

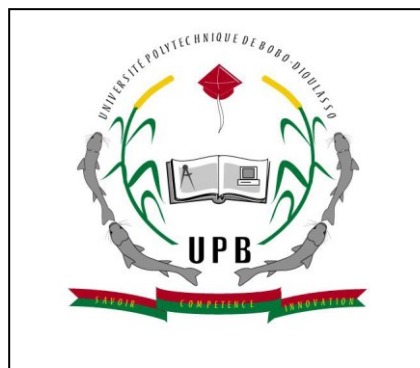
UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

.....
ECOLE DOCTORALE DES
SCIENCES NATURELLES ET
AGRONMIQUES

Année académique 2016-2017

BURKINA FASO

Unité –Progrès –Justice



THESE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement le 08 Février 2017

**Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université
Polytechnique de Bobo-Dioulasso en Biologie Appliquée et
Modélisation des Système Biologiques Spécialité Immunologie**

Par

Yacouba SOURABIE

**Etude du rôle et de la présence des lymphocytes
TH17/TREG dans les maladies auto-immunes au
Burkina Faso.**

Directeur de thèse :

M. Yves TRAORE, Professeur titulaire

Co-Directeur de thèse

M. Anicet G OUEDRAOGO,
Professeur titulaire, UPB

Jury :

Président

M. Marie G Adrien BELEM, Professeur titulaire, UPB

Membre :

Mme Marceline T YAMEOGO, MCA, UPB

M. Zakaria BENGALY, Chargé de Recherches, CIRDES

Rapporteurs:

M. Zekiba TARNAGDA, Directeur de Recherches,
IRSS/CNRST

M. Francis FUMOUX, Professeur titulaire, Aix-Marseille
Université

M. Macaire S OUEDRAOGO, Professeur titulaire, UPB

DEDICACES

À notre Père Feu Mamadou D SOURABIE (*in memoriam*) : merci pour le sacrifice consenti pour notre éducation. Vous n'avez pas eu la chance de voir l'achèvement de ce travail qui vous tenait à cœur mais soyez réconforté car nous serons toujours dans la direction de l'intégrité que vous avez souhaitée. Que votre âme repose en paix.

À notre mère SOURATIE P Awa: vous vous êtes occupée de nous durant toutes ces années, nous vous en remercions. Que ce travail vous réconforte pour une partie de vos sacrifices quotidiens. Que Dieu vous donne longue vie pour que nous continuons d'apprendre à vos côtés.

À mon épouse Patricia et mes enfants Oceanne 2^{ème} J, Steeves 1^{er} J et Faouzi: ce travail est le vôtre car vous avez participé activement en acceptant des sacrifices durant mes absences ; les périodes dures nous les avons traversées ensemble. Que le SEIGNEUR puisse nous offrir un lendemain meilleur à la suite de cette thèse.

À mes frères et sœurs et toute la famille: Pour l'estime et la considération que vous avez pour moi. En témoignage des liens qui nous unissent. Trouvez ici, le fruit des efforts que vous avez consenti à mon égard

À mes amis : pour les moments passés ensemble.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une collaboration institutionnelle entre l'UPB, l'INSSA, le CHU-SS, CNRFP et CERBA France. Je remercie toutes ses institutions et leurs responsables pour la franche collaboration.

J'ai bénéficié d'une bourse de troisième cycle du Ministère de l'enseignement supérieur de la recherche scientifique et de l'innovation à travers le CIOSPB qui m'a permis d'effectuer mes travaux au Burkina Faso et également à Paris en France. Cette bourse m'a permis de payer mes frais d'inscriptions en thèse.

A nos Co- Directeurs de Thèse,

Messieurs les Pr Yves TRAORE et Anicet G OUEDRAOGO, vous nous faites l'honneur de nous accompagner dans notre carrière médicale et scientifique depuis quelques années maintenant. Je vous remercie aussi pour votre confiance, votre constante disponibilité et votre écoute compréhensive. Vous m'aviez accepté d'abord dans votre formation de DEA de Biologie Appliquée à l'Université Polytechnique de Bobo Dioulasso et de Master 2 immunologie à l'Université Aix Marseille II. Puis mon intégration pour consolider la petite équipe d'immunologiste du Burkina Faso. Trouvez ici le témoignage de notre profonde admiration, vous qui avez su allier une carrière pédagogique et scientifique exemplaire. En espérant rester digne de votre confiance et poursuivre nos travaux à vos côtés.

Aux membres du Jury,

Monsieur le Pr Marie Gaston Adrien BELEM, vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse de doctorat. Nous avons pu profiter de vos connaissances par nos lectures et restons admiratifs du travail que vous effectuez notamment dans le cadre de l'immunologie parasitaire au plan national et international.

Au **Pr. Francis Fumoux**, l'occasion nous est enfin donnée de témoigner de votre personnalité hors du commun. Votre savoir, votre compétence, la clarté de votre enseignement, votre rigueur dans la démarche scientifique et par dessus tout, votre extraordinaire humilité font de vous un des plus beaux fleurons de l'intelligence nationale et internationale. Je suis fière d'avoir été votre étudiant. Recevez ici, ainsi que votre famille, l'expression de nos respectueux hommages. Nous sommes ravis que vous acceptiez de juger notre travail. Vos remarques et critiques permettront d'élaborer des collaborations futures.

Monsieur le Pr Macaire S OUEDRAOGO, nous vous remercions d'avoir accepté le rôle de rapporteur et d'avoir évalué ce travail. J'ai beaucoup apprécié vos discussions scientifiques lors

du rapport et je vous remercie de l'intérêt que vous avez montré pour ce travail. Nous connaissons votre rigueur médicale et scientifique par nos lectures et les interventions orales auxquelles nous avons eu la chance d'assister.

Monsieur le Pr Zekiba TARNAGDA, nous sommes honorés de confier ce travail à votre jugement. Nous n'avons pas eu le plaisir de bénéficier de votre enseignement mais sommes admiratifs de l'étendue de vos travaux de recherche.

Dr Marcelline T Yaméogo, nous vous remercions d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez montré pour ce travail. Nous connaissons votre rigueur médicale et scientifique par nos lectures et les interventions orales auxquelles nous avons eu la chance d'assister.

Dr Zakaria BENGALY, nous sommes honorés de confier ce travail à votre jugement. Nous sommes admiratifs de l'étendue de vos travaux de recherche.

Je remercie le Professeur GUIGUEMDE Robert Tinga qui a bien voulu nous intégrer dans le corps professorat de l'INSSA en nous proposant cette formation doctorale et comme Assistant en Immunologie.

Je tiens ensuite à remercier tous mes collègues, complices des bons comme des mauvais jours.

Merci à SANGARE Ibrahim, BAZIE W Wilfried, Bamba Sanata, DA Ollo, OUEDRAOGO Abdoul-Salam, SANOU Soufiane Do Malick, SAWADOGO Salifo, KONSEIGRE Valentin et SANOU M Armel pour votre présence amicale et en souvenir de toutes ces années passées ensemble, je vous souhaite brillante carrière professionnelle et beaucoup de bonheur. Bien sûr, je n'oublie pas notre grand Frère KANIA Dramane, je voudrais te remercier de m'avoir donné gracieusement le Ficoll lors de mes manipulations. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci beaucoup pour ton aide précieuse.

Cette thèse m'a aussi permis de rencontrer des personnes exceptionnelles avec qui j'ai pu partager mes difficultés : un grand merci à SANOU Guillaume et Dr SAGNON pour m'avoir introduit au CNRFP pour la culture de mes PBMCs. Merci pour ta très grande disponibilité, pour ton soutien constant et pour les nombreuses corrections de mon anglais écrit.

Merci à tout le personnel du Département des laboratoires qui a supporté pendant longtemps mon absence du laboratoire pendant les moments de rédaction.

Je tiens à remercier Dr OUEDRAOGO David *in memoriam* pour vos discussions et vos conseils avisés relatifs à la science et à la recherche. Que ton âme repose en paix

Je remercie aussi mes parents pour m'avoir soutenue pendant ces longues années de thèses. Une pensée émue pour mon épouse qui m'a toujours si bien compris.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
RESUME / ABSTRACT.....	8
INTRODUCTION GENERALE	10
PREMIERE PARTIE: REVUE DE LA LITERATURE.....	14
CHAPITRE I: GENERALITES SUR LES MALADIES AUTO-IMMUNES.....	15
I. La tolérance au soi	16
1. Evolution du concept de tolérance immunitaire.....	16
2. Les mécanismes de tolérance immunitaire	17
2.1. La tolérance des lymphocytes T.....	17
2.1.1. La tolérance centrale.....	17
2.1.2. La tolérance périphérique	23
2.2. La tolérance des lymphocytes B	24
2.2.1. La tolérance centrale.....	24
2.2.2. La tolérance périphérique	25
II. Présentation des maladies auto-immunes	26
1. Critères et classification.....	26
2. Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns	29
2.1. Les autoanticorps : des facteurs lésionnels majeurs.....	29
2.2. Les effecteurs lymphocytaires T.....	32
3. Les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes.....	33
3.1. Les modèles spontanés.....	33
- Les souris lupiques.....	33
3.2. Les modèles induits.....	36
- L'encéphalomyélite allergique expérimentale	37
CHAPITRE II : LE ROLE DES AUTO ANTIGENES AU COURS DES	
 MALADIES AUTO-IMMUNES	38
I. L'autoantigène initie et conduit la réponse auto-immune	38
II. La séquestration des autoantigènes	39
1. La séquestration anatomique	39
2. La séquestration moléculaire.....	39
III. Les modifications des antigènes du soi	40
1. Modifications de l'autoantigène par les métaux lourds.....	41
2. Modifications de l'autoantigène et processus apoptotique	41
3. Modifications de l'autoantigène et cancer	42
4. Modifications de l'autoantigène au cours des processus de réparation tissulaire	42
5. Modifications co-et post-traductionnelles des autoantigènes.....	42
IV. Le polymorphisme génique des autoantigènes	44
1. Le modèle de la myasthénie	45
2. Le modèle du diabète de type1	46
CHAPITRE III : LE ROLE DES CELLULES TH17/TREGs DANS LES	
 MALADIES AUTO-IMMUNES	47
I. La polarisation de la réponse immunitaire T et L TREGs.....	47
1. La polarisation TH1, TH2 et TH17.....	47
2. Les Lymphocytes T régulateurs.....	49
2.1. Définition des L TREGs.....	49
2.2. Caractéristiques phénotypiques des L TREGs <naturel >.....	49
2.2.1. Expression membranaire constitutive de CD 25.....	49
2.2.2. Facteur de transcription Foxp3.....	51

2.2.3. Autres marqueurs.....	53
2.3. Caractéristiques fonctionnelles.....	56
2.3.1. Anergie.....	56
2.3.2. Inhibition de multiples lignées cellulaires.....	57
2.3.3. Mécanismes d'inhibition dépendant du contact.....	59
2.4. Origine et homéostasie.....	61
2.4.1. Circulation des TREGs.....	63
2.4.2. Rôle en pathologie humaine : auto-immunité, oncologie et infections.....	64
3. Les autres lymphocytes TREGS.....	66
3.1. Les lymphocytes CD8 Régulateurs.....	66
3.2. Les lymphocytes B régulateurs.....	69
DEUXIEME PARTIE : LES TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	71
CHAPITRE I: METHODOLOGIE GENERALE.....	72
1. Caractéristique de la population et de la zone d'étude	72
1.1. Lieu de l'étude.....	72
1.2. Caractéristique des sujets de l'étude.....	73
2. Screening du VIH, VHB et du VHC par la technologie CMIA.....	74
3. Screening du CMV du <i>Borrelia burgdorferi</i> par la technologie ELFA.....	77
4. Screening de la Dengue sérotype 1, 2, 3,4 et de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	79
5. Dosage néphélométrique des différentes fractions des protéines sériques.....	79
CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC PRECOCE DES MAI (Article I)	80
II.1.INTRODUCTION	81
II.2.MATERIEL et METHODES	82
II.3.RESULATS	94
II.4.DISCUSSION	99
II.5.CONCLUSION PARTIELLE.....	103
CHAPITRE III : ANALYSE DU MICROENVIRONNEMENT CYTOKINIQUES (Article II).....	104
III.1.INTRODUCTION	105
III.2.MATERIEL ET METHODES	106
III.3. RESULATS	110
III.4.DISCUSSION	118
III.5.CONCLUSION PARTIELLE	121
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124
ANNEXES.....	146

ABBREVIATIONS

Ac(m) : anticorps (monoclonaux)

Ac : anticorps

ACh : acétylcholine

ADN(c) : acide désoxyribonucléique (complémentaire)

Ag: antigène(s)

AIRE: autoimmune regulator

ANA: anticorps anti-nucléaire

ANCA: anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles

APECED: Autoimmune Poly-Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy

AutoAc: autoanticorps

AutoAg: autoantigène(s)

ARN (m): acide ribonucléique (messenger)

β 2-GPI: β2-glycoprotéine I

BCR: B Cell Receptor

BET: bromure d'éthidium

BPAG1 : antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse –

CD : classe de différenciation

CDR : troisième région déterminant la complémentarité

CET(m) : cellules épithéliales thymiques (de la médullaire)

CHRNA : sous-unité α du récepteur musculaire à l'acétylcholine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

Cp: crossing point

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

DC : cellules dendritiques

DP: desmoplakine(s)

Dsc: desmocolline(s)

Dsg : desmoglérine(s)

DSG1-AT : transcrits alternatifs du gene

DSG1 DTT : dithiotréitol

EAE : encéphalomyélite allergique expérimentale

EC: extracellulaire

ELFA: Enzyme linked fluorescent Assay

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ENA: extractable nuclear antigen

ENV: envoplakine

Foxp3: forkhead box P3

GAPDH : gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GITR: glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor like receptor

GPI : gradient de pH immobilisé

HE: Human Epidermis

HLA: Human Leukocyte Antigen

Hsp: Heat shock protein

IEF : isoélectrofocalisation

IFD : immunofluorescence directe

IFI : immunofluorescence indirecte

Ig (IV): immunoglobulines (intraveineuses)

IP3: inositol 1, 4, 5-triphosphate

kD: kilo Dalton

LED : lupus érythémateux disséminé

LES : lupus érythémateux systémique

MAPK : mitogen activating protein kinase

MAI : maladies autoimmunes

MALDI-ToF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

MBG : anticorps anti-membrane basale glomérulaire

MBP : protéine basique de la myéline

M-MLV RT : Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

MOG : protéine oligodendriale de la myéline

NK : Natural killer

NOD : Non Obese Diabetic

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

(Q-)PCR : (Quantitative) polymerase chain reaction

PIB : Produit Intérieur Brut

pI : point isoélectrique

PR: polyarthrite rhumatoïde

RAG: recombination-activating genes

(Sm)RNP: (small nuclear) ribonucleoproteins

rEC1/5-Dsg1 : région extracellulaire recombinante de la Dsg1

SAPL: syndrome des anti-phospholipides

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

Scl-70 : topoisomerase

SDS-PAGE: SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SEP : sclérose en plaques

SI : système immunitaire

SIC: substance intercellulaire

SNP: single nucleotide polymorphism

TB: thyroglobuline bovine

TCR: T Cell Receptor

TGF- β : transforming growth factor- β

Th: T helper

TLR: Toll-like receptors

TNF: Tumor necrosis factor

TRA: antigènes restreints aux tissus

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

VNTR: variable number of tandem repeats

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanismes de tolérance des lymphocytes T et B

Figure 2. Rôle de la protéine AIRE dans l'induction de la tolérance intrathymique

Figure 3. Les principales maladies auto-immunes

Figure 4. Exemples de mécanismes lésionnels autoanticorps dépendants

Figure 5. Facteur de transcription Foxp3

Figure 6. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs

Figure 7. Genèse thymique des lymphocytes T régulateurs

Figure 8. Aperçu du dispositif de dosage des analytes par la technologie CMIA (A : Architect *CI4100* B : Réactifs utilisés par l'instrument)

Figure 9. Aperçu du dispositif de dosage des analytes par la technologie ELFA (A Mini Vida ; B Principe de ELISA Sandwich)

Figure 10. Analyseur Konelab 20i

Figure 11. Aperçu de la détection des autoanticorps

Figure 12. Répartition des femmes malades en fonction de l'âge et le type de maladies auto-immunes

Figure 13. Aperçu du milieu de culture des PBMC.

Figure 14. Aperçu du dispositif de lecture A : une plaque ELISA, B : un spectrophotomètre OpsysMRDynex®- Pour la lecture de 4 plaques).

Figure 15. Principe de l'ELISA sandwich

Figure 16. Concentration de l'IL-2 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 17. Concentration de l'IL-10 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 18. Concentration du TGF- β chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 19. Concentration de l'IL-17A chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 20. Concentration de l'IL-22 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 21. Concentration de l'IL-21 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 22. Concentration de l'IL-23 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Figure 23. Concentration de l'interféron gamma chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Autoantigènes exprimés dans le thymus et maladies auto-immunes associées

Tableau II. Manifestations pathologiques du syndrome APECED

Tableau III. Diversité des autoantigènes au cours des maladies auto-immunes

Tableau IV. Mécanismes lésionnels des autoanticorps

Tableau V. Modifications post-traductionnelles associées aux maladies auto-immunes

Tableau VI. Polymorphismes géniques d'autoantigènes et mécanismes associés

Tableau VII. Protéines impliquées dans les fonctions suppressives des Treg chez l'homme et chez la souris

Tableau VIII. Récepteurs et chémokines impliqués dans le trafic des Treg

Tableau IX. Lymphocytes T CD8+ Régulateur induits spécifiques d'antigènes chez l'homme

Tableau X. Composition du coffret des ENA

Tableau XI. Composition du coffret des ANCA-MBG

Tableau XII. Composition du coffret de l'ADN natif

Tableau XIII. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des ENA

Tableau XIV. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des ANCA-MBG

Tableau XV. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des anticorps anti-ADN natif

Tableau XVI. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients

Tableau XVII. Profil des fractions protéiques dans le sérum des patients atteints de MAI

Tableau XVIII. Profil des auto-anticorps dans le sérum des patients atteints de MAI

Tableau XIX. Fréquence des maladies auto-immunes en fonction du statut socio-économique

Tableau XX. Concentration des cytokines suivantes : TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β et l'IFN- γ dans le groupe contrôle et le group de patients (Moy $\pm$ SD).

RESUME

Les maladies auto-immunes (MAI) résultent de la rupture des mécanismes de tolérance du système immunitaire conduisant à une symptomatologie clinique variée et complexe. Elles sont décrites comme des pathologies dont la répartition géographique suit le gradient nord-sud. Le premier volet de notre thèse s'est focalisé sur l'épidémiologie et le diagnostic immunologique de ces affections au Burkina Faso. Sur 65 patients suspectés, 17 ont pu être confirmés comme patient souffrant d'une MAI en se basant sur la technique multiplexe d'identification directe des autoanticorps (Immunodot). Nous avons trouvé que l'identification directe des autoanticorps par la technique immunodot multiplex est une approche innovante dans le diagnostic immunologique des maladies auto-immunes au Burkina Faso. On a trouvé que l'incidence était de 0,023%. La très faible incidence des maladies auto-immunes obtenue est due à l'existence de patients non encore diagnostiqués. Et, l'identification directe des autoAc pourra améliorer le taux de diagnostic obtenu (26,2%). Nous avons trouvé que l'hypothèse d'hygiène qui détermine le gradient nord-sud de la répartition géographique des MAI semble décliner. Même si elle est causale, il faut y associer d'autres facteurs. Aucune association significative n'a été trouvée entre les maladies auto-immunes et les infections comme le VIH, le VHB, le VHC, la dengue (sérotypé 1, 2, 3, 4), le CMV et *Borrelia burgdorferi*. Le second axe de notre thèse s'est concentré sur le microenvironnement cytokinique dans les surnageants de PBMCs chez 17 patients souffrant de maladies auto-immunes et 17 donneurs sains de Bobo Dioulasso. Ainsi, 10 mL de sang total ont été prélevés chez chaque sujet pour l'analyse du microenvironnement cytokinique. Des PBMCs ont été isolées et activées par le LPS bactérien pendant 24 heures. Nous avons mesuré les concentrations des cytokines suivantes: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α et TGF- β) par la technique ELISA sandwich. Nous avons trouvé qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres de TNF- α chez les témoins sains et les patients souffrant de maladies auto-immunes ($P = 0,09$). Les concentrations de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-10 et le TGF- β sécrétées par les PBMCs sont statistiquement plus élevées dans le groupe témoin que dans le groupe de patients souffrant d'une maladie auto-immune (respectivement $p = 0,1$; $0,004$ et $0,016$). Les concentrations des cytokines comme: l'IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 et IFN- γ ont statistiquement augmenté dans les situations de maladies auto-immunes en comparaison avec les témoins sains (respectivement $p = 0,00001$; $0,001$; $0,006$; $0,008$ et $0,000$). De même les patients atteints de LES et de PR ont des concentrations élevées en IL-22, IL-21, tandis que les patients atteints de PR ont des titres élevés en IL-17A. En se basant sur la concentration de cytokines sécrétées telles que l'IL-17A et l'IFN- γ , nous trouvons que le phénotype IL-17 +, IFN- γ + est majoritaire dans les maladies auto-immunes à Bobo Dioulasso. Nous proposons que des cibles thérapeutiques soient dirigées vers ces phénotypes pour lutter contre les maladies auto-immunes.

Mots clés: Autoanticorps, Burkina Faso, Cellules TH17, TREGs, Cytokines, Maladies auto-immunes.

ABSTRACT

Autoimmune diseases (AID) result from the breakdown of the mechanisms of tolerance of the immune system leading to a varied and complex clinical symptomatology. Described as pathology whose geographical distribution follows the north-south gradient. The first part of our thesis focuses on the epidemiology and the immunological diagnosis of these diseases in Burkina Faso. Of the 65 suspected patients, 17 were able to be confirmed as patients with AID based on the multiplex technique of direct identification of autoantibodies (Immunodot). We have found that the direct identification of autoantibodies by the immunodot multiplex technique is an innovative approach in the immunological diagnosis of autoimmune diseases in Burkina Faso. The incidence was found to be 0.023%. The very low incidence of autoimmune diseases found is due to the existence of undiagnosed patients. And the direct identification of autoAb can improve the diagnosis referral obtained (26.2%) with diseases. We found that the hygiene hypothesis that determines the north-south gradient of the geographical distribution of AID appears to be declining. Even if it is causal, other factors must be associated with it. No significant association was found between autoimmune diseases and infections such as HIV, HBV, HCV; Dengue (serotype 1,2, 3,4), CMV and *Borrelia burgdorferi*. The second axis of our thesis focused on the cytokine microenvironment in PMBC supernatants in 17 patients with autoimmune diseases and 17 healthy donors from Bobo Dioulasso. Thus, 10 mL of whole blood was collected from each subject for cytokine microenvironmental analysis. PBMCs were isolated and activated by bacterial LPS for 24 hours. Using the ELISA sandwich technology, we measured the concentrations of the following cytokines: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α and TGF- β . We found that there was no statistically significant difference between TNF- α titers in healthy controls and patients with autoimmune diseases ($P = 0.09$). Concentrations of cytokines such as IL-2, IL-10 and TGF- β secreted by PBMCs were significantly higher in the control group than in the group of patients with autoimmune disease (respectively $P = 0.1$, 0.004 , 0.016). Concentrations of cytokines such as IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ significantly increased in autoimmune disease situations compared with healthy controls ($P = 0.00001$, 0.001 , 0.006 , 0.008 and 0.000). Also patients with SLE and RA have high concentrations of IL-22, IL-21, while patients with RA have high IL-17A titers. Patients with HT have a high TGF- β titer. Based on the concentration of secreted cytokines such as IL-17A and IFN- γ , we find that the IL-17 +, IFN- γ + phenotype predominate in autoimmune diseases in Bobo Dioulasso. We propose that therapeutic targets be directed to these phenotypes to combat autoimmune diseases.

Keys Words: Autoantibodies, Autoimmune diseases, Burkina Faso, Cytokines, TH17 TREGS CELLS

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies auto- immunes résultent de la rupture des mécanismes de tolérance du système immunitaire vis-à-vis des constituants de l'organisme (auto-antigènes) conduisant à un processus pathologique. Certaines d'entre elles sont mortelles car elles provoquent des complications cardiaques et neurologiques. Ces quatre dernières décennies ont été marquées dans les pays industrialisés par une diminution considérable de l'incidence de maladies infectieuses telles que l'hépatite A, la tuberculose, la rougeole et le rhumatisme streptococcique. Simultanément, les maladies auto-immunes telles que, le diabète insulino-dépendant, le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodermie ont crû de manière spectaculaire avec une prévalence atteignant 4 à 10% dans la population générale [Okada *et al.*, 2010]. Les données cliniques et expérimentales ont rapporté la preuve d'une étiologie multifactorielle.

En Afrique et particulièrement au Burkina Faso, la connaissance sur les maladies auto-immunes reste encore assez limitée en général. Cette rareté apparente des maladies auto-immunes en Afrique pourrait s'expliquer par un défaut de diagnostic lié à une sous -médicalisation.

De nombreuses études ont montré que la répartition géographique des maladies auto-immunes suit un gradient nord-sud. Ce gradient apparaît clairement pour le diabète de type 1 A et la sclérose en plaques, dont l'incidence est nettement plus élevée en Europe qu'en Afrique. Il existe également entre l'Amérique du nord et du sud [Bach *et al.*, 2005]. Ce constat amène à considérer le poids de facteurs génétiques et/ou ethniques. Mais leur contribution paraît faible au regard de celle de facteurs environnementaux selon les données de plusieurs travaux sur des populations immigrées [Litjens *et al.*, 2009 ; Waisberg *et al.*, 2010].

D'autres études sur des populations génétiquement homogènes ont établi un lien entre la fréquence de maladies auto-immunes et divers indicateurs du niveau socio-économique. En effet les facteurs associés de manière indépendante à une incidence élevée des maladies auto-immunes témoignent d'un style de vie privilégié tandis que les facteurs environnementaux locaux (pollution atmosphérique) n'influencent pas de manière significative la fréquence des maladies auto-immunes [Selmi *et al.*, 2009]. Ce qui nous conduit à l'hypothèse selon laquelle la fréquence de plus en plus élevée des maladies auto-immunes en Afrique, serait la conséquence d'une réponse immunologique anormale (TH17/TREG) du sujet en rapport avec certains facteurs environnementaux plutôt que de considérer l'hypothèse d'asepsie. Les maladies auto-immunes ont longtemps été associées à une réponse de type TH1 excessive et non contrôlée par le système immunitaire. Aujourd'hui, plusieurs études ont démontré que certaines maladies telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la sclérodermie localisée, le lupus, la maladie de Crohn et l'asthme non atopique sont en fait le résultat d'une activation de la voie TH17

[Stockinger et Veldhoen, 2007 ; Iwakura *et al.*, 2008 ; Korn *et al.*, 2009 ; Sakuraba *et al.*, 2009]. C'est aussi le cas pour l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), une affection induite chez la souris et servant de modèle pour l'étude de la sclérose en plaques chez l'homme. Pour étudier le rôle des cellules TH17 dans cette maladie, des souris invalidées, tant pour le gène de l'IL-17A que pour ceux de l'IL-23, l'IL-6, l'IL-12p40 et l'IL-1, ont été utilisées. Les résultats ont montré que ces souris ne développaient pas l'EAE [Iwakura *et al.*, 2008].

D'autres auteurs ont démontré que l'IL-9 intervient également dans la pathogénie de cette maladie auto-immune [Nowak *et al.*, 2009]. En effet, la neutralisation de l'IL-9 à l'aide d'anticorps monoclonaux chez des souris atteintes d'EAE atténue les signes de la maladie chez ces souris. Le rôle de la voie TH17 dans l'EAE a donc clairement été démontré. De plus, il a été prouvé que l'axe cytokinique IL-23/IL-17, plutôt que l'IL-12/ IFN- γ , est crucial dans la pathogénèse de la maladie. En effet, des souris déficientes pour l'IL-23p19 ou pour l'IL-12p40 sont résistantes à l'EAE ainsi qu'à l'arthrite induite par le collagène (*Collagen-Induced Arthritis*, CIA), une autre maladie auto-immune, alors que des souris déficientes en IL-12p35 y sont sensibles [Murphy *et al.*, 2003]. Les cellules TH17 peuvent donc être décrites comme des cellules pro-inflammatoires, impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunes. Elles peuvent aussi avoir un rôle dans la résolution de maladies infectieuses.

Comme les cellules TH17 et les cellules TREG ont un rôle totalement opposé, il sera judicieux d'étudier la relation TH17/TREG dans la survenue des maladies auto-immunes. Suite à la stimulation de son récepteur, une cellule T naïve peut activer le facteur de transcription *Forkhead box Protein 3* (Foxp3) et devenir une cellule TREG en présence de la cytokine TGF- β . Cependant, lorsque le TGF- β est associé à l'IL-6 ou l'IL-21, le développement des cellules T reg est inhibé et les cellules T naïves se différencient en cellules TH17 suite à l'activation du facteur de transcription (ROR γ) t [Bettelli *et al.*, 2007 ; Stockinger et Veldhoen, 2007]. Le TGF- β peut donc induire la différenciation des cellules T *helper* en TH17 ou TREG respectivement en présence ou non de cytokines pro-inflammatoires. Plus précisément, à basse concentration, le TGF- β , en synergie avec l'IL-6 et l'IL-21, induit l'expression d'IL-23R, favorisant ainsi le développement des cellules TH17.

Par contre, à forte concentration, le TGF- β réprime l'expression de l'IL-23R et favorise le développement des cellules TREG [Zhou *et al.*, 2008]. Le rôle des cellules TREG est de contrôler une réaction inflammatoire trop importante tandis que celui des cellules TH17 est d'induire une forte réaction inflammatoire en réponse à un processus infectieux. L'activation de ces deux types cellulaires doit être minutieusement régulée pour que l'organisme puisse se défendre contre

l'agent pathogène tout en évitant une réaction inflammatoire excessive qui serait nocive pour l'hôte.

L'activation de la voie TH17 induit une production d'IL-8 qui attire les PNN sur le site d'infection [Peck et Mellins, 2010]. Ces derniers peuvent phagocyter l'agent pathogène et le détruire via la production d'ions superoxydes et l'action des lysozymes. Ils produisent également des peptides antimicrobiens et les libèrent sur le site d'infection [Chakravarti *et al.*, 2007]. De plus, les PNN produisent des cytokines impliquées dans la différenciation des cellules TH17 et renforcent l'activation de la voie TH17.

Nous pensons qu'un déséquilibre de la balance TH17/TREG dans le contexte d'absence d'asepsie serait à l'origine de la pathologie auto-immune. Les objectifs de cette thèse sont :

Etudier le rôle et la présence des lymphocytes TH17/TREG dans les maladies auto-immunes au Burkina Faso.

- Analyser les aspects épidémiologiques et immunologiques des maladies auto-immunes au Burkina Faso.
- Identifier les autoanticorps chez les patients du Burkina Faso par une technique multiplexe innovante (immunodot®).
- Déterminer le profil du microenvironnement cytokinique chez les patients atteints d'une MAI.
- Déterminer les mécanismes moléculaires qui gouvernent chaque sous population des lymphocytes TH17 et TREGs dans les MAI au BF.

**PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA
LITERATURE**

CHAPIRE I : LES MALADIES AUTO-IMMUNES

INTRODUCTION

Le système immunitaire désigne un ensemble de tissus, cellules et molécules ayant pour but de protéger l'organisme des agressions provenant d'agents exogènes (bactéries, virus, parasites et champignons) ou endogènes (cellules tumorales ou le soi altéré) reconnus comme n'appartenant pas au « soi ». Les principales cellules du système immunitaire jouant un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie sont les lymphocytes T et B capables de reconnaître l'antigène (Ag) via leur récepteur pour l'Ag : TCR (*T Cell Receptor*) pour les cellules T et BCR (*B Cell Receptor*) pour les cellules B. La reconnaissance de l'Ag par le TCR nécessite, en outre, que celui-ci soit présenté par une molécule HLA (*Human Leukocyte Antigen*) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les récepteurs pour l'Ag sont spécifiques d'un Ag donné et l'ensemble des spécificités exprimées par les lymphocytes en constitue le répertoire immunologique. Ce répertoire résulte d'un processus génétique d'origine somatique. Il est théoriquement illimité et généré de façon stochastique avant tout contact préalable avec l'Ag par des mécanismes de recombinaison génétique. La génération de cette diversité est nécessaire à la défense de l'organisme. Elle constitue un avantage sélectif. Néanmoins, le système immunitaire est susceptible de générer des clones T et B capables de reconnaître des Ag du soi encore appelés clones autoréactifs. Ce sont les phénomènes dits de tolérance immunitaire qui permettent de prévenir la survenue de processus auto-immuns grâce à l'élimination ou au contrôle de ces clones autoréactifs. Dans certaines conditions non physiologiques, une dérégulation du réseau d'interactions cellulaires et moléculaires contrôlant la présence ou l'expansion de cellules autoréactives peut conduire à une rupture de tolérance au soi caractérisée par l'activation et la multiplication de ces cellules et au développement d'une maladie auto-immune (MAI).

La découverte d'une classe de TH17 et T REGS a permis de déterminer le rôle de ces cellules dans certaines maladies auto-immunes qui étaient auparavant associées à une réponse de type TH1.

Ainsi nous allons décrire les divers aspects des mécanismes immunitaires notamment, le rappel des mécanismes de tolérance aux Ag du soi, des mécanismes effecteurs de la réponse auto-immune et des modèles expérimentaux d'études de ces pathologies.

Dans un second temps, nous exposerons plus précisément les différents arguments en faveur du rôle des cellules TH17/TH REG, des cytokines et de la densité de leurs récepteurs dans les processus d'auto-immunité.

Enfin, évaluer les conséquences de la délétion de FOXP3, RORy et du gène de l'IL 17 dans la survenue des MAI.

I. La tolérance au soi

1. Evolution du concept de tolérance immunitaire

Au début du siècle dernier, Paul Ehrlich a observé le phénomène d'allo-immunisation due à la présence d'isolysines (isoanticorps) par injection à des chèvres de globules rouges homologues, tandis que toutes les tentatives d'auto-immunisation afin de produire des autolysines (autoanticorps) ont échoué. Ces observations montrant l'absence de réaction du système immunitaire vis-à-vis des propres constituants de l'organisme ont conduit Ehrlich à la notion *d'horror autotoxicus* pour désigner l'incapacité de celui-ci à se mettre en danger par la production d'autoanticorps (autoAc) toxiques. Ce postulat a été confirmé par la découverte des règles de compatibilité transfusionnelle par Karl Landsteiner qui lui ont permis de définir le système ABO en démontrant l'existence d'isoagglutinines naturelles dirigées contre l'antigène non exprimé et l'absence d'autoanticorps contre l'antigène exprimé. Les expériences conduites par Owen en 1945 suivies par celles de Medawar ont eu une influence considérable dans l'élaboration de la théorie de la délétion clonale par le groupe de McFarlane Burnet. L'interprétation de Burnet et Medawar, a été que l'organisme doit acquérir la capacité de discriminer le soi du non soi pendant la vie embryonnaire et que les clones autoréactifs soient éliminés pendant la vie fœtale. Cette interprétation a permis de forger le concept de tolérance immunitaire.

La théorie originelle de la distinction entre le soi et le non soi s'est ultérieurement modifiée pour s'accommoder des nouvelles découvertes, incompatibles avec ce modèle soi/non soi, telles que : la génération à partir de lymphocytes B activés de potentielles cellules autoréactives *via* le phénomène d'hypermutation; la nécessité pour le lymphocyte T de recevoir en plus du signal procuré par l'interaction TCR/peptide/CMH, un second signal apporté par des cellules présentatrices d'Ag (CPA) exprimant les molécules dites de costimulation ; ou encore la théorie du Danger défendue par Polly Matzinger qui stipule que la CPA pour fournir ce second signal doit elle-même recevoir un signal endogène « d'alarme » ou « de danger » provenant d'une cellule lésée ou soumise à un stress [Matzinger *et al.*, 2002]. Il paraît clair aujourd'hui, que la tolérance immunitaire correspond d'avantage à un état physiologique acquis où le système immunitaire ne

réagit pas de façon agressive contre les composants de l'organisme dans lequel il s'est développé, plutôt qu'à un état de non réponse contre les constituants du soi. La tolérance désigne donc l'ensemble des mécanismes inhibant ou contrôlant une réponse dirigée contre un Ag du soi ou autoAg.

2. Les mécanismes de tolérance immunitaire

Les récepteurs pour l'Ag des lymphocytes T et B sont générés au hasard par le processus de recombinaison des différents segments géniques V, D et J codant pour les domaines variables de ces molécules. Entre 20 et 50% des TCR et des BCR ont une affinité potentiellement dangereuse pour les Ag du soi. Par ailleurs, des clones B autoréactifs peuvent aussi être générés par hypermutation somatique lors de leur différenciation dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes périphériques. L'élimination des clones autoréactifs implique donc des mécanismes de tolérance immunitaire intéressant aussi bien le compartiment T que le compartiment B. Dans de nombreux modèles de souris transgéniques exprimant sur la majorité de leurs lymphocytes un seul récepteur (TCR ou BCR), spécifique d'un Ag donné, le suivi du développement de ces lymphocytes a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes de tolérance souvent communs aux lymphocytes T et B. Classiquement, les mécanismes de tolérance lymphocytaire se divisent selon leur localisation anatomique en deux grandes catégories : l'une centrale, survenant dans les organes lymphoïdes centraux (thymus pour les cellules T et moelle osseuse pour les cellules B) et l'autre périphérique, prenant place dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, système lymphoïde associé aux muqueuses). La tolérance peut être acquise selon quatre ou cinq mécanismes (Figure 1) : (a) l'élimination des cellules autoréactives par délétion clonale qui intervient dans les organes lymphoïdes centraux précocement au cours de leur différenciation; (b) la réédition du récepteur qui permet la génération de nouveaux récepteurs ayant perdu leur autoréactivité ; (c) la neutralisation fonctionnelle des cellules autoréactives appelée anergie clonale, qui se traduit par l'inaptitude des cellules à répondre à une stimulation par l'Ag ; (d) la régulation extrinsèque des cellules T appelée indifférence ou ignorance lymphocytaire (e) l'immunorégulation des cellules autoréactives par des cellules régulatrices à activité suppressive ou par d'autres facteurs tels que des facteurs de croissance ou des médiateurs pro-inflammatoires[Goodnow et al., 2005].

2.1. La tolérance des lymphocytes T

2.1.1. La tolérance centrale

Le répertoire lymphocytaire T exprimé en périphérie résulte des mécanismes de sélection positive et sélection négative qui ont lieu dans le thymus. La sélection positive est un processus destiné à favoriser la survie et l'expansion des thymocytes qui reconnaissent les peptides du soi complexés aux molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales de la corticale thymique. La sélection négative a pour but d'éliminer les cellules fortement réactives vis-à-vis des peptides du soi présentés par les molécules du CMH qui sont exprimées par les cellules épithéliales de la médullaire thymique et les cellules dendritiques.

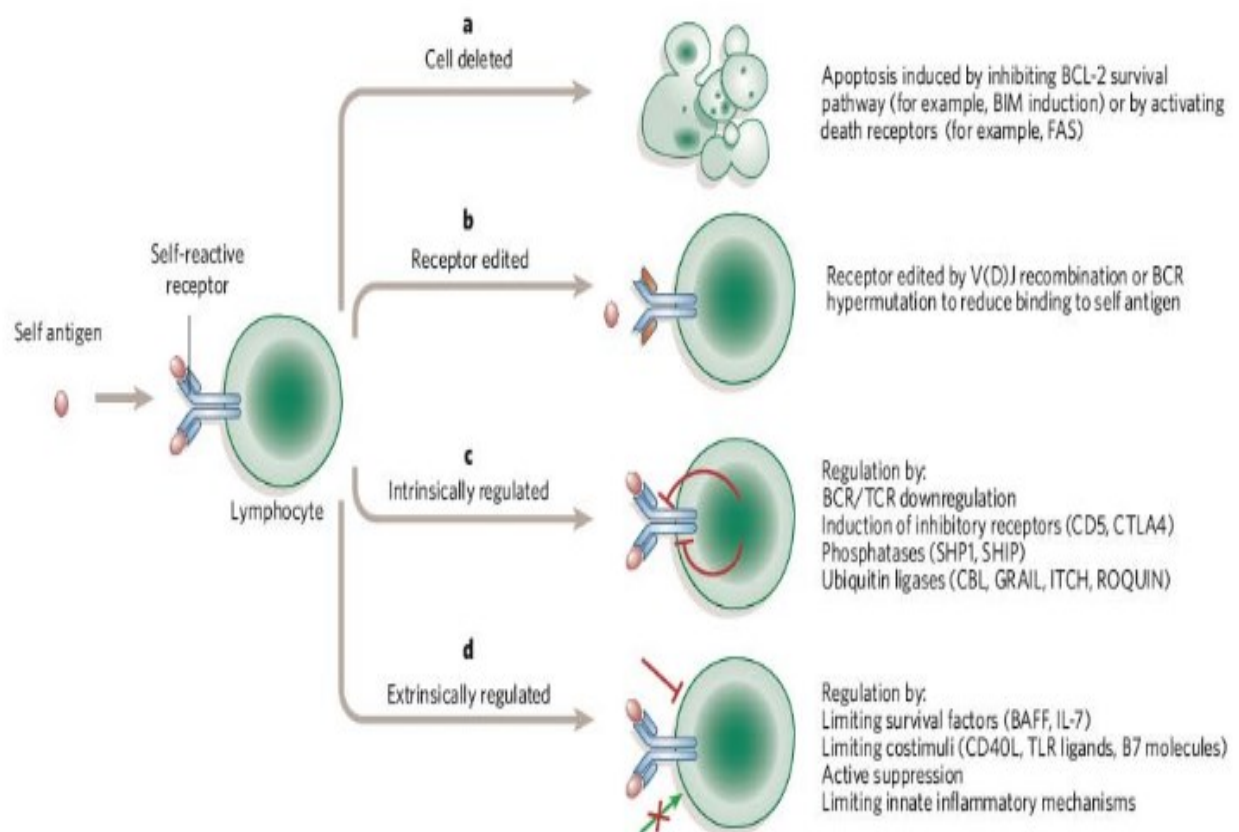


Figure 1. Les différents mécanismes de tolérance des lymphocytes T [Goodnow *et al.*, 2005].

Les cellules soumises à la sélection négative ou échappant à la sélection positive meurent rapidement par apoptose. Bien que les événements moléculaires impliqués dans ce phénomène soient encore mal connus, la signalisation de la mort cellulaire grâce aux molécules pro-apoptotiques (*BCL-2-interacting mediator of cell death* (BIM) et Fas) semble cruciale. La délétion clonale des lymphocytes T autoréactifs est une étape essentielle dans les processus de tolérance immune qui se traduit par l'élimination de 90% des thymocytes entrant en différenciation.

Les thymocytes en voie de différenciation ont aussi la possibilité d'effectuer, nous l'avons vu plus haut, une réédition de leur TCR ayant une forte affinité pour un Ag du soi. Dans ce cas, l'expression du TCR est diminuée et grâce aux recombinaisons RAG (*recombination-activating gene*) qui permettent le réarrangement des *locus* codant pour les chaînes α et β , la première chaîne α synthétisée est remplacée par une seconde chaîne. Ce second mécanisme de tolérance centrale permet donc *in fine*, la perte de la spécificité anti-soi [McGargill *et al.*, 2000].

Un dernier mécanisme de tolérance prenant place dans le thymus est l'anergie selon lequel l'interaction du TCR avec le complexe peptide/CMH conduit à l'inactivation intrinsèque du lymphocyte T. L'anergie lymphocytaire sera davantage détaillée dans la partie consacrée aux mécanismes de tolérance périphérique.

Le thymus intervient dans les processus de tolérance T non seulement par la délétion et l'anergie des cellules T autoréactives mais aussi par la sélection positive des cellules T dites régulatrices CD4+CD25^{high}. Il est désormais clairement établi que ces cellules constituent une lignée distincte T matures qui prend son origine au niveau du thymus et nécessite une interaction forte avec les cellules épithéliales thymiques exprimant un complexe peptide du soi/molécules CMH de classe II. Le thymus contribue ainsi aux mécanismes de tolérance périphérique *via* la génération de lymphocytes T régulateurs dont les caractéristiques seront abordées plus bas.

- **Le concept d'expression thymique d'antigènes tissu-spécifiques**

La diversité des Ag du soi qui sont accessibles au répertoire T qui s'établit dans le thymus va déterminer l'étendue et la spécificité de la tolérance centrale. Différentes catégories de CPA, essentiellement les cellules épithéliales thymiques (CET) de la médullaire et de la corticale, les cellules dendritiques thymiques et les macrophages, chacune présentant un ensemble unique de peptides du soi, contribuent à la diversité des Ag exprimés dans le thymus. L'absence d'autoréactivité vis-à-vis de protéines exprimées spécifiquement dans un tissu était auparavant considérée comme la conséquence exclusive de mécanisme de tolérance périphérique. En effet, n'étant pas représentés au niveau thymique, ces Ag tissu-spécifiques ne pouvaient intervenir dans la délétion des clones T autoréactifs. Depuis une décennie, les travaux démontrant l'expression thymique d'autoAg tissu-spécifiques chez l'homme, la souris ou le rat se sont progressivement accumulés (Tableau I) [Sospedra *et al.*, 1998 ; Heath *et al.*, 1998]. Les travaux de l'équipe de Klein [Derbinski *et al.*, 2001] ont révélé la diversité des protéines des tissus qui sont représentées dans le thymus humain. On estime qu'environ 5 à 10% des protéines du soi sont présentées au niveau du thymus. Ce concept est dénommé *promiscuous gene expression*. Cette expression de

gènes tissu-spécifiques est une propriété physiologique des CET, en particulier des CET de la médullaire (CETm) et persiste aussi longtemps que des cellules T émigrent du thymus, même l'involution thymique [Derbinski *et al.*, 2001]. Ce phénomène est conservé chez l'homme et la souris. De manière intéressante, certains des gènes tissulaires exprimés par les CETm sont regroupés sur des segments chromosomiques [Gotter *et al.*, 2004].

Tableau I. Autoantigènes exprimés dans le thymus et maladies auto-immunes associées [Sospedra *et al.*, 1998]

Maladies auto-immunes	Autoantigènes candidats
Maladie d'Addison	Cyp11a1*
Gastrite auto-immune	H+/K+-ATPase (chaîne α et β^*) et facteur intrinsèque*
Uvéite auto-immune	IRBP, Antigène rétinien S, α 1-cristalline*
Thyroïde de Hashimoto	Thyroglobuline, TPO
Infertilité masculine	Antigène 6 associé au sperme, glutathion transférase
Sclérose en plaque	PLP, (golli)-MBP, MOG et S100b*
Myasthénie	NACHR (chaîne α 1)
Polyarthrite rhumatoïde	Collagène de type II
Diabète de type 1	Insuline, GAD65, GAD67 et IA-2
Vitiligo	Tyrosinase, gp 100 et MART1
APECED	Nombreux autoAg
Pemphigus vulgaire	Desmoglérine 3

*L'expression thymique de ces autoAg n'a été détectée que chez la souris. Cyp11a1, cytochrome P450 11a1; IRBP, protéine de fixation à l'interphotorécepteur rétinien; TPO, thyropéroxydase; PLP, protéine protéolipidique; MBP, protéine basique de la myéline; MOG, glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline; NACHR, récepteur nicotinique à l'acétylcholine; GAD, glutamate décarboxylase; MART, antigène du mélanome reconnu par les cellules T.

La base moléculaire de ce phénomène a été découverte par l'équipe de Mathis et Benoist [Anderson *et al.* 2002] grâce à la caractérisation de souris invalidées pour le gène *AIRE*. Le gène *AIRE* (*Auto-immune regulator*), initialement identifié chez l'homme [The Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine *et al.*, 1997], code pour un facteur de transcription fortement exprimé dans le thymus, notamment par les CETm. Chez l'homme, les mutations de ce gène (une cinquantaine a été identifiée) conduisent à une maladie héréditaire monogénique définie comme le syndrome poly-endocrinien autoimmun de type 1, le syndrome APS-1 (*Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome type 1*) ou APECED (*Autoimmune Poly Endocrinopathy*

Candidiasis Ectodermal Dystrophy). L'APECED est caractérisé par un ensemble de manifestations pathologiques notamment auto-immunes touchant particulièrement les organes endocriniens (Tableau II) et par la production d'autoAc dirigés contre les composants des organes affectés [Peterson et Peltone., 2005].

Tableau II. Manifestations pathologiques du syndrome APECED [Peterson *et al.*, 2005]

Composants de l'APECED	Prévalence (%)
Maladie d'Addison	60-100
Hypoparathyroïdisme	77-100
Candidose chronique	73-100
Dystrophie ectodermale	10-77
Thyroïdite auto-immune	8-18
Diabète de type 1	4-23
Hypogonadisme	31-60
Alopécie	27-72
Vitiligo	4-26
Kératopathie	12-35
Hépatite auto-immune	10-19
Anémie perniciose	12-15
Gastrite auto-immune	6

Les souris *AIRE*^{-/-} présentent des manifestations auto-immunes proches de celles observées au cours du syndrome APECED, avec une infiltration lymphocytaire des organes cibles associée à la présence d'autoAc. L'analyse comparative du transcriptome des cellules thymiques des souris *AIRE*^{-/-} et des souris normales a montré que la protéine *AIRE* induit l'expression dans les CETm, de 200 à 1200 transcrits dont la majorité a une expression restreinte à un seul tissu. Beaucoup de ces gènes codent pour des autoAg qui sont la cible des réponses au cours de MAI, tels que la pro-insuline ou le cytochrome P450 IA2 [Anderson *et al.*, 2002]. *AIRE* exerce sa fonction de tolérisation en permettant la sélection négative des cellules T autoréactives plutôt que la sélection de lymphocytes T régulateurs que l'on sait aujourd'hui générés dans le thymus. En outre, *AIRE* semble capable d'augmenter les propriétés de CPA des CETm [Anderson *et al.*, 2005]. Par sa fonction d'induction de l'expression d'Ag tissu-spécifiques dans le thymus, *AIRE* a donc un rôle crucial dans l'acquisition de la tolérance des lymphocytes T (Figure 2). En effet, de nombreux gènes tissu-restreints sont exprimés dans les CETm matures en l'absence de *AIRE* qui ne constitue vraisemblablement pas l'inducteur exclusif de cette *promiscuous gene expression* [Derbinski *et al.*, 2005]. Par ailleurs l'expression ectopique d'Ag tissulaires dans le thymus au niveau

transcriptionnel n'est pas la condition *sine qua none* d'une délétion efficace des cellules T autoréactives vis-à-vis des peptides de cet Ag comme cela a pu être montré pour la H⁺/K⁺ ATPase, autoAg cible au cours de la gastrite auto-immune [Allen *et al.*, 2005].

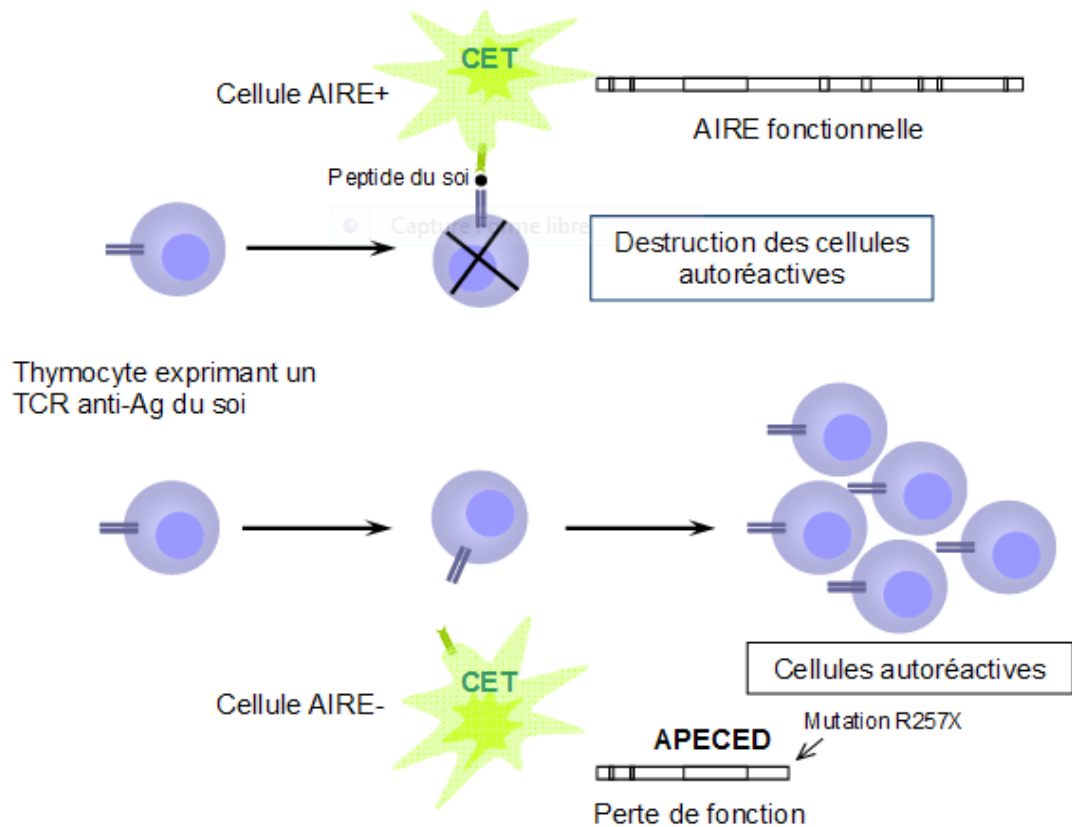


Figure 2. Rôle de la protéine AIRE dans l'induction de la tolérance intrathymique [adapté de Sakaguchi *et al.*, 2004].

Dans les conditions normales, AIRE est fonctionnelle et induit l'expression des Ag du soi par les cellules épithéliales thymiques (CET) permettant la délétion des cellules T auto réactives au cours du processus de sélection négative. Lorsque la protéine AIRE, est défective chez l'homme au cours du syndrome APECED et chez les souris AIRE-, les CET ne présentent plus les peptides du soi aux cellules T auto réactives. Ces cellules survivent, prolifèrent et initient une réponse auto-immune en périphérie lors de la rencontre avec les auAg cibles.

S'il est admis que les cellules T fortement autoréactives sont éliminées lors des évènements de sélection intrathymique, de nombreuses études ont révélé le caractère partiel du phénomène de délétion clonale. En effet, tous les Ag tissu-spécifiques ne sont pas exprimés dans le thymus (Ag séquestrés). De plus, des modifications d'ordre quantitatif et qualitatif qui seront explicitées ultérieurement peuvent affecter l'expression thymique d'autoAg. Enfin, certaines modifications

physiologiques (dégradation métabolique, spermatogenèse, lactation...) se traduisent par la synthèse de *nov*o de molécules du soi qui nécessite une tolérisation des cellules T potentiellement autoréactives vis-à-vis de ces Ag. Des mécanismes tolérogènes doivent être complétés à la périphérie, la purge des cellules T autoréactives amorcée au niveau central par les phénomènes de sélection intrathymique.

2.1.2. La tolérance périphérique

Les 4 mécanismes de tolérance périphérique qui peuvent s'exercer sur les lymphocytes T et B sont présentés dans la figure 1. L'anergie consiste en une altération fonctionnelle des cellules T autoréactives qui se traduit par une incapacité à être activées et à proliférer en réponse à une stimulation antigénique. Ce mécanisme de régulation intrinsèque des lymphocytes T peut résulter de modifications biochimiques diverses. Celles-ci consistent en la diminution de l'expression des TCR qui peut être de 50 % et, l'augmentation du seuil d'activation de la cellule par recrutement, par exemple, de molécules impliquées dans le contrôle négatif de la voie de signalisation du TCR comme CD5 ou CTLA4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*). Ces molécules ont donc un rôle crucial dans le maintien de l'anergie périphérique de lymphocytes T autoréactifs.

Un autre modèle de tolérance périphérique est l'indifférence lymphocytaire. Il s'agit d'une régulation extrinsèque du lymphocyte T par limitation des stimuli immunogéniques. Parmi les stimuli immunogéniques susceptibles d'induire cette levée d'indifférence, l'interaction de la molécule CD28 exprimée par les cellules T avec les protéines B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) à la surface des CPA a vraisemblablement un rôle majeur. De façon générale les CPA, notamment les cellules dendritiques et leur activation par l'intermédiaire des récepteurs *Toll-like* (TLR), participent étroitement à l'activation des cellules T autoréactives et donc au contrôle de la tolérance T périphérique [Turley *et al.*, 2002].

Un dernier mécanisme est l'immunorégulation, c'est-à-dire la suppression de clones T autoréactifs par d'autres populations lymphocytaires T. L'autoréactivité physiologique et, de façon plus générale, l'ensemble des réponses immunitaires sont placées sous le contrôle de plusieurs populations de cellules T régulatrices, appelées autrefois cellules T suppressives. Cette immunorégulation joue un rôle essentiel dans la tolérance périphérique comme l'illustre l'apparition d'un syndrome polyauto-immun après thymectomie chez la souris [Sakaguchi *et al.*, 2004]. Le rôle de l'immunorégulation dans la tolérance périphérique est, cependant, complexe et encore mal défini, faisant intervenir à la fois des cellules régulatrices naturelles (cellules T CD4+ CD25^{high} mais aussi cellules NKT et γ/δ^+) dont la présence n'est pas secondaire à des stimulations

exogènes ou endogènes et des cellules régulatrices adaptatives (telles que les cellules Th2, CD4⁺CD62L⁺ et Tr 1) dont la différenciation est secondaire à la stimulation par un autoAg. Néanmoins, au vu des différentes avancées réalisées sur la compréhension des lymphocytes T régulateurs et de leur utilisation potentielle dans le traitement des MAI, il est intéressant d'en décrire quelques caractéristiques. Les expériences *in vitro* ont montré que les cellules T CD4⁺CD25^{high} sont capables d'inhiber la prolifération et les fonctions effectrices de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻. Bien que ces cellules régulatrices aient une spécificité de l'autoAg, il n'est pas formellement établi que leur action suppressive soit spécifique de l'autoAg reconnu ou plus diffuse, en s'étendant à des réponses immunitaires spécifiques d'autres autoAg. En revanche, leur action suppressive semble nécessiter un contact direct avec les cellules cibles et n'apparaît pas dépendante de la sécrétion de cytokines. Toutefois, le rôle de l'IL10 et surtout du TGF- β (*transforming growth factor- β*) a été évoqué, de même que l'intervention de molécule membranaire notamment celle de la molécule CTLA4 et du GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor like receptor*). Enfin, le facteur de transcription *Foxp3* (*forkhead box3*) constituerait un marqueur spécifique des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25^{high} chez l'homme et la souris. Des mutations du gène *Foxp3* situé sur le chromosome X sont responsables chez l'homme de troubles dysimmunitaires complexes, tel que l'IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Les sujets atteints sont des enfants de sexe masculin qui présentent une sensibilité particulière aux maladies auto-immunes et allergiques. Chez la souris, les mutations du gène *Foxp3* sont à l'origine du phénotype dit *scurfy*. Les souris *scurfy* développent des pathologies analogues à celles de l'IPEX chez l'homme et présentent également une lymphoprolifération associée à une activation anormalement élevée des cellules T CD4⁺. L'étude de ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de *Foxp3* dans l'orientation et le développement thymique des cellules T régulatrices CD4⁺CD25^{high} [Sakaguchi *et al.*, 2004].

2.2. La tolérance des lymphocytes B

2.2.1. La tolérance centrale

Au niveau central, la sélection négative des lymphocytes B a lieu dans la moelle osseuse, au stade immature. Les analyses de souris transgéniques exprimant un répertoire de BCR restreint révèlent une série d'événements cellulaires qui sont déclenchés immédiatement après que des cellules B immatures arborent des récepteurs anti-Ag du soi dans la moelle osseuse. Lorsque l'affinité du BCR pour l'Ag et la signalisation intracellulaire excèdent un certain seuil, les

lymphocytes B internalisent rapidement leurs BCR et arrêtent temporairement leur programme de maturation. Trois événements vont résulter de cet état : (i) les récepteurs de « *horming* » tel que le ligand de CD62, nécessaires à l'entrée des cellules B dans les ganglions lymphatique, ne sont pas exprimés, (ii) les récepteurs pour le *B-cell activating factor* (BAFF), une cytokine requise pour la survie des lymphocytes B, ne sont pas induits ; (iii) les recombinaisons RAG-1 sont exprimées. Les cellules B immatures exprimant un BCR anti-soi de forte affinité ont alors la possibilité de ré-éditer leur récepteur. Le réarrangement du *locus* codant pour la chaîne légère par les recombinaisons permet le remplacement de la première chaîne légère par une deuxième chaîne et, *in fine*, la perte de la spécificité anti-soi [Erikson *et al.*, 1991 ; Nemazee et Hogquist, 2003]. Si leurs récepteurs autoréactifs n'ont pas été ré-édités, les cellules B meurent après 1 à 2 jours. Ce processus de délétion clonale implique l'induction du facteur pro-apoptotique BIM ainsi que la répression des récepteurs de la molécule BAFF.

Une anergie des clones lymphocytaires B dirigée contre l'Ag du soi peut également être induite au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes B anergisés présentent alors une diminution, soit de l'expression du BCR, soit des signaux d'activation de la voie de signalisation positive du BCR. Le modèle murin double transgénique pour le lysozyme de poule et un anticorps (Ac) spécifique de haute affinité dirigé contre cette molécule a largement contribué à l'exploration du phénomène d'anergie clonale. Dans ce modèle, bien que des clones autoréactifs spécifiques du lysozyme soient présents, aucune réponse humorale spécifique n'est initiée par ces cellules B [Goodnow *et al.*, 1988].

2.2.2. La tolérance périphérique

Au niveau périphérique, le lymphocyte B peut aussi manifester une indifférence vis-à-vis des AutoAg. La prolifération et la différenciation des cellules B en plasmocytes nécessitent en effet que celles-ci reçoivent deux signaux, l'un de l'Ag se liant au BCR et l'autre des cellules T auxiliaires. Les lymphocytes T peuvent délivrer leur message par le ligand de CD40 (CD40L) exprimé à leur surface et la sécrétion de cytokines telles que l'IL2, l'IL4, l'IL5 et l'IL21. L'absence du deuxième signal, c'est-à-dire de cellules T spécifiques d'un des épitopes de l'Ag conduit à l'arrêt du programme de différenciation voire à la mort cellulaire du lymphocyte B [Goodnow *et al.*, 2005]. Récemment, le rôle des TLR exprimés à la surface des cellules B a été démontré dans l'activation du lymphocyte B [Beutner *et al.*, 2004] : ceux-ci pourraient se substituer partiellement aux signaux délivrés par les cellules T pour permettre la production d'anticorps.

II. Présentation des maladies auto-immunes

Les MAI représentent l'expression pathologique du phénomène d'autoimmunité. Il est légitime de penser que des défaillances au niveau des différents mécanismes d'induction de tolérance centrale et/ou périphérique conduisent à l'émergence de lymphocytes T et B autoréactifs et donc, à la possibilité de développer des manifestations auto-immunes. Cette rupture de la tolérance est par exemple parfaitement illustrée par le syndrome APECED chez l'homme et chez la souris invalidée pour le gène *AIRE*. Dans ce cas, un défaut constitutionnel unique dans l'expression thymique des autoAg et donc, dans le processus de sélection négative des clones T autoréactifs aboutit à l'induction d'un syndrome « multi-auto-immun ». Toutefois, la plupart des MAI sont des maladies multifactorielles qui résultent non pas d'un seul facteur génétique mais de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Leur survenue n'est donc pas souvent la conséquence d'un mécanisme univoque.

1. Critères et classification des MAI

Les maladies auto-immunes sont fréquentes puisqu'elles affectent 4 à 10 % de la population en Europe et aux Etats Unis d'Amérique [Okada *et al.*, 2010]. On en connaît plus de 80 et quasiment tous les organes peuvent être touchés. Quatre postulats majeurs permettent d'affirmer l'origine auto-immune d'une maladie [Rose *et al.*, 1993] : (i) la mise en évidence d'une réaction auto-immune (humorale ou cellulaire) dirigée contre l'organe à l'origine des manifestations cliniques ; (ii) la démonstration du pouvoir pathogène des effecteurs autoimmuns *in vitro* par des tests fonctionnels ou *in vivo* par des expériences de transfert ; (iii) l'induction d'une maladie expérimentale par immunisation avec l'autoAg cible ; (iv) la prévention ou la suppression de la maladie par l'administration d'un traitement immunosuppresseur. Peu de MAI réunissent l'ensemble de ces critères et dans de nombreux cas, seuls deux ou trois de ces critères sont réunis. Il est d'usage de classer les MAI en deux catégories (Figure 3) : (i) les MAI spécifique d'organe, comme le diabète de type I, la myasthénie, les thyroïdites et les pemphigus, caractérisées par une réponse auto-immune dirigée contre des Ag exprimés spécifiquement par l'organe cible (ii) les MAI non spécifiques d'organe ou systémique, caractérisées des manifestations pathologiques plus étendues, telles que le lupus érythémateux disséminé (LED) ou la polyarthrite rhumatoïde (PR), et dont la rupture de tolérance intéresse des autoAg ubiquitaires, exprimés par un grand nombre de tissus (Tableau III). Ces maladies n'en demeurent pas moins Ag spécifique et peuvent paradoxalement s'exprimer préférentiellement au niveau d'un ou de plusieurs organes [Matsumoto *et al.*, 1999].

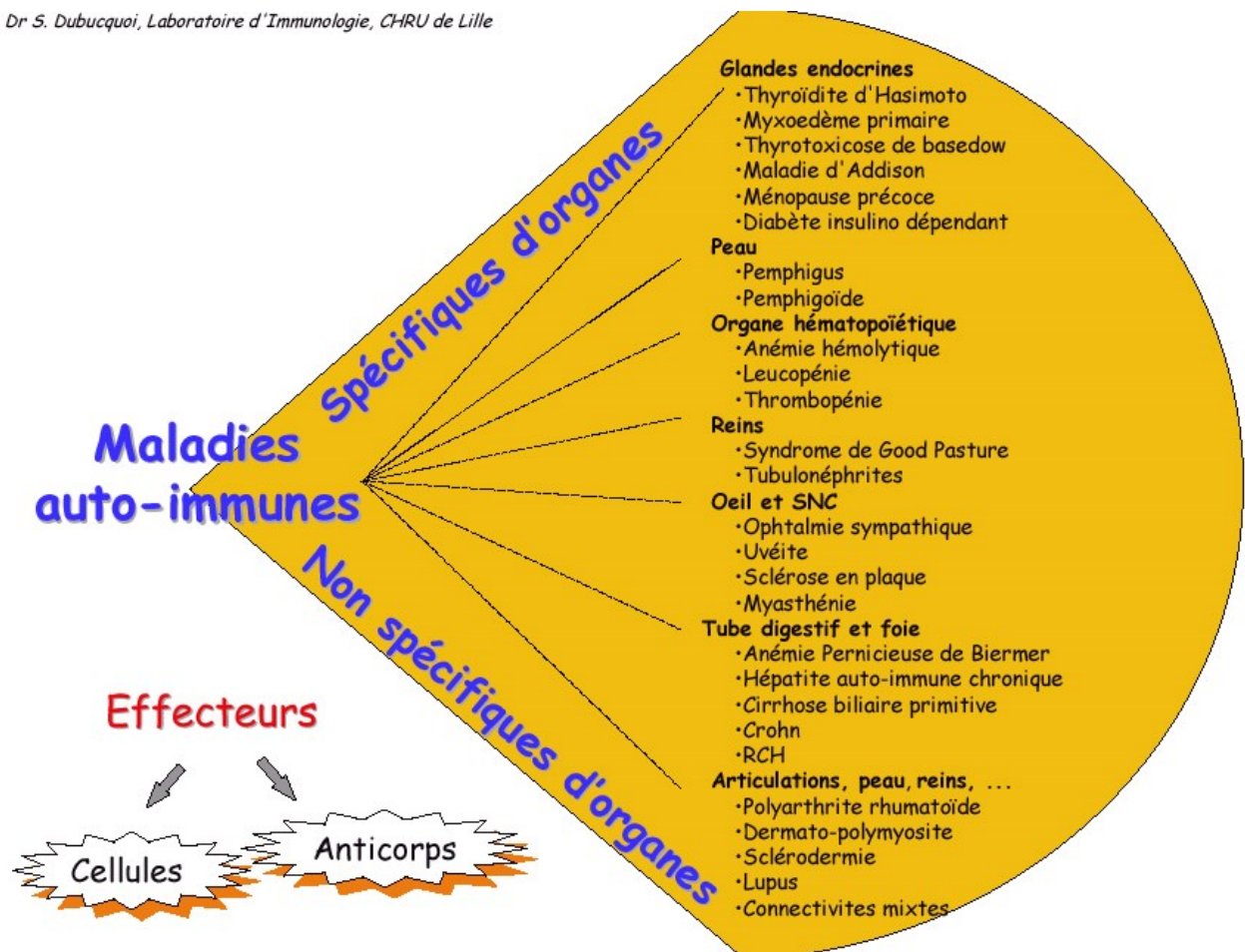


Figure 3. Les principales maladies auto-immunes [adapté de Dubucquoi, 2010]

Tableau III. Diversité des autoantigènes au cours des maladies auto-immunes [Matsumoto *et al.*, 1999]

Nature biochimique	Localisation tissulaire	Fonction	Maladies auto-immunes
Protéines			
<i>Protéines structurales</i>			
Histones	Ubiquitaire	Chromatine	Connectivites
Myosine	Muscle strié	Myofibrilles	Cardiomyopathies
Desmopgléines	Peau/Muqueuses	Desmosomes	Pemphigus
Collagène IV	Rein,	Membrane basale	Syndrome de Goodpasture
<i>Protéines fonctionnelles</i>			
Récepteur de la TSH	Thyroïde	Croissance des cellules thyroïdiennes	Maladie de Basedow
Récepteur de l'Ach	Muscles	Transmission du signal	Myasthénie
Facteur intrinsèque	Estomac	Transport vitamine B12	Anémie de Biermer
Immunoglobuline	Sang	Immunologique	Polyarthrite rhumatoïde
<i>Hormones</i>			
Insuline	Pancréas	Métabolisme du glucose	Diabète de type 1
Thyroglobuline	Thyroïde	Fonction thyroïdienne	Thyroïdite
<i>Enzymes</i>			
Pyruvate-déshydrogénase	Ubiquitaire	Mitochondries	Cirrhose biliaire primitive
H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Estomac	Formation de HCl	Gastrites auto-immunes
Glutamate décarboxylase	Pancréas	Synthèse du GABA	Diabète de type 1
Calpastatine	Ubiquitaire	Inhibition des calpaïnes	Polyarthrite rhumatoïde
Transglutaminase	Ubiquitaire	Digestion du gluten	Maladie coeliaque
<i>Acides nucléiques</i>			
ADN	Ubiquitaire	Support génétique	LED
Complexes ribonucléiques (U ₁ RNP)	Ubiquitaire	Splicéosomes	LED
<i>Lipides</i>			
Phospholipides	Ubiquitaire	Constituant membranaire	Syndrome des anti-phospholipides
<i>Polysaccharides</i>			
Antigène I	Erythrocytes et Ubiquitaire	Structure des Ags des Groupes sanguins	Anémies hémolytiques

GABA, acide gamma-amino butyrique ; LED, lupus érythémateux disséminé ; RNP, ribonucléoprotéines ; TSH Thyroid Stimulating Hormone.

Les mécanismes effecteurs de l'autoimmunité peuvent faire intervenir l'immunité cellulaire et/ou l'immunité humorale. Les autoAc, les cellules T cytotoxiques et d'autres effecteurs cellulaires ou moléculaires recrutés par les cellules auto-immunes, constituent les mécanismes lésionnels au cours des MAI.

2. Les mécanismes lésionnels des effecteurs auto-immuns

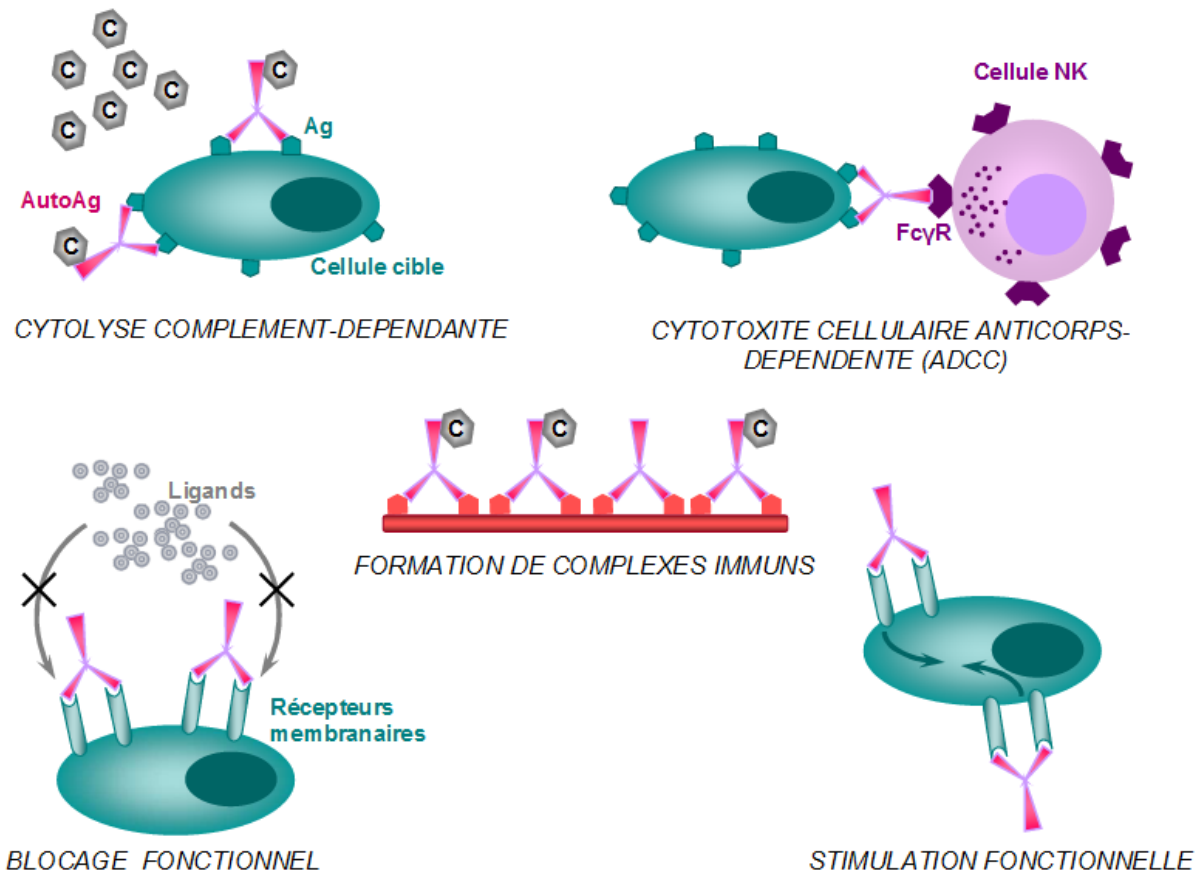
2.1. Les Autoanticorps : des facteurs lésionnels majeurs

La preuve la plus éloquente du caractère pathogène des autoAc est la capacité de transférer la maladie par le sérum des malades atteints d'une MAI. Cette démonstration peut être faite, soit chez l'animal par le transfert passif du sérum à des animaux normaux, soit chez l'homme, par transfert transplacentaire des autoAc de classe G de la mère atteinte au fœtus. Ainsi, la myasthénie [Gardnerova *et al.*, 1997], l'hyperthyroïdie [Hollingsworth et Mabry, 1976], le pemphigus [Anhat *et al.*, 1982] peuvent –ils être induits chez la souris par le transfert d'Ig G isolées à partir du sérum de malades. Le transfert d'autoAc de la mère à son fœtus est par exemple responsable de myasthénie néonatale [Gardnerova *et al.* 1997], d'hyperthyroïdie ou de pemphigus vulgaire [Chowdhury et Natarajan, 1998].

Les mécanismes par lesquels les autoAc induisent des lésions cellulaires ou tissulaires sont divers. Quatre grands mécanismes peuvent être mis en jeu (Tableau IV, figure 4).

Tableau IV. Mécanismes lésionnels des autoanticorps [Mouquet *et al.*, 2005]

Mécanismes	Maladies auto-immunes
CYTOLYSE DIRECTE	
Complément dépendante	LED
Cellulaire dépendante des Ac (ADCC)	Myocardite
<i>BLOPAGE FONCTIONNEL</i>	
D'une molécule circulante	
D'une molécule membranaire par :	
• Blocage stérique	Myasthénie, thyroïde, anémie de Biermer
• Modulation antigénique	Myasthénie
<i>SITUATION FONCTIONNELLE</i>	
D'un récepteur	Myasthénie, hyperthyroïdie, encéphalite de Rasmussen
D'une activité enzymatique	Pemphigus, LED
<i>INFLAMMATOIRE</i>	
Complexes immuns	LED, glomérulonéphrites



LED, lupus érythémateux disséminé.

Figure 4. Exemples de mécanismes lésionnels autoanticorps dépendants [adapté de Mouquet *et al.*, 2005].

La cytolysé de la cellule cible peut être secondaire à l'activation du complément. Au cours des anémies hémolytiques par exemple, les Ac anti-I fixés à la surface des érythrocytes activent le complément *via* la voie classique. Cette activation aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire C5b9 qui forme des pores dans la membrane du globule rouge et induit la lyse cellulaire. Au cours de la pemphigoïde bulleuse, une maladie auto-immune de la jonction dermoépidermique, des dépôts du fragment C3 du complément et d'IgG sont présents au siège du décollement dermoépidermique responsable de la formation de bulles cutanées chez les malades [Mouquet *et al.*, 2005]. De plus, dans le modèle expérimental murin de la pemphigoïde induite par transfert passif d'Ac dirigés contre l'autoAg cible de la maladie humaine, l'activation du complément est indispensable [Liu *et al.*, 1995]. La cytolysé médiée par les autoAc peut aussi faire intervenir les cellules monocytaires/macrophagiques. Ces cellules peuvent fixer par leur récepteur du fragment Fc des IgG (FcγR), les cellules cibles recouvertes des autoAc spécifiques d'un Ag qu'elles expriment, les phagocyter et enfin, les détruire. La phagocytose des plaquettes par les macrophages au cours des thrombopénies auto-immunes illustre ce mécanisme. La

cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) constitue un troisième mécanisme lésionnel de cytolyse directe. Cette cytotoxicité est exercée par des cellules mononuclées en particulier les cellules NK (*natural killer*). Les lymphocytes NK s'activent *via* l'interaction entre leur FcγR et les autoAc recouvrant les cellules et libèrent des granules lysosomiaux contenant des enzymes, les granzymes (sérines-estérases) et la perforine, qui vont détruire la cellule cible. Ce mécanisme interviendrait dans la destruction des cardiocytes au cours des myocardites [Anand *et al.*, 1983].

Certains autoAc ont la capacité de se lier à des récepteurs membranaires et d'en modifier l'expression ou les fonctions biologiques. La myasthénie en fournit l'illustration la plus éloquente. Des expériences de culture de lignées de cellules musculaires exprimant le récepteur à l'acétylcholine (ACh) réalisées en présence de sérum de malades atteints de myasthénie ont montré que le pontage des récepteurs par les autoAc s'accompagne de leur internalisation et d'une augmentation de leur dégradation. Cette modulation de l'expression membranaire du récepteur à l'ACh altère la transmission neuromusculaire qui caractérise la maladie. Un second mode d'action de ces autoAc anti-récepteur à l'ACh pourrait être le blocage par encombrement stérique de la liaison de l'ACh à son récepteur [Eymard *et al.*, 1997]. La thyroïdite de Hashimoto illustre également le blocage par des autoAc de la liaison d'un ligand à son récepteur. En effet, certains malades atteints de thyroïdite de Hashimoto présentent des autoAc qui bloquent le récepteur de la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) et cette fixation provoque une inhibition des fonctions thyroïdiennes [Mukhtar *et al.*, 1975]. A l'instar, de la maladie de Basedow, les autoAc anti-récepteurs de la TSH sont capables d'activer ce récepteur et ainsi d'induire une hyperthyroïdie avec sécrétion accrue d'hormones thyroïdiennes [Geenen *et al.*, 2001]. Ce mécanisme d'activation d'un récepteur par des autoAc est aussi incriminé dans l'encéphalite de Rasmussen, qui est caractérisée par une production d'Ac dirigés contre le récepteur d'un neurotransmetteur, le glutamate, à l'origine d'une épilepsie sévère et d'une démence progressive chez l'enfant [Rogers *et al.*, 1996].

Aussi des autoAc, dont la cible correspond à une protéine de surface cellulaire, semblent capables d'induire après leur fixation, la formation de seconds messagers et la transduction de signaux aboutissant à l'activation cellulaire.

Un autre mécanisme lésionnel des autoAc est lié à la formation de complexes immuns. Ces complexes peuvent se former soit dans la circulation puis se déposer au niveau des tissus, soit *in situ*, l'Ag se déposant en premier avant d'être reconnu par les autoAc circulants. Ces mécanismes de formation de dépôt des complexes immuns conduisent à l'activation du complément, à la

libération d'anaphylatoxines, au recrutement et à l'activation des polynucléaires neutrophiles qui participent aux lésions inflammatoires. Les glomérulonéphrites observées au cours du LED en constituent sans doute un bon modèle [Clough *et al.*, 1992]. Les autoAc se fixent à leurs cibles, notamment l'ADN et les constituants du nucléosome, insérés dans la membrane basale des glomérules et/ou les complexes immuns s'y déposent. Ceci entraîne l'activation du complément et la libération d'anaphylatoxines qui accroissent l'accès de la membrane basale par contraction des cellules endothéliales. L'altération de la membrane basale glomérulaire est due à trois mécanismes : (i) directement par dépôts des complexes immuns, les Ac, et le complément modifiant les propriétés électrostatiques de la membrane basale, ayant pour conséquence la fuite de protéines du sérum dans les urines (protéinurie) ; (ii) indirectement par le recrutement de polynucléaires neutrophiles qui sécrètent des enzymes digérant la membrane basale, et, (iii) par accumulation dans le temps de complexes immuns sur la membrane basale, faisant perdre au glomérule son pouvoir filtrant.

Dans certains cas on parle de la pénétration intracellulaire des autoAc. En effet, des autoAc sont capables de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, d'atteindre leur Ag par exemple nucléaire et, ainsi de modifier les fonctions cellulaires [Alarcon-Segovia *et al.*, 1996a ; Alarcon-Segovia *et al.*, 1996b]. C'est le cas des Ac anti-ribonucléoprotéines (RNP) et anti-ADN produits au cours du LED ou encore des Ac anti-Hu produits au cours des encéphalites paranéoplasiques observées chez les patients présentant un cancer du poumon à petites cellules. La mise en évidence de la capacité qu'ont certains Ac de pénétrer à l'intérieur des cellules ouvre donc de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes par lesquels certains autoAc dirigés contre des Ag intracellulaires participent au dysfonctionnement de certaines catégories cellulaires et donc de certains organes.

2.2. Les effecteurs lymphocytaires T

Le diabète de type 1 et la sclérose en plaques représentent deux prototypes de MAI médiées par les lymphocytes T. La première démonstration du caractère auto-immun du diabète de type 1 a été fournie par la détection d'autoAc dirigés contre les cellules β des îlots de Langerhans dans les sérums d'individus pré-diabétiques ou diabétiques. Les modèles de diabète de type 1 spontanés chez la souris NOD (*Non Obese Diabetic*) ou chez les rats BB (bio-breeding) ont démontré que la destruction des cellules β , caractéristique de la maladie humaine, est dépendante et assurée par les lymphocytes T, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ étant toutes deux nécessaires [Tisch *et al.*, 1996]. La spécificité du diabète de type 1 chez l'homme est l'infiltration cellulaire des îlots pancréatiques

(ou insulite). Les études immunohistochimiques ont montré que ces cellules sont majoritairement des lymphocytes T et, plus particulièrement, des lymphocytes T CD8 + auxquels s'associent des macrophages et des lymphocytes B. Le rôle prépondérant des effecteurs T dans le développement de la maladie est démontré par le fait que les lymphocytes T purifiés à partir de la rate de souris diabétiques donatrices peuvent transférer le diabète, de manière adoptive, à des souris receveuses syngéniques et non atteintes, les souris NOD-SCID, dépourvues de lymphocytes B et T, par exemple. L'induction du diabète chez l'animal receveur n'est possible que si les deux populations T CD4+ et CD8+ issues des souris diabétiques sont transférées et, ne nécessite ni la présence de lymphocytes B du donneur ni ceux du receveur [Haskins *et al.*, 1996].

Un mécanisme lésionnel médié par lymphocytes T est également impliqué dans le développement de la sclérose en plaques (SEP), et des modèles animaux d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE). L'EAE peut être induite dans de nombreuses espèces animales par immunisation avec de la myéline du système nerveux central ou certains de ses composants comme la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéolipidique (PLP), et la protéine oligodendriale de la myéline (MOG) [Liblau *et al.*, 1992]. Cette affection peut également être induite passivement par le transfert de lymphocytes T CD4+ autoréactifs à des animaux syngéniques. Il est toutefois essentiel de rappeler que ces maladies s'accompagnent de la production d'autoAc (par exemple d'Ac anti-insuline au cours du diabète ou d'Ac anti-MOG au cours de la SEP) qui constituent de bons marqueurs de la réponse auto-immune spécifique.

3. Les modèles expérimentaux de maladies auto-immunes

Les modèles animaux de MAI, qu'ils soient spontanés ou induits, sont à l'origine de progrès formidables sur la compréhension des mécanismes de rupture de la tolérance, des mécanismes effecteurs de la réponse auto-immune, et des bases génétiques qui concourent à la survenue de la maladie chez l'homme. A ce titre, l'exploitation du modèle NOD ou encore des souris lupiques a fourni une profusion d'aperçus sur la complexité de survenue des manifestations auto-immunes. Ces modèles permettent notamment d'attribuer aux autoAg un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire.

3.1. Les modèles spontanés

- **La souris NOD**

Obtenue au Japon par Makino et al à la fin des années 1960, constitue vraisemblablement le plus informatif et important modèle expérimental de diabète de type 1. L'incidence de la maladie chez

la souris NOD est de 60-80% pour les femelles et de 20-30% pour les mâles. Comme certains malades atteints de diabète de type 1, la souris NOD conjugue de manière globale, une propension génétique pour une autoimmunité multi-organe. En effet, la souris NOD peut également développer d'autres manifestations auto-immunes telles qu'une thyroïdite auto-immune, une poly neuropathie périphérique auto-immune, une sialite auto-immune ou une anémie hémolytique. Le diabète survient entre la 12^{ème} et 14^{ème} semaine chez les femelles et un peu plus tard chez les mâles. Les études histologiques ont montré que des infiltrats de cellules mononuclées sont présents autour des îlots de Langerhans (péri-insulite) des souris mâles et femelles à partir d'environ 3-4 semaines d'âge et qu'ils envahissent progressivement les îlots (insulite) préalablement à la survenue du diabète. La majorité des cellules qui composent ces infiltrats sont des lymphocytes T CD4+ bien que des lymphocytes T CD8+, des cellules NK, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages peuvent aussi être identifiés dans les lésions. Plusieurs arguments prouvent que la maladie chez la souris NOD est essentiellement médiée par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ : la capacité de transférer passivement le diabète à des souris receveuses saines par des cellules T CD4+ et CD8+ purifiés à partir de souris NOD ou de clones T (restreints par les molécules du CMH de classe I et de classe II) dérivés des îlots des souris NOD ou encore le fait que les thérapies modulant les cellules T inhibent l'incidence de la maladie. La souris NOD développe également des autoAc contre des Ag des cellules β des îlots pancréatiques de Langerhans. Tandis que le diabète est transférable par le transfert passif de sphénocytes issus d'animaux malades, il ne peut cependant pas être transféré par les autoAc de souris diabétiques, bien que les cellules B soient clairement impliquées dans le développement de la maladie. L'inflammation suivie de la destruction des cellules β productrices d'insuline par les cellules T autoréactives est la conséquence du diabète d'origine auto-immune. L'administration d'alloxane qui détruit sélectivement les cellules β des îlots de Langerhans préalablement à la survenue de la maladie, prévient l'apparition des autoAc et des effecteurs cytotoxiques dirigés contre les Ag pancréatiques et souligne que la présence de l'autoAg est indispensable pour induire la réponse auto-immune [Larger *et al.*, 1995].

- **Les souris lupiques**

Plusieurs modèles murins développent un lupus spontané caractérisé par des manifestations voisines de la maladie humaine. Quatre lignées de souris lupides sont particulièrement étudiées : les souris NZB (*New Zealand Black*), les hybrides (NZB x NZW) F1 ou BW, les souris MRL-Ipr et les souris BXSB. Chaque modèle a ses propres caractéristiques génotypiques, phénotypiques et pathologiques soulignant ainsi la diversité et la nature polygénique de la maladie lupique. Il n'en

demeure pas moins qu'il existe des caractéristiques communes à ces quatre lignées : l'hypergammaglobulinémie[Sourabié *et al.*,2015], l'activation polyclonale des lymphocytes B liée à une hyperactivité intrinsèque et/ou une réponse accrue de ces cellules à des facteurs de stimulation, la production d'Ac dirigés contre des constituant nucléaires (par exemple l'ADN, les histones), la commutation de classe précoce d'IgM en IgG, la formation de complexes immuns, les glomérulonéphrites, l'implication des lymphocytes T CD4+. L'étude des croisements entre souches auto-immunes et souches normales a montré que chaque anomalie immunologique était sous contrôle génétique (polygénique) *via* des gènes de fonction et/ou des gènes de régulation [Kotzin *et al.*, 1997 ; Morel *et al.*, 2000 ; Morel *et al.*, 2001]. Des gènes accélérateurs ou inhibiteurs de la maladie lupique ont aussi été identifiés. Par exemple, l'introduction du gène *Ipr* (codant pour une forme anormale de la molécule Fas) dans une lignée lupique induit une accélération de la maladie. Par ailleurs, le gène lié au chromosome Y des souris BXSB, soit le gène *Yaa* est à l'origine de la gravité de la maladie chez les mâles de cette lignée. Cette mutation n'a été identifiée que très récemment et consiste en la duplication du gène codant pour le récepteur TLR7 [Pisitkun *et al.*, 2006]. Ainsi, l'expression plus élevée de TLR7 sur les cellules B conduirait-elle à une augmentation de leur sensibilité vis-à-vis des Ag nucléaires contenant de l'ARN. L'analyse des nombreux modèles murins de LED cités ci-dessus a largement contribué à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui concourent au développement de la maladie notamment, à l'identification d'anomalies lymphocytaires T et B.

Ces modèles spontanés de LED ont par ailleurs apporté d'autres arguments sur l'intervention de l'autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune grâce à l'analyse du compartiment lymphocytaire B et de l'analyse structurale des autoAc dirigés contre l'ADN dont la production constitue une anomalie majeure du LED. Ces modèles ont notamment permis l'obtention d'Ac monoclonaux (Acm) anti-ADN dont la caractérisation a montré que l'expansion des cellules B autoréactives spécifiques de cet autoAg est clonale et sélectionnée par l'Ag [Radic *et al.*, 1994]. En effet, l'analyse des caractéristiques structurales des chaînes lourdes (H) et légères (L) des Acm anti-ADN dérivés de souris MRL-Ipr/Ipr et BW a montré que leur spécificité est la conséquence de mécanisme de diversification identiques à ceux observés au cours de la réponse dirigée par un Ag exogène. Certains gènes V_H non polymorphes sont utilisés préférentiellement pour élaborer une réponse anti-ADN et de façon récurrente par des hybridomes sécrétant des Acm anti-ADN. En outre, ces clones portent également des mutations somatiques qui génèrent des aminoacides créant ou amplifiant la spécificité pour l'ADN. De la sorte, l'accumulation de résidus chargés positivement, arginine ou lysine, dans les domaines variables des chaînes H et L confèrent aux Ac

anti-ADN des propriétés de protéines de liaison à l'ADN. La troisième région déterminant la complémentarité (CDR3) des chaînes H des Ac anti-ADN comporte fréquemment des résidus arginine et lysine, capables de se lier aux structures anioniques de l'ADN [Shlomchik, 1987 ; Shlomchik, 1990]. En définitive, même si le rôle d'une activation polyclonale lymphocytaire semble intervenir au cours du LED, tous les arguments expérimentaux convergent pour considérer que l'activation des clones B autoréactifs est la conséquence d'un processus dirigé par l'autoAg.

3.2. Les modèles induits

Plusieurs modèles de MAI induites ont été développés chez l'animal, dans différentes espèces, en leur injectant des extraits d'organe ou des autoAg purifiés en présence d'adjuvant. A titre d'exemple, nous décrirons un modèle de MAI expérimentales induites : l'EAE, qui mime les MAI développées spontanément et qui permettent l'étude de leurs mécanismes physiopathologiques.

- **L'encéphalomyélite allergique expérimentale(EAE)**

L'EAE est une MAI démyélinisante du système nerveux central qui peut être induite dans de nombreuses espèces animales (rongeurs, lagomorphes, primates, poulets...) en particulier chez la souris, par immunisation avec de la myéline du système nerveux central ou certains de ses composants comme la MBP, la PLP et la MOG. Ses manifestations cliniques et pathologiques ressemblent en de nombreux points à celles de la SEP. Au plan histologique, les lésions sont caractérisées par une infiltration péri vasculaire de cellules mononucléées, prédominant au niveau de la moelle épinière, constituée de nombreux lymphocytes T et de macrophages, et par une démyélinisation d'intensité variable. Il est actuellement clairement établi que les lymphocytes T CD4⁺, spécifiques de composants de la myéline, sont à la base du processus pathogène. En effet, les lésions histologiques de l'EAE ressemblent à une réaction d'hypersensibilité retardée vis-à-vis des Ag de la myéline. De plus, l'EAE peut être induite par transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs à des animaux syngéniques. Bien qu'une grande variété d'Ac spécifiques de plusieurs Ag de la myéline en particulier, la MOG et la MBP, soit détectée dans le sérum d'animaux atteints, l'implication des cellules B et des autoAc dans la physiopathologie de l'EAE reste très controversée. Par ailleurs, il ressort que le développement de l'EAE est génétiquement contrôlé, lié au moins partiellement et de façon polygénique au CMH.

Dans d'autres modèles expérimentaux, les manifestations auto-immunes chez l'animal peuvent être induites par l'injection de l'autoAg sous forme recombinante ou purifié à partir du tissu qui l'exprime. Par exemple, l'injection intradermique de collagène de type II extrait de cartilage

humain en présence d'adjuvant complet de Freund à différentes lignées de rat induit une arthrite inflammatoire dans 40% des cas. La maladie se caractérise par une synovite proliférative ressemblant à la polyarthrite rhumatoïde chez l'homme. Les réponses lymphocytaires T et B sont dirigées contre des déterminants antigéniques localisés principalement sur le fragment CB11 issu de la digestion du collagène II par le bromure de cyanogène. En effet, l'épitope 58-73 du fragment CB11 stimule aussi efficacement que la molécule complète la prolifération *in vitro* de lymphocytes T issus de souris dont l'arthrite a été induite par le collagène II. De plus, l'administration du peptide 58-73 à des rats prévient l'induction de la maladie par le collagène, démontrant ainsi *in vivo* que la réponse immunitaire dirigée contre ce peptide intervient dans la pathogénèse de l'arthrite [Ku *et al.*, 1993]. En outre, le rôle pathogène des autoAc anti-collagène II a été démontré par des expériences de transfert passif. En effet, le transfert de la maladie a été observé après (i) injection à des rats (ou à des souris) sain(e) s d'IgG provenant de rats (ou de souris) immunisé(e) avec du collagène de type II. Certaines données expérimentales, notamment issues de l'étude de l'évolution de la réponse auto-immune chez ces modèles animaux, permettent de penser que les MAI sont initiées par une réponse dirigée contre un Ag unique, qu'il soit spécifique ou non d'un tissu. Secondairement, la réponse auto-immune s'étend vers d'autres déterminants du même Ag ou d'autres Ag du même tissu, selon le phénomène épitopique intramoléculaire et intermoléculaire qui rend compte de la diversité des spécificités Ac observée au cours d'une même MAI [Lehmann *et al.*, 1993 ; Mamula *et al.*, 1998].

Ce premier point doit être particulièrement considéré du point de vue de l'intervention de l'autoAg dans le développement des MAI. En effet, au niveau des phénomènes de tolérance immunitaire, l'autoAg joue un rôle essentiel notamment, par son expression thymique qui intervient dans les phénomènes de sélection négative des cellules T autoréactives et de sélection positive des lymphocytes T régulateurs. Une anomalie de cette expression ectopique des autoAg au niveau du thymus participe très certainement à l'induction de MAI systémiques et spécifiques d'organe comme l'illustre l'APECED. Par ailleurs, il est fondamental d'insister sur le fait que l'étude des modèles expérimentaux de MAI, qu'ils soient spontanés ou induits, a entre autres permis d'attribuer aux autoAg un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire. Dans ce second chapitre consacré au rôle de l'autoAg dans les MAI, nous allons exposer de manière plus précise par quels mécanismes l'autoAg prend part à l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune.

CHAPITRE II : LE ROLE DES AUTOANTIGENES AU COURS DES MALADIES AUTO-IMMUNES

Les MAI sont caractérisées par des manifestations pathologiques qui sont la conséquence directe de l'interaction des autoAg cibles avec les mécanismes effecteurs du système immunitaire (autoAc et/ou lymphocytes T CD8 cytotoxiques). Le rôle clef de l'autoAg lui-même dans l'initiation, la propagation et la pérennisation de la réponse auto-immune a été mis en exergue et cela, en raison de ses caractéristiques structurales, de sa localisation, de ses modifications, de son apprêtement ou de sa modalité de présentation aux cellules du système immunitaire. [Zinkernagel *et al.*, 1997 ; Mocci *et al.*, 2000 ; Zingernagel *et al.*, 2001].

I. L'autoantigène initie et conduit la réponse auto-immune

Les arguments les plus directs du rôle de l'autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune sont issus de modèles animaux au cours desquels l'ablation ou l'élimination de l'organe cible prévient la mise en jeu de la réponse auto-immune. Ainsi, dans le modèle de la thyroïdite du poulet obèse, la thyroïdectomie du poulet à la naissance prévient-elle l'apparition des AutoAc et des lymphocytes T autoréactifs dirigés contre les Ag thyroïdiens tels que la thyroglobuline et la thyropéroxydase. De même chez la souris NOD, la destruction sélective des cellules β de Langerhans par l'administration d'alloxane prévient l'apparition des autoAc et des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les Ag pancréatiques. Chez l'homme, certaines observations suggèrent également que la suppression de l'autoAg s'accompagne de la diminution d'une réponse auto-immune établie. C'est ainsi qu'au cours du diabète de type 1, la destruction complète des cellules β des îlots de Langerhans par le processus lésionnel, peut s'accompagner d'une diminution, voire d'une disparition des autoAc dirigés contre les Ag pancréatiques cibles. On a également rapporté la diminution des taux d'Ac anti-thyroglobuline et anti thyropéroxydase chez les malades souffrant d'une maladie de Basedow et subissant une thyroïdectomie. A ces arguments directs s'associent des arguments indirects fondés sur l'analyse des caractéristiques structurales des autoAc et de TCR exprimés par les lymphocytes autoréactifs au cours des MAI spécifiques d'organe et non spécifiques d'organe. Au cours des MAI spécifiques d'organe, ces arguments sont issus de l'analyse des chaînes β du TCR exprimées par les clones T sélectionnés sur leur capacité à reconnaître des autoAg de l'organe cible. C'est ainsi que les clones T V β 13.1 dirigés contre un peptide immunodominant de la MBP et partageant une CDR3 ont été observés chez plusieurs malades atteints de SEP [Oksenberg *et al.*, 1993]. Des CDR3 de séquences identiques ont été également identifiés dans les chaînes β du TCR des cellules T CD4⁺ isolées de malades atteints de

maladie cœliaque [**Prisco et al., 1997**]. Cette démonstration d'une identité structurale entre clones lymphocytaires T spécifiques d'un même autoAg et isolés de différents patients atteints d'une même MAI est un argument majeur en faveur de l'intervention d'un autoAg dans l'initiation de la réponse auto-immune.

Etant donné le rôle de l'autoAg dans la survenue du processus auto-immun, il est logique de penser que des variations dans sa localisation, ses caractéristiques structurales, son niveau et ses modalités d'expression jouent un rôle essentiel dans sa capacité à activer les lymphocytes T et B autoréactifs.

II. la séquestration des autoantigènes

1. La séquestration anatomique

Malgré la démonstration de la présence d'une multiplicité d'Ag tissu-spécifiques dans le thymus humain, certains Ag sont exclusivement exprimés au niveau d'un tissu et ne permettent donc pas la sélection négative des clones T autoréactifs qui *in fine*, vont circuler en périphérie [**Sebzda, 1999**]. Cette séquestration anatomique d'Ag du soi peut rendre compte de la rupture de la tolérance lorsque ces molécules sont anormalement libérées, apprêtées par les molécules du CMH et présentées aux cellules T autoréactives passées à la périphérie [**Sebzda, 1999**]. C'est le cas des Ag séquestrés (Ag portés par les spermatozoïdes ou le cristallin) dont la libération anormale à l'occasion d'un traumatisme ou d'une infection, peut induire la survenue d'une MAI spécifique d'organe (orchite auto-immune secondaire à une vasectomie, ophtalmie sympathique consécutive à une intervention sur l'œil). Par ailleurs, certains syndromes paranéoplasiques neurologiques pourraient relever d'un tel mécanisme en raison de l'expression anormale par les cellules tumorales de l'Ag qui était jusqu'ici ignoré par le système immunitaire avant son expression ectopique [**Darnell et al., 1996**].

2. La séquestration moléculaire [Moudgil, 2005].

Il existe un autre type de séquestration présentée par certains autoAg, dite séquestration moléculaire. En effet, au sein d'une protéine, certains peptides ont une forte affinité pour les molécules du CMH et sont présentés de façon privilégiée aux TCR par rapport à d'autres peptides de cette protéine. Il existe donc une hiérarchie peptidique des Ag du soi qui sont dits dominants, sous-dominants ou cryptiques selon leur capacité à s'associer aux molécules du CMH. Les principes de cette théorie sont que : (i) tout Ag protéique et notamment les Ag du soi, présente une minorité d'épitopes immunodominants impliqués dans la sélection négative et responsables de la

tolérance T efficace ; (ii) à l'inverse, la majorité des déterminants d'une protéine sont cryptiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas efficacement apprêtés et présentés aux clones T potentiellement autoréactifs vis-à-vis de ces déterminants. Ce mécanisme aboutit donc à un défaut de tolérisation des lymphocytes T spécifiques d'épitopes sous-dominants ou cryptiques qui gagnent alors la périphérie. Certaines circonstances contribuent à la présentation de déterminants antigéniques cryptiques aux cellules T et par conséquent, à l'induction d'une réponse auto-immune. Par exemple, lors d'infection virale ou bactérienne, un peptide porté par l'agent pathogène peut être identique structuralement à un épitope cryptique d'un Ag du soi (phénomène de mimétisme moléculaire) qui dans ce contexte, peut devenir immunodominant. Une réaction inflammatoire peut aussi constituer une situation propice à l'apprêtement et la présentation d'épitopes cryptiques par les CPA. Au cours de l'inflammation, la formation de complexes immuns peut faciliter l'immunogénicité de peptides cryptiques étant donné que l'Ag complexé comme substrat de la machinerie cellulaire peut moduler l'apprêtement de l'Ag par rapport à sa forme libre et notamment, augmenter de 10 à 100 fois sa présentation par les molécules du CMH de classe II.

Cette « déséquestration » de l'autoAg au niveau moléculaire, illustrée par ces différents mécanismes, ne concerne pas seulement l'initiation de la réponse immunitaire mais également sa pérennisation et son extension *via* le phénomène d'extension épitopique [Vanderlugt *et al.*, 2002]. En effet, on considère que la première vague successive de réponses contre des déterminants antigéniques de la même molécule (extension épitopique intramoléculaire) ou de molécules physiquement liées (extension épitopique intermoléculaire). Ce phénomène pourrait rendre compte de la diversification de la réponse auto-immune contre différents Ag de l'organe cible que l'on observe fréquemment au cours de MAI spécifiques d'organe.

III. Les modifications des antigènes du soi

Une importante interrogation concernant la rupture de tolérance est de déterminer si les autoAg sont normales ou modifiés, les deux situations étant apparemment possibles [Doyle, 2002]. La théorie du soi modifié constitue néanmoins, une hypothèse plus séduisante pour rendre compte du déclenchement d'un processus d'auto-immunité chez l'homme. Les modifications des Ag du soi par les métaux lourds, au cours des processus d'apoptose, de cancer, de réparation tissulaire ainsi que celles générées par des modifications co- et post-traductionnelles seront traitées dans cette partie.

1. Modifications de l'autoantigène par les métaux lourds

La création de néo-autoAg peut être la conséquence de l'interaction entre les Ag du soi et les métaux lourds. Les métaux tels que l'or, possède une forte capacité oxydative qui peut être responsable de l'oxydation des chaînes latérales des aminoacides constituant les Ag protéiques et, ainsi, conduire à leur dénaturation. Par ailleurs, des complexes protéine-métal peuvent se former *via* la fixation des métaux aux chaînes latérales des protéines. Ces deux mécanismes pourraient être à l'origine d'une activation de cellules T n'ayant pas été tolérés vis-à-vis de ces peptides du soi altérés [Griem *et al.*, 1995].

2. Modifications de l'autoantigène et processus apoptotique

Un autre exemple du rôle des déterminants néo-antigénique dans l'induction d'une réponse effectrice est fournie par les modifications des autoAg reconnus par les autoAc à l'occasion du phénomène d'apoptose rencontré au cours du LED. Certains Ag reconnus au cours du LED subissent des modifications de concentration, de distribution cellulaire et de structure au cours de l'apoptose et ce sont ces modifications qui interviendraient dans l'initiation et la propagation de la réponse auto-immune au cours de la maladie [Casciola-Rosen, 1994]. Le premier constat est que les autoAg cibles au cours du LED subissent une redistribution géographique dans la cellule en apoptose, plus spécifiquement une concentration et un regroupement dans les vésicules de surface des cellules apoptotiques. En effet, les vésicules apoptotiques sont considérablement enrichies en Ag ribosomaux, protéines Ro et La, smRNP, poly (ADP-ribose) polymérase qui ont normalement une distribution, nucléaire diffuse [Casciola-Rosen *et al.*, 1994]. En outre, la surface des vésicules apoptotiques exprime la phosphatidylsérine qui a la capacité de se lier à des protéines qui sont la cible de la réponse au cours de MAI non spécifiques d'organe, comme le β 2-glycoprotéine et l'annexine V. Ces observations suggèrent que la vésicule apoptotique et son contenu antigénique constituent la source des immunogènes majeurs au cours du LED à l'origine de la réponse autoAc si particulière de la maladie. La deuxième observation majeure est que certains des autoAg mentionnés précédemment sont des substrats d'enzymes protéolytiques mises en jeu au cours du processus apoptotique. Par exemple, la poLy (ADP-ribose) polymérase subit un clivage protéolytique par une famille de protéases à cystéine appelées caspases [Yamanaka *et al.*, 1987]. Des travaux ultérieurs ont montré le clivage par les caspases, d'autres Ag impliqués au cours du LED [Martin *et al.*, 1995 ; Waterhouse *et al.*, 1996 ; Casiano *et al.*, 1996 ; Takeda *et al.*, 1999]. D'autres modifications structurales pourraient affecter les autoAg au cours du processus apoptotique. A cet égard, il a été montré qu'au cours du LED, les autoAc ciblent fréquemment des

protéines sélectivement phosphosphorylées durant l'apoptose par des sérine/thréonine-kinases. et qui correspondent soit à des Ag déjà identifiés soit à de nouvelles protéines spécifiques de l'apoptose [Utz *et al.*, 1997 ; Utz *et al.*, 1998]. Ces protéines modifiées, c'est-à-dire clivées par une caspase ou modifiées par une kinase pourraient constituer des néo-épitopes vis-à-vis desquels les cellules T ne sont pas tolérisées qui *in fine* contribueraient à l'activation des lymphocytes B spécifiques de ces Ag. Par ailleurs, il est essentiel de rappeler que des cellules apoptotiques ne sont pas immunologiquement passives, mais peuvent exercer, selon la CPA avec laquelle elles interagissent, un effet positif ou négatif sur le système immunitaire. Par exemple, les cellules dendritiques, à l'inverse des macrophages, présentent de façon efficace les Ag dérivés des cellules apoptotiques et sont capables de stimuler des lymphocytes T [Bellone *et al.*, 1997].

L'immunisation intraveineuse de souris non auto-immunes avec des thymocytes apoptotiques syngéniques induit la production transitoire d'autoAc, notamment d'Ac anti-cardiolipine et ADN simple brin ainsi que des dépôts glomérulaires d'immunoglobulines rappelant les anomalies biologiques et histologiques du LED [Mevorach *et al.*, 1998]. Il convient aussi de noter que les vésicules de surfaces des kératinocytes en apoptose se lient au C1q, le premier composant de la voie d'activation classique du complément et qui peut lui conférer un rôle essentiel dans la clairance des cellules apoptotiques. Or, le déficit en C1q est quasiment constamment associé à un LED chez l'homme comme chez les souris invalidées pour le gène du C1q [Korb *et al.*, 1997]. Tout se passe comme si la génération et l'accumulation de vésicules apoptotiques et des Ag modifiés qu'elles contiennent constituent un des principaux mécanismes immunogènes des cellules T et B au cours du LED.

3. Modifications de l'autoantigène et cancer

D'autres modèles défendent le concept du soi modifié dans le déclenchement d'une réponse auto-immune. Des anomalies des gènes codant pour la protéine p53 sont observées chez environ 50% des malades ayant un cancer du poumon ou un cancer du sein parmi lesquels 20 à 30% développent des Ac dirigés contre la protéine p53. L'étude des lignées cellulaires de malades atteints de cancer du poumon a révélé la présence de mutations du gène p53 qu'il s'agisse de mutations ponctuelles, de mutations générant un codon stop ou de mutations décalant le cadre de lecture. Ces mutations ponctuelles peuvent être à l'origine de la production de protéines p53 dont les fonctions sont altérées et surtout, dont la stabilité intracellulaire est considérablement augmentée en regard de la protéine p53 sauvage qui est rapidement dégradée [Tilkin *et al.*, 1995]. La première hypothèse est que ces autoAc anti-p53 sont dirigés contre la protéine altérée.

Cependant, il a été démontré que ces autoAc reconnaissent à la fois la forme mutante et la forme sauvage et notamment des épitopes situés en dehors des points chauds de mutation. Ceci suggère que c'est plus la persistance de la protéine p53 ou la formation de complexes entre la protéine mutante et d'autres protéines qui est à l'origine de la réponse auto-immune, que la formation de néo-épitopes. Il n'en demeure pas moins que l'hypothèse de la formation de néo-épitopes liée à la mutation de certaines qui sont la cible de la réponse auto-immune au cours du cancer reste une hypothèse attractive dans les phénomènes d'immunisation anti-tumorale [Winter *et al.*, 1992 ; Davidoff *et al.*, 1992].

4. modifications de l'autoantigène au cours des processus de réparation tissulaire

Les modifications de l'autoAg au cours des mécanismes de réparation peuvent également intervenir au cours des MAI. Cet autre aspect de la contribution de l'expression de l'autoAg dans l'autoréactivité est illustré par la démonstration de l'expression d'isoformes embryonnaires de la MBP au cours des processus de remyélinisation observés dans la SEP et dans son modèle expérimental murin, l'EAE.

5. Modifications co- et post-traductionnelles des Autoantigènes.

Un autre exemple de formation de néo-Ag susceptible d'induire une rupture de la tolérance est apporté par les modifications co- et post-traductionnelles d'autoAg [Doyle *et al.*, 2002], comme par exemple, la citrullination des protéines au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR) [Schellekens *et al.*, 1998]. La citrulline est un constituant majeur des déterminants antigéniques reconnus par les autoAc présents dans le sérum de malades atteints de PR. C'est la déimination des résidus arginine par l'enzyme peptidyl-arginine déiminase qui transforme les résidus arginine en citrulline. L'observation qu'une modification post-traductionnelle des résidus arginine génère des déterminants antigéniques B suggère un nouveau mécanisme de production des autoAc. Une hypothèse est que la tolérance est établie vis-à-vis de la protéine non modifiée. Ainsi, quand la protéine modifiée et maturée est présentée au système immunitaire, comme par exemple après une lyse cellulaire massive, l'Ag modifié pourrait induire une réponse immunitaire et, par extension épitopique, conduire à une réponse auto-immune polyclonale contre la protéine entière. De nombreux exemples avérés de réponse auto-immune T et B contre des Ag modifiés co- et post-traductionnellement illustrent ce concept (Tableau V). A l'inverse, il a été clairement démontré qu'au cours du LED et de l'EAE, l'absence d'une de ces modifications préexistante au niveau physiologique sur un Ag du soi peut également induire une réponse auto-immune

Tableau V. Modifications post-traductionnelles associées aux maladies auto-immunes [Doye *et al.*, 2002]

Modifications	Autoantigènes	Maladies auto-immunes
Glycosylation	Collagène de type II	PR
Phosphorylation	Multiples	LED
Oxydation	LDL	Athérosclérose
Déamidation	Gliadine	Maladie cœliaque
Isoaspartylation	SnRNP	LED
Transglutamination	Histone H2B, actine, myosine	LED
Déimination (citrullination)	Fibrine	PR
Nitration des tyrosines	MBP	EAE/SEP
	Multiples (tissu inflammatoire)	LED

EAE, encéphalomyélite allergique expérimentale ; LED, lupus érythémateux disséminé ; LDL, *Light-Density Lipoprotein* ; MBP, protéine basique de la myéline ; PR, polyarthrite rhumatoïde ; SEP, sclérose en plaque ; smRNP, *small nuclear ribonucleoproteins*.

IV. Le polymorphisme génique des autoantigènes

Les maladies auto-immunes sont des maladies complexes dites multifactorielles qui résultent de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Ces maladies polygéniques font intervenir de nombreux *locus* de susceptibilité qui, pris isolément, sont le plus souvent ni nécessaires ni suffisants à leur développement. Le déterminisme génétique aux MAI peut schématiquement se placer à 3 niveaux : la réactivité globale du système immunitaire, l'autoAg et sa présentation, la réponse et la sensibilité de l'organe cible. Il est désormais bien établi que la plupart des MAI est associée au *locus* HLA. Cette partie ne traitera que du polymorphisme de l'Ag et de sa contribution, par le biais de différents mécanismes d'action, à la survenue des MAI spécifiques et non spécifiques d'organe. (Tableau VI).

Tableau VI. Polymorphismes géniques d'autoantigènes et mécanismes associés [Doye *et al.*, 2002]

Mécanismes	Autoantigènes	Maladies auto-immunes
TOLERANCE INTRA THYMIQUE	Insuline	Diabète de type 1
PRESENTATION DE L'ANTIGENE	CHRNA	Myasthénie
PRODUCTION D'AUTOANTICORPS	DsgI	Pemphigus
	β2-GPI	SAPL
	Ro52kD	Syndrome de Sjögren

CHRNA, sous-unité α du récepteur musculaire à l'ACH ; DsgI, Desmoglérine 1 ; β2-GPI, β2 glycoprotéine 1 ; SAPL, syndrome des anti-phospholipides.

1. Modèle de la myasthénie

La myasthénie est une MAI caractérisée par la production d'autoAc dirigés contre la sous-unité α du récepteur musculaire à l'acétylcholine (CHRNA). Grâce à l'étude de marqueurs microsatellites situés dans le premier intron du gène *CHRNA*, Garchon *et al.* ont démontré l'association entre l'allèle HB*14 d'un des microsatellites et la maladie [Garchon *et al.*, 1994]. Le mécanisme d'action de ce polymorphisme n'est cependant pas connu et n'est probablement pas direct, ce dernier siégeant sur une séquence intronique et aucune fonction n'étant attribué aux microsatellites chez les eucaryotes supérieurs. Il s'agit donc probablement de marqueurs génétiques en déséquilibre de liaison avec d'autres polymorphismes fonctionnels. Deux hypothèses ont été émises, l'une impliquant un polymorphisme de régions régulatrices de l'expression du gène, l'autre impliquant un polymorphisme des séquences codantes capables de moduler l'immunogénicité de la protéine. Pour étayer cette hypothèse, et plus précisément la capacité de ce variant à générer des peptides capables de s'associer avec les molécules HLA de susceptibilité, l'effet du marqueur HB*14 sur la distribution des génotypes HLA a été étudié. Cette étude a permis de montrer une augmentation significative du génotype DQA1*0101/0501 chez les patients HB*[Djabiri *et al.*, 1997]. Le rôle direct de l'allèle DQA1*0101 a pu être démontré dans la mesure où les allèles des gènes DRB1 et DQB1 en déséquilibre de liaison avec DQA1*0101 ne sont pas associés à la maladie. En revanche, le rôle direct de DQB1*0501 n'a pu être individualisé au sein de l'haplotype étendu DR3. Ces résultats ont conduit à proposer un modèle polygénique de susceptibilité à la myasthénie auto-immune faisant intervenir 3 gènes : le gène de l'autoAg *via* l'existence d'un variant qui serait présenté par le produit du gène DQA1*0101 associé à une chaîne β, la réaction auto-immune étant favorisée par un troisième gène de régulation immunitaire situé sur l'haplotype DR3.

2. Modèle du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une MAI spécifique d'organe qui est déclenchée par la destruction des cellules β des îlots de Langerhans responsables de la sécrétion d'insuline. C'est la MAI la plus étudiée et la mieux caractérisée sur le plan génétique. L'implication du complexe HLA est connue depuis 1973 [Singal *et al.*, 1973 ; Cudworth *et al.*, 1974] et a été confirmée et évaluée à 40-50% de la composante génétique de la maladie [Thomson *et al.*, 1988]. L'association la plus forte est retrouvée avec les gènes de classe II (DRB1, DQA1 et DQB1) et plus particulièrement avec les allèles DR4 et DR3 dont l'un au moins est retrouvé chez 90% des patients atteints de diabète de type 1 contre seulement 45% de la population générale. D'autres facteurs génétiques non HLA sont également en cause [Risch *et al.*, 1987]. Parmi les régions identifiées, *IDDM2* (située sur le bras court du chromosome 11) contient le gène de l'insuline (*INS*) [Bell *et al.*, 1984 ; Bain *et al.*, 1992]. Dix variants fortement associés à la maladie ont été identifiés dans un segment génétique de 4,1 kb incluant le gène *INS*. De vastes études d'association analysant la fréquence des différentes combinaisons génotypiques de ces 10 variants, ont permis d'identifier 4 polymorphismes comme étant significativement plus associés à la maladie que les autres [Julier *et al.*, 1994]. L'un de ces variants correspond à un VNTR (*variable number of tandem repeats*), de la région située en 5' du gène *INS* et contenant un polymorphisme résultant d'un nombre variable de répétition en tandem d'éléments de 14 pb. La taille des différents allèles se répartit selon une distribution trimodale permettant de distinguer 3 classes (classe I : 20 à 63 répétitions, classe II : 64 à 139 répétitions et classe III : 140 à 210 répétitions). Les allèles associées au diabète de type 1 sont les allèles de classe I à l'état homozygote qui sont retrouvés chez 78% des patients contre 45% des témoins. Les allèles de classe I apparaissent donc comme des traits récessifs. Leur rôle peut être envisagé autrement, puisque la présence d'au moins une copie des allèles de classe III est associée à une diminution du risque de développer la maladie, cette classe d'allèle constituant un trait dominant de protecteur contre la maladie. Cette vision est confortée par la mise en évidence d'un effet protecteur variable en fonction de certains sous-groupes de classe III. Cet effet protecteur pourrait être lié au niveau d'expression du gène de l'insuline dans le thymus [Jolicœur *et al.*, 1994]. En effet, il a été montré que l'insuline est exprimée dans le thymus chez l'homme comme la souris, et que le niveau d'expression du gène *INS* sous la régulation du VNTR, avec 2 à 3 fois d'ARN messager (ARNm) du gène *INS* chez les porteurs des allèles de classe III que chez les sujets porteurs des allèles de classe I. L'effet protecteur pourrait alors s'expliquer par une délétion intrathymique des clones T autoréactifs ou par une sélection positive de cellules régulatrices CD4 + CD25^{high}. A cet égard, l'étude d'un modèle murin dans lequel l'expression thymique de l'insuline est progressivement réprimée montre une corrélation inverse entre la

concentration thymique et la réaction lymphocytaire T contre cet autoAg en périphérie [Chentoufi *et al.*, 2002]. Enfin, l'absence d'expression de la pro-insuline 2 conduisant à une accélération de la maladie chez les souris NOD/pro-insuline 2^{-/-} conforte le rôle de l'expression thymique de l'insuline dans la susceptibilité au diabète [Thébault-Baumont *et al.*, 2003]. Quoiqu'il en soit, le VNTR de l'insuline constitue le candidat fonctionnel le plus probable au niveau du locus *IDDM2* et pourrait agir en modifiant l'accessibilité des régions en 5' du gène, aux molécules régulant son expression [Lucassen *et al.*, 1995 ; Kennedy *et al.*, 1995 ; Bennett *et al.*, 1995].

CHAPITRE III: ROLE DES CELLULES TH17/TREGS DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES

I. Polarisation de la réponse immunitaire T et lymphocytes T régulateurs

1. Polarisation TH1, TH2, TH17

On distingue plusieurs types de réponse immunitaire selon l'orientation des LT CD4⁺ naïfs, appelés TH0 (Figure 2). Une orientation Th1, sous la dépendance des facteurs de transcription T-bet et STAT4, conduit à la sécrétion d'IFN- γ , entraînant la production d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α . La réponse Th1 est impliquée dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, responsable d'une activation des LT- cytotoxiques, et participe à la réponse antitumorale, antivirale et contre les bactéries intracellulaires. Elle a été associée à de nombreuses MAI. Un environnement riche en IL-12 va orienter les cellules Th0 vers une réponse Th1, alors que l'IL-4 entraîne une réponse Th2. Les lymphocytes Th2 vont sécréter de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 sous la dépendance des facteurs de transcription STAT5 et GATA3. Ces cytokines activent les LB et favorisant la réponse immunitaire humorale. Un déséquilibre vers la voie Th2 intervient principalement au cours de l'atopie. Ces populations Th1 et Th2 ont un rôle antagoniste en s'inhibant mutuellement via l'IFN- γ et l'IL-4 [Liew *et al.*, 2002].

La réponse Th17 est de découverte plus récente. Responsable d'une réponse inflammatoire importante, elle participe à la défense contre les germes extracellulaires, les champignons et est également impliquée dans les mécanismes d'auto-immunité [Afzali *et al.*, 2007]. La différenciation des cellules Th0 en TH17 se fait sous l'action conjointe de l'IL-6 et du TGF- β chez la souris. Chez l'homme, le rôle de l'IL-6 est moins évident et le TGF- β intervient de façon indirecte en inhibant la polarisation Th1. Une boucle d'amplification est ensuite créée par sécrétion autocrine et paracrine d'IL-21. Enfin, l'IL-23 permet une stabilisation de la lignée cellulaire et est nécessaire à la survie des lymphocytes Th17. Le facteur de transcription principal est ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor gamma t*). Les Th17 sécrètent de l'IL-17 et IL-

21 à activité pro-inflammatoire. Les cellules Th1 et Th2 ont un effet répresseur sur la différenciation en cellule Th17, par la sécrétion respective d'IFN- γ et d'IL-4 [Bettelli *et al.*, 2007 ; Steinman *et al.*, 2007]. Plusieurs MAI, notamment la PR étaient jusqu'à présent considérées comme des pathologies à médiation Th1. Depuis la découverte des lymphocytes Th17, ces considérations ont évolué. Au cours de la PR, les lymphocytes Th17 jouent un rôle important notamment au niveau articulaire, en augmentant la production de métalloprotéases, en stimulant les ostéoclastes et en inhibant la prolifération des chondrocytes [McInnes et Schett, 2007]. Par ailleurs, les lymphocytes Th17 inhibent la différenciation en lymphocytes Th1 par régulation négative de la chaîne α du récepteur à l'IL-12, les lymphocytes Th1 jouant plutôt un rôle protecteur au cours de la PR [Toh *et al.*, 2010].

Les maladies auto-immunes étant décrite comme maladie à médiation Th17/Treg, leurs rôles méritent également d'être étudiés. A ce jour, quelques études ont déjà été réalisées par deux équipes à partir des lymphocytes circulants, avec des résultats discordants, les lymphocytes Th17 étant tantôt élevés (Zhang *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2010), tantôt à des taux similaires à ceux des témoins [Guo *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2008].

D'autres sous-populations de LT ont été récemment décrites ; les lymphocytes Th22 (producteurs d'IL-22), les lymphocytes Th9 (producteurs d'IL-9 et d'IL-10) et les lymphocytes Th21 ou lymphocytes T auxiliaires folliculaires (*T follicular helper*) qui coopèrent avec les LB au niveau du follicule secondaire. Leurs rôles en physiologie et surtout en physiopathologie sont encore très mal connus [Annunziato *et al.*, 2009 ; King *et al.*, 2009].

Des travaux ont montré que cette polarisation Th1, Th2, Th17 ou Treg n'était pas un processus définitif puisqu'en fonction de l'environnement cytokinique local, les LT pouvaient évoluer notamment de Th17 à Th1, de Treg à Th17, ou de Th2 à Th9. En fait, à un état précoce de différenciation, l'ensemble des LT (Th1, Th2, Th17 ou Treg) peut être facilement redirigé vers un autre sous-type de polarisation [Annunziato *et al.*, 2009 ; Bluestone *et al.*, 2009 ; Peck et Mellins, 2010]. Par exemple, des lymphocytes Th2 cultivés en présence d'IL-12 sont capables de produire de l'IFN- γ . En revanche, à un stade tardif de différenciation, seuls les lymphocytes Th17 et les Treg gardent une plasticité, les lymphocytes Th1 et Th2 étant différenciés de façon terminale [Zhu et Paul, 2010]. Les Treg peuvent également, dans un environnement pro-inflammatoire constitué de CPA allogéniques, d'IL-2 ou d'IL-15, se différencier en lymphocytes Th17 [Koenen *et al.*, 2009]. Ainsi, le microenvironnement cytokinique local, conséquence de la réaction immunitaire innée et aussi adaptative, est donc capital dans l'orientation initiale de la réponse immunitaire mais aussi dans son évolution dans le temps. Il est donc fort probable qu'il existe au

cours des MAI, des perturbations de ce microenvironnement, responsables de la chronicisation inadaptée d'une réponse immunitaire autoréactive.

Ces données permettent une approche « dynamique » et non pas « figée » de la réponse immunitaire. Elles mettent en avant le rôle primordial du microenvironnement cytokinique ainsi que les possibilités de réorientation de la réponse immunitaire lorsque les cellules ne sont pas engagées dans une différenciation terminale. Ainsi, un LT pourra subir des polarisations différentes au cours de sa vie, selon les proportions relatives des différents facteurs de transcriptions à un instant t , eux-mêmes régulés par de nombreux facteurs intrinsèques [O'Shea et Paul, 2010].

2. Lymphocytes T régulateurs

2.1. Définition des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une sous-population lymphocytaire aux propriétés immunorégulatrices. Leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles seront détaillées successivement.

2.2. Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T régulateurs «naturels»

2.2.1 Expression membranaire constitutive de CD25

Le CD25 correspond à la chaîne α du récepteur de l'IL-2. Il s'agit d'un marqueur membranaire non spécifique puisque exprimé par les LT effecteurs après activation. Cependant, les Treg expriment cette molécule de façon constitutive avec une forte intensité et ils ont longtemps été identifiés par le phénotype $CD4^+CD25^{High}$, bien que la limite retenue en analyse par cytométrie en flux reste sujet à débat [Baecher-Allan *et al.*, 2005]. Contrairement aux LT effecteurs, les Treg ne sécrètent pas d'IL-2 après stimulation, le facteur de transcription Foxp3 agissant comme répresseur du gène de cette cytokine [Bettelli *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2006]. C'est la sécrétion paracrine d'IL-2 par les LT effecteurs qui participe à la survie des Treg [Setoguchi *et al.*, 2005] et à leur activation *in vitro* et *in vivo* comme cela a été observé chez la souris [Brandenburg *et al.*, 2008; De la Rosa *et al.*, 2004]. Cette cytokine est primordiale pour la genèse des Treg, les souris déficientes en IL-2 meurent rapidement de manifestations auto-immunes et d'un syndrome lymphoprolifératif [Antony *et al.*, 2006]. De même, un défaut de signalisation de la voie de transduction du récepteur de l'IL-2 entraîne la survenue de manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg. Une mutation du récepteur de l'IL-2 a été identifiée chez l'homme, responsable d'un syndrome lymphoprolifératif, d'une susceptibilité aux infections et de manifestations auto-immunes [Sharfe *et al.*, 1997]. De plus, chez la souris,

l'utilisation d'un Ac monoclonal anti-IL-2 entraîne une déplétion transitoire des Treg, accompagnée de manifestations auto-immunes [Setoguchi *et al.*, 2005].

La surexpression de CD25 participe à l'activité immunomodulatrice des Treg en constituant une niche pour l'IL-2, qui n'est alors plus utilisable par les LT effecteurs pour le maintien de leur activation [Pandiyan *et al.*, 2007]. En effet, la sécrétion autocrine d'IL-2 constitue le 3^{ème} signal d'activation des lymphocytes et son absence, alors qu'ils subissent une stimulation *via leur* TCR, entraîne un état d'anergie. Les Treg sont également capables, chez la souris, d'inhiber directement la synthèse d'ARN messenger de l'IL-2, le mécanisme impliqué demeurant inconnu [Thornton et Shevach, 1998]. Par ailleurs, la déplétion du milieu en IL-2 inhibe la différenciation et l'activation des LT effecteurs. En effet, l'IL-2 participe à la différenciation des LT naïfs vers les voies Th1 et Th2 et est indispensable à leur activation et à leur survie [Scheffold *et al.*, 2005].

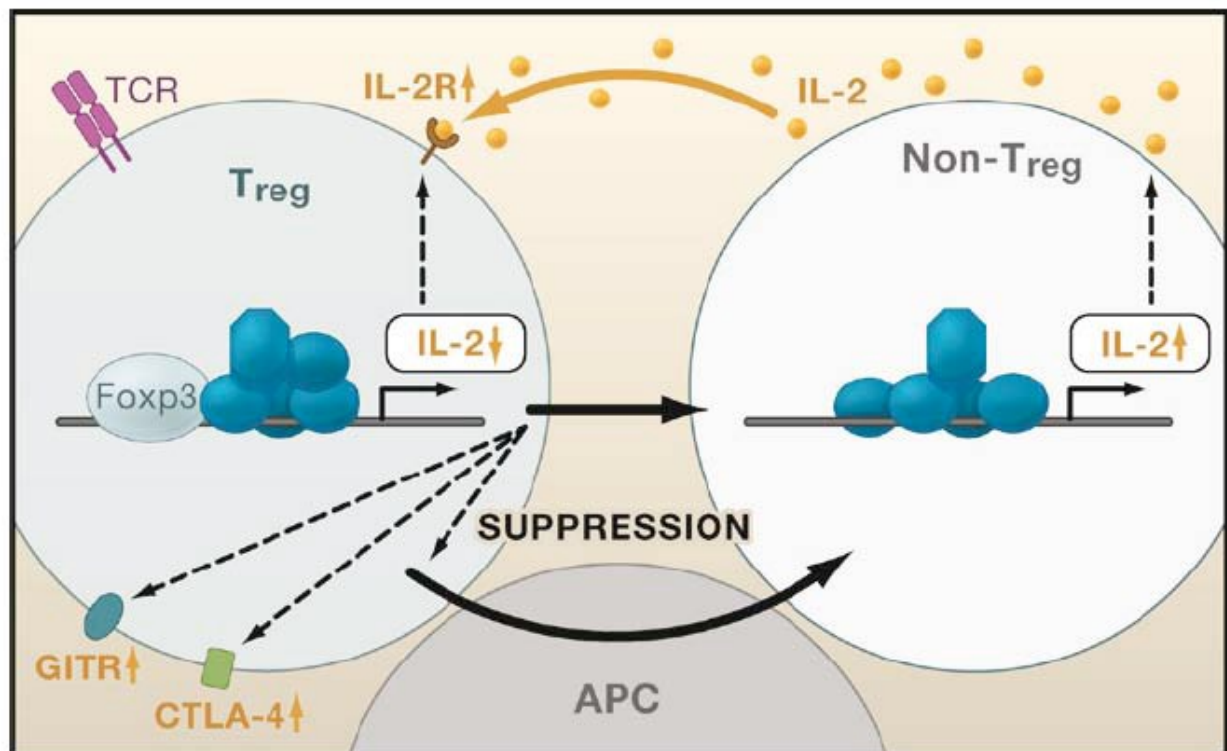


Figure 5. Facteur de transcription Foxp3 [adapté de Sakaguchi *et al.*, 2008]

Foxp3 est capable de se lier à plusieurs autres facteurs de transcription (NFAT, AML1/Runx1) et d'en modifier les fonctions. En sa présence, il existe une inhibition de transcription des gènes de l'IL-2 et de l'IFN- γ , alors que les gènes du récepteur de l'IL-2 (CD25) et de CTLA-4 sont activés. Ceci permet une différenciation en lymphocytes T régulateurs [Sakaguchi, 2008].

2.2.2. Facteur de transcription Foxp3

Foxp3 (*Forkhead/winged helix box protein 3*) est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de l'expression de plus de 700 gènes, dont seulement 10% sont directement sous son contrôle [Marson *et al.*, 2007 ; Zheng *et al.*, 2007]. Foxp3 agit sous forme oligomérique en se liant à d'autres facteurs de transcription, notamment NFAT, NF- κ B, AML1/Runx1 et les complexes HAT/HDAC [Yagi *et al.*, 2004]. Il est capable de réprimer les gènes de l'IL-2, du CD127 alors qu'il stimule l'expression de GITR et CTLA-4 (Figure 5). Chez la souris comme chez l'homme, un déficit en Foxp3 entraîne des manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg, ce facteur de transcription étant primordial pour la genèse thymique des Treg [Fontenot *et al.*, 2003]. Foxp3 a donc été considéré comme un marqueur spécifique des Treg. Cependant, si cela est vrai chez la souris, chez l'homme, après stimulation *via* leur TCR les LT effecteurs sont aussi capables d'exprimer Foxp3, de façon moindre et transitoire, associé [Pillai, 2007] ou non à des fonctions régulatrices [Morgan *et al.*, 2005]. Par ailleurs, la transfection de Foxp3 à des LT entraîne une anergie, l'absence de sécrétion de cytokines, notamment l'IL-2 et l'IFN- γ , et une activité régulatrice variable selon les études [Allan *et al.*, 2005 ; Bettelli *et al.*, 2005 ; Yagi *et al.*, 2004]. Foxp3 est donc capable, du fait de son interaction avec certains facteurs de transcription, de détourner la machinerie transcriptionnelle, orientant ainsi les LT effecteurs vers des Treg. Cependant, l'absence de corrélation entre l'expression de Foxp3 et la présence de propriétés immunorégulatrices ne fait pas de Foxp3 un marqueur totalement spécifique des Treg humains.

Un lien entre les Treg et les lymphocytes Th17, et par extension entre tolérance et réponse inflammatoire, a été suggéré chez la souris. En effet, Foxp3 inhibe également le facteur de transcription ROR γ t, impliqué dans la différenciation Th17. De même, la présence de TGF- β dans l'environnement cellulaire peut générer des Treg, tandis qu'associée à l'IL-6, la différenciation vers la voie Th17 sera privilégiée [Bettelli *et al.*, 2006]. Chez l'homme, ces constatations n'ont pas été vérifiées, par contre une plasticité entre lymphocytes Th17 et Treg est possible, et fait intervenir l'IL-1 β et l'IL-23. En effet, des Treg (CD4⁺ CD25^{High} Foxp3⁺CD27⁺CD127⁻CD45RA⁻) stimulés par des CPA en présence d'IL-2 et/ou d'IL-15 sont capables de se différencier en lymphocytes Th17, exprimant ROR γ t et sécrétant de l'IL-17 [Koenen *et al.*, 2008]. Cette différenciation est augmentée en présence d'IL-1 β et dans une moindre mesure par ajout d'IL-23 et d'IL 21. L'IL -6 et le TGF- β n'ont quand à eux aucun impact. Ces nouvelles connaissances soulignent ainsi les interactions possibles entre Treg et Th17 dans la genèse des MAI par déséquilibre de la balance tolérance/immunité. L'implication des Treg dans la physiopathologie

des maladies auto-immunes incite donc à vérifier l'équilibre entre Treg et Th17. En effet, puisqu'il existe un déficit quantitatif et fonctionnel des Treg au cours des MAI, on peut supposer que les lymphocytes Th17 sont augmentés.

2.2.3. Autres marqueurs

CD152 (CTLA-4) est également exprimé de façon constitutive par les Treg, principalement dans le compartiment intracellulaire. Les LT naïfs ne l'expriment à leur surface qu'après activation, de façon retardée et transitoire, ce qui permet la régulation de la réponse immunitaire par interaction avec CD80 et CD86, stoppant le 2^{ème} signal activateur impliquant CD28 et ces molécules de co-stimulation. CTLA-4 joue un rôle important dans les phénomènes de tolérance. Après activation des Treg, CD152 est exprimé à la surface et interagit avec les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, exprimées à la membrane des DC [**Manzotti et al., 2002**]. Chez la souris, les Treg induisent l'expression par les DC d'une enzyme, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), capable de cataboliser le tryptophane, acide aminé essentiel à la survie et à la prolifération des lymphocytes, en kynurénines. L'induction de cette expression, en l'absence de signaux danger comme le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, est sous la dépendance de l'interaction CTLA-4/CD86. En présence de LPS, c'est l'IL-10 sécrétée par les Treg qui permet la modulation de l'expression de cette enzyme. L'action de cette enzyme est donc double, d'une part par privation d'un acide aminé essentiel, d'autre part par production de métabolites [**Fallarino et al., 2003**]. Les Treg participent ainsi à l'induction de DC tolérogènes.

De plus, CD152 interagit directement avec CD80 exprimé à la surface des LT effecteurs, entraînant leur inhibition. En effet, les Treg ne peuvent réguler les LT effecteurs issus de souris déficientes en CD80 [**Paust et al., 2004**]. Cependant, CD152 n'est pas indispensable aux mécanismes de régulation, puisque les souris déficientes pour cette molécule présentent des Treg fonctionnels. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps bloquant le CD152 n'abroge pas les fonctions régulatrices des Treg humains [**Jonuleit et al., 2001**].

GITR (*Glucocorticoid Induced TNF Receptor family related gene*) est fortement exprimé à la surface des Treg, alors que les LT, LB, DC et macrophages ne l'expriment que faiblement, cette expression étant accrue après activation. Aussi, après activation par un signal danger *via* les Récepteurs Toll-Like, les DC expriment également le ligand de GITR (GITR-L), qui en liant son récepteur à la surface des Treg, inhibe leurs fonctions régulatrices [**Shimizu et al., 2002**]. Ainsi, GITR pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité des Treg c'est-à-dire la contre-régulation. L'expression de **CD127** (chaîne α du récepteur membranaire à l'IL-7) pourrait

permettre une distinction entre Treg et LT activés. En effet, cette molécule est peu exprimée à la surface des Treg, tandis qu'une expression importante est observée à la surface des LT après activation [Seddiki *et al.*, 2006]. De plus, son expression est inversement corrélée à celle de Foxp3, ce qui confirme son intérêt dans l'identification et l'isolement des Treg [Liu *et al.*, 2006 ; Seddiki *et al.*, 2006].

CD95 (Fas) est un récepteur de mort. La liaison à son ligand, CD95L (FasL) entraîne l'apoptose de la cellule. CD95 est exprimé de façon constitutive et importante à la surface des Treg [Fritzsching *et al.*, 2005 ; Wing *et al.*, 2002]. Il ne constitue pas un marqueur spécifique puisque retrouvé à la surface de nombreux autres types cellulaires, cependant, il intervient probablement dans l'homéostasie des Treg. En effet, cette expression constitutive de CD95 rend les Treg très sensibles à la mort cellulaire induite par FasL, contrairement aux LT activés. Cette différence pourrait avoir un rôle notamment lors de l'initiation de la réponse inflammatoire, au cours de processus des Treg permettant une réponse anti-infectieuse efficiente [Fritzsching *et al.*, 2005].

En effet, il a été montré qu'après activation, les Treg surexpriment à la fois CD95 et CD95L. CD95L participe à l'induction d'apoptose de LT CD8⁺ tandis que LT CD4⁺ ne sont pas sensibles à ce mécanisme de régulation, le système perforine/granzyme étant prédominant. Au contraire, lorsque les concentrations d'IL-2 du milieu de culture sont faibles, ce sont les Treg qui meurent par apoptose, ce qui correspond à un phénomène de mort induite par activation (*activation-induced cell death*, AICD) [Strauss *et al.*, 2009].

CD39 appartient à la famille des ectonucléoside triphosphate diphosphonucléotidases (ENTPDases), enzymes capables de métaboliser les nucléosides triphosphates, dont l'ATP en AMP. L'ATP outre son rôle dans le métabolisme énergétique, est également un médiateur intercellulaire, notamment au niveau du système nerveux central. Il constitue ainsi un signal danger. En effet, la libération massive d'ATP lors de la lyse cellulaire entraîne la sécrétion par les monocytes d'IL-1 β , principal cytokine pro-inflammatoire, et exerce une activité chimio-attractrice envers les DC. L'ATP joue donc un rôle pro-inflammatoire qui peut être inhibé par sa dégradation par le CD39. Cette molécule est exprimée à la surface des DC, des LB et LT activés, mais également, et ce de façon constitutive, à la surface des Treg mémoires humains exprimant CD45RO et CCR6. Chez la souris, pour que cette enzyme soit active, il est nécessaire que les Treg soient stimulés [Borsellino *et al.*, 2007]. CD39 est couplé à CD73, une autre ectonucléosidase, capable de cataboliser l'AMP en adénosine, ce dernier inhibant la réponse cellulaire T [Deaglio *et al.*, 2007]. CD39 ne constitue

donc pas un marqueur spécifique, mais suggère un nouveau mécanisme d'action dans le contrôle de la régulation immunitaire par les Treg, par dégradation de l'ATP extracellulaire, pro-inflammatoire, en adénosine, à activité anti-inflammatoire.

CD223 ou (**LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene-3**) est exprimé à la surface des Treg seulement après stimulation. Il s'agit d'une molécule d'adhésion associée au CD4, capable de lier le CMH-II. LAG-3 interviendrait dans les fonctions suppressives dépendantes du contact, bien que les souris invalidées pour le gène LAG-3 ne présentent pas de déficit fonctionnel ou quantitatif en Treg. L'utilisation d'un Ac bloquant LAG-3 entraîne cependant une diminution des fonctions suppressives des Treg et la transfection de LT naïfs avec LAG-3 leur confère un état d'anergie et une fonction suppressive dépendante du contact. Comme de nombreux autres marqueurs, LAG-3 est également détecté chez les LT effecteurs après activation [**Huang *et al.*, 2004**].

CD62-L est une sélective impliquée dans la migration (homing) des lymphocytes aux ganglions lymphatiques. Les Treg expriment cette molécule membranaire à l'état naïf, et conservent un haut niveau d'expression après activation [**Baecher-Allan *et al.*, 2005; Valmori *et al.*, 2005**]. Ceci traduit donc qu'après contact avec leur Ag, les Treg sont capables de gagner les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent réguler l'initiation de la réponse immunitaire.

TGF- β est une cytokine anti-inflammatoire qui peut également être exprimée à la surface cellulaire. Les Treg expriment TGF- β de façon croissante après stimulation. Le TGF- β membranaire est impliqué dans les mécanismes d'inhibition de la prolifération et de la sécrétion des Ig par les LB chez la souris [**Nakamura *et al.*, 2001**] et de la prolifération des NK chez l'homme [**Ralainirina *et al.*, 2007 ; Romagnani *et al.*, 2005 ; Trzonkowski *et al.*, 2004**]. Cependant, les souris dont le gène de TGF- β est invalidé, présentent un taux diminué de Treg qui garde cependant une activité suppressive. Ceci fait donc envisager un rôle plus important du TGF- β dans l'homéostasie des Treg que dans leur activité immunorégulatrice [**Huber *et al.*, 2004**].

CD45 est un marqueur panleucocytaire à activité tyrosine phosphatase essentiel pour une transduction efficace du signal *via* les récepteurs T et B [**Tchilian et Beverley, 2006**]. Ses différentes isoformes permettent de caractériser les stades de différenciation et d'activation des lymphocytes et ainsi de distinguer les LT naïfs CD45RA⁺ et les LT mémoires CD45RO⁺ [**Tchilian et Beverley, 2006**]. Récemment, une distinction de différentes sous-populations de Treg a été apportée en fonction de l'expression des différentes isoformes de ce marqueur et de l'intensité d'expression de Foxp3 [**Miyara *et al.*, 2009**]. Les auteurs distinguent 3 types de cellules exprimant Foxp3 aux propriétés différentes : d'un côté les LT sécrètent de cytokines (CD45RA⁻

Foxp3^{low}), dénués d'activité immunosuppressive, scindés en deux groupes : les Treg activés (activated Treg ou aTreg, CD45RA Foxp3^{High}), à l'activité immunosuppressive importante et les Treg quiescents (*resting Treg* ou rTreg CD45RA+Foxp3^{low}), capables de proliférer et de se différencier en aTreg.

ICOS (Inductible CO Stimulator) est une protéine membranaire non spécifique des Treg, exprimée à la surface des LT après activation. Son ligand, ICOS-L, est exprimé de façon constitutive à la surface des DC et des monocytes, l'expression sur ces derniers étant augmentée par l'IFN- γ [Collins *et al.*, 2005]. ICOS permet de distinguer deux types de Treg [Ito *et al.*, 2008]. Les Treg ICOS⁻ expriment intensément le TGF- β à leur surface, et leur fonction immunorégulatrice, médiée par cette molécule, est dépendante du contact et s'exerce directement sur les LT effecteurs. Les Treg ICOS⁺, quand à eux, sécrètent de grande quantité d'IL-10 capable d'inhiber la maturation des DC *in vitro*. Ils expriment également le TGF- β à leur membrane. Leur fonction immunosuppressive est complètement abrogée par utilisation d'Ac anti-IL-10 et anti-TGF- β . Ils présentent également une apoptose accrue en l'absence d'IL-2, rendant ainsi difficile l'analyse de leur fonction *in vitro* lors de cocultures prolongées. Ainsi la notion d'immunosuppression dépendant exclusivement du contact est peut-être erronée et liée au fait que les Treg agissant par sécrétion d'IL-10, meurent en cours d'expérimentation. Par ailleurs, leur action n'est pas directement dirigée contre les LT effecteurs mais passe par une régulation des fonctions des DC. Ces deux populations ont également un comportement différent lors de la stimulation par un Ac anti-CD28 : les Treg ICOS⁻ prolifèrent, tandis que la prolifération des Treg ICOS⁺ est inhibée. Ainsi, les techniques utilisées pour étudier leur fonctionnalité restent imparfaites. Si la coculture ne comprend que des LT effecteurs stimulés par des Ac anti-CD3 et anti-CD28, d'une part l'étude fonctionnelle des Treg ICOS⁻ est exclue puisqu'elle passe par une sécrétion d'IL-10 agissant sur les DC, d'autre part la notion d'anergie des Treg (cf infra) est à relativiser puisque les Treg ICOS sont capables de proliférer. De fait, la mesure d'incorporation de thymidine tritiée pour étudier la prolifération des LT effecteurs et par extension l'activité immunosuppressive des Treg peut être perturbée, notamment dans les puits contenant des LT effecteurs et des Treg. Une autre méthode d'analyse est donc la technique de marquage par CFSE (*Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester*) des LT effecteurs, qui permet d'étudier de façon exclusive leur prolifération, en excluant les Treg de l'analyse [Miyara *et al.*, 2009].

En résumé, l'identification phénotypique des Treg est rendue difficile par l'absence de marqueurs spécifiques. Ceci rend l'interprétation des données de la littérature délicate puisque les phénotypes étudiés ne sont pas toujours les mêmes et ont évolué avec la découverte de nouveaux

marqueurs. Il est donc probable que certaines discordances concernant les taux de Treg observés au cours d'une même pathologie soient en partie liées à des définitions phénotypiques différentes. Pour exemple, au cours des PTI, les taux de Treg circulants sont considérés comme abaissés [Ling *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007a ; Sakakura *et al.*, 2007 ; Stasi *et al.*, 2008] ou similaires aux témoins [Bao *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2008]. Cependant, les phénotypes utilisés pour définir les Treg varient d'une étude à l'autre : CD4+CD25^{High} [Liu *et al.*, 2007a ; Sakakura *et al.*, 2007], CD4+Foxp3+ [Ling *et al.*, 2007 ; Stasi *et al.*, 2008] ou CD4+CD25^{High}Foxp3+ [Bao *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2008].

Par ailleurs, la sélection des Treg, pour étudier leur fonctionnalité *in vitro*, est également délicate du fait de l'impossibilité d'utiliser les marqueurs intracellulaires, qui nécessitent une perméabilisation des cellules et entraînent donc leur mort. Là encore, CD127 apportera peut-être une amélioration de cette sélection, puisque les cellules au phénotype CD4⁺ CD25^{High} CD127- constitue le pool des Treg, permettant ainsi d'exclure les LT activés, au phénotype CD4⁺ CD25⁺ CD127+ [Seddiki *et al.*, 2006]. La sélection des Treg peut donc être réalisée à partir de cellules mononucléées sanguines par une première étape de sélection négative permettant d'obtenir une population CD4+ déplétée en cellules exprimant le CD127, puis par une sélection positive des cellules exprimant fortement CD25. Elle peut également se faire par tri en cytométrie en flux, en sélectionnant directement la population CD4+ CD25+CD127- [Seddiki *et al.*, 2006].

2.3. Caractéristiques fonctionnelles

2.3.1. Anergie

Les Treg sont caractérisées par un état d'anergie, c'est-à-dire qu'une stimulation *via* leur TCR n'entraîne pas leur prolifération. Cependant, dans certaines conditions, telles une liaison de forte affinité de la liaison TCR-Ag, une forte concentration d'Ac anti-CD3 et anti-CD28, ou l'ajout d'IL-2 dans le milieu de culture, une prolifération des Treg est observée, sans perte de fonctionnalité [Earle *et al.*, 2005].

Cette notion a récemment été mise en doute puisque les rTreg, après stimulation, sont capables de proliférer, et d'acquérir un phénotype de aTreg, c'est-à-dire une expression membranaire de CD45RO et une surexpression intracellulaire de Foxp3 et de CD152. A l'inverse, les aTreg prolifèrent peu et après stimulation, ils exercent leurs fonctions suppressives et meurent [Miyara *et al.*, 2009]. Cependant, comme les aTreg sont capables d'inhiber la prolifération des rTreg, il est difficile de déterminer avec précision la capacité de prolifération d'un pool cellulaire contenant à la fois des aTreg et des rTreg. Il est donc possible que l'absence de prolifération des

Treg décrite initialement soit le reflet d'une part d'une inhibition des rTreg par les aTreg, d'autre part de la mort de ces derniers.

2.3.2. Inhibition de multiples lignées cellulaires

A ce jour, les connaissances des mécanismes d'inhibition sont imparfaites. Il semble que les Treg acquièrent leurs pleines fonctions inhibitrices après activation par liaison spécifique de leur TCR à l'Ag. Ils opèrent ensuite de façon non spécifique d'Ag, c'est-à-dire qu'ils peuvent inhiber des lymphocytes qui reconnaissent d'autres Ag [Thornton & Shevach, 2000]. Cette fonction inhibitrice est dépendante du contact intercellulaire [Thornton & Shevach, 1998].

Les Treg sont impliqués dans l'immunorégulation de plusieurs types cellulaires, en inhibant leur activation, leur prolifération et leurs fonctions [Askenasy *et al.*, 2008 ; Miyara & Sakaguchi, 2007].

Les LB présentent in vitro une inhibition de leur prolifération, de la production des Ig et de la commutation de classe des Ig lorsqu'ils sont cultivés avec des Treg [Lim *et al.*, 2005 ; Nakamura *et al.*, 2001].

Les cellules NK voient leur activité cytotoxique diminuée en présence de Treg [Ralainirina, 2007 ; Romagnani, 2005 ; Trzonkowski, 2004].

Les LT CD4⁺ et CD8⁺ présentent une diminution de leur activation, de leur prolifération, de la sécrétion de cytokines et une inhibition de leurs fonctions au contact de Treg [Dieckmann *et al.*, 2001 ; Jonuleit *et al.*, 2001 ; Piccirillo & Shevach, 2001 ; Trzonkowski *et al.*, 2004].

L'activité des DC est également modulée avec une diminution de leur maturation et de leur capacité à présenter des Ag [Misra *et al.*, 2004]. Les Treg sont également capables d'induire des DC tolérogènes surexprimant IDO, inhibant ainsi de façon indirecte la prolifération des LT [Fallarino *et al.*, 2003].

Les Treg exercent également une action sur les cellules de l'immunité innée que sont les polynucléaires neutrophiles. Après activation *via* les récepteurs Toll-like, présents à leur surface, les Treg sont capables d'inhiber les polynucléaires neutrophiles. Ceci se traduit par une diminution de la production de radicaux oxygénés, une diminution de la sécrétion en cytokine (IL-6, IL-8 et TNF- α) et une augmentation de l'apoptose des polynucléaires [Lewkowicz *et al.*, 2006].

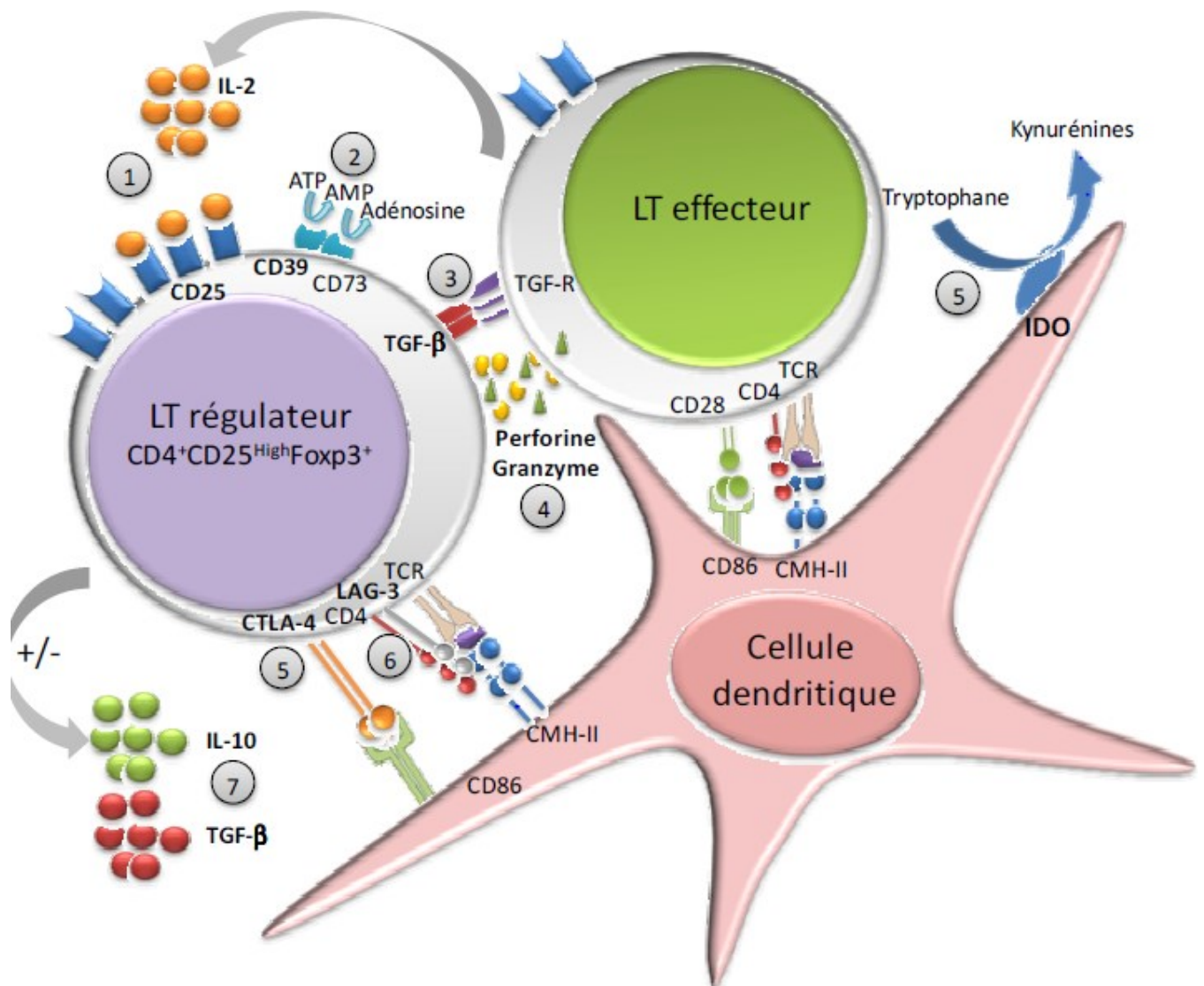


Figure 6. Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateur [adapté de Goodnow *et al.*, 2005]

- 1) Déplétion du milieu extracellulaire en IL-2, cytokine nécessaire à l'activation et la prolifération des LT effecteurs ;
- 2) Système enzymatique CD39/CD73 dégradant l'ATP en adénosine, toxine pour les LT effecteurs ;
- 3) Inhibition *via* le TGF-β membranaire ;
- 4) Mort cellulaire *via* le système perforine/granzyme ;
- 5) Compétition par le CTLA-4 pour CD86 et induction de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme catabolisant le tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération des LT, en kynurénines, toxiques pour les LT ;
- 6) Inhibition par interaction de LAG-3 avec le CMH-II ;
- 7) Sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (mécanismes prépondérant pour les Treg ; Th3, Tr1).

2.3.3. Mécanismes d'inhibition dépendant du contact

Chez l'homme, les mécanismes d'inhibition dépendent *in vitro* du contact intercellulaire, comme le montrent les expériences de coculture de Treg et de LT effecteurs. En effet, lorsque les Treg peuvent avoir un contact direct avec les LT effecteurs, on observe une diminution de leur prolifération, tandis que séparés à l'aide de membranes semi-perméables, ils ne présentent plus d'activités inhibitrices [Jonuleit *et al.*, 2001].

Plusieurs molécules membranaires semblent impliquées dans ce mécanisme, notamment CTLA-4, LAG-3 et TGF- β (Figure 6 et tableau VII).

Cependant, d'autres mécanismes, comme les systèmes perforine/granzyme ou CD39/CD73, ne nécessitent pas un contact cellulaire *stricto sensu*, mais une forte proximité [Yi, 2006].

La production de cytokines anti-inflammatoires serait quand à elle plutôt impliquée dans les mécanismes d'immunorégulation des Treg induits en périphérie (iTreg : Th3 et Tr1), et pas pour les Treg constitutifs, d'origine thymique. L'IL-35, une cytokine anti-inflammatoire participe à l'activité immunosuppressive des Treg. Le mécanisme d'action, identifié chez les souris, est original puisque l'induction de la sécrétion d'IL-35 par les Treg nécessite un contact avec les LT effecteurs. L'action de cette cytokine peut ensuite s'exercer à distance, de façon non dépendante du contact. Ainsi, ce ne serait pas l'inhibition qui serait dépendante du contact mais son initiation seulement [Collison *et al.*, 2009]. L'implication de cette cytokine n'est cependant pas évidente chez l'homme puisqu'il semblerait que les Treg humains ne l'expriment pas [Bardel *et al.*, 2008].

Tableau VII. Protéines impliquées dans les fonctions suppressives des Treg chez l'homme et chez la souris [adapté de [Sakaguchi *et al.*, 2010] et [Shevach *et al.*, 2009]

Molécules	Mode d'action	Chez l'homme	Chez la souris
<i>Mécanismes d'inhibition dépendant du contact</i>			
	Diminution des molécules de costimulation des DC		
CTLA-4 (CD152)	Induction d'IDO par les DC	+	+
	Diminution de la sécrétion d'IL-6 et TNF- α		
CD39-CD73	Hydrolyse de l'ATP extracellulaire	+	+
LAG-3	Induction de signaux inhibiteurs par interaction avec le CMH-II	+	+
Granzyme/Perforine	Lyse des lymphocytes T effecteurs	+	+
CD95-CD95ligand (Fas-FasL)	Apoptose des lymphocytes T effecteurs	+	-
TGF- β	Induction de Foxp3	+/-	+
<i>Mécanismes d'inhibition dépendant des cytokines</i>			
IL-10	Inhibition de la maturation des DC	+	+
	Induction de Tr1	+	+
CD25	Séquestration d'IL-2	-	-
IL-35	Après activation et contact avec des LT effecteurs, sécrétion d'IL-35 qui inhibe la prolifération des LT effecteurs	-	+

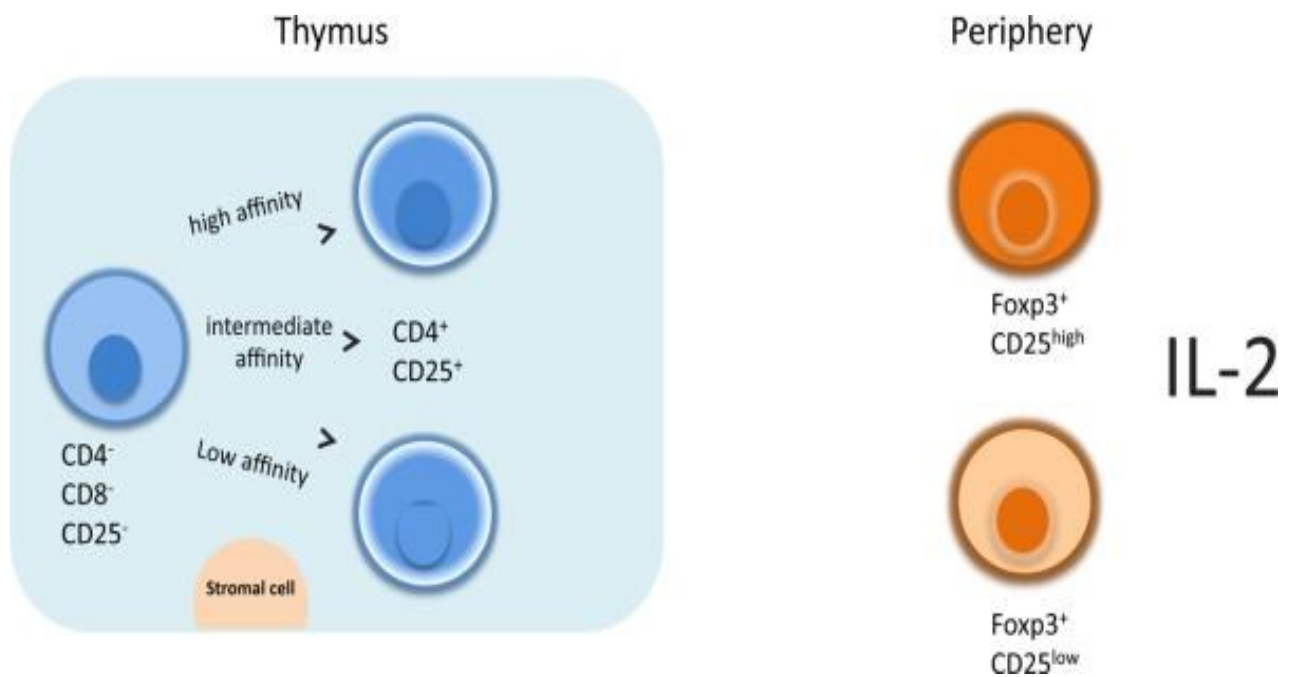


Figure 7. Genèse thymique des lymphocytes T régulateurs [Nomura & Sakaguchi, 2007].

A) Les lymphocytes T CD4⁺ CD8⁻ dont le TCR reconnaît les molécules du CMH de classe II subissent une 1^{ère} sélection positive. Ceux dont le TCR présente une faible affinité pour les auto-antigènes présentés par les cellules épithéliales médullaires gagnent la périphérie tandis que ceux dont l'affinité est forte enclenchent un mécanisme de mort programmée (sélection négative). Cependant, ces derniers, en présence de cellules dendritiques matures et d'une cytokine produite par les corpuscules de Hassal, la TSLP, peuvent subir une 2^{ème} sélection positive qui permet la différenciation en lymphocytes T régulateurs. **B)** Cette différenciation implique des interactions entre TCR-Ag/CMH-II mais également entre diverses molécules de co-stimulation. Ces interactions participent à l'expression de Foxp3, facteur de transcription principal mis en jeu dans la genèse thymique des lymphocytes T régulateurs.

(Aire : gène de régulation auto-immune ; CEC : cellules épithéliales corticales thymiques ; DC : cellules dendritiques ; HC : corpuscule de Hassal ; IM-DC : cellules dendritiques immatures ; MEC/CETm : cellules épithéliales médullaires thymiques ; TSLP : lymphopoïétine stromale thymique ; Treg : lymphocytes T régulateurs). D'après [Liu *et al.*, 2007b ; Nomura & Sakaguchi, 2007].

2.4. Origine et homéostasie

L'existence d'une population régulatrice d'origine thymique a été suspectée dès les années 70-80. En effet, chez la souris, la réalisation d'une thymectomie à 3 jours de vie entraîne de multiples manifestations auto-immunes (thyroïdite, gastrite, ovarite), traduisant d'une part la présence de lymphocytes autoréactifs de façon constitutionnelle et d'autre par la présence d'une population d'origine thymique capable de réguler ces lymphocytes. Par ailleurs, ces manifestations sont améliorées par transfert de lymphocytes provenant d'un animal non thymectomisé et plus

particulièrement par un sous-type lymphocytaire T $CD4^+ CD25^+$ [Nomura & Sakaguchi, 2007 ; Sakaguchi *et al.*, 2007].

Les Treg trouvent donc leur origine dans le thymus où les interactions avec les différentes cellules thymiques sont importantes. Les souris déficientes en CMH de classe I et II ne sont pas capables de générer de Treg, traduisant l'importance des sélections positives et négative dans leur genèse [Bensinger *et al.*, 2001]. L'étude du TCR des Treg a montré qu'ils reconnaissent avec une très forte affinité les autoAg. En effet la sélection négative thymique est liée à l'expression par les CETm (cellules épithéliales thymiques médullaires) de la quasi-totalité de nos autoAg, dont l'expression est favorisée par le gène *Aire* (*Auto-immune regulator*). Ainsi, l'absence de molécule de CMH-II à la surface des CETm conduit à la production d'un faible nombre de Treg. A l'inverse, la transfection d'un Ag au sein des CETm entraîne la production de Treg spécifiques de cet Ag, alors que la transfection de cet Ag aux DC thymiques n'a aucun effet [Aschenbrenner *et al.*, 2007]. Ainsi, la reconnaissance des autoAg permet, selon l'affinité de liaison avec le TCR, d'orienter vers une apoptose lorsque l'affinité est faible, alors qu'une forte affinité orientera vers une différenciation en Treg [Picca *et al.*, 2006]. L'absence d'expression de *Aire* est responsable de manifestations auto-immunes chez la souris, comme chez l'homme, associant une atteinte endocrinienne multiple, une susceptibilité aux infections fongiques et une dystrophie ectodermique (syndrome APECED : *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*). Cependant, ce syndrome est plus lié à l'absence de sélection négative des LT effecteurs qu'à un déficit de production en Treg [Liu *et al.*, 2007b].

Une cytokine, la TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), sécrétée au niveau des corpuscules de Hassal, constitués de CETm, est capable d'activer les DC. Ces DC activées participent à une deuxième sélection positive des lymphocytes présentant un TCR de haute affinité pour les autoAg, ces lymphocytes constituant les Treg [Liu *et al.*, 2007b]. Les facteurs de costimulation ont là toute leur importance, puisque les DC thymiques non activées, immatures, sont incapables de générer des Treg. Par ailleurs, un déficit en molécules de costimulation (CD28, CD80, CD86, CD40) entraîne un déficit thymique et périphérique en Treg [Sakaguchi *et al.*, 2005].

C'est donc après une double sélection positive, en présence de signaux de costimulation importants, que les lymphocytes $CD4^+ CD8$ expriment Foxp3 au sein du thymus et se différencient en Treg (Figure 7).

2.4.1. Circulation des Treg

La circulation des Treg dans l'organisme est la dépendance de diverses chémokines et de leurs récepteurs, exprimés de façon séquentielle à la surface des cellules. Actuellement, la chronologie entre le trafic des Treg et des LT effecteurs n'est pas connue. Il apparaît nécessaire que les Treg soient présents sur le site de la réponse immunitaire pour la contrôler et également pour inhiber la réponse auto-immune, sans pour autant empêcher une réponse efficace. L'ensemble des récepteurs identifiés chez les Treg humains, leurs ligands et les cellules les exprimant sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII. Récepteurs et chémokines impliqués dans le trafic des Treg [Liu *et al.*, 2007b]

SITES	RECEPTEURS	LIGANDS	CELLULES
THYMUS	CCR8	CCL1	-Macrophages de la médullaire thymique -Cellules épithéliales thymiques
SANG	CCR4	CCL17/CCL22	- Cellules dendritiques matures - LT activés - Monocytes/macrophages activés - LT activés - Cellules dendritiques matures - Monocytes/macrophages activés
ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES	CCR7 CXRS	CCL19 CXL13	Cellules stromales des zones T Cellules stromales des zones B
MOELLE OSSEUSE	CXCR4	CXCL12	Cellules stromales médullaires

Au niveau du thymus, les T reg expriment CCR8, qui lie la chémokine CCL1 exprimée par les macrophages médullaires thymiques et les cellules épithéliales [Annunziato *et al.*, 2002].

Dans le sang, les Treg sont attirés vers les DC matures des organes lymphoïdes secondaires sécrétant CCL17 et CCL22, du fait de l'expression de CCR4 [Iellem *et al.*, 2001]. Les Treg se

distinguent des LT effecteurs, qui expriment également CCR4, par la co-expression de CCR8 qui lie CCL1. Cette chémokine est également sécrétée par les DC activées, les LT activés et les monocytes/macrophages, notamment lors de la liaison de leur FcR aux IgG. Ainsi, CCL1 serait produite sur les sites d'inflammation, permettant ainsi le recrutement des T reg à ce niveau [Iellem *et al.*, 2001].

Au sein des organes lymphoïdes secondaires, ils expriment d'abord CCR7, récepteur de CCL19 sécrétée par les cellules stromales des zones T. Rapidement, après stimulation antigénique, ils expriment CXCR5, ce qui entraîne leur migration vers les zones B où le ligand CXCL13 est sécrété [Lim *et al.*, 2004]. Au sein, de la rate de sujets sains, les Treg, identifiés par Foxp3, sont effectivement présents tant au niveau des zones T que B [Velasquez-Lopera *et al.*, 2008]. Leur proportion est évaluée à $0,6 \pm 0,3\%$ des lymphocytes. Leur répartition est inégale entre les différentes structures, avec une présence plus importante au niveau des manchons lymphocytaires péri artériolaires (PALS) que des follicules. Ainsi, des modifications dans la sécrétion des chémokines CCL19 et CXCL13 ou un défaut d'expression des récepteurs CCR7 et CXCR5, pourraient être impliqués dans un défaut de recrutement des Treg au niveau de la rate.

La moelle osseuse, longtemps considérée comme simple site de production des LB, joue également un rôle dans la réponse immunitaire. En effet, plusieurs cellules participent à la réponse immunitaire y ont été localisées, comme les plasmocytes de longue demi-vie [Manz *et al.*, 2002], mais également des LT CD8⁺ mémoires [Mazo *et al.*, 2005 ; Olsson *et al.*, 2008] et les LT CD4⁺ [Olsson *et al.*, 2008]. De façon intéressante, elle constitue également un site de stockage des Treg exprimant CXCR4, attirés par la chémokine CXCL12 [Zou *et al.*, 2004]. L'impact de ce traitement sur le taux de Treg sanguin est à ce jour inconnu.

2.4.2. Rôle en pathologie humaine : auto-immunité, oncologie et infections

Des manifestations auto-immunes identiques à celles observées après réalisation d'une thymectomie à 3 jours de vie ont été observées chez la souris dite « *scurfy* ». Cette souris, naturellement déficiente en Foxp3, ne possède pas de Treg et développe dans les premiers jours de vie des signes d'auto-immunité comprenant une thyroïdite, une gastrite, un diabète, entraînant rapidement le décès [Brunkow *et al.*, 2001]. Chez l'homme, on décrit le syndrome IPEX (*Immune dysfunction Polyendocrinopathy Enterocolopathy X-Linked syndrome*), qui se traduit par la survenue dès le plus jeune âge de troubles du transit en rapport avec une entéocolite, d'un diabète, d'une dysthyroïdie, d'un eczéma, associés à un retard de croissance. De multiples mutations de Foxp3 ont été rapportées au cours de ce syndrome [Van der Vliet & Nieuwenhuis,

2007]. Un syndrome « IPEX-like » est également observé lors de mutations du CD25 [Sharfe *et al.*, 1997].

Au cours des MAI, les résultats concernant l'étude des Treg sont contradictoires. Un déficit quantitatif est observé au cours du LES [Miyara *et al.*, 2005], de l'arthrite juvénile, du rhumatisme psoriasique, tandis que le taux de Treg semble normal au cours de la sclérose en plaque (SEP), du diabète de type 1, de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et des spondylarthropathies [Dejaco *et al.*, 2006]. Un déficit fonctionnel est quand à lui observé au cours de la SEP [Viglietta *et al.*, 2004], du diabète de type 1, de la vascularite cryoglobulinémique liée au VHC. Les fonctions immunomodulatrices sont préservées *in vitro* au cours de la PR [Dejaco *et al.*, 2006]. Cependant, il faut noter qu'au cours de la PR, il existe des taux plus importants de Treg dans le liquide synovial que dans le sang. Ainsi, un taux de Treg abaissé dans le sang peut témoigner non pas d'un déficit quantitatif mais d'un recrutement des Treg sur le site d'inflammation. Par ailleurs, les patients présentant le taux de Treg intrasynovial le plus important ont le meilleur pronostic [Cao *et al.*, 2003].

Les Treg sont également impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. En effet, les patients atteints de cancers présentent une élévation des Treg sanguins, péri-tumoraux et au sein des ganglions de drainage, ce qui facilite la progression des cellules cancéreuses en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale [Zou *et al.*, 2006]. Cette augmentation des Treg participe à l'échec de certaines immunothérapies anti-tumorales, comme cela a été montré dans l'étude de Audia *et al.* [Audia *et al.*, 2007]. Dans ce travail, ils ont observé que le taux de Treg circulants était plus élevé chez les patients atteints de cancers métastatiques et qu'ils étaient capables d'inhiber la prolifération de LT effecteurs. Contrairement à ce qu'une étude a montré dans un modèle de cancer du colon chez le rat [Ghiringhelli *et al.*, 2004], des bolus de cylophosphamide n'entraînent pas une déplétion en Treg permettant l'efficacité d'une immunothérapie intratumorale par BCG thérapie.

Au cours des infections, les Treg ont un effet bénéfique en limitant l'intensité de la réponse anti-infectieuse, évitant ainsi les dommages contre les tissus sains de voisinage. A l'inverse, une limitation trop importante de cette réponse anti-infectieuse est incriminée dans la chronicisation de certaines maladies infectieuses [Belkaid & Rouse, 2005].

Les Treg sont également impliqués dans les phénomènes de tolérance aux greffes et leur déficit est observé au cours des pathologies allergiques [Afzali *et al.*, 2007].

3. Autres lymphocytes régulateurs

3.1. Lymphocytes T CD8 régulateurs

L'existence de LT CD8⁺ régulateurs (CD8⁺ Treg) est connue depuis des années mais leur étude n'a été approfondie que récemment [Dinesh *et al.*, 2010 ; Konya *et al.*, 2009]. Leurs fonctions suppressives sont variables et quatre mécanismes différents interviennent :

- Une inhibition dépendante du contact impliquant CTLA-4 et TGF-β
- La sécrétion de cytokines et chémokines anti-inflammatoires : IL-10, TGF-β, IL-16 et CCL4
- L'induction de DC tolérogènes par une expression diminuée des molécules de costimulation CD86 et CD80 et par l'expression membranaire d'ILT3 (*Immunoglobulin-like Transcript 3*) et d'ILT4, récepteurs de la superfamille des Ig dont les domaines intracytoplasmiques comportent des domaines ITIM.
- La lyse des LT CD4⁺ effecteurs HLA-E.

Comme pour les Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3), on distingue les CD8⁺Treg constitutifs des CD8⁺Treg induits. Les CD8⁺ T reg constitutifs sont générés au niveau thymique et représentent une lignée spécifique. Ils partagent des marqueurs phénotypiques et un mode d'action proche de celui des Treg. Ils sont définis par le phénotype CD8⁺ CD25⁺ Foxp3 CTLA-4⁺GITR⁺ et exercent leur suppression par un mécanisme dépendant du contact impliquant CTLA-4 et TGF-β. Comme pour les Treg, il n'existe pas de marqueur spécifique puisque les LT CD8⁺effecteurs expriment CD25 et CTLA-4 après activation, ainsi que Foxp3, au moins de façon transitoire [Dinesh *et al.*, 2010 ; Konya *et al.*, 2009].

Tableau IX. Lymphocytes T CD8⁺ Régulateurs induits spécifiques d'antigènes chez l'homme [Dinesh *et al.*, 2010]

PHENOTYPE	MECANISMES		INDUCTION
	Dépendant du contact	Autre	
CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺	+		CD8 ⁺ CD25 stimulés par l'entérotoxine B du staphylocoque et Ac Anti CD3/28
CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	+		TGF-β1 et Ac antiCD3/28
CD8 ⁺ CD28 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺		Expression d'IIT3 et 4 par les DC	Stimulation par CPA chargées en Ag
CD8 ⁺ CD103 ⁺	+		Ac antiCD3/28
CD8 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ Foxp3 ⁺	+	Dépendant de CCL4 et TNF	Ac antiCD3 modifié
CD8 ⁺ CD25 ⁺ LAG-3 ⁺ Foxp3 ⁺ CCL4 ⁺	+	Sécrétion de CCL4	Stimulation par BCG
CD8 ⁺ TCR α/β ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ Foxp3 ⁺	+		DC activées par le LPS
CD8 ⁺ IL-10 ⁺	+	Sécrétion d'IL-10	pDC activées par CD40L
CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺		Sécrétion TGF-β	Sécrétion de TGF-β par les cellules épithéliales oculaires
CD8 ⁺ CC7 ⁺ CD45 ⁺ STRO ⁺ IL-10 ⁺		Sécrétion d'IL-10	pDC d'ascite tumorale

Adapté de [Dinesh et al. , 2010 ; Konya et al., 2009]. (Ac : anticorps ; CPA : cellules présentatrices d'Ag ; DC : cellules dendritique ; IDO ; indoléamine ; 2,3-dioxygénase ; LPS : lipopolysaccharide ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes)

Chez l'homme, une autre sous population de CD8⁺Treg constitutifs a été identifiée par le phénotype CD8⁺CCR3⁺. Leur action suppressive est médiée par la sécrétion d'IL-10 et l'inhibition

de la sécrétion d'IFN- γ . Cette population présente des caractéristiques similaires aux CD8⁺Treg murins CD8⁺CD122⁺.

De nombreuses autres populations de CD8⁺Treg induits ont été décrites. Ils sont obtenus à partir de LT CD8⁺périphériques sous l'action de diverses stimulations. Certains nécessitent une stimulation *via* leur TCR (CD8⁺Treg spécifiques d'antigène), tandis que pour d'autres ce signal n'est pas nécessaire (CD8⁺Treg non spécifique d'antigènes) :

CD8⁺Treg induits non spécifiques d'antigène :

Ces LT CD8⁺ CD28⁺ Foxp3⁺CD56 sont obtenus à partir de cellules mononucléées sanguines stimulées par GM-CSF, IL-10 et IL-2 en présence de monocytes. Ils inhibent la présentation antigénique des CPA, la prolifération des LT CD4⁺et la cytotoxicité des LT CD8⁺ par sécrétion d'IL-10. Cette population pourrait avoir un intérêt clinique puisque leur durée de vie est de l'ordre d'un mois et qu'ils sont résistants au traitement par corticoïdes [**Konya, 2009**].

CD8⁺Treg spécifiques d'antigène :

Ces CD8⁺Treg représentent de multiples sous-populations, obtenues par de stimulations diverses et agissant soit de façon dépendante du contact soit par sécrétion de cytokines [**Dinesh et al., 2010 ; Konya et al., 2009**]. Les caractéristiques de ces populations sont résumées dans le tableau IX.

Les données de la littérature suggèrent que les CD8⁺Treg peuvent être induits à partir de cytokines, d'une stimulation *via* leur TCR ou en présence de CPA stimulées grâce à leur TLR. Malheureusement, dans les différentes études, l'ensemble des marqueurs phénotypiques n'a pas été étudié et il est donc probable que certaines populations soient redondantes avec d'autres. Ces données doivent être uniformisées afin d'avoir une vision plus restreinte de ces CD8⁺ Treg induits. Par ailleurs leur étude à l'heure actuelle est complexe en l'absence de marqueurs phénotypique spécifique permettant de les identifier et de les isoler.

Les lymphocytes Treg CD8⁺ jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire au cours, de plusieurs modèles murins de MAI (PR, LES, sclérose en plaque (SEP), diabète de type I (DID), colites inflammatoires, myasthénie) en modulant l'activité des CPA (DC et macrophages) et en diminuant la prolifération des LT CD4⁺ [**Dinesh et al., 2010 ; Konya et al., 2009**]. Chez l'homme, les données sont peu nombreuses, et les CD8⁺ Treg semblent être impliqués au cours du LES, du DID et de la SEP. Au cours du LES, les CD8⁺Treg circulants présentent un

déficit quantitatif et fonctionnel. Au cours du DID, l'utilisation d'Ac anti-CD3 permet d'atténuer la maladie, ceci étant corrélé à l'expansion des CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ GITR⁺. Enfin, au cours de la SEP, un traitement permettant de diminuer l'apparition de nouvelles lésions cérébrales permet également l'expansion de CD8⁺Treg [Dinesh *et al.*, 2010]. A l'inverse, les CD8⁺ Treg infiltrant certaines tumeurs et participent probablement à l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale [Dinesh *et al.*, 2010].

3.2. Lymphocytes B régulateurs

Les LB sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative en sécrétant des Ac mais également en modulant la réponse immunitaire T. En effet, en tant que CPA et par la production de cytokines pro-inflammatoires, ils peuvent stimuler la réponse immunitaire T. D'autre part, ils sont capables de l'inhiber, notamment par la sécrétion d'IL -10 (cytokine anti-inflammatoire), cytokine majeure des LB régulateurs [Lund et Randall, 2010].

Les LB expriment les molécules nécessaires aux fonctions de CPA: CMH-II permettant la présentation des Ag, et molécules CD80 et CD86 fournissant les co-signaux nécessaires à l'activation des LT. Ainsi, après stimulation antigénique, les LB augmentent l'expression membranaire de CD80 et CD86 et sont capables de faire proliférer des LT CD4⁺ [Constant *et al.*, 1995].

Par ailleurs, par la sécrétion de cytokines, le LB est capable d'entretenir l'orientation de la réponse immunitaire T. En effet, en présence de cytokines Th1 (IFN- γ), les LB activés par stimulation antigénique et/ou stimulation *via* leur BCR sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL-12 principalement. On parle de cellules Be1 (*B effector 1 cells*) par analogie aux lymphocytes Th1. Ainsi par la sécrétion de ces cytokines, les cellules Be1 sont capables d'orienter les LT naïfs vers une réponse Th1, réalisant ainsi une boucle d'amplification de la réponse Th1. A l'inverse, des LB stimulés en présence de cytokines Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-2 et de l'IL-13. On parle alors de cellules Be2, qui entretiennent une réponse Th2 [Lund et Randall, 2010].

Enfin, les cellules B régulatrices (Breg) constituent une sous-population particulière chez la souris, exprimant CD5 et CD1d, nommées B10 du fait de la sécrétion d'IL-10 après stimulation *via* CD40 [Yanaba *et al.*, 2008]. Ainsi, ces cellules sont capables d'inhiber la réponse lymphocytaire T. Chez l'homme, les Breg ne constituent pas une sous-population aisément individualisable et n'expriment notamment pas le CD5. Chez l'homme, les LB sécrétant de l'IL-10 sont retrouvés au sein des LB naïfs et des LB mémoires. Les stimulations nécessaires pour induire la sécrétion d'IL-10 divergent conférant probablement un rôle distinct à ces deux sous-populations cellulaires. Ainsi,

la sécrétion d'IL-10 par les LB mémoires nécessite à la fois une stimulation antigénique, l'activation des BCR et un signal *via* CD40. Ce mécanisme est donc probablement impliqué dans la résolution de la réponse immunitaire. A l'inverse, les LB naïfs sont capables de sécréter de l'IL-10 après stimulation isolée *via* CD40. Ceci leur conférerait plutôt un rôle préventif permettant d'inhiber des LT autoréactifs activés [Fillatreau *et al.*, 2008; Rieger & Bar-Or, 2008]. De façon intéressante, des LB stimulés par des Ac anti- CD40 sont capables d'induire des Treg exprimant CD25, Foxp3, CTLA-4 et GITR à partir de LT naïfs CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺ [Tu *et al.*, 2008] mais également des CD8⁺Treg, CD8^{High} présentant une activité spécifique d'Ag et CD8^{Low} ayant une activité non spécifique d'Ag [Zheng *et al.*, 2009]. Les CD8^{High} Treg présentent une activité suppressive supérieure au CD8^{Low} et expriment Foxp3, CD62L et CD28. Ces résultats ouvrent des perspectives futures pour la génération et l'expansion de cellules immunosuppressives *ex vivo* pouvant ensuite être réinjectées dans le cadre de protocole d'immunothérapie.

Ainsi, les interactions entre LB et LT jouent un rôle prédominant avec une double action des LB. D'une part, les LB possèdent un rôle pro-inflammatoire en stimulant les lymphocytes Th1 ou Th2 par la sécrétion de cytokines Th1 ou Th2 et leur capacité à présenter de façon efficace des Ag aux LT. D'autre part, ils sont également capables d'exercer un effet immunosuppresseur direct par la sécrétion d'IL-10 et indirect par l'induction de Treg. Enfin, les LT interviennent au sein des organes lymphoïdes secondaires pour permettre la commutation de classe des Ig. Ces données soulignent les différents impacts d'une déplétion lymphocytaire B au cours des pathologies auto-immunes selon le stade de la maladie. Au cours de l'encéphalite auto-immune expérimentale, une déplétion des LB réalisée avant l'induction de la maladie entraînera une déplétion des Breg, entraînant des manifestations cliniques plus graves. A l'inverse, si la déplétion est réalisée après l'induction de la maladie, à un moment où les LB jouent alors un rôle pathogène, la sévérité est alors moindre [Thaumat *et al.*;2010]. En pathologie humaine, une meilleure connaissance de l'activité des LB, anti ou pro-inflammatoire, à un instant donné de la MAI permettrait une utilisation plus raisonnée des thérapeutiques anti-lymphocytaires B.

DEUXIEME PARTIE : LES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I : METHODOLOGIE GENERALE

Le présent travail porte sur l'épidémiologie, le diagnostic immunologique et sur l'étude du microenvironnement cytokinique chez les patients souffrant de maladies auto-immunes au Burkina Faso. La population d'étude est constituée de plusieurs ethnies du Burkina Faso et d'immigrés y résidant.

1. Caractéristiques de la population et de la zone d'étude

1.1. Cadre de l'étude

Notre étude s'est déroulée au Burkina Faso, pays sahélien situé au cœur de l'Afrique de l'Ouest. Le Burkina Faso est peuplé d'environ 15 millions d'habitants. Il est situé à 9° 20' et 15° 5' de latitude Nord, 2° 20' de longitude Est et 5° 30' de longitude Ouest. A l'exception de la zone du sud-ouest, l'aridité est une des caractéristiques essentielles du milieu naturel burkinabè. L'impact de cette aridité et notamment celui des sécheresses sporadiques est considérable sur l'environnement, l'économie et la vie quotidienne des burkinabès. Ces conditions climatiques sont favorables au développement de nombreuses maladies endémo-épidémiques. La population burkinabè est caractérisée par un taux d'accroissement élevé (2,4%): elle est jeune, habite encore essentiellement en zone rurale (85%) et est très mobile aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur du pays. Malgré les efforts de ces dernières années, l'économie burkinabè reste encore fragile. Les secteurs de l'agriculture et de l'élevage emploient 86% de la population active et fournissent à eux seuls 35% du PIB ainsi que 65 à 70% des recettes d'exportation. Le secteur industriel représente 18% du PIB ; mais, en dehors du dynamisme des Bâtiments et Travaux publics modernes, il reste peu actif et peu compétitif. Le secteur tertiaire, avec près de 40% du PIB, constitue une source importante de croissance. L'économie burkinabè se caractérise également par un secteur informel important, notamment en milieu urbain, qui est à la fois une manifestation d'une structuration insuffisante du tissu économique mais également d'un dynamisme des populations pour faire face aux situations difficiles [INSD, 2010a].

Les résultats de deux enquêtes de 2006 et 2010 indiquent que la proportion de pauvres a connu une légère hausse, passant de 44,5% à 45,3%; 27,8% de la population vit en-dessous du seuil national d'extrême pauvreté (45 dollars par an) [INSD, 2006 ; INSD, 2010b]. On observe des différences sensibles entre les zones urbaines et rurales et entre les régions économiques du pays (les régions Nord, Centre Nord et de l'Est étant les plus pauvres). Les agriculteurs vivriers sont les plus touchés par la pauvreté. Des handicaps tels que le niveau d'alphabétisation, l'accès aux

moyens de production, notamment à la terre, font que les femmes sont en moyenne plus pauvres que les hommes [DGPÉR, 2010]. Le faible niveau d'éducation, en particulier celui des filles, la pauvreté, la malnutrition, l'accès limité à l'eau potable et à l'assainissement de base favorisent le développement des maladies. En ce qui concerne l'eau et l'assainissement, 44% des ménages utilisent l'eau des puits traditionnels alors que 75% des ménages ne disposent d'aucune forme de toilette et seulement 24% utilisent les latrines simples [Banque mondiale, 2012]. Dans ce contexte de vie l'hygiène individuelle et du milieu sont très précaires au Burkina Faso.

1.2. Caractéristiques des sujets de l'étude

Durant les 2 premières années de l'étude, 73950 patients ont consulté au Centre Hospitalier Universitaires Sourô SANOU de Bobo Dioulasso selon l'annuaire statistique du CHUSS 2012. Ainsi, 65 patients avec une suspicion de MAI vus au CHUSS et les autres formations sanitaire du pays ont été référés au laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie du CHUSS. Chez chaque patient, des prélèvements par ponction veineuse au pli du coude ont été effectués pour des investigations biologiques. Les critères d'inclusion ont été: (i) être volontaire avec le consentement éclairé écrit; (ii): avoir les signes cliniques d'une maladie auto-immune sans condition d'âge.

Le sang total prélevé chez chaque patient avait servi au diagnostic des maladies auto-immunes par une technique multiplexe (Immunodot®, Biomedicals diagnostics, France). L'âge moyen des patients inclus est de 51 ans (28-75 an). Le sexe masculin et le sexe féminin sont respectivement de 6,15% et 93,85%.

Dans la deuxième phase de l'étude, des échantillons de sang total ont été obtenus auprès des patients confirmés par notre technique multiplexe comme souffrant de maladies auto-immunes (n=17) et des donneurs sains (groupe contrôle, n=17) du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Bobo Dioulasso. Les sujets sains sont âgés de 30 à 50 ans. Tous les sujets sains, ont subi des examens médicaux de routine de don de sang. Aucun des participants à l'étude n'a signalé d'antécédents de problèmes médicaux aigus ou chroniques. Egalement tous les sujets de l'étude ont été dépistés pour les infections suivantes : VIH ; VHB ; VHC ; CMV ; Dengue sérotype 1, 2, 3, 4 ; *Mycobacterium tuberculosis* et la *Borrelia burgdorferi* ou la maladie de Lyme. En effet, des autoanticorps ont été retrouvés dans le sérum des sujets souffrants de ces infections [Strassburg, 2015]. Le sang total (10 mL) a été prélevé dans des tubes avec l'héparine pour le dosage des cytokines. Pour le diagnostic de *Mycobacterium tuberculosis*, des crachats ont été prélevés et acheminés dans le laboratoire de Mycobactériologie du CHUSS de Bobo Dioulasso pour la recherche des BAAR. Un consentement éclairé a été obtenu chez tous les sujets de l'étude.

2. Screening du VIH, VHB et du VHC par la technologie CMIA

La recherche des marqueurs sérologiques du VIH, VHB et du VHC est faite sur 5 mL de sang total prélevé par ponction veineuse au pli du coude. Après centrifugation à 4000 tours/mn pendant 10 mn, nous avons utilisé 100µL de sérum de chaque sujet et testé à l'aide de l'Architect *CI4100*® d'Abbott (figure 8). Nous avons utilisé la technologie de dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence permettant de déterminer la présence d'analytes (anticorps anti-VIH, Ac anti-VHC totaux, AgHBs, Ac anti-HBc totaux) dans les échantillons analysés. La technique CMIA utilise les réactifs suivants :

- Les microparticules paramagnétiques recouvertes d'une molécule de capture (antigène anticorps ou particules virales) spécifique de la substance à analyser.
- Le conjugué marqué à l'acridinium
- La solution de pré-activation et la solution d'activation.

A**B**

Figure 8. Photo du dispositif de dosage des analytes par la technologie CMIA (A : Architect CI4100, B : Réactifs utilisés par l'instrument)

➤ **Mode opératoire de l'Architect CI4100®**

Avant de charger le réactif de l'architect CI 4100® sur l'analyseur pour la première fois, le flacon de microparticules doit être homogénéisé afin de remettre en suspension les microparticules qui se sont déposées pendant le transport. Après le premier chargement des microparticules, aucune homogénéisation supplémentaire n'est nécessaire.

- **Retourner le flacon de microparticules 30 fois ;**

- Examiner le flacon pour s'assurer que les microparticules sont remises en suspension. Si des microparticules restent encore collées au flacon, continuer à retourner ce dernier jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension,

Si les microparticules ne sont pas remises en suspension, ne pas les utiliser ;

- Une fois que les microparticules ont été remises en suspension, placer un septum sur le flacon ;
 - **Charger les réactifs correspondant sur l'architect *ci 4100*® ;**
- Vérifier que tous les réactifs requis sont présents,
 - S'assurer que chaque flacon de réactif est muni d'un septum,
 - Si nécessaire, programmer une calibration,
 - Demander les analyses,
 - Le volume minimum requis dans le godet-échantillon est calculé par le système et imprimé sur le rapport liste des demandes. Ne pas prélever plus de 10 répliques à partir du même godet-échantillon. Afin de minimiser les effets de l'évaporation, vérifier qu'un volume d'échantillon adéquat est présent dans le godet-échantillon avant d'effectuer le dosage.
 - En cas d'utilisation de tubes primaires ou aliquots, utiliser la jauge échantillon afin de s'assurer que le volume d'échantillon de patient est suffisant,
 - Préparer les calibrateurs et les contrôles,
 - Homogénéiser les calibrateurs et les contrôles en les retournant délicatement avant emploi,
 - Suivre les instructions du fabricant pour la préparation des contrôles disponibles dans le commerce.
- Charger les échantillons,
 - Appuyer sur la touche LANCER.

3. Screening du cytomégalo­virus (CMV) et du *Borrelia burgdorferi* ou la maladie de Lyme par la technologie ELFA.

Le Minividas® (Biomerieux) a été utilisé pour la recherche des Ig M et IgG de *Borrelia burgdorferi* et du Cytomégalo­virus (figure 9). Nous avons utilisé la technologie de dosage ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) permettant de déterminer la présence d'analytes (IgG et IgM anti-*Borrelia burgdorferi* et anti-CMV) dans les sérums analysés. Le volume de l'échantillon utilisé est de 150 µL. La technique ELFA associe la méthode immuno­enzymatique sandwich en deux étapes à une détection finale en fluorescence. Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et repartis dans la cartouche. Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument. Elles sont constituées d'une succession de cycle d'aspiration /refoulement du milieu réactionnel. L'échantillon est aspiré et refoulé plusieurs fois à l'intérieur du cône. Cette opération permet à l'anticorps fixé sur le cône de capturer les IgG et les IgM anti-*Borrellia* et anti-CMV présent dans le sérum. Les composants non lié sont éliminés par lavages. Lors de l'étape de révélation, le substrat (4-Méthyl-Ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliferone) dont la fluorescence émise est mesurée à 450nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'analytes présents dans le sérum.



A

Figure 9. Photo du dispositif de dosage des analytes par la technologie ELFA (A : Mini Vida)

➤ **Mode opératoire du Mini VIDAS ®**

La réalisation du test

Les échantillons sont centrifugés à 4000 tr/mn pendant 5 minutes et homogénéisés à l'aide d'un agitateur de type vortex. Pour la prise d'essai des échantillons, 200 µL du sérum ont été distribué dans le puits échantillon des cartouches correspondants à chaque analyte. Les cônes et les cartouches sont placés sur l'appareil Mini VIDAS® et l'analyse est démarrée. Toutes les étapes étaient alors gérées automatiquement par l'instrument. Les résultats étaient obtenus en 1h 15mn.

Interprétation des résultats

Dès le test terminé, les résultats sont analysés automatiquement par le système d'informatique. Le Mini VIDAS ® effectue deux mesures de fluorescence dans la cuvette de lecture pour chacun des tests.

La première lecture prend en compte le bruit de fond dû à la cuvette substrat avant mise en contact du substrat avec le cône.

La seconde lecture est effectuée après incubation du substrat avec l'enzyme présente dans le cône. Le calcul de la RFV (Relative Fluorescence Value) est le résultat de la différence des deux mesures. Il apparaît sur la feuille de résultat.

La RFV du patient est interprétée par le système VIDAS®.

4. Screening de la Dengue sérotype 1, 2, 3,4 et de *Mycobacterium tuberculosis*.

Pour la recherche des mycobactéries (TPM- et TPM+) chez les sujets de l'étude, nous avons associé à la microscopie fluorescente un test immunochromatographique (Hexagon TB, Human, Allemagne) de détection des antigènes du complexe tuberculosis (la protéine A 60). Ce test utilise 10 µL du sérum des patients.

Nous avons utilisé également pour le dépistage de la dengue sérotype 1, 2,3 et 4 un test immunochromatographique (Hexagon Dengue® ; Human, Allemagne).

Son principe est basé sur l'utilisation des particules d'or colloïdal enduites d'une mixture de protéines d'enveloppe recombinantes de la dengue. Suite à l'ajout d'un échantillon avec des anticorps anti-dengue IgG et/ou IgM au test, les anticorps réagissent aux protéines d'enveloppe de la dengue en formant des complexes immuns qui migrent le long de la membrane et sont capturés par des anti-IgG humains monoclonaux dans la première ligne de test (G) et/ou par des anti-IgM humains monoclonaux dans la deuxième ligne de test (M). L'excédent de l'immunocomplexe et/ou le colloïde d'or non fixé continuent à migrer et sont immobilisés à la troisième ligne par des anti-dengue IgG en y formant la ligne de contrôle. Deux ou trois lignes sont visibles dans la présence d'anti-dengue IgG et/ou IgM dans l'échantillon. Si aucun anticorps anti-dengue n'est présent dans l'échantillon ou si sa concentration est au dessous du seuil de détection, on n'observera que la ligne de contrôle qui sert de preuve pour l'exécution et la fonction correcte du test. L'absence de toute ligne indique la réalisation impropre du test ou le fonctionnement incorrect des réactifs.

Mode opératoire

- Appliquer 10 µL du sérum des patients à la petite plage d'échantillon carrée (marquée de la lettre S),
- Immédiatement dans les 20 secondes ajouter 3 à 4 gouttes du diluant à la plage de réactif ronde au bout inférieur du dispositif,
- Lire les résultats du test après 15-20 minutes dans un endroit bien éclairé.

5. Dosage néphélométrique des différentes fractions des protéines sériques.

La sécrétion des cytokines est susceptible de modifier les profils des protéines sériques. Pour comprendre l'impact des cytokines au cours des MAI, nous avons réalisé le dosage des différentes fractions protéiques sur un spectrophotomètre automatique: le Konelab 20i (figure 10 ci-contre). Cet automate est notamment équipé d'un spectrophotomètre spécifique aux mesures de colorimétrie et turbidimétrie.

Ainsi, après centrifugation du sang total a 4000 tours/ mn pendant 5mn, 100 μ L de sérum de chaque patient atteint d'une maladie auto-immune ont été utilisé pour la quantification des fractions protéiques.



Figure 10. Photo de l'analyseur Konelab 20i

CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC PRECOCE DES MALADIES AUTO-IMMUNES

INTRODUCTION

Les maladies auto-immunes (MAI) représentent la 3ème cause de morbidité après les affections cardio-vasculaires et les cancers dans les pays développés [Bach *et al.*, 2005 ; Okada *et al.*, 2010]. Il s'agit d'un ensemble de maladies très différentes dans leur expression clinique et dans les organes intéressés, mais qui ont en commun un même mécanisme : le dérèglement du système immunitaire à l'encontre de substances ou de tissus normalement présents dans l'organisme.

Les autoanticorps sont des marqueurs diagnostiques et pronostiques très utiles, mais la présence d'un autoanticorps ne signifie pas forcément l'existence d'une maladie auto-immune. Il peut s'agir d'une infection chronique (Virus de l'Hépatite C...) ou d'une affection néoplasique. Dans les environnements à ressources limitées la technique IFI comporte des limites (la fausse interprétation des résultats, le nombre limité de biologistes qualifiés, la qualité du matériel pour l'immunofluorescence et le coût exorbitant des réactifs entraînant une mauvaise prise en charge des patients. Aussi, en Afrique de façon générale et particulièrement au Burkina Faso, l'ampleur de ces affections est mal connue. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer les aspects épidémiologiques et le diagnostic immunologique par une technique multiplexe immunodot des maladies auto-immunes.

II.1.MATERIEL ET METHODES

Patients et méthodes

Pour cette étude de cohorte et durant les deux premières années, nous avons inclus de façon prospective des patients ayant eu un diagnostic clinique et immunologique de maladies auto-immunes. Les patients sont venus de différentes régions du Burkina Faso pour le dosage des auto-anticorps d'intérêt clinique pour les MAI. Nous avons effectué chez chaque patient un prélèvement de 4 mL de sang total par ponction veineuse dans un tube sec. Ces prélèvements ont été effectués par un personnel habilité à le faire dans le service de prélèvement du département des laboratoires du CHU-SS. Nous avons déterminé les caractéristiques démographiques, les manifestations cliniques, le profil des auto-anticorps du sérum de chaque patient.

Le diagnostic de maladies auto-immunes a été établi en faisant une combinaison du dosage sanguin des autoanticorps au diagnostic clinique des maladies auto-immunes.

Le diagnostic des maladies auto-immunes par technique multiplexe (immunodot).

- **Définition**

La technique de l'immunodot pour la recherche des anticorps a été introduite en 1982 par Paul Herbrinck *et col.* sous l'appellation de « Antigen Spot Test » ou AST [Herbrinck *et al.*, 1982]. Les auteurs se sont inspirés de la technique du Western blot, ou immunotransfert ou immunoempreinte, développée quelques années auparavant par Towbin [Towbin *et al.*, 1979]. Mais, contrairement à cette dernière, les protéines ne sont pas transférées d'un gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose, mais sont directement appliquées sur des bandelettes sous forme de spots pour former des « dots ». Le terme de dot-blot quelquefois employé est donc tout à fait impropre puisque le procédé ne comporte aucune opération de transfert, c'est-à-dire de « blotting ».

Plusieurs antigènes différents peuvent être déposés sur la même membrane permettant la détection simultanée de nombreux anticorps différents. Une fois séchée, la membrane est saturée par des agents bloquants et stabilisants puis conservée à l'abri de l'humidité. Ces antigènes alors situés à la surface de la membrane peuvent se complexer avec leurs anticorps spécifiques par incubation avec le sérum. Les anticorps capturés sont localisés par immunodétection, à l'aide d'un antiserum marqué par une enzyme, et révélés par le substrat correspondant. La lecture des résultats par simple appréciation visuelle de la coloration fournit des résultats qualitatifs, à la limite semi-quantitatifs si l'on tient compte de l'intensité de la coloration. Il existe également la possibilité d'analyser les bandelettes à l'aide d'un scanner qui mesure l'intensité de coloration des spots ou des bandes, permettant une évaluation quantitative. La plupart des immunodots comportent un spot appelé « *cut-off* » (valeur seuil). L'intensité de coloration de ce spot est comparée à celle des autres spots et permet d'interpréter les résultats comme positifs ou négatifs. La coloration des spots varie en effet en fonction de la température et de la durée des incubations, d'où l'importance de ce « *cut-off* », dont la coloration varie parallèlement à celle des spots réactionnels obtenus avec les sérums.

Nous avons utilisé les coffrets **ENA-DOT 7**, **DNA-DOT**, **CYTO-DOT**, **ANCA-MBG-DOT** de Biomedical Diagnostics, France. Ils constituent des méthodes de détection immunoenzymatique rapide et qualitative d'autoanticorps sur support membranaire.

- **Le kit ENA-DOT 7.** Il permet la recherche simultanée de 7 spécificités :

- 5 antigènes nucléaires solubles (Extractable Nuclear Antigen): SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP et Scl – 70.
- et 2 antigènes complémentaires : Jo-1 et centromère.

Les antigènes coatés sur le support membranaire sont :

- Des protéines purifiées : Ro/SS-A (60 kD), Sm (mélange de plusieurs polypeptides de poids moléculaires différents), Sm/RNP (mélange de polypeptides de poids moléculaires différent) et Scl-70 (70kD),
- Des protéines recombinantes : La/SS-B (47 kD), Jo-1 (58 kD) et CENP-B (80kD)
- **Le kit ANCA- MBG-DOT.** Il permet la recherche simultanée :
 - Des anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles (anti-neutrophil cytoplasm antibodies : ANCA) dirigés contre la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3).
 - Des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) grâce à l'utilisation d'un antigène purifié à partir du collagène IV.

Les antigènes déposés sur le support membranaire sont :

- La myéloperoxydase humaine purifiée.
- La protéinase 3 humaine purifiée
- L'antigène « Goodpasture »
- **Le kit DNA – DOT.** Il permet la détection des autoanticorps anti-ADN natif.

L'antigène coaté est l'ADN double brin extrait de thymus de veau

Réactifs de laboratoire

Tableau X. Composition du coffret pour la recherche des ANA[]

Désignation	conditionnement
Bandelettes réactives constituées de 8 puits distincts< Contrôle positif, SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo1, CENP-B	25
Un flacon de conjugué –PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline) A diluer	650 µL
Un flacon de Substrat (BCIP/NBT). Prêt à l'emploi	35 mL
Un flacon de tampon phosphate-Tween (concentré 10x) A reconstituer en eau distillée	30 mL
Tubes de réaction (1,5 ml)	100

Tableau XI. Composition du coffret pour la recherche des ANCA-MBG[]

Désignation	conditionnement
Bandelettes réactives constituées de 4 puits distincts Contrôle positif, MPO, PR3, MBG	10
Un flacon de conjugué –PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline) A diluer	300 µL
Un flacon de Substrat (BCIP/NBT). Prêt à l'emploi	12mL
Un flacon de tampon phosphate-Tween (concentré 10x) A reconstituer en eau distillée	30 mL
Tubes de réaction (1,5 ml)	40

Tableau XII. Composition du coffret pour la recherche des ADN natif[]

Désignation	conditionnement
Bandelettes réactives constituées de 2 puits distincts Contrôle positif, Ag DNA	25
Un flacon de conjugué –PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline) A diluer	650 µL
Un flacon de Substrat (BCIP/NBT). Prêt à l'emploi	18mL
Un flacon de tampon phosphate-Tween (concentré 10x) A reconstituer en eau distillée	30 mL
Tubes de réaction (1,5 ml)	100

Egalement Biomedical diagnostics propose des contrôles multiparamétriques externes qui peuvent être testés en parallèle. Ils ont été testés de façon identique à celle des échantillons. Les différents contrôles que nous avons utilisés sont :

- Immunotrol I, réf. HM 061. Ils renferment des anticorps humains anti-ds ADN.
- Immunotrol I, réf. HM 036. Ils renferment des anticorps humains anti-ANCA (dirigés contre les antigènes MPO et PR3) et anti- MBG.
- Immunotrol IV, réf. HM 051, pour la recherche du SS-A, SS-B, Sm, et Sm-RNP et Immunotrol V, réf. HM 052 pour la recherche du ribosome, centromère, Jo-1, Scl-70 et de l'antigène mitochondrie).

Préparation du dosage et des échantillons

Nous avons prélevé 4mL de sang total par ponction veineuse au pli du coude sur un tube sec.

Après centrifugation à 4000 tours/mn pendant 10 mn, le test est à effectuer avec 20 µL de sérum.

Nous avons évité de travailler avec des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois. Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons ont été conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum, sinon congelés à -20°C. Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

Avant la manipulation, tous les réactifs ont été ramenés à la température ambiante.

Pour la préparation du Tampon de Dilution et de Lavage (TDL), nous avons dilué le tampon PBS –Tween 10X au 1/10 avec de l'eau distillée et conservé entre +2°C et +8°C pendant 3 mois selon les prescriptions du fabricant. Puis une bandelette a été identifiée par échantillon.

Ensuite nous avons identifié 3 tubes de réaction échantillon et les numéroté de 1 à 3 :

- Tube 1 : incubation de l'échantillon
- Tube 2 : incubation du conjugué
- Tube 3 : incubation du substrat

Enfin nous avons distribué 1,2 mL de tampon TDL dans les tubes 1 et 2. Un tube supplémentaire avait été réservé aux deux premiers lavages dans lequel 1,2 mL de tampon TDL a été distribué.

Principe des tests

Les antigènes différents de chaque spécificité sont adsorbés sur un support membranaire constitué de puits distincts.

- Dans un premier temps, la membrane est plongée dans un tube réactionnel contenant 20µL de l'échantillon à tester. S'il contient un ou plusieurs anticorps. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un conjugué, protéine A couplée à la phosphatase alcaline, viendra ensuite se fixer aux auto-anticorps précédemment capturés. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer tout excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en utilisant un substrat insoluble de la phosphatase (BCIP/NBT). Au cours de celle-ci apparaissent des cercles de couleur bleue, traduisant la présence d'autoanticorps dans l'échantillon testé.

Les Modes opératoires de différentes techniques immunodots

Les tableaux ci-dessous recaptulent les modes opératoires pour l'identification des autoanticorps.

Tableau XIII. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des ENA

	OPERATION A EFFECTUER	TEMPS D'INCUBATION
INCUBATION DES SERUMS	- Ajouter 20µL d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL - Y plonger la bandelette identifiée - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s) - Laisser ensuite incuber sans agiter	10 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µL de conjugué dans le tube 2 contenant le TDL		
LAVAGE	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL - Agiter *manuellement - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	1 minute à T.A
INCUBATION DU	- Plonger la bandelette dans le tube 2 - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois	10 minutes à T.A

CONJUGUE	(sur une durée totale de 15 s)	
	- Laisser ensuite incuber sans agiter	
Enfin d'incubation du conjugué, distribuer 1.2 mL de substrat dans le tube 3		
	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL	
	- Agiter *manuellement	1 minute à T.A
LAVAGE	- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	
INCUBATION DU SUBSTRAT	- Placer la bandelette dans le tube 3	
	- Déclencher le chronomètre	
	- Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s)	5 minutes à T.A
	- Laisser ensuite incuber sans agiter	
LAVAGE	- Laver la bandelette sous l'eau de robinet	
SECHAGE	- Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et laisser sécher complètement avant l'interprétation du résultat	Environ 30 minutes à T.A

T.A : Température ambiante entre 18° C et 25° C

***** : Les agitations doivent être lentes et verticales

Tableau XIV. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des ANCA-MBG

	OPERATION A EFFECTUER	TEMPS D'INCUBATION
INCUBATION DES SERUMS	- Ajouter 20µL d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL - Y plonger la bandelette identifiée - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s) - Laisser ensuite incuber sans agiter	45 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µL de conjugué dans le tube 2 contenant le TDL		
LAVAGE	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL - Agiter *manuellement - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	1 minute à T.A
INCUBATION DU	- Plonger la bandelette dans le tube 2 - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois	

CONJUGUE	(sur une durée totale de 15 s) - Laisser ensuite incuber sans agiter	20 minutes à T.A
Enfin d'incubation du conjugué, distribuer 1.2 mL de substrat dans le tube 3		
LAVAGE	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL - Agiter *manuellement - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	1 minute à T.A
INCUBATION DU SUBSTRAT	- Placer la bandelette dans le tube 3 - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s) - Laisser ensuite incuber sans agiter	10 minutes à T.A
LAVAGE	- Laver la bandelette sous l'eau de robinet	
SECHAGE	- Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et laisser sécher complètement avant l'interprétation du résultat	Environ 30 minutes à T.A

T.A : Température ambiante entre 18° C et 25° C

***** : Les agitations doivent être lentes et verticales

Tableau XV. Récapitulatif du mode opératoire pour l'identification des anticorps anti-ADN natif

	OPERATION A EFFECTUER	TEMPS D'INCUBATION
INCUBATION DES SERUMS	- Ajouter 20µL d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL - Y plonger la bandelette identifiée - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s) - Laisser ensuite incuber sans agiter	10 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µL de conjugué dans le tube 2 contenant le TDL		
LAVAGE	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL - Agiter *manuellement - Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	1 minute à T.A
INCUBATION DU	- Plonger la bandelette dans le tube 2 - Déclencher le chronomètre - Agiter *manuellement la bandelette 20 fois	

CONJUGUE	(sur une durée totale de 15 s)	10 minutes à T.A
	- Laisser ensuite incuber sans agiter	
Enfin d'incubation du conjugué, distribuer 600 µL de substrat dans le tube 3		
	- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL	
	- Agiter *manuellement	1 minute à T.A
LAVAGE	- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant	
INCUBATION DU SUBSTRAT	- Placer la bandelette dans le tube 3	
	- Déclencher le chronomètre	
	- Agiter *manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15 s)	5 minutes à T.A
	- Laisser ensuite incuber sans agiter	
LAVAGE	- Laver la bandelette sous l'eau de robinet	
SECHAGE	- Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et laisser sécher complètement avant l'interprétation du résultat	Environ 30 minutes à T.A

T.A : Température ambiante entre 18° C et 25° C

***** : Les agitations doivent être lentes et verticales

Les critères biologiques de diagnostic des tests immunodots sont les suivants:

Nous avons établi des critères biologiques pour assurer une meilleure corrélation entre les signes cliniques et l'identification précise des auto-anticorps [2, 3, 4, 5,7].

Pour les anticorps anti-nucléaires (ANA), des études sérologiques de plus en plus complètes ont permis de mettre en évidence des associations significatives entre certains ANA et certaines maladies :

- **Les anticorps anti-SS-A et anti-SS-B**

De façon associée ou non, ils sont observés dans les mêmes circonstances pathologiques : syndrome de Gougerot-Sjögren, ou syndrome sec, et dans le Lupus Erythémateux Systémique (LES). L'anti-SS-A est également retrouvé chez les mères d'enfant ayant présenté un bloc auriculo-ventriculaire néonatal.

- **Les anticorps anti-RNP**

On les retrouve surtout dans les connectivites, ou Syndrome de Sharp, dont il constitue le marqueur biologique. Il est également observé dans le LED.

- **Anticorps anti-Sm** caractéristique des formes graves de LED
- **Anticorps anti-Scl-70** spécifique de la sclérodermie proximale diffuse.
- **Anticorps anti-Jo-1** retrouvé exclusivement chez les malades atteints de Polymyosite.
- **Anticorps anti-centromère** le plus souvent retrouvés chez des patients présentant une Sclérodermie à localisation restreinte cutanée, désignée par le syndrome CREST.

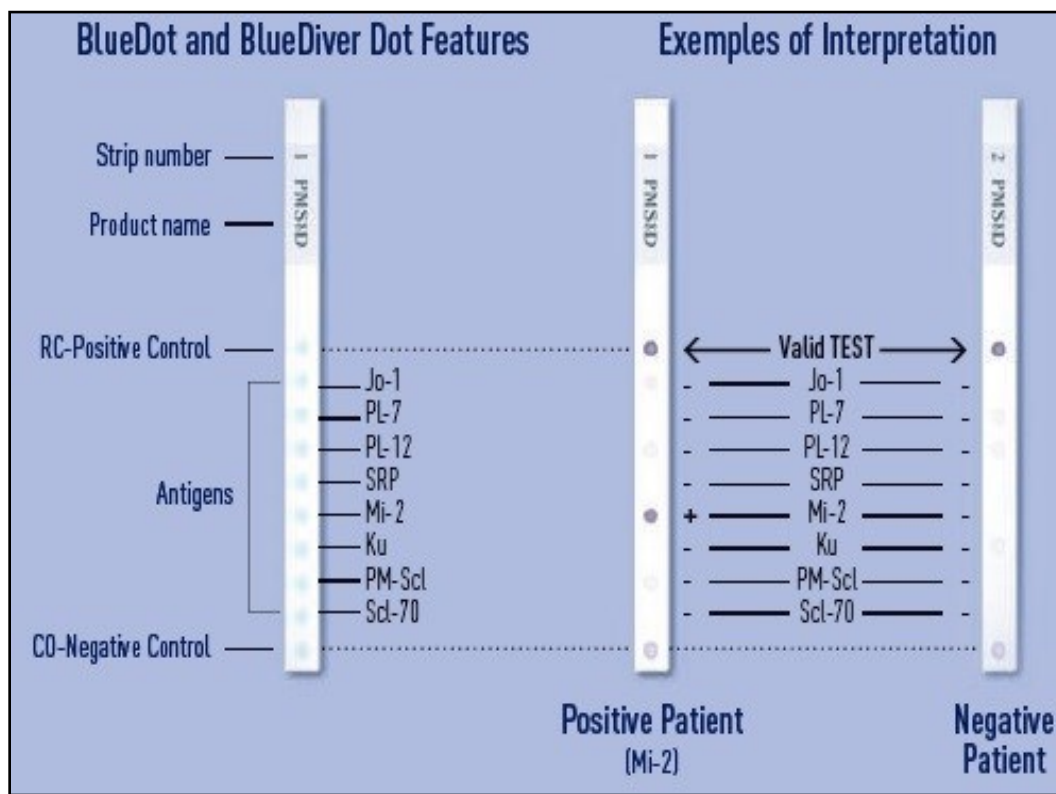


Figure 11. Aperçu de la détection des autoanticorps par la technique immunodot [Homburger, 1995].

Pour les ANCA-MBG

Les ANCA forment une famille d'autoanticorps dont la valeur diagnostique et pronostique au cours des différentes vascularites systémiques primitives, qu'elles soient ou non associées à une glomérulonéphrite, est maintenant bien établie. Ils sont dirigés contre les constituants antigéniques présents dans les granules primaires azurophiles des polynucléaires neutrophiles dans les lysosomes de monocytes.

Les ANCA ont tout d'abord été mis en évidence par immunofluorescence indirecte utilisant des polynucléaires neutrophiles humains fixés à l'éthanol. La présence d'ANCA se caractérise par deux principaux aspects de répartition bien distincte : l'une cytoplasmique et l'autre périnucléaire. Ces deux types dénommés c-ANCA et p-ANCA, sont respectivement liés, de façon prédominante à des anticorps dirigés contre la protéinase 3 (PR3) et contre la Myéloperoxydase (MPO).

La détection par immunofluorescence des ANCA pose néanmoins des problèmes de diagnostic différentiel dans la mesure où il est possible de rencontrer ces anticorps en association avec d'autres anticorps donnant un aspect voisin. Ceci existe aussi bien dans le Wegener et les vascularites où l'association d'ANCA à d'autres autoanticorps a été décrite (facteur rhumatoïde, anticorps antinucléaire, anti-muscle lisse, anti-thyroïdien, etc.) que dans les collagénoses, les hépatites auto-immunes qui, en plus de leurs autoanticorps spécifiques ; peuvent lors de tableaux cliniques particuliers développer des ANCA.

La sensibilité diagnostique des ANCA est particulièrement importante pour la granulomatose de Wegener (anti-PR3), syndrome de Churg et Strauss, la péri-artérite microscopique et les glomérulonéphrites à croissants (anti-MPO).

- **MBG**

La recherche d'autoanticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) constitue une aide importante au diagnostic du syndrome de Goodpasture, qui associe une glomérulonéphrite nécrasante et une pneumopathie marquée par des hémoptysies par hémorragies intra-alvéolaires. Il constitue une maladie auto-immune due à des autoanticorps réagissant avec les constituants de la membrane basale (chaîne alpha 3 du collagène IV). Cette maladie progresse rapidement et, de façon fatale dans plus de 75% des cas en absence de traitement. Un diagnostic rapide, basé sur la recherche des autoanticorps anti-MBG en tant que marqueurs spécifiques, est donc crucial avant que le rein, et souvent le poumon, ne subissent une destruction importante. De plus, la persistance de ces autoanticorps implique de différer la transplantation rénale. Enfin, la recherche des anticorps anti-MBG permet de différencier le syndrome de Goodpasture des néphropathies associées à la présence d'ANCA qui nécessite un traitement totalement différent. L'obtention d'un résultat négatif constitue, à ce titre, un élément très important pour le clinicien en termes de diagnostic d'exclusion.

Concernant les anticorps anti-ADN natif

Ils sont considérés comme le marqueur sérologique majeur du Lupus Erythémateux Systémique (LES). Leur spécificité et leur sensibilité leur confèrent une haute valeur diagnostique. A ce titre, ils font partie des critères cliniques et biologique retenus en 1982 par l'Américain Rheumatism Association (ARA) pour le diagnostic du LES. La détection des anticorps anti-ADN natif est particulièrement utile à deux niveaux : en tant qu'aide au diagnostic du LES et en tant moyen de surveillance de l'évolution de la maladie. Pour ce second point, les prélèvements répétés de sérum auprès du patient peuvent se révéler très informatifs dans la mesure où il existe une corrélation entre les anti-ADN natif, et l'activité de la maladie : les poussées lupiques sont généralement précédées d'une élévation du taux d'anticorps anti-ADN natif, suivie par une chute brutale pendant l'aggravation (particulièrement dans les glomérulonéphrites). D'autre part, les différents traitements ont des effets variables sur les taux anti-ADN natif et peuvent être adaptés par un suivi régulier de ces anticorps.

Dosage des autoanticorps anti-TPO, anti-TG, anti-CCP et des facteurs rhumatoïdes

Les auto-anticorps anti-CCP, anti-TPO et anti-TG ont été mesurés en utilisant un immunodosage en deux étapes avec le prétraitement automatisé de l'échantillon pour la détermination semi-quantitative des autoACs (IgG) spécifiques respectivement du peptide citrulliné cyclique, du TPO et du TG dans le sérum humain en utilisant une technologie chimiluminescente de dosage des microparticulaires. Les échantillons ayant des résultats <5 U / mL ont été définis comme négatifs pour la recherche des anti-CCP. Pour les anti-TPO et les anti-TG, les échantillons ayant respectivement des résultats <5 U / mL et 20 U / mL ont considérés négatif.

Les IgG et IgM RF ont été déterminées en utilisant également la technique chimiluminescence de dosage de microparticules (CMIA). Les échantillons ayant des résultats <20 UI / mL ont été définis comme négatifs.

ANALYSE STATISTIQUE

Les proportions ont été comparées par le test de Chi-Carré. Et le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour l'analyse des moyennes en utilisant les logiciels (SPSS) et EPI info version 3.5.1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart types. Les variations étaient jugées significatives à $p < 0.05$ avec un intervalle de confiance de $= 95\%$.

ETHIQUE

Les échantillons de nos travaux proviennent de patients venus à l'hôpital pour une consultation médicale. Les patients qui avaient été confirmés comme atteints de maladies auto-immunes ont reçu une prescription d'immunosuppresseurs en monothérapie ou associés à d'autres médicaments. Les patients participant à cette étude ont donné un consentement éclairé écrit.

II.3. RESULTAS

Caractéristiques sociodémographiques des patients

Parmi les 65 cas de suspicion de maladies auto-immunes, nous avons identifié 17 cas de maladies auto-immunes. Soit un taux de diagnostic de référence de 17/65 (26,2%). L'incidence avait été de 17/73950 (0,023%). L'analyse des données de la présente étude avait montré qu'il existe une relation entre la suspicion clinique et l'identification des autoanticorps chez les 17 patients ($r=0,89$, $p=0,035$).

Le tableau XVI nous montre les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des sujets de notre cohorte d'étude. En comparant l'impact du sexe sur la survenue des maladies auto-immunes, les personnes du sexe féminin avaient été plus susceptibles à développer une maladie auto-immunes que les sujets du sexe masculin ($p=0,004$). Aussi en analysant la corrélation entre les maladies auto-immunes et les facteurs tels que la race ou l'origine ethnique et les revenus annuels familiaux, nous n'avons trouvé aucune différence statistiquement significative ($p=0,7$). Des anticorps anti-VHB ou anti-VHC (virus de l'hépatite B ou C), anti-VIH, anti-CMV, anti-*Borrelia burgdorferia* avait été trouvés dans le sérum ou la salive de patients atteints de maladies auto-immunes telles que le SSG, le LES et la PR. C'est pourquoi, nous avons cherché à dépister ces infections chez les patients souffrant de maladies auto-immunes dans notre travail. Mais aucune corrélation positive n'a été établie dans notre étude ($p=0,3$).

Tableau XVI. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients (n = 65)

Age (année) Mediane	51 (28- 75)
Sexe Masculin Féminin	4 (6.15%) 61 (93.85%)
Revenu familial annuel (CFA) La médiane Race/Ethnie Sujet de race noire	2.880.000

Sujet de race blanche	64 (98.46%) 1(1.53%)
Statut virologique et bactériologique des patients	
VIH	
Positif	0%
Négatif	100%
VHB	
Positif	0%
Négatif	100%
VHC	
Positif	0%
Négatif	100%
DENGUE SEROTYPE 1, 2,3 et 4 IgG IgM	
Positif	0%
Négatif	100%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Positif	(2/65) 3.07%
Négatif	(63/65) 96.93%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	
Positif	0%
Négatif	100%
CMV	
Positif	0%
Négatif	100%

--	--

Profil des protéines de l'inflammation dans le sérum de patients souffrant de maladies auto-immunes

Le tableau XVII indique les profils des différentes fractions protéiques dans le sérum des patients atteints de maladies auto-immunes dans notre cohorte. En analysant les valeurs des différentes fractions de protéines obtenues chez les patients, on trouve que l'hypoalbuminémie est associée à la plupart des maladies auto-immunes ($p = 0,02$). Aussi, l'hypergammaglobulinémie est associée au LES tandis que l'hypogammaglobulinémie est associée à la thyroïdite de Hashimoto.

Tableau XVII. Profil des fractions protéiques dans le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes

Type de fractions protéiques (g/dl)	PR (n=5)	LES (n= 4)	SSG (n=1)	Thyroïdite de Hashimoto (n =2)	CREST (n=2)	CREST et Poly-myosite (n=2)	Sarcoidose (n=1)	Valeurs de References
Albumine	21.92	22.98	9.62	18.72	17.30	25.75	ND	(40.2-47.6)
Alpha1	2.37	3.06	1.13	2.78	2.62	1.53	ND	(2.1-3.5)
Alpha2	3.40	5.37	1.7	2.88	4.35	3.2	ND	(5.1-8.5)
Beta 1	2.93	1.9	0.79	0.80	2.05	1.89	ND	(3.4-5.2)
Beta 2	3.88	4.28	1.49	1.82	3.20	2.64	ND	(2.3-4.7)
Gamma	13.6	30.4	9.26	4.99	11.48	8.98	ND	(8-13.5)
Protéines totales	49.2	68	24	32	41	44	ND	(60-70)

ND : Non Déterminé.

Les profils des auto-anticorps dans le sérum de patients souffrant de maladies autoimmunes

Le tableau XVIII nous montre les profils des auto-anticorps pathologiques dans les sérums de patients atteints de maladies auto-immunes dans notre étude. En comparant la proportion des auto-anticorps obtenue dans chaque type de maladie auto-immune, on constate qu'il n'y a pas de différence statistique significative dans les maladies auto-immunes ($p = 0,07$).

Tableau XVIII. Profils des auto-anticorps dans le sérum de patients souffrant de maladies auto-immunes

AUTO-ANTICORPS SPECIFIQUE	METHODES	MALADIES ASSOCIÉES	FREQUENCES (%)
Anti –DNA natif, anti- ENA	Immunodot		
Anti-SSA et Anti-SSB		SSG	(1/73950) 0.001
Anti-Sm et ADN natif		LES	(4/73950) 0.005
Anti-CENP- B	Immunodot	CREST	(2/73950) 0.003
Anti-CENP-B et Anti-Jo1	Immunodot	CREST et Polymyosite	(2/73950) 0.003
Anti-CCP	CMIA		
Facteurs Rhumatoïdes	CMIA	RA	(5/73950) 0.007
Anti-TG	CMIA		
Anti-TPO	CMIA	Thyroïdite de Hashimoto	(2/73950) 0.003
Anti SSA/Anti SSB	Immunodot	Sarcoïdose	(1/73950) 0.001

Association entre le genre et les maladies auto-immunes au Burkina Faso

Dans notre étude, on a obtenu une prédominance féminine parmi les sujets affectés par une MAI. Dans l'ensemble, 94,12% (16/17) des personnes touchées sont de sexe féminin et 5,88% (1/17) des patients touchés sont du sexe masculin.

Fréquence des maladies auto-immunes en fonction du statut socio-économique des malades.

Le tableau XIX montre la fréquence des maladies auto-immunes en fonction du statut socio-économique du patient de l'étude. En analysant l'impact de la grossesse sur la survenue d'une maladie auto-immune, on trouve que les femmes ayant eu des grossesses multiples sont plus touchées que celles primipares ($P = 0,002$). Aussi les conditions d'hygiène sont absentes chez la plupart des patients.

Tableau XIX. Fréquence des maladies auto-immunes en fonction du statut socio-économique

Type de maladie auto-immune	Gravidité		Condition d'hygiènes	Fréquence
	Primipare	Multipare		
PR	5		Absence d'hygiène	(5/73950) 0.007
LES	1	4	Absence d'hygiène	(4/73950) 0.005
SSG		1	Absence d'hygiène	(1/73950) 0.001
CREST		2	Absence d'hygiène	(2/73950) 0.003
CREST et Polymyosite		2	Absence d'hygiène	(2/73950) 0.003
Sarcoïdose		ND	Absence d'hygiène	(1/73950) 0.001
Thyroïdite de Hashimoto		2	Absence d'hygiène	(2/73950) 0.003

La relation entre l'âge des femmes et les maladies auto-immunes

La figure 10 indique la répartition des femmes malades en fonction de l'âge et le type de maladies auto-immunes. En comparant les différentes proportions d'âge des femmes en fonction du type de maladie auto-immune contractée, on trouve que les jeunes âgées de 32.5 ans et 35 ans sont plus susceptibles à développer respectivement un LES et un SSG ($\text{Khi } 2 = 5,30$). Tandis que les sujets plus âgés sont plus susceptibles au syndrome de CREST (68 ans), PR (60,4 ans), HT (50 ans) et à développer une polyautoimmunité syndrome de CREST associé à une Polymyosite (46,5 ans) ($\text{Khi } 2 = 3,72$).

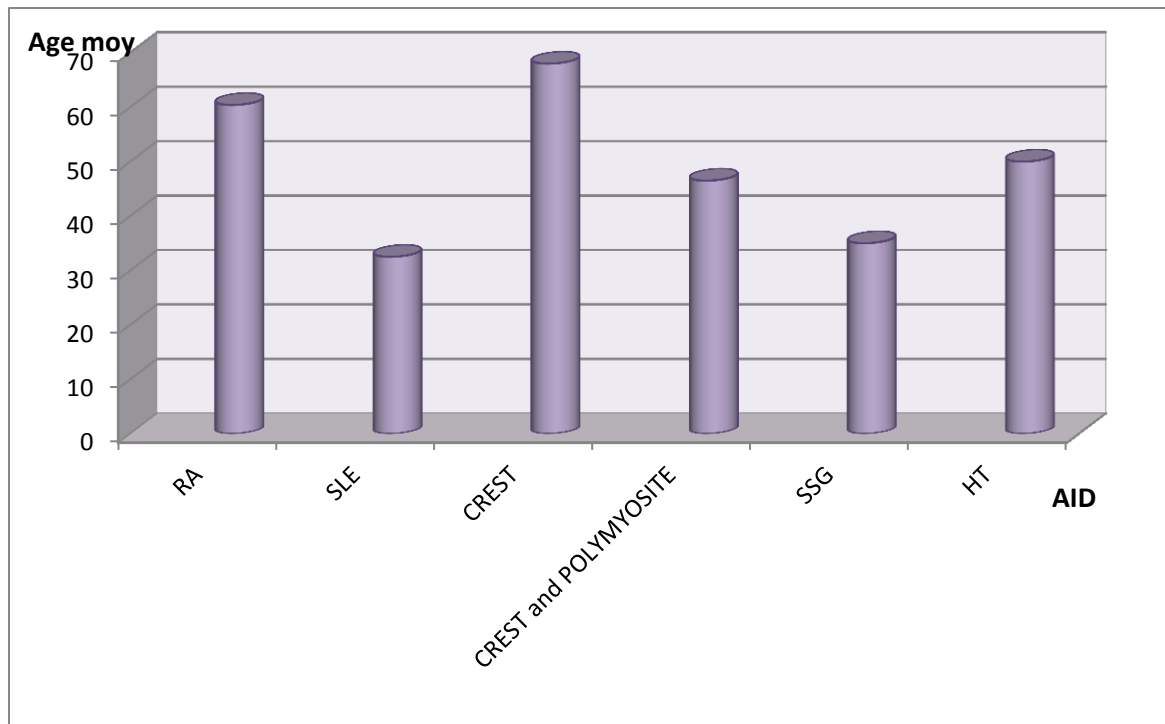


Figure 12. Répartition des femmes malades en fonction de l'âge et le type de maladies auto-immunes

II.4.DISCUSION

Limites et contraintes

Compte tenu de la non médicalisation des maladies auto-immunes au Burkina Faso, la taille de l'échantillon obtenue est faible.

Dans notre étude sur l'épidémiologie moléculaire et le diagnostic des maladies auto-immunes au Burkina Faso, 65 patients avec une suspicion de maladies autoimmunes ont été prélevés en vue d'établir le diagnostic immunologique de ces affections. Nous avons trouvé que les maladies auto-immunes dans le contexte des environnements à ressources limitées comme le Burkina Faso, peuvent être diagnostiquées par la technologie multiplexe (immunodot, BMD, France). Ainsi la technique utilisée nous a permis d'identifier 17 patients souffrant de différentes maladies auto-immunes.

L'incidence trouvée est très faible (0,023%). Parmi les 17 personnes affectées par une MAI, seulement une personne est du sexe masculin. Le diagnostic de référence est de 17/65 soit (26,2%) chez les patients de notre étude (Burkina Faso). De façon générale, les maladies auto-immunes

s'observent préférentiellement chez la femme. Dans le lupus érythémateux systémique, la prédominance féminine est très nette avec un sex ratio de 9 pour 1 [Okada *et al.*, 2010]. Pour la sclérodermie, la prédominance féminine est de 3 à 6 femmes pour 1 homme [Waisberg *et al.*, 2010].

Egalement l'analyse des données confirme la faible fréquence des maladies auto-immunes dans cette étude. Ainsi, il y avait 0,005% de patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES), 0,007% avec une polyarthrite rhumatoïde (PR), 0,003% avec une polyautoimmunité (le syndrome de CREST associé à une Polymyosite), 0,003% avec un syndrome de CREST isolé, 0,001% avec un syndrome Gougerot Sjögren (SSG), 0,003% avec une Thyroïdite de Hashimoto et 0,001% avec une Sarcoïdose. Des travaux réalisés aux USA et en Europe rapportent des prévalences élevées entre 4 et 10% [Forsblad-d'Elia *et al.*, 2005 ; Hanly *et al.*, 2010a ; Hanly *et al.*, 2010b]. D'autres travaux ont montré les maladies auto-immunes sont beaucoup rares en Afrique. Cela a été clairement démontré dans le diabète insulino-dépendant et la sclérose en plaques, où l'incidence est plus élevée en Europe qu'en Afrique. Bach *et al.*, en 2005 ont fait le même constat entre l'Amérique du nord et du sud. Ce qui suggère une implication des facteurs génétiques et/ou ethniques. Mais leur contribution paraît faible au regard de celle de facteurs environnementaux selon les données de plusieurs travaux sur des populations immigrées [Litjen *et al.*, 2009 ; Waisberg *et al.*, 2010].

Les résultats obtenus dans notre étude pourraient s'expliquer probablement par un défaut de diagnostic des maladies auto-immunes dans notre contexte. En considérant certains biais de notre étude, il existe certainement de nombreux patients souffrant de maladies auto-immunes non encore diagnostiqués au Burkina Faso. Tout de même, les résultats préliminaires déjà obtenus montrent que le gradient nord-sud semble décliner dans la répartition géographique des maladies auto-immunes.

Nous avons montré par ailleurs dans nos travaux que le LES et le SSG sont plus fréquents chez les Jeunes âgées de 32,5 ans et 35 ans respectivement. Tandis que les sujets plus âgés sont plus susceptibles au syndrome de CREST (68 ans), PR (60,4 ans), TH (50 ans) et à développer une polyautoimmunité (syndrome de CREST associé à une Polymyosite) (46,5 ans).

Cette inégalité retrouvée entre le sexe et l'âge dans les maladies auto-immunes est souvent due à des facteurs hormonaux [Juby *et al.*, 1994 ; Jacobson *et al.*, 1997 ; Damoiseaux *et al.*, 2005 ; Balboni *et al.*, 2006]. Ainsi il a été montré que la production d'anticorps par les plasmocytes et la présence de lymphocytes chez le sujet de sexe féminin sont plus importantes que chez le sujet de sexe masculin [Ahonen *et al.*, 1987]. En plus, dans des modèles animaux tels que la sclérodermie multiple induite chez la souris, l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale chez la souris, il

a été montré que la sévérité de la maladie augmente avec la castration des souris mâles et diminuait avec l'injection de la testostérone chez les souris femelles [**Bossuyt et al., 2008**].

Les effets immunomodulateurs des hormones stéroïdiennes, et de façon spécifique, la testostérone, pourrait expliquer le fait qu'il ya une association entre les maladies auto-immunes et le sexe féminin.

Nous avons rapporté également qu'il existe une association positive entre les maladies auto-immunes comme la PR, le SSG, la TH, le syndrome de CREST / Polymyosite et le nombre de grossesses de la femme. Les données issues de la littérature sont très similaire à nos résultats [**Engvall et al., 1972 ; Endo et al., 2002 ; Robert et al., 2006 ; Kumar et al., 2009**].

Cela suggère que des cellules fœtales passent à travers le placenta pendant la grossesse et persistent chez la mère après l'accouchement et dans certains cas peut perturber l'immunité. Cette perturbation des mécanismes physiologiques du système immunitaire est d'autant plus élevée que le nombre de grossesse est élevé. C'est pourquoi les femmes multipares sont plus susceptibles aux maladies auto- immunes que celles ayant eu un seul geste.

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé une relation causale entre l'hypothèse d'hygiène et le risque de développer une maladie auto-immune. Les enquêtes anonymes que nous avons menées auprès des différentes familles des patients atteints de MAI ont permis d'établir les conditions d'hygiènes chez les sujets. L'asepsie était absente dans chaque situation (Tableau XIX). Les revenus annuels des 17 patients de notre étude étaient faible (<5760 \$ USA). Des études sur des populations génétiquement homogènes ont établi un lien entre la fréquence de maladies auto-immunes et divers indicateurs du niveau socio-économique. En effet les facteurs associés de manière indépendante à une incidence élevée des maladies auto-immunes témoignent d'un style de vie privilégié tandis que les facteurs environnementaux locaux (pollution atmosphérique) n'influencent pas de manière significative la fréquence des maladies auto-immunes [**Selmi et al., 2009**].

En associant le faible niveau du diagnostic de référence (26.2%) des MAI aux conditions d'hygiènes des patients, nous pouvons dire que si la relation entre le degré d'hygiène et les maladies auto-immunes est causale, elle n'est pas probablement directe. Des mécanismes indirects doivent être considérés.

Il y avait une association négative entre les MAI (PR, LES, CREST / Polymyosite, HT) et les infections par les pathogènes tels que (VIH, VHB, VHC, maladie de Lyme, Dengue sérotype 1, 2, 3 et 4). Par contre nous avons trouvé une association positive entre l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et les cas de PR (3,07%). Les données de la littérature sont très variables et des

travaux ont rapporté que des manifestations auto-immunes telles que la cryoglobulinémie, le syndrome de Sjögren, la thyroïdite auto-immune peuvent survenir au cours de l'hépatite virale C. De même que la présence d'autoanticorps tels que les ANA, Ac anti muscle lisse et Ac anti LKM1 peuvent être associés. L'association avec les autoanticorps anti-LKM1 est plus fréquente [Strassburg, 2015].

En analysant les données des 609 patients atteints de PR inclus dans la cohorte Rochester, plusieurs facteurs augmentant le risque infectieux de façon significative ont été identifiés [Doran *et al.*, 2002b]. Il s'agit de l'âge, de certaines comorbidités incluant les maladies pulmonaires chroniques, les leucopénies, le diabète et l'alcoolisme. D'autres facteurs sont liés à l'activité de la maladie comportant les manifestations extra-articulaires, les nodules rhumatoïdes, le facteur rhumatoïde, le syndrome inflammatoire et la réduction de la capacité fonctionnelle. Le lien entre la sévérité de la PR et l'augmentation du risque infectieux résulte de l'immobilité causée par les dommages articulaires, la présence d'un état cutané défectueux et la chirurgie orthopédique prédisposant aux infections cutanées et articulaires [Doran *et al.*, 2002a]. Parmi les médicaments utilisés pour le traitement de la PR, les glucocorticoïdes constituent le principal facteur de risque infectieux sans pour autant innocenter certains traitements de fond. La dose de corticoïdes associée au risque infectieux n'est pas connue, toutefois le risque existe même pour les faibles doses (5 mg/j) [Smitten *et al.*, 2008].

Concernant la biothérapie, nous connaissons désormais le risque infectieux potentiellement sévère lié à l'utilisation des anti-TNF- α et la plus fréquente et sérieuse en est la tuberculose puisque le relargage du TNF- α est primordial pour la réponse aux infections mycobactériennes (il augmente la capacité des macrophages à phagocyter les mycobactéries et à les tuer, stimule la formation du granulome; ce qui permet la séquestration des mycobactéries et empêche leur dissémination) [Ahonen *et al.*, 1987 ; Correa *et al.*, 2005; Balboni *et al.*, 2006 ; Abreu *et al.*, 2014].

Le risque est plus élevé au cours des six premiers mois suggérant plutôt une réactivation d'une tuberculose latente.

Identifier les facteurs prédictifs d'augmentation du risque infectieux chez les patients atteints de PR constituera certainement le premier pas vers la réduction de la fréquence des infections et permettra également d'identifier les patients à risques sévères nécessitant une stratégie préventive. Concernant les capacités de diagnostics du test immunodot, nos résultats de l'identification directe des autoanticorps dans les échantillons de patients sont bien corrélés aux signes cliniques. L'identification des auto-anticorps est essentielle pour le diagnostic des maladies auto-immunes dans les pays à ressources limitées. Les cliniciens peuvent utiliser les résultats du diagnostic pour évaluer non seulement l'évolution des MAI, mais encore l'efficacité des traitements spécifiques,

en particulier dans les cas de développement de biothérapies ciblées [Engvall *et al.*, 1972 ; Endo *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2009].

Nos technologies ont donné une nouvelle approche pour la quantification des auto-anticorps basée sur un test multiplexe qui représente un avantage par rapport aux méthodes antérieures telles que les analyses ELISA, l'IFI [Balboni, 2006 ; Kumble, 2010 ; Okada, 2010]. Ces dosages immunodot multiplexe permettent également de détecter simultanément plusieurs biomarqueurs d'un seul échantillon de sérum et une seule plate-forme. Le volume de l'échantillon utilisé est faible 20µL de sérum et suit les mêmes étapes qu'un test ELISA classique. Le coût des équipements est réduit et le temps de traitement des échantillons est très rapide (57 à 107 minutes). Aussi il évite la première étape de recherche des autoanticorps utilisé actuellement dans la plupart des laboratoires d'analyse sophistiqués IFI [El Miedany *et al.*, 2004 ; Damoiseaux *et al.*, 2005, Bossuyt *et al.*, 2008].

Ces avantages économiques permettent aux petits laboratoires à ressources limitées d'utiliser cette technologie sans un investissement important et une formation de biologistes et de techniciens qualifiés [Selmi *et al.*, 2012 ; Zafrir *et al.*, 2013].

II.5.CONCLUSION PARTIELLE :

Nous avons trouvé en somme que l'identification directe des autoanticorps par la technique immunodot multiplexe est une approche innovante dans le diagnostic immunologique des maladies auto-immunes au Burkina Faso. On a trouvé que l'incidence était faible. La très faible incidence des maladies auto-immunes trouvées est probablement due à l'existence de patients non diagnostiqués. Et l'utilisation de l'identification directe des autoAc pourra améliorer le diagnostic de référence obtenu avec ces affections. Nous avons trouvé que l'hypothèse d'hygiène qui détermine le gradient nord –sud de la répartition géographique des MAI semble décliner. Même si elle est causale, il faut y associer d'autres facteurs.

Aucune association significative n'a été trouvée entre les maladies auto-immunes et les infections comme le VIH, le VHB, le VHC; la dengue (sérotypé 1, 2, 3,4), le CMV et *Borrelia burgdorferi*.

CHAPITRE III : ANALYSE DU MICROENVIRONNEMENT DES CYTOKINES DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES

III.1. INTRODUCTION

Les maladies auto-immunes ont longtemps été associées à une réponse de type Th1 excessive et non contrôlée par le système immunitaire. Du point de vue physiopathologique, ces maladies correspondent à la survenue d'une rupture de tolérance au soi dont les mécanismes sont complexes et font appel à l'ensemble des acteurs du système immunitaire. Aujourd'hui, plusieurs études ont démontré que certaines maladies telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la sclérodermie localisée, le lupus, la maladie de Crohn et l'asthme non atopique sont en fait le résultat d'une activation de la voie Th17 [Stockinger et Veldhoen, 2007 ; Iwakura *et al.*, 2008 ; Korn, *et al.* 2009 ; Sakuraba *et al.*, 2009]. Les cellules TH17 pour leur développement ou évolution secrètent des cytokines. Ces cytokines ont été associées à la pathogénie de certaines MAI. Pour étudier le rôle du microenvironnement cytokiniques dans ces maladies, des souris invalidées, tant pour le gène de l'IL-17A que pour ceux de l'IL-23, l'IL-6, l'IL-12p40 et l'IL-1, ont été utilisées. Les résultats ont montré que ces souris ne développaient pas l'EAE [Iwakura *et al.*, 2008]. Aussi, il a été prouvé que les cytokines telles que l'IL-23 et IL-17, sont importantes dans la pathogénèse de l'AEA. En effet, des souris déficientes pour l'IL-23p19 ou pour l'IL-12p40 sont résistantes à l'EAE ainsi qu'à l'arthrite induite par le collagène (*Collagen-Induced Arthritis*, CIA), une autre maladie auto-immune, alors que des souris déficientes en IL-12p35 y sont sensibles [Murphy *et al.*, 2003]. Les cellules Th17 peuvent donc être décrites comme des cellules pro inflammatoires, impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunes. Le rôle des cellules Treg est de contrôler une réaction inflammatoire trop importante tandis que celui des cellules Th17 est d'induire une forte réaction inflammatoire en réponse à un processus infectieux. L'activation de ces deux types cellulaires doit être minutieusement régulée pour que l'organisme puisse se défendre contre l'agent pathogène tout en évitant une réaction inflammatoire excessive qui serait nocive pour l'hôte. Comme les cellules Th17 et les cellules Treg ont un rôle totalement opposé, il sera judicieux d'étudier le microenvironnement cytokinique TH17/TREG au cours des maladies auto-immunes.

III.2.MATERIEL ET METHODES

- **Nature des cellules utilisées**

Nous avons effectué le dosage des cytokines dans des surnageants d'incubation de cellules mononucléées du sang total veineux périphérique (PBMCs) de patients souffrant de maladies auto-immunes et de donneurs sains humains (groupe contrôle). Les prélèvements de sang total ont été réalisés dans le Département des laboratoires du Centre Hospitalier Universitaire Sourou Sanou de Bobo Dioulasso et au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Bobo Dioulasso.

- **Isolement et incubation des PBMC**

Nous avons effectué chez chaque sujet de notre travail un prélèvement de 10 mL de sang veineux périphérique sur un tube avec l'héparine comme anticoagulant. Le sang a été dilué au 1/2 dans une solution saline équilibrée de Hank dépourvue en Ca^{2+} et en Mg^{2+} (Gibco BRL). La pénicilline-streptomycine à une concentration de 100 UI/mL a été ajoutée comme antibiotique (Biochrom KG). Les cellules mononucléées telles que les lymphocytes et les monocytes ont été séparées par gradient de centrifugation sur Ficoll- Hypaque (Histopaque 1077 avec une densité de 1,076; Sigma) (30 min à 400g). Après deux lavages successifs, nous avons resuspendues les cellules mononucléées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) en présence de 10% (volume/volume) de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur (56°C, 30min, Gibco BRL), et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 100UI/mL).

- **Culture cellulaire.**

Les cellules sont incubées, à raison de 2×10^6 cellules/puits des plaques de 24puits (Corning Inc), dans un incubateur humidifié (37°C, 95% d'air, 5% de CO_2 , 100% d'humidité), en présence du SVF 80% dilués dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde, Sigma; maximum: 20% (v/v) par puits). Nous avons simulé les conditions d'infection en activant les cellules par le lipopolysaccharide (LPS obtenu de *Salmonella abortus equi*, 5µg/mL) (Sigma). Après 24 heures d'incubation, les plaques sont centrifugées (15min à 200g), et les surnageants ont été aliquotés puis congelés à -80°C pendant 2jours jusqu'au dosage ELISA par le laboratoire CERBA, Paris en France.



Figure 13. Photo du milieu de culture des PBMC.

- **Détermination de la viabilité cellulaire**

Dans une cellule de Malassez, nous avons introduit 50µl de PBMCs, puis ajouter 50µl de bleu de trypan pour la numération des cellules. Les cellules réfringentes sont celles qui sont vivantes et les cellules mortes absorbent le bleu de trypan. Nous avons établi la viabilité des cellules (%) selon la formule suivante

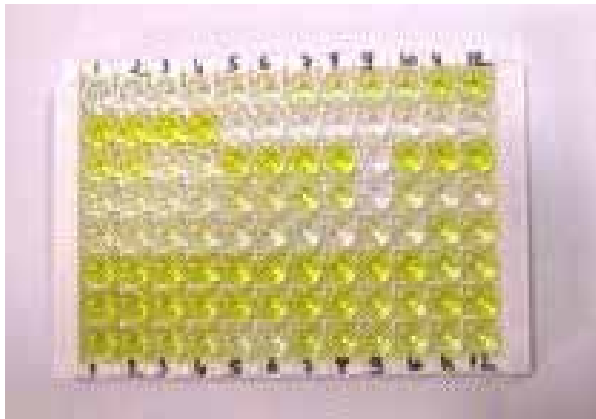
$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{nombre de cellules vivantes}}{\text{nombre de cellules vivantes} + \text{nombre de cellules mortes}}$$

- **Dosages des cytokines par une technique immunoenzymatique**

- **Principe :**

Les cytokines, substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire sont impliquées dans le développement et la régulation du système immunitaire.

Elles constituent par conséquent des marqueurs spécifiques de l'inflammation. Il est intéressant de quantifier ces facteurs afin d'évaluer leur profil dans le cadre d'une MAI. A partir d'un prélèvement de sang total par ponction veineuse au pli du coude, on dose certaines cytokines par la méthode ELISA.



A

B



Figure 14. Photo du dispositif de lecture (A : une plaque ELISA, B : un spectrophotomètre OpsysMRDynex®- Pour la lecture de 4 plaques).

- Test ELISA sandwich

Les surnageants de cultures cellulaires PBMCs de chaque sujet ont été prélevées et dosés pour les cytokines par la techniques ELISA. Les kits ELISA utilisés sont ceux disponibles dans le commerce. Les concentrations des cytokines suivantes : IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, INF- γ , TNF- α et de TGF- β ont été déterminées chez chaque sujet. Les limites inférieures de détection pour les dosages individuels sont les suivantes:

IL-2, 20 pg / mL; IL-10, 1 pg / mL; IL-17A, 5 pg / mL; IL-21, 1 pg / mL; IL-22, 5 pg / mL; IL-23, 4 pg / mL; TGF- β , 10 pg / mL; et IFN- γ , 10 pg / mL.

Nous avons traité brièvement des plaques de 96 puits (Corning Inc.) par 250 μ L/puits d'une solution du premier anticorps monoclonal (IgG) de capture (HalfMoon Bay, Etats-Unis) (5 μ g/mL) dilué dans du PBS/Tween 0,50% (Sigma). Après une nuit d'incubation, scellées hermétiquement et à 4°C, les plaques sont lavées trois fois. Nous avons utilisés le PBS-lait 3 % 250 μ L/puits pour la saturation des sites de fixations non spécifique et incubé à la température ambiante durant 1 heure. Après 2 lavages supplémentaires, 25 μ L de surnageant de PBMC, ou de cytokines recombinantes humaines servant à l'établissement de la gamme étalon sont déposés en double dans chaque puits, et les plaques incubées 2 heures à température ambiant. Les cytokines recombinante humaine étaient obtenues de : (Pharma Biotechnologies, Allemagne pour l'h-IL-2 ; l'h-IL-10 ; l'h-IL-21 ; R&D Systems Europe, UK pour l'h-IL-22; l'h-IL-23;l'h-IL-17A ; l'h-TGF- β et l'h-TNF- α . Après 3 lavages, les puits sont incubés 1 heure à la température ambiante avec 25 μ L d'une solution d'anticorps biotinylé (Half Moon Bay, Etats-Unis) (2 μ g/mL) dilué au 1/1000 dans du tampon PBS-Tween 0.5%. Après lavages, 50 μ L d'une solution de streptavidine –HR peroxydase (Zymed, Etats-Unis) diluée au 1/3000 dans du PBS Tween 0.5% sont déposés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, la réaction enzymatique est révélée par du dichlorate d'O-phénylènediamine (OPD SigmaFast, Sigma) déposé après 4 lavages supplémentaires. La lecture s'effectue par mesure de la densité optique (DO) à 450 nm au spectrophotomètre d'absorption (Figure 14). La concentration en cytokines est déterminée par interpolation à partir de la gamme étalon, et les résultats normalisés par rapport au contrôle.

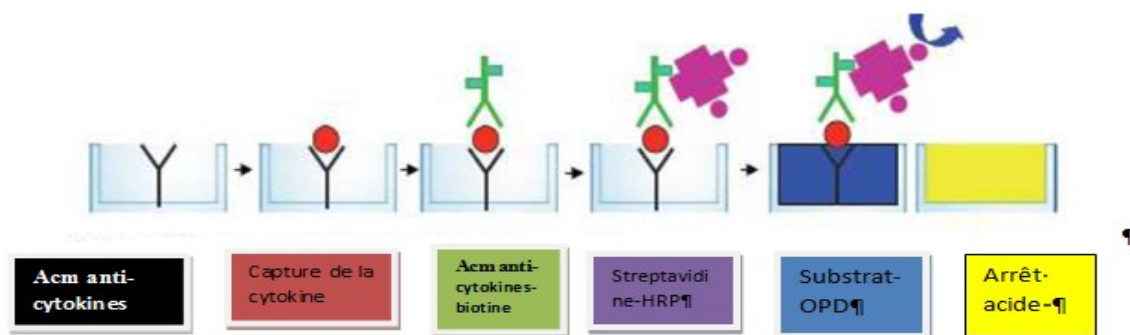


Figure 15. Principe de l'ELISA sandwich [adapté de Goldsby *et al.*, 2003]

- ANALYSE STATISTIQUE**

Les résultats sont exprimés en pg/mL par rapport à la valeur de référence (production de la cytokine étudiée en présence de LPS). Compte tenu du faible nombre d'échantillons, les moyennes ont été analysées par des tests non paramétriques (Kruskal-Wallis). La significativité statistique est définie à $p = 0,05$.

III.3.RESULTATS

Caractéristiques sociodémographiques

Au total, 17 cas de maladies auto-immunes ont été confirmés au laboratoire d'immunologie et d'hématologie du CHUSS de Bobo Dioulasso. Le diagnostic de référence est de 17/65 soit (26,2%). L'incidence obtenue est de 17/73950 (0,023%). Pour cette étude, nous avons identifié deux groupes de sujets. Le groupe de patients souffrant de maladies auto-immunes ($n = 17$), soit 16 sujets de sexe féminin et un sujet de sexe masculin. L'âge moyen est de $29,2 \pm 3,2$ ans. Le groupe de donneurs sains humains ou groupe contrôle se compose aussi de 17 sujets appariés pour l'âge et le sexe avec le groupe de patients. Dans ce groupe, nous avons 2 sujets du sexe masculin et 15 sujets du sexe féminin. L'âge moyen est de $28,7 \pm 2,3$ ans.

Dosage des cytokines

Les concentrations des cytokines telles que : IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α , TGF- β , et l'IFN- γ obtenues après activation des cellules mononuclées du sang périphérique par le LPS de *Salmonella abortus equi*, 5 $\mu\text{g/mL}$ ont été dosées chez les donneurs sains humains ($n = 17$), et chez les patients souffrants de maladies auto-immunes ($n = 17$) (tableau XVII).

Nous avons trouvé dans le surnageant de PBMC un titre moyen de TNF- α de $104,4 \pm 15,2$ pg / mL chez les sujets malades et un titre moyen de $92,5 \pm 12,1$ pg / mL dans le groupe de contrôle. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée (tableau XVII).

La concentration moyenne de l'IL-2 dans le surnageant de PBMC est de $78,1 \pm 9,9$ pg / mL dans le groupe de sujets sains, tandis que dans le groupe de patients souffrant d'une maladie auto-immune elle est de $35,9 \pm 15,8$ pg / mL. Nous avons observé une différence statistiquement significative ($p = 0,01$). Pour l'IL-10, le titre moyen chez les sujets malades est de $212,6 \pm 22,1$ pg / mL. Il est de $226,2 \pm 25,3$ pg / mL chez les sujets sains. En comparant les concentrations de l'IL-10 entre le groupe contrôle et les malades, on trouve une différence statistique significative ($p = 0,016$).

Dans le surnageant de PBMC; le titre moyen de TGF- β chez les sujets sains est de $27,51 \pm 7,7$ pg / mL, alors que dans le groupe des patients souffrant de maladies auto-immunes, il est de $18,02 \pm 5,6$ pg / mL. La différence est statistiquement significative ($p = 0,004$).

Dans le surnageant de PBMC la concentration moyenne en IL-22 dans le groupe de patients souffrant de maladie auto-immune est de $79,5 \pm 22,3$ pg / mL. Comparativement au groupe contrôle, elle est de 45 ± 17 pg / mL; associant une différence statistiquement significative ($p < 0,006$). Le titre de l'IL-17A obtenu chez les sujets malades est de $239,8 \pm 87,5$ pg / mL, alors qu'il est de $102,4 \pm 42,3$ pg / mL chez les sujets sains. En comparant ce titre entre les deux groupes, on trouve qu'il ya une augmentation statistiquement significative du titre de l'IL-17A chez les patients par rapport au groupe de sujets sains ($p = 0,024$). La concentration moyenne de l'IL-21 dans le surnageant de PBMC est de $85,9 \pm 15,6$ pg / mL dans le groupe contrôle et de $198,6 \pm 82,7$ pg / mL dans le groupe de patients. Aussi, la différence est statistiquement significative entre le titre chez les patients avec une MAI et les sujets sains ($p = 0,00001$). Le titre moyen de l'IFN- γ dans le surnageant des PBMC chez les sujets contrôle est de $225 \pm 31,5$ pg / mL, mais il est plus élevé chez les sujets avec MAI : $294,2 \pm 40,1$ pg / mL. Et cette différence est statistiquement significative ($p = 0,000$).

Le tableau XX montre la concentration moyenne dans le surnageant de PBMC de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β et IFN chez les sujets sains et les patients souffrant d'une MAI.

Tableau XX. Concentration des cytokines suivantes : TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β et l'IFN- γ dans le groupe contrôle et le group de malades (Moy $\pm$ SD).

Cytokines	Groupe de contrôle (n = 17) (Pg/mL)	Groupe de patient (n =17) (Pg/mL)	P value (controle vs. patient)
TNF-α (moy$\pm$SD)	92.5 $\pm$ 12.1	104.4 $\pm$ 15.2	p=0.09 (NS)
IL-2 (moy $\pm$SD)	78.1 $\pm$ 9.9	35.9 $\pm$ 15.8	p= 0.01 (S)
IFN-γ (moy $\pm$SD)	225 $\pm$ 31.5	294.2 $\pm$ 40.1	p=0.000 (S)
TGF-β (moy $\pm$SD)	27.51 $\pm$ 7.7	18.02 $\pm$ 4.6	p=0.004 (S)
IL-22 (moy $\pm$SD)	45 $\pm$ 17.7	79.5 $\pm$ 22.3	p=0.006 (S)
IL-23 (moy $\pm$SD)	84.1 $\pm$ 20.4	110 $\pm$ 21.1	p=0.008(S)
IL-17A(moy $\pm$SD)	102.4 $\pm$ 21.8	239.8 $\pm$ 67.5	p=0.00001 (S)
IL-21 (mean$\pm$SD)	85.9 $\pm$ 15.6	198.6 $\pm$ 82.7	P=0.001 (S)
IL-10 (moy $\pm$SD)	266.2 $\pm$ 25.3	212.6 $\pm$ 22.1	P=0.016 (S)
Ratio IL-2/IL-17A	0.76	0.15	

La concentration de l'interleukine 2 (IL-2) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IL-2 dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-2 obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous constatons que la production d'IL-2 est significativement plus élevée dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 16). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes maladies autoimmunes ($p = 0,07$).

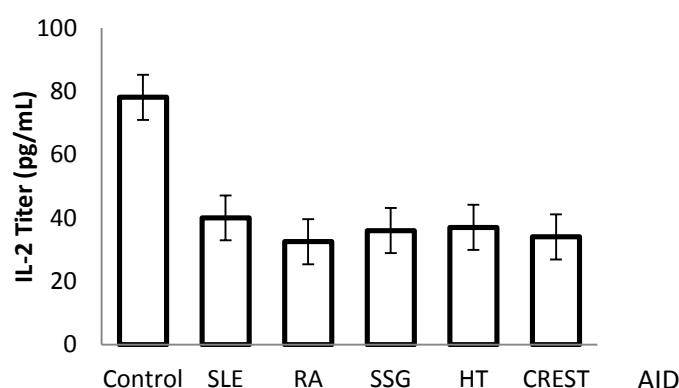


Figure 16. Concentration de l'IL-2 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM ($n = 17$ pour le groupe contrôle et $n=17$ pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interleukine 10 (IL-10) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IL-10 dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-10 obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous constatons que la production d'IL-10 est significativement plus élevée dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 17). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes maladies auto-immunes ($p = 0,09$).

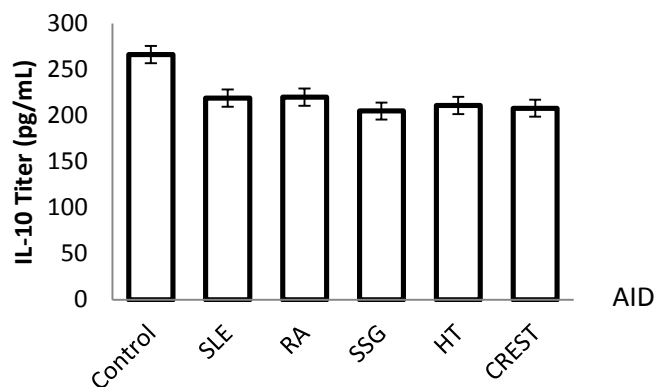


Figure 17. Concentration de l'IL-10 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interleukine 17A (IL-17A) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné également le rôle potentiel de l'IL-17A dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-17A obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre d'IL-17A significativement plus faible dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 18). En outre, on a observé une différence statistiquement significative entre les patients atteints de PR et les autres maladies auto-immunes ($p = 0,001$).

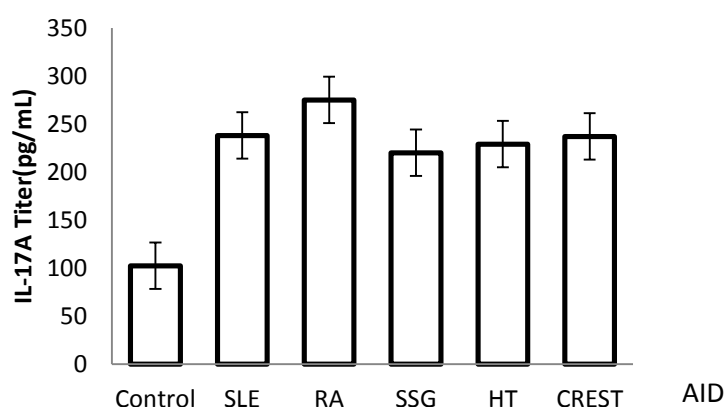


Figure 18. Concentration de l'IL-17A chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration du TGF- β dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné le rôle potentiel du TGF- β dans les maladies auto-immunes en comparant les différents titres obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre moyen de TGF- β significativement plus élevé dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 19). Une différence statistiquement significative a été observée entre les patients atteints de la thyroïdite d'Hashimoto et les autres maladies auto-immunes ($p = 0,03$).

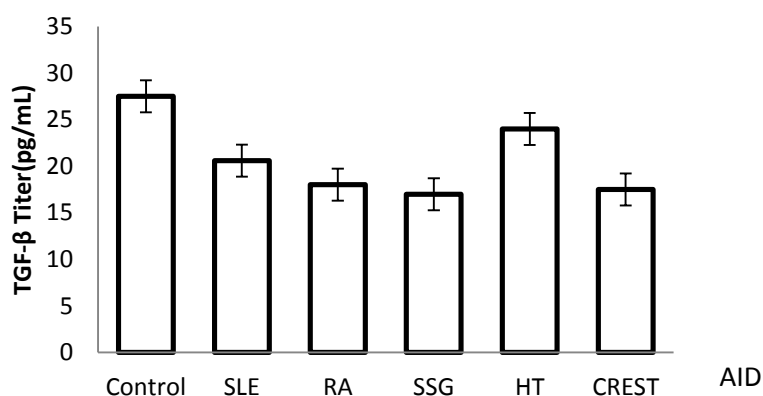


Figure 19. Concentration du TGF- β chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interleukine 22 (IL-22) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IL-22 également dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-22 obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre d'IL-22 significativement plus faible dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 20). Egalement une différence statistiquement significative a été observée entre les patients avec la PR et les autres maladies auto-immunes ($p = 0,004$) (Figure 19).

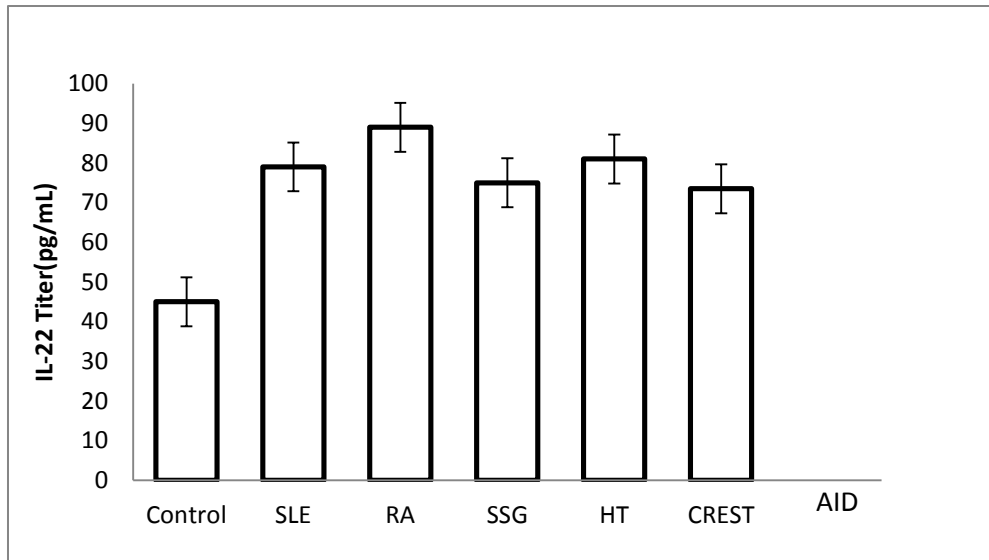


Figure 20. Concentration de l'IL-22 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interleukine 23 (IL-23) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IL-23 dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-23 obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre d'IL-23 significativement plus faible dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 21). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les différentes maladies auto-immunes ($p = 0,075$).

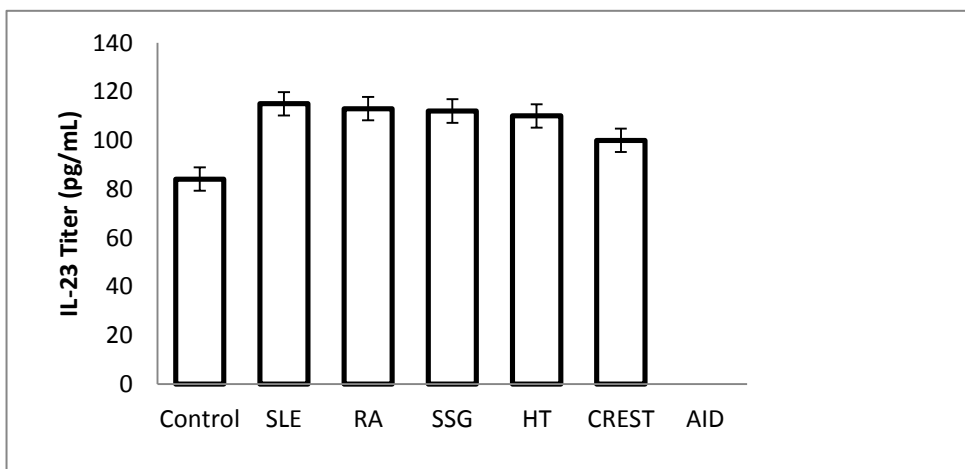


Figure 21. Concentration de l'IL-23 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interleukine 21 (IL-21) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IL-21 dans les maladies auto-immunes en comparant les titres d'IL-21 obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre d'IL-21 significativement plus bas dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 22). On obtient une variation significative entre les patients avec le LES; la PR et les autres maladies auto-immunes ($p = 0,000$) (figure 19).

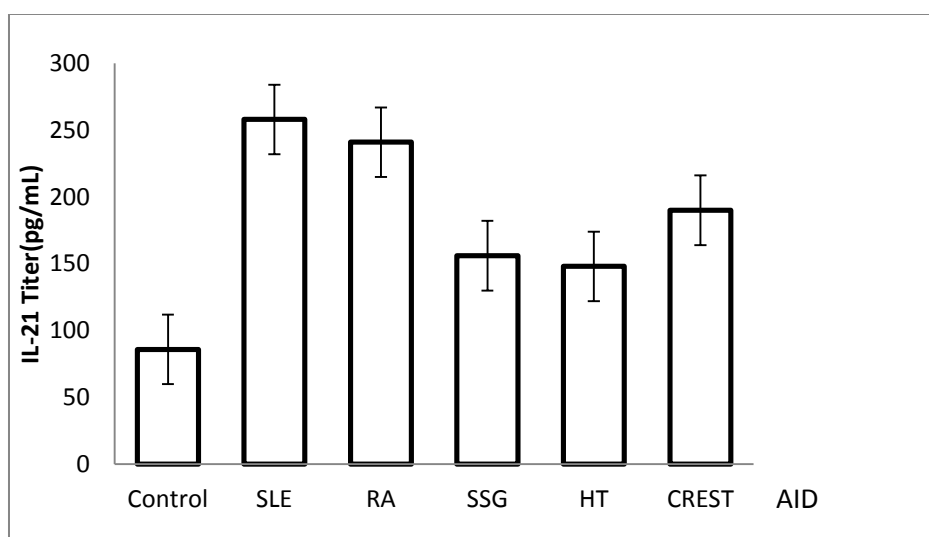


Figure 22. Concentration de l'IL-21 chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains.

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM (n= 17 pour le groupe contrôle et n=17 pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

La concentration de l'interféron gamma (IFN- γ) dans le surnageants de PBMC chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains

Nous avons examiné le rôle potentiel de l'IFN- γ dans les maladies auto-immunes en comparant les différents titres obtenus dans le groupe témoin et le groupe de patients. Nous avons obtenu un titre

d'IFN- γ significativement plus faible dans le groupe témoin que dans le groupe de patients (figure 23). Il ya une variation significative entre les patients atteints de LES, la PR et les autres maladies auto-immunes ($p = 0,002$).

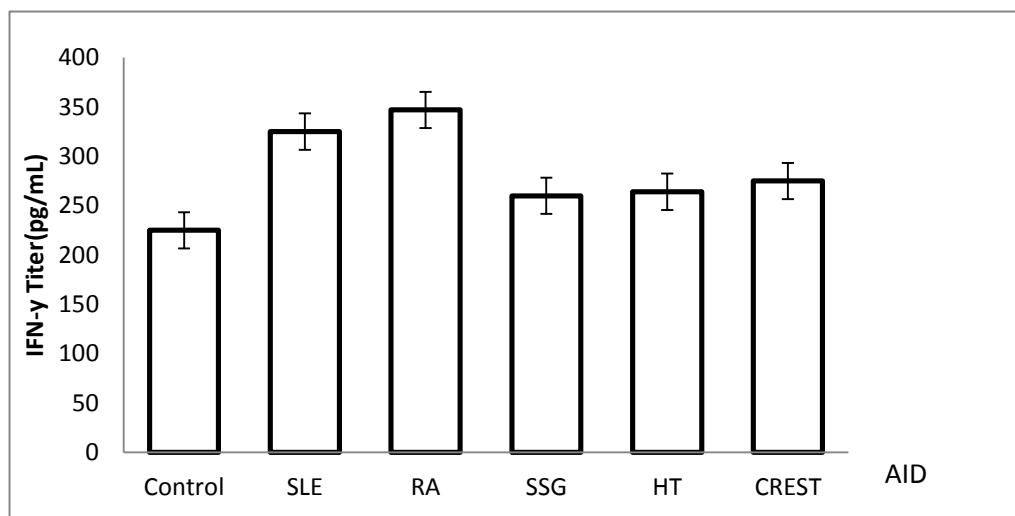


Figure 23. Concentration de l'IFN- γ chez les patients avec maladies auto-immunes et chez les sujets sains

Chaque barre représente la Moy $\pm$ SEM ($n = 17$ pour le groupe contrôle et $n = 17$ pour le groupe de patients avec maladies auto-immunes).

III.4. DISCUSSION

En fonction de nos résultats obtenus ci-dessus, nous avons cherché à élucider les mécanismes moléculaires qui gouvernent les maladies auto-immunes chez les patients dans les conditions des pays à ressources limitées. Ainsi nous avons focalisé notre recherche sur l'analyse du microenvironnement cytokinique qui gouverne TH17/TREG chez les patients atteints de maladies auto-immunes. Dans cette étude le dosage des cytokines a été effectué dans le surnageant de PBMC activées par le LPS de *Salmonella abortus equi* chez 17 patients souffrant de maladies auto-immunes et chez 17 donneurs sains.

Nous avons trouvé dans notre étude qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le titre de TNF- α chez les sujets du groupe contrôle et les sujets souffrant de maladies auto-immunes. La plupart des travaux s'accordent sur une concentration de TNF- α élevée dans les cas de maladies auto-immunes. Ainsi des études conduites en Europe ont montré que des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ont été guéris grâce à une biothérapie anti-TNF- α [Calabresi *et al.*, 1998 ; Stockinger *et al.*, 2007]. Ces études ont été réalisées dans des conditions de rareté

apparente des épidémies et/ou endémies dans ces localités. Les populations qui y vivent sont donc très peu exposées aux pathogènes et leurs vecteurs.

Cette différence avec nos résultats est justifiée par le fait que le Burkina Faso où nous avons conduit ce travail se trouve dans une zone endémo-épidémique de la plupart des maladies tropicales. Les conditions de transmission des pathogènes sont permanentes et le système immunitaire des populations se trouve soumis à une constante stimulation par ces pathogènes et/ou leurs vecteurs. Ceci peut contribuer à une augmentation probable de la susceptibilité des sujets de ces zones aux phénomènes d'auto-immunité et à la pathologie cancéreuse.

Par ailleurs, il a été montré que le TNF- α est principalement sécrété par les cellules TH1 et nos titres de TNF- α obtenus confirment que ces sous-populations lymphocytaires ne sont pas impliquées dans le développement des maladies auto-immunes [Stockinger *et al.*, 2007].

Dans notre étude, nous avons montré que les concentrations moyennes de l'IL-2, l'IL-10 et le TGF- β dans le groupe de patients sont significativement plus basses que dans le groupe contrôle. Nos résultats corroborent les résultats d'autres études qui ont indiqué une diminution de la concentration des cytokines comme l'IL-2, l'IL-10 et la TGF- β au cours des rechutes de maladies auto-immunes [Carrieri *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 2009]. Ainsi des études ont clairement montré les effets inhibiteurs de l'IL-10 au cours de certaines maladies auto-immunes telles que la sclérodémie multiple [Calabresi *et al.*, 1998 ; Cucci *et al.*, 2010].

Concernant les titres moyens de l'IL-2 et du TGF- β dans les surnageants de PBMC, des travaux ont montré que ces cytokines non seulement induisent l'expression de Foxp3, mais encore sont nécessaires pour maintenir l'expression de ce facteur de transcription [Song Guo *et al.*, 2007]. D'autres études ont rapporté que l'IL-2 est nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules TREG [Antony *et al.*, 2006; Doreau *et al.*, 2009; Fonterot *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2009].

Meyer *et al.* ont rapporté que la sécrétion du TGF- β 1 par les lymphocytes T régulateurs inhibent le développement de l'EAE [Meyer *et al.*, 2001]. En plus, le TGF- β 1 exogène peut prévenir le développement de l'EAE. Mieux, la sévérité de la maladie augmente avec la neutralisation de TGF- β 1. Aussi l'apparition de symptômes chez les patients souffrant de maladies auto-immunes a été également associée à la faible concentration de TGF- β 1 [Racke *et al.*, 1992].

Ces résultats démontrent le rôle inhibiteur de ces cytokines sur les cellules du système immunitaire. Ainsi un défaut d'activation des cellules TREGS pourrait expliquer le développement des cellules TH17 en particulier dans les maladies auto-immunes. En effet, les cellules TREGS

sont normalement activées par des cellules dendritiques et sécrètent IL-10 et TGF- β qui sont des cytokines anti-inflammatoires.

Dans ce travail, les résultats obtenus montrent que les titres des cytokines comme l'IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 et IFN- γ ont significativement augmenté dans le groupe des patients souffrant de maladies auto-immunes que dans le groupe de donneurs sains.

Aussi, nous avons trouvé que les patients atteints de LES et de PR ont une concentration élevée en IL-22, IL-21. Ensuite ceux qui souffrent d'une PR ont une concentration élevée en IL-17A. Enfin les patients atteints de HT montrent des titres élevés en TGF- β . Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus par de nombreux travaux [**Kallaur *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2009**].

Chez les sujets souffrant de MAI comme le LES, la SM et la PR ; il a été montré que l'IL-17 en association avec IL-21 et la cytokine BAFF favorise la formation des centres germinatifs et peut influencer les lymphocytes B à produire des autoanticorps pathogènes [**Doreau *et al.*, 2009 ; Hsu *et al.*, 2008 ; Kwok *et al.*, 2012**]. Des travaux de génétique ont rapporté qu'il existe un polymorphisme des molécules codant pour les cellules TH17 (p. Ex., L'IL-21) ou leurs récepteurs (p. Ex. IL-21R) au cours du LES [**Sawalha *et al.*, 2009 ; Webb *et al.*, 2009**]. En effet, des variants génétiques de facteurs de transcription (par exemple, ETS1) qui régulent négativement la différenciation des cellules TH17 (par exemple, IL-21) pourrait prédisposer au LES [**Leng *et al.*, 2011**]. Aussi le blocage de la voie de synthèse de l'IL-21 améliorerait les symptômes lupiques dans un modèle murin [**Heber *et al.*, 2007**].

Des travaux récents ont montré que l'IL-22 joue également un rôle important dans la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes. L'IL-22 est donc une cytokine majeure dans plusieurs maladies auto-immunes, comme le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'hépatite auto-immune, la maladie du greffon contre l'hôte (GHVD) et les maladies allergiques [**Yang *et al.*, 2014**]. Cela montre que l'IL-22 est une potentielle cible en biothérapie dans la prise en charge des maladies auto-immunes.

Sur la base de la concentration des cytokines dosées telles que l'IL-17A et l'IFN- γ , nous avons montré que le phénotype de cellules TH17 majeur dans notre travail est : IL-17 +, IFN- γ +. Des études ont observé plusieurs phénotypes des sous population lymphocytaires TH17 dans le sang périphérique et les tissus inflammés. Ces résultats impliquent que les cellules TH17 sont instables et, selon le type d'inflammation et l'environnement des cytokines, les cellules TH17 peuvent acquérir différents phénotypes tels que (l'IL-17 +, IFN- γ +) et (l'IL17 + IL-4 +, IFN- γ -). En se

basant sur des données plus récentes obtenues avec l'IL-17A chez des souris [**Hiroba et al., 2011 ; Wei et al., 2009**], les cellules TH17 semblent être stables dans les processus inflammatoire aiguë, alors que sous l'inflammation chronique, ces cellules sont susceptibles de donner des phénotypes mixtes.

Nous proposons que des cibles thérapeutiques puissent être dirigées vers ces phénotypes pour traiter les maladies auto-immunes.

Notre étude a montré enfin que le titre de IL-23 dans le surnageant de PBMC est statistiquement différent entre les deux groupes. Des concentrations élevées en IL-23 sont associées à une augmentation de la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T. Vaknin-Dembinsky et al. ont fait les mêmes constats. Ils ont montré que les cellules dendritiques dérivant de monocytes des patients souffrant de maladies auto-immunes produisent plus l'IL-23 comparativement à des témoins sains [**Babaloo et al., 2013; Vaknin-Dembinsky et al., 2006**]. En plus, il a indiqué que les cytokines comme l'IL-23 et l'IL-17 jouent un rôle très crucial dans la pathogenèse de la plupart des maladies auto-immunes. En effet, les souris déficientes en IL-23p19 ou en IL-12p40 sont résistantes à l'EAE ainsi qu'à l'arthrite induite par le collagène (CIA), qui est une autre maladie auto-immune. Ces données montrent que les cellules TH17 peuvent être décrites comme des cellules pro-inflammatoires impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunes [**Lovett-Racke et al., 2011 ; Romagnani et al., 2006**].

III.5. CONCLUSION PARTIELLE:

Nous avons montré que dans les cas de maladies auto-immunes et dans le contexte des pays à ressources limitées comme le Burkina Faso, le microenvironnement des cytokines est variable. Les cytokines pro-inflammatoires de la voie des cellules TH17 telles que l'IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 et IFN- γ sont sécrétées en abondance par les PBMC activées par le LPS de *Salmonella abortus equi* chez les sujets souffrant de maladies auto-immunes. Par contre les cytokines anti-inflammatoires de la voie des lymphocytes T régulateurs (IL-2, IL-10 et TGF- β) sont très peu sécrétées pendant les processus auto-immuns. En analysant le profil de sécrétion des cytokines, nous avons mis en évidence une prévalence élevée du phénotype des TH17 suivant : IL-17+, IFN- γ +. Nous proposons que des cibles thérapeutiques soient dirigées vers ces phénotypes pour améliorer le traitement des maladies auto-immunes.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons trouvé dans un premier temps que l'identification directe des autoanticorps par la technique immunodot multiplexe est une approche innovante dans le diagnostic immunologique des maladies auto-immunes au Burkina Faso. On a trouvé que l'incidence était faible. La très faible incidence des maladies auto-immunes trouvée est probablement due à l'existence de patients non diagnostiqués. Et l'utilisation de l'identification directe des autoAc pourra améliorer le diagnostic de référence obtenu avec ces affections. Nous avons trouvé que l'hypothèse d'hygiène qui détermine le gradient nord –sud de la répartition géographique des MAI semble décliner. Même si elle est causale, il faut y associer d'autres facteurs. Aucune association significative n'a été trouvée entre les maladies auto-immunes et les infections comme le VIH, le VHB, le VHC; la dengue (sérotypel 2, 3,4), le CMV et *Borrelia burgdorferi*.

Dans le second volet de la thèse, nous avons montré que dans les cas de maladies auto-immunes et dans le contexte dans des pays à ressources limitées comme le Burkina Faso, le microenvironnement des cytokines est variable. Les cytokines pro-inflammatoires de la voie des cellules TH17 telles que l'IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 et IFN- γ sont sécrétées en abondance par les PBMC activées par le LPS de *Salmonella abortus equi* chez les sujets souffrant de maladies auto-immunes. Par contre les cytokines anti-inflammatoires de la voie des lymphocytes T régulateurs (IL-2, IL-10 et TGF- β) sont très peu sécrétées pendant les processus auto-immuns. En analysant le profil de sécrétion des cytokines, nous avons mis en évidence une prévalence élevée du phénotype des TH17 suivant : IL-17+, IFN- γ +. Nous proposons que des cibles thérapeutiques soient dirigées vers ces phénotypes pour améliorer le traitement des maladies auto-immunes.

PERSPECTIVES

Afin de comprendre la contribution des différentes populations de cellules T dans la pathologie auto-immune humaine, nous procéderons à la caractérisation de l'expression de Foxp3 et de ROR γ chez les patients ayant un processus auto-immuns (contexte du Burkina).

L'antagonisme phénotypique et fonctionnel observés entre TREG et les TH17 suggère leurs implications dans les processus auto-immuns. Nous souhaitons évaluer, la présence des deux sous-populations cellulaires isolées d'échantillons de patients burkinabè et déterminer les conséquences de la délétion de Foxp3 et/ou ROR γ . Les sous-populations de LTCD4⁺ seront marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre les marqueurs de surfaces discriminants (CD4⁺CD25⁺) pour les TREGS et (interleukine-17⁺) pour les TH17 et triés par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). L'ARN des cellules sera extrait et l'expression relative de Foxp3 et de ROR γ sera évaluée par RT-PCR quantitative. Ensuite, une analyse par microarray du transcriptome complet des deux sous-populations de LTCD4⁺ sera envisagée cela permettra de mettre en relation d'éventuels antagonismes fonctionnels entre TREG ET TH17 chez les patients souffrant d'une MAI dans le contexte des environnements de non aseptie.

Nous utiliserons la cytométrie en flux pour poursuivre également nos travaux sur l'évaluation de la densité des récepteurs des cytokines impliquées dans les maladies auto-immunes. Grâce à la technique de perméabilité des membranes cellulaires nous poursuivrons le dosage intracellulaire des cytokines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

ABREU AS, FERNANDES GH, BORBA EF, GUEDES LKN, RAMOS JF, et al. Musculoskeletal Tuberculosis in Dermatomyositis: Association or Coincidence? *Open J Rheumatol Autoimmune Dis*, 2014, 4: 58-61.

AFZALI B, LOMBARDI G, LECHLER RI, LORD GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 2007, 148 (1): 32-46.

AHONEN P, MIETTINEN A, PERHEENTUPA J. Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metabol*, 1987, 64: 494-500.

ALARCON-SEGOVIA D, LORENTE L et RUIZ-ARGUELLES A. The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. *J Autoimmun*, 1996a, 9: 295-300.

ALARCON-SEGOVIA D, RUIZ-ARGUELLES A, et LORENTE L. Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. *Immunol Today*, 1996b, 17:163-164.

ALLAN SE, PASSERINI L, BACCHETTA R, CRELLIN N, DAI M, ORBAN PC, ZIEGLER SF, RONCAROLO MG, LEVINGS MK. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest*, 2005, 115 (11): 3276-3284.

ALLEN S, READ S, DIPAOLO R, MCHUGH RS, SHEVACH EM, GLEESON, PA et VAN DRIEL IR. Promiscuous thymic expression of an autoantigen gene does not result in negative selection of pathogenic T cells. *J Immunol*, 2005, 175: 5759-5764.

ANDERSON MS, VENANZI ES, CHEN Z, BERZINS SP, BENOIST C, et MATHIS D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, 2005a;23, 227-239.

ANDERSON MS, et BLUESTONE JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 2005;23: 447-485.

ANDERSON MS, VENANZI ES, KLEIN L, CHEN Z, BERZINS SP, TURLEY SJ, VON BOEHMER H, BRONSON R, DIERICH A, BENOIST C et MATHIS D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 2002, 298: 1395-1401.

ANHALT GJ, LABIB RS, VOORHEES JJ, BEALS TF, DIAZ LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of Ig G from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982, 306: 1189-96.

ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, LAZZERI E, MANETTI R, VANINI V, ROMAGNANI P, MAGGI E, ROMAGNANI S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med*, 2002, 196 (3): 379-387.

ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11 (6): 257.

ANTONY PA, PAULO S CM, AHMADZADEH M, AKPINARLI A, PALMER DC, SATO N, KAISER A, HINRICHS CS, KLEBANOFF CA, TAGAYA Y, RESTIFO NP. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol*, 2006; 176 (9): 5255-5266.

ASCHENBRENNER K, D'CRUZ LM, VOLLMANN EH, HINTERBERGER M, EMMERICH J, SWEE LK, ROLINK A, KLEIN L. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*, 2007, 8 (4): 351-358.

ASKENASY N, KAMINITZ A, YARKONI S. Mechanisms of T regulatory cell function. - *Autoimmun Rev*, 2008, 7 (5): 370-375.

AUDIA S, NICOLAS A, CATHELIN D, LARMONIER N, FERRAND C, FOUCHER P, FANTON A, BERGOIN E, MAYNADIE M, ARNOULD L, BATEMAN A, LORCERIE B, SOLARY E, CHAUFFERT B, BONNOTTE B. Increase of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a Phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4⁺ CD25⁺ T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 2007, 150 (3): 523-530.

B

BABALOO Z, YEGANEH RK, FARHOODI M, BARADARAN B, BONYADI M, AGHEBATI L. Increased IL-17A but decreased IL-27 serum levels in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol*, 2013, 10(1):47-54.

BAECHER-ALLAN C, WOLF E, HAFNER DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Clin Immunol*, 2005, 115 (1): 10-18.

BAIN SC, PRINS JB, HEARNE CM, RODRIGUESNR, ROWE BR, PRITCHARD LE, RITCHIE RJ, HALL JR, UNDLIEN DE, RONNINGENKS, et al. Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. *Nat Genet*, 1992; 2, 212-215.

BALBONI I, CHAN SM, KATTAH M, TENENBAUM JD, BUTTE AJ, et al. Multiplexed protein array platforms for analysis of autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 391-418.

BANQUE MONDIALE, 2012. Burkina Faso-Développement des compétences et de l'emploi, Rapport n°. 69635-BF, Document de la Banque mondiale, Washington DC.

BAO W, BUSSEL JB, HECK S, HE W, KARPOFF M, BOULAD N, YAZDANBAKHS K. Improved regulatory T cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood*, 2010; [07/08/2010], pubmed.

BARDEL E, LAROUSSE F, CHARLOT-RABIEGA P, COULOMB-L'HERMINE A, DEVERGNE O. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol*, 2008, 181 (10): 6898-6905.

BELL GI, HORITA S AND KARAM JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 1984, 33: 176-183.

BELLONE M, IEZZI G, ROVERE P, GALATI G, RONCHETTI A, PROTTI MP, DAVOUST J, RUGARLI C, AND MANFREDI AA. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol*, 1997; 159, 5391-5399.

BENNETT ST, LUCASSEN AM, GOUGH SC, POWELL EE, UNDLIEN DE, PRITCHARD LE, MERRIMAN ME, KAWAGUCHI Y, DRONSFIELDMJ, POCIOT F. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*, 1995, 9: 284-292.

BELKAID Y, ROUSE BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 2005, 6 (4):353-360.

BENSINGER SJ, BANDEIRA A, JORDAN MS, CATON AJ, LAUFER TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4 (+) 25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med*, 2001, 194 (4): 427-438.

BETTAIEB A, OKSENHENDLER E, DUEDARI N, BIERLING P. - Cross-reactive antibodies between HIVgp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *ClinExp Immunol*, 1996, 103 (1): 19-23.

BETTELLI E, DASTRANGE M, OUKKA M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl AcadSci U S A*, 2005, 102 (14): 5138-5143.

BETTELLI E, KORN T, KUCHROO VK. - Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19 (6): 652-657.

BEUTNER B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004, 430: 257-263.

BLUESTONE JA, MACKAY CR, O'SHEA JJ, STOCKINGER B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (11): 811-816.

BOEHLEN F, HOHLFELD P, EXTERMANN P, PERNEGER TV, DE MOERLOOSE P. - Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. *Obstet Gynecol*, 2000, 95 (1): 29-33.

BORSELLINO G, KLEINWIEFELD M, DI MITRI D, STERNJAK A, DIAMANTINI A, GIOMETTO R, HOPNER S, CENTONZE D, BERNARDI G, DELL'ACQUA ML, ROSSINI PM, BATTISTINI L, ROTZSCHKE O, FALK K. Expression of ectonucleotidase CD39 by

Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007, 110 (4): 1225-1232.

BOSSUYT X, LOUCHE C, WIIK A. Standardisation in clinical laboratory medicine: an ethical reflection. *Ann Rheum Dis*, 2008, 8: 1061-1063.

BOSSUYT X, FRANS J, HENDRICKX A, GODEFRIDIS G, WESTHOVEN SR, et al. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem*, 2004, 12: 2361-2369.

BRANDENBURG S, TAKAHASHI T, DE LA ROSA M, JANKE M, KARSTEN G, MUZZULINI T, ORINSKA Z, BULFONE-PAUS S, SCHEFFOLD A. IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2008, 38 (6): 1643-1653.

BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD KA, PAEPER B, CLARK LB, YASAYKO SA, WILKINSON JE, GALAS D, ZIEGLER SF, RAMSDELL F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 2001; 27 (1): 68-73.

C

CALABRESI PA, TRANQUILL LR, MCFARLAND HF, COWAN EP. Cytokine gene expression in cells derived from CSF of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 1998; 89(1-2):198-205.

CAO D, MALMSTROM V, BAECHER-ALLAN C, HAFLER D, KLARESKOG L, TROLLMO C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 2003, 33 (1): 215-223.

CARRIERI PB, PROVITERA V, DE ROSA T, TARTAGLIA G, GORGA F, PERRELLA O. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1998, 20(3):373-82.

CASCIOLA-ROSEN LA, ANHALTG et ROSENA. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 1994, 179: 1317-1330.

CASIANO CA, MARTIN SJ, GREEN DR, et TAN EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1) -mediated T cell apoptosis. *J Exp Med*, 1996, 184: 765-770.

CERVERA R, BALASCH J. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Update*, 2008, 14: 359-366.

CHENTOUFI AA AND POLYCHRONAKOS C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes*, 2002; 51: 1383-1390.

CHOWDHURY MM et NATARAJAN S. Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. *Br J Dermatol*, 1998; 139:500-503.

CLOUGH JD. Role of autoantibodies and immune complexes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Apher*, 1992;7:151-152.

COLLINS M, LING V, CARRENO BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol*, 2005, 6 (6): 223.

COLLISON LW, PILLAI MR, CHATURVEDI V, VIGNALI DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol*, 2009, 182 (10): 6121-6128.

CONSTANT S, SCHWEITZER N, WEST J, RANNEY P, BOTTOMLY K. - B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol*, 1995, 155 (8): 3734-3741.

CORREA PA, GOMEZ LM, CADENA J, ANAYA JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol*, 2005, 32: 219-224.

CUCCI A, BARBERO P, CLERICO M, FERRERO B, VERSINO E, CONTESSA G, *et al.* Pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA blood level in multiple sclerosis is related to treatment response and interferon-beta dose. *J Neuroimmunol*, 2010, 226(1-2):150-7.

CUDWORTH AG AND WOODROW JC. Letter: HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, 1974, 2: 1153.

-D-

DARNELL RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93, 4529-4536.

DAVIDOFF A M, IGLEHART, JD, AND MARKS JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89, 3439-3442.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A, ERAT A, CHEN JF, ENJOJI K, LINDEN J, OUKKA M, KUCHROO VK, STROM TB, ROBSON SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 2007, 204 (6): 1257-1265.

DEJACO C, DUFTNER C, GRUBECK-LOEBENSTEIN B, SCHIRMER M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*, 2006, 117 (3): 289-300.

DE LA ROSA M, RUTZ S, DORNINGER H, SCHEFFOLD A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 2004, 34 (9): 2480-2488.

DERBINSKI J., GABLER J, BRORS B, TIERLING S, JONNAKUTY S, HERGENHAHN M, PELTONEN L, WALTER J, et KYEWSKI B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med*, 2005,202:33-45.

DERBINSKI J, SCHULTE A, KYEWSKI B et KLEIN L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2001, 2:1032-1039.

DGPER, 2010, Enquête permanente agricole (EPA). Direction générale de la promotion de l'économie rurale (DGPER). Ouagadougou. Burkina Faso, pp. 1-83.

DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, BERGER T, SCHULER G. Ex vivo isolation and characterization of CD4 (+) CD25 (+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 2001, 193 (11): 1303-1310.

DINESH RK, SKAGGS BJ, LA CAVA A, HAHN BH, SINGH RP. CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun Rev*, 2010, 9 (8): 560-568.

DJABIRI F, CAILLAT-ZUCMAN S, GAJDOS P, JAIS JP, GOMEZ L, KHALIL I, CHARRON D, BACH JF, et GARCHON HJ. Association of the AChR alpha-subunit gene (CHRNA), DQA1*0101, and the DR3 haplotype in myasthenia gravis. Evidence for a three gene disease model in a subgroup of patients. *J Autoimmun*, 1997;10: 407-413.

DORAN MF, CROWSON CS, POND GR, MICHAEL O'FALLON W, GABRIEL SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls. A population-based study. *Arthritis and Rheum*, 2002a, 46:2287-93.

DORAN MF, CROWSON CS, POND GR, MICHAEL O'FALLON W, GABRIEL SE. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum*, 2002b, 46:2294-300.

DOREAU A, BELOT A, BASTID J, RICHE B, TRESCOL-BIEMONT MC, RANCHIN B, FABIEN N, COCHAT P, POUTEIL-NOBLE C, TROLLIET P, DURIEU I, TEBIB J, KASSAI B, ANSIEAU S, PUISIEUX A, ELIAOU JF, BONNEFOY-BERARD N. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*, 2009, 10:778–785.

DOYLE HA et MAMULA MJ. Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens. *Curr Opin Rheumatol*, 2002, 14:244-249.

E

EARLE KE, TANG Q, ZHOU X, LIU W, ZHU S, BONYHADI ML, BLUESTONE JA. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. - *Clin Immunol*, 2005, 115 (1): 3-9.

EL MIEDANY YM, AHMED I, MOUSTAFA H, EL BADDANI M. Hyperprolactinemia in Sjögren's syndrome: a patient subset or a disease manifestation? *Joint Bone Spine*, 2004, 71: 203-208.

ENDO Y, NEGISHI I, ISHIKAWA O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41: 490-495.

ENGVALLE E, PERLMANN P. Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, 1972, 109: 129-135.

ERIKSON J, RADIC MZ, CAMPER SA, HARDY RR, CARMACK C et WEIGERT, M. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature*, 1991, 349: 331-334.

EYMARD B et CHILLET P. [Autoimmune myasthenia: recent physiopathological data]. *Presse Med*, 1997, 26: 872-879.

F

FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, ORABONA C, VACCA C, BIANCHI R, BELLADONNA ML, FIORETTI MC, ALEGRE ML, PUCETTI P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4 (12): 1206-1212.

FILLATREAU S, GRAY D, ANDERTON SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (5): 391-397.

FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, GAVIN MA, et RUDENSKY AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol*, 2005; 6: 1142-1151.

FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003; 4 (4): 330-336.

FORSBLAD-D'ELIA H, CARLSTEN H, LABRIE F, KONTTINEN YT, OHLSSON C. Low serum levels of sex steroids are associated with disease characteristics in primary Sjögren's syndrome; supplementation with dehydroepiandrosterone restores the concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94: 2044-2051.

FRITZSCHING B, OBERLE N, EBERHARDT N, QUICK S, HAAS J, WILDEMAN B, KRAMMER PH, SURIPAYER E. In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol*, 2005, 175 (1): 32-36.

FUJINAMI RS, VON HERRATH MG, CHRISTEN U, WHITTON JL. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19: 80-94.

G

GARCHON HJ, DJABIRI F, VIARD JP, GAJDOS P et BACH JF. Involvement of human muscle acetylcholine receptor alpha subunit gene (CHRNA) in susceptibility to myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4668-4672.

GARDNEROVA M, EYMARD B, MOREL E, FALTIN M, ZAJAC J, SADOVSKY O, TRIPON P, DOMERGUE M, VERNET-DER GARABEDIAN B et BACH JF. The fetal/adult acetylcholine receptor antibody ratio in mothers with myasthenia gravis as a marker for transfer of the disease to the newborn. *Neurology*, 1997, 48: 50-54.

GEENEN V, WARZEE E, MOUTSCHEN M et LEGROS JJ. [Autoimmune thyroiditis]. *Rev Med Liege*, 2001, 56: 72-78.

GHIRINGHELLI F, LARMONIER N, SCHMITT E, PARCELLIER A, CATHELIN D, GARRIDO C, CHAUFFERT B, SOLARY E, BONNOTTE B, MARTIN F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 2004, 34 (2): 336-344.

GOLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA ET KUBY J, « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », in *Immunology*, 2003, 5^e édition, pages 148-150, W. H. Freeman, New York.

GOODNOW CC, SPRENT J, FAZEKAS DE ST GROTH B et VINUESA CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 2005, 435, 590-597.

GOTTER J, BRORS B, HERGENHAHN M, et KYEWSKI B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med*, 2004, 199: 155-166.

GRIEM P et GLEICHMANN E. Metal ion induced autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7, 831-838.

GUO ZX, CHEN ZP, ZHENG CL, JIA HR, GE J, GU DS, DU WT, WANG XY, ZHAO HF, YANG RC. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2009, 82 (6): 488-489.

H

HABASH-BSEISO DE, YALE SH, GLURICH I, GOLDBERG JW. Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res*, 2005, 3: 190-193.

HAGA HJ, RYGH T. The prevalence of hyperprolactinemia in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*, 1999, 26: 1291-1295.

HANLY JG, SU L, FAREWELL V, FRITZLER MJ. Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*, 2010a, 358: 75-80.

HANLY JG, THOMPSON K, MCCURDY G, FOUGERE L, THERIAULT C, et al. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods*, 2010b, 352: 147-152.

HASKINS K et WEGMANN D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes*, 1996, 45: 1299-1305.

HEATH VL, MOORE NC, PARNELL SM et MASON DW. Intrathymic expression of genes involved in organ specific autoimmune disease. *J Autoimmun*, 1998, 11: 309-318.

HERBER D, BROWN TP, LIANG S, YOUNG DA, COLLINS M, DUNUSSI-JOANNOPOULOS K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R. Fc reduces disease progression, *J Immunol*, 2007, 178:3822–3830.

HERBRINK P, VAN BUSSEL FJ, WARNAAR SO. The antigen spot test (AST): A highly sensitive assay for the detection of antibodies. *Journal of immunoll methods*. 1982, vol. 48, (3): 293-298.

HIROTA K, DUARTE JH, VELDHOFEN M, HORNSBY E, LI Y, CUA DJ, AHLFORS H, WILHELM C, TOLAINI M, MENZEL U, GAREFALAKI A, POTOCHNIK AJ, STOCKINGER B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*, 2011, 12:255–263.

HOLLINGSWORTH DR et MABRY CC. Congenital graves disease. Four familial cases with long-term follow-up and perspective. *Am J Dis Child*, 1976, 130: 148-155.

HOMBURGER HA. Cascade testingfor autoantibodies in connectivite tissue disease. *Mayo Clin.Proc.*, 1995, 70,183-184.

HSU HC, YANG P, WANG J, WU Q, MYERS R, CHEN J, YI J, GUENTERT T, TOUSSON A, STANUS AL, LE TV, LORENZ RG, XU H, KOLLS JK, CARTER RH, CHAPLIN DD, WILLIAMS RW, MOUNTZ JD. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol*, 2008, 9:166–175.

HUANG CT, WORKMAN CJ, FLIES D, PAN X, MARSON AL, ZHOU G, HIPKISS EL, RAVI S, KOWALSKI J, LEVITSKY HI, POWELL JD, PARDOLL DM, DRAKE CG, VIGNALI DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 2004, 21 (4): 503-513.

HUBER S, SCHRAMM C, LEHR HA, MANN A, SCHMITT S, BECKER C, PROTSCHKA M, GALLE PR, NEURATH MF, BLESSING M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol*, 2004, 173 (11): 6526-6531.

I

IELLEM A, MARIANI M, LANG R, RECALDE H, PANINA-BORDIGNON P, SINIGAGLIA F, D'AMBROSIO D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 2001, 194 (6): 847-853.

INSD, 2006, Recensement général de la population et de l'habitation (RGPH). Institut national de la statistique et de la démographie (INSD). Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 1-51.

INSD, 2010a. Annuaire statistique 2010. Institut national de la statistique et de la démographie. Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 1-47.

INSD, 2010b, Enquête intégrale sur les conditions de vie des ménages (EICVM), Institut national de la statistique et de la démographie (INSD). Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 1-189.

ITO T, HANABUCHI S, WANG YH, PARK WR, ARIMA K, BOVER L, QIN FX, GILLIET M, LIU YJ. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*, 2008, 28(6): 870-880.

IWAKURA Y, NAKAE S, SAIJO S, ISHIGAME H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.*, 2008, 226: 57-79.

J

JOLICOEUR C, HANAHAHAN D et SMITH KM. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6707-6711.

JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH. - Identification and functional characterization of human CD4 (+) CD25 (+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. - *J Exp Med*, 2001, 193 (11): 1285-1294.

JULIER C, LUCASSEN A, VILLEDIEU P, DELEPINE M, LEVY-MARCHAL C, DANZE PM., BIANCHI F, BOITARD C, FROGUEL P, BELL J et al. Multiple DNA variant association analysis: application to the insulin gene region in type I diabetes. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 1247-1254.

-K-

KALLAUR AP, OLIVEIRA SR, COLADOSIMAO AN, DELICATO DE ALMEIDA ER, KAMINAMI MORIMOTO H, LOPES J. Cytokine profile in relapsingremitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3):1010-20.

KENNEDY GC, GERMAN MS et RUTTER WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet*, 1995, 9: 293-298

KING C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (11): 757-766.

KOENEN HJ, SMEETS RL, VINK PM, VAN RIJSSEN E, BOOTS AM, JOOSTEN I. Human CD25^{high} Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*, 2008, 112 (6):2340-2352.

KONYA C, GORONZY JJ, WEYAND CM. - Treating autoimmune disease by targeting CD8 (+) T suppressor cells. - *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9 (8): 951-965.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROOV K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27: 485-517.

KOTZIN BL. Susceptibility loci for lupus: a guiding light from murine models? *J Clin Invest*, 1997, 99: 557-558.

KU G, KRONENBERG M, PEACOCK DJ, TEMPST P, BANQUERIGO ML, BRAUN B. S, REEVE JR, et BRAHN E. Prevention of experimental autoimmune arthritis with a peptide fragment of type II collagen. *Eur J Immunol*, 1993, 23: 591-599.

KUMAR Y, BHATIA A, MINZ RW .Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol*, 2009, 4: 1.

KUMBLE S, CHOI L, LOPEZ-MUEDANO C, KUMBLE KD. Microarray ELISA for autoantibody screening in connective tissue diseases. *J Clin Diagn Res*, 2010, 6: 145-149.

KWOK SK, CHO ML, PARK MK, OH HJ, PARK JS, HER YM, LEE SY, YOUN J, JU JH, PARK KS, KIM SI, KIM HY, PARK SH. Interleukin-21 promotes Osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis in humans and mice, *Arthritis Rheum*, 2012, 64:740–751.

-L-

LARGER E, BECOURT C, BACH JF et BOITARD C. Pancreatic islet beta cells drive T cell-immune responses in the non obese diabetic mouse model. *J Exp Med*, 1995, 181: 1635-1642.

LEHMANN PV, SERCARZ EE, FORSTHUBER T, DAYAN CM AND GAMMON G. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol Today*, 1993, 14: 203-208.

LENG RX, PAN HF, CHEN GM, FENG CC, FAN YG, YE DQ, LI XP. The dual nature of Ets-1: focus to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 2011, 10:439–443.

LEWKOWICZ P, LEWKOWICZ N, SASIAK A, TCHORZEWSKI H. Lipopolysaccharide-activated CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibits neutrophil function and promotes their apoptosis and death. *J Immunol*, 2006, 177 (10): 7155-7163.

LIBLAU R, TOURNIER-LASSERVE E, AND HAUW JJ. *Encéphalomyélite allergique expérimentale* (Charpin, J., Vervloet, D.eds). Flammarion Méd-Sci, Ser Allergologie, 1992, Paris.

LIEW FY. T (H) 1 and T (H) 2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (1): 55-60.

LIM HW, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*, 2005, 175 (7): 4180-4183.

LIM HW, HILLSAMER P, KIM CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest*, 2004, 114 (11): 1640-1649.

LING Y, CAO X, YU Z, RUAN C. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol*, 2007, 79 (4): 310-316.

LIU B, ZHAO H, POON MC, HAN Z, GU D, XU M, JIA H, YANG R, HAN ZC. Abnormality of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2007a, 78 (2): 139-143.

LIU YJ, SOUMELIS V, WATANABE N, ITO T, WANG YH, MALEFYT RDE W, OMORI M, ZHOU B, ZIEGLER SF. - TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. - *Annu Rev Immunol*, 2007b, 25: 193-219.

LIU W, PUTNAM AL, XU-YU Z, SZOT GL, LEE MR, ZHU S, GOTTLIEB PA, KAPRANOV P, GINGERAS TR,FAZEKAS DE ST GROTH B, CLAYBERGER C, SOPER DM, ZIEGLER SF, BLUESTONE JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006, 203 (7): 1701-1711.

LIU Z, GIUDICE GJ, SWARTZ SJ, FAIRLEY JA, TILL GO, TROY JL et DIAZ LA. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest*, 1995; 95, 1539-1544.

LOVETT-RACKE AE, YANG Y, RACKE MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim BiophysActa*, 2011, 1812(2):246-51.

LUCASSEN AM, SCREATON GR, JULIER C, ELLIOTT TJ, LATHROP M et BELL JL. Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated insulin locus haplotype. *Hum Mol Genet*, 1995; 4, 501- 506.

LUND FE, RANDALL TD. - Effector and regulatory B cells: modulators of CD4 (+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10 (4): 236-247.

-M-

MA D, ZHU X, ZHAO P, ZHAO C, LI X, ZHU Y, LI L, SUN J, PENG J, JI C, HOU M. Profile of Th17cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 2008, 87 (11): 899-904.

MALEK TR., YU A, VINCEK V, SCIBELLI P, AND L. KONG L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rdeficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 2002, 17: 167–178.

MAMULA MJ. Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes. *Immunol Rev*, 1998, 164: 231-239.

MANZ RA, ARCE S, CASSESE G, HAUSER AE, HIEPE F, RADBRUCH A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14 (4): 517-521.

MANZOTTI CN, TIPPING H, PERRY LC, MEAD KI, BLAIR PJ, ZHENG Y, SANSOM DM. - Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2002, 32 (10): 2888-2896.

MARSON A, KRETSCHMER K, FRAMPTON GM, JACOBSEN ES, POLANSKY JK, MACISAAC KD, LEVINE SS, FRAENKEL E, VON BOEHMER H, YOUNG RA. - Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 2007, 445 (7130): 931-935.

MARTIN SJ, O'BRIEN GA, NISHIOKA WK, MCGAHON AJ, MAHBOUBI A, SAIDO TC et GREEN DR. Proteolysis of fodrin (non-erythroidspectrin) during apoptosis. *J Biol Chem*, 1995, 270: 6425-6428.

MARZANO AV, GRAMMATICA A, COZZANI E, TERRACINA M et BERTI E. Paraneoplastic pemphigus. A report of two cases associated with chronic B-cell lymphocytic leukaemia. *Br J Dermatol*, 2001, 145: 127-131.

MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, 296: 301-305.

MAZO IB, HONCZARENKO M, LEUNG H, CAVANAGH LL, BONASIO R, WENINGER W, ENGELKE K, XIA L, MCEVER RP, KONI PA, SILBERSTEIN LE, VON ANDRIAN UH. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity*, 2005, 22 (2): 259-270.

MCGARGILL MA, DERBINSKI JM, et HOGQUIST KA. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol*. 2000, 1:336-341.

MCINNES IB, SCHETT G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7 (6): 429-442.

MEVORACH D, ZHOU JL, SONG X AND ELKON KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med*, 1997, 188: 387-392.

MEYER AL, BENSON J, SONG F, JAVED N, GIENAPP IE, GOVERMAN J ET AL. Rapid depletion of peripheral antigen-specific T cells in TCR-transgenic mice after oral administration of myelin basic protein. *J Immunol*, 2001, 166(9):5773-81.

MISRA N, BAYRY J, LACROIX-DESMAZES S, KAZATCHKINE MD, KAVERI SV. Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, 2004, 172 (8): 4676-4680.

MIYARA M, SAKAGUCHI S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, 2007, 13 (3): 108-116.

MIYARA M, YOSHIOKA Y, KITO A, SHIMA T, WING K, NIWA A, PARIZOT C, TAFLIN C, HEIKE T, VALEYRE D, MATHIAN A, NAKAHATA T, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M, AMOURA Z, GOROCHOVG, SAKAGUCHI S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, 30 (6): 899-911.

MOCCI S, LAFFERTY K et HOWARD M. The role of autoantigens in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12: 725-730.

MOREL L, BLENMAN KR, CROKER BP et WAKELAND EK. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1787-1792.

MOREL L, CROKER BP, BLENMAN KR, MOHAN C, HUANG G, GILKESON, G et WAKELAND, EK. Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:6670-6675.

MORGAN ME, VAN BILSEN JH, BAKKER AM, HEEMSKERK B, SCHILHAM MW, HARTGERS FC, ELFERINK BG, VAN DER ZANDEN L, DE VRIES RR, HUIZINGA TW, OTTENHOFF TH, TOES RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. - *Hum Immunol*, 2005, 66 (1): 13-20.

MOUDGIL KD et SERCARZ EE. Understanding cryptic city is the key to revealing the pathogenesis of autoimmunity. *Trends Immunol*, 2005, 26:355-359.

MOUQUET H, GILBERT D, MUSETTE P, TRON F, et JOLY P. [Molecular advances in pathogenesis of autoimmune blistering skin diseases]. *Ann Dermatol Venereol*, 2005,132: 231-242.

MUKHTAR ED, SMITH BR, PYLE GA, HALL R et VICE P. Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine, and antithyroid drugs. *Lancet*. 1975, 1:713-715.

MURPHY CA, LANGRISH CL, CHEN Y, BLUMENSCHEN W, MCCLANAHAN T, KASTELEIN RA, SEDGWICK JD, CUA DJ. Divergent and proanti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*, 2003, 198: 1951-1957.

-N-

NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 2001, 194 (5): 629-644.

NAGAMINE K, PETERSON P, SCOTT HS, KUDOH J, MINOSHIMA S, HEINO M, KROHN KJ, LALIOTI MD, MULLIS PE, ANTONARAKIS SE. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet*.1997, 17:393-398.

NEMAZEE D et HOGQUIST KA. Antigen receptor selection by editing or down regulation of V (D) J recombination. *Curr Opin Immunol*. 2003, 15: 182-189.

NOMURA T, ONO M, AMOURA Z, GOROCHOV G, SAKAGUCHI S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, 30 (6): 899-911.

NOMURA T, SAKAGUCHI S. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol*, 2007, 8 (4): 333-334.

-O-

OKADA H, KUHN C, FEILLET H, BACH JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, 2010, 160: 1-9.

OKSENBERG JR, PANZARA MA, BEGOVICH AB, MITCHELL D, ERLICH HA, MURRAY RS, SHIMONKEVITZ R, SHERRITT M, ROTHBARD J, BERNARD CC et al. Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature*, 1993, 362: 68-70.

O'SHEA JJ, PAUL WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 2010, 327 (5969): 1098-1102.

OLSSON B, RIDELL B, CARLSSON L, JACOBSSON S, WADENVIK H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. - *Blood*, 2008, 112 (4): 1078-1084.

-P-

PANDIYAN P, ZHENG L, ISHIHARA S, REED J, LENARDO MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2007, 8 (12):1353-1362.

PAUST S, LU L, MCCARTY N, CANTOR H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (28): 10398-10403.

PECK A, MELLINS ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*, 2010, 129 (2): 147-153.

PETERSON P et PELTONE L. Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun*, 2005, 25 Suppl, 49-55.

PICCA CC, LARKIN J, BOESTEANU A, LERMAN MA, RANKIN AL, CATON AJ. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev*, 2006, 212: 74-85.

PICCIRILLO CA, SHEVACH EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+immunoregulatory cells. *J Immunol*, 2001, 167 (3): 1137-1140.

PILLAI V, ORTEGA SB, WANG CK, KARANDIKAR NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol*, 2007, 123 (1): 18-29.

PISITKUN P, DEANE JA, DIFILIPPANTONIO MJ, TARASENKO T, SATTERTHWAITE AB et BOLLAND S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 2006, 312, 1669-1672.

PRISCO A, TRONCONE R, MAZZARELLA G, GIANFRANI C, AURICCHIO S, EVEN J, TIBERIO C, GUARDIOLA J, et DE BERARDINIS P. Identical T-cell receptor beta chain rearrangements are present in Tcells infiltrating the jejunal mucosa of untreated celiac patients. *Hum Immunol*, 1997, 55: 22-33.

-R

RACKE MK, CANNELLA B, ALBERT P, SPORN M, RAINE CS, MCFARLIN DE. Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol*, 1992; 4(5):615-20.

RADIC MZ et WEIGERT M. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 487-520.

RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, POOS L, ANDRES E, HENTGES F, ZIMMER J. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2007, 81 (1): 144-153.

RIEGER A, BAR-OR A. B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (6): 486-487.

RISCH N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet*, 1987, 40:1-14.

ROGERS SW, TWYMAN RE, et GAHRING LC. The role of autoimmunity to glutamate receptors in neurological disease. *MolMed Today*, 1996, 2: 76-81.

ROMAGNANI S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36(11):1357-66.

ROMAGNANI C, DELLA CHIESA M, KOHLER S, MOEWES B, RADBRUCH A, MORETTA L, MORETTA A, THIEL A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol*, 2005, 35 (8): 2452-2458.

ROSE NR, et BONA C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*, 1983, 14: 426-430.

-S-

SAKAGUCHI S, MIYARA M, COSTANTINO CM, HAFLER DA. - FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. - *Nat Rev Immunol*, 2010, 10 (7): 490-500.

SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M. - Regulatory T cells and immune tolerance. - *Cell*, 2008, 133 (5): 775-787.

SAKAGUCHI S, WING K, MIYARA M. - Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*, 2007, 37 Suppl 1: 116-123.

SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005, 6 (4): 345-352.

SAKAGUCHI S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immuneresponses. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 531-562.

SAKAKURA M, WADA H, TAWARA I, NOBORI T, SUGIYAMA T, SAGAWA N, SHIKU H. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*, 2007, 120(2): 187-193.

SAKURABA A, SATO T, KAMADA N, KITAZUME M, SUGITA A, HIBI T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2009, 137: 1736-1745.

SAWALHA AH, KAUFMAN KM, KELLY JA, ADLER AJ, ABERLE T, KILPATRICK J, WAKELAND EK, LI QZ, WANDSTRAT AE, KARP DR, JAMES JA, MERRILL JT, LIPSKY P, HARLEY JB. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67:458–461.

SCHEFFOLD A, HUHN J, HOFER T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL) two to tango. *Eur J Immunol*, 2005, 35 (5): 1336-1341.

SHELLEKENS GA, DE JONG BA, VAN DEN HOOGEN FH, VAN DE PUTTE LB et VAN IJ, VENROO WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*, 1998, 101: 273-281.

SEBZDA E, MARIATHASAN S, OHTEKI T, JONES R, BACHMANN MF et OHASHI PS. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 829-874.

SEDDIKI N, SANTNER-NANAN B, MARTINSON J, ZAUNDERS J, SASSON S, LANDAY A, SOLOMON M, SELBY W, ALEXANDER SI, NANAN R, KELLEHER A, FAZEKAS DE ST GROTH B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 2006, 203 (7): 1693-1700.

SELMİ C, LU Q, HUMBLE MC. Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. *J Autoimmun*, 2012, 39: 249-252.

SETOGUCHI R, HORI S, TAKAHASHI T, SAKAGUCHI S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 2005, 201 (5): 723-735.

SHARFE N, DADI HK, SHAHAR M, ROIFMAN CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (7): 3168-3171.

SHEVACH EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 2009, 30(5): 636-645.

SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. Stimulation of CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 2002, 3 (2): 135-140.

SHIMIZU A, ISHIKO A, OTA T, SAITO H, OKA H, TSUNODA K, AMAGAI M et NISHIKAWA T. In vivo ultra structural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosomemid-line. *J Invest Dermatol*, 2005, 124: 984-989.

SHLOMCHIK M, MASCELLI M, SHAN H, RADIC MZ, PISETSKY D, MARSHAK-ROTHSTEIN A et WEIGERT M. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med*, 1990, 171: 265-292.

SHLOMCHIK MJ, AUCCOIN AH, PISETSKY DS et WEIGERT M G. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *ProcNatlAcadSci USA*, 1987, 84: 9150-9154.

SINGAL DP et BLAJCHMAN MA. Histocompatibility (HLA) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*, 1973, 22: 429-432.

SMITTEN AL, CHOI HK, HOCHBERG MC. The risk of hospitalized infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2008; 35:387-93.

SONG GUO Z, JUHUA W, PU W,J. DIXON G, AND HORWITZ D.A. IL-2 Is Essential for TGF- β to Convert Naive CD4 CD25Cells to CD25Foxp3Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells. *J Immunol*, 2007; 178:2018-2027.

SOSPEDRA M, FERRER-FRANCESCH X, DOMINGUEZ O, JUAN M, FOZ-SALA M, et PUJOL-BORRELL R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol*, 1998, 161: 5918-5929.

STASI R, COOPER N, DEL POETA G, STIPA E, LAURA EVANGELISTA M, ABRUZZESE E, AMADORI S. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*, 2008, 112 (4): 1147-1150.

SOURABIÉ Y, BAZIÉ WW, SANGARÉ I, SIRIMA C, OUÉDRAOGO MS, FUMOUX F et TRAORÉ Y. Autoimmune Diseases in Limited Setting Country (Burkina Faso): Epidemiology, Technical and Diagnostic Performance of Specific Biomarkers for the Early Diagnosis. *Autoimmunes and Infectious Diseases*, 2016, 2(2): doi [http:// dx.doi.org/10.16966/2470-1025.112](http://dx.doi.org/10.16966/2470-1025.112)

STEINMAN L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 2007, 13 (2): 139-145.

STOCKINGER B, VELDHOFEN M. Differentiation and function of TH17 cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, 19: 281-286.

STRASSBURG CP. Autoimmune Liver Diseases: AIH, PBC and PSC. In: hepatology a clinical text book: Mauss S, Berg T, Rockstroh y, Sarrazin C, Wedemeyer H.Hepatology. *A Clinical Textbook*; 2015: 548-584.

-T

TAKEDA, Y., CAUDELL, P., GRADY, G., WANG, G., SUWA, A., SHARP, G. C., DYNAN, W. S, et HARDIN, J. A. Human RNA helicase A is a lupus autoantigen that is cleaved during apoptosis. *J Immunol*, 1999, 163: 6269-6274.

TCHILIAN EZ, BEVERLEY PC. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol*, 2006, 27 (3):146-153.

THAUNAT O, MORELON E, DEFRANCE T. Am^Bvalent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood*, 2010, 116 (4): 515-521.

THEBAULT-BAUMONT K, DUBOIS-LAFORGUE D, KRIEF P, BRIAND J. P, HALBOUT P, VALLON-GEOFFROY K, MORIN J, LALOUX V, LEHUEN A, CAREL JC *et al*. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest*, 2003, 111: 851-857.

THE FINNISH-GERMAN APECED CONSORTIUM. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *Nat Genet*, 1997, 17: 399-403.

THOMSON G, ROBINSON WP, KUHNER MK, JOE S, MACDONALD MJ, GOTTSCHALL JL, BARBOSA J, RICH SS, BERTRAMS J, BAUR MP. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet*, 1988, 43: 799-816.

THORNTON AM, SHEVACH EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1998, 188 (2): 287-296.

THORNTON AM, SHEVACH EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 2000, 164 (1): 183-190.

TILKIN AF, LUBIN R, SOUSSI T, LAZAR V, JANIN N, MATHIEU MC, LEFRERE I, CARLU C, ROY M, KAYIBANDA M *et al*. Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. *Eur J Immunol*.1995, 25:1765-1769.

TISCH R, *et* MCDEVITT H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 1996, 85: 291-297.

TOH ML, KAWASHIMA M, HOT A, MIOSSEC P. - Role of IL-17 in the Th1 systemic defects in rheumatoid arthritis through selective IL-12Rbeta2 inhibition. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69 (8): 1562-1567.

TRZONKOWSKI P, SZMIT E, MYSLIWSKA J, DOBYSZUK A, MYSLIWSKI A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.*, 2004, 112 (3): 258-267.

TU W, LAU YL, ZHENG J, LIU Y, CHAN PL, MAO H, DIONIS K, SCHNEIDER P, LEWIS DB. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40 activated B cells. *Blood*, 2008, 112 (6): 2554-2562

TURLEY SJ. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 765-770.

TOWBIN H, STAEBELIN T et GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro- cellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76: 4350-4354.

-U-

UTZ PJ, HOTTELET M, SCHUR PH, et ANDERSON P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, 1997, 185: 843-854.

UTZ PJ, HOTTELET M, VAN VENROOIJ WJ et ANDERSON P. Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. *J Exp Med*, 187: 547-560.

-V-

VAKNIN-DEMBINSKY A, BALASHOV K, WEINER HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol*, 2006; 176(12):7768-74.

VALMORI D, MERLO A, SOULEIMANIAN NE, HESDORFFER CS, AYYOUB M. - A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest*, 2005, 115 (7): 1953-1962.

VANDERLUGT CL et MILLER SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2002, 2: 85-95.

VAN DER VLIET HJ, NIEUWENHUIS EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*, 2007, 2007: 89017.

VELASQUEZ-LOPERA MM, CORREA LA, GARCIA LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154 (1): 107-114.

VESTERGAARD P. Smoking and thyroid disorders a meta analysis. *Eur J Endocrinol*, 2002 146: 153-161.

VIGLIETTA V, BAECHER-ALLAN C, WEINER HL, HAFLER DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 2004, 199 (7): 971-979.

-W

WAISBERG M, TARASENKO T, VICKERS BK, SCOTT BL, WILLCOCKS LC, et al. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *PNAS*, 2010, 108: 1122-1127.

WATERHOUSE N, KUMAR S, SONG Q, STRIKE P, SPARROW L, DREYFUSS G, ALNEMRI ES, LITWACK G, LAVIN M et WATTERS D. Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J Biol Chem*, 1996, 271:29335-29341.

WEBB R, MERRILL JT, KELLY JA, SESTAK A, KAUFMAN KM, LANGEFELD CD, ZIEGLER J, KIMBERLY RP, EDBERG JC, RAMSEY-GOLDMAN R, PETRI M, REVEILLE JD, ALARCON GS, VILA LM, ALARCON-RIQUELME ME, JAMES JA, GILKESON GS, JACOB CO, MOSER KL, GAFFNEY PM, VYSE TJ, NATH SK, LIPSKY P, HARLEY JB, SAWALHA AH. A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009, 60:2402-2407.

WEI G, WEI L, ZHU J, ZANG C, HU-LI J, YAO Z, CUI K, KANNO Y, ROH TY, WATFORD WT, SCHONES DE, PENG W, SUN HW, PAUL WE, O'SHEA JJ, ZHAO K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4 T cells. *Immunity*, 2009, 30:155-167.

WING K, EKMARK A, KARLSSON H, RUDIN A, SURI-PAYER E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology*, 2002, 106 (2): 190-199.

WINTER SF, MINNA JD, JOHNSON BE, TAKAHASHI T, GAZDAR AF et CARBONE DP. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res*, 1992, 52: 4168-4174.

WU Y, BORDE M, HEISSMEYER V, FEUERER M, LAPAN AD, STROUD JC, BATES DL, GUO L, HAN A, ZIEGLER SF, MATHIS D, BENOIST C, CHEN L, RAO A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 2006, 126 (2): 375-387.

-X Y Z-

YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, KITAWAKI T, HORI S, MAEDA M, ONODERA M, UCHIYAMA T, FUJII S, SAKAGUCHI S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 2004, 16 (11): 1643-1656.

YAMANAKA H, WILLIS EH, PENNING CA, PEEBLES CL, TAN EM et CARSON DA. Human autoantibodies to poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase. *J Clin Invest*, 1987, 80: 900-904

YANABA K, BOUAZIZ JD, HAAS KM, POE JC, FUJIMOTO M, TEDDER TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 2008, 28 (5): 639-650.

YANG J, CHU Y, YANG X, GAO D, ZHU L, WAN L, LI M. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009, 60:1472-1483.

YANG X et ZHENG SG. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2014 Jun; 13(6):615-20.

YI H, ZHEN Y, JIANG L, ZHENG J, ZHAO Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3 (3): 189-195.

YU J, HECK S, PATEL V, LEVAN J, YU Y, BUSSEL JB, YAZDANBAKHS K. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2008, 112 (4): 1325-1328.

ZHANG J, MA D, ZHU X, QU X, JI C, HOU M. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2009, 94 (9): 1326-1329.

ZHENG J, LIU Y, QIN G, CHAN PL, MAO H, LAM KT, LEWIS DB, LAU YL, TU W. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40 activated B cells. *J Immunol*, 2009, 183 (6): 3742-3750.

ZHENG Y, JOSEFOWICZ SZ, KAS A, CHU TT, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*, 2007, 445 (7130): 936-940.

ZHU J, PAUL WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*, 2010, 20 (1): 4-12.

ZHU X, MA D, ZHANG J, PENG J, QU X, JI C, HOU M. Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol*. 2010, 30 (2): 253-259.

ZINKERNAGEL RM et HENGARTNER H. Regulation of the immune response by antigen. *Science*, 2001, 293:251-253.

ZINKERNAGEL RM, EHL S, AICHELE P, OEHEN S, KUNDIG T et HENGARTNER H. Antigen localisation regulates immuneresponses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev*, 1997, 156:199-209.

ZOU L, BARNETT B, SAFAH H, LARUSSA VF, EVDEMON-HOGAN M, MOTTRAM P, WEI S, DAVID O, CURIEL TJ, ZOU W. Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res*, 2004, 64 (22): 8451-8455.

ZOU W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6 (4):295-307.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PUBLICATIONS

SELECTION D'ARTICLES

Sourabié Y. Bazié WW, Sangaré I, Sirima C, Ouédraogo MS, Fumoux F and Traoré Y. Autoimmune Diseases in Limited Setting Country (Burkina Faso): Epidemiology, Technical and Diagnostic Performance of Specific Biomarkers for the Early Diagnosis. *Autoimmun Infec Dis*, oct 2016, 2(2): doi [http:// dx.doi.org/10.16966/2470-1025.112](http://dx.doi.org/10.16966/2470-1025.112).

Sourabié Y. Sawadogo S, Sanou G, Bazié WW, Ouédraogo MS, Fumoux F, Traoré Y. Study of cytokines environment during autoimmune diseases in patients from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *Science et technique, Sciences Santé*, janvier –Juin 2017, Vol. 40, n° 1 p19-33.

COMMUNICATIONS

Sourabié Y. Bazié W W, Ouédraogo SM, Fumoux F, Traore Y. Apport des autoanticorps dans le diagnostic des maladies autoimmunes dans les environnements à ressources limités : exemple du Burkina Faso. *In : Deuxièmes Journées de Biologie Clinique du Burkina Faso*, 21-23 juillet 2014, Ouagadougou.

Sourabié Y. Bazié W W, Ouédraogo SM, Fumoux F, Traore Y. Prévalence et facteurs associés aux maladies autoimmunes dans les environnements à ressources limités : exemple du Burkina Faso. *In : Deuxièmes Journées de Biologie Clinique du Burkina Faso*, 21-23 juillet 2014, Ouagadougou.

Autoimmune and Infectious Diseases: Open Access

Research Article

Volume: 2.2

Open Access

Autoimmune Diseases in Limited Setting Country (Burkina Faso): Epidemiology, Technical and Diagnostic Performance of Specific Biomarkers for the Early Diagnosis

Sourabié Y^{1,2*}, Bazié WW¹, Sangaré I^{1,2}, Sirima C¹, Ouédraogo MS^{1,2}, Fumoux F⁴ and Traoré Y³

¹University Hospital Souro Sanou, 01 BP 676, Bobo, Burkina Faso

²Higher Institute of Health Sciences, Polytechnic University of Bobo Dioulasso, Burkina Faso

³Training and Research Unit of the Health Sciences, University of Ouagadougou, Burkina Faso

⁴Faculté luminy of Sciences, Aix Marseille University, France

*Corresponding author: Yacouba Sourabié, Teacher-Researcher in immunology at Higher Institute of Health Sciences, Polytechnic University of Bobo Dioulasso, Hospitalo - University Centre Souro Sanou, Department of Immunology and Hematology, BP 676, Tel: 0022670710325; E-mail: yacourabie@yahoo.fr

Received date: 29 Oct 2015; Accepted date: 26 Mar 2016; Published date: 29 Mar 2016.

Citation: Sourabié Y, Bazié WW, I Sangaré, Sirima C, Ouédraogo MS, et al. (2016) Autoimmune Diseases in Limited Setting Country (Burkina Faso): Epidemiology, Technical and Diagnostic Performance of Specific Biomarkers for the Early Diagnosis. *Autoimmun Infect Dis* 2(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/2470-1025.112>

Copyright: © 2016 Sourabié Y, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Background: Autoimmune diseases have been rarely reported in limited setting country. We aimed to investigate the burden, immunological and clinical diagnosis of autoimmune diseases in Burkina Faso.

Methods: We prospectively enrolled patients with a suspected autoimmune disease at University Hospital SOURO SANOU, in Bobo Dioulasso, BURKINA FASO, between 2012 and 2014 for this cohort study. Demographic characteristics, clinical manifestations, sera autoantibodies determination and plasma viral and bacteria status (HBV, HCV, HIV, and Dengue serotype 1, 2, 3 and 4, *Mycobacterium tuberculosis* and Lyme disease) were determined. All plasma samples were stored at -80°C when analyzed was not making immediately.

Results: During the three year study period, totally 65 patients with suspicion of autoimmune diseases were diagnosed. The referral diagnosis was right in 17/65 patients (26.2%) among patients in the limited setting country (Burkina Faso). The incidence of autoimmune diseases was 17/73950 (0.023%). There were 4/73950 (0.005%) patients with systemic lupus erythematosus (SLE), 5/73950 (0.007%) with rheumatoid arthritis (RA), 2/73950 (0.003%) with CREST and Polymyositis, 2/73950 (0.003%) with CREST, 1/73950 (0.001%) with Gougerot Sjögren's syndrome (SSG), 2/73950 (0.003%) with Thyroiditis of Hashimoto and, 1/73950 (0.001%) with sarcoidosis. The median age at the diagnosis of autoimmune diseases were respectively 51 years (28 -75 years) and male to female ratio of 0.06 (1/16). The plasma viral status (HBV, HCV, CMV and HIV, Lyme disease, Dengue serotype 1, 2, 3 and 4) was negative. *Mycobacterium tuberculosis*'s cases were 3.07%. The immune suppressor's treatment against autoimmune diseases were not efficient among 2/17 of patients.

Conclusion: The referral diagnosis was right in 17/65 (26.2%). The incidence was 17/73950 (0.023%) in the limited setting country (Burkina Faso). There was not a significant associated relation between autoimmune diseases and infection; there was not also significant association between autoimmune diseases and hygienic hypothesis.

Keywords: Autoimmune; Disease; Autoantibody

Abbreviations: ANA: Anti-nuclear Antibodies; CENP-B: Centromere protein B; dsDNA: Double-stranded DNA; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IFI: Indirect Immunofluorescence Assay; Jo-1: Histidyl-t-RNA synthetase; AID: Autoimmune Disease; RNP70 A,C: Small nuclear ribonucleoprotein complexes; 70 kDa, A, C polypeptides Scl-70: DNA topoisomerase I; SLE: Systemic lupus erythematosus; SmD: Smith's antigen (a family of RNA-binding proteins); SSA/Ro: Sjögren's Syndrome A antigen/small ribonucleoprotein particle (Ro 52 and 60 kDa); SSB/La: Sjögren's Syndrome B antigen/Lupus antigen, La ribonucleoprotein domain family, member 3; U1RNP: U1 nuclear ribonucleoprotein (mixture of recombinant RNP70, A, C); RA: Rheumatoid Arthritis; HT: Hashimoto Thyroiditis

Introduction

Autoimmune diseases represent a heterogeneous family of chronic, disabling diseases with different natural histories and a wide spectrum of clinical symptoms. These disorders share underlying defects in the immune response leading the body to attack its own organs and tissues. Most of these diseases disproportionately affect women; however, persons of all racial, ethnic, and socioeconomic groups are affected [1,2]. Certain diseases, including systemic lupus erythematosus and scleroderma, are more common in African Americans, whereas others, such as type 1 diabetes and multiple sclerosis, are more common in Caucasians. All ages

are affected, with onset from childhood to late adulthood. While many individual autoimmune diseases are rare, collectively they are thought to affect approximately 5 to 8 percent of the United States population - 14 to 22 million persons [3-8]. Because of their chronicity, measured in decades, and their debilitating complications, autoimmune diseases exact high medical and socioeconomic costs. In addition, since autoimmune diseases affect women in their most productive years, their impact on families and society can be substantial. Although comprehensive national data on the incidence, prevalence, and medical and economic impact of autoimmune diseases do not exist in the aggregate, or for the majority of individual autoimmune diseases, the statistics that are available make clear

that the impact of these diseases is significant. Some of the available data for specific diseases are highlighted below. The purpose of our study is to establish immunology and clinical strategies for enhancing autoimmune diseases diagnosis in the limited setting country (BURKINA FASO) where incidence, prevalence, morbidity, and mortality of autoimmune diseases remains undiscovered.

Materials and Methods

Ethical Statement

Samples analyzed in our study derived from patients who went to hospital for consultation. Patients with autoimmune diseases enrolled in our study received effective immunosuppressors treatment alone or in association with another drug. The study was approved by our National Ethical Committee for health research in Burkina Faso Ouagadougou. Patients participating in this study gave written informed consent.

Patients and method

We prospectively enrolled patients who had a medical and immunology diagnosis of autoimmune diseases at University Hospital SOROU SANOU and another private clinical, in Bobo Dioulasso, BURKINA FASO, between January 2012 and November 2014 for this cohort study. Demographic characteristics, clinical manifestations, sera auto antibodies profile and plasma viral and bacterial statuses (HIV/HSV/HBC/CMV/ Dengue serotype 1, 2, 3 and 4 /Mycobacterium tuberculosis/Lyme disease) were determined.

In our study, autoimmune diseases diagnosis was a combination of autoantibody blood tests-rays, clinical presentation and blood tests that measure nutritional function and inflammation. In addition, a criterion of diagnosis was used to confirm each case of autoimmune disease without IIF method; the sera autoantibody profile of the patient represents an important prerequisite for the clinical diagnosis. Indeed, positive results for ANA and the presence of anti-double-stranded native DNA (anti-dsDNA) or anti-Sm antibodies constitute 2 of the 11 criteria for the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) [2,9-11]; positivity for ANA in high titer or the presence of anti-Ro/SSA or anti-La/SSB antibodies were diagnostic criteria for Sjögren's syndrome [10]; the presence of anti-Jo-1 antibodies was a criterion for the diagnosis of dermatomyositis [12,13]; the presence of anticentromere or anti-topoisomerase I (anti-Scl70) antibodies was the criterion for classifying subtypes of cutaneous systemic sclerosis as limited or diffuse [9].

Laboratory assay

The multiplex immunodot assay: We used for the diagnosis of autoimmune diseases the following Immunodot kit (biomedicals diagnostics, France)

- **ENA-DOT 7 kit** a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of 7 antibodies specificities: against Extractable Nuclear Antigens (SS-A, SS-B, Sm, Scl70 and Scl70), and against 2 additional antigens (centromere and Jo-1).
- **ANCA-MBG-DOT kit** a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against Myeloperoxidase (MPO) and serine proteinase (PR 3). Anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies using a purified antigen based on type IV.
- **CYTOTOXICITY-DOT4 kit** a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of 4 auto-antibodies specificities against cytosol organists (anti-mitochondria, anti-Jo1, anti-ribosomes and anti-LK1)
- **DNA-DOT kit** a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the detection of anti-DNA antibodies directed against (DNA native).
- The antigens are coated on distinct membrane on the assay strip;
- First, the assay strip is incubated in a reaction tube containing the diluted sample of the patient. If this sample contains at least one of the antibodies, these antibodies will recognize and bind to the corresponding antigen. After incubation, a first wash step removes all of the unbound proteins.
- An alkaline phosphatase labelled protein A conjugate binds to the captured antibodies. The excess of unbound conjugate is removed by a second wash step.
- The bound conjugate is visualized with an insoluble substrate for the

phosphatase enzyme (BCIP/NBT). This will give rise to a blue colored circle, confirming the presence of auto antibodies in the sample tested.

- **Anti-CCP, anti-TPO and anti-TG antibodies** were measured using a two-step immunoassay with the automated sample pretreatment for the semi quantitative determination of the Ig G class of auto antibodies specific to cyclic citrullinated peptide, thyroperoxidase and thyroglobulin in human serum using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology with flexible assay protocols referred to as chimiflex. Samples with results respectively < 5 U/ml, 100U/ml and 10U/ml were defined as negative. Ig G and Ig M RF was determined using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology with flexible assay protocols referred to as chimiflex. Samples with results < 20 U/ml were defined as negative.

Screening for HIV, HBV and HCV: Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology (Architect ci4100®) was used in screening for HIV, HBV and HCV.

Screening for CMV and Lyme diseases: Enzyme linked Fluorescence Assay (ELFA) technology (MiniVidas®) was used in screening for CMV and Lyme diseases. Dengue serotype 1, 2,3,4,5 and *Mycobacterium tuberculosis* were determined using the immunochromatographic technical (Hexagon D® and Hexagon TB® respectively).

Statistical analysis

Data were analyzed using Wilcoxon test to compare rates. We used Fischer (1) test for the percentages. Non parametric tests (Kruskal Wallis and Mann-Witney) were used when normality of distribution wasn't verified. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. Analysis was performed with STATA™.

Results

Patients and baseline characteristics

The number of visits during the study period was 73950 including 17 cases of autoimmune diseases. The referral incidence was right in 17/65 patients (26.2%). The incidence was 17/73950 (0.023%).

Table 1 shows demographic and clinical characteristics of autoimmune diseases patients in the study cohort. Comparing gender impact on the autoimmune diseases, the women were more likely to have autoimmune diseases than men ($p = 0.004$). Analyzing correlation between autoimmune diseases and race or ethnicity and family annual incomes, no differences attributable to ethnicity and family annual incomes were observed ($p = 0.7$).

Antibodies against HIV or HCV (Hepatitis B or C virus), CMV, *Borrelia burgdorferi* were found in sera or saliva of patients with autoimmune diseases such as SSG, SI.E, and PR. No correlation was found in our study ($p = 0.3$).

Inflammatory proteins profiles in the sera of patients with autoimmune diseases

The table 2 show inflammatory proteins profiles in the sera of patients with autoimmune diseases in the study cohort. Analyzing the different fractions of proteins, it's found that the hypoalbuminemia is associated with autoimmune diseases ($p = 0.02$). Thus hypergammaglobulinemia is associated with SLE and hypogammaglobulinemia is associated with Hashimoto Thyroiditis.

Auto antibodies profiles in the sera of patients with autoimmune diseases

The table 3 show the auto antibodies profiles in the sera of patients with autoimmune diseases in the study cohort. Comparing the proportion

Age (years)	
Median range	51 (28- 75)
Gender	
Male	4 (6.15%)
Female	61 (93.85%)
Family annual incomes (\$USA)	
Median range	5760
Race/Ethnicity	
Black	64 (98.46%)
White	1(1.53%)
Viral and Bacteria statue	
HIV	
Positive	0%
Négative	100%
HBV	
Positive	0%
Négative	100%
HCV	
Positive	0%
Négative	100%
DENGUE SEROTYPE 1, 2,3 et 4 IgG IgM	
Positive	0%
Négative	100%
Mycobacterium tuberculosis	
Positive	(2/17) 3.07%
Négative	(15/17) 96.93%
Lyme disease	
Positive	0%
Négative	100%
CMV	
Positive	0%
Négative	100%

Table 1: Demographic and clinical characteristics of patients with in the study cohort (n = 65)

fractions of proteins, it's found that the hypoalbuminemia is associated with autoimmune diseases ($p=0.02$). Thus hypergammaglobulinemia is associated with SLE and hypogammaglobulinemia is associated with Hashimoto Thyroiditis.

Auto antibodies profiles in the sera of patients with autoimmune diseases

The table 3 show the auto antibodies profiles in the sera of patients with autoimmune diseases in the study cohort. Comparing the proportion by type of autoimmune disease, it is found that there is no significant statistical difference in our cohort ($p=0.07$).

Association between gender and autoimmune diseases in Burkina Faso

In our study, there was a predominance of women among the affected member of study. Overall, 94.12% (16/17) of affected individuals were female and 5.88% (1/17) of affected individuals were men. Performances and the diagnosis of Immunodot technique were respectively 100% and 57% for the sensitivity and specificity.

The correct use and interpretation of serologic testing for diagnosing autoimmune diseases present a challenge to clinicians for two reasons: first the sensitivity and specificity of most laboratory tests for autoimmune disease are significantly less than 100% and second the detection of autoantibodies using different techniques such as indirect immune fluorescence or multiplex Immunodot assays give different results.

Autoimmune diseases proportion and patient's socio economic statute

The table 4 show the proportion of autoimmune diseases and patient's socioeconomic status in our study. Comparing pregnancy's impact on autoimmune disease occurrence, it is found that women who have had multiples pregnancies are more affected than primiparous ($p=0.002$).

Women's age and autoimmune diseases

The figure 1 show the Women's age and autoimmune diseases.

Comparing different age proportions depending on the autoimmune disease, SLE and SSG were more frequently in young women old of 32.5 years and 35 years respectively (Khi 2=5.30). The old women were more likely to have CREST (68 years), RA (60.4 years), with HT (50 years) and CREST and Polymyositis (46.5 years) (Khi 2 = 3.72).

Discussion

Rate of autoimmune diseases

In this study, the incidence of autoimmune diseases is very low (0.023%) and all except one patient were women. The referral diagnosis was right in 17/65 patients (26.2%) among patients in the limited setting country (Burkina Faso). Data analysis confirmed the low frequency of autoimmune diseases. There were 0.005% patients with systemic lupus erythematosus (SLE), 0.007% with rheumatoid arthritis (RA), 0.003% with CREST and Polymyositis, 0.003% with CREST, 0.001% with Gougerot Sjögren's syndrome (SSG), 0.003% with Thyroiditis of Hashimoto and, 0.001% with sarcoidosis. Autoimmune diseases prevalence is in the range of 4-10% in American and European populations [8,14-18]. Given that the prevalence of autoimmune diseases in USA and Europe is 4-10%, as referred, the 0.023% of autoimmune diseases found is very low and it probably simply indicates that there are many other patients with autoimmune diseases non-diagnosed. We report that SLE and SSG were more frequently in young women old of 32.5 years and 35 years respectively. The old women were more likely to have CREST (68 years), RA (60.4 years), HT (50 years) and CREST and Polymyositis (46.5 years). This gender inequality found in autoimmune diseases is often due to hormonal factors [3-8,19,20];

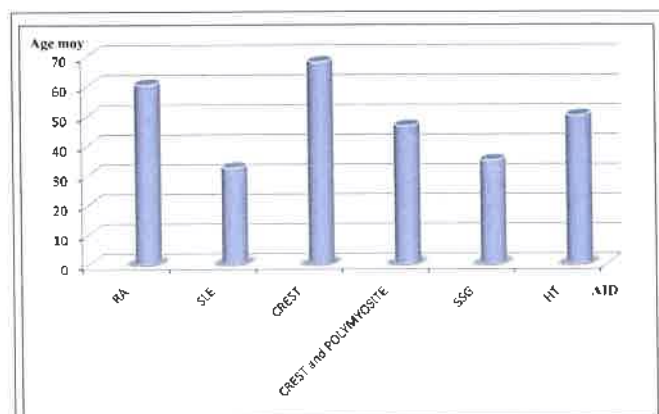


Figure 1: Women's age and autoimmune diseases

Moy. Range of Proteins fractions (g/dl)	RA (n=5)	SLE (n= 4)	SSG (n=1)	Hashimoto Thyroiditis (n =2)	CREST (n=2)	CREST Sarcoidose and Poly-myositis		References Values
						(n=2)	(n=2)	
Albumin	21.92	22.98	9.62	18.72	17.3	25.75	NA	(40.2-47.6)
Alpha1	2.37	3.06	1.13	2.78	2.62	1.53	NA	(2.1-3.6)
Alpha2	3.4	5.37	1.7	2.88	4.35	3.2	NA	(5.1-8.5)
Beta 1	2.93	1.9	0.79	0.8	2.05	1.89	NA	(3.4-5.2)
Beta 2	3.88	4.28	1.49	1.82	3.2	2.64	NA	(2.3-4.7)
Gamma	13.6	30.4	9.26	4.99	11.48	8.98	NA	(8-13.5)
Proteins totals	49.2	68	24	32	41	44	NA	(60-70)

Table 2: Inflammatory protein profile in the sera of patients with autoimmune diseases
NA: Not Applicable

Specific autoantibodies	Methods	Associated disease	Frequencies
Antinuclear,anti- ENA Anti-SSA and Anti-SSB	IMMUNODOT		
Anti-Sm and ds-DNA		SSG	1 /73950) 0.001 %
		SLE	(4 /73950) 0.005 %
Anti-CENP- B	IMMUNODOT	Crest	(2 /73950) 0.003%
Anti-CENP-B and Anti-Jo1	IMMUNODOT	Crest and polymyositis	(2 /73950) 0.003%
Anti-CCP	CMIA	RA	(5 /73950) 0.007%
Rheumatoidfactors			
Anti-TG Anti-TPO	CMIA	Autoimmunethyroiditis Hashimoto	2 /73950) 0.003%

Table 3: Auto antibodies profiles in the sera of patients with autoimmune diseases

Autoimmune disease	Gravidity		Hygienic condition	Frequencies
	Primiparous	Multiparous		
RA		5	No hygiene	(5/73950) 0.007%
SLE	1	4	No hygiene	(4/73950) 0.005 %
SSG		1	No hygiene	(1/73950) 0.001%
CREST		2	No hygiene	(2/73950) 0.003%
CREST and Polymyosite		2	No hygiene	(2/73950) 0.003%
Autoimmune Thyroiditis: Hashimoto		2	No hygiene	(2/73950) 0.003%

Table 4: Rate of autoimmune diseases and patient's socio economic statue

antibodies production and the presence of lymphocytes are higher in women than men [2]. Indeed, in the mouse model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, disease severity is increased by castration in male

mice diffuse and decreased by testosterone implantation in females diffuse [4].

The immunomodulatory effects of gonadal steroids, especially, testosterone, may underlie the female-specific association with autoimmune disorders. We additionally report positive association with RA, SSG, HT, CREST/

Polymyositis and gravidity. These results were reported in many studies [12,13,21-24]. It suggests that transition from fetal cells through the placenta during pregnancy, and their persistence in the mother after childbirth can in some cases disturb immunity which explains that the women multiparous are more likely to have autoimmune diseases than those with one pregnancy.

In our study we have found that there is no association with hygiene hypothesis and autoimmune disease. The annual incomes was very low in our study (< 5760\$ USA). Studies that have investigated human autoimmune disease risk in relation to the hygienic degree have found many associations [24].

We also examined a negative association with RA, SLE, CREST/ Polymyositis, HT and infection agents (HIV, HBV, HCV, Lyme disease, Dengue serotype 1, 2, 3 and 4) a positive association with *Mycobacterium tuberculosis* and RA cases (3.07%).

It is a possibility that autoimmune disease and the associated *Mycobacterium tuberculosis* infected may modulate the immune response and RA risk, given some observed correlation between the *Mycobacterium tuberculosis* and autoimmune diseases [1,2,9-13]. It would be of interest to evaluate RA risk in relation to the *Mycobacterium tuberculosis* infection in populations where *Mycobacterium tuberculosis* frequencies are sufficiently high (e.g., Africa tropical); and perhaps more importantly, in any population stratified by gender.

Our findings are, however, consistent with a direct identification of autoantibodies in patients samples coupled with clinical signs. Identification of autoantibodies is essential for the diagnosis of autoimmune diseases in limiting setting country. Clinicians can use these results as guidance for classifying patients and/or for assessing their response to specific therapies, especially in cases where development of targeted biological therapies [12,13,21].

Ours technologies have provided a new approach for autoantibody quantification based on multiplex testing which represents an advantage compared to earlier methods such as line blot assays and conventional one well-one test microtiter ELISA diffuse [3,22,23]. These multiplex assays have made it possible to simultaneously detect multiple biomarkers using a single platform and a single serum sample. In this study we have showed different levels of clinical sensitivity for the detection of the most frequently detected autoantibodies in AID patients.

BMD Test® allows testing of seven antigens in parallel from individual serum samples with high specificity (99.8%). This method provides significant savings in time, avoiding the conventional first screening and post-confirmation algorithm currently being used in most clinical testing laboratories for AID sample testing. BMD requires only 20 µL of sample and follows the same steps as a traditional ELISA assay. Together with low setup costs and a fast sample processing time, BMD provides an affordable alternative to currently available multiplex testing systems. These cost-saving features enable small laboratories with limited budgets to use this technology without a large capital outlay and training of laboratory technicians. BMD have demonstrated an excellent analytical sensitivity (100%) but a bad specificity (57%) and when compared with established ELISA assays [4,8,11]. Moreover, when compared with a line immunoassay, BMD represents the quantitative advantage for clinical management of patients [25-28].

Conclusion

The referral diagnosis was right in 17/65 (26.2%). The incidence was 17/73950 (0.023%) in the limited setting country (Burkina Faso). The very low incidence of auto-immune diseases found is probably due to a number of undiagnosed patients. There was not a significant association between auto-immune diseases and infection; there was not also significant association between auto-immune diseases and hygienic

hypothesis.

Acknowledgments

We thank investigators at University Hospital, Bobo Dioulasso BURKINA FASO Dr. (University Hospital) for providing patients with autoimmune diseases and clinical data.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Y Sourabié, Y Traoré, F Fumoux, M S Ouédraogo, and C Sirima

Performed the experiments: Y Sourabié, Y Traoré and M S Ouédraogo

Analyzed the data: Y Sourabié and Y Traoré

Contributed reagents/materials/analysis tools: Y Sourabié, Y Traoré and F Fumoux,

Wrote the paper: Y Sourabié, Y Traoré, F Fumoux, M S Ouédraogo, and C Sirima

Conflict of Interest Statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Abreu AS, Fernandes GH, Borba EF, Guedes LKN, Ramos JF, et al. (2014) Musculoskeletal Tuberculosis in Dermatomyositis: Association or Coincidence? *Open J Rheumatol/Autoimmune Dis* 4: 58-61.
2. Ahonen P, Miettinen A, Perheentupa J (1987) Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. *J Clin Endocrinol/Metab* 64: 494-500.
3. Engvall E, Perlmann P (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked antimmunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109: 129-135.
4. Forsblad-d'Elia H, Carlsten H, Labrie F, Kontinen YT, Ohlsson C (2009) Low serum levels of sex steroids are associated with disease characteristics in primary Sjögren's syndrome; supplementation with dehydroepiandrosterone restores the concentrations. *J Clin Endocrinol/Metab* 94: 2044-2051.
5. Habash-Bseiso DE, Yale SH, Glurich I, Goldberg JW (2005) Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res* 3: 190-193.
6. Haga HJ, Rygh T (1999) The prevalence of hyperprolactinemia in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 26: 1291-1295.
7. Hanly JG, Su L, Farewell V, Fritzler MJ (2010) Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 358: 75-80.
8. Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, Fougere L, Theriault C, et al. (2010) Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 352: 147-152.
9. Balboni I, Chan SM, Kattah M, Tenenbaum JD, Butte AJ, et al. (2006) Multiplexed protein array platforms for analysis of autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol* 24: 391-418.
10. Bossuyt X, Louche C, Wiik A (2008) Standardisation in clinical laboratory medicine: an ethical reflection. *Ann Rheum Dis* 8: 1061-1063.
11. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, et al. (2004) Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 12: 2361-2369.

12. Cervera R, Balasch J (2008) Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Update* 14: 359-366.
13. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM (2005) Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 32: 219-224.
14. Forsblad-d'Elia H, Carlsten H, Labrie F, Kontinen YT, Ohlsson C (2009) Low serum levels of sex steroids are associated with disease characteristics in primary Sjögren's syndrome; supplementation with dehydroepiandrosterone restores the concentrations. *J Clin Endocrinol/Metab* 94: 2044-2051.
15. Habash-Bseiso DE, Yale SH, Glurich I, Goldberg JW (2005) Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res* 3: 190-193.
16. Haga HJ, Rygh T (1999) The prevalence of hyperprolactinemia in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 26: 1291-1295.
17. Hanly JG, Su L, Farewell V, Fritzler MJ (2010) Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 358: 75-80.
18. Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, Fougere L, Theriault C, et al. (2010) Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 352: 147-152.
19. El Miedany YM, Ahmed I, Moustafa H, El Baddani M (2004) Hyperprolactinemia in Sjögren's syndrome: a patient subset or a disease manifestation? *Joint Bone Spine* 71: 203-208.
20. Endo Y, Negishi I, Ishikawa O (2002) Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 41: 490-495.
21. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW (2009) Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 4: 1.
22. Kumble S, Choi L, Lopez-Muedano C, Kumble KD. (2010) Microarray ELISA for autoantibody screening in connective tissue diseases. *J Clin Diagn Res* 6: 145-149.
23. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF (2010) The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 160: 1-9.
24. Selmi C, Lu Q, Humble MC (2012) Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. *J Autoimmun* 39: 249-252.
25. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL (2006) Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev* 19: 80-94.
26. Vestergaard P (2002) Smoking and thyroid disorders—a metaanalysis. *Eur J Endocrinol* 146: 153-161.
27. Waisberg M, Tarasenko T, Vickers BK, Scott BL, Willcocks LC, et al. (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *PNAS* 108: 1122-1127.
28. Zafir Y, Gilburd B, Carrasco MG, Kivity S, Sánchez-Castañón M, et al. (2013) Evaluation of an automated chemiluminescent immunoassay kit for antinuclear antibodies in autoimmune diseases. *Immunol Res* 56: 451-456.

Study of cytokines microenvironment during autoimmune diseases in patients from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Y. SOURABIÉ^{1,2}, S. SAWADOGO³, G. SANOU⁶, W. W. BAZIÉ¹,
M. S. OUÉDRAOGO^{1,2}, F. FUMOUX⁴, Y. TRAORÉ⁵

Résumé

La survenue des maladies auto-immunes implique un réseau de cytokines complexe qui recrutent et activent des cellules TREGS / TH17. Cette étude a pour but de comparer les taux de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans les surnageants de PMBC chez les patients souffrant de maladies auto-immunes et chez les donneurs sains de Bobo Dioulasso.

Il s'agit d'une étude prospective de cohorte qui s'est déroulée de novembre 2014 à décembre 2015 et a concerné 17 patients souffrant de maladies auto-immunes et 17 donneurs sains. L'étude s'est déroulée à l'hôpital universitaire SOURO SANOU et les autres cliniques privées de Bobo Dioulasso, BURKINA FASO. Les caractéristiques démographiques et le profil des cytokines: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α et TGF- β) ont été déterminés. Nous avons utilisé une technique immunoenzymatique (ELISA) pour le dosage de ces cytokines.

Nous avons trouvé qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres de TNF- α chez les témoins sains et les patients souffrant de maladies auto-immunes ($P = 0,09$). Les concentrations de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-10 et le TGF- β dans les surnageants de PMBC sont significativement plus élevées dans le groupe témoin que dans le groupe de patients souffrant de maladies auto-immunes (respectivement $P = 0,1, 0,004, 0,016$). Les concentrations des surnageants en IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 et IFN- γ ont significativement augmenté dans les situations de maladies auto-immunes en comparaison avec les témoins sains (respectivement $P = 0,00001, 0,001, 0,006, 0,008$ et $0,000$). Egalement les patients atteints de SLE et de RA ont des concentrations élevées en IL-22, IL-21, tandis que les patients atteints de RA ont des titres élevés en IL-17A. Les patients atteints de HT ont un titre élevé en TGF- β . En se basant sur la concentration de cytokines sécrétées telles que l'IL-17A et l'IFN- γ , nous trouvons que le phénotype IL-17+, IFN- γ + est majoritaire dans les maladies auto-immunes à Bobo-Dioulasso.

Nous avons montré qu'au cours des maladies auto-immunes à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso, les cytokines pro-inflammatoires produites par la voie des cellules TH17 telles que (IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ) sont sécrétées en abondance dans les surnageants de PMBC. Alors que les cytokines anti-inflammatoires de la voie des cellules T régulatrices (IL-2, IL-10 et le TGF- β) sont très peu sécrétées au cours des processus auto-immuns. Aussi nous avons mis en évidence dans notre étude une prévalence élevée du phénotype de TH17 suivant (IL-17+, IFN- γ +). Nous proposons que des cibles thérapeutiques soient dirigées vers ces phénotypes pour lutter contre les maladies auto-immunes.

Mots-clés : Phénotype, Cytokines, Maladies auto-immunes.

¹ Centre Hospitalier Universitaire Sourou Sanou 01 BP 676 Bobo 01 Burkina Faso.

² Institut supérieur des sciences de la santé, Université polytechnique de Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

³ Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé, Université Ouaga I Professeur Joseph Ki-Zerbo.

⁴ Faculté des sciences de luminy, Aix Marseille Université, France.

⁵ Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies, Université Ouaga I Professeur Joseph Ki-Zerbo.

⁶ Centre National de Formation et de Recherche sur le Paludisme.

Correspondance : Yacouba Sourabié, Enseignant- chercheur en Immunologie à Institut supérieur des sciences de la santé, Université polytechnique de Bobo Dioulasso, Centre Hospitalo-universitaire Sourou Sanou, Service d'Immunologie et d'Hématologie BP 676. Email: yacourabie@yahoo.fr - Tel: 0022670710325.

Abstract

The development of autoimmune diseases involves an intricate network of cytokines that recruit and activate TREGS/ TH17 cells. This study was aimed to compare PBMC levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in AID patients and non-AID controls from Bobo Dioulasso. We prospectively enrolled 17 patients who had autoimmune diseases and 17 healthy donors at University Hospital SOURO SANOU and other private clinical, from Bobo Dioulasso, BURKINA FASO, between November 2014 and December 2015 for this cohort study. Demographic characteristics and cytokines profile: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α and TGF- β) were determined. We used the immunoenzymatic technology to assess the titer of cytokines.

We found that there was no significant variation of TNF- α level in normal controls and autoimmune diseases patients ($P=0.09$). The concentrations of cytokines anti-inflammatory such as IL-2, IL-10 and TGF- β in PBMC supernatant were significantly higher in the control group than in the group of patients with autoimmune diseases (respectively $P=0.1; 0.004; 0.016$). The supernatant levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ significantly increased in autoimmune diseases in comparison to healthy controls (respectively $P=0.00001; 0.001, 0.006; 0.008$ and 0.000). We also found that patients with SLE and RA exhibit increased levels of IL-22, IL-21, also, patients with RA exhibit increased levels of IL-17A. Patient with HT diseases exhibit increased levels of TGF- β . Based on the level of cytokines such as IL-17A and IFN- γ , we demonstrate that the phenotype IL-17+, IFN- γ + T cell is major in AID.

We have shown that patients with autoimmune diseases from Bobo Dioulasso, Burkina Faso have pro-inflammatory cytokines produced by TH17 cells such as (IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ) are abundantly secreted in PBMC supernatants. While anti-inflammatory cytokines in the regulatory T-cell pathway (IL-2, IL-10 and TGF- β) are poorly secreted during autoimmune processes. We also found in the study a high prevalence of the phenotype of the following TH17 (IL-17 +, IFN- γ + T cells). We propose that the therapeutic targets be directed to the phenotypes to fight AID.

Keywords: Phenotype, Cytokines, Autoimmune Diseases

Introduction

Autoimmune diseases are characterized by autoimmune reactions against one's own widespread determinants. Many cytokines are involved in activity regulation and organ involvement in various autoimmune diseases [11, 15, 22, 25]. These cytokines are synthesized particularly in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, type I diabetes, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis, and worth stressing is the difference between cytokines as phenotype markers and cytokines as inflammation and tissue damage mediators. In most autoimmune diseases the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines determines the extent and spread of inflammation and can lead to conspicuous clinical effects such as autoimmune diseases [11, 19]. In SLE patients, for instance, studies showed a significant elevation of TNF- α and IL-10 in all, but especially in neurologic disease form. Understanding of the fundamental mechanisms of T cell differentiation control is the road to the strategy of cytokine phenotype modulation and prevention of tissue damage and autoimmune diseases, promoting naturally the protection from them. To understand the molecular immun in patients with autoimmune diseases, we wanted to characterize the profile of cytokines that interact with TH17 / TREGS to develop treatments biotherapy in autoimmune diseases.

Material and methods

Ethic Statement

Samples analyzed in our study derived from patients who went to hospital for consultation. Patients with autoimmune diseases enrolled in our study received effective immunosuppressors treatment alone or in association with another drug. The study was approved by our National Ethic Committee for health research in Burkina Faso Ouagadougou. Patients participating in this study gave written informed consent.

Patients and method

We prospectively enrolled 17 patients who had autoimmune diseases and 17 healthy donors at University Hospital SOURO SANOU and other private clinical, from Bobo Dioulasso, BURKINA FASO, between November 2014 and December 2015 for this cohort study. Demographic characteristics and cytokines profile: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α and TGF- β) were determined.

Laboratory assay

Nature of cells

Cytokine secretion was assayed in incubation supernatant of peripheral venous blood mononuclear cells (PBMC) from patients with autoimmune disease and healthy donors (control group). All blood samples were taken at the laboratory of the SANOU Sourou University Hospital in Bobo Dioulasso, Burkina Faso, after approval of the study protocol by the ethics committee.

Isolation and incubation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from whole blood

In each patient, we had taken 10 mL of peripheral venous blood every morning on an empty stomach in two tubes with heparin as an anticoagulant. The whole blood was diluted to ($\frac{1}{2}$) in a Hank's balanced salt solution devoid of Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco BRL, France) with penicillin-streptomycin 100UI/mL (Biochrom KG, Germany). Lymphocytes and monocytes cells were separated by gradient centrifugation using Ficoll-Histopaque with a density of 1.076 (Sigma) (30 min à 400g). After two successive washes, we resuspended it in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) with 10% (v/v) of Fetal calf serum (FCS) inactivated with heat (56 °C, 30 min, Gibco BRL), and we added antibiotic (penicillin/streptomycin 100UI/mL). Cells were incubated, at 2×10^5 cells / well of 24-well plates (Corning Inc, NY) at 37 °C in a humidified incubator (95% air - 5% CO_2). PBMC supernatant was diluted in DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma; maximum 10% (v / v) per well), with activation by lipopolysaccharide (LPS) of *Salmonella abortus equi*, 5 μg / mL (Sigma).

After 24 hours of incubation, the plates were centrifuged (15 min to 200 g), and the supernatant was removed and then frozen at -80 °C until the Elisa assay performed in the laboratory CERBA in France.

Determination of cell viability

We added in Malassez cell, 50 μL of PBMCs and 50 μL of trypan blue for the cell count. Refractive cells are those that are alive and dead cells absorb trypan blue.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{number of living cells}}{\text{number of living cells} + \text{number of death cells}}$$

Immunoenzymatic technology

The supernatant from PBMC level of following cytokines: IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α and TGF- β were determinate using Immunoenzymatic technology Elisa. Briefly, 96 well plates (Corning Inc.) were treated with 25 mL / well of a solution of the first capture monoclonal antibody (HalfMoonBay, USA) (5 μ g / mL) diluted in PBS 0.5% tween (Sigma). The plate is incubated overnight at 4 ° C., washed three times and the nonspecific binding sites saturated by incubation for 1 hour at room temperature with PBS 3% milk. After additional washings, we added 25 μ L of sample, or human recombinant cytokines used for the standard range (Pharma Biotechnologies, Germany) for h-IL-2; H-IL-10; h-IL-21; R & D Systems Europe, UK for h-IL-22; H-IL-23; 1H-IL-17A; h-TGF- β and h-TNF- α . Then, 25 μ L of a biotinylated antibody solution (Antibody Solutions, Half Moon Bay, USA) (2 μ g / mL) are duplicated in each well. The plates are incubated for 2 hours at room temperature. After washing 50 μ L, of a solution of streptavidin-HR peroxidase (Zymed, USA) diluted 1/3000 in PBS1X are deposited in each well. After 1 hour of incubation at room temperature, the enzymatic reaction is revealed by O-phenylenediamine dichlorate (OPD SigmaFast, Sigma). Finally, we read the results of DO, using a spectrophotometer (OpsysMRDy nex® Technology) set at the wave length of 450 nm. Cytokines concentration was determined by interpolation of the standard range, and the results standardized with control.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 16. Student's independent t-test was used to determine the significant difference; $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Characteristics of the study population

The number of visits during the study period was 73950 including 17 cases of autoimmune diseases. The referral diagnosis was right in 17/65 patients (26.2%). The incidence was 17/73950 (0.023%). In group of AID patients ($n = 17$), there were 16 females and 1 male with a mean age of 29.2 ± 3.2 years). The controls consisted of 17 normal healthy who were matched for age and sex with the patient group. In this group there were 2 males and 15 females with a mean age of 28.7 ± 2.3 years.

Cytokine Assay

Cytokines levels in supernatant from PBMCs, namely, IL-2, IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α , TGF- β , and IFN- γ were measured in normal patients ($n = 17$), group of AID patients ($n = 17$) (table I). It was observed that the mean supernatant from PBMC level of TNF- α was (104.4 ± 15.2 pg/mL) as compared to normal controls at 92.5 ± 12.1 pg/mL. There was no significant variation (table I).

The mean supernatant from PBMC level of IL-2 in control group was 78.1 ± 9.9 pg/mL, whereas level in group of AID patients was 35.9 ± 15.8 pg/mL showing a significant variation ($p = 0.01$).

The mean supernatant from PBMC level of TGF- β in the control group was 27.51 ± 7.7 pg/mL, whereas level in group of AID patients was 18.02 ± 5.6 pg/mL showing a significant variation ($p = 0.004$).

The mean supernatant from PBMC level of IL-22 in the group of AID patients was 79.5 ± 22.3 pg/mL when compared with the normal controls at 45 ± 17 pg/mL; the variation was significant ($p < 0.006$). The mean PBMC supernatant level of IL-17A was high in group of AID patients at 239.8 ± 87.5 pg/mL, as compared to the normal controls at 102.4 ± 42.3 pg/mL. There was also a significant increase in the group of AID patients as compared to the controls subjects ($P = 0.024$). The mean supernatant from PBMC level of IL-21 was also in control subjects 85.9 ± 15.6 pg/mL and 198.6 ± 82.7 pg/mL in the group of AID patients. However, there was a significant difference ($P = 0.00001$). The mean supernatant from PBMC level of IFN- γ in control subjects was 225 ± 31.5 pg/mL, but it was higher in group of AID patients at 294.2 ± 40.1 pg/mL. And this difference was significant ($P = 0.000$).

The table I show the PBMC supernatant level of TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β and IFN- γ in the Controls and group of AID Patients

Table I: PBMC supernatant level of TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, TGF- β and IFN- γ in the Controls and group of AID Patients (Mean $\pm$ SD)

Cultures (Pg/mL)	Control (n = 17)	Group of AID patients (n = 17) (Pg/mL)	P value (control vs. patient)
TNF- α (mean $\pm$ SD)	92.5 $\pm$ 12.1	104.4 $\pm$ 15.2	P<0.09 (NS)
IL-2 (mean $\pm$ SD)	78.1 $\pm$ 9.9	35.9 $\pm$ 15.8	P= 0.01 (S)
IFN- γ (mean $\pm$ SD)	225 $\pm$ 31.5	294.2 $\pm$ 40.1	P<0.000 (S)
TGF- β (mean $\pm$ SD)	27.51 $\pm$ 7.7	18.02 $\pm$ 4.6	P<0.004 (S)
IL-22 (mean $\pm$ SD)	45 $\pm$ 17.7	79.5 $\pm$ 2.3	P<0.006 (S)
IL-23 (mean $\pm$ SD)	84.1 $\pm$ 20.4	110 $\pm$ 21.1	P<0.008(S)
IL-17A (mean $\pm$ SD)	102.4 $\pm$ 21.8	239.8 $\pm$ 67.5	P<0.00001 (S)
IL-21 (mean $\pm$ SD)	85.9 $\pm$ 15.6	198.6 $\pm$ 82.7	P<0.001 (S)
IL-10 (mean $\pm$ SD)	266.2 $\pm$ 25.3	212.6 $\pm$ 22.1	P<0.016 (S)
Ratio of mean IL-2/IL-17A	0.76	0.15	T REGS/TH17

Interleukin 2(IL-2) concentration in supernatant from PBMC of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-2 in autoimmune diseases by comparing the IL-2 titers obtained in the control group and the patient group. We find that the production of IL-2 is significantly higher in the control group than in the group of patients (Figure 1). But there was seeded no significant variation between the different autoimmun diseases ($p = 0.07$).

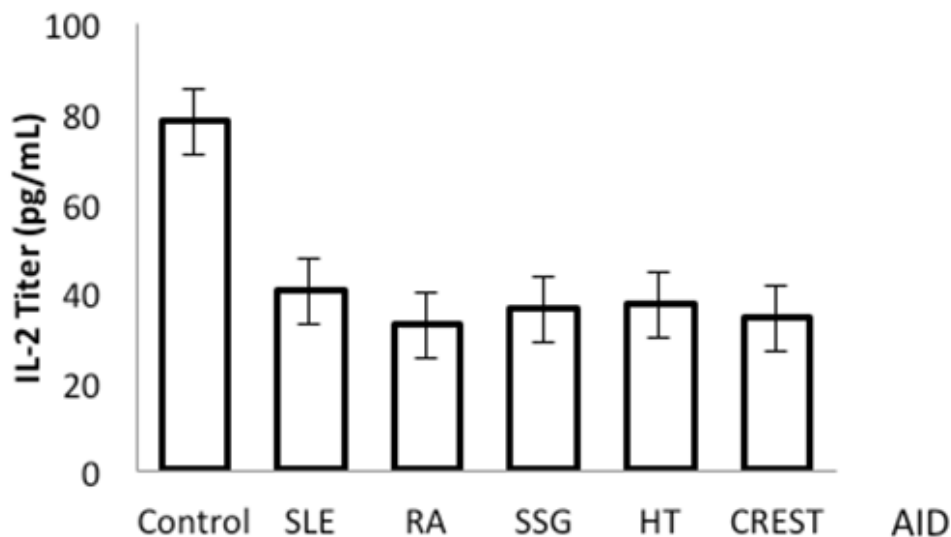


Figure 1: IL-2 concentration in the supernatant from PBMCs at healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Each bar represents means $\pm$ SEM ($n = 17$ for control and $n = 17$ for patients with autoimmune diseases).

Interleukin 10(IL-10) concentration in supernatant from PBMC of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-10 in autoimmune diseases by comparing the IL-10 titers obtained in the control group and the patient group. We find that the production of IL-10 is significantly higher in the control group than in the group of patients (Figure 2). But there was no significant variation between the different autoimmune diseases ($p = 0.09$).

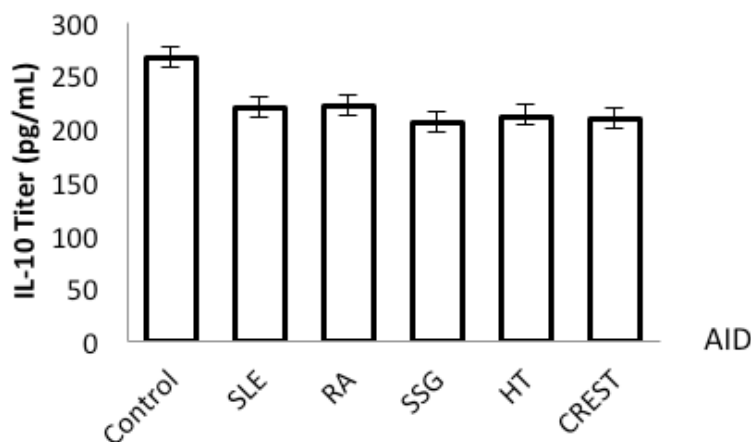


Figure 2: IL-10 concentration in supernatant from PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Each bar represents means $\pm$ SEM ($n = 17$ for control and $n = 17$ for patients with autoimmune diseases).

Interleukin 17A (IL-17A) concentration in supernatant from PBMC of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-17A in autoimmune diseases by comparing the IL-17A titers obtained in the control group and the patient group. We obtained a significantly lower IL-17A titer in the control group than the patient group (Figure 3). Also, there was a significant variation between patient with RA and others autoimmune diseases ($p = 0.001$).

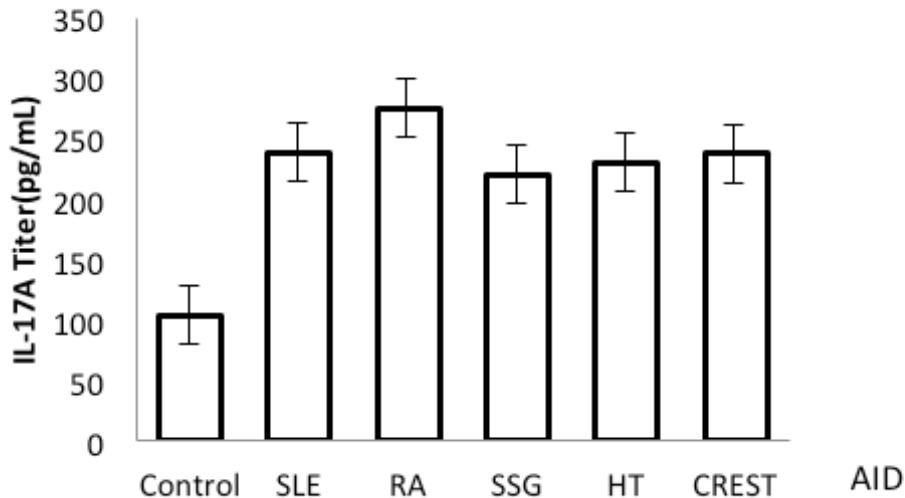


Figure3: IL-17A concentration in supernatant of PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Each bar represents means $\pm$ SEM ($n = 17$ for control and $n = 17$ for patients with autoimmune diseases).

TGF- β concentration in supernatant of PBMCs of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of TGF- β in autoimmune diseases by comparing the different titers obtained in the control group and the group of patients. We obtained a significantly higher TGF- β titer in the control group than the patient group (Figure 4). There was a significant variation between patients with HT disease and the other autoimmune diseases ($p = 0.03$).

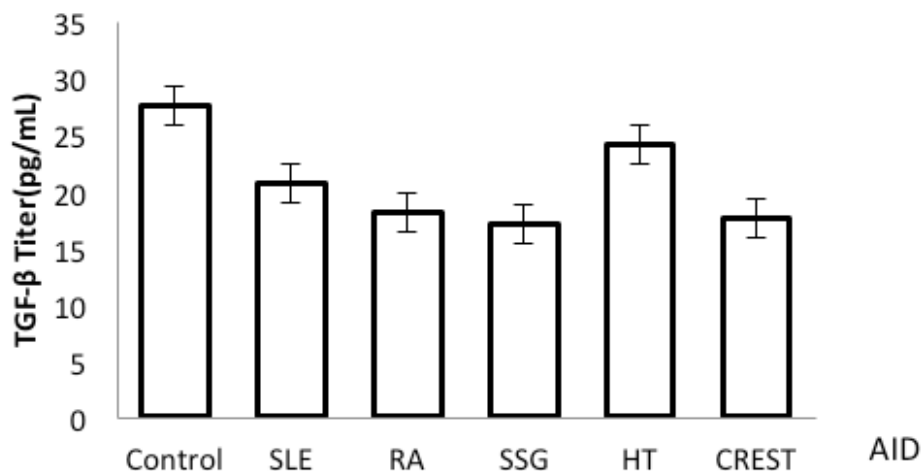


Figure 4: TGF- β concentration in supernatant from PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases. Each bar represents means $\pm$ SEM (n= 17 for control and n=17 for patients with autoimmune diseases).

Interleukin 22(IL-22) concentration in supernatant from PBMCs of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-22 also in autoimmune diseases by comparing the IL-22 titers obtained in the control group and the patient group. We obtained a significantly lower IL-22 titer in the control group than in the patient group (Figure 5). Also, there was a significant variation between patient with RA and others autoimmune diseases ($p= 0.004$) (Figure 4).

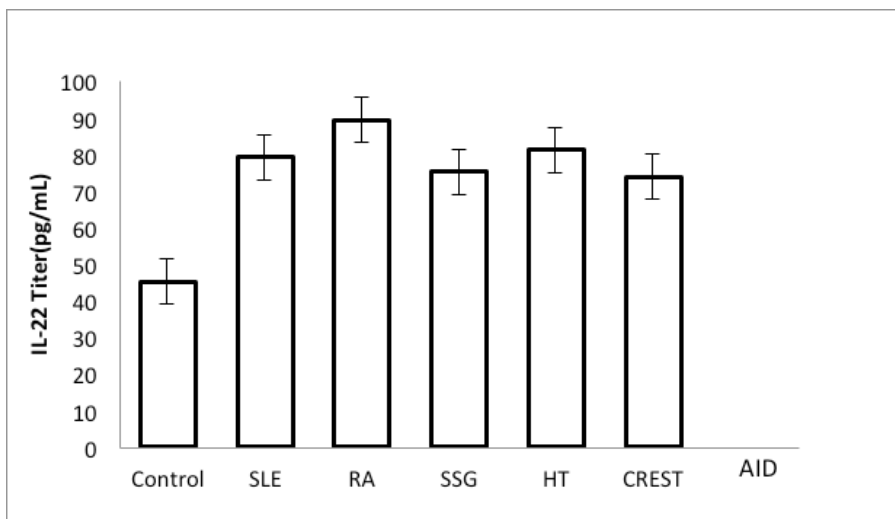


Figure 5: IL-22 concentration in supernatant from PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases. Each bar represents means $\pm$ SEM (n= 17 for control and n=17 for patients with autoimmune diseases).

Interleukin 23(IL-23) concentration in surpernatant from PBMCs of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-23 in autoimmune diseases by comparing the IL-23 titers obtained in the control group and the patient group. We obtained a significantly lower IL-23 titer in the control group than in the group of patients (Figure 6). But there was seeded no significant variation between the different autoimmun diseases ($p=0.075$).

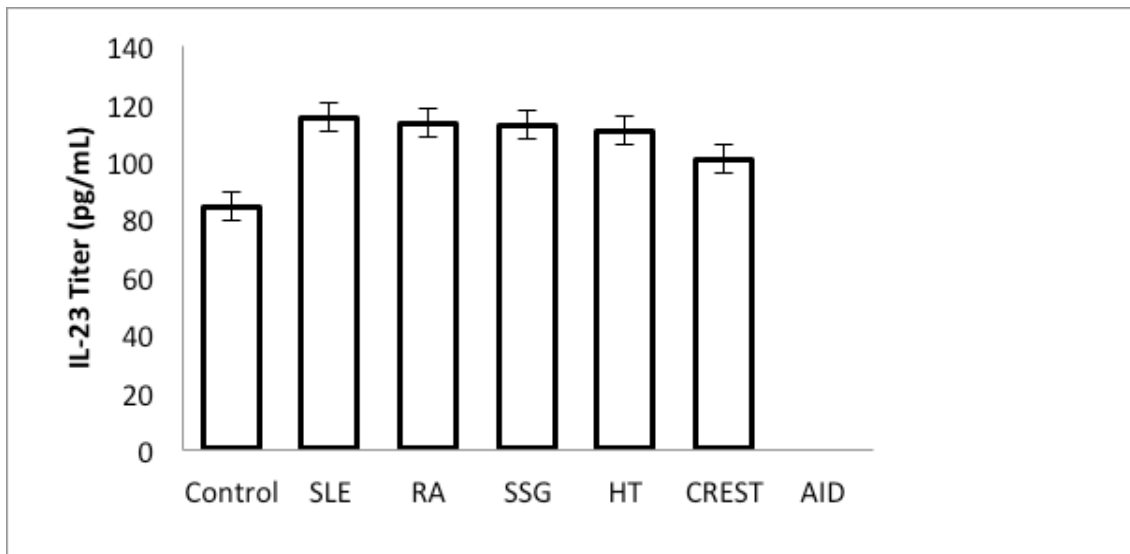


Figure 6: IL-23 concentration in surpernatant from PBMCs of healthy donors and patients with autoimmun diseases.

Each bar reprents means $\pm$ SEM ($n=17$ for control and $n=17$ for patients with autoimmune diseases).

Interleukin 21 (IL-21) concentration in surpernatant from PBMCs of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IL-21 in autoimmune diseases by comparing the IL-21 titers obtained in the control group and the patient group. We obtained a significantly lower IL-21titer in the control group than in the group of patients (Figure 7). Also, there was seeded a significant variation between patient with SLE; RA and others autoimmune diseases ($p=0.000$) (Figure 4).

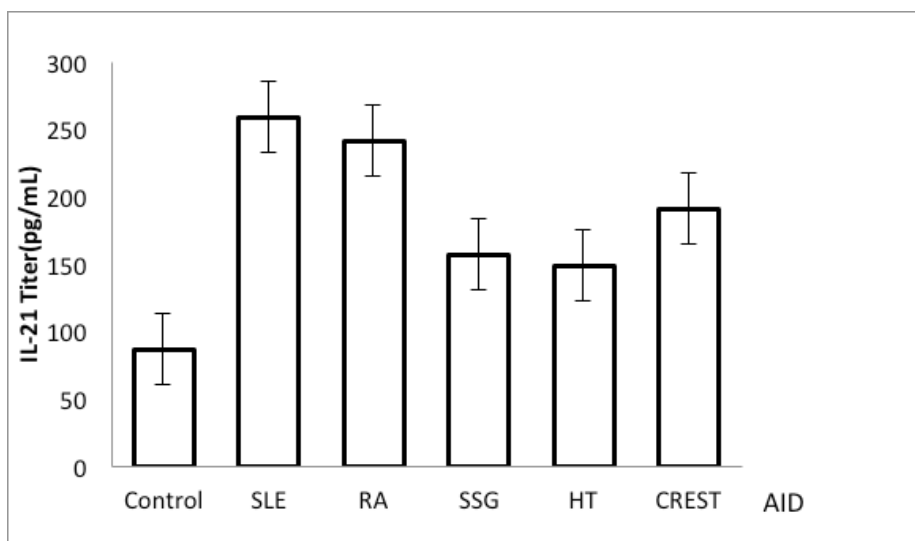


Figure 7: IL-21 concentration in supernatant from PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Each bar represents means $\pm$ SEM (n= 17 for control and n=17 for patients with autoimmune diseases).

Interferon gamma (IFN- γ) concentration in PBMC supernatant of control group and patients with autoimmune diseases.

We examined the potential role of IFN- γ in autoimmune diseases by comparing the different titers obtained in the control group and the group of patients. We obtained a significantly lower IFN- γ titer in the control group than in the group of patients (Figure 8). There was a significant variation between patients with SLE, RA diseases and the others autoimmune diseases ($p= 0.002$).

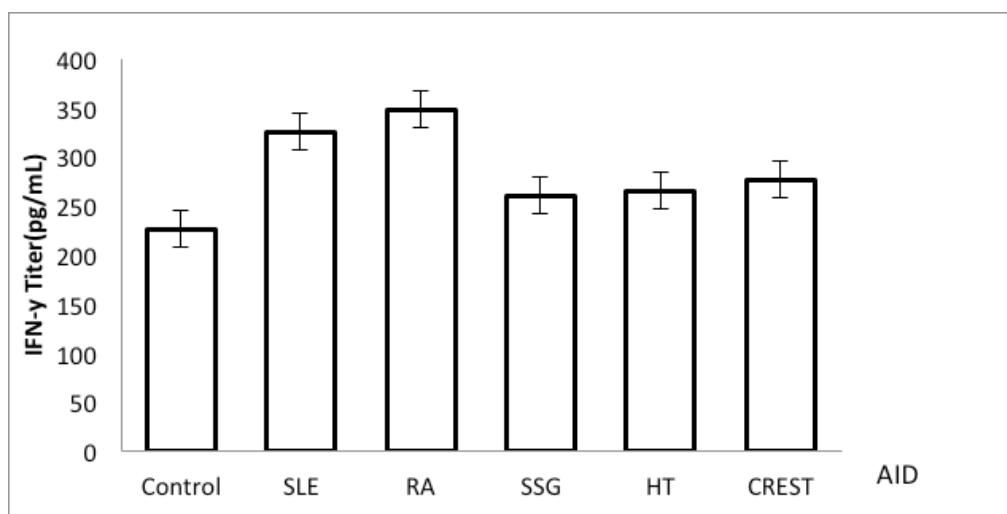


Figure 8: IFN- γ concentration in the supernatant of PBMCs of healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Each bar represents means $\pm$ SEM (n= 17) for control and n=17 for patients with autoimmune diseases.

Discussion

We found in our study that there was no significant variation of TNF- α level in normal controls and autoimmune diseases patients. Most studies agree on a high concentration of TNF- α in autoimmune diseases [3, 25].

The difference with our results is justified by the fact that BURKINA FASO is located in an endemic or epidemic area of most tropical diseases. The transmission conditions are permanent and the immune system of the populations is also constantly stimulated by the pathogens or their vectors. Indeed TNF- α is mainly secreted by the subset TH1 cells and confirms the non involvement of these subsets of lymphocytes in the development of AID [25].

In our study, result demonstrated that IL-2, IL-10 and TGF- β levels in the patients group were significantly lower than the control group. These results agree with the findings of other studies which indicated that IL-2, IL-10 and TGF- β cytokine is decreased during relapses of autoimmune diseases [4, 29]. A number of studies make clear inhibitory effects of IL-10 in autoimmune diseases such as MS [3, 5]. According to IL-2 and TGF- β level in PBMC supernatant, studies showed that these cytokines induced Foxp3 expression, but both cytokines were needed to sustain expression of this transcription factor [24]. Other studies have reported that IL-2 is necessary for the survival and “fitness” of natural Treg cells [1, 6, 7, 28].

Meyer et al. reported that TGF- β 1 secretion by regulatory T lymphocytes inhibit the development of EAE [18]. In addition, exogenous TGF- β 1 can prevent the development of EAE and the severity of the disease was increased by TGF- β 1 neutralization. Also appearance of symptoms in patients with autoimmune diseases has been associated with TGF- β 1 levels [20].

These findings demonstrate inhibitory role of these cytokines on the immune system cells. A defect in activation of TREGS cells could explain the development of TH17 cells the particular in AID. Indeed, TREGS cells are normally activated by dendritic cells and secrete IL-10 and TGF- β which are anti-inflammatory cytokines.

In our study, the results presented showed that supernatant levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ significantly increased in autoimmune diseases in comparison to healthy controls.

We found in our study that patients with SLE and RA exhibit increased levels of IL-22, IL-21, also, patients with RA exhibit increased levels of IL-17A. Patient with HT diseases exhibit increased levels of TGF- β . Similar results have been showed by many studies [14, 29].

In patients with SLE, MS, RA and in experimental models, IL-17 in coordination with IL-21 and BAFF promotes germinal center formation and influences B cells to produce pathogenic autoantibodies [6, 10, 16]. The genetic association of SLE with polymorphisms of Th17-encoding molecules (eg, IL-21) or their receptors (eg, IL-21R) has been reported [23, 27]. In addition, genetic variants of transcription factors (eg, ETS1) that negatively regulate Th17 differentiation can predispose to SLE [12]. Blocking of the IL-21 pathway ameliorates the autoimmune symptoms in a mouse model of SLE [8].

Recently accumulated evidence has indicated that IL-22 also plays an important role in the pathogenesis of many autoimmune diseases. IL-22 is a major cytokine in several autoimmune diseases, such as psoriasis, rheumatoid arthritis (RA), hepatitis, graft versus host disease (GVHD) and allergic diseases, implicating that target IL-22 may have a therapeutic potential in those autoimmune diseases [30].

Based on the level of cytokines such as IL-17A and IFN- γ , we demonstrate that the phenotype IL-17+, IFN- γ + T cell is major in our study. Studies showed that subset Th17 cells with mixed phenotypes are observed in the peripheral blood and inflamed tissues. These findings imply that Th17 cells are unstable, and, depending on the type of inflammation and cytokine environment, Th17 cells can acquire a phenotype of other T-cell subsets, such as IL-17+, IFN- γ + T cells and IL17+, IL-4+, IFN- γ - T cells. Based on more recent data obtained in IL-17A fate-reporter mice, [9, 28] Th17 cells appear to be stable under acute inflammation, whereas under chronic inflammation, these cells are vulnerable to obtain a mixed phenotype.

We propose that therapeutic targets can be directed to these phenotypes to fight autoimmune diseases.

Our study showed that supernatant from PBMC level of IL-23 was significantly different between the two groups. High levels of IL-23 are associated with increasing IL-17 secretion from T cells. Vaknin-Dembinsky et al. obtained the similar results those monocyte-derived dendritic cells in autoimmune diseases patients produce greater amounts of IL-23 compared with healthy controls [2, 26]. In addition, it has reported that IL-23 and IL-17 cytokine are crucial in the pathogenesis of the autoimmune disease. Indeed, mice deficient in IL-23p19 or IL-12p40 are resistant to EAE as well as collagen-induced arthritis (CIA), another AID. These data also demonstrated that Th17 cells can therefore be described as pro-inflammatory cells, involved in many autoimmune diseases [13, 21].

Conclusion

We have shown that patients with autoimmune diseases from Bobo Dioulasso, Burkina Faso have pro-inflammatory cytokines produced by TH17 cells such as (IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 and IFN- γ) are abundantly secreted in supernatants from PBMC. While anti-inflammatory cytokines in the regulatory T-cell pathway (IL-2, IL-10 and TGF- β) are poorly secreted during autoimmune processes. We also found in the study a high prevalence of the phenotype of the following TH17 (IL-17 +, IFN- γ + T cells). We propose that the therapeutic targets be directed to the phenotypes to fight AID.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SY SG SS TY FF. Performed the experiments: SY TY SS SG FF. Analyzed the data: SY TY FF. Contributed reagents/materials/analysis tools: SY TY FF. BW Wrote the paper: SY FF TY SG.

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

Abbreviations:

AID: Autoimmune Disease; ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay; HT: Hashimoto Thyroiditis, MS: Multiple Sclerosis, RA: Rheumatoid Arthritis, SSG: Gougerot-Sjögren' syndrome, SLE: Systemic lupus erythematosus; TGF- β : Transforming Growth Factor-beta, TNF- α : Tumor Necrosis Factor.

References

1. **ANTONY PA, PAULOS CM, AHMADZADEH M, AKPINARLI A, PALMER DC, SATO N, KAISER AHEINRICH S, KLEBANOFF CA, TAGAYA Y, AND RESTIFO NP.** Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J. Immunol*, 2006, 176: 5255–5266.
2. **BABALOO Z, YEGANEH RK, FARHOODI M, BARADARAN B, BONYADI M, AGHEBATI L.** Increased IL-17A but decreased IL-27 serum levels in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol*, 2013; 10(1):47-54.
3. **CALABRESI PA, TRANQUILL LR, MCFARLAND HF, COWAN EP.** Cytokine gene expression in cells derived from CSF of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, 1998; 89(1-2):198-205.
4. **CARRIERI PB, PROVITERA V, DE ROSA T, TARTAGLIA G, GORGA F, PERRELLA O.** Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1998; 20(3):373-82.
5. **CUCCI A, BARBERO P, CLERICO M, FERRERO B, VERSINO E, CONTESSA G, et al.** Pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA blood level in multiple sclerosis is related to treatment response and interferon-beta dose. *J Neuroimmunol*, 2010; 226(1-2):150-7.
6. **DOREAU A, BELOT A, BASTID J, RICHE B, TRESCOL-BIEMONT MC, RANCHIN B, FABIEN N, COCHAT P, POUTEIL-NOBLE C, TROLLET P, DURIEU I, TEBIB J, KASSAI B, ANSIEAU S, PUISIEUX A, ELIAOU JF, BONNEFOY-BERARD N.** Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*, 2009, 10:778–785.
7. **FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, GAVIN MA, AND RUDENSKY AY.** A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol*, 2005, 6: 1142–1151.
8. **HERBER D, BROWN TP, LIANG S, YOUNG DA, COLLINS M, DUNUSI-JOANNOPOULOS K.** IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R. Fc reduces disease progression, *J Immunol*, 2007, 178:3822–3830.
9. **HIROTA K, DUARTE JH, VELDHOFEN M, HORNSBY E, LI Y, CUA DJ, AHLFORS H, WILHELM C, TOLAINI M, MENZEL U, GAREFALAKI A, POTOCNIK AJ, STOCKINGER B.** Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*, 2011, 12:255–263.
10. **HSU HC, YANG P, WANG J, WU Q, MYERS R, CHEN J, YI J, GUENTERT T, TOUSSON A, STANUS AL, LE TV, LORENZ RG, XU H, KOLLS JK, CARTER RH, CHAPLIN DD, WILLIAMS RW, MOUNTZ JD.** Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol*, 2008, 9:166–175.
11. **IWAKURA Y, NAKAE S, SAIJO S, ISHIGAME H.** The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.*, 2008, 226, 57-79.
12. **LENG RX, PAN HF, CHEN GM, FENG CC, FAN YG, YE DQ, LI XP.** The dual nature of Ets-1: focus to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 2011, 10:439–443.

- 13. LOVETT-RACKE AE, YANG Y, RACKE MK.** Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *BiochimBiophysActa*, 2011; 1812(2):246-51.
- 14. KALLAUR AP, OLIVEIRA SR, COLADOSIMAO AN, DELICATO DE ALMEIDA ER, KAMINAMI MORIMOTO H, LOPES J, et al.** Cytokine profile in relapsingremitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol Med Rep*, 2013; 7(3):1010-20.
- 15. KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROOV K.** IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27, 485-517.
- 16. KWOK SK, CHO ML, PARK MK, OH HJ, PARK JS, HER YM, LEE SY, YOUN J, JU JH, PARK KS, KIM SI, KIM HY, PARK SH.** Interleukin-21 promotes Osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis in humans and mice, *Arthritis Rheum*, 2012, 64:740–751.
- 17. MALEK TR., YU A, VINCEK V, SCIBELLI P, and L. KONG L.** CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rdeficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 2002, 17: 167–178.
- 18. MEYER AL, BENSON J, SONG F, JAVED N, GIENAPP IE, GOVERMAN J and al.** Rapid depletion of peripheral antigen-specific T cells in TCR-transgenic mice after oral administration of myelin basic protein. *J Immunol*, 2001; 166(9):5773-81.
- 19. MURPHY CA, LANGRISH CL, CHEN Y, BLUMENSCHIEIN W, MCCLANAHAN T, KASTELEIN RA, SEDGWICK JD, CUA DJ.** Divergent proandanti-inflammatory roles forIL-23 and IL-12 in joint autoimmuneinflammation. *J. Exp. Med.*2003, 198, 1951-1957.
- 20. RACKE MK, CANNELLA B, ALBERT P, SPORN M, RAINE CS, MCFARLIN DE.** Evidence of endogenous regulatory function of transforming growth factor-beta 1 in experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol*, 1992; 4(5):615-20.
- 21. ROMAGNANI S.** Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*, 2006; 36(11):1357-66.
- 22. SAKURABA A, SATO T, KAMADA N, KITAZUME M, SUGITA A, HIBI T.** Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2009, 137, 1736-1745.
- 23. SAWALHA AH, KAUFMAN KM, KELLY JA, ADLER AJ, ABERLE T, KILPATRICK J, WAKELAND EK, LI QZ, WANDSTRAT AE, KARP DR, JAMES JA, MERRILL JT, LIPSKY P, HARLEY JB.** Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67:458–461.
- 24. SONG GUO Z, JUHUA W, PU W, J. DIXON G, and HORWITZ D.A.** IL-2 Is Essential for TGF-βto Convert Naive CD4 CD25Cells to CD25Foxp3Regulatory T Cells and forExpansion of These Cells. *J Immunol*, 2007; 178:2018-2027.
- 25. STOCKINGER B., VELDHONEN M.** Differentiation and function of TH17 cells. *Curr. Opin.Immunol.*, 2007, 19, 281-286.
- 26. VAKNIN-DEMBINSKY A, BALASHOV K, WEINER HL.** IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol*, 2006; 176(12):7768-74.

- 27. WEBB R, MERRILL JT, KELLY JA, SESTAK A, KAUFMAN KM, LANGEFELD CD, ZIEGLER J, KIMBERLY RP, EDBERG JC, RAMSEY-GOLDMAN R, PETRI M, REVEILLE JD, ALARCON GS, VILA LM, ALARCON-RIQUELME ME, JAMES JA, GILKESON GS, JACOB CO, MOSER KL, GAFFNEY PM, VYSE TJ, NATH SK, LIPSKY P, HARLEY JB, SAWALHA AH.** A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009, 60:2402–2407.
- 28. WEI G, WEI L, ZHU J, ZANG C, HU-LI J, YAO Z, CUI K, KANNO Y, ROH TY, WATFORD WT, SCHONES DE, PENG W, SUN HW, PAUL WE, O'SHEA JJ, ZHAO K.** Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4 T cells. *Immunity*, 2009, 30:155–167.
- 29. YANG J, CHU Y, YANG X, GAO D, ZHU L, WAN L, LI M.** Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009, 60:1472–1483.
- 30. YANG X and ZHENG SG.** Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.*, 2014 Jun; 13(6):615-20.