

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET
BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences
Biologiques

Option : Biosignalisation cellulaire et moléculaire, immunologie

THEME

**Fréquences alleliques et génotypiques du polymorphisme des gènes PADI4
et PTPN22, chez une population algérienne saine.**

Présenté par : **BENAOUICHA Radhia**

Soutenu le devant le jury :

Mme Benmensor	MAA	USDB	Présidente
Mme Aissani R	MAA	USDB	Examinatrice
Mr Benyahya N	MAA	USDB	Examineur
Mlle Allam I	Assistance	CHU Beni-Messous	Promotrice
Mr Bessaad A	MCB	USDB	Co-promoteur

2012/2013

Remerciements

Je tiens en premier lieu de remercier Dieu le tout puissant de m'avoir aidé et donné du courage au cours de mon cursus afin d'arriver jusque-là.

Je remercie de manière particulière le professeur Djidjik R. de m'avoir accepté dans son service et me donnait la chance de faire partie de sa charmante et professionnelle équipe, de pouvoir acquérir beaucoup de choses à travers ce stage, que Dieu le préserve du mal.

Je tiens à remercier vivement Mlle Allam I. d'avoir bien voulu accepter de diriger ce mémoire malgré ses obligations professionnelles et le temps qu'elle m'avait consacré qui lui manquait beaucoup .

Sans oublier, Mr Bessad A. d'avoir bien voulu co-dirigé ce travail et de m'avoir guidé et éclairé sur le droit chemin par ses conseils les plus utiles durant la préparation de ce mémoire.

Je remercie d'une manière particulière ma collègue de stage Sihem de m'avoir accompagné et assisté tout au long de notre stage et je lui souhaite une bonne chance et bonne réussite.

Je tiens à remercier mes parents et mes amies et sans oublier mon grand père de m'avoir aidé et encourager .

Je tiens à remercier Mme Ayadi R qui m'a fait l'honneur et le privilège de présider le jury et de juger ce modeste travail, ainsi que Mme Aissani R et Mr Benyahia pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je tiens en fin à remercier tout le personnel du laboratoire central de biologie de CHU Beni Messous particulièrement Soraya, Soumia, Sanaa, Yasmine et Ismail et tous ce qui m'on aidé de près ou de loin à réaliser ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail de mon profond intérieur à :

Mes plus chers parents, mon grand père, jeunes sœurs et particulièrement mes tantes et mes oncles.

Toutes mes amies et exceptionnellement Chafia , Cherifa, Ferial, et Ikram .

La charmante et professionnelle équipe du CTS de Blida à leurs tête Mr Chergui, et laboratoire central de biologie de CHU Beni Messous et à leur tête Dr Cherguelaine et tous ce qui ont participé à la réussite de ce mémoire d'une manière directe ou indirecte, que Dieu les protègent du mal.

Hommage

Dans de pareilles circonstances, pleines de joie et gaîté , je tiens à rendre un vibrant hommage et une pensée particulière à travers ce mémoire de fin d'études à ma grand mère décédée l'an dernier, car je n'oublierai à jamais ses prières, son insistance et parfois elle me servait comme un stimulant dans des périodes les plus difficiles dans mon cursus, et elle tenait jalousement à ce que je réussisse mes études.

Je profite de cette chaleureuse occasion, de prier Dieu le tout puissant éternellement et sans répit de l'accueillir et de l'héberger dans son vaste paradis.

Grand mère, repose en paix, je viens de réussir...

Résumé

Les Polymorphismes de nucléotide unique (SNP) des gènes PADI4(rs2210340) et PTPN22 (rs2476601) sont décrits comme associés à une augmentation du risque pour le développement de plusieurs maladies auto-immunes (MAI) .

Notre travail a porté sur une population de 253 sujets algériens sains indemnes de toute pathologie inflammatoire et rhumatismale avec un sexe ration 1F :1H et une moyenne d'âge de 35ans.

Une étude sérologique qui consiste à la recherche de facteurs rhumatoïdes (FR) ainsi que la mesure de la vitesse de sédimentation (VS) ont été faite, suivie d'une étude génétique qui consiste à extraire l'ADN génomique par la technique de Salting out afin de déterminer les fréquences allélique et génotypique du polymorphisme des gènes PADI4 et PTPN22 en utilisant la PCR en temps réel.

Les résultats de notre étude ont montré que tous les sujets de notre série avaient un facteur rhumatoïde négatif (FR-) et une vitesse de sédimentation (VS) inférieur à 30mm .Les fréquences alléliques de gène PADI4 sont caractérisées par une dominance de l'allèle T (56%) contrairement au gène PTPN22 qui est caractérisé par une dominance de l'allèle C (94%), tandis que les fréquences génotypiques de gène PADI4 (CC :17.78% ,CT :51.38%,TT :30.84%) présentent une dominance de génotype hétérozygote CT contrairement au gène PTPN22 (CC :98.33% ,CT :10.27%,TT :0.85%) qui présent une dominance de génotype homozygote CC.

Notre travail nous permet d'avoir une idée sur les fréquences alléliques et génotypiques pour ces deux gènes chez la population Algérienne.

Mots clés : SNP ,gène PADI4, gène PTPN22, fréquences alléliques, fréquences génotypiques, PCR en temps réel.

Summary

The single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes PADI4 (rs2210340) and PTPN22 (rs2476601) are described as being associated with an increased risk for the development of several autoimmune diseases

Our work has focused on a population of 253 healthy Algerian subjects free of any inflammatory rheumatic disease and with a sex ration 1F: 1H and an average age of 35 years.

A serological study that is in search of rheumatoid factor (RF) and the measurement of erythrocyte sedimentation rate (ESR) were made, followed by a genetic study of extracting genomic DNA by the technique of Salting out to determine the allelic and genotypic frequencies of polymorphisms PADI4 and PTPN22 genes using real-time PCR.

The results of our study showed that all the subjects in our series had a negative rheumatoid factor (RF-) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) to 30mm lower. The allele frequencies of PADI4 gene are characterized by a dominant allele T (56%) unlike the PTPN22 gene, which is characterized by a dominance of the C allele (94%), while the genotype frequencies of PADI4 gene (CC: 17.78%, CT: 51.38%, TT: 30.84%) have dominance of heterozygous genotype CT unlike the PTPN22 gene (CC: 98.33%, CT: 10.27% TT: 0.85%) that this dominance of homozygous CC.

Our work allows us to have an idea about the allelic and genotypic frequencies for these two genes in the Algerian population.

key words: SNP, PADI4 gene, PTPN22 gene, allele frequencies, genotypic frequencies, Real-time PCR

الملخص

تم وصف الأشكال المتعددة للتركيبات النووية المنفردة من الجينات PADI4 (rs2210340) و PTPN22 (rs2476601) باعتبارهم مرتبطين بزيادة الخطر لتطوير العديد من أمراض المناعة الذاتية.

وقد ركز عملنا على 253 حالة صحية جزائرية خالية من أي مرض التهابي وروماتيزي مع الجنس التميمونية F1:H1 ويبلغ متوسط أعمارهم 35 عاما.

تم القيام بالدراسة المصلية التي تعمل على البحث عن عامل الروماتويد (RF) وقياس سرعة الترسيب ، تليها دراسة وراثية تتمثل في استخراج الحمض النووي الجيني بواسطة تقنية التلميح لتحديد الترددات أليلية و الوراثة من الأشكال للجينات PADI4 و PTPN22 باستخدام PCR في الوقت الحقيقي.

أظهرت نتائج دراستنا أن كل الحالات ي سلسلة لدينا كان لها عامل الروماتويد سلبي (RF-) وسرعة الترسيب أقل من 30mm وتتميز الترددات أليل من الجينات PADI4 من قبل هيمنة الأليل (56 %T) وعلى النقيض من PTPN22 الجين يتميز هيمنة أليل (94 %C)، في حين أن الترددات التركيب الوراثي من PADI4 الجين (CC: 17.78%، CT: 51.38%، TT: 30.84%) أظهرت هيمنة النمط الوراثي متخالف CT على عكس الجين (CC: PTPN22 98.33%، CT: 10.27%، TT: 0.85%) أن هذه الهيمنة من CC متماثلة للواقع .

يسمح عملنا هذا بتكوين فكرة عن الترددات أليلية و الوراثة لهذان الجينان عند الجزائريين .

الكلمات الرئيسية: SNP, الجين PADI4, الجين PTPN22, ترددات الأليل, ترددات النمط الجيني، في الوقت الحقيقي PCR

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Localisation chromosomique du gène PADI4	5
Figure 2 :	La réaction de désimination ou citrullination	6
Figure 3 :	Localisation de SNP étudié de gène PADI4	7
Figure 4 :	Les auto-anticorps anti-protéines citrullinées caractéristiques de la PR	8
Figure 5 :	Localisation chromosomique du gène PTPN22	8
Figure 6 :	Les mécanismes proposés par LYP codée par le gène PTPN22 qui affecte l'activation des lymphocytes T	9
Figure 7 :	Mécanisme proposé par laquelle CTLA-4 peut utiliser LYP/Grb2 pour inhiber l'activation des cellules T	10
Figure 8 :	Localisation de SNP étudié du gène PTPN22	11
Figure 9 :	Le résultat obtenu après la lyse Des globules rouges	16
Figure 10 :	Les étapes de la lyse des blancs	17
Figure 11 :	Les étapes de précipitation des protéines au Na CL6M	17
Figure 12 :	L'ADN récupéré sur pipette	18
Figure 13 :	Représentation schématique de la sonde Taqman	20
Figure 14 :	schémas récapitulatif de principe de la PCR –RT pour les trois génotypes étudié	21
Figure 15 :	Le suivi en temps réel d'une réaction PC	22
Figure 16 :	Interprétation des résultats de PCR-RT –Génotypage	23
Figure 17 :	Schéma récapitulatif de différentes méthodes utilisées au cours de notre étude	23
Figure 18 :	Répartition de la population selon le sexe	24
Figure 19 :	: Histogramme représentant la répartition de la population selon les tranches d'âge	25
Figure 20 :	Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié	25
Figure 21 :	Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 chez les femmes et les hommes.	26

Figure 22 :	Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié	27
Figure 23 :	Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 chez les femmes de même que chez les hommes.	27
Figure 24 :	Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié	28
Figure 25 :	Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 chez les femmes et les hommes	28
Figure 26 :	Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié	29
Figure 27 :	: Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 chez les femmes et les hommes	29
Figure 28 :	Lecture de la vitesse de sédimentation (VS).	Annexe II
Figure 29 :	Matériel utilisé au cours des testes de détection de Facteurs Rhumatoïdes(FR)	Annexe II
Figure 30 :	Lecture de résultat de la technique d'agglutination Waaler-Rose.	Annexe II

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Taux de concordance entre jumeaux mono-et dizygote pour certaines (MAI)	3
Tableau II :	Principaux facteurs de susceptibilité génétiques HLA dans le déterminisme de certaines maladies auto-immunes (MAI)	3
Tableau III :	Principaux facteurs de susceptibilité génétiques non HLA dans le déterminisme de certaines maladies auto-immune	4
Tableau IV	amorces, sondes et références SNP des deux polymorphismes utilisées au cours de notre travail.	20
Tableau V :	Caractéristiques épidémiologiques de notre population	27
Tableau VI :	Distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme de gène PADI4 dans différents pays	35
Tableau VII :	Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de gène PTPN22 dans différents pays	36
Tableau VIII :	Répartition de la population selon les tranches d'âge	Annexe III
Tableau IX :	Distribution des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié	Annexe III
Tableau X :	Comparaison des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 selon le sexe.	Annexe III
Tableau XI :	Distribution des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié	Annexe III
Tableau XII :	Comparaison des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 selon le sexe	Annexe III
Tableau XIII :	Distribution des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié	Annexe III
Tableau XIV :	Comparaison des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 selon le sexe	Annexe III
Tableau XV :	Distribution des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié	Annexe III
Tableau XVI :	Comparaison des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 selon le sexe	Annexe III

Tableau XVII : Association entre les deux gènes PADI4 et PTPN22

Annexe III

Table des matières

Introduction	1
I. Généralités	
I.1. Système immunitaire	2
I.2. Maladies Auto-immunes	2
I.3. L'immunogénétique	4
II. Gènes étudié	5
II.1. Peptidyl-Arginine Désiminase de type4 (PADI4)	5
a. Gène	5
b. Protéine PAD4 (Peptidyl-Arginine Désiminase 4)	5
c. Rôle physiologique de PAD4	5
d. Rôle pathologique de PAD4	7
II.2. Protein tyrosin Phosphatase non-receptor 22 (<i>PTPN22</i>)	8
a. Gène	8
b. Protein LYP (Lymphoid-specific Phosphatase)	9
c. LYP un régulateur négatif le lymphocyte T	9
d. <i>PTPN22</i> dans les maladies auto-immunes	10
Matériel et Méthodes	
I. Matériel	12
I.1. Matériel biologique	12
I.2. Matériel non biologique	13
II. Méthodes	13
II.1. Vitesse de sédimentation (VS)	13
II.2. Facteur rhumatoïde (FR)	14
II.3. L'extraction d'ADN par Salting Out	15
II.4. PCR en temps réel (PCR-RT)	18

II.5. Outils statistiques	23
---------------------------	----

Résultats

I .Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée	24
---------------------------------------------------------------	----

II .Vitesse de Sédimentation (VS)	25
-----------------------------------	----

III Facteurs Rhumatoïdes (FR)	25
-------------------------------	----

IV. Fréquences génotypiques de polymorphisme des gènes étudiés	25
----------------------------------------------------------------	----

V. Fréquences allelique de polymorphisme des gènes étudiés	28
------------------------------------------------------------	----

DISCUSSION	31
-------------------	-----------

CONCLUSION	35
-------------------	-----------

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

Introduction

I. Généralités

I.1. Système immunitaire

I .2. Maladies Auto-immunes

I .3. L'immunogénétique

II . Gènes étudié

II .1.Peptidyl-Arginine Désiminase de type4 (PADI4)

II .1.a. Gène

II .1.b. Protéine PAD4 (Peptidyl-Arginine Désiminase 4)

II .1.C. Rôle physiologique

II .1.d. Rôle pathologique de PAD4

II .2.Protein tyrosin Phosphatase non-receptor 22 (*PTPN22*)

II .2.a. Gène

II .2.b. Protein LYP (Lymphoid-specific Phosphatase)

II .2.c. LYP un régulateur négatif le lymphocyte T

II .2.d.PTPN22 dans les maladies auto-immune

Matériel et Méthodes

I . Matériel

I.1. Matériel biologique

I.2. Matériel non biologique

II. Méthodes

II.1. Vitesse de sédimentation (VS)

II .2. Facteur rhumatoïde (FR)

II.3. L'extraction d'ADN par Salting Out

II.4 . PCR en temps réel (PCR-RT)

II.5 . Outils statistiques

Résultats

I. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

II . Vitesse de Sédimentation (VS)

III Facteurs Rhumatoïdes (FR)

IV. Fréquences allélique de polymorphisme des gènes étudiés

V. Fréquences génotypiques de polymorphisme des gènes étudiés

DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

Introduction

Les maladies auto-immunes (MAI) sont des affections multifactorielles, font intervenir des facteurs environnementaux (agents infectieux, tabac ..) et génétiques (gènes Human Leukocyt Antigen -HLA- et gènes non HLA (**Weill et Batteux,2003**)).

Parmi les gènes non HLA qui sont impliqués dans le développement des MAI, nous avons étudié les gènes suivant : PADI4 et PTPN22.

Le gène PADI4 code pour l'enzyme Peptidyl-Arginine Désiminase 4 (PAD4) responsable de la transformation post-traductionnelle de l'arginine en citrulline (**Suzuki et al., 2003**), tandis que le gène PTPN22 code pour une tyrosine phosphatase appelé Lymphoid-specific Phosphatase (LYP) qui est un régulateur négatif du lymphocyte T(**Cloutier et al.,1996**).

Des études immunogénétiques montrent que le Polymorphisme de nucléotide unique (SNP) du gène PADI4 situé en position 1p35-36 est caractérisé par le changement de nucléotide cytosine -C- par thymine -T-, ainsi le SNP du gène PTPN22 situé en position 1p13.2 est caractérisé par un changement de nucléotide cytosine -C- par une thymine -T- ce qui implique la substitution d'une arginine (R) par un tryptophane (W). Ils sont décrits comme associés à plusieurs maladies auto-immunes (MAI) (**Yoichiro et al.,2007, Steer et al.,2005**).

L'objectif de notre travail fut d'abord de déterminer les fréquences alleliques et génotypiques du polymorphisme des gènes PADI4 et PTPN22 chez une population algérienne saine, ensuite de comparer nos résultats de fréquences à ceux d'autres pays.

Matériel et Méthodes

Notre stage s'est fait au niveau de l'Unité d'Immunologie au sein du Laboratoire Central de biologie de CHU Beni Messous d'Alger.

La durée de notre travail expérimental était de 02 mois et demis couvrant la période allant de fin février jusqu'au début du mois de mai 2013.

Notre thème consiste à une étude des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphismes des gènes PADI4 et PTPN22,chez une population algérienne saine.

Population étudiée

Notre étude a porté sur une population saine de 253 sujets indemne de toutes maladies inflammatoires ou rhumatismales, issus de familles indépendantes et de différente willaya d'Algérie. Les sujets témoins ont été recrutés au Centre de transfusion sanguine (CTS) de CHU Beni Messous et de Blida.

Chaque personne répond à un questionnaire incluant l'âge, le sexe, la région d'origine, les antécédents personnels et familiaux (fiche de renseignements mise en annexe I).

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.a. Echantillon

Les échantillons étaient prélevés a partir du sang total par ponction veineuse dans :

- ✓ 2 tubes avec anticoagulant EDTA pour l'étude génétique (l'extraction d'ADN).
- ✓ 1 tube avec anticoagulant citraté pour mesure la vitesse de sédimentation (VS) afin de confirmer que cette personne ne présente aucune inflammation.
- ✓ Et 1 tube sec sans anticoagulant pour la récupération du sérum pour la recherche du facteur rhumatoïde.

I.2. Matériel non biologique

Equipement et appareillage

Les différents appareils utilisés sont mis en annexe II.

II. Méthodes

II.1. Vitesse de sédimentation (VS)

La vitesse de sédimentation (VS), est une mesure non spécifique de l'inflammation, utilisée fréquemment comme test médical d'orientation.

II.1.a. Principe

Le sang est recueilli sur anticoagulant et laissé au repos sédimente : il y a d'abord formation de piles ou rouleaux d'hématies, puis tassement progressif de ces piles laissant surnager une couche de plasma. La mesure de la hauteur de plasma surnageant, au bout d'un temps déterminé, traduit la vitesse de sédimentation des hématies (Lessing et al., 2007).

II.1.b. Technique

Tube de Westergreen est un tube standardisé, au diamètre exactement calibré (2,5 mm de diamètre intérieur), gradué en millimètres de 0 à 200, ouvert au deux extrémités. Un support spécial permet de le positionner verticalement.

II.1.c. Réalisation

Le sang recueilli à la veine est mélangé à l'anticoagulant, citrate à raison de 4 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant. L'homogénéisation du mélange est réalisée en aspirant et refoulant plusieurs fois celui-ci dans le tube, sans dépasser la graduation 0. Le tube est aussitôt placé sur un support spécial, en position rigoureusement verticale.

II.1.d. Lecture

Au bout d'une heure, la hauteur de la colonne de plasma exprimée en millimètres, représente la vitesse de sédimentation. Une vitesse supérieur de 30mm est considérée comme accélérée et traduit la présence d'un état inflammatoire (figure mise en annexe).

II .2. Facteur rhumatoïde (FR)

Le facteur rhumatoïde (FR) est un auto-anticorps dirigé contre les gammaglobulines humaines le plus souvent de la classe des IgM. Il peut être aussi de type IgA, IgG.

Les facteurs rhumatoïdes sont présent au cours de nombreuses pathologies rhumatologiques (PR) et infectieuses (**Weill et Batteux, 2003**).

II.2.a. Détection des facteurs rhumatoïdes

Au cours de notre travail nous avons utilisés deux méthodes sérologiques classiques complémentaires pour la détection de facteurs rhumatoïdes, Le test au latex et La réaction de Waaler-Rose.

- ✓ **Le test au latex** : c'est une réaction d'agglutination utilisant des molécules de Latex recouvertes de gamma immunoglobulines (IgG) humaines spécialement purifiées.
- ✓ **La réaction de Waaler-Rose** : c'est une réaction d'hémagglutination utilisant Des hématies de mouton ou d'homme recouvertes gamma immunoglobulines (IgG) de lapin (**Weill et Batteux, 2003**)

II.2.b. Matériel utilisé

Le matériel utilisé est mis dans l'annexe II

II.2.c. Mode opératoire

Déposer au niveau de chaque puits de la lame et de façon successive une goutte (50 µl) de contrôle positif, une goutte de contrôle négatif et une goutte de sérum à tester, ensuite rajouter au niveau de chaque dépôt une goutte de réactif Latex de couleur blanche.

A l'aide d'une tige, homogénéiser le mélange, en laissant la lame reposée pendant 2 min, ensuite en appliquant doucement et uniformément un mouvement de rotation à la lame.

Tout en respectant les mêmes étapes du processus précédent et au lieu de déposer le réactif Latex, on le remplace par le réactif Waaler Rose de couleur marron.

II.2.d. Lecture

✓ Latex

Au bout d'une minute de temps, si la réaction est positive, elle se traduira par une agglutination, si c'est le contraire la suspension restera homogène.

✓ Waaler Rose

La couleur du réactif nous incite à procéder au renversement de la plaque.

Si la réaction est positive, elle se traduira par une hémagglutination des globules rouges, si c'est le contraire la suspension restera homogène (figure mise en annexe II)

II.3. L'extraction d'ADN par Salting Out

II.3.a Principe

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

II.3.b Mode opératoire

L'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de notre information génétique, se fait à partir de sang total.

La récupération d'ADN se fait à partir des globules blancs du sang. En effet, se sont les seules cellules sanguines contenant un noyau car les autres cellules, les globules rouges, sont des cellules anucléés.

Pour récupérer cet ADN, nous avons suivi les étapes suivantes

➤ **Lyse des globules rouges**

En effet, 40 ml de la solution de lyse des globules rouges (SLR) 1 fois concentré sont ajoutés au 10 ml de sang prélevé sur EDTA dans un tube de 50 ml, suivi d'une agitation vigoureuse, puis les tubes sont plongés dans la glace pendant 30 minutes pour accélérer la lyse, cette solution a une concentration inférieure à celle intracellulaire et, par un phénomène de pression osmotique, va permettre la pénétration d'eau dans le dans les hématies, et cette entrée massive d'eau aboutira à son éclatement.

Une centrifugation à 2500 t/ mn pendant 10 minutes a 4°C permet de recueillir un culot blanc contenant les globules blancs, après élimination du surnageant ; On resuspend a nouveau le culot dans 40 ml de SLR 1 fois concentré pour l'élimination de toute trace d'hémoglobine.

Une deuxième centrifugation analogue à la précédente permet d'obtenir la fraction cellulaire désirée après élimination du surnageant ; le culot constitué uniquement de globules blancs est conservé à -20°C.



Figure 9 : Le résultat obtenu après la lyse des globules rouges.

➤ **Lyse des globules blancs**

Pour libérer l'ADN contenu dans les globules blancs, il faut détruire leurs membranes plasmiques et nucléaires.

Donc, on ajoute au culot ajoute 3ml de solution de lyse des globules blancs (SLB) pour lyser les membranes plasmiques et nucléaires.

Pour digérer les protéines ; 35 μ l de protéinase K sont rajoutés, puis pour désagréger la bicouche phospholipidique, 300 μ l de détergent dodécylsulfate de sodium (SDS)10% sont rajoutés dans le milieu. L'ensemble est vortexé puis incubé durant une nuit à 37°C.

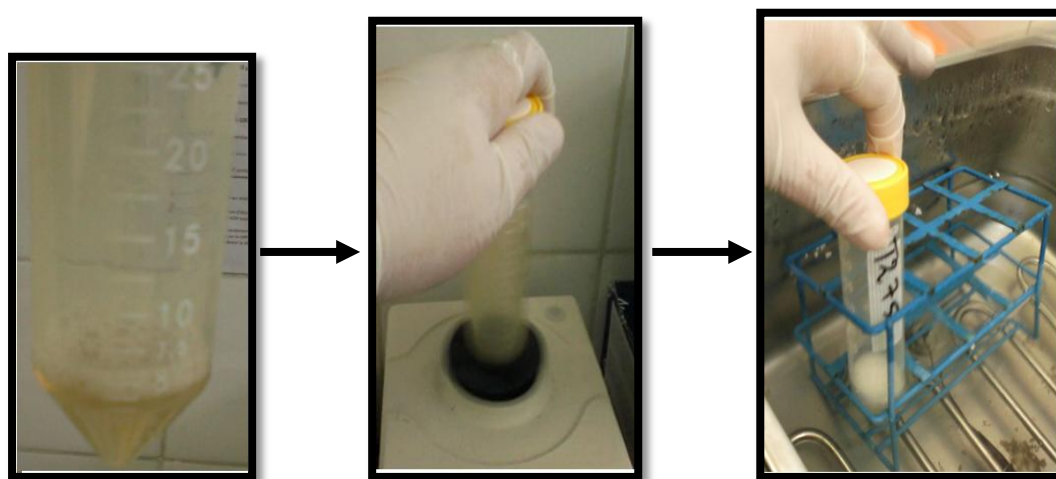


Figure 10 : Les étapes de la lyse des blancs.

➤ **Précipitation des protéines au Na Cl 6M**

Pour chaque tube, on rajoute 1ml Na Cl 6M, et on agite vigoureusement pendant 15 secondes ; une mousse blanche se forme. Une centrifugation à 3500 t/mn pendant 15 mn à 4°C permet l'élimination totale des protéines et les sels résiduels au fond du tube, alors que l'ADN est à l'état soluble dans la phase aqueuse.

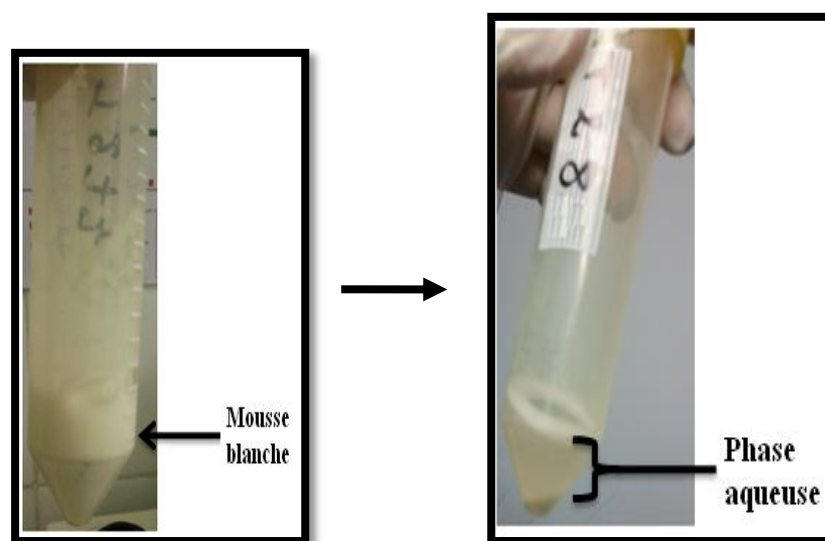


Figure 11 : Les étapes de précipitation des protéines au Na CL6M .

➤ **Précipitation à l'éthanol de l'ADN**

Elle permet l'obtention d'ADN pur et concentré, elle se fait suite à un additionnement de 2 volumes d'éthanol 100% par volume d'échantillon. L'éthanol permet de déshydrater l'ADN, ce qui entraîne l'agrégation des molécules en de multiples brins, qui forment alors une masse de fibres visibles appelées la méduse.

On récupère l'ADN sur une pipette pasteur boullée, puis on effectue un lavage dans 250 μ l d'éthanol 70%, on laisse les pipette séchées, puis on resuspend la méduse dans 250 μ l de Tampon d'élution, conserver l'ensemble a +4°C.

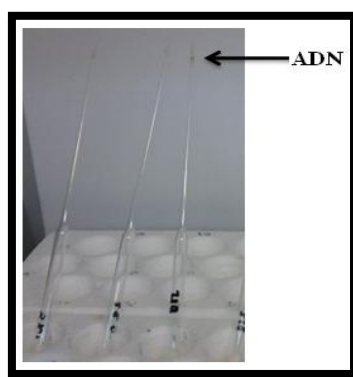


Figure 12 : L'ADN récupéré sur pipette.

- Détail des différentes étapes et du mode de préparation des solutions sont mis en annexe II.

II.4. PCR en temps réel (PCR-RT)

Notre étude des polymorphismes des gènes PADI4 et PTPN22 a été faite à l'aide de la PCR en temps réel génotypage qui présente de nombreux avantages :

- ✓ Elimination des problèmes de **cross-contamination** occasionnés par la manipulation des amplifias.
- ✓ Gain du **temps** nécessaire pour obtenir les résultats des expériences, avec gain de réactifs et d'effort.
- ✓ Augmentation de la **sensibilité** de la PCR.
- ✓ Quantification **absolue/précise** de la cible dans l'échantillon.

II.4.a. Principe

La RT-PCR utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en point final mais tout au long de l'amplification.

La RT-PCR fait appel à l'utilisation de sondes fluorescentes qui subissent une réorganisation conformationnelle lorsqu'elles se lient à leur cible et émettent une fluorescence dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons.

II.4.b. Mode opératoire

✓ Préparation du mélange réactionnel

Nous avons mis dans un eppendorf

-99 µl d'eau distillée stérile

- 132 µl de master mix (dNTP , Taq polymérase, tampon, Magnésium et PH =8.2)

-6,6 µl de référence SNP (rs)spécifique pour chaque polymorphisme (PADI4 rs 2240340, PTPN22 rs 2476601), à la fin le tout est vortexé .

✓ Préparation de la plaque

La plaque est composée de 96 puits, en déposant dans chaque puits 4.5 µl de mélange réactionnel spécifique pour chaque polymorphisme, puis 1.5 d'ADN dilué sauf les puits de témoin négatif pour lesquels on dépose 0.5 µl d'eau distillée stérile.

La plaque est scellée par un film adhésif optique transparent afin d'éviter l'évaporation du mélange.

Après avoir déposé la plaque dans l'appareil, le temps consacré à l'obtention du résultat est de 90 minutes.

II.4.c. Les sondes TaqMan

Les sondes d'hydrolyse TaqMan ont la particularité d'avoir des séquences de 13 à 19 bases, elles sont hydrolysées par l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase lorsqu'elles sont fixées sur leur cible.

Les amorces de la PCR encadrent le SNP d'intérêt, et deux sondes allèle spécifiques sont utilisées (l'une spécifique de l'allèle sauvage et l'autre de l'allèle muté). Chaque sonde est marquée à son extrémité 5' par un fluorophore émetteur (le reporter) différent qui permet d'identifier l'allèle présent. A leur extrémité 3', les sondes sont liées à un fluorophore suppresseur (le quencher).

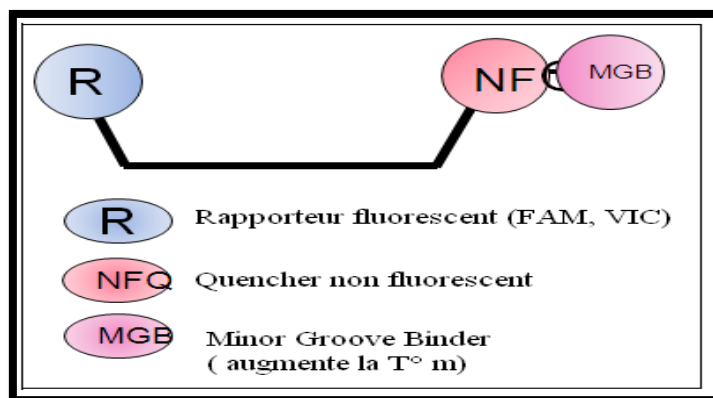


Figure 13 : Représentation schématique de la sonde Taqman (originale)

Tableau IV : amorces, sondes et références SNP des deux polymorphismes utilisées au cours de notre travail.

	Le gène PADI4 (rs 2240340)	Le gène PTPN22 (rs 2476601)
Amorce sens	5`7CCG TGG AGG AGG GAT GTC TT3`	5`GAT AAT GTT GCT TCA ACG GAA TTT3`
Amorce anti sens	5`AGG AGC GTT TGG GTG AGT GG3`	5`CCA TCC CAC ACT TTA TTT TAT ACT3`
Sonde pour l'allèle T	VIC	VIC
Sonde pour l'allèle C	FAM	FAM
Référence SNP (rs)	ACAAGGAGATTTCTGAAATCCC ATCA (A /G) GTAAGAGGAGAG GTTGGTGAGGGTC	AACCACAATAAATGATTCA GGTGTCC (A/G) TACAGGAAGTGGAGGGGG GTTTCA

Au cours de la phase d'hybridation de la PCR, la sonde se lie à sa séquence cible si celle-ci est présente.

Pendant la phase d'élongation, lorsque la Taq polymérase atteint la sonde hybridée, son activité exonucléasique 5'-3' va déplacer la sonde et la dégrader. Cela entraîne un éloignement des fluorophores émetteur et suppresseur et, donc, une augmentation de la fluorescence du fluorophore rapporteur qui est mesurée à chaque cycle de PCR.

Comme l'activité exonucléasique de la Taq polymérase est double brin spécifique, elle ne va pas hydrolyser les sondes non fixées. Cela implique que les conditions de température de l'étape de polymérisation soient ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. Les sondes doivent avoir une température de dissociation (TM) de 5 à 10 °C plus élevée que les amorces, permettant ainsi une étape unique d'hybridation / polymérisation à +60°C qui assure l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. A cette température, l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase est maximale.

A la fin de la PCR, la détection de fluorescence d'un fluorophore émetteur permet de dire que la sonde qui portait ce fluorophore est dégradée par la Taq polymérase au cours de cycle d'amplification, et donc permet d'identifier l'allèle présent. Dans le cas d'un échantillon homozygote, une seule fluorescence est détectée, alors que, dans le cas d'un hétérozygote, deux fluorescences seront détectées (Chiaroni et al, 2011).

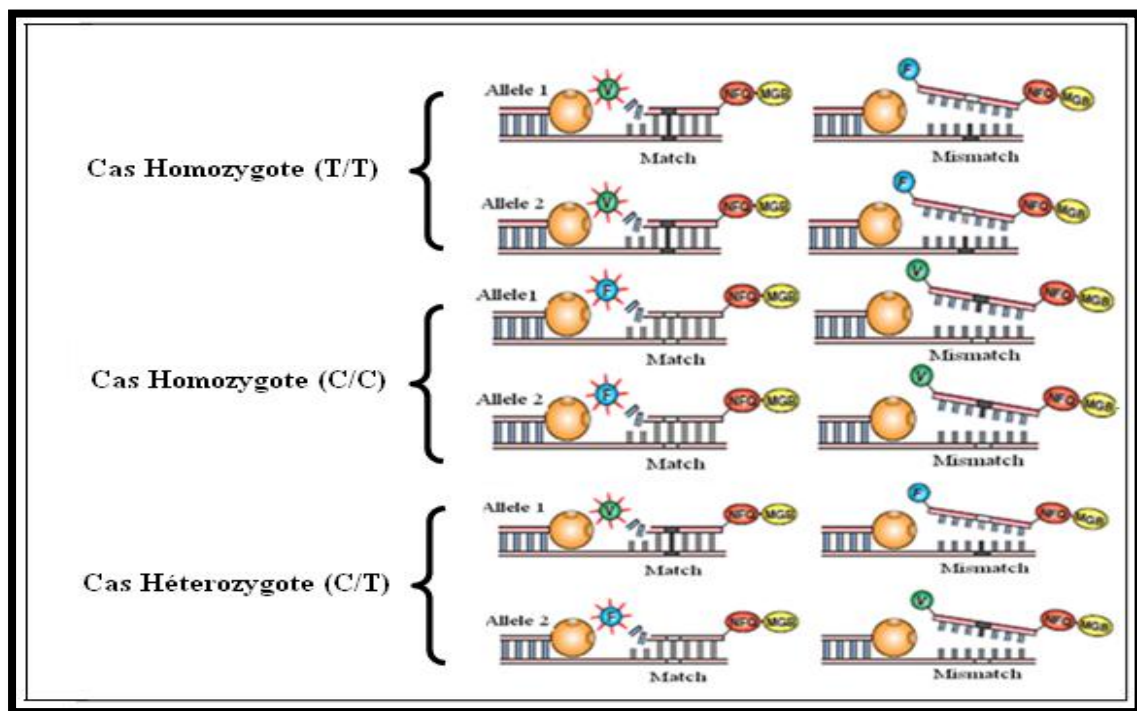


Figure 14: schémas récapitulatif de principe de la PCR –RT pour les trois génotypes étudié (Originale).

II.4.d. Courbe d'amplification

Le résultat de la PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbe sigmoïde.

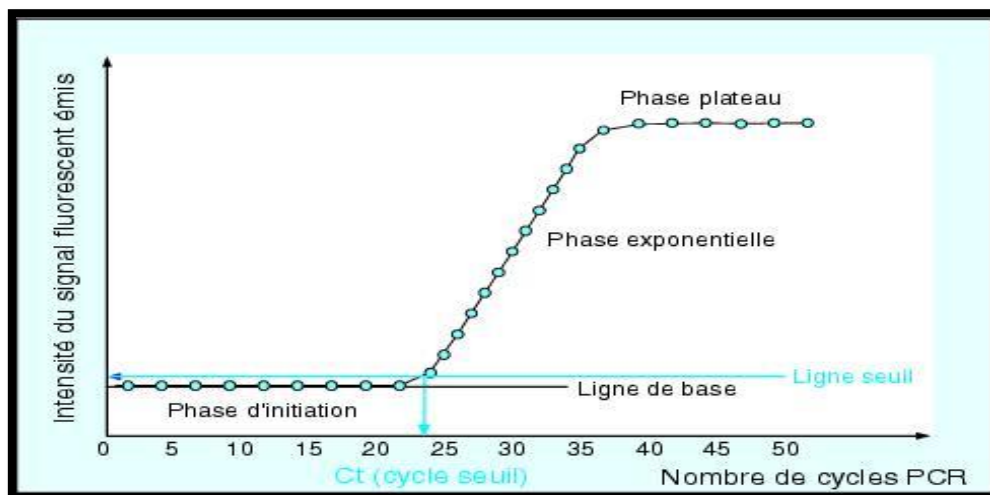


Figure15: Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (Tse et Capeau,2003).

La cinétique de la réaction PCR met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau.

Elle est construite à partir de plusieurs points d'amplification.

Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR versus l'intensité de fluorescence émise.

- **La ligne seuil** correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle.
- Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit **le cycle seuil (Ct)** qui Correspond au signal seuil de l'augmentation significative de la fluorescence. Il est le point de départ de la phase exponentielle, et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.(Tse et Capeau,2003).

II.4.e. Interprétation des résultats

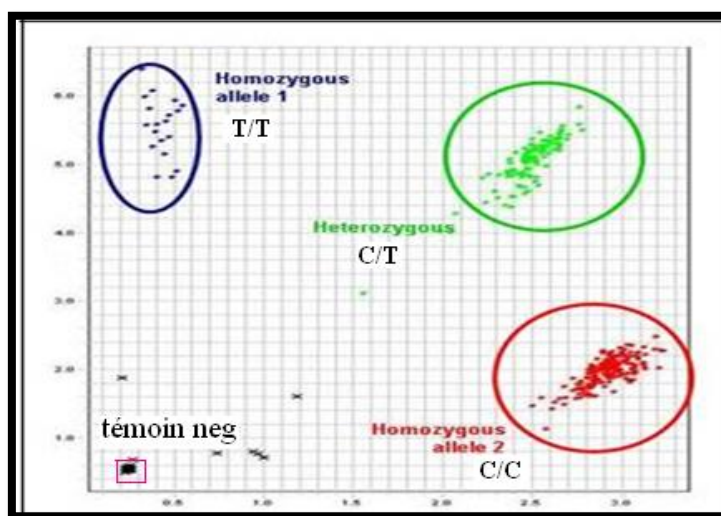


Figure 16 : Interprétation des résultats de PCR-RT –Génotypage-

II.5. Outil statistique

La comparaison des fréquences génotypiques et alléliques entre les sujets de sexe masculin et féminin a été faite en utilisant le logiciel Compare 2.

Le P a été calculé et est considéré comme significatif s’il est inférieur de 0.05.

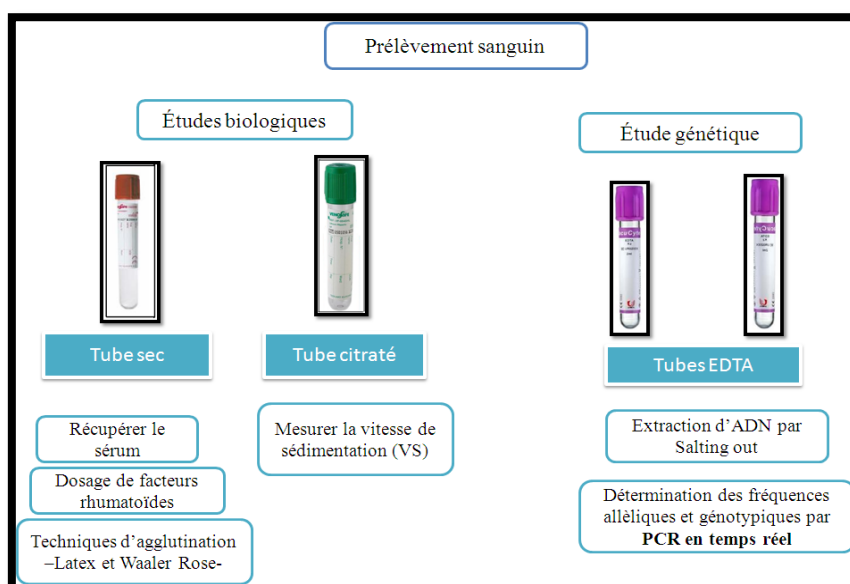


Figure 17 : Schéma récapitulatif de différentes méthodes utilisées au cours de notre étude (Originale).

Discussion

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme des gènes PADI4 et PTPN22 chez une population algérienne saine. En raison de leur implication dans les maladies auto-immunes, inflammatoires et rhumatismales.

Notre étude a porté sur 253 sujets sains avec un sexe ratio 1F : 1H et une moyenne d'âge de 35 ans, tous indemnes de toute pathologie inflammatoire ou rhumatismale, ceci a été confirmé par la mesure de la vitesse de sédimentation (VS) et les techniques d'agglutination (Latex et Waaler-Rose) afin de chercher la présence de facteurs rhumatoïdes (FR).

Le premier des deux gènes étudiés est le gène peptidyl arginine désiminase de type IV (PADI4) qui appartient à la famille des gènes PADI, ce dernier code pour une enzyme peptidyl arginine désiminase 4 (PAD4) responsable de la transformation post-traductionnelle de l'arginine en citrulline (**Zhou et Menard., 2009**).

L'une des caractéristiques de ce gène, est la présence du Polymorphisme de nucléotide unique (SNP) au niveau de l'intron 3 en position 94 aboutissant à une substitution de nucléotide : remplacement de cytosine (C) par thymine (T) (**Yoichiro et al., 2007**).

Notre étude a montré, en effet une fréquence de l'allèle T et de l'allèle C respectivement de **56% et 43%** (voir figure 18). Celle-ci est similaire à celles retrouvées dans des études chinoise (**T : 57.9%, C : 42.1%**) (**Chen et al., 2010**) et tunisienne (**T : 49%, C : 51%**) (**Wendling et al., 2012**). Contrairement aux études faites en Egypte où la fréquence est moins importante pour l'allèle T **35.6%** (**Abd-Allah et al. 2011**).

Il faut noter que l'allèle muté T du gène PADI4 a été décrit comme étant associé à plusieurs maladies auto-immunes (MAI) telles que la Polyarthrite Rhumatoïde (PR), Sclérose en plaque (SEP) et le psoriasis (**Alenius et al. 2006**).

L'analyse des fréquences génotypiques du polymorphisme PADI4 a été faite afin de chercher la présence des génotypes homozygote et hétérozygote, en effet cette dernière a montré une prédominance du génotype hétérozygote **CT (51.38%)** suivie

du génotype homozygote **TT (30.84%)** et à la fin le génotype homozygote **CC (17.78%)** (Voir figure 22).

Ces résultats pourraient être en faveur d'une susceptibilité aux maladies auto-immune en cas d'association avec d'autres facteurs génétiques et environnementaux.

Notre attention a été attirée par la similitude que nous avons constaté entre les résultats de notre population et ceux d'une cohorte chinoise, sachant que les deux populations sont relativement éloignées ethniquement et géographiquement. On s'attendait plus à une similitude avec la population maghrébine. Ces résultats sont légèrement différents pour la population tunisienne. En plus de ces dernières nous avons aussi constaté une non similitude avec des études faites au Japon, Espagne, Suède et en Amérique du nord où la distribution des trois génotypes est caractérisée par une prédominance de génotype hétérozygote CT suivie de génotype homozygote CC et à la fin le génotype homozygote TT.

Tableau VI : Distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme de gène PADI4 dans différents pays.

Pays	Nombre totale	Génotypes			Références
		CC(%)	CT(%)	TT(%)	
Chine	439	18%	48.3%	33.7%	(Chen et al., 2010)
Tunisie	120	28%	46.4%	25.6%	(Wendling et al., 2012)
Japon	646	39%	47.21%	13.79%	(Ikari et al., 2005)
Espagne	394	33%	48%	19%	(Martinez et al., 2005)
Suède	858	36.37%	45.80%	17.83%	(Plenge et al., 2005)
Amérique du nord	784	37%	45%	18%	(Plenge et al., 2005)

L'utilisation du logiciel « Compare2 » montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux sexes pour les trois génotypes étudiés (voir figure 23).

Le deuxième gène que nous avons étudié, est le gène Protein tyrosin Phosphatase non-receptor de type 22 (PTPN22) qui code pour la protéine tyrosine phosphate non-receptor type 22 LYP (Lymphoid-specific Phosphatase) (Cloutier et al., 1996). Cette

dernière est un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T via la voie de signalisation du T-cell antigen receptor (TCR) (Begovich et al., 2004).

En effet, un polymorphisme dans ce gène cause une dérégulation dans la voie de signalisation des lymphocytes T ce qui pourrait conduire à l'apparition des lymphocytes T hyper réactifs par conséquent des lymphocyte B producteurs des auto anticorps (Zikherman et al.,2009) aboutissants à l'apparition des maladies auto-immunes (MAI) telles que la Polyarthrite Rhumatoïde (PR) (Steer et al.,2005) , le lupus érythémateux disséminé (LES) (Kyogoku et al.,2004), et maladie de Basedowe (Velaga et al.,2004).

Notre étude a montré une fréquence de l'allèle T et de l'allèle C respectivement 6% et 94% (figure 20) qui rejoint les études tunisiennes(C : 99%) (Mejri et al., 2007), mexicaines(C : 98%) (Magdalena et al., 2012) et suédoises (C : 88%) (Juneblad et al., 2011). On suppose que, le fait que le gène PTPN22 soit spécifique des lignées lymphoïdes, pourrait expliquer la faible fréquence de l'allèle muté T.

La distribution des trois génotypes (CC : 89.33%, CT : 10.27%, TT : 0.4%) révèle une prédominance de génotype homozygote CC (voir figure 24).

Des études faites dans les populations tunisienne, mexicaine et japonaise pourraient confirmer nos résultats, contrairement aux études faites dans les populations françaises, et suédoise ou la fréquence de génotype homozygote CC est moins importante.

Tableau VII : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de gène PTPN22 dans différents pays.

Pays	Nombre Total	Génotypes			Références
		CC(%)	CT(%)	TT(%)	
Mexique	347	96%	4%	0%	(Magdalena et al 2012)
Tunisie	100	98%	2%	0%	(Gelbert et al 2007)
Japon	453	99.55%	0.55%	0%	(Ikari et al 2006)
France	319	79.62%	1.88%	18.5%	(Michou et al 2006)
Suède	725	77.7%	21%	1.3%	(Juneblad et al 2011)

L'utilisation du logiciel « Compare2 » montre qu'il existe une différence significative entre les deux sexes pour les génotypes homozygote CC et hétérozygote CT, contrairement au génotype homozygote TT (voir figure 25).

Notre étude a révélé que la présence de 7.50% de la population générale est porteuse d'une association des deux mutations alléliques pour les deux gènes PADI4 et PTPN22 en même temps (voir tableau XVI en annexe III). On se demande si cette population présentait une susceptibilité plus importante pour les maladies auto-immunes (MAI) ce qui veut dire l'implication des deux gènes à la fois pourrait être signe de susceptibilité élevée d'évolution vers la maladie, ce qui serait souhaitable de compléter avec d'autres travaux.

Résultats

I. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

Notre étude a porté sur une série de **253** témoins comprenant 117 femmes et 136 hommes, avec une moyenne d'âge de **35 ans**. La répartition selon le sexe, montre une légère prédominance masculine : mais avec un sexe Ratio **1F :1H**

Tableau V : Caractéristiques épidémiologiques de notre population

Caractéristiques épidémiologiques de notre population	n =253	
Sex-ratio (F : M)	1F :1H	
Moyenne d'âge (Années)	Moyenne	Intervalle
	35±10.66	17-56

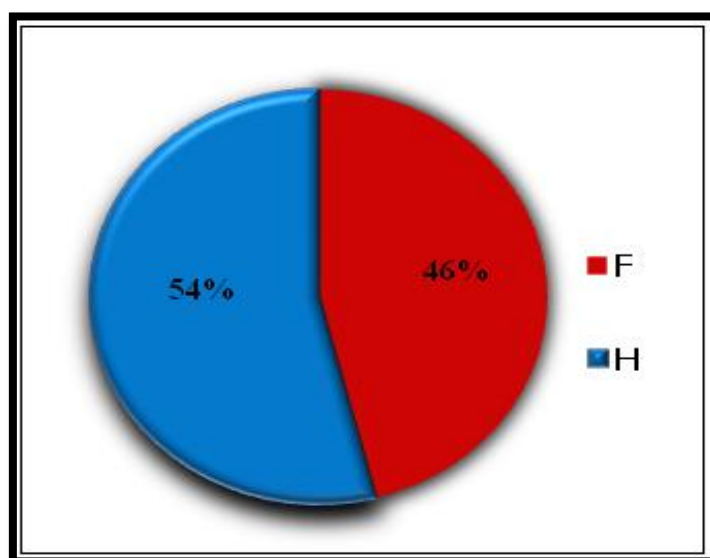


Figure 18 : Répartition de la population selon le sexe.

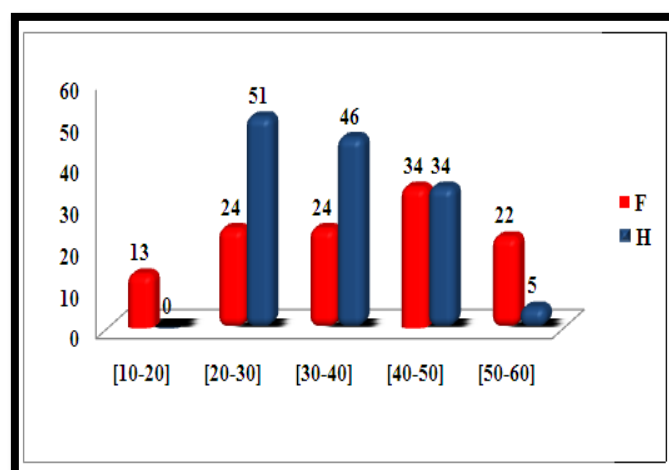


Figure 19 : Histogramme représentant la répartition de la population selon les tranches d'âge.

II. Vitesse de Sédimentation (VS)

N'a été considéré comme sujets sains que les personnes ayant une VS **inferieur de 30mm/H**

III. Facteurs Rhumatoïdes (FR)

Le facteur rhumatoïde (FR) à une fréquence de **1- 2%** dans la population normale. Il été retrouvé chez deux personnes de notre série.

Les deux sujets avec FR+ ont été exclus de l'étude pour plus de précaution.

IV. Fréquences génotypiques de polymorphisme des gènes étudiés

- Le gène PADI4

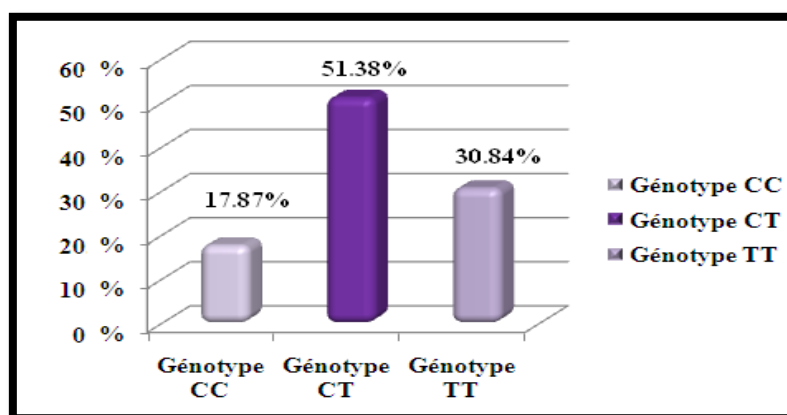


Figure 20 : Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié.

Notre étude sur les fréquences génotypiques du polymorphisme de gène PADI4 montre la distribution suivante :

51.38% de génotype hétérozygote CT, 30.84% de génotype homozygote TT et 17.78% de génotype homozygote CC.

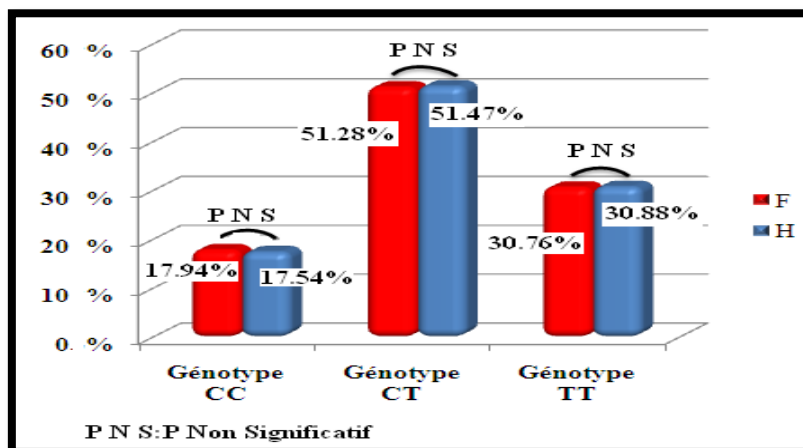


Figure 21 : Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 chez les femmes et les hommes.

Dans notre étude, la distribution des trois génotypes (CC, CT, TT) entre les deux sexes est comme suit :

-51.28% de génotype hétérozygote CT chez les femmes tandis que 51.47% chez les hommes, 30.76% de génotype homozygote TT tandis que 30.88% chez les hommes, et 17.94% de génotype homozygote CC chez les femmes tandis que 17.54% chez les hommes. Avec absence de différence significative entre les deux sexes pour les trois génotypes.

- Le gène PTPN22

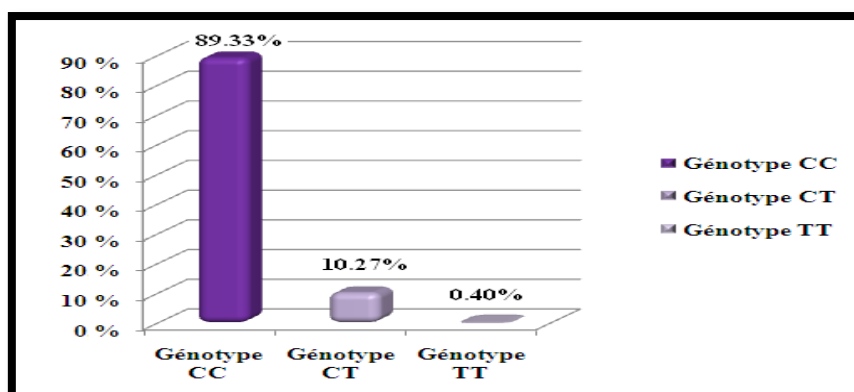


Figure 22 : Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié.

Notre étude sur les fréquences génotypiques du polymorphisme de gène PTPN22 montre la distribution suivante:

89.33% de génotype homozygote CC, 10.27% de génotype hétérozygote CT et 0.40% de génotype homozygote TT.

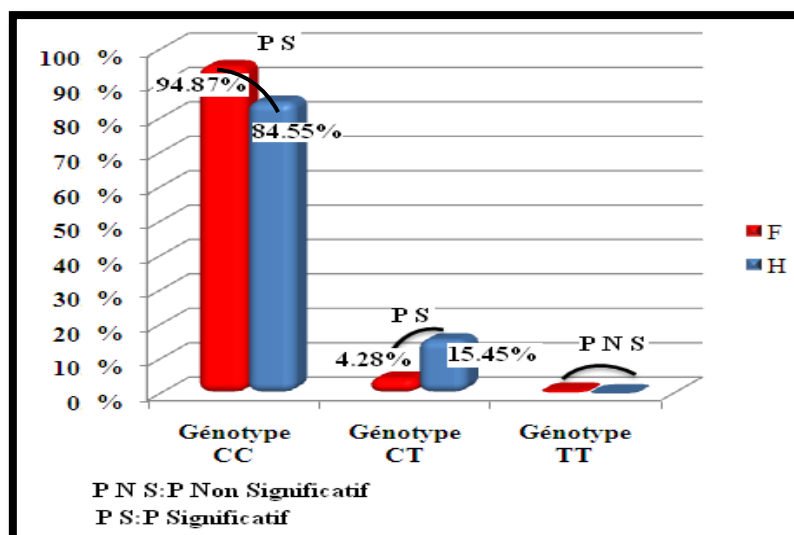


Figure 23 : Histogramme représentant les fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 chez les femmes de même que chez les hommes.

Dans notre étude la distribution des trois génotypes (CC,CT,TT) entre les deux sexes est comme suite :

94.87% de génotype hétérozygote CC chez les femmes tandis que 84.55% chez les hommes, 4.28% de génotype hétérozygote CT tandis que 15.45% chez les hommes, et 0.85% de génotype homozygote TT chez les femmes tandis qu'il est absent chez les hommes. Avec différence significative entre les deux sexes pour les génotypes homozygote CC et hétérozygote CT.

V. Fréquences allélique de polymorphisme des gènes étudiés

- Le gène PADI4

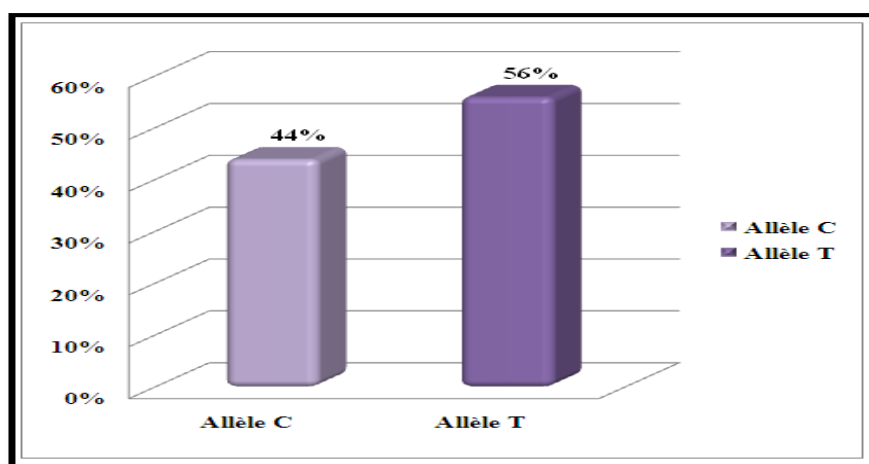


Figure 24 : Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié.

Notre étude sur les fréquences alléliques du polymorphisme de gène PADI4 montre une dominance de l'allèle muté T (56%).

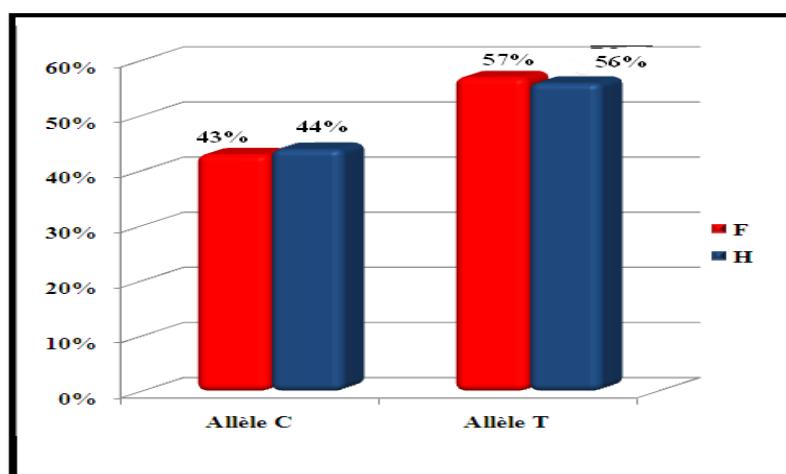


Figure 25 : Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 chez les femmes et les hommes.

Dans notre étude, la distribution des deux allèles (C et T) est comme suit :

-43% de l'allèle sauvage C chez les femmes tandis que 44% chez les hommes.

-57% de l'allèle muté T chez les femmes tandis que 56% chez les hommes.

- **Le gène PTPN22**

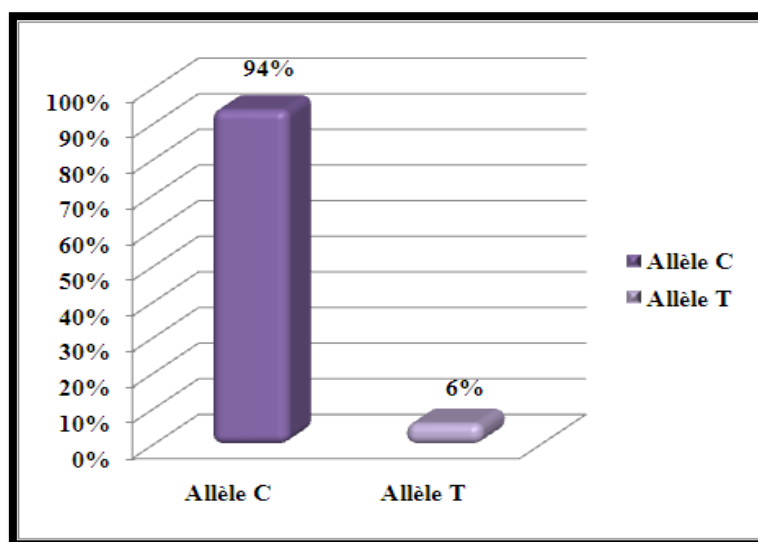


Figure 26 : Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié

Notre étude sur les fréquences alléliques du polymorphisme de gène PTPN22 montre une dominance de l'allèle sauvage C (94%).

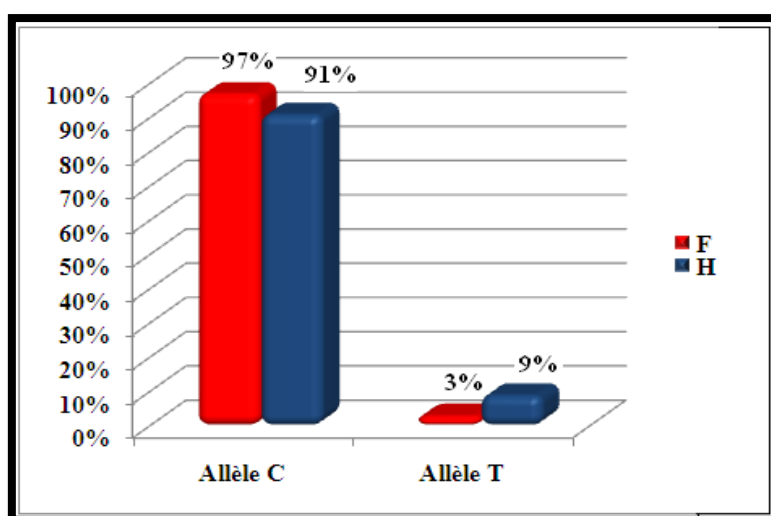


Figure 27 : Histogramme représentant les fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 chez les femmes et les hommes.

Dans notre étude, la distribution des deux allèles (C et T) est comme suit :

-97% de l'allèle sauvage C chez les femmes tandis que 91% chez les hommes.

-3% de l'allèle muté T chez les femmes tandis que 9% chez les hommes.

Conclusion

Nos résultats sur les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme des gènes PADI4 et PTPN22 ont montré une dominance du polymorphisme de gène PADI4, ils présentent un support pour les futures études de type cas- témoins : afin de les comparer aux sujets ayant des maladies auto-immunes (MAI) et à prospecter une éventuelle association génétique de ces gènes avec les maladies auto-immunes.

Notre travail ouvre une porte pour une importante perspective qui consiste à mettre en place un registre international des fréquences alléliques et génotypiques des différents gènes impliqués dans différentes maladies.

RERRERENCES

-A-

- Abd-Allah, S., El-Shal, A., Shalaby S., Pasha,H., Abou El-Saoud, A., El-Najjar ,A., El-Shahawy ,E.,2012. Polymorphismes de PADI4 et de ses haplotypes chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. *Rhumatisme* .79 ,245-250.

-Alenius, G.M., Berglin, E., Rantapaa Dahlqvist, S., 2006.Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation.*Ann Rheum Dis*.65,398–400.

-Allanore, Y., Boileau, C.,2011. Génétique et physiopathologie de la sclérodermie systémique. *Bull. Acad. Natle Méd*.195(1),55-67.

-B-

- Begovich,A.B., Carlton,V., Honigberg ,L., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G.,2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*.75,330-337.

-Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani ,M., MacMurray, J., Meloni, GF., Lucarelli, P., Pellecchia, M., Eisenbarth, G.S., Comings, D., Mustelin, T.,2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* .36,8–337.

-Brand, O., Gough, S., Heward,J.,2005.HLA,CTLA-4and PTPN22.the shared genetic master-key to autoimmunity?. *Molecular Medicine* .7,1-15.

-C-

- Chavanas, S., Mechin, H., Takahara, A., Kawada, R.,Nachat, G.,Serre, M., Simon., 2004. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segmentsand a new human gene, PADI6. *Gene*.330,19-27.

- Chen, R., Wei, Y.,Cai, Q., Duan, S., Lin, J., Fang, M., Lv K., Cheng, N., Sun, S.,2010. PADI4 Gene Polymorphism is not Associated with Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Population. *Clinical immunology*.72,449-453.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Chiaroni, J.,Roubinet, F.,Bailly, P.,Mannessier, L.,Noizat-Pirenne, F.,2011. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext,PP.135-136.

-Cloutier, J.F., Veillette, A.,1996. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J.*15,4909– 4918.

-Cloutier, J. F., Veillette, A.,1999. Cooperative inhibition of t-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med.*189(1),111-21.

-D-E-

-Dieudé,P.,2009. Rhumatismes : environnement et génétique. *Rhumatisme* .76 ,937-943.

-Dieude, P.,2009. Rheumatic diseases: environment and genetics. *Joint Bone Spine.*76,7–602.

-Dieude, P.,Guedj, M., Wipff, J., Avouac, J., Hachulla, E., Diot, E., Granel, B., Sibilia, J.,Cabane, J., Meyer, O., Mouthon, L., Kahan, A., Boileau, C., Allanore, Y.,2008. The PTPN22 620W Allele Confers Susceptibility to Systemic Sclerosis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM.*58,2183–2188.

- Dieudé, P., Karen, D.,2010. Déterminisme des pathologies auto-immunes : facteurs génétiques et environnementaux . *Rhumatisme monographies* .77 ,283-287.

- Encyclopédie Larousse 2013 [enligne].(30.04.2013)

<http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/syst%C3%A8me_immunitaire/60053>

-G-

-Gregersen, P.K., Lee, H.S., Batliwalla, F., Begovich, A.B .,2006. *Semin Immunol.* 18,214–223.

-Ikari, K.,Iwamoto, T., Nakamura, T., Kuwahara, M., Toyama, Y., Tomatsu, T., S., Kamatani, N.,2005.Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *ArthritisRheum.*52,7– 3054.

-I-J-

-Ikari, K., Momohara, S., Inoue, E., Tomatsu, T., Hara, M., Yamanaka, H., Kamatani, N.,2006. Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population. *Rheumatology* . 45,1345–1348.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Juneblad, K., Johansson, M., Rantapaa-Dahlqvist, S., Alenius, G.M.,2011. Association between the PTPN22 +1858 C/T polymorphism and psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy* .(13),1-4.

-K-L-

- Kyogoku, C., Langefeld, C.D., Ortmann, W.A., Lee, A., Selby, S., Carlton, V.E., Chang, M., Ramos, P., Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Novitzke, J., Williams, A.H., Gillett, C., Rodine, P., Graham, R.R., Ardlie, K.G., Gaffney, P.M., Moser, K.L., Petri, M., Begovich, A.B., Gregersen, P.K., Behrens, T.W.,2004. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 504–507.

- Lessing, P.H., Delmenico, S., Klinik, M., Aarau, K.,2007. Une vitesse de sédimentation augmentée. *CABINET*.7,765-769.

- Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., Wang, Y.,2010 .PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* .207,62– 1853.

-Lynn, B., John, C., Muchael, J., Raymond, L.,2004. *Génétique médicale*. Elsevier SAS, PP.223.

-M-

-Mammete, A.,2002. *Virologie medicale*. Presses universitaires de Lyon, PP .200.

- Martinez, A., Valdivia, D., Pascual-Salcedo, J., Ramon Lamas, M., Fernandez-Arquero, A., Balsa, B., Fernandez-Gutierrez, E. G., Urcelay, E.,2005. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatology* . 44,6– 1263.

-Mejri, K., Kallel-Sellami, M., Pettit-Teixeira, E., Abida, O., Mbarek, H., Zitouni, M., Ben Ayed, M., Teixeira, V., Mokni, M., Fazza, B., Tirki, H., Tron, F., Gilbert, D., Masmoudi, H., Cornelis, F., Makni, S.,2007. PTPN22 R620W polymorphism is not associated with pemphigus. *British Journal of Dermatology* .157,1040–1085.

-Michel, M.,2000. *Medecine thérapeutique*. *Lupus* .6(7) ,8-522.

-Michou, L., Lasbleiz, S., Rat, A., Migliorini, P., Balsa, A., Westhovens, R., Barrera, P., Alves, H., Pierlot, C., Glikmans, E., Garnier, S., Garnier, J., Vaz, C., Fernandes, M., Petit-Teixeira, E., Lemaire, I., Pascual-Salcedo, D., Bombardieri, S., Dequeker, J., Radstakel, T., Van Riel, P., van de Putte, L., Lopes-Vaz, A., Prum, B., Bardin, T., Dieude, P., Cornelisa, F.,2006. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis

susceptibility gene and a human autoimmunity gene. MEDICAL SCIENCES .1-6.

-Mordon, S.,2005.Principes et Applications de la Tomographie Cohérence Optique (OCT) en Dermatologie. Kératine .(10) ,11-14.

-P-R-S-

- PADI4 2013[enligne].(02.05.2013) <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PADI4>>

- Perrier, J.,2006.Le dosage des anticorps antiprotéines citrullinées : intérêt pour le diagnostic et le pronostic de la polyarthrite rhumatoïde.150 ,15-20.

-PTPN22 2013[enligne].(04.05.2013) <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTPN22>>

-Raychaudhuri, S., Sandor, C., Stahl, E.A., Freudenberg, J., Lee ; H.S., Jia, X., Alfredsson, L., Padyukov, L., Klareskog, L., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Bae, S.C., Plenge, R.M., Gregersen, P.K.,2012. de Bakker PI: Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. Nat Genet. 44,291-296.

- Robert, M., Plenge., Padyukov, L.,Elaine, F.,Remmers., Purcell, S.,Annette, T., Lee,Elizabeth W., Karlson., Wolfe, F., Daniel, L., Kastner.,Alfredsson, L., Altshuler, D., Peter, K., Gregersen., Klareskog, L., John, D.,2005. Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in 14,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. Genet. 77,1044–1060 .

-Sébahoun, G.,2005.Hématologie clinique et biologique.(2).Arnet,PP.549.

-Smith, Rh.LI.,Warren, R.B., Eyre, S., Ke, X., Young, H.S., Allen, M., Strachan, D., McArdle, W.,Gittins, M.P., Barker, J.N.W.N., Griffiths, C.E.M.,Worthington ,J.,2008. Polymorphisms in the PTPN22 region are associated with psoriasis of early onset. CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATIONS.158(5),962-968.

-Steer, S., Lad, B., Grumley, J.A., Kingsley, G.H., Fisher, S.A.,2005. Association of R602W in a protein tyrosine phosphatase gene with a high risk of rheumatoid arthritis in a British population: evidence for an early onset/disease severity effect. Arthritis Rheum.52,358–60.

- Struyf, S., Noppen, S., Loos, T., Mortier, A., Gouwy, M., Verbeke, H., Huskens ,D., Luangsay, S., Parmentier, M., Geboes, K., Schols, D., Van Damme, J., Proost, P .,2009.Citrullination of CXCL12 differentially reduces CXCR4 and CXCR7

binding with loss of inflammatory and anti-HIV-1 activity via CXCR4. *J Immunol* .182,74–666.

-Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Yamamoto, K., 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*.34,395-402.

(T)

-Tanikawa, C., Ueda, K., Nakagawa, H., Yoshida, N., Nakamura, Y., Matsuda, K., 2009. Regulation of protein citrullination through p53/PADI4 Network in DNA damage response. *Cancer Research*. 69(22), PP. 8761–8769.

- Torres-Carrillo, M., Ruiz-Noa, Y., Martinez-Bonilla, G., Leyva-Torres, S., Torres-Carrillo, N., Palafox-Sanchez, C., Navarro-Hernandez, R., Villalobos, H., Oregón-Romero, E., Muñoz-Valle, J., 2012. The +1858C/T PTPN22 gene polymorphism confers genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population from the Western Mexico. *Immunology Letters* .147 ,41-46.

-Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*.61(3),93-179.

-U-V-

-Urano, Y., Watanabe, K., Sakaki, A., Arase, S., Watanabe, Y., Shigemi, F., Takeda, K., Akiyama, K., Senshu, T., 1990. Immunohistochemical demonstration of peptidylarginine deiminase in human sweat glands. *Am J Dermatopathol*.12,55– 249.

-Velaga, M. R., Wilson, V., Jennings, C. E., Owen, C. J., Herington, S., Donaldson, P. T., Ball, S. G., James, R. A., Quinton, R., Perros, P., Pearce, S. H., 2004. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 89, 5862–5865.

-W-Y-

-Weill, B., Batteux, F., 2003. Immunologie et réactions inflammatoires. *de boeck*. PP .84-111.

-Wendlinga, D., Prati, C., Berthelot, J., Claudepierre, P., Phamd, T., 2012. Lack of association between PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis in the Tunisian population. *79* ,323–334.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yoichiro, T., Hiroshi, I., Aya, S., Kazue ,T.,Katsutoshi, M., Daisuke, H., Fumio, S., Shunji, N.,Natsuo, Y., Toshihito, T., Mitsuo, I.,2007. Replication of reported genetic associations of PADI4, FCRL3,SLC22A4 and RUNX1 genes with rheumatoid arthritis: results of an independent Japanese population and evidence from meta-analysis of East Asian studies.53,163-173.

-Z-

-Zhou, Z., Menard, H.A.,2002. Autoantigenic posttranslational modifications of proteins:does it apply to rheumatoid arthritis ? Curr Opin Rheumatol.14,3–250.

- Zikherman, J., Hermiston, M., Steiner, D., Hasegawa, K., Chan, A., Weiss, A., 2009.PTPN22 deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non autoimmune background. J Immunol.182,106– 4093.

Fiche de renseignements

Date du prélèvement :

Nom : Prénom :

Sexe : Age :

Région d'origine :

❖ Antécédents :

➤ **ATCD personnels :**

Arthralgies : oui non

Maladie auto-immune : oui non Si oui :

Préciser :

➤ **ATCD familiaux :**

Maladie auto-immune : oui non

Polyarthrite rhumatoïde : oui non

Tableau VIII : Répartition de la population selon les tranches d'âge

	[10-20[[20-30[[30-40[[40-50[[50-60[
Nombre T	13	75	70	68	27
F	13	24	24	34	22
H	0	51	46	34	5

Tableau IX : Distribution des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié

	Allèle C n(%)	Allèle T n(%)
Fréquences allélique	221(43%)	287(56%)

Tableau X : Comparaison des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PADI4 selon le sexe.

Allèles		C n(%)	T n(%)
Fréquences allélique	F	102(43%)	132(57%)
	H	119(44%)	155(56%)

Tableau XI: Distribution des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié

Allèles	C n(%)	T n(%)
Fréquences allélique	477(94%)	29(6%)

Tableau XII : Comparaison des Fréquences allélique de polymorphisme de gène PTPN22 selon le sexe.

Allèles		C n(%)	T n(%)
Fréquences allélique	F	227(97%)	7(3%)
	H	250(91%)	22(9%)

Tableau XIII : Distribution des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 dans la population étudié.

Génotypes	CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
Fréquences génotypiques	45(17.78%)	130(51.38%)	78(30.84%)

Tableau XIV : Comparaison des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PADI4 selon le sexe.

Génotypes		CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
Fréquences génotypique	F	21 (17.94%)	60 (51.28%)	36 (30.76%)
	H	24 (17.54%)	70 (51.47%)	42(30.88%)
P		0.950	0.976	0.985

Tableau XV : Distribution des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 dans la population étudié.

Génotype	CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
Fréquence Génotypiques	226(89.33%)	26(10.27%)	1(0.4%)

Tableau XVI : Comparaison des Fréquences Génotypique de polymorphisme de gène PTPN22 selon le sexe.

Génotypes		CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
Fréquences génotypique	F	111 (94.87%)	5 (4.28%)	1 (0.85%)
	H	115 (84.55%)	21(15.45%)	0 (0%)
P		0.008	0.004	0.280

Tableau XVII : Association entre les deux gènes PADI4 et PTPN22

Nombre total (%)	19 (7.50%)
------------------	------------

I. Généralités

I.1. Système immunitaire

Le système immunitaire (SI) est un système biologique constitué d'un ensemble d'organes, tissus, cellules et molécules intervenant dans les réponses immunitaires afin d'assurer une défense contre les agents pathogènes étrangers, tels que les virus, les bactéries, les parasites ou contre certaines molécules « étrangères » toxiques.

Ce système est éduqué de façon à rencontrer les antigènes étrangers et de réagir contre, et des antigènes de soi et de les tolérer (Encyclopédie Larousse, 2013).

I.2. Maladies Auto-immunes

Une maladie auto-immune (MAI) est la conséquence de la rupture de la tolérance vis à vis des antigènes du soi, cette rupture peut être effectuée lors de la sélection thymique périphérique aboutissant à la génération de lymphocytes T auto réactifs délétères pour les tissus cibles porteurs des auto-antigènes spécifiques, ou de lymphocytes B producteurs d'auto-anticorps pathogènes.

Les MAI sont des affections multifactorielles, faisant intervenir **des facteurs environnementaux** (agents infectieux, tabac, facteurs hormonaux,...) chez des sujets qui sont généralement génétiquement prédisposés avec une dysrégulation immunitaire (Weill et Batteux, 2003).

Facteur génétique

Le rôle des facteurs génétiques a été prouvé dans les MAI grâce aux études génétiques faites sur des jumeaux monozygotes et dizygotes, ces études sont fondées sur la comparaison du taux de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes.

- **Taux de concordance** : La proportion de seconds jumeaux atteints quand le premier est malade (Dieudé, 2009).

Tableau I : Taux de concordance entre jumeaux mono-et dizygote pour certaines (MAI) (Michel, 2000).

Maladies Auto-immunes (MAI)	Jumeaux monozygotes	Jumeaux dizygotes
Polyarthrite Rhumatoïde (PR)	12 à 32%	4 à 9%
Lupus érythémateux systémique(LES)	23 à 57%	3 à 10%
Diabète de type1	30 à 54%	0 à 13%

(Michel, 2000)

- **Les gènes « Human Leukocyt Antigen » (HLA)**

Les gènes HLA codent pour des molécules qui appartiennent au système Human Leucocyte Antigen –HLA-. En raison de la propriété de présentation antigénique (antigène d'origine exogène ou endogène) de ces molécules, les gènes HLA ont été associés à l'apparition des MAI (Raychaudhuri et al.,2012)

Tableau II : Principaux facteurs de susceptibilité génétiques HLA dans le déterminisme de certaines maladies auto-immunes(MAI) .

MAI	Gènes HLA	Référence
Polyarthrite Rhumatoïde (PR)	DR4	(Weill et Batteux,2003)
Diabète de type 1	DR3 et DR4	(Weill et Batteux,2003)
Lupus érythémateux systémique (LES)	DR3	(Michel,2000)

- **Les gènes non HLA**

Les gènes HLA à eux seuls n'expliquent pas la survenue de la maladie, d'autres gènes ont été incriminés comme facteurs favorisant le développement chez des sujets génétiquement prédisposés .Ce sont le plus souvent des gènes qui codent pour des molécules qui interviennent dans la physiopathologie des maladies.

Tableau III : Principaux facteurs de susceptibilité génétiques non HLA dans le déterminisme de certaines maladies auto-immune (Dieudé et al.,2010).

MAI	Gènes
Polyarthrite Rhumatoïde (PR)	TRAF1,PTPN22,PADI4,STAT4 ,IRF5 ,
Lupus érythémateux systémique (LES)	PTPN22,BANK1 ,BLK ,IRF5,STAT4
Diabète de type 1	PTPN22 ,CTLA4,CD226
Sclérose En Plaque (SEP)	PADI4

(Dieudé et al.,2010)

I .3. L'immunogénétique

L'étude de la génétique du système immunitaire, désignée par le terme d'**immunogénétique**, a considérablement évolué grâce au développement de nouvel outils de biologie et de recherche , ce qui a permis d'identifier les gènes responsables de la synthèse des substances et molécules qui interviennent dans les défenses immunitaires et anti-tumoral (**Lynn et al.,2004**).

L'un des procédés d'immunogénétique qui a permis d'étudier le lien entre différentes maladie et les gènes en relation est l'étude des « Polymorphisme de nucléotide unique» (SNP) des gènes concernés.

- **Les Polymorphisme de nucléotide unique (SNP)**

Les Polymorphismes de nucléotide unique sont des polymorphismes bi-alléliques correspondant à un changement nucléotidique : la variation nucléotidique est appelée non-synonyme si elle entraîne une modification secondaire de l'acide aminé. Par ailleurs, un SNP est dit fonctionnel si la fonction de la protéine codée résultante en est modifiée (**Allanore et Boileau, 2011**).

Si la plupart du temps ces variations sont silencieuses, ou à l'origine de nos différences morphologiques, elles peuvent aussi être à l'origine de maladies génétiques, ou de prédispositions à des maladies.

II. Gènes étudié

Notre étude a porté sur le polymorphisme de deux gènes PADI4 et PTPN22 :

II .1.Peptidyl-Arginine Désiminase de type4 (PADI4)

Le PADI4 fait partie d'une famille composée de cinq gènes , les PADI 1,2,3,4 et 6 tous codent pour des enzymes responsables de la transformation post-traductionnelle de l'arginine en citrulline (Zhou et al.,2002).

a. Gène

Le gène PADI4 est localisé sur le chromosome 1p35-36,il contient 16 exons séparés de 15 introns (Chavanas et al.,2004). Ce gène code pour une enzyme appelé peptidylarginine déiminase 4 (PAD 4) (Suzuki et al.,2003).

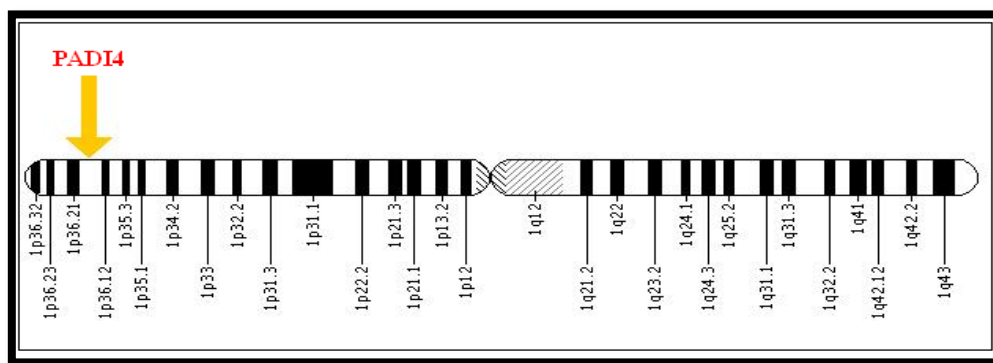


Figure 1 : Localisation chromosomique du gène PADI4 (PADI4.2013)

b. L'enzyme Peptidyl-Arginine Désiminase 4 (PAD4)

L'enzyme PAD4 est localisée dans le cytoplasme des monocytes, des cellules T et B, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles , ainsi que des cellules natural killer (NK). Cette enzyme est responsable de la transformation post-traductionnelle de l'arginine en citrulline (Suzuki et al.,2003).

C. Rôle physiologique de PAD4

➤ Fonction principale « La désimination ou citrullination »

La désimination ou citrullination est la modification post-traductionnelle , elle correspond à la transformation de résidus arginyl au sein d'une séquence peptidique en résidus citrullyl (Mordon,2005).

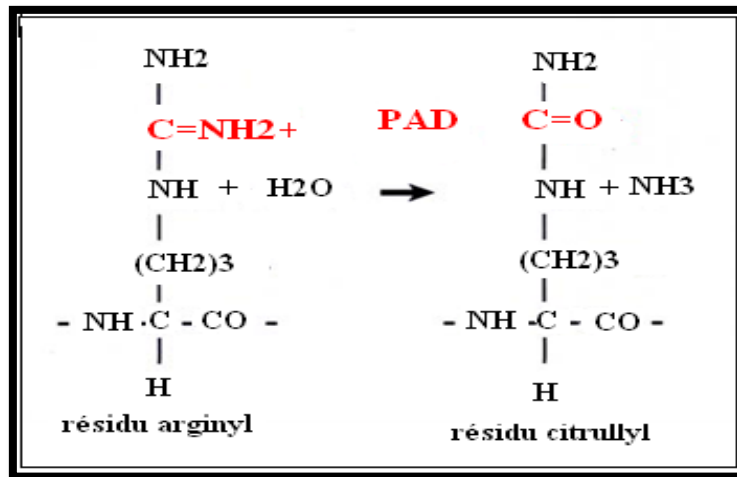


Figure 2 : La réaction de désimination ou citrullination (**adapté par Mordon,2005**).

La désimination d'une protéine induit une diminution du nombre de ses acides aminés chargés positivement, ce qui se traduit par une perte potentielle de liaisons ioniques intra- ou inter-moléculaires. Ceci peut modifier les interactions de la protéine avec ces partenaires ou entraîner une altération de sa structure spatiale, et de son dépliement (**Mordon, 2005**).

➤ Autres fonctions

L'enzyme PAD4 intervient dans la régulation génétique en citrullinant l'arginine et la méthylarginine des histones H3et H4et donc désactiver la méthylation de ces acides aminés sur les histones d'une part, comme elle peut agir comme un co-régulateur transcriptionnel pour une série de facteurs tels que p53, p21d'autre part.

Bien que le mécanisme par lequel PAD4 régule l'activité d'un gène cible n'est pas tout à fait clair, certaines études montrent que le PAD4 peut cibler les queues N-terminales des histones H2A, H3, H4 pour la citrullination afin de promouvoir la décondensation chromatine (**Tanikawa et al.,2009**).

L'enzyme PAD4 possède une fonction complexe pour avoir des effets essentiellement anti-inflammatoires et antibactériens.

L'hypercitrullination des histones catalysée par PAD4 conduit à la décondensation de la chromatine, ce qui implique l'expression de certains gènes qui codent pour des molécules qui participent dans la formation des structures appelées NET (pour neutrophil extracellular traps), grâce à ces structures les neutrophiles peuvent piéger et tuer les bactéries (**Li et al.,2010**).

La citrullination des deux chimiokines CXCL10 et CXCL11 aurait pour conséquence une diminution de leur chimiotactisme, notamment pour les lymphocytes T (**Struyf et al., 2009**)

d. Rôle pathologique de PAD4

L'étude d'association de certain polymorphismes des gènes avec des MAI a permis de mieux comprendre le rôle pathologique de ces gènes dans la maladie.

Un SNP (rs2210340) du gène PADI4 situé dans l'intron 3 de ce gène en position 94, caractérisé par le changement de nucléotide cytosine (C) par thymine (T) a été décrit comme associé a certaines maladies auto-immunes : polyarthrite rhumatoïde (PR), Sclérose en plaque(SEP) (**Yoichiro et al.,2007**). et psoriasis (**Alenius et al., 2006**).

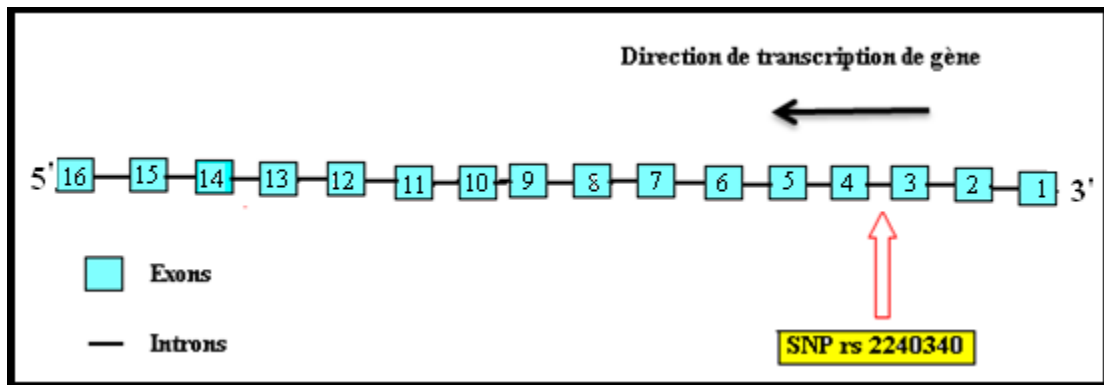


Figure 3: Localisation de SNP étudié de gène PADI4 (**originale**).

Exemple :

Nous avons choisi comme exemple la polyarthrite rhumatoïde parce que notre polymorphisme est plus étudié dans cette maladie.

L'enzyme PAD4 est candidate pour la citrullination de diverses protéines (fi laggrine, fibrine, etc) du tissu synovial .En cas d'une inflammation de ce tissu la citrullination augmente, ce qui conduit à la génération des épitopes protéique citrullinés, cibles des auto anticorps anti protéines citrullinées (ACPA) .

Les anticorps anti protéines citrullinées sont synthétisés et sécrétés localement par les plasmocytes du pannus rhumatoïde dont leurs principales cibles sont des formes citrullinées des chaînes α et β de la fibrine (**Urano et al.,1990 ; Perrier, 2006**).

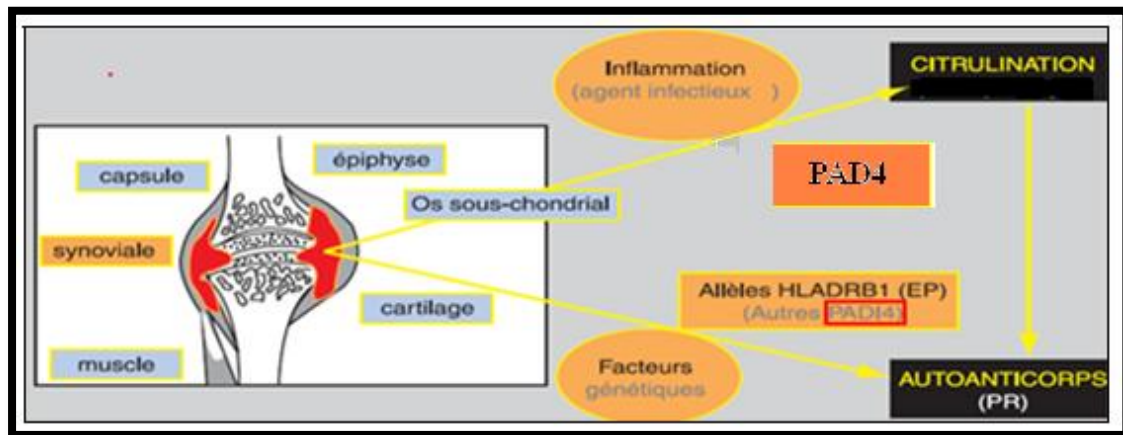


Figure 4 : Les auto-anticorps anti-protéines citrulinées caractéristiques de la PR (Perrier,2006)

II .2. Protein tyrosin Phosphatase non-receptor de type 22 (PTPN22)

II .2.a. Gène

Le gène PTPN22 est localisé sur le chromosome 1p13.2 (Gregersen et al., 2006). Il contient 24 exons séparés de 23 introns .

Ce gène code pour une protéine tyrosine phosphate non-receptor type 22 appelée LYP (Lymphoid-specific Phosphatase) (Cloutier et al.,1996) .

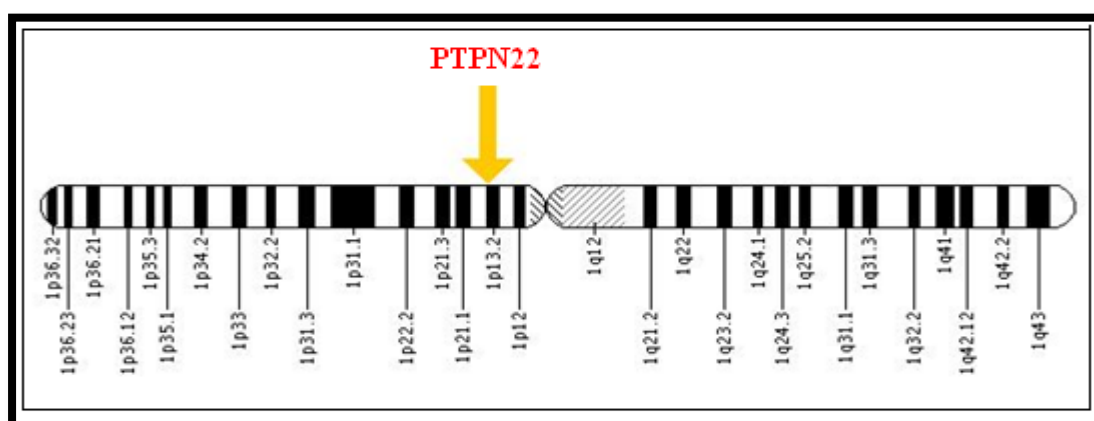


Figure 5 : Localisation chromosomique du gène PTPN22 (PTPN22.2013)

II .2.b. La Proteine LYP (Lymphoid-specific Phosphatase)

C'est une tyrosine phosphatase spécifique des lignées lymphoïdes permettant la régulation négative de l'activation des lymphocytes T mémoires/effecteurs) via la voie de signalisation du T-cell antigen receptor (TCR) (Begovich et al.,2004).

Cette protéine intracellulaire constituée de 807 acides aminés est exprimée dans les tissus hématopoïétiques (le thymus, la rate, la moelle osseuse et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) comme les cellules T, B, les neutrophiles, les cellules dendritiques, NK).

Elle possède, dans sa partie N-terminale, un domaine catalytique (tyrosine phosphatase) et dans sa partie C-terminale, quatre motifs riches en proline, nommés P1 qui a la capacité de se lier au domaine SH3 (Src homology 3) de la protéine tyrosine kinase Csk (C-src tyrosine kinase), P2, P3 et P4 (Bottini et al., 2004).

II .2.c. La protéine LYP est un régulateur négatif de lymphocyte T

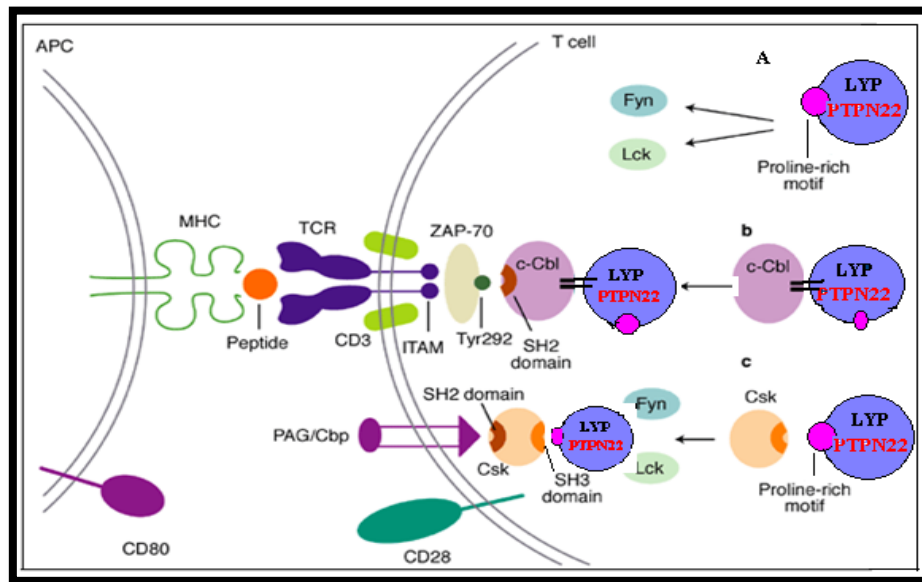


Figure 6 : Les mécanismes proposés par LYP codée par le gène PTPN22 qui affecte l'activation des lymphocytes T (adapté par Brand et al., 2005).

Le domaine P1 de la protéine LYP a la capacité de se lier au domaine SH3 (Src homology 3) de la protéine tyrosine kinase Csk. Dans les cellules T, le complexe LYP/Csk est un régulateur négatif de la voie de signalisation TCR.

Ce complexe inhibe phosphorylation de tyrosines ciblées, les kinases de la famille Src comme Lck et Fyn, initiateurs du signal TCR. De plus, la protéine LYP peut aussi inhiber l'activation des cellules T, via un nouveau complexe avec le proto-oncogène c-Cbl, en déphosphorylant une autre tyrosine kinase, appelée ZAP-70 (Cloutier et al.,1999).

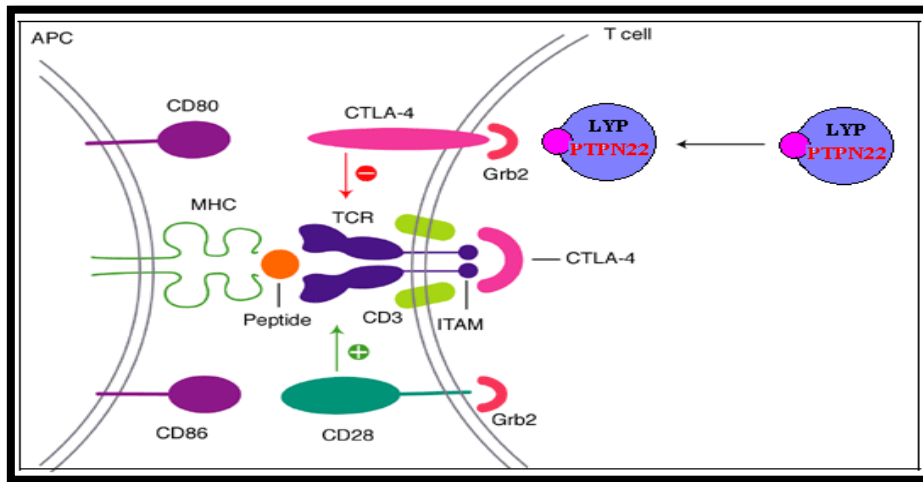


Figure 7 : Mécanisme proposé par laquelle CTLA-4 peut utiliser LYP/Grb2 pour inhiber l'activation des cellules T (adapté par Brand et al.,2005).

Le complexe LYP/Grb2 peut se lier aux domaines SH2 ou SH3 de CTLA-4 pour inhiber l'activation des cellules T. Il est bien établi que Grb2 joue un rôle dans la voie de signalisation en aval de l'activation des lymphocytes T CD28. La présence de deux domaines SH2 et SH3 contraignants dans CTLA-4 et des molécules CD28 a soulevé la possibilité que CTLA-4 peut se lier à Grb2 par un de ces domaines et d'utiliser son association avec LYP pour réguler les cellules T négativement.

II .2.d.PTPN22 dans les maladies auto-immunes

Le SNP (rs2476601) du gène PTPN22 est situé dans l'exon 14 de ce gène. Il est caractérisé par un changement de nucléotide cytosine (C) par une thymine (T) en position 1858, implique la substitution d'une arginine (R) par un tryptophane (W) en position 620 de la protéine, dans le domaine de liaison de LYP avec la kinase Csk (Bottini et al.,2004) a été associée à une augmentation du risque pour le développement de plusieurs maladies auto-immunes : polyarthrite rhumatoïde (PR) (Steer et al.,2005), le diabète de type 1 (Bottini et al.,2004), le lupus érythémateux

disséminé (LES) (Kyogoku et al.,2004), et maladie de Basedowe (Velaga et al.,2004).

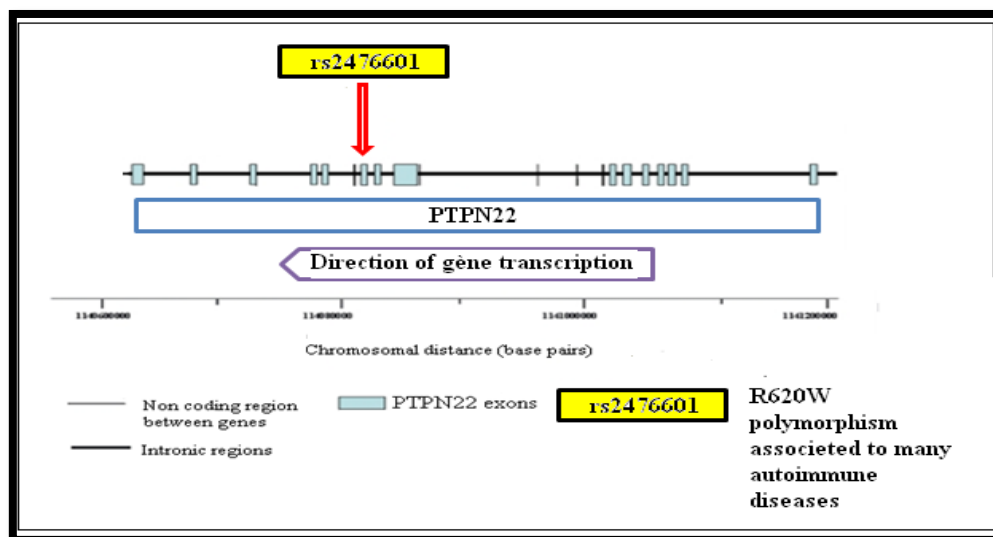


Figure 8 : Localisation de SNP étudié du gène PTPN22 (Adapté par Smith et al.,2008).

Nous avons choisi comme exemple la polyarthrite rhumatoïde parce que notre polymorphisme est plus étudié dans cette maladie.

Au cours de la PR des auteurs ont démontré que le SNP (rs2476601) de gène PTPN22 est caractérisé par une diminution de la fonction de la protéine LYP, cette dernière ne peut pas inhiber la signalisation du TCR dans des cellules T CD4 correctement; donc LYP-620W est considérée comme une protéine de perte de fonction.

Cette fonction de LYP est affaiblie, dans les cellules T CD4, pourrait conduire à des cellules T CD4 et B hyper réactives qui brisent la tolérance périphérique ce qui conduit à la production des auto-anticorps tels que les anticorps anti protéines citrullinées (ACPA), donc à la prédisposition au développement d'une polyarthrite rhumatoïde (Zikherman et al.,2009).

ABREVIATIONS

ACPA :	Auto anticorps anti protéines citrullinées
ADN :	Acide désoxyribonucléique
BANK :	B cell scaffold protein with ankyrin repeats
BLK :	B Lymphocyte Kinase
CsK :	C-src tyrosine kinase
Ct :	Cycle seuil
CTLA4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTS :	Centre de transfusion sanguine
dNTP :	Desoxynucléotide triphosphate
EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétique
FR :	Facteur Rhumatoïde
Grb2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
HLA :	<i>Human Leukocyt Antigen</i>
HTA	Hypertension artérielle
IgA :	Immunoglobuline de classe A
IgG :	Immunoglobuline de classe G
IgM :	Immunoglobuline de classe M
IRF :	Interféron Regulatory Factor
LcK :	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LES :	Lupus érythémateux systémique
LYP :	Lymphoid-specific Phosphatase
MAI :	Maladie Auto-immune
NET :	Neutrophil extracellular traps
NK :	Naturel Killer
PAD4 :	Peptidyl Arginine Désiminase4
PADI4 :	<i>Peptidyl Arginine Désiminase de type 4</i>
PBMCs :	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PCR :	Polymerase chain reaction
PR :	Polyarthrite Rhumatoïde
PTK :	Protéine tyrosine kinase

PTPN22:	<i>Protéine Tyrosine Phosphatase Non récepteur de type 22</i>
Rs :	Référence SNP
RT-PCR :	Réel Time polymerase chain reaction
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SEP :	Sclérose En Plaque
SH2 :	Src homology 2
SH3 :	Src homology 3
SI :	Système immunitaire
SLB :	Solution de Lyse de globule Blanc
SLR :	Solution de Lyse de globule Rouge
SNP :	Polymorphisme de nucléotide unique
STAT4 :	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 4</i>
TCR :	T-cell antigen receptor
TM :	Température de dissociation
TRAF1 :	TNF Receptor-Associated Factor 1
Vs :	Vitesse de Sédimentation
WR :	Réaction de Waaler-Rose
Zap 70 :	Zeta-chain-associated protéin kinase 70