distaux et à l'apparition d'une Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) (Didier *et al.*, 2019).

Par ailleurs, la cascade rénine-angiotensine est perturbée par un déséquilibre qui est en faveur de la vasoconstriction (l'angiotensine II) et contre la vasodilatation, aboutissant à une vasoconstriction impliquée dans la crise rénale de la SSc (Didier *et al.*, 2019 ; Guillevin, 2015).

Des anticorps anti-CE ont été mis en évidence, dans la SSc, montrant, ainsi, l'implication du système immunitaire. Carvalho *et al.*, suggèrent qu'ils induiraient une surexpression des molécules d'adhésion telles l'ICAM-1 et favoriseraient l'adhésion des leucocytes aux CE (Carvalho *et al.*, 1996), alors que Cipriani *et al.*, laissent penser qu'ils induiraient l'apoptose des CE via le système « Fas/Fas-Ligand » (Cipriani *et al.*, 2011).

I. 2-2. Dysfonctionnement fibroblastique

La SSc est caractérisée par une synthèse accrue de collagène par les fibroblastes, principalement, au niveau du derme. Une synthèse exagérée des composants de la matrice extra cellulaire (MEC) est observée avec des défauts de résorption et des modifications de sa composition et de son organisation, ce qui contribue à la progression de la maladie (Didier *et al.*, 2019 ; Allanore, 2016).

L'extension de l'atteinte cutanée est proportionnelle à la synthèse de collagène et le dysfonctionnement des fibroblastes semble global et non limité aux seules zones fibrosées. Des myofibroblastes issus de la transformation des fibroblastes et d'autres cellules, expriment l'alpha-Smooth Muscle Actine (α -SMA) et produisent un taux élevé de collagène. Cette transformation pourrait être favorisée par un défaut d'expression du facteur de transcription Fli-1 et par certains auto-anticorps anti-fibroblastes dirigés contre le récepteur du facteur de croissance plaquettes-dérivé (PDGF). Ce dysfonctionnement est lié à des anomalies dans certains facteurs de croissances tels que le TGF β (Transforming Growth Factor- β) et le CTGF (connective tissue growth factor ou CCN2) et PDGF (Didier et *al.*, 2019 ; Allanore, 2016).

Le TGF β produit par les fibroblastes est un facteur central de la fibrose. Dans des cas physiologiques comme la cicatrisation, l'action du TGF β est arrêtée par un rétrocontrôle négatif exercé par le facteur nucléaire NLR4A1. La fibrose est due à la persistance du TGF β par l'inhibition du rétrocontrôle négatif et un défaut d'expression du NLR4A1 mais aussi à un défaut du système « Fas/Fas-Ligand » de la voie apoptotique qui maintient la fibrose. Certains transducteurs du signal fibroblastique du TGF β comme la FAK (Focal Adhesion Kinase) peuvent influencer la transformation des fibroblastes en myofibroblastes mais aussi la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Didier et *al.*, 2019 ; Allanore, 2016).

Dans la Pneumopathie Interstitielle Diffuse (PID), l'alvéolite lymphocytaire est représentée par les LT CD4⁺ sécrétant principalement de l'IL-4 qui stimulent la croissance des fibroblastes et donc l'augmentation de la quantité du collagène au niveau de la MEC (Didier et *al.*, 2019).

La libération du facteur de croissance TGF β et d'autres cytokines induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. La dysrégulation des voies épigénétiques, dans la SSc, entraîne la présence persistante de fibroblastes actifs et myofibroblastes ce qui entraîne une sécrétion chronique de la matrice extracellulaire (MEC) et, par la suite, l'apparition de la fibrose (**Figure 3**) (Henderson, 2019).

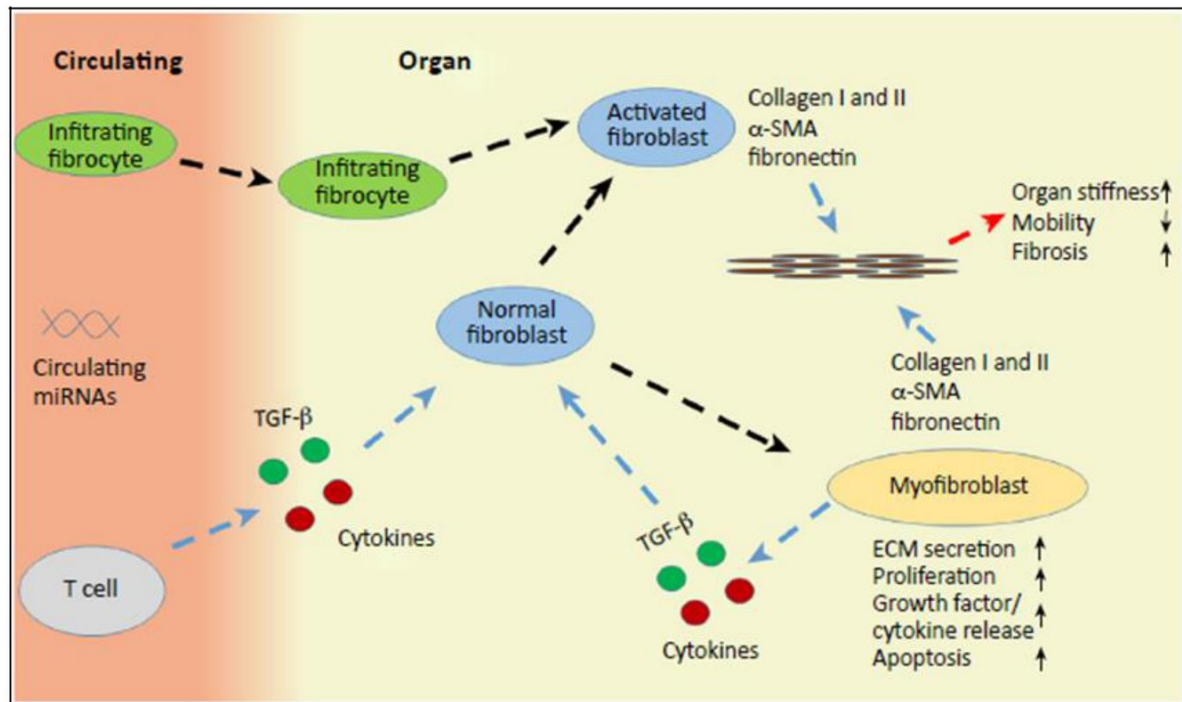


Figure 3. Activation des fibroblastes, majeure clé de la pathogenèse de la SSc (Henderson, 2019)

Les flèches bleues indiquent une sécrétion, les flèches noires indiquent une différenciation et la flèche rouge signifie un changement physiologique.

I. 2-3. Dysfonctionnement du Système Immunitaire

Dans la SSc, il y a activation des cellules immunitaires telles que les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes afin d'activer les fibroblastes mais aussi les cellules endothéliales (CE) (Korman et Criswell, 2015). Les réponses immunitaires innée et adaptative sont perturbées et un déséquilibre, notamment, dans la production et la fonction des anticorps est observée (Allanore, 2016).

Un défaut d'homéostasie des LB a été mis en évidence dans la SSc. Ceci s'explique par la production, en excès des facteurs BAFF et APRIL. La production de ces facteurs de croissance est corrélée à la concentration d'immunoglobulines sériques, à la sévérité de l'atteinte cutanée (pour BAFF) et à la survenue d'une atteinte pulmonaire (pour APRIL) (Didier et *al.*, 2019).

La majorité des patients produisent, précocement, des auto-anticorps. Certains ne semblent pas avoir de rôle pathogène direct comme les anticorps anti-centromères (ACA), anti-Topo-Isomérase I (ATA, également appelés anti-Sc170), anti-ARN polymérase III, anti-Pm/Scl, anti-U1RNP, anti-U3RNP (également appelés anti-fibrillarine), anti-Ku et anti-Th/To. D'autres anticorps pourraient avoir un rôle pathogène comme les anticorps anti-récepteur de l'angiotensine II de type 1, anti-

récepteur de l'endothéline de type A, anti-récepteur du PDGF, anti-fibroblastes et anti-CE (Didier et *al.*, 2019).

Les LT semblent impliqués dès la phase précoce de la maladie. En effet, une infiltration précoce des LT a été mise en évidence, principalement de type TCD4+ dans le derme des patients, dont l'importance semble corrélée à la durée d'évolution de la maladie et au score de la fibrose (Rodnan). Certaines sous-populations dermiques de LT participent à l'excès de production d'IL-4 et d'IL-13 (Didier et *al.*, 2019).

Ainsi, les concentrations d'IL-17 sont significativement plus élevées, au niveau du sang périphérique, des lésions cutanées de fibrose et des lésions pulmonaires de patients sclérodermiques par rapport aux sujets sains. Cette cytokine favorise la synthèse excessive de collagène par les fibroblastes et participe au dysfonctionnement de l'endothélium (Didier et *al.*, 2019).

L'immunité innée semble, également, jouer un rôle dans la physiopathologie de la SSc par infiltration précoce de macrophages et de polynucléaires neutrophiles (PNN), au niveau du derme des patients, principalement, dans les formes diffuses et au niveau des poumons lors d'une Pneumopathie Interstitielle Diffuse (PID). Les macrophages activés secrètent des formes réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que différentes cytokines et expriment des marqueurs particuliers, à la fois de type M1 et M2, leur conférant un phénotype particulier qui semble assez spécifique à la maladie. Des modifications qualitatives et fonctionnelles des mastocytes au niveau des lésions fibrosantes ont également été mises en évidence. Ces cellules pourraient jouer un rôle dans la pérennité du processus de fibrose (Didier et *al.*, 2019 ; Henderson , 2019) (**Figure 3**).

I-3. Facteurs etiopathogeniques de la sclerodermie systemique

Il est admis que c'est l'interaction d'événements environnementaux avec un terrain génétique de susceptibilité qui contribuent au développement de la SSc.

I. 3-1. Facteurs environnementaux

Plusieurs déclencheurs environnementaux ont été associés au développement ultérieur de SSc. Il s'agit, notamment, d'agents infectieux tels que le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le parvovirus B19. L'exposition aux poussières de silice a été associée à la SSc et l'exposition à certains autres agents tels que les solvants organiques, le toluène, le xylène, le trichloréthylène, le polychlorure de vinyle a parfois été liée à l'apparition de la maladie. Le

tabagisme ne semble par être un facteur de risque. Plusieurs troubles de type sclérodermique (qui peuvent être différenciés de la SSc par des caractéristiques cliniques, histopathologiques et de laboratoire) ont été associés à des expositions environnementales (huile de cuisson de colza contaminée avec syndrome de l'huile toxique et L-tryptophane avec syndrome d'éosinophilie-myalgie). Certaines substances telles que la Bléomycine et la Cocaïne ont été associées au développement de maladies de type SSc (Rotimi et *al.*, 2020).

I. 3-2. Facteurs génétiques

La composante génétique est polygénique. Plusieurs études ont identifiés un certain nombre de facteurs ou gènes de susceptibilité (Assassi et *al.*, 2013). Des études d'association « gène-candidat », de génome entier (Genome Wide Association Study, GWAS) et immuno-chip (puces à ADN) ont mis en évidence un certain nombre de gènes de susceptibilité associés à la maladie. Différents polymorphismes nucléotidiques simples (SNP, single nucleotide polymorphisms) ont été identifiés avec des associations surtout liées aux différents auto-anticorps produits (Assassi et *al.*, 2013; Agrawal, 2010 ; Allanore et *al.*, 2010).

La SSc est une affection dont l'étiologie semble être multifactorielle. Le facteur génétique a été suspecté, comme étiologie probable. La pathologie est significativement plus fréquente dans les familles atteintes de sclérodermie (1,6%) que dans la population générale (0,026%). Cependant, le risque absolu pour chaque membre de la famille reste assez faible (<1%). Toutefois, les études portant sur les jumeaux monozygotes n'ont montré qu'un taux de concordance de 5% indiquant que les facteurs génétiques sont, finalement, peu importants dans la maladie (Murdaca, 2016 ; Allanore et *al.*, 2010).

La susceptibilité génétique, dans cette maladie, semble reposer sur une combinaison de polymorphismes de nombreux gènes. Ces polymorphismes sont des variants de la séquence codante ou non codante d'ADN plus ou moins fréquents dans la population générale. Les types de polymorphismes varient par leur structure et leur répartition sur le génome : les microsatellites (courtes séquences de nucléotides répétées localisées dans des régions non codantes géniques ou intergéniques), les RFLP (restriction fragment length polymorphisms) et les SNPs (single nucleotide polymorphisms) présents dans l'ensemble du génome et détectés par digestion enzymatique ou amplification (Arnett et *al.*, 2001).

Plusieurs études ont rapporté l'association de différents SNPs à la survenue de la SSc, à des phénotypes cliniques particuliers ou à la production de certains auto-anticorps. Ces gènes codent

pour des protéines intervenant dans le processus de fibrose et dans les réponses immunitaires. Parmi ces gènes on peut citer : *CTGF*, *STAT4*, *IRF5*, *BLK*, , *BANK1*, *T-bet*, *TNF α* et *TNF β* .

I. 3. 2-1. Facteur régulateur des interférons « IRF5 »

L'IRF5 est un facteur de transcription permettant la transcription des gènes codant pour les IFN de type I (IFN- α et IFN- β). La famille des IRFs comprend neuf membre : IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 et IRF9 (Lohoff et Mak, 2005). Chaque IRF contient un domaine de liaison à l'ADN de 120 résidus acides aminés formant un motif « helix-turn-helix ». Cette région reconnaît une séquence ADN : IFN-Stimulated Response Element (ISRE) identifiée, initialement, dans le promoteur des gènes qui sont régulés par les IFNs de type I. ISRE est aussi retrouvé dans le promoteur de nombreux gènes impliqués dans l'immunité et l'oncogenèse. Les IRFs exercent, donc, de multiples rôles (Tamura et *al.*, 2008).

L'IRF5 possède plusieurs rôles, notamment, dans la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la modulation de l'activité du système immunitaire. L'IRF5 est un commutateur principal car il contrôle l'équilibre entre la réponse immunitaire de type 1 (favorise l'inflammation et la distinction des agents pathogènes) et de type 2 (réparation et la croissance de tissus) (Weihrauch, 2016).

I. 3. 2-2. Voie de signalisation des TLRs

L'IRF5 est constitutivement exprimé par les LB, les DC et les macrophages. Son expression est, également, induite par les IFNs de type I et les TLRs. Il interagit avec les différents adaptateurs, notamment MyD88 et TRIF (Schoenemeyer et *al.*, 2005 ; Takaoka et *al.*, 2005). Ces données ont été obtenues, en utilisant, des lignées cellulaires humaines. D'après leurs résultats, certains virus, comme le HSV-1, activent IRF5 par phosphorylation permettant sa translocation nucléaire et la production d'IFN-I (principalement d'IFN- α). La stimulation des TLR7 et TLR8, par le composé synthétique R848, provoque aussi une production d'IFN-I dépendante de l'IRF5 (Schoenemeyer et *al.*, 2005 ; Barnes et *al.*, 2001). De plus, l'IRF5 semble être capable d'agir comme un stimulateur de la transcription des gènes codant pour les IFN-I, lorsqu'il forme un homodimère ou un hétérodimère avec l'IRF3 ou comme un inhibiteur lorsqu'il interagit avec l'IRF7 (Barnes et *al.*, 2003). Ces résultats ont suggéré un modèle dans lequel le facteur IRF7 serait responsable de la production d'IFN de type I et IRF5 de la production de plusieurs cytokines inflammatoires (Honda et *al.*, 2005) (**Figure 4**).

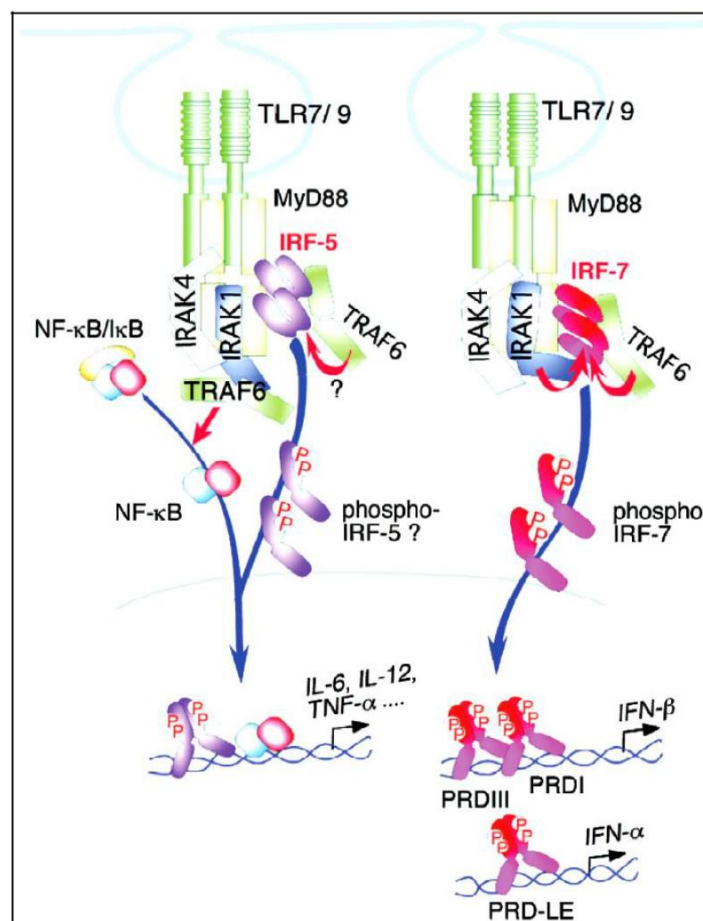


Figure 4. Rôle de l'IRF5 dans les voies de signalisation des TLRs (Honda et *al.*, 2005).

I. 3. 2-3. Implications de l'IRF5 en pathologie humaine

L'IRF5 est essentiel pour la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires en aval des TLRs. Les TLRs, les IFN de type I et les cytokines inflammatoires jouent un rôle primordial dans les maladies auto-immunes dont la SSc. Il était donc logique de s'intéresser au rôle de ce facteur de transcription dans la SSc.

Des études ont montré le rôle des IFN type I (IFN- α et IFN- β) et type II (IFN- γ) comme immuno-modulateurs et inhibiteurs de la production de collagène par les fibroblastes *in vitro* et *in vivo* chez des sujets sains et chez les patients sclérodermiques (Granstein et *al.*, 1990 ; Duncan et *al.*, 1987).

En se basant sur cette propriété, plusieurs essais thérapeutiques ont été faits chez des patients atteints de SSc (Black et *al.*, 1999 ; Vancheeswarn et Black, 1992). Contrairement à d'autres études qui ont montré le développement de SSc chez des patients soumis à des thérapies intensives d'IFN pour le traitement de l'hépatite C, la sclérose en plaque (SEP), ils ont remarqué que ces patients

développaient rapidement des symptômes de SSc, caractérisés par une fibrose cutanée progressive, crise rénale, phénomène de Raynaud et dysphagie après administration d'IFN (Hugle et *al.*, 2008 ; Sdans et *al.*, 2004).

La production d'IFN par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ou myéloïdes (mDC) après activation des TLRs, est le signal déclencheur des MAI. Cette activation induit la production d'IFN qui va promouvoir la différenciation des DC immatures en DC matures puis l'activation des LT auto-réactifs et production d'auto-anticorps (**Figure 5**).

Les auto-anticorps vont former des complexes immuns avec l'ADN, l'ARN et des protéines post apoptotiques et vont se fixer sur le récepteur FcR sur les pDC. Ce complexe immun, une fois internalisé dans l'endosome, agit comme un inducteur endogène pour la production d'IFN alpha et va prolonger la production d'IFN responsable d'une réponse immunitaire excessive avec production accrue d'auto-anticorps soutenant un processus auto-immun (Coelho et *al.*, 2008).

Au final, la production d'IFN par des cellules activées dans des sites inflammatoires induit une inflammation des cellules endothéliales contribuant aux dommages vasculaires précoces au cours de la SSc (Coelho et *al.*, 2008) (**Figure 5**).

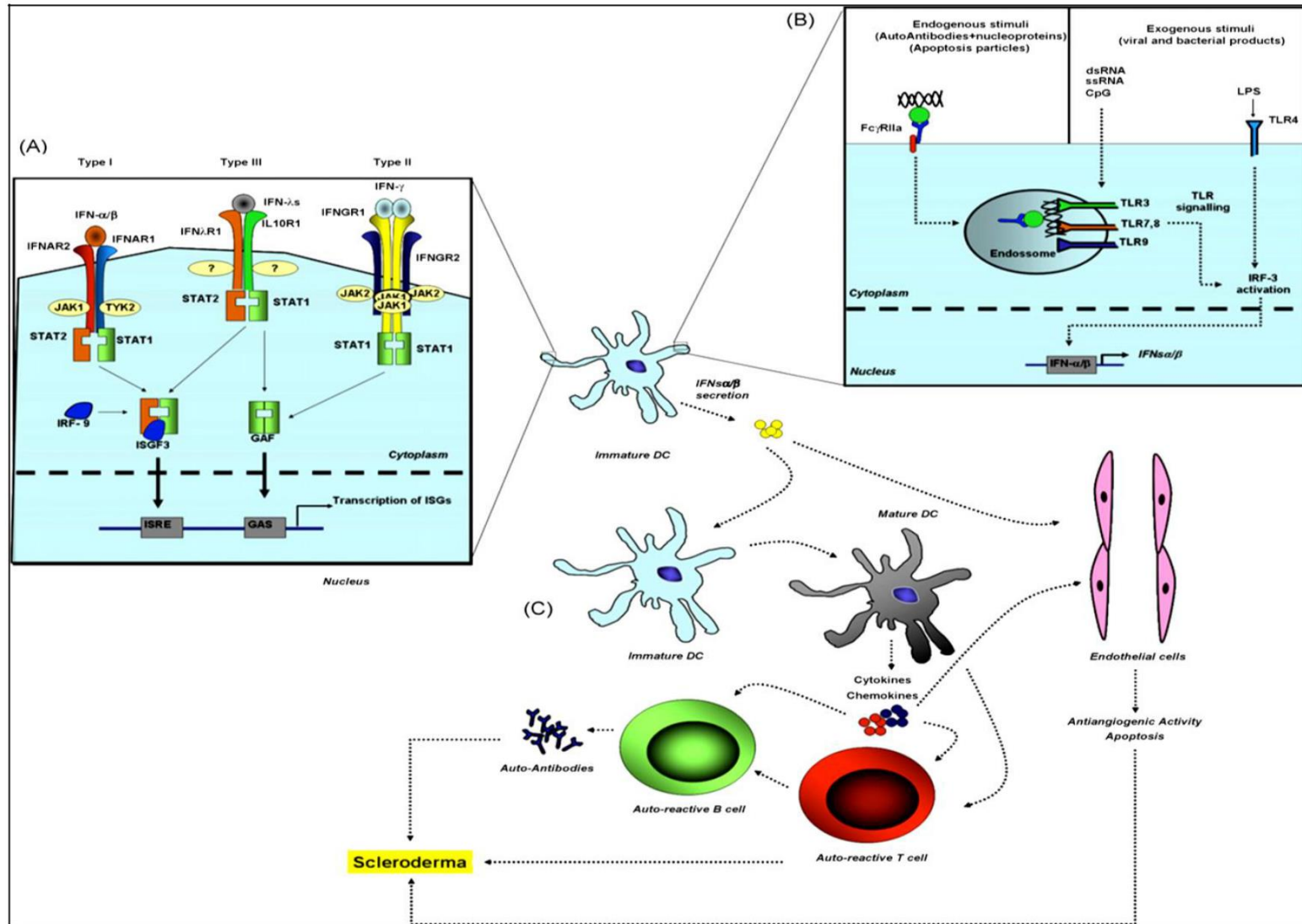


Figure 5. Rôle des interférons de type I dans l'étiopathogénie de la Sclérodémie Systémique (Coelho et al., 2008).

I. 3-3. Épigenétique

Les modifications chimiques de l'ADN ont été reconnues comme des mécanismes épigénétiques clés pour le maintien de l'état spécialisé des cellules et de leur mémoire. L'hypométhylation de l'ADN provoque la surexpression de gènes liés à l'auto-immunité (Murdaca et *al.*, 2019). L'hypométhylation de l'ADN dans les LT CD4⁺ de patients atteints de SSc induit la diminution de l'expression des gènes régulateurs de la méthylation tels que les ADN méthyltransférases (DNMT-1), les méthyl-Protéines du domaine de liaison à la CpG *MBD3* et *MBD4*. Ces LT CD4⁺ présentent, également, une expression élevée du *CD40LG* codant pour CD40L, située sur le chromosome X et jouant un rôle central dans la pathogenèse de la SSc. Cette hypométhylation dans les LT offre une explication potentielle de la prépondérance féminine dans la SSc par laquelle la perte de méthylation sur le promoteur CD40 situé sur le chromosome X inactivé entraîne une surexpression CD40 spécifique à la femme et une auto-immunité ultérieure (Henderson et *al.*, 2019).

Toujours dans les mêmes cellules, l'augmentation de la méthylation des séquences régulatrices du gène *FOXP3*, affecte l'expression de ce facteur de transcription qui est nécessaire pour la génération des LT régulateurs (Treg) et, par conséquent, peut servir de médiateur dans le dysfonctionnement immunitaire de la SSc (Henderson et *al.*, 2019).

L'altération de la méthylation de l'ADN a été démontrée dans d'autres types de cellules comme les fibroblastes et les cellules endothéliales (Wang et *al.*, 2014 ; Wang et *al.*, 2006). En effet, les cellules endothéliales microvasculaires des patients atteints de SSc montrent l'hyperméthylation des CpG du promoteur du gène codant pour le récepteur de la protéine morphogénétique osseuse de type 2 (*BMP2*) qui est important dans la pathogenèse de l'HTAP familiale (Wang et *al.*, 2006).

Par ailleurs, deux facteurs de transcription participant à la régulation épigénétique ont été identifiés chez les patients SSc : il s'agit de *KLF5* (kruppel-like factor 5) et de *FLI1* (friend leukemia integration 1). Ces derniers sont impliqués dans la SSc, en modulant l'expression de gènes de fibrose. Des excès de méthylation ont, également, été observés au niveau de différents gènes régulant les fonctions des fibroblastes dont plusieurs acteurs de la voie Wnt : *DKK1* (dickkopf WNT signalling pathway inhibitor 1), *WIF1* (WNT inhibitory factor 1), *SFRP1* (secreted frizzled-related protein 1) fibrose (Allanore, 2016).

Une cible particulière de l'hyperméthylation jugée critique est la SFRP1 (secreted-frizzled protein 1) qui fonctionne comme un modulateur clé de la signalisation Wnt/ β -caténine, une voie impliquée dans l'homéostasie tissulaire et qui s'est avérée trop active chez les patients atteints de SSc. Il a été démontré que la SFRP1 elle-même est régulée à la baisse dans la SSc, en conséquence de l'hyperméthylation (Henderson *et al.*, 2019) (**Figure 6**).

De même, des modifications post-traductionnelles des histones ont été suggérées, impliquant les HDAC (histone deacetylases) dans la réponse profibrosante dans plusieurs modèles (Allanore, 2016).

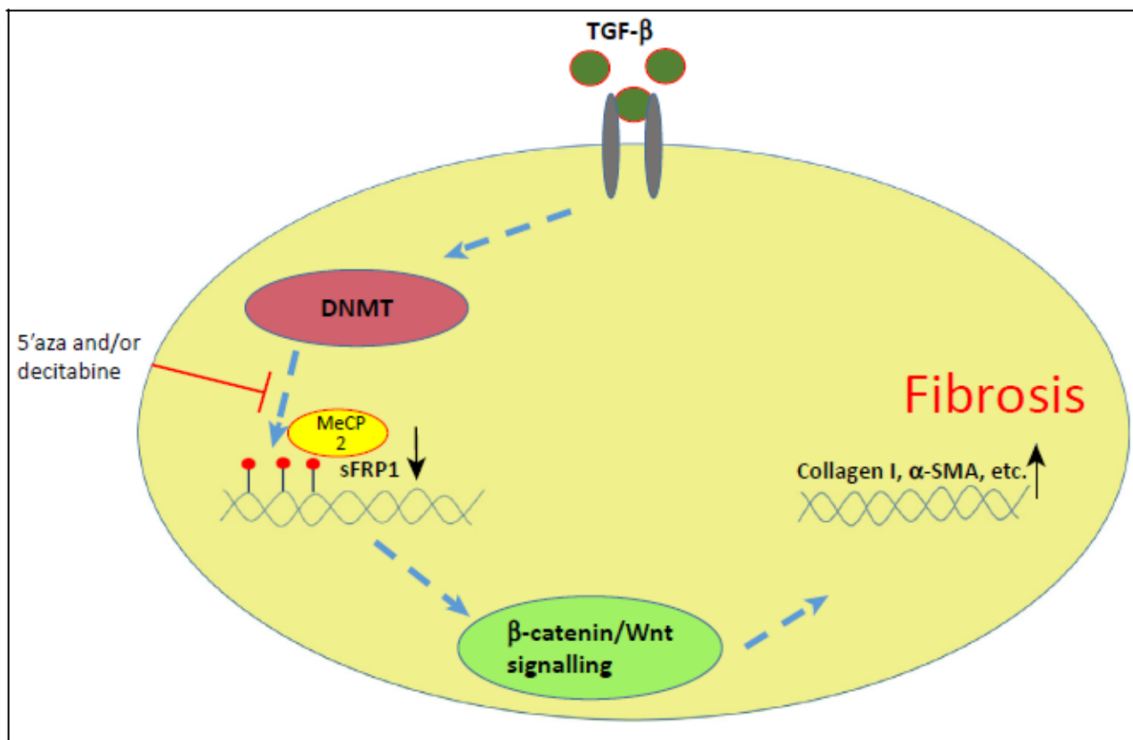


Figure 6. Rôle de la méthylation de l'ADN et MeCP2 dans la Sclérodémie Systémique (Henderson *et al.*, 2019).

Concernant les micro-RNA, des études ont rapporté que le taux du Mir-21, un mi-RNA profibrotique est cinq fois plus élevé chez les patients SSc, tandis que le Mir-29a qui est anti-fibrotiques, connu pour se lier à la 3'UTR du gène COL1A1 (le gène codant pour le collagène 1) s'est avéré être significativement régulé à la baisse dans les fibroblastes de ces patients. Aussi, le Mir-155 est fortement impliqué comme médiateur de l'inflammation et est, donc, de plus en plus étudié pour son rôle dans les troubles auto-immuns (Henderson *et al.*, 2019).

I-4. Traitement de la sclérodémie systémique

I. 4-1. Traitement palliatif et symptomatiques

Selon les symptômes cliniques existant, les choix thérapeutiques sont faits. Un bilan viscéral initial complet et une évaluation de l'évolutivité de la sclérodermie sont nécessaires pour le choix thérapeutique (Hachulla, 2007).

I. 4-2. Traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs

Les traitements immunosuppresseurs et immunomodulateurs doivent être réservés aux SSc diffuses récentes (moins de trois à cinq ans) ou évolutives (Hachulla, 2007).

I. 4. 2-1. Corticothérapie générale

Elle peut apporter un bénéfice sur les manifestations articulaire, musculaire, voire cardiaque ou pulmonaire (Hachulla, 2007).

I. 4. 2-2. D-Pénicillamine

La D-Pénicillamine peut apporter un effet protecteur vis-à-vis de la crise rénale aiguë (Hachulla, 2007).

I. 4. 2-3. Nintédanib

Il réduit l'apoptose des cellules endothéliales micro-vasculaires dermiques et module la restauration du réseau vasculaire pulmonaire. Il a été confirmé aussi que le Nintédanib bloque la synthèse du collagène et la transformation des fibroblastes pulmonaire humains. L'essai clinique de cette molécule est actuellement en cours (Andrea et *al.*, 2019).

I. 4-3. Autogreffe de moelle osseuse

L'autogreffe de moelle osseuse constitue une nouvelle option thérapeutique pour les patients atteints de SSc sévère (Katarzyna et *al.*, 2019) et toute maladie auto-immune (Walker et *al.*, 2018). C'est une procédure complexe, elle consiste à transplanter ou greffer les précurseurs de cellules immunitaire (cellules souche hématopoïétique, CSH) provenant du propre corps du patient, pour pouvoir développer un nouveau système immunitaire empêchant le retour de l'auto-immunité de la SSc plus durablement et sans aucune médication (Walker et *al.*, 2018).

L'avantage de cette thérapie est d'améliorer la qualité de vie du patient. En cas de maintien de la fonction pulmonaire, les patients respirent mieux, aussi l'inflammation des petits vaisseaux diminue et cela combat la fibrose cutanée et les capillaires disparus vont se reformer.

L'effet de la greffe de moelle osseuse commence immédiatement et continue habituellement des mois voir à des années (Walker et *al.*, 2018).

La greffe de moelle osseuse n'est pas un traitement sans risque. Elle peut causer des infections et des arythmies cardiaques mortelles. Elle induit une insuffisance gonadique chez les deux sexes. Chez l'homme, elle cause de l'azoospermie alors que chez la femme pré-ménopausée, elle cause l'infertilité et des symptômes de ménopause. (Walker et *al.*, 2018).

Enfin, c'est le seul traitement qui reste avec des données scientifiques de haut niveau qui permet d'améliorer la survie des patients atteints de SSc (Walker et *al.*, 2018).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'auto-immunité du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie, du mois de février à mars 2020. Nous avons étudié l'aspect moléculaire suspecté dans la pathogenèse de la SSc et relatif au polymorphisme du gène *IRF5*.

Il s'agissait, initialement, d'une étude «prospéctive» mais la survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion du COVID-19 avec le confinement qui s'en est suivi, nous avaient contraints à nous limiter à une étude rétrospective. En effet, nous avons analysé les résultats issus des études sérologique et génétique de 275 sujets dont 99 patients atteints de SSc et 176 sujets sains (**Tableau III**).

II-1. Matériel

II. 1-1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué par le sang prélevé à partir des patients atteints de Sclérodémie systémique (SSc), recueilli sur un tube :

- Sec puis centrifugé à 3500 tours/min pendant 5 minutes et le sérum est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Il sert à l'étude sérologique : recherche des AAN et identification de leurs cibles antigéniques.
- EDTA à partir duquel l'ADN génomique a été extrait, par « Salting Out ». Il sert à l'étude génétique par la technologie TaqMAN : étude du SNP *IRF5* rs2004640 et son association à la susceptibilité à développer la SSc ainsi que l'association de ce SNP à la production des AAN spécifiques de la SSc.

Les échantillons (Sérums et ADN extrait) ont été conservés entre 2-8°C jusqu'à ce que la série soit complète pour la manipulation.

II. 1-2. Matériel non biologique (Annexe 1)

II-2. Méthodes

II. 2-1. Étude sérologique

II. 2. 1-1. Recherche des anticorps anti-nucléaires (AAN)

Cette recherche doit passer par un dépistage par Immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2000 puis une identification des cibles antigéniques des AAN par immunofluorimétrie en flux « IFF » (Technologie Multiplex).

A. Immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp2000

Le dépistage des AAN a été fait par une technique IFI sur frottis de cellules HEp2000 (*IMMUNOCONCEPT[®], Sacramento, CA, USA*).

- Les échantillons dilués au 1 :80 sont incubés, sur un frottis de cellules HEp2000. En cas d'échantillon positif, les anticorps spécifiques se lient à l'antigène. La fraction non fixée est éliminée par lavage au tampon PBS.
- Révélation des Ac fixés par un conjugué « anti-Ig humaines (lapin) couplé à la FITC (Isothiocyanate de Fluorescéine) » (**Figure 7**). Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.
- Lecture au microscope à fluorescence permettant 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.

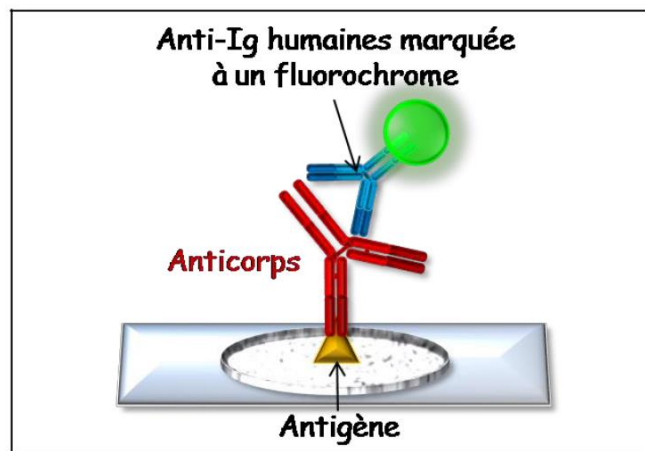


Figure 7. Principe de l'IFI sur cellules HEp2000 (Benidir et *al.*, 2009).

B. Technologie Multiplex (Immunofluorimétrie en flux)

- Des billes de polystyrène de 5,6 µm de diamètre sont colorées par l'incorporation de deux marqueurs fluorescents rouge et orange en quantité variable, générant ainsi 100 types de billes différentes, chacune caractérisée par un code couleur.

- Sur chaque type de bille, un antigène différent peut être fixé de façon covalente, le plus souvent par l'intermédiaire d'un groupement aminé et des fonctions carboxyliques portées par les billes.
- Un mélange de billes est mis en présence d'un sérum de malade dans lequel la présence éventuelle d'AAN est recherchée.
- Après incubation, un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines humaines marqué à la phycoérythrine, permet de révéler et de quantifier la présence de ces AAN (**Figure 8**).

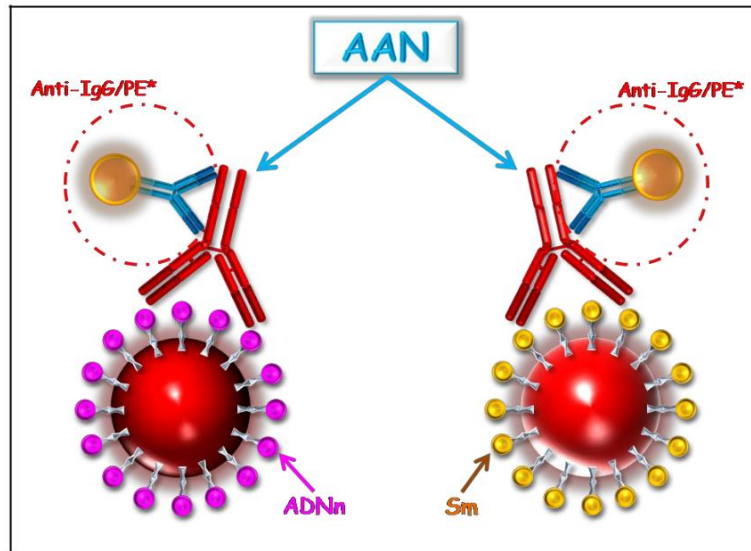


Figure 8. Détection des anticorps en immunofluorimétrie en flux (Benidir et *al.*, 2009).

- À l'étape finale chaque bille passe dans le faisceau de deux lasers d'un cytomètre appelé également *fluorimètre en flux* :
 - *Le laser rouge (635 nm)* identifie le *code couleur* de la bille, donc, l'auto-antigène par sa fluorescence intrinsèque.
 - *Le laser vert (532 nm)* mesure la *quantité de conjugué*, donc, d'AAN fixée à sa surface (**Figure 9**).

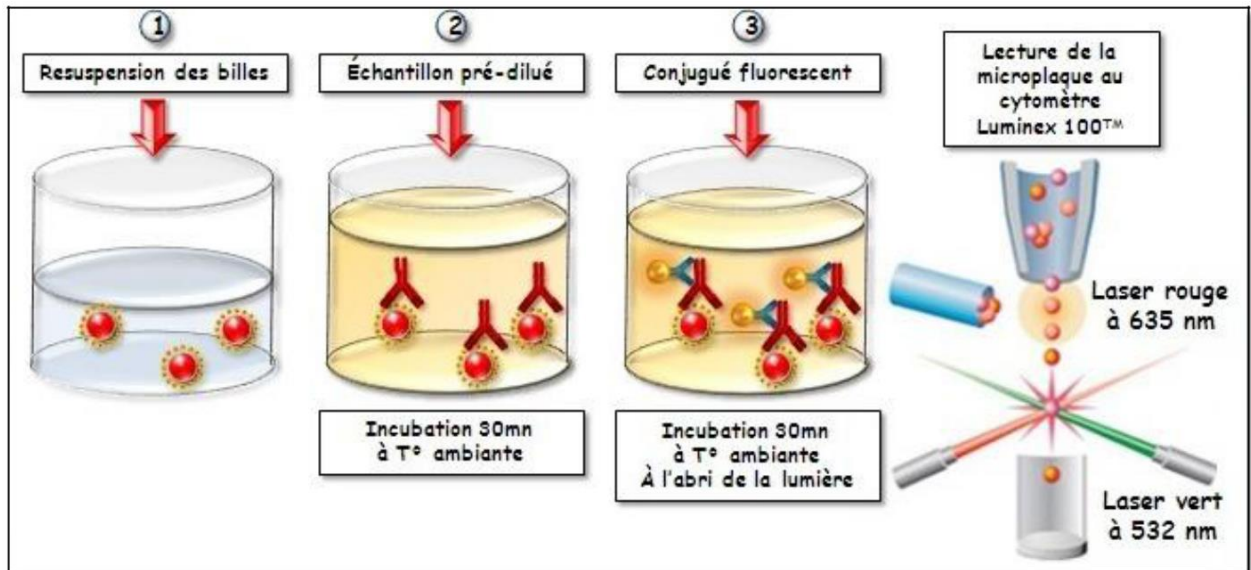


Figure 9. Principe de l'immunofluorimétrie en flux (Benidir et al., 2009).

Cette technique permet la détection :

- Qualitative : des AAN de classe IgG, grâce à une bille coatée avec un extrait de cellules HEp2000.
- Semi-quantitative : des AAN de classe IgG spécifiques de huit analytes séparés (SSA, SSB, Sm, RNP, Scl 70, Jo-1, centromère et histones).
- Quantitative : des Ac de classe IgG spécifiques de l'ADN natif (double brin).

La recherche des Ac anti-ADN natif, pour les échantillons revenus positifs en AAN à un titre $\geq 1:320$ (aspect de la fluorescence : homogène, moucheté ou mixte) s'est faite, également, selon la Technologie Multiplex (IFF) : AtheNA-Multi-Lyte™ (ZEUS) ANA II.

II. 2-2. Étude génétique

II. 2. 2-1. Extraction de l'ADN génomique

- Traiter le lysat cellulaire avec la protéinase K qui va hydrolyser les protéines.
- Ajouter, dans un premier temps, du phénol qui va dénaturer les protéines.
- Après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse, surnageant contenant l'acide nucléique, est recueillie.
- Ajouter, par la suite, du chloroforme pour éliminer toute trace de protéines.
- L'ADN présent dans la phase aqueuse sera, ensuite, précipité par de l'éthanol.

• Mode opératoire (Annexe2).

II. 2. 2-2. Étude du SNP *IRF5* rs2004640 par la technologie TaqMAN

Le génotypage a été réalisé par RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) en utilisant la technologie TaqMAN (Applied Bio-SystemsTM).

Cette RT-PCR 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). La détection des produits d'amplification se fait selon deux grands principes, par marquage :

- Non spécifique avec des agents se liant à l'ADN double brin (Syber Green I).
- Spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou de deux sonde(s) fluorescente(s) "Sondes TaqMAN ou balises moléculaires".

Dans le présent travail, deux sondes discriminantes ont été utilisées : **VIC** et **FAM**. Dans ce cas de figure, la PCR requiert :

- Deux amorces oligo-nucléotidiques : pour amplifier la séquence d'intérêt.
- Deux sondes TaqMAN : l'une s'hybridant à l'allèle sauvage, l'autre à l'allèle variant.

Chaque sonde TaqMAN renferme :

- Un fluorochrome, à l'extrémité 5', spécifique de chaque type d'allèle (**VIC** ou **FAM**).
- Un Quencher non fluorescent (NFQ), à l'extrémité 3'.
- Une molécule MGB (Minor Groove Binder) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex "ADN cible – sonde spécifique" et le stabilise (**Figure 10**).

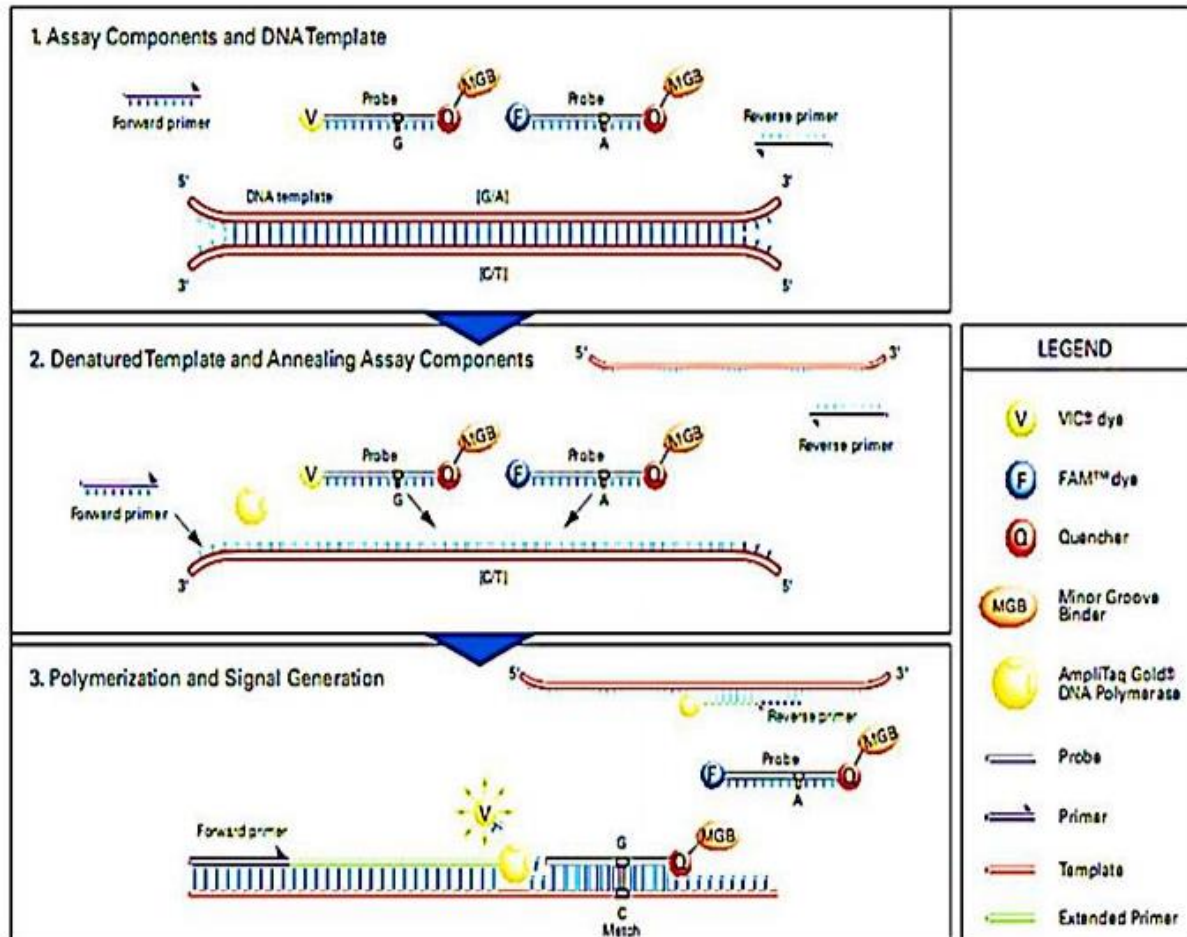


Figure 10. Différentes étapes du génotypage par la technique TaqMAN (Benidir et al., 2009).

La concentration finale de l'ADN utilisé a été ajustée à 20 ng/ml et la préparation du Mix de la PCR a été faite comme suit :

- Avant de commencer la manipulation, remise du TaqMAN et l'AD-Mix TaqMAN SNP Genotyping Assays (TaqMan MGB probes, **FAM** and **VIC** dye-labeled), spécifiques de chaque essai pendant 30 minutes à Température ambiante (18 – 30°C).
- Préparation du mélange réactionnel pour le nombre d'échantillons plus deux (n+2) (**Tableau I**).
- Dépôts de 1 µl d'ADN de chaque échantillon dans chaque Puits d'une microplaque de 96 Puits et 1 µl d'eau distillée stérile dans les deux derniers Puits qui servent de témoins négatifs.
- Distribution de 19 µl du Mix d'amplification dans chaque Puits contenant l'ADN génomique pour un volume réactionnel final de 20 µl.
- Fermeture hermétique de la plaque avec une feuille thermocollante puis la placer dans le Thermocycleur.

Tableau I. Mélange réactionnel pour la PCR.

Composant	Quantité/Puits (Échantillon)
AD Mix	12.5 µl
Master Mix	250 µl
Eau distillée stérile	425 µl

La RT-PCR a été effectuée dans le thermocycleur 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems™), dont le programme est comme suit (**Tableau II**) :

Tableau II. Programme de la RT-PCR.

Température	Durée du Cycle	Effet
60°C	1 min	Activation de la Taq Polymérase
95°C	10 min	Dénaturation initiale
95°C (40 Fois)	15 secondes	Dénaturation des sondes amplifiées
60°C	1 min	Hybridation – Élongation
60°C	1 min	Activation des fluorochromes et préparation à la lecture

Lecture des résultats de la RT-PCR, et donc, la fluorescence, dans le détecteur couplé au thermocycleur et cette dernière est intégrée grâce au logiciel 7500 software v2.0.1 de l'ordinateur lié au détecteur (Applied Biosystems™) : Chaque échantillon étant représenté par un point. Par la suite est défini le type de fluorescence associé à chaque point.

Par exemple : Le nuage de points exprimant majoritairement de la fluorescence **FAM** (bleu) correspond à des échantillons homozygotes pour l'un des deux allèles ; le nuage rouge correspond à une fluorescence **VIC** majoritaire, donc, à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle ; tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences, 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. Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associée chacune des sondes **VIC** et **FAM** (**Figure 11**).

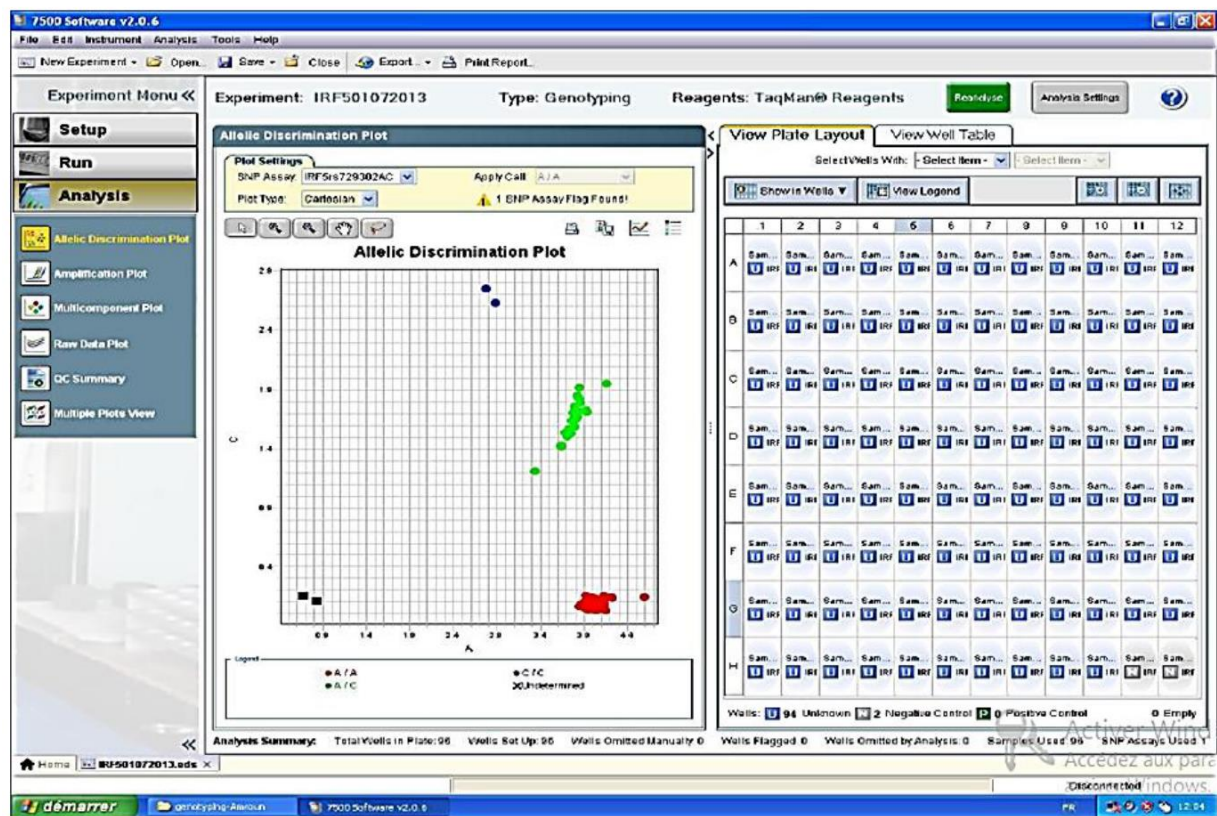


Figure 11. Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.

II-3. ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons calculé les fréquences alléliques et génotypiques 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.

D'abord, nous avons évalué l'équilibre de Hardy-Weinberg, ensuite, nous avons analysé ces fréquences (avec ou sans stratification) à l'aide du test du χ^2 . Nous avons considéré une différence comme étant "statistiquement significative" pour une valeur du $p < 0,05$. Dans ce cas précis, nous avons calculé : l'Odds Ratio (OR) qui se définit comme le rapport des chances qu'un événement arrivant à un groupe de personnes « A », arrive également, à un autre groupe « B » et l'Intervalle de confiance à 95% (IC 95%) selon le test exact de Fisher.

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. Enfin, le logiciel informatique utilisé est le Compare 2. V 3.11.

Résultats

III. Résultats

L'étude rétrospective que nous avons menée a porté sur la SSc dans laquelle nous avons recherché l'existence d'une association entre le SNP *IRF5* rs2004640 et :

1. La susceptibilité à développer la SSc ;
2. La production des auto-anticorps spécifiques de la SSc : anti-nucléoles, anti-Topoisomérase I (ATA) et anti-Centromère (ACA) ;
3. La forme de SSc : limitée (l-SSc) et diffuse (d-SSc).

III-1. Caractéristiques de la population étudiée

Les caractéristiques de la population étudiée figurent dans le **Tableau III** :

Tableau III. Caractéristiques de la population étudiée.

	Patients SSc	Sujets Sains
Nombre	99	176
Age (moyenne ± 1 DS) [an]	45 ± 12	33 ± 13
Âges extrêmes [an]	8 – 78	20 – 67
Sexe ratio (H : F)	1 : 10	1 : 6
Durée d'évolution (moyenne ± 1 DS) [an]	6 ± 2	-

III. 1-1. Principales manifestations cliniques

La Sclérodermie systémique (SSc) peut prendre deux principales formes cliniques :

- SSc diffuse : d-SSc ;
- SSc limitée : l-SSc.

La distribution des patients selon les formes cliniques est illustrée dans la **Figure 12**.

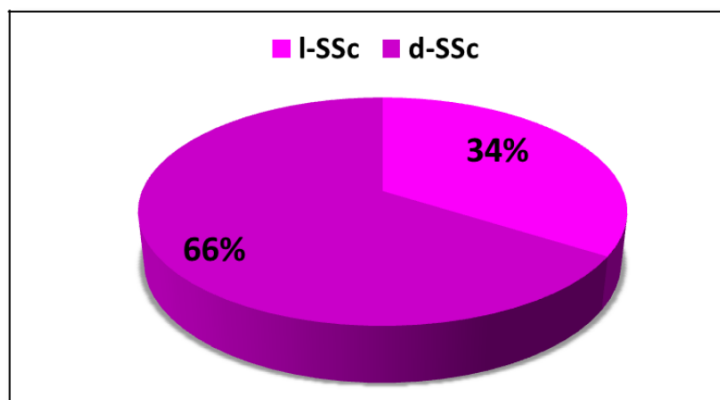


Figure 12. Distribution des formes de SSc dans la population malade.

Quant aux manifestations cliniques les plus observées, elles sont représentées dans le **Tableau IV ; Figure 13.**

Tableau IV. Principales manifestations cliniques observées chez les patients SSc étudiés.

Manifestation Clinique		Fréquence (%)
Atteinte articulaire	Arthralgies	67
	Arthrite	
	Polyarthrite	
Syndrome de Raynaud		65
Atteinte digestive	Reflux Gastro-Œsophagien (RGO)	54
	Dysphagie	
	Varices œsophagiennes (VO)	
Syndrome sec oculo-buccal		36
Sclérose cutanée		33
Atteinte pulmonaire	Dyspnée	21
	Fibrose Pulmonaire	
	Pneumopathie Interstitielle Diffuse (PID)	
	Silicose	
Association à d'autres maladies auto-immunes		8
Crise rénale de la SSc		2

La microangiopathie organique a été objectivée dans 8% des cas.

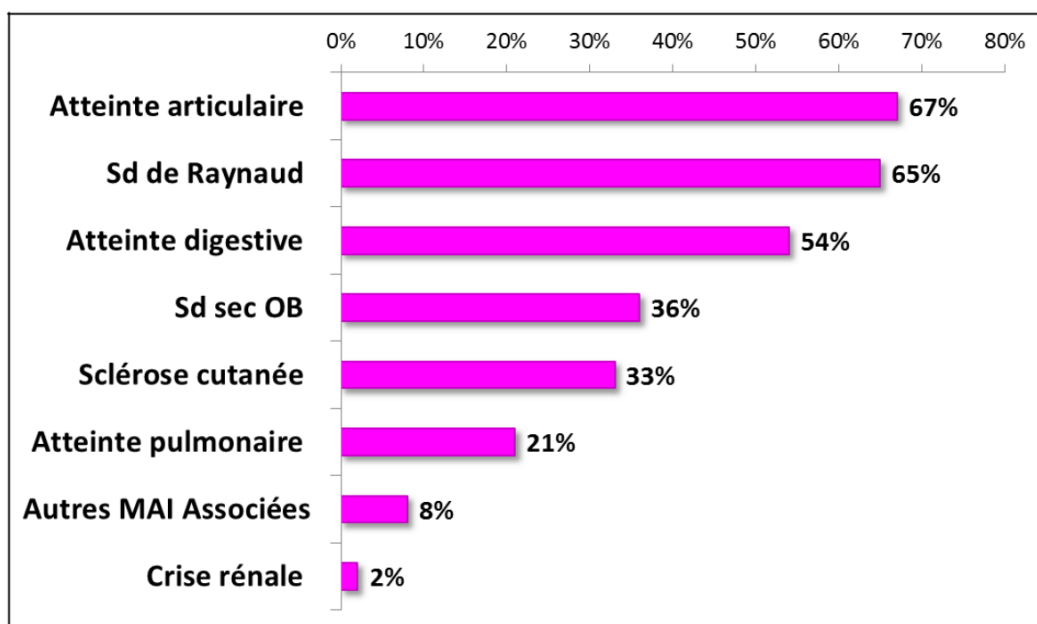


Figure 13. Principales manifestations cliniques observées chez les patients SSc.

III. 1-2. Profil en anticorps anti-nucléaires de la population

malade A. Dépistage des AAN sur cellules HEp2000

Les résultats de la recherche des AAN en IFI sur cellules HEp2000 montrent que tous les patients atteints de SSc étaient positifs en AAN avec des titres significatifs à élevés ($\geq 1 : 320$) avec des aspects assez différents (Figure 14).

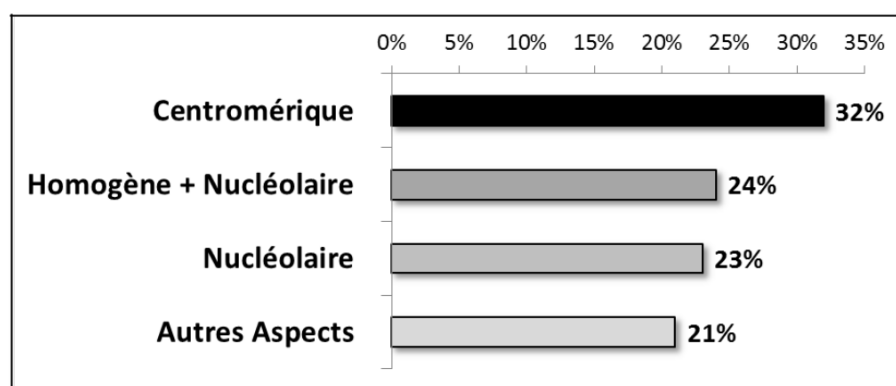


Figure 14. Aspects les plus fréquents des AAN obtenus en IFI sur cellules HEp2000.

B. Identification des cibles antigéniques des AAN

Nous avons eu recours à l'identification des cibles antigéniques des AAN par Immunofluorimétrie en flux (IFF) pour certains sérums qui avaient donné un aspect de fluorescence

nucléolaire isolée ou mixte en IFI sur cellules HEP-2000, par exemple : Homogène + Nucléolaire, Homogène + Centromérique, Homogène + Moucheté + Nucléolaire, Homogène + Moucheté + Centromérique, etc.

Parmi les sérums étudiés, 19 avaient donné une fluorescence nucléolaire isolée et l'identification des cibles antigéniques par IFF était négative pour eux (panel classique avec 10 cibles antigéniques). Par ailleurs, 16 sérums n'avaient qu'une centromérique isolée et n'avaient pas fait l'objet d'une identification par IFF.

Les résultats de l'identification figurent dans le **Tableau V** et **Figure 15**.

Tableau V. Cibles antigéniques des AAN identifiées par IFF (Technologie Multiplex).

Cibles antigéniques « IFF »	Fréquence (%)
Sc170	64
Centromère B	17
TRIM-21 (SSA 52 kDa)	9
SSA 60 kDa	6
ADN natif	5
SSB	4
RNP	1
Jo-1	1
Ribosome P	1
Sm	0

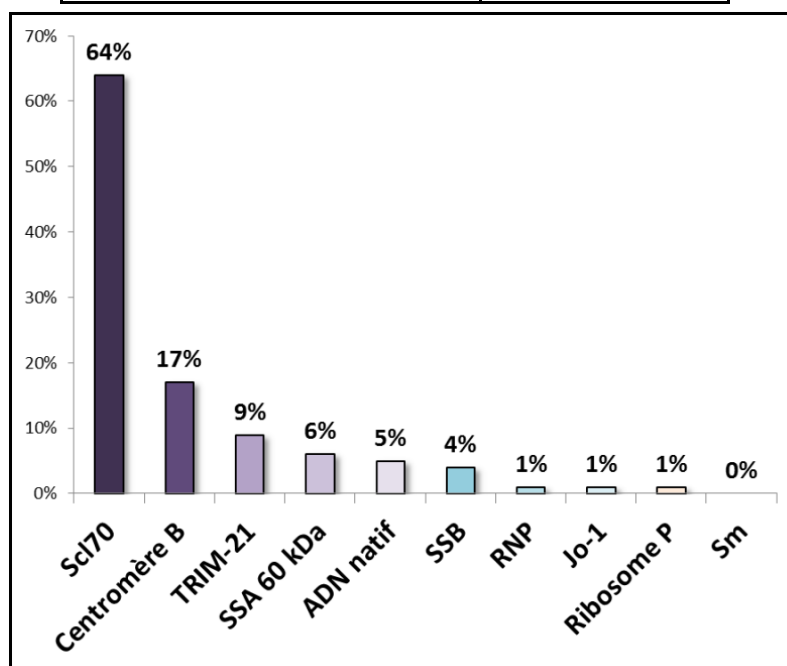


Figure 15. Cibles antigéniques des AAN identifiées par IFF (Technologie Multiplex).

III-2. Recherche d'une association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et la susceptibilité à développer la SSc dans la population étudiée

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 figurent dans le **Tableau VI ; Figure 16 (Annexe 3)**.

Tableau VI. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc vs. Population contrôle.

	SSc (n = 99)	SS (n = 176)	SSc vs. SS	
			χ^2	(p)
Allèles				
T	111 (56%)	197 (56%)	0,000	0,983
G	87 (44%)	155 (44%)	0,000	0,983
Génotypes				
TT	30 (30%)	63 (36%)	0,854	0,355
GT	51 (52%)	71 (40%)	3,205	0,073
GG	18 (18%)	42 (24%)	1,199	0,273

III. 2-1. Comparaison entre les patients SSc et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative quant à l'expression des allèles T et G entre les patients SSc et les sujets sains et de la même manière, l'analyse des fréquences génotypiques ne montre aucune différence malgré que nous ayons observé que :

- Les génotypes **TT** et **GG** soient plus exprimés chez les sujets sains ;
- Le génotype **GT** soit plus exprimé chez les patients SSc : 52% vs. 40% avec une valeur du « p » de 0,073 proche du seuil de significativité et un OR de 1,57.

L'augmentation de l'effectif nous permettra, dans le futur, de tirer des conclusions plus objectives.

III-3. Recherche d'une association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et la production des auto-anticorps spécifiques de la SSc

III. 3-1. Production des anticorps anti-Topo-Isomérase I

Parmi les patients SSc étudiés, 47 avaient des auto-anticorps dirigés contre la Topo-Isomérase I (Scl 70) : ATA.

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640, selon la production des ATA, figurent dans le **Tableau VII ; Figures 17 et 18 (Annexe 4)**.

Tableau VII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des ATA vs. Sujets sains.

	ATA (+)	ATA (-)	SS	ATA (+) vs. ATA (-)		ATA (+) vs. SS	
	(n = 47)	(n = 52)	(n = 176)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles							
T	51 (54%)	62 (60%)	197 (56%)	0,579	0,447	0,088	0,767
G	43 (46%)	42 (40%)	155 (44%)	0,579	0,447	0,088	0,767
Génotypes							
TT	14 (30%)	23 (44%)	63 (36%)	2,200	0,138	0,592	0,442
GT	23 (49%)	16 (31%)	71 (40%)	3,413	0,065	1,124	0,289
GG	10 (21%)	13 (25%)	42 (24%)	0,192	0,661	0,139	0,709

L'analyse des fréquences alléliques en fonction de la production des ATA n'a révélé aucune différence significative entre :

- Patients ATA (+) vs. ATA (-) ;
- Patients ATA (+) vs. Sujets sains.

Néanmoins, nous avons observé que l'allèle :

- **T** est plus fréquemment exprimé chez les patients ATA (-) et sujets sains que chez les patients ATA (+) ;
- **G** est plus exprimé chez les patients ATA (+)

Par ailleurs, l'analyse des fréquences génotypiques montre une forte expression du génotype **GT**, sans aucune différence significative, chez les patients SSc producteurs d'ATA. Par contre, les génotypes **TT** et **GG** sont moins fréquents chez les patients producteurs d'ATA.

III. 3-2. Production des anticorps anti-Centromère

Parmi les patients SSc étudiés, 33 avaient des auto-anticorps dirigés contre le Centromère : ACA.

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640, selon la production des ACA, figurent dans le **Tableau VIII ; Figures 19 et 20 (Annexe 5)**.

Tableau VIII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des ACA vs. Sujets sains.

	ACA (+) (n = 33)	ACA (-) (n = 66)	SS (n = 176)	ACA (+) vs. ACA (-)		ACA (+) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles							
T	36 (55%)	77 (58%)	197 (56%)	0,258	0,612	0,045	0,831
G	30 (45%)	55 (42%)	155 (44%)	0,258	0,612	0,045	0,831
Génotypes							
TT	10 (30%)	27 (41%)	63 (36%)	1,057	0,304	0,369	0,544
GT	16 (48%)	23 (35%)	71 (40%)	1,713	0,191	0,759	0,384
GG	7 (22%)	16 (24%)	42 (24%)	0,113	0,736	0,109	0,741

L'analyse des fréquences alléliques n'a révélé aucune différence significative. Cependant, nous avons remarqué que l'allèle **G** est plus présent chez les patients producteurs d'ACA alors que l'allèle **T** est moins fréquemment exprimé chez ces patients comparés aux patients non producteurs d'ACA et aux sujets sains.

Également, l'analyse des fréquences génotypiques n'a objectivé aucune différence significative entre les patients producteurs ou non d'ACA et les sujets sains bien que le génotype **GT** soit plus fréquent chez les patients producteurs d'ACA (48%) contrairement aux génotypes **TT** et **GG** qui sont moins fréquemment exprimés chez les patients producteurs d'ACA que les non producteurs ou les sujets sains.

III. 3-3. Production des anticorps anti-Nucléoles

Parmi les patients SSc étudiés, 66 avaient des auto-anticorps dirigés contre les nucléoles.

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640, selon la production des anticorps anti-nucléoles, figurent dans le **Tableau IX ; Figures 21 et 22 (Annexe 6)**.

Tableau IX. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la production des anticorps anti-nucléoles vs. Sujets sains.

	Nucléoles (+) (n = 66)	Nucléoles (-) (n = 33)	SS (n = 176)	Nucl (+) vs. Nucl (-)		Nucl (+) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles							
T	77 (58%)	36 (55%)	197 (56%)	0,258	0,612	0,219	0,640
G	55 (42%)	30 (45%)	155 (44%)	0,258	0,612	0,219	0,640
Génotypes							
TT	27 (41%)	10 (30%)	63 (36%)	1,057	0,304	0,537	0,464
GT	23 (35%)	16 (48%)	71 (40%)	1,713	0,191	0,610	0,435
GG	16 (24%)	7 (22%)	42 (24%)	0,113	0,736	0,004	0,951

L'analyse des fréquences alléliques n'a objectivé aucune différence significative quant à la production des anticorps anti-nucléoles bien que l'allèle **T** soit plus exprimé chez les patients producteurs de ces anticorps contrairement à l'allèle **G**.

En outre, ce nous avons observé en analysant les fréquences génotypiques c'est que le génotype **TT** est plus exprimé ou associé à la production des anti-nucléoles à l'inverse des génotypes **GT** et **GG**, sans qu'il y ait de différence significative.

III-4. Recherche d'une association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et l'apparition des formes clinique de la SSc

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640, selon la forme de la SSc, figurent dans le **Tableau X ; Figures 23, 24 et 25 (Annexes 7 et 8)**.

Tableau X. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 chez les patients SSc selon la forme clinique.

	Forme limitée (n = 33)	Forme diffuse (n = 66)	SS (n = 176)	ACA (+) vs. ACA (-)		ACA (+) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles							
T	36 (55%)	77 (58%)	197 (56%)	0,258	0,612	0,045	0,831
G	30 (45%)	55 (42%)	155 (44%)	0,258	0,612	0,045	0,831
Génotypes							
TT	10 (30%)	27 (41%)	63 (36%)	1,057	0,304	0,369	0,544
GT	16 (48%)	23 (35%)	71 (40%)	1,713	0,191	0,759	0,384
GG	7 (22%)	16 (24%)	42 (24%)	0,113	0,736	0,109	0,741

En analysant les fréquences alléliques selon la forme de la SSc qu'elle soit limitée ou diffuse, nous n'avons objectivée aucune différence significative, néanmoins, nous avons constaté que l'allèle **G** était plus fréquemment exprimé dans la forme limitée contrairement à l'allèle **T** qui est exprimé dans la forme diffuse.

Et de la même manière, l'analyse des fréquences génotypiques n'a révélé aucune différence statistiquement significative mais nous avons observé que le génotype **GT** est plus exprimé dans la forme limitée alors que les génotypes **TT** et **GG** sont plus fréquemment exprimés dans la forme diffuse.

Discussion

IV. Discussion

Notre travail a porté sur la SSc, qui est une maladie auto-immune multifactorielle. Nous nous sommes intéressés à étudier le rôle de la composante génétique, en recherchant une association entre le polymorphisme du gène *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 avec :

- La susceptibilité à développer la SSc, en comparant les fréquences alléliques et génotypiques entre les patients atteints de SSc et la population contrôle (sujets sains)
- La production d'auto-anticorps chez les patients
- L'apparition des deux formes cliniques principales de la maladie (l-SSc et d-SSc).

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques de ce SNP ne montre pas de différence statistiquement significative entre les patients SSc comparés aux sujets sains, même résultat avec le profil en auto-Ac et avec les formes limitées et diffuses.

Nos résultats ne rejoignent pas les données de la littérature (**Tableau XI**). Ceci peut être expliqué par le faible effectif de notre population, comparée aux autres études publiées concernant :

1. L'association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et la susceptibilité à développer la SSc

- **Xu et al.**, dans une méta-analyse avaient montré que l'allèle T du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 était fortement associé au développement de la SSc (OR 1,27 ; IC 95% CI 1,17 – 1,39) (Xu et al., 2016).
- L'étude cas-témoin réalisée par **Dieudé et al.**, sur une population caucasienne française faite de 811 patients et 760 sujets sains ayant objectivé une association avec l'allèle T du SNP *IRF5* rs2004640 (OR 1,25) de même que le génotype TT (OR 1,58) avec la susceptibilité à développer la SSc (Dieudé et al., 2009).

2. L'association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et la Production des auto-anticorps spécifiques de la SSc

- **Wang et al.**, en 2014 avaient confirmé cette association dans la population Chinoise (424 patients vs. 502 sujets sains) en rapportant une fréquence plus élevée du génotype TT (OR 1,4) chez les patients anti-Topo-Isomérase (Wang et al., 2014).

- L'étude d'**Ikue et al.**, sur une population Japonaise ayant révélé une association de l'allèle à risque T avec la production des anticorps anti-Topo-Isomérase I (OR 1,56) (Ikue et al., 2009).
3. L'association entre le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et l'apparition des différentes formes cliniques et complications de la SSc
- **Zhao et al.**, dans une méta analyse avaient comparé des patients SSc présentant une fibrose pulmonaire (PF+) et des patient sans fibrose pulmonaire (PF-) et Ils avaient démontré une association entre le polymorphisme de *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et l'apparition de la fibrose pulmonaire chez les patients SSc (OR 1,12 ; IC 95% 1,02 – 1,22) (Zhao et al., 2017).
 - **Wang et al.**, avaient confirmé cette association dans la population Chinoise en rapportant une fréquence plus élevée du génotype TT (OR 1,4) chez les patients présentant une fibrose pulmonaire (Wang et al., 2014).
 - **Dieudé et al.**, avaient démontré une association entre l'expression de l'allèle à risque T et du génotype TT avec :
 - Le développement de la forme cutanée diffuse de la sclérodermie :
 - Allèle T : OR 1,27 ;
 - Génotype TT : OR 2,25 ;
 - L'apparition de la fibrose pulmonaire :
 - Allèle T : OR 1,44 ;
 - Génotype TT : OR 2,07 (Dieudé et al., 2009).
 - L'étude d'**Ikue et al.**, sur une population Japonaise ayant révélé une association de l'allèle à risque T avec l'apparition de la forme cutanée diffuse de la SSc (OR 1,43) (Ikue et al., 2009).

Par ailleurs, il serait plus intéressant d'étudier d'autres SNPs de ce gène comme le montrent les études de :

- **Murdaca et al.**, avaient montré que le SNP *IRF5* rs2004640 possédait des effets additifs avec d'autres SNPs dans la susceptibilité à la fois à la fibrose alvéolaire et à la
- **David Carmona et al.**, méta-analyse réalisée sur une population d'origine Caucasiennne (Espagne, Allemagne, Italie, Hollande et le Royaume Uni), composée de 3361 patients

SSc et 4012 sujets contrôles, avait conclu à une association significative de trois polymorphismes d'IRF5 avec la susceptibilité à la sclérodermie systémique :

- rs4728142 : OR 1,22 ; IC 95% 1,14 – 1,30 ;
- rs2004640 : OR 0,84 ; IC 95% 0,78 – 0,90 ;
- rs10488631 : OR 1,63 ; IC 95% 1,47 – 1,81.

Cependant, l'haplotype formé des trois allèles à risque (rs4728142*A-rs2004640*T-rs10488631*C : OR 1,75 ; IC 95% 1,56 – 1,97 « haplotype ATC ») explique mieux l'association observée, suggérant un effet additif des trois SNPs (David Carmona et *al.* 2013).

- **Dieudé et al.**, dans le but d'étudier si les haplotypes du gène *IRF5* confèrent une susceptibilité à la SSc et d'analyser la corrélation phénotype-génotype et phénotype-haplotype, cette équipe avait étudié trois SNPs de l'*IRF5* (rs377385, rs2004640 et rs10954213) chez 1623 sujets d'origine Française et ils ont établi une corrélation avec le phénotype de la maladie (la forme cutanée et la forme associée à la fibrose alvéolaire) (Dieudé et *al.*, 2010).

Discussion

Tableau XI. Différentes études portant sur le SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 dans la Sclérodermie Systémique.

Auteurs	Sclérodermie Systémique (n)	Sujets sains (n)	Résultats	OR	Population
Wang <i>et al.</i> , 2014	424	502	Association Génotype TT	1,4	Chinoise
David Carmona <i>et al.</i> , 2013	Méta-analyse :		Association Haplotype rs4728142*A- rs2004640*T- rs10488631* C	1,75	Caucasienne
	3361	4012			
Dieudé <i>et al.</i> , 2010	Étude de trois SNPs de l' <i>IRF5</i> : rs377385 rs2004640 rs10954213		Corrélation haplotype- Phénotype	-	Française
Dieudé <i>et al.</i> , 2009	811	760	Association Génotype TT Allèle T	1 ,58 1,25	Caucasienne Française
Ikue <i>et al.</i> , 2009	281	477	Association Allèle T	1,43	Japonaise
Dieudé <i>et al.</i> , 2009	801	964	Association Allèle T Génotype TT	1,31 1,72	Française

Conclusion

V. Conclusion

La SSc est une maladie multifactorielle, le rôle des auto-anticorps n'est pas bien élucidé dans sa pathogénie, mais leurs rôles diagnostique et pronostic sont bien établis.

Le rôle de la composante génétique a fait l'objet de nombreuses études, il s'agit d'une maladie multigénique, dont certains gènes de susceptibilité interviennent dans les processus de dysfonction immunitaire.

Il s'agit d'une étude préliminaire ayant pour objectif principal de rechercher une association entre le polymorphisme *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 et la susceptibilité à développer la SSc dans une cohorte de patients Algériens et secondairement, à établir son association avec la production des auto-anticorps spécifiques de cette pathologie et enfin sa place dans l'expression des formes cliniques de la SSc.

Visant à réaliser ces objectifs, nous avons comparé les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *IRF5* (-3835 G/T) rs2004640 entre les patients atteints de SSc et les sujets contrôles (patients LES et sujets sains) selon différentes stratifications.

Les résultats obtenus n'ont montré aucune association significative, néanmoins, nous avons relevé des tendances avec des valeurs du p avoisinant le seuil de la significativité ($p < 0,05$).

Ceci dit et en tenant compte du faible effectif de notre cohorte, nos résultats sont très prometteurs si un effectif plus important est envisagé en plus de l'étude d'autres SNPs de l'*IRF5* ayant un effet additif avec le SNP *IRF5* rs2004640, dans des études futures, afin de tirer des conclusions plus objectives et pouvoir comparer nos données avec celles de la littérature scientifique.

Références

- Allanore Y. Physiopathologie de la sclérodémie systémique. *Médecine/sciences*. 2016; 32(2):183–191.
- Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology*, 2010; 49:203–210.
- Assassi S, Radstake T, Mayes MD, Martin J. Genetics of scleroderma implications for personalized medicine? *BMC Medicine*. 2013 ;11:9.
- Agarwal SK. The genetics of systemic sclerosis. Division of Rheumatology and Clinical Immunogenetics, Department of Internal Medicine, The University of Texas Health Science Center at Houston. 2010; 10(51): 134–143.
- Arlettaz L, Musaro V, Dayer E. Les anticorps spécifiques de la sclérodémie systémique. *Caduceus express*, Institut Central (ICHV), Hôpital du Valais, Sion. 2014 ;16(5).
- Arnett FC. Is scleroderma an autoantibody mediated disease? *Current Opinion in Rheumatology*. 2006;18(6): 579–581.
- Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005; 204 : 9–26.
- Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity*. 2004;20: 539–50.
- Barnes BJ, Field AE, Pitha-Rowe PM. Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes. *J Biol Chem*. 2003; 278:16630-41.
- Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. 2001 , *J Biol Chem*. 2001; 276:23382-90.
- Black CM, Silman AJ, Herrick AI, Denton CP, Wilson H, Newman J et al. Interferon-alpha does not improve outcome at one year in patients with diffuse cutaneous scleroderma: results of a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Arthritis Rheum*. 1999; 42:299–305.
- Bussone G, Albiero A, Mouthon L. Sclérodémie systémique. *EMC*. 2012 ; 7.
- Camille F, Nakhle A, Stéphane B. Comment reconnaître une sclérodémie. *Rev Prat*. 2002 ; 52 :1884-90.
- Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular

- endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest.* 1996; 97(1):111–9.
- Carwile leRoy E. Sclérodémie systémique. *Traité de médecine interne.* Paris : Flammarion. 1997 ; 1483-7.
 - Chora I, Romano E, Manetti M, Mazzotta C, Costa R, Machado V, et al. Evidence for a derangement of the microvascular system in patients with a very early diagnosis of systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2017;44(8):1190–7.
 - Cipriani P, Marrelli A, Liakouli V, Di Benedetto P & Giacomelli R. Cellular players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews.* 2011 ; 10. 641–646.
 - Comacle P, Padelli M, Renaudineau Y, Youinou P. Quel est l'intérêt de la recherche des anticorps anti-nucléolaires dans la sclérodémie systémique ? *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 2011 ; 26: 176—181.
 - David Carmona F, Jose-Ezequiel M, Lorenzo B et al. The Systemic Lupus Erythematosus IRF5 Risk Haplotype Is Associated with Systemic Sclerosis. *PLOS ONE.* 2013; 8(1) : e54419.
 - Dieude P, Dawidowicz K et al. Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity. *J Rheumatol.* 2010 ; 37(5) : 987-92
 - Dieudé P, Guedj M, Wipff J et al. Association Between the IRF5 rs2004640 Functional Polymorphism and Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism,* 2009. 60(1) : 225–233.
 - Dieudé P, Guedj M, Wipff J et al. STAT4 Is a Genetic Risk Factor for Systemic Sclerosis Having Additive Effects With IRF5 on Disease Susceptibility and Related Pulmonary Fibrosis. *Arthritis & Rheumatism,* 2009. 60 (8) : 2472–2479.
 - Didier K, Robbins A, Antonicelli F, Pham BN, Giusti D & Servettaz A. Actualités dans la physiopathologie de la sclérodémie. *La Revue de Médecine Interne.* 2019 ; 40(10) :654-663.
 - Distler JHW, Jünger A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(8):2892–7.

- Duncan MR, Berman B. Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. *J Clin Invest.* 1987; 79 : 1318–24.
- Farrar J, Smith DJD, et al. Recruitment of Stat4 to the human interferon α / β receptor requires activated Stat2. *J Biol Chem.* 2000; 275(4): 2693-7.
- Granstein RD, Flotte TJ, Amento EP. Interferons and collagen production. *Invest Dermatol.* 1990; 95 :75S–80S.
- Gourh P, Safran SA, Alexander T, Boydn SE, Morgan ND, Ami AS, et al. HLA and autoantibodies define scleroderma subtypes and risk in African and European Americans and suggest a role for molecular mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117(1) : 552-62.
- Guillevin L, Mouthon L. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2015; 41(3):475–88.
- Hachulla E. Traitement de la sclérodermie systémique (en dehors de l’hypertension artérielle pulmonaire). *La Revue de medecine interne.* 2007 ; 28 : 277–S284.
- Hebbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(4): 889–93.
- Henderson J, Distler J, O’Reilly S. The Role of Epigenetic Modifications in Systemic Sclerosis: A Druggable Target. *Trends in Molecular Medicine.* 2019; 25 : 5.
- Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction. *Int Immunol.* 2005;17:1367-78.
- Huggle T, Gratzl S, Daikeler T, Frey D, Tyndall A, Walker UA. Sclerosing skin disorders in association with multiple sclerosis. Coincidence, underlying autoimmune pathology, or interferon induced? *Ann Rheum Dis.* 2008 ; 68 (1): 47-50.
- Ikue I, Yasushi Ki, Aya K et al. Association of a Functional Polymorphism in the IRF5 Region With Systemic Sclerosis in a Japanese Population. *Arthritis & Rheumatism,* 2009. 60 (6): 1845–1850.
- Korman BD, Criswell LA. Recent Advances in the Genetics of Systemic Sclerosis: Toward Biological and Clinical Significance. *Division of Rheumatology.* 2015; 17 (3): 21.
- LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis . *J Rheumatol.* 2001; 28(7) : 1573-6.

- Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5 :125-35.
- Coelho LFL, de Oliveira JG, Kroonb EG. Interferons and scleroderma—A new clue to understanding ? 2008, *Immunology Letters*, Vol. 118, pp. 110–115.
- Marie I, Cabane J. Étiopathogénie des sclérodermie. *Rev Prat.* 2002 ; 52 : 1873-81.
- Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, Ramirez GA, Tombetti E, Valle PD, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci Transl Med.* 2018; 10(45).
- Mayes MD, Lacey JR, Dimmer JB, et al. Prevalence, incidence, survival and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis.* 2003; 48 : 2246-55.
- Murdaca G, Contatore M, Gulli R, Mandich P, Puppo F. Genetic factors and systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews.* 2016.
- Pandey JP, Takeuchi F. TNF- α and TNF- β Gene Polymorphisms in Systemic Sclerosis. *Human Immunology.* 1999; 60 : 1128–1130.
- Pawlak-Buś K, Schmidt W, Olejarz M, Czyż A, Komarnicki M & Leszczyński P. Autologous hematopoietic stem cell transplant for progressive diffuse systemic sclerosis: procedural success and clinical outcome in 5-year follow-up. *Reumatologia/Rheumatology*, 2019; 57(1), 50–54.
- Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, et al. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;30:332–46.
- Rotimi A, Amandeep G, Pankaj B, Anis H. Systemic Sclerosis (CREST Syndrome). 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613625/>.
- Rueda B, Gourh P, Broen J, Agarwal SK, Simeon C, Ortego-Centeno N, et al. BANK1 functional variants are associated with susceptibility to diffuse systemic sclerosis in caucasian. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(4) : 700-5.
- Saigusa R, Asano Y, Taniguchi T, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, Sato S. Multifaceted contribution of the TLR4-activated IRF5 transcription factor in systemic sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015; 112(49) : 15136–15141.

- Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem.* 2005;280: 17005-12.
- Sierra-Sepúlveda A, Esquinca-González A, Benavides-Suárez SA, Sordo-Lima DE, Caballero-Islas AE, Cabral-Castañeda AR & Rodríguez-Reyna TS. Systemic Sclerosis Pathogenesis and Emerging Therapies, beyond the Fibroblast. *BioMed Research International.* 2019;1–15.
- Sibia J. Classification, physiopathologie et pronostic. Systemic scleroderma: classification, pathogenesis and prognostic factors. *La Lettre du Rhumatologue.* 2004 - n° 299.
- Solans R, Bosch JA, Esteban I, Vilardell M. Systemic sclerosis developing in association with the use of interferon alpha therapy for chronic viral hepatitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22 : 625–8.
- Stock CJW & Renzoni EA. Genetic predictors of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: a review of recent literature. *European Journal of Human Genetics.* 2018;26(6) : 765–777.
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature.* 2005; 434:243-9.
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2008 ; 26 : 535-84.
- Valim V, Assis LSS, Simões MFJ, Trevisani VFM, Pucinelli MLC, Andrade LEC. Correlation between serum E-selectin levels and panoramic nailfold capilla-roscopy in systemic sclerosis. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(9):1423–7.
- Van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2014; 370(5):433–43.
- Vancheeswaran R, Black CM. Alpha interferon-2a (Roferon-A) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Br J Rheumatol : a pilot study.* 1992,. 31 :683–9.
- Walker UA, Saketkoo LA & Distler O. Haematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis. *RMD Open.* 2018; 4(1).
- Wang J, Yi L, Guo X et al. Association of the IRF5 SNP rs2004640 with systemic sclerosis in Han Chinese. *Int J Immunopathol Pharmacol,* 2014; 27(4): 635-8.

- Wang J, Assassi S, Guo G, Tu W, Wu W, Yang L, et al. Clinical and serological features of systemic sclerosis in a Chinese cohort. *Clin Rheumatol*. 2013; 32(5) : 617-21.
- Wang YY, Wang Q, Sun XH, Liu RZ, Shu Y, Kanekura T, et al. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2014;171(1):39-47.
- Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2006;54(7):2271-9.
- Weihrauch D, Krolkowski JG, Jones DW, Zaman T, Bamkole O, Struve J, Pillai S, Pagel PS, Lohr NL, Pritchard KA. An IRF5 Decoy Peptide Reduces Myocardial Inflammation. *PLoS One*. 2016;6 :11(4).
- Xu Y, Wang W, Tian MD, Liu JBD, Yang R. Polymorphisms in STAT4 and IRF5 increase the risk of systemic sclerosis: a meta-analysis. *International Journal of Dermatology*. 2015; 55, 408–416.
- Zhao W, Yue X, Liu K, Zheng J, Huang R, Zou J, Riemekasten G, Petersen F, Yu X. The status of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis is associated with IRF5, STAT4. *Rheumatology international*. 2017; 37 (8): 1303-1310.

Annexes

Annexe 1

Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé a consisté en :

- Micropipettes (1µl, 10µl, 100µl et 1000µl).
- Tubes secs pour prélever le sérum.
- Tubes avec anticoagulant (EDTA).
- Vortex.
- Microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Automate pour immunofluorimétrie en flux (Luminex™).
- Cônes pour récupérer l'ADN (Eppendorf).
- Embouts jetables pour micropipette (avec et sans filtre).
- Éprouvettes en verre.
- Bêchers.
- TaqMAN (7500, Applied Biosystems™).
- TaqMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™).
- Plaque à 96 puits pour Ta

Annexe 2

MODE OPÉRATOIRE

1. Lyse des Globules Rouges

Préparer une solution de lyse des globules rouges (SLR) composée de :

- EDTA : 10 ml, 0,5 M PH 8
- Tris : 5 ml, 1 M PH 8
- Eau distillée stérile : 500 ml

Ajouter de la SLR, au prélèvement de sang total de 10 à 15 ml, de telle sorte qu'on complète à 45 ml.

Agiter, énergiquement, puis mettre à – 20°C, pendant 20 mn. Ce choc thermique va fragiliser la paroi des globules rouges.

Centrifuger, pendant 10 mn, à 4000 tours/mn à + 4°C.

Jeter le surnageant et refaire l'opération jusqu'à l'obtention d'un culot de globules blanc clair (2 à 3 lavages sont suffisants).

2. Lyse des Globules Blancs

Préparer la solution de lyse des globules blancs SLB composée de :

- EDTA : 5 ml, 0,5 M PH 8
- Tris : 5 ml, 1 M PH 8
- Eau distillée stérile : 500 ml

Re-suspendre le culot de globules blancs dans 3 ml de SLB.

Ajouter 35 µl de protéinase K (300 µl/ml).

Ajouter 600 µl de SDS à 10%.

Incuber le mélange à 37°C, pendant une nuit.

3. Extraction de l'ADN par « Salting Out »

a. Précipitation de l'ADN

- Ajouter 300 µl de NaCl 3M.
- Ajouter de l'éthanol 100% glacial (conservé à -20°C) : 2 volumes pour 1.
- Mélanger, doucement, par retournement, jusqu'à l'apparition de la méduse d'ADN (l'ADN étant insoluble dans l'alcool).
- Récupérer la méduse d'ADN, à l'aide d'une pipette Pasteur.
- La laisser sécher, pendant 24 h, à température

b. Re-Suspension et conservation de l'ADN

- Casser le bout de la pipette Pasteur portant la méduse séchée, dans un tube Eppendorf contenant 500 µl de solution TE (Tris EDTA) 10.1 composée de 100

µl d'EDTA, 0,5 ml de Tris dans 500 ml d'eau distillée.

- Mettre le tube Eppendorf sous agitation douce pendant 24 à 48 h à température ambiante.

- Conserver le tube à +4°C.

4. Dosage de l'ADN extrait

Ce dosage s'effectue, par spectrophotométrie, l'absorption à 260 nm (λ).

En outre, il est indispensable de mesurer l'absorption à 280 nm (λ)

permettant d'estimer une éventuelle contamination de l'extrait d'ADN par des protéines ou de l'ARN, en calculant le rapport DO 260/280.

a. Protocole

- Dilution au 1/100 : 10µl ADN+ 990 µl tris EDTA (TE) (photos 6)
- Lire l'absorption à 260/280 nm par spectrophotométrie et déterminer la concentration d'ADN.

b. Interprétation des résultats

- Une solution d'ADN doit avoir un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,2.
- Si ce rapport est :
 - Inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par des protéines.
 - Supérieur à 2,2 : il est contaminé par de l'ARN.

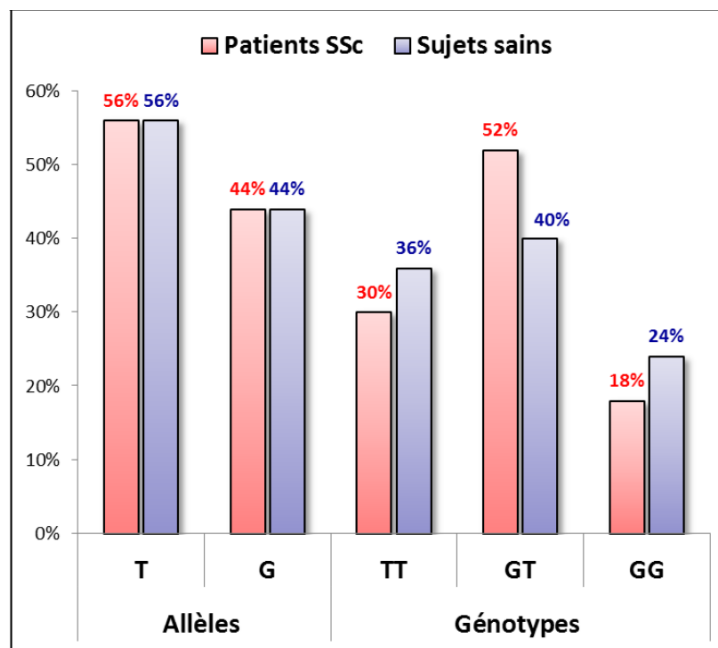
Annexe 3

Figure 16. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients SSc vs. Sujets sains.

Annexe4

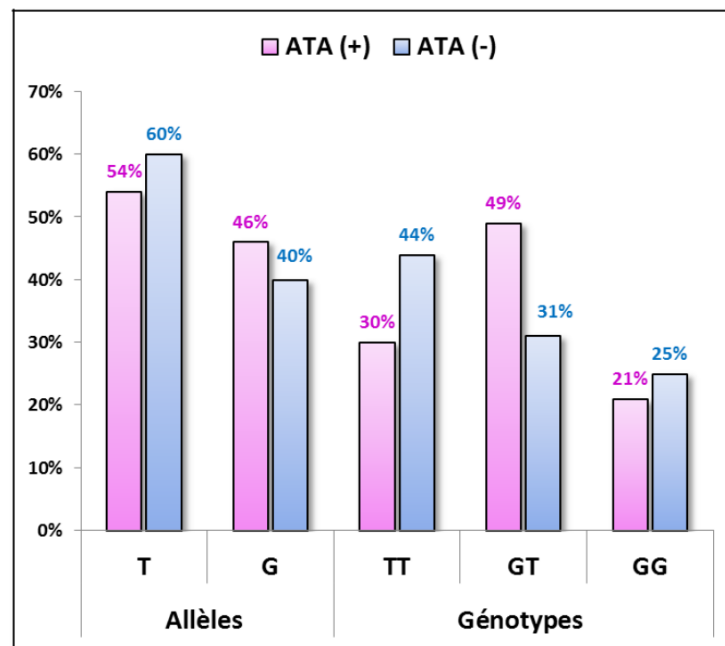


Figure 17. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients ATA (+) vs. ATA (-).

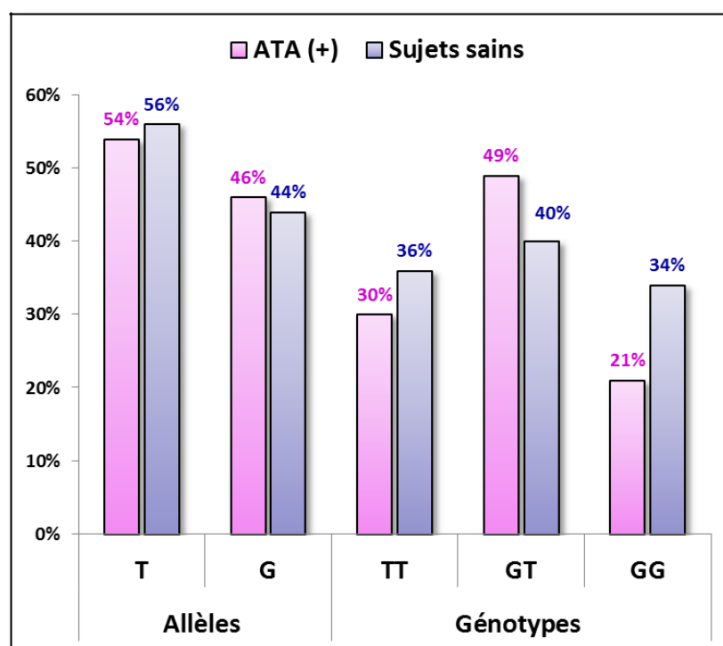


Figure 18. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients ATA (+) vs. Sujets sains.

Annexe 5

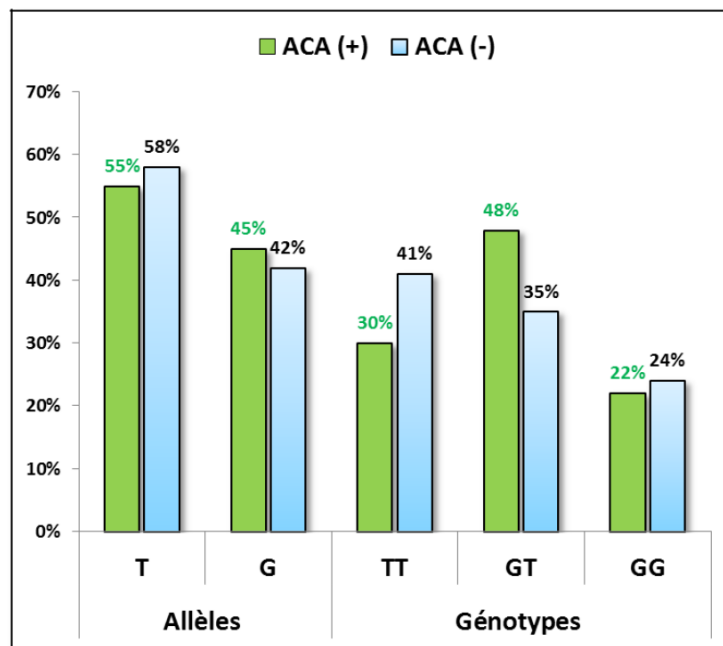


Figure 19. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients ACA (+) vs. ACA (-).

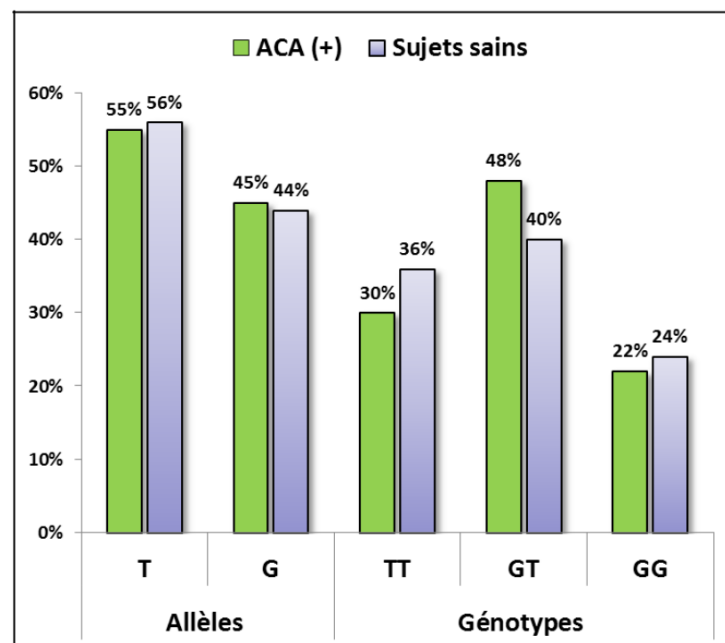


Figure 20. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients ACA (+) vs. Sujets sains.

Annexe 6

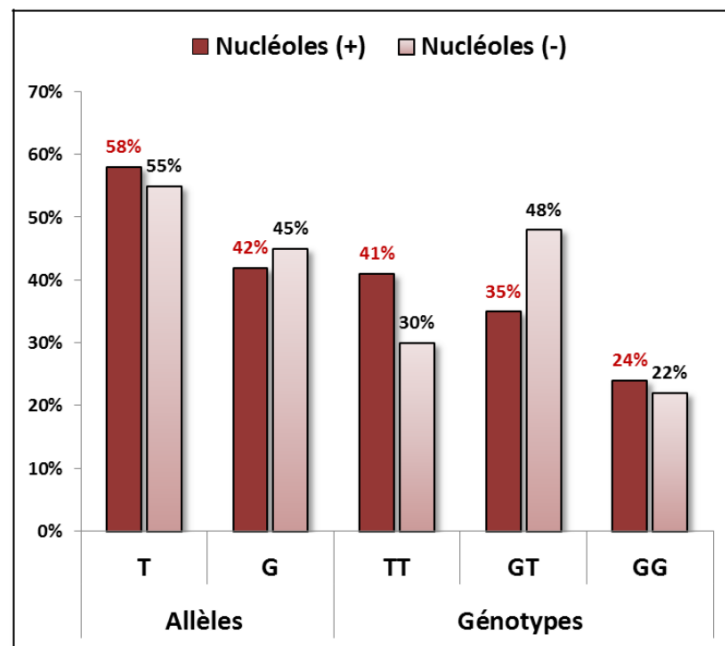


Figure 21. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients anti-nucléoles (+) vs. (-).

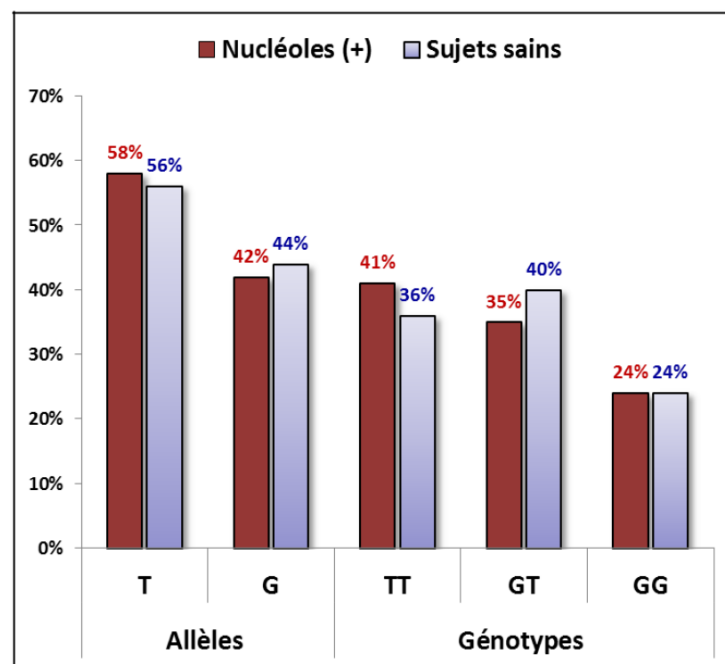


Figure 22. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients anti-nucléoles (+) vs. Sujets sains

Annexe 7

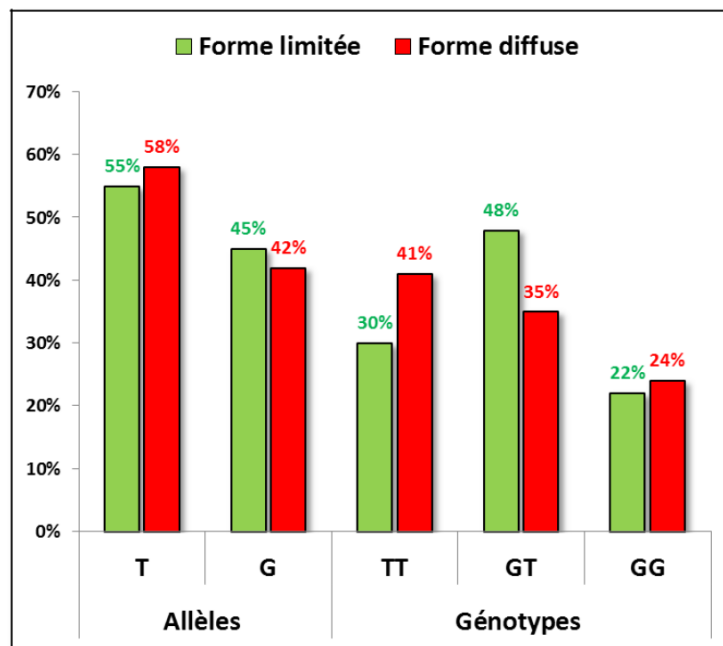


Figure 23. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients atteints de forme limitée vs. Diffuse.

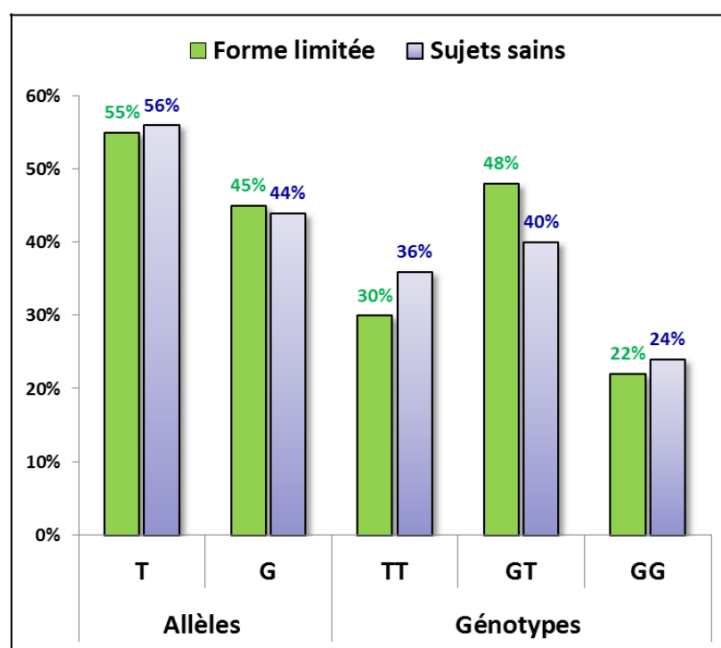


Figure 24. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients atteints de forme limitée vs. Sujets sains.

Annexe 8

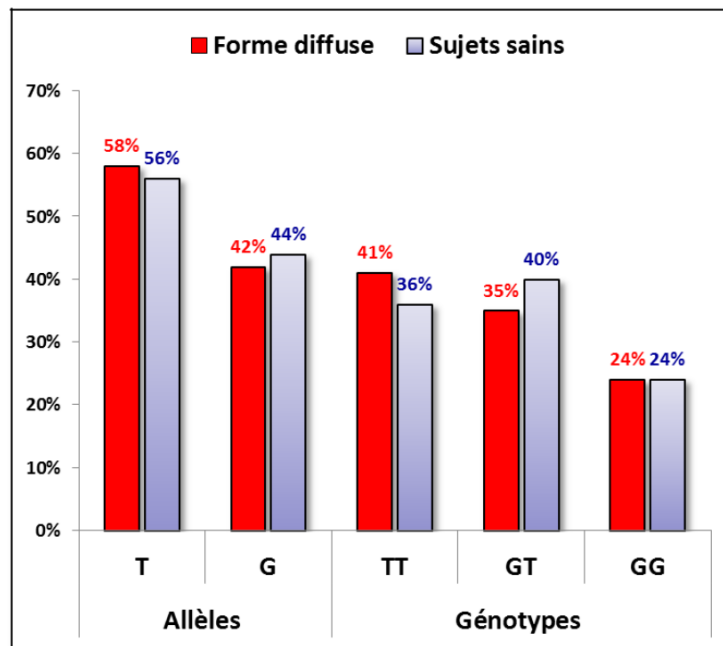


Figure 25. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP IRF5 rs2004640 (-3835 G/T) chez les patients atteints de forme diffuse vs. Sujets sains.