



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de biologie moléculaire et immunologie

MEMOIRE

Présenté par

Bndjefel nour el houda

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Intitule :

Conception des amorces encadrant le gène AIRE associé à l'auto immunité

Sous la direction de Mm . BRAHAMI Nabila

Soutenu le 21-09-2020, devant le jury composé de :

Dr. NOUARI W
Dr. BRAHAMI N
Dr. MILIANI M

Université de Tlemcen
Université de Tlemcen
Université de Tlemcen

Présidente du jury
Encadreur
Examineur

Résumé

Résumé

Introduction : Le régulateur auto immune AIRE est un régulateur important de l'auto immunité favorisant la tolérance centrale en contrôlant la sélection des thymocytes T par l'expression ectopique des antigènes des tissus périphériques dans les cellules épithéliales médullaire thymique . les mutations de la protéine AIRE sont le facteur causal de développement de maladie humaine auto immune . le polyendocrinien auto-immun de type 1 également connus sous le nom polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique (APECED) est une maladie autosomique récessive rare caractérisée par trois symptômes hyperparathyroïdie, insuffisance corticosurrénale auto-immune et mucocutanée chronique CMC bien que d'autre auto-immunité. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est fondamentale pour la biologie moléculaire et la technique moléculaire la plus importante pour le laboratoire de recherche grâce a leur sensibilité et spécificité , . La conception de l'amorce est une étape essentiel dans tous les types de méthodes de PCR..

Objectif : nous allons concevoir avec spécificité le couple d'amorce de gène AIRE

But : le couple d'amorces connues au cours ce travail serviras à étudier l'association de gène AIRE avec auto immunité .

Matériels et méthodes : recherche de la séquence de gène AIRE dans la base de donné ensembl puis utilisé l'outil primer blast pour concevoir les paires d'amorces .

Résultats : outil primer blast donne 10 paires d'amorces , permis ces amorces en choisi un couple d'amorces de 20 nucléotides de longueur qui donne un produit de 666 paires de bases .

Mot clé : le gène AIRE , tolérance immunitaire , mTEC , polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique (APECED)

Abstract

Abstract

Background :. The autoimmune regulator AIRE is an important regulator of autoimmunity promoting central tolerance in the thymus by controlling the selection of the T cell through the ectopic expression of peripheral tissue antigens (PTAs) in medullary thymic epithelial cells (mTECs) . Mutations in AIRE protein are the causative factor in development of the human disease autoimmune. Polyendocrinopathy type 1 (APS1) also named autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) is a rare autosomal recessive disease characterized by a triad of symptoms including hypoparathyroidism, autoimmune adrenal insufficiency and chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) although other autoimmunity. The polymerase chain reaction (PCR) is fundamental for molecular biology and the most important molecular technique for the research laboratory through to their sensitivity and specificity .The design of the primer is an essential step in all types of PCR .

Objective: we will design with specificity the pair of AIRE gene primer

Purpose : the pair of primers known during this work will be used to study the association of the AIRE gene with autoimmunity.

Materials and methods :search for the AIRE gene sequence in the database ensemble then used the primer blast tool to design the primer pairs

Results : primer blast tool yields 10 primer pairs, allowing these primers to pick a primer pair 20 nucleotides in length which gives a product of 666 base pairs.

Keywords: Aire gene ,immune tolerance ,mTEC, autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED)

Résumé en arabe

ملخص

مقدمة : منظم المناعة الذاتية AIRE هو منظم مهم للمناعة الذاتية يعزز التسامح المركزي من خلال التحكم في اختيار الخلايا التائية عن طريق التعبير خارج الرحم عن مستضدات الأنسجة المحيطة في الخلايا الظهارية النخاعية الصغرية، الطفرات في بروتين AIRE هي العامل المسبب في تطور أمراض المناعة الذاتية البشرية النوع الأول من الغدد الصماء المناعي الذاتي المعروف أيضًا باسم اعتلال الغدد الصماء المناعي الذاتي - داء المبيضات - حثل الأديم الظاهر (APECED) هو مرض وراثي جسدي متنحي نادر يتميز بثلاثة أعراض فرط نشاط جارات الدرقية ، قصور قشر الكظر المناعي الذاتي و CMC الجلدي المخاطي المزمن على الرغم من المناعة الذاتية الأخرى، تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) أساسي للبيولوجيا الجزيئية وأهم تقنية جزيئية لمختبر الأبحاث بفضل حساسيتها وخصوصياتها يعد تصميم البرايمر خطوة أساسية في جميع أنواع طرق PCR.

الهدف: سوف نصمم بخصوصية زوج من الجينات AIRE التمهيدي

الغرض: زوج من البادئات المعروفين خلال هذا العمل سيتم استخدامهم لدراسة ارتباط جين AIRE بالمناعة الذاتية

المواد والأساليب: ابحث عن تسلسل الجينات AIRE في قاعدة البيانات معًا ، ثم استخدم أداة الانفجار التمهيدي لتصميم أزواج التمهيدي

النتيجة: يعطي primer blast 10 أزواج من البادئات ، وتسمح لهذه البادئات باختيار زوج من البادئات 20 نيوكليوتيدات في الطول مما يعطي منتجًا من 666 زوجًا أساسيًا .

الكلمة الرئيسية: جين AIRE، التحمل المناعي ، APECED، mTEC .

Avant –propos

Avant -propos

Je remercie en premier lieu notre Dieu « ALLAH » Le tout puissant qui nous a dotés de la merveilleuse faculté de raisonnement, de m'avoir donnée le courage et la volonté de mener à terme le présent travail.

J'adresse mes sincères remerciement à tous les professeurs pour la qualité de l'enseignement qu'ils m'ont prodigué au cours mes années universitaires .

Je voudrais également remercie mes très chers parent qui ont été toujours la pour moi et mes frères pour leur encouragement

A tous ces intervenants je présente mes remerciement à mes collègue de promotion de immunologie et mes amis .

Table des matières

Table des matières

Abstract

Liste des figures..... v

Liste des tableaux..... v

Liste des abréviations v

Introduction 1

Chapitre 1 :Revue de la littérature

1. Le gène AIRE.....	4
1.1. définition.....	4
1.2. Localisation.....	4
1.3. Protéine AIRE	4
1.4. les partenaires d' AIRE	5
1.5. Distribution tissulaires et cellulaires d'AIRE.....	7
1.5.1. Les cellules épithéliales thymiques	8
1.5.2. Ontogénie et maturation de TEC	8
1.5.3. Les voies contrôlant la différenciation de mTEC.....	9
1.5.4. Phénotype et différenciation de mTEC.....	9
1.5.5. Post AIRE	11
1.5.6.Utilisation de TEC comme thérapie	12
1.6. Fonction de AIRE.....	12
1.6.1.Fonction thymique	12
1.6.1.1Tolérance centrale	12
1.6.1.1.1.L'expression de gène PGE.....	12
1.6.1.1.2.Activation et le transfert de PGE	13
1.6.1.1.3. Expression de PGF dépend de AIRE.....	13
1.6.1.1.3.1.la régulation épigénétique de PGF.....	13
1.6.1.1.3.1.1.méthylation d'ADN	13
1.6.1.1.3.1.2.modification des histones.....	14
1.6.1.1.3.1.3.la régulation post transcription de PGF.....	14
1.6.1.1.4.L'expression de TSA indépendant de AIRE.....	14
1.6.1.1.5.Sélection négatif.....	15
1.6.1.2.Génération de Treg.....	15

Table des matières

1.6.2.Fonction extra thymiques	17
1.7.La régulation de facteur AIRE	17
1.8.Les mutations de gène AIRE	17
1.8.1.Domaine HSR/CARD.....	18
1.8.2.Domaine SAND	18
1.8.3.Domaine PHD	18
1.8.4.Domaines NLS.....	19
2. les maladies auto immunes APECED.....	20
2.1.Rhumatoïde arthrites.....	21
2.2 .CMC	21
2.3.La maladie d'Addison AAD.....	22
2.4.Alopécie areata.....	22
2.5.Diabète.....	22
2.6.Thérapie des patients atteints APS.....	22
3.AIRE et le cancer.....	23
4. la réaction en chaine de polymérase PCR	24
4.1.Définition et les étapes de PCR	24
4.2.les avantages et limites de PCR.....	25
5.Choix d'amorces	25
5.1.Définition.....	25
5.2.Outil	26
Chapitre 2 :Matériel et méthode	29
1.Conception des amorces.....	29
2.sélection des amorces.....	29
2.1.la spécificité	29
2.2.la longueur	29
2.3.Température de fusion	29
2.4.la teneur de GC	30
2.5. la séquence de l'extrémité 3'.....	30
3.Recherche de la séquence de gène AIRE	30
4.L'outil primer blast	32
5. Analyse de résultats	33
Chapitre 3 : Résultat	34
1.Analyse de résultat de primer blast.....	34
2.confirimation de résultats.....	35
Chapitre 4 : Discussion	36

Table des matières

Chapitre 5 :Conclusion	38
Chapitre 6 : Référence bibliographiques	39

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau1 -1: Le rôle de Fezf2 et Aire dans la différenciation mTEC	15
Tableau1-2 : mutation dans les domaines AIRE	19
Tableau2-1 : Différents outils disponibles pour la conception des l'amorces	26
Tableau5-1 : l'étude de différentes amorces de gènes AIRE par le technique de PCR	36

Liste des tableaux

Liste des figures

Figure1.1 : la localisation de gène aire	4
Figure1.2 : la structure de gène aire	5
Figure1.3 : la formation de complexe multimoléculaire qui impliqué dans le mécanisme d'initiation et post initiation de la transcription des gènes	7
Figure1.4 : ontogénie de TEC	9
Figure1.5 : la différenciation de mTEC	11
Figure 1.6 : le rôle de gène AIRE dans l'établissement de tolérance immunitaire	16
Figure 2.1 : le rôle de l'AIRE dans auto immunité et l'immunité anti tumoral	23
Figure 3.1 : Plateforme de la base de données ensembl	31
Figure 3.2 : La séquence du gène AIRE sur la plateforme ensembl	31
Figure 3.3: la sélection de séquence d'intérêt de gène AIRE copié dans le Word	32
Figure 3.4: plateforme de la base de données NCBI	32
Figure 3.5: L'outil primer blast	33
Figure 4.1: Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire d'amorces choisis	34
Figure 4.2 : confirmation des résultats	35

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AIRE	Régulateur auto-immune
APECD	polyendocrinopathie auto immune ,candidose dystrophie ectodermiques
cTEC	Les cellules épithéliales thymiques corticales
eTEC	Population des cellules extra thymique
mTECs	Les cellules épithéliales thymiques médullaires
pGE	expression génique promiscuité
PCR	Réaction en chaine par polymérase
TRA	Auto antigène à restriction tissulaire

Introduction

Introduction

Le syndrome polyendocrinien auto-immun de type 1 (APS-1, OMIM 240300), également connu sous le nom de polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique (APECED) (Zhu et *al.*, 2017). Est une maladie monogénique autosomique récessive rare causée par une mutation du gène régulateur auto-immun (AIRE) (Humbert et *al.*, 2018) caractérisées par la présence de deux ou trois principaux critères candidose muco-cutanée chronique, insuffisance corticosurrénale auto-immune (maladie d'Addison) et hyperparathyroïdie (Zhu et *al.*, 2017). La CMC peut être compliquée par une candidose systémique ou un carcinome épidermoïde oral (SCC), et peut entraîner la mort (Humbert et *al.*, 2018) Cependant, les patients atteints d'APS-1 peuvent aussi présenter des maladies auto-immunes supplémentaires, y compris le diabète de type 1 (DT1), le vitiligo, l'alopecie, l'hépatite auto-immune et l'anémie pernicieuse. La gamme de ces troubles auto-immunes secondaires est large et variable (Mora et *al.*, 2014a). APECED est très répandue dans certaines populations géographiquement isolées, comme les Finlandais, les Sardes et les Juifs iraniens, mais elle est rare dans la population chinoise. (Zhu et *al.*, 2017).

Le gène AIRE est localisé dans le chromosome 21q22.3 et se compose de 14 exons et code pour une protéine de 58 kDa impliquée dans la transcription nucléaire (Herzig et *al.*, 2017a) et joue un rôle important dans le maintien de la tolérance centrale (Guo et *al.*, 2018a), par l'expression ectopique des auto-antigènes dans le thymus (Humbert et *al.*, 2018). Le gène AIRE est codé pour une protéine composée de 545 acides aminés et contient des motifs indicatifs de sa fonction de facteur de transcription (Mora et *al.*, 2014a), y compris qu'un domaine de région de coloration homogène (HSR), un signal de localisation nucléaire bipartite conservé (NLS), un domaine CARD (domaine de recrutement en caspase), SAND (SP100, AIRE1, NucP41 / P75 et DEAF1), PHD1 (domaine homéo végétal 1) et PHD2 (Anderson and Su, 2016a). L'expression de l'AIRE a été détectée dans les tissus et les cellules de différents niveaux chez l'homme et la souris. Il est exprimé principalement dans le thymus (Zhao et *al.*, 2018a), plus précis dans les cellules épithéliales thymiques médullaires mTEC, mais est également exprimé à des faibles niveaux dans la rate, les ganglions lymphatiques, le pancréas, le cortex surrénal et les cellules mononucléaires du sang périphérique. (Guo et *al.*, 2018a)

Les cTEC et mTEC partagent le même progéniteur bipotent commun mais ces deux cellules se spécialisent dans des types de cellules fonctionnellement distincts tandis que le cTEC entraîne l'engagement de la lignée de cellules T et la sélection positive et le mTEC implique dans la délétion des thymocytes auto-réactifs ou favorise leur déviation clonale en

Introduction

cellule T régulatrice.(Rodrigues et *al.*, 2018). Le mTEC subit des différents stades de maturation leur différenciation et développement régulée par différentes facteurs notamment Les signaux extrinsèques tels que RANK, CD40L et lymphotoxine-bêta qui favorisent la différenciation des mTEC en cellules matures avec une augmentation de l'expression du MHC, CD80 et de l'AIRE (O'Sullivan et *al.*, 2018).AIRE est un régulateur clé de l'expression du TSA dans les mTEC et affecte la transcription de milliers de gènes TSA mais l'expression de TSA dans les m TEC peuvent se fait de manière indépendante de l'AIRE. (Anderson and Su, 2016a) et ont des autres rôles notes l'expression des molécules impliquées dans les processus d'interaction cellulaires et certaines molécules d'adhésions l'induction de l'apoptose dans les mTEC et la sécrétion des chimiokines (Passos et *al.*, 2018a).

L'amplification de l'ADN par réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique largement utilisée pour le diagnostic et la caractérisation virale en raison de sa sensibilité et de sa spécificité (Dopazo et *al.*, 1993). la PCR est une technique révolutionnaire développée par Kary Mullis dans les années 1980 , est basée sur l'utilisation de la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser un nouveau brin d'ADN complémentaire du brin matrice proposé . La stabilité des hybrides d'amorce d'ADN ou d'amorce d'ARN est essentielle pour une amplification efficace des régions génomiques souhaitées. Plusieurs programmes pour identifier les amorces optimales ont été décrits (Dopazo et *al.*, 1993) . les amorces utilisées dans ce procédure ont des caractéristiques bien déterminées pour assurer une sélection optimale et une bonne PCR .

Notre travail est basé sur la conception des amorces pour le gène AIRE qui est associées à des maladies auto immunes mono génique provoqué par une mutation dans ce gène .

Chapitre 1 : Revue de la littérature

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1. Le gène AIRE

1.1. Définition

AIRE (régulateur auto immune) est un facteur de transcription nucléaire (Tanaka and Sakaguchi, 2015). Le plus souvent exprimé dans les cellules au cours des premières stades de l'embryogénèse mais avec le temps son expression est limitée aux quelques cellules qui participent à la tolérance immunitaire (Berrih-Aknin et al., 2018). Souvent exprimé dans les cellules épithéliales thymiques mTEC (Zhao et al., 2018b). Et joue un rôle crucial dans la stimulation d'expression de la promiscuité de nombreux gènes codant pour les antigènes spécifiques de tissu (Herzig et al., 2017b). AIRE a été découverte pour la première fois dans les années 1997 comme un gène susceptible d'induire des maladies auto immunes APECED (polyendocrinopathie –auto immune, candidose dystrophie ectodermique) en cas d'une mutation dans leur gène (Radhakrishnan et al., 2016). AIRE est capable de réguler l'expression de 3980 gènes et ont un rôle bien déterminé d'induire une tolérance centrale et périphériques, et aussi dans la génération de lymphocytes régulateurs Treg (Lopes et al., 2015).

1.2. Localisation

Le gène aire est localisé dans la région 22q3 du chromosome 21 humains (Perniola, 2018). Et situé sur la position 39.72cM du chromosome 10 chez les souris (Passos et al., 2018b). Il comprend quatorze exons couvrant environ 13Kb d'ADN génomique (Mora et al., 2014a). Le dernier exon (exon 14) contient un codon stop dans la position 1756 suit par des séquences répétées (Finnish-German APECED Consortium, 1997)

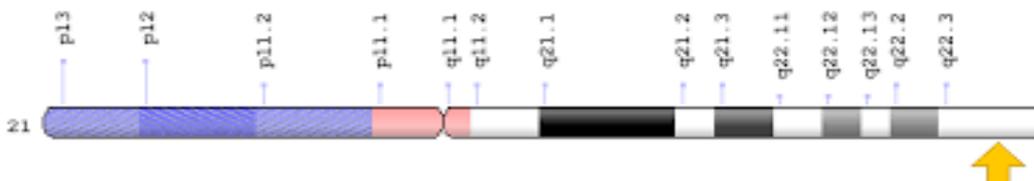


Figure 1.1 : la localisation du gène AIRE dans chromosome 21 humain

1.3. Protéine AIRE

Le gène AIRE codé pour une protéine multi domaine (Passos et al., 2018a) située dans le noyau et ont une forte capacité d'attachement aux chromatines et régule le

Chapitre 1 : Revue de la littérature

processus de transcription des gènes (Maslovskaja et al., 2015). AIRE est codé pour une protéine de 545 AA et de poids moléculaires de 58Ka (Berrih-Aknin et al., 2018). qui contient dans l'extrémité N-terminal un domaine HSR/CARD (homogenously staining region /domaine de recrutement de caspases) qui participe à l'oligomérisation soit sous forme dimère ou tétramère pour se lier et attacher à des séquences oligonucléotides spécifiques (Lopes et al., 2015). Elle influence également de nombreux processus cellulaires, notamment le contrôle de la croissance, l'apoptose cellulaire et la sénescence (Zhu et al., 2017). un domaine NLS (nuclear localisation signal) intervient dans la migration de cytoplasme vers le noyau, un domaine SAND (SP100, AIRE1, NucP41/P75 et DEAF1) 180-280aa est un domaine de la liaison à l'ADN et responsable de l'interaction protéine-protéine. (Chan and Anderson, 2015). Les domaines CARD NLS et SAND contiennent des résidus de lysine qui sont des sites d'acétylations (Perniola, 2018). C-terminal de protéine aire terminent par deux doigts de zinc PHD 1 (229-340aa) et PHD 2 (434-475aa) souvent séparé par une région riche en proline. Le domaine PHD1 possède un ligase ubiquitaire et lie aux histone H3 non méthyle à la lysine 4 (H3K4MO) et termine par 4 motifs de liaison au récepteur nucléaire LXXLL (ou L est un leucine, et X est n'importe quel acide aminé). (Perniola, 2018).

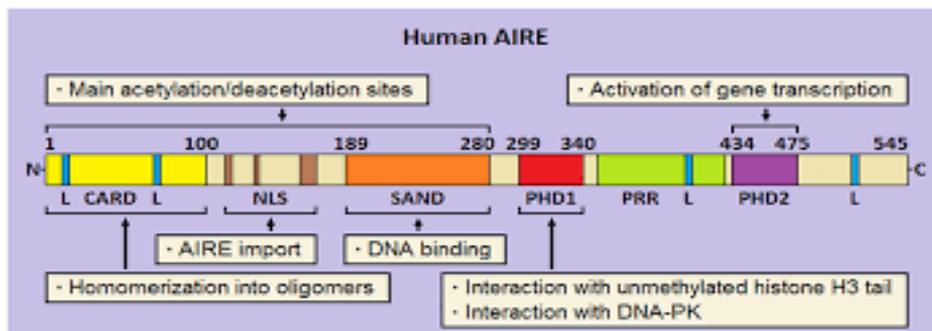


Figure 1. 2 : structure de gène AIRE

4 . les partenaires d' AIRE

CBP(protéine de liaison aux CREB) est un Co- activateur de plusieurs facteurs de transcription, la première partenaire d'AIRE a été identifiée (Perniola, 2018). Est une ubiquitaire protéine acétyl transférase qui est active l'expression de gènes par la modification des protéines nucléaires comme l'histone et régulateur transcriptionnel, et interagit avec l'AIRE via ses domaines CH1, CH3, il assure

Chapitre 1 : Revue de la littérature

l'acétylation des résidus lysine de AIRE (Perniola, 2018). y compris H2A-K5, H2B-K15, H2B-K15, H3-K14, H3-K18, H4-K5 et H4-K8 (Abramson and Goldfarb, 2016). CBP interagit avec AIRE et joue un rôle important dans l'activation transcriptionnelle. grâce à ces fonctions CBP est concéder comme un médiateur clé de l'expression des gènes dépendant de L'AIRE (Abramson and Goldfarb, 2016). Une récente étude montre une association de AIRE avec des protéines déacétylases, mTEC mature AIRE⁺ expriment des niveaux élevés de protéines déacétylase Sirtuin -1 (Sirt1) (Abramson and Goldfarb, 2016). Sirt -1 interagit avec AIRE et régule l'expression des gènes promiscuités de manière spécifique (Abramson and Goldfarb, 2016). Sirt -1 responsable de déacyltatation des résidus lysines de AIRE situés entre les domaines NLS et SAND. (Abramson and Goldfarb, 2016). CRP et SIRT ont des effets opposés, mais l'acétylation et déacétylation liées à AIRE ont un rôle essentiel dans l'induction d'expression des gènes promiscuités conduit par AIRE (Abramson and Goldfarb, 2016).

L'ADN – PKcs est l'une des protéines interagissant avec AIRE qui associes avec tous les partenaires de AIRE impliqués dans la transcription (Ku80, PARP-1, BRD4, CDK9, TOP2A, DSIF, RNA-PolII) (Bansal et al., 2017). L'ADN –PKcs phosphoryle AIRE dans les résidus tyrosine 68 et serine 156 (Perniola, 2018). Il est active par des cassures doubles brin de l'ADN par la suite leur l'activation permet de recruter de nombreux protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN par leur la phosphorylation (Abramson and Goldfarb, 2016).

ADN topo-isomérase sont des enzymes qui opèrent sur la topologie de l'ADN (Perniola, 2018). topo-isomérase Top2A est l'un des premiers partenaires de AIRE (Bansal et al., 2017). est un enzyme qui activé en réponse à des dommages d'ADN double brins et ont un rôle important dans la réparation des mésappariements d'ADN (Abramson and Goldfarb, 2016). Via l'activation de ADN –pk (Bansal et al., 2017) et la poly ADN – ribose polymérase 1 PARP1. les ruptures causes par top2 sont des médiateurs essentiels pour l'expression des gènes dépendants de l'AIRE (Abramson and Goldfarb, 2016).

AIRE induit l'expression des gènes par la libération du RNAP-II en équilibre (Abramson and Goldfarb, 2016). il recrute P-TEFb aux sites de début de transcription des gènes cibles (Perniola, 2018). Aire interagit avec les deux sous unités de P-TEFb la kinase dépendante de la cycline 9 (CDK9) et la cycline T (CycT) (Abramson and Goldfarb, 2016). BRD4 est le principal recruteur du complexe pTEFb pour interrompre la machinerie RNAP-II en se liant aux histones acétylées H3 / H4 il

Chapitre 1 : Revue de la littérature

a été suggéré qu'AIRE recrute BRD4 directement, via son domaine CARD acétylé (Abramson and Goldfarb, 2016) . La protéine kinase 2 interagissant avec l'homéodomaine (HIPK2) est une sérine / thréonine-protéine kinase impliquée dans plusieurs processus cellulaires, y compris la régulation transcriptionnelle, l'apoptose cellulaire médiée par p53 / TP53 et la régulation du cycle cellulaire (Abramson and Goldfarb, 2016) .localisée dans les NB, phosphoryle AIRE (et CBP) (Perniola, 2018). d'autres partenaires interagissent avec AIRE comme la protéine 6 associée à la mort (DAXX), la cohésine, AIRE peut aussi réguler l'expression des gènes également via le traitement pré-ARNm (Abramson and Goldfarb, 2016).

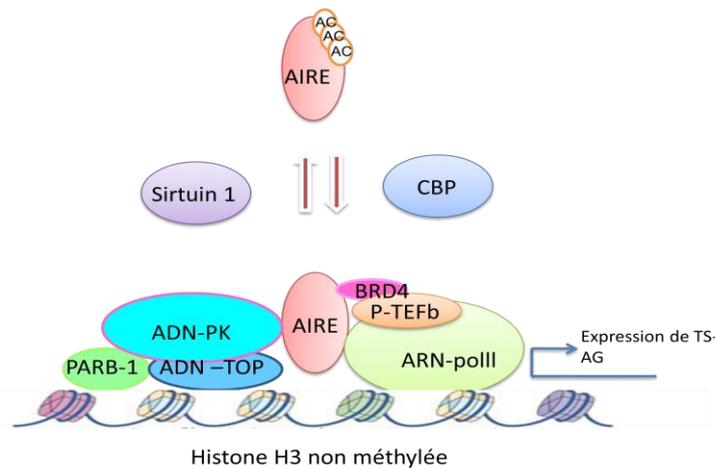


Figure 1.3 : formation d'un complexe multimoléculaire qui impliqué dans le mécanisme d'initiation et post initiation de la transcription des gènes

1.5 . Distribution tissulaires et cellulaires d'AIRE

AIRE est un facteur de transcription non conventionnel (St-Pierre et *al.*, 2015). exprimé le plus souvent dans les cellules épithéliales médullaires et d'autres organes tel que le pancréas , les organes lymphoïdes secondaires (la rate , les ganglions lymphatiques) et les organes reproducteurs (ovaires et testicules) (Perniola, 2018).L'expression de protéine AIRE a été détecté sauf que dans le thymus le plus spécifiquement dans les cellules épithéliales thymiques médullaires mTEC et l'expression de l'ARNm a été détecté au sein des nodules lymphatiques ,thymus ,la rate et le foie fœtal .10 -20% de cellules qui expriment l'AIRE dans les ganglions lymphatiques expriment aussi CD83et CD45⁺ sont des cellules dendritiques qui contient un ARNm codé pour une enzyme indolamine 2,3 dioxygénase IDO et IL10, A partir les travaux de Zeng et al la majorité des cellules qui expriment AIRE dans la rate sont des cellules dendritiques .L'expression d'Aire a été détecté dans les mTEC, les CPA non conventionnels dérivés

Chapitre 1 : Revue de la littérature

de la moelle osseuse (BM) qui présentent une expression élevée du MHC-II dans les organes lymphoïdes secondaires, appelés cellules extra-thymiques exprimant Aire (eTAC)(CMHII^{hi}EpCAM^{hi}CD4^{lo}) (Herzig et al., 2017a). les eTAC ont un rôle importante dans l'établissement tolérance immunitaire par l'empêchement de maturation des lymphocytes T auto réactifs qui ont échappé à la sélection thymique négative,. Les cellules B du thymus expriment aussi l'aire(Matsumoto et al., 2020).

1.5.1. Les cellules épithéliales thymiques

Le micro environnement thymique constituent des différents types des cellules ;les cellules AIRE⁺,AIRE⁻ ,des cellules dendritiques et des thymocytes (Passos et al., 2018a). Les cellules épithéliales thymiques constituent une population hétérogènes des cellules (Morimoto et al., 2018).y compris les TEC corticales et médullaires , et l'une de ces cellules ont des fonctions distincts(Abramson and Anderson, 2017) .Les cellules épithéliales corticales cTEC intervient dans la sélection positive tandis que les mTEC joue un crucial rôle dans la sélection négative et générer les lymphocytes régulatrices Treg sous le contrôle de L'AIRE qui régule l'expression de proximité des gènes PGE(Morimoto et al., 2018) .

1 .5. 2. Ontogénie et maturation de TEC

Le thymus est un organe lymphoïde primaire(Herzig et al., 2017a).qui se divise en deux compartiments fonctionnellement différent sont le cortex et médulla , le cortex aura lieu de sélection positives des thymocytes et le médulla responsables de la sélection négative et établissement de tolérance centrale par expression de PGE dans les mTEC (Kianizad and Zúñiga-Pflücker, 2014).Les TEC sont un progéniteur bipotent communs qui surviennent dans la troisième poche pharyngée (Hamazaki et al., 2016) .puis passent par un stade ou les cellules exprimant des molécules associés au cTEC avant de séparer en lignage de mTEC ou cTEC (Hamazaki, 2015). sous le contrôle de FOXn1 qui est un facteur de transcription essentiel pour le développement et différenciation de TECs et l' expression de ce facteur a été détecté dans mTEC et cTEC (Kianizad and Zúñiga-Pflücker, 2014). FOXn1 contrôle l'expression des gènes codé pour la synthèse de chimiokines CCL25, et cytokines SCF , et une défaut d'expression de FOXn1 cause l'atrophie et absence d'expression des molécules d'adhérences par les cellules TEC(Wang et al., 2020) .Les ctec et mtec provient d'ectoderme et endoderme respectivement ,mais partagent un progeniteur épithéliaux endodermiques communs (Abramson and Anderson, 2017).Les cTEC expriment CD205+,B5t+, IL7 et a partir de 13.5 E les mTEC expriment une forte pourcentage de

Chapitre 1 : Revue de la littérature

claudine 3 et 4 (Takahama et al., 2017). et sub diviser en sous ensemble mTEC^{hi} (CD80^{hi} et CMH^{hi}) et mTEC^{low} (CD80^{low} CMH^{low})(Takahama et al., 2017).

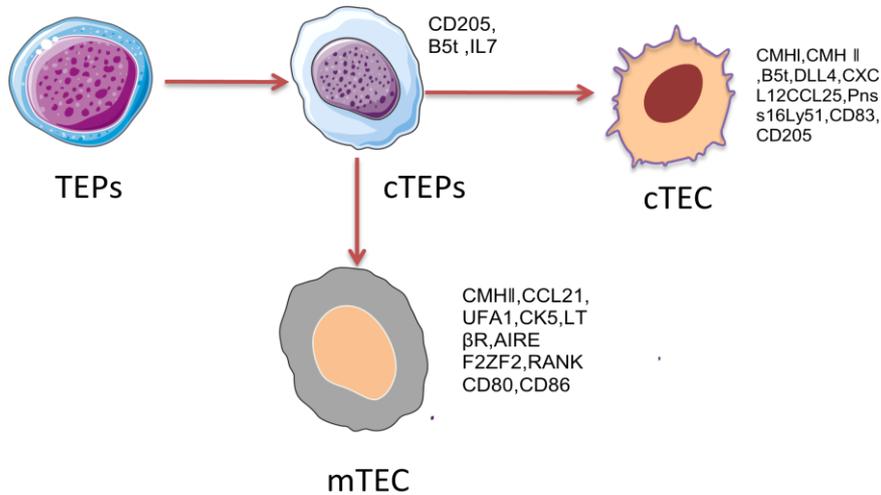


Figure 1.4 : Ontogénie de TEC les mTEC et cTEC partagent un progéniteur bipotent communs TEPs puis passent par un stade communs cTEPs qui capable par la suite de différencier en cTEC et mTEC

1.5.3. Les voies contrôlant la différenciation de mTEC

le développement et différenciation de mTEC régulée par différents facteurs y compris le FOXN1 qui est un facteur de transcription exprimé dans la première stade de développement de TEC et régulé par un nombre de BMP (BMP4) (Abramson and Anderson, 2017). AIRE et d'autres signaux drivées de thymocytes (Wang et al., 2020) . tel que le voie de NF-κβ canonique et non canonique qui sont un rôle essentiel d'expression de AIRE dans mTEC (Herzig et al., 2017c). et par la signalisation fournit par des membres spécifiques du récepteurs de NF-κβ RANK, CD40 et le récepteur de lymphotoxine β (LTβR) (ribiero2019). La maturation de cTEC dépend des signaux fournit par des thymocytes immatures doubles négatives et double positives tandis que la maturation de mTEC repose sur des signaux fournis par les thymocytes matures (Wang et al., 2020). ces signaux contribue non seulement de différenciation et développement de TEC, mais aussi dans le développement de thymus, la signalisation de LTβR a été impliquée dans le maintien de la population cld

Chapitre 1 : Revue de la littérature

3,4+SSEA+mTEP dans le thymus néonatal et dans l'induction de l'expression de RANK et implique aussi dans l'organisation du compartiment médullaire (Ribeiro et al., 2019). tandis que le RANK peut trouver à la fois dans les cellules mTEC^{low} et mTEC^{hi} y compris les cellules AIRE+, est joué un rôle dominant dans le développement de ces population (Ribeiro et al., 2019) . les mTEC se développent de manière dépendante de LT β R et possèdent un rôle important dans la migration des thymocytes positivement sélectionnés vers le médulla (Ribeiro et al., 2019). Une autre voie de signalisation qui est importante pour l'induction d'expression de FOXP1 et le développement de TEC c'est la voie wntless (Abramson and Anderson, 2017). est une glycoprotéine sécrétée et impliquée dans une grande variété de processus biologiques y compris la survie, la prolifération (Wang et al., 2020). Le wnt1 et wnt4 sont les principaux membres impliqués dans le développement de TEC et contrôlent l'expression de FOXP1 via la phosphorylation de AKT, en générale les signaux WNT fonctionnent par des voies dépendantes et indépendantes de β caténine (Wang et al., 2020).

La signalisation de NOTCH indispensable pour la différenciation de divers types de cellules épithéliales, des études récentes ont montré que certains TEC expriment des récepteurs de NOTCH (Abramson and Anderson, 2017).

La voie de mTOR régule le développement de TEC, mTORC1/Recors joue un rôle crucial pour le développement de thymopoïèse tandis que la suppression de mTORC2 /recors dans le TEC provoque l'atrophie thymique (Wang et al., 2020).

La voie de signalisation du kératinocytes KGF dans TEC qui est active par la suite les voies de P53 et NF- κ B et conduit à la transcription de plusieurs gènes indispensables pour le fonctionnement des lymphocytes y compris BMP2, BMP4, il existe aussi des signalisations par des facteurs de transcription tels que STAT3 qui est essentiel pour le maintien de l'architecture thymique et ont un rôle vital dans le développement de mTEC par leur activation via le mTEC, qui peut directement phosphoryler STAT3 à ser 727, la différenciation de mTEC nécessite également l'activation d'histone désacétylase3 (Abramson and Anderson, 2017).

La signalisation de TGF β peut moduler négativement les signaux nécessaires pour le développement de mTEC et inhibe la signalisation non canonique induit par les anti CD40, NF- κ B et aussi par les cyclosporines, la cyclophosphamide et le dexaméthasone qui affectent le développement de TEC (Wang et al., 2020).

1.5.4. Phénotype et différenciation de mTEC

Les cellules épithéliales médullaires thymiques mTEC ont un rôle crucial dans l'établissement de tolérance immunitaire, l'élimination de lymphocytes auto réactifs et la génération de Treg grâce à leur forte capacité d'exprimer des antigènes restreints aux

Chapitre 1 : Revue de la littérature

tissus TRAs(Lopes et *al.*, 2015).mTEC provient d'origine bipotent communs TEPs qui peut différencies en cTEC et mTEC (Takaba and Takayanagi, 2017). Leur développement dépend fortement des signaux fournit par les cellules hématopoïétiques au sein du thymus (Ribeiro et *al.*, 2019) . y compris les signaux extrinsèques tels que RANKL, CD40L et lymphotoxine-bêta qui favorisent la différenciation des mTEC en cellules matures avec une expression accrue du MHC, du CD80 et de l'AIRE (O'Sullivan et *al.*, 2018) .Chez l'embryon les mTEC exprimant une forte portion de molécules d'adhérences cellulaires claudine 3 ,4 et marqueurs de surface SSEA1(stage spécifique embryonic antigen1(Lopes et *al.*, 2015).avec le temps ce progéniteur perd leur capacité d'auto renouvellement .

récemment le compartiment de mTEC a été reclassée en quatre sous population principaux mTEC I – IV ces sous population ont des caractéristiques transcriptionnelles et moléculaires distincts (Wang et *al.*, 2020)

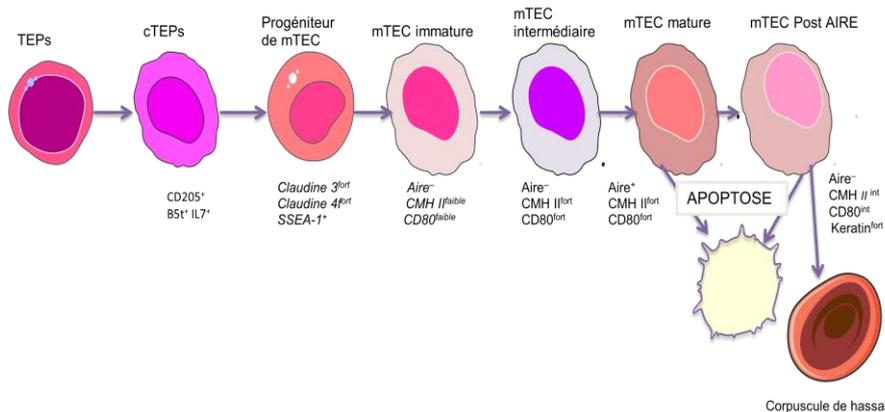


Figure 1.5 : la différenciation des mTEC

le développement de mTEC est contrôlé par le facteur AIRE , absence de ce gène entraine des perturbations du compartiment cellulaire qui se caractérisent par l'accumulation de mTEC mûré et la réduction de corpuscule de hassal (Lopes et *al.*, 2015).

1.5.6. Les cellules Post AIRE

la différenciation de mTEC est continué au-delà du stade AIRE ⁺pour devenir une population mTEC intermédiaires AIRE⁻CMH⁻ sont des cellules mTEC post AIRE qui expriment une forte gamme des antigènes de kiratinocytes (K6 ,10rt involucine) (Wang

Chapitre 1 : Revue de la littérature

et *al.*, 2012). ces cellules sont encore capables d'exprimer des gènes PGE (Wang et *al.*, 2012) .et régule par la signalisation de lymphotoxine β (Chan and Anderson, 2015).les m TEC perd leur noyau et fusionnent pour former des corpus de hassal (Lopes et *al.*, 2015). chez l'homme ces corpuscules ont un rôle dans l'induction de Treg en raison de co localisation dans le thymus (Wang et *al.*, 2012).

1.5.7. Utilisation de TEC comme thérapie

Le Progeniteur de TEC peut utiliser comment thérapie pour améliorer la fonction de thymus par exemple le FOXP1 qui est un régulateur de transcription essentielle pour le développement et le fonctionnement du thymus

La régulation positive de l'expression de FOXP1 induit par TEC présent dans le thymus des souris âgées à conduit à des améliorations de la thymopoïese (Takahama et *al.*, 2017). aussi l'injection de précurseur précoce de TEC embryonnaire qui exprimant une grande quantité de claudine (cellules cld3,4 hi) directement dans le thymus donnent naissance à une médulla fonctionnelle , favoriser la suppression des cellules T auto réactives et ainsi rétablir l'auto tolérance (Kianizad and Zúñiga-Pflücker, 2014).

1.6. Fonction de AIRE

1.6.1. Fonction thymique

1.6.1.1. Tolérance centrale

Aire joue un rôle essentiel dans l'établissement de la tolérance centrale en favorisant l'expression ectopique d'antigènes spécifiques des tissus dans les cellules épithéliales thymiques médullaires (Crossland et *al.*, 2016). éliminés les lymphocytes auto réactives et générer les lymphocytes Treg (Berrih-Aknin et *al.*, 2018).L'expression des antigènes périphériques de tissus dans mTEC se fait de manière dépendant et indépendant AIRE .ces deux facteurs AIRE et FeZF2 responsable d'expression d'environ 15000 gènes au sein de mTEC(Speck-Hernandez et *al.*, 2018). le mTEC est capable d'exprimer lui seul une portion de TRA (Perniola, 2018)

1.6.1.1.1.L'expression de gène PGE

AIRE est un régulateur transcriptionnel qui induit l'expression de la promiscuité de milliers de gènes codant pour des antigènes restreints aux tissus (TRA) dans les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) (Herzig et *al.*, 2017a).En 1989

Chapitre 1 : Revue de la littérature

linsk et al sont les premières qui proposent qu'une large variété de gènes sont exprimés ectopiquement dans le thymus y compris les gènes de rétention aux tissus où ils favorisent la sélection négative et l'induction de tolérance immunitaire (Abramson and Anderson, 2017).

1.6.1.1.2. Activation et le transfert de PGE

L'expression de PGE n'est pas limitée aux mTEC, mais aussi exprimé dans les cellules cTEC sont principalement spécifiques aux lymphocytes (Perniola, 2018). Tandis que son expression a été détecté dans les cellules dendritiques et les macrophages, plus tard Hubert et al, ont constaté que certaines auto-Ag doivent être transférées aux DC thymique pour être présenté aux thymocytes, et son transport assuré par le facteur régulateur AIRE (Perniola, 2018). A été récemment montrée qu' AIRE⁺mTEC libèrent des vésicules d'origine exosome qui porte une grande molécule d'auto-Ags

1.6.1.1.3 .Expression de PGF dépend de AIRE

AIRE est un facteur de transcription classique liée directement au séquence promotrice de gène (Danson-Abeam et al., 2011). et déclenche l'expression ectopique de TRA dans mTEC par des mécanismes générales de transcription et favoriser l'allongement de la transcription (Ucar and Rattay, 2015). La méthylation de l'ADN, la modification des histones et le miARN peuvent influencer le maintien de la PGE dans mTEC (Ucar and Rattay, 2015).

1.6.1.1.3.1.la régulation épigénétique de PGF

AIRE interagit avec les marqueurs épigénétique répressives et recrutes des protéines qui favorisent l'allongement de transcription et le traitement de pré-ARNm. (St-Pierre et al., 2015).

1.6.1.1.3.1.1.méthylation d'ADN

La plupart de CpG sont méthylés dans le génome humaine pour assurer différentes fonctions, mais certains nombre des gènes spécifiques de TEC sont hypométhylés dans mTEC contrairement à d'autres types de cellules thymiques (Ucar and Rattay, 2015). Les régions promotrices de gènes AIRE sont hypométhylés dans mTEC pour assurer l'expression de PGE, mais certains gènes expriment de manière dépendant de AIRE sont hyperméthylés par exemple le gène Fcγ (chaîne gamma de fibrinogène) qui code pour une protéine spécifique de foie (Ucar and Rattay, 2015). Le domaine SAND de AIRE interagit avec le complexe ATFZIP-MBD1 localisée dans la région

Chapitre 1 : Revue de la littérature

CPG méthyle de génome (Takaba and Takayanagi, 2017). ATFZIP-MBD1 montre une association à l'histone méthyle transférase ESET également connue sous le nom de SETDB1 (Anderson and Su, 2016) .

1.6.1.1.3.1.2.modification des histones

Les régions promotrices de gène AIRE enrichie par des marqueurs répressives par exemple H3K27 et un manque des marqueurs activateurs tel que H3k4 (Takaba and Takayanagi, 2017).Le domaine PHD1 de gène AIRE reconnaît l'histone hypométhylé H3k4(H3K4me0) dans les régions promotrices des TRAs (Lopes et *al.*, 2015) .et induit l'expression des gènes après la triméthylation ou acétylation de H3(Takaba and Takayanagi, 2017).

1.6.1.1.3.1.3.la régulation post transcription de PGF

Récente études montrés que aire peut contrôler les mécanismes post transcription des gènes par l'interaction avec miARN (Perniola, 2018) .qui est une petite molécule de 20 à 25 nucléotides (Ucar and Rattay, 2015).les gènes codant pour les miARN peuvent utiliser des promoteurs alternatifs et de nombreux miARN sont situés dans les introns et son expression dans mTEC est indispensable pour l'établissement de la tolérance centrale sous le contrôle de AIRE (Ucar and Rattay, 2015).

1.6.1.1.4.L'expression de TSA indépendant de AIRE

AIRE exprimé plus de 40 % des TRAs ,mais TRA est exprimé de manière indépendante de AIRE qui provoque l'existence d'autre facteur qui contrôle l'expression de TRAs dans mTEC (Ribeiro et *al.*, 2019). Fezf2 a été exprimé dans la population de mTEC avec une forte expression dans les mTEC^{hi} plus que mTEC^{low} ,et n'est exprimé pas dans cTEC (Takaba and Takayanagi, 2017).Fezf2 n'associe pas à des maladies auto immunes en cas des mutations mais dans certains cas il peut associer à des maladies néoplasiques et l'autisme (Berrih-Aknin et *al.*, 2018).Fezf2 est un facteur de transcription conventionnel ,son expression a été détectée pendant l'embryogénèse et augmente jusqu'à la période périnatale dans le thymus (Berrih-Aknin et *al.*, 2018).plus précise dans les mTEC (mTEC^{low} ,mTEC^{hi}) (Ribeiro et *al.*, 2019) .Fezf2 est une protéine de 455 aa contient un domaine répresseur d'homologue 1 dans la région N terminale et six domaines de liaison à l'ADN de doigts de zinc à l'extrémité c terminale (Berrih-Aknin et *al.*, 2018). et liée directement à la séquence spécifique d'ADN et déclenche la transcription mais le mécanisme qui permet l'expression de TRA par le Fezf2 est resté inconnu (Takaba and Takayanagi, 2017) .

Chapitre 1 : Revue de la littérature

	AIRE	Fezf2
L'expression de TRA	Oui	Oui
Liaison à l'ADN	Non	Oui
Développement de mTEC	Oui	Oui
Production de chimiokines	Oui	/
Transfer de TRA	Oui	/
Sélection négative	Oui	Oui
Développement de Treg	Oui	/

Tableaux1.1 : Le rôle de Fezf2 et Aire dans la différenciation mTEC

Sélection négatif

Après la sélection positive qui aura lieu dans le cortex thymique ,les lymphocytesLTCD4⁺et LTCD8⁺positivement sélectionnées exprimant des récepteurs de chimiokines CCR7, ces cellules migrent vers le médulla ,où les mTEC expriment le ligand CCL19 et CCL21, puis ces cellules interagit avec les Ag de soi présenté par les mTEC ou par les cellules dendritiques DC (Takaba and Takayanagi, 2017).qui est exprimé par l'intervention de facteur AIRE (Passos et al., 2018a) .mais certains antigènes a été présenté et transféré aux DC , les cellules qui ont une forte affinité aux molécules CMH-Ag sera éliminé (Takaba and Takayanagi, 2017).

1.6.1.2.Génération de Treg

AIRE en tant que contrôleur transriptionnel et post transriptionnel de TRA dans les mTEC , son mécanisme d'action est influence sur la sélection négative dans le thymus et la génération de Treg (Passos et al., 2018a) .Les mTEC joue un rôle essentiel dans la génération de Foxp3⁺Treg et leur précurseurs(Cowan et al., 2018).Certaines clone de Treg dépend d'expression de l'AIRE pour son génération y compris Foxp3⁺MJ23Treg et RT83tgTreg qui se trouvent infiltrés dans les tumeurs de souris atteintes d'un cancer de prostate (Passos et al., 2018a) . AIRE responsable d'expression des gènes spécifiques pour le développement de Treg par exemple hémaglutinie (Chan and Anderson, 2015).et aussi ont un rôle important dans la génération d'un seul type de Treg dans la période périnatale (Chan and Anderson, 2015).d'autre travaux ont suggère que la différenciation de Treg ne dépend pas de la présence de AIRE mais dépend de la présentation Ag- CMH par les cellules présentatrices de l'antigènes dérivés de la moelle osseuse ,mais comme savez aire n'exprime pas dans ces cellules il a été suggéré que les antigènes de mTEC pourraient être transférés aux cellules dendritiques (Passos et al., 2018a).

Chapitre 1 : Revue de la littérature

AIRE contrôle non seulement l'expression de TSA ,mais contrôle aussi l'expression des molécules d'adhésion impliquant dans l'interaction cellules -cellules (Passos et al., 2018a).la diminution de niveau d'expression de AIRE affecte l'expression de TSA et les molécules d'adhésions comme l'intégrine , claudine et CD80 nécessaire pour l'adhésion de mTEC-thymocytes qui est un processus essentiel pour la sélection négative des thymocytes et établissement de tolérance immunitaire (Passos et al., 2018a). D'autres rôle de AIRE dans l'induction de l'apoptose dans les mTEC^{hi} (Passos et al., 2018a) . cette fonction pro apoptotique peut améliorer l'auto-tolérance et facilite la phagocytose et la représentation de TSA par les cellules présentatrices de l'antigène (Anderson and Su, 2016b).mais cette fonction n'est pas été confirmée. AIRE régule également l'expression de certaines chimiokines qui favorisent la migration de thymocytes dans la médulla(Lopes et al., 2015). aire régule l'expression de CCL17/CCL22 ligands de récepteurs CCR4et CCL19/CCL21ligands de récepteurs CCR7, le CCR7 responsable de migration de thymocytes dans la médulla (Lopes et al., 2015) . Et régule aussi l'expression deXCL1 nécessaire pour la localisation médullaires des cellules dendritiques , la déficience en XCL1contribue à l'accumulation des cellules épithéliales et également affecté le développement de Treg(Anderson and Su, 2016b).

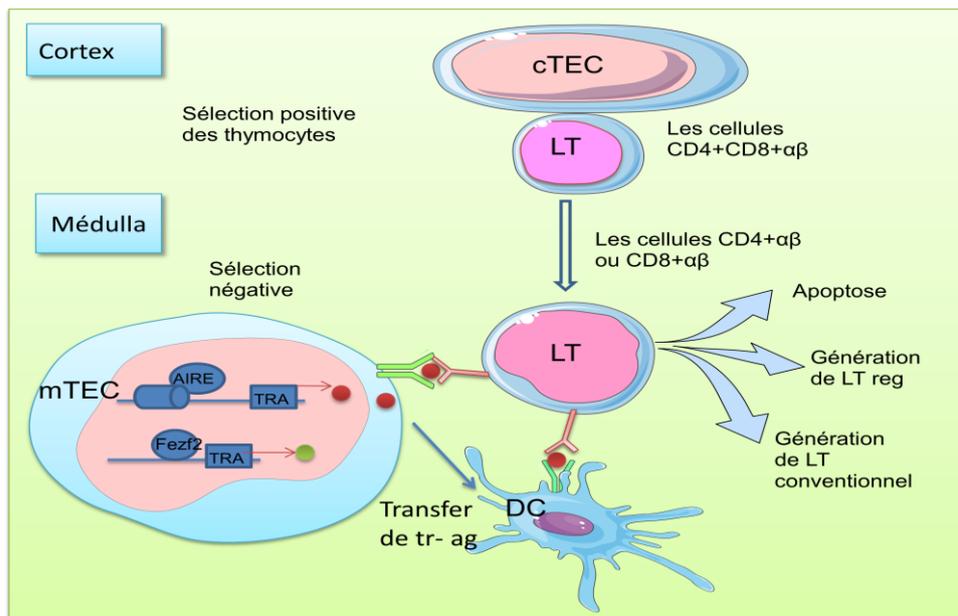


Figure 1.6 : le rôle de gène AIRE dans l'établissement de tolérance immunitaire

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.6.2. Fonction extra thymiques

La présence AIRE a été détecté dans les organes lymphoïdes secondaires (la rate et les ganglions lymphatiques) au sein des eTECs qui jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique (Chan and Anderson, 2015).par l'expression des auto antigène extra thymique sous le contrôle de facteur AIRE(Zhao et al., 2018b). récemment a été montré que l'AIRE régule l'expression de 163 gènes dans eTEC par exemple l'expression des antigènes de l'insuline dans le pancréas .Les eTAC et les cellules stromales y compris les cellules présentatrices de l'antigènes CPA exprimant la TSA et éliminant par la suite les lymphocytes LTCD8 auto réactives dans les organes lymphoïdes secondaire de manière similaire à mTEC dans les thymus (Conteduca et al., 2018). elle est capable également de transformer les cellules T CD4⁺ auto réactives matures en cellules T négatives FoxP3 non fonctionnelles (Conteduca et al., 2018).AIRE permet l'expression de CMH et CD86 dans les CPA qui influencée les signaux d'interaction entre les lymphocytes et CPA pour affecter la fonction de présentation de l'antigènes ,et aussi peut influencer l'expression de TLR dans les cellules CPA plus précisément le TLR1,TLR3,TLR8 (Zhao et al., 2018c).

1.7. La régulation de facteur AIRE

Aire est présente dans les premiers stades de l'embryogénèse , mais cette expression est rapidement régulé dans mTEC(down régulation dans post AIRE) (Anderson and Su, 2016b). l'arginine diméthylase et la lysylhydroxylase bifonctionnelles ,JMJD6 semblent de réguler l'expression de AIRE au niveau protéique ,la perte d'expression de JMJD6 entraine une accumulation de l'intron 2 et une diminution de l'expression de la protéine AIRE ,également régulé par des complexe nucléaires NFkB contenant p65 ou RELB responsables l'expression de AIRE (Anderson and Su, 2016b) . les hormones sexuelles (œstrogènes et testostérones) sont impliquées dans la régulation de l'expression thymiques de l'AIRE chez l'homme et la souris par le biais d'une modulation transcriptionnelle directe et changement epigénitique(Berrih-Aknin et al., 2018). La voie de transduction du TNF et la voie du facteur de liaison CCCTC régulent également l'expression, de l'AIRE(Berrih-Aknin et al., 2018).

1.8. Les mutations de gène AIRE

AIRE favorise la tolérance immunitaire par l'induction de transcription ectopique des antigènes tissulaires spécifique TSA(Kaasch and Kaasch, 2016).une mutation de leur gène contribue à des dysfonctionnements de la tolérance , qui par conséquence

Chapitre 1 : Revue de la littérature

contribue au développement des maladies auto-immunes (Zhu et al., 2017). A ce jour plus de 100 mutations ont été identifiées dans le gène AIRE (Bruserud et al., 2016). Ces mutations sont responsables d'induire des maladies rares héréditaires récessives (Mora et al., 2014b). Les mutations du gène AIRE comprennent des mutations non sens, des suppressions ou des erreurs d'acides aminés uniques (Berrhi-Aknin et al., 2018). Les points chauds de mutation d'AIRE sont situés dans les exons 1, 2, 6, 8, 10. Les exons 1 et 2 codent pour le domaine HSR. L'exon 6 est trouvé dans le domaine SAND, l'exon 8 dans le domaine PHD1 et l'exon 10 dans la région riche en proline (Fardi Golyan et al., 2019). La mutation la plus commune dans la population finlandaise est caractérisée par le changement de C en T dans le nucléotide 889 situé dans l'exon 6 qui change par la suite l'acide aminé arginine par le codon stop, même mutation a été trouvée dans la population italienne (hétérozygote, germanique (homozygote) (Finnish-German APECED Consortium, 1997). R257X est la mutation la plus couramment signalisée dans les populations finlandaise, ainsi que la population juifs iraniens partagent une mutation commune de transition de A en G au niveau du résidu 85 qui devrait endommager le domaine HSR de la protéine AIRE par substitution de la tyrosine 85 à la cystéine (Fardi Golyan et al., 2019).

1.8.1. Domaine HSR/CARD

Ce domaine est crucial pour l'oligomérisation de la protéine AIRE, une nouvelle mutation a été identifiée dans l'exon 2 de la région HSR (c149insTGAA, p.Lys50Asnfsx168) (Fardi Golyan et al., 2019). D'autres mutations P.K83E localisées en surface de CARD ont un effet sur la transcription et la localisation par le changement de site de liaison de protéine-protéine (Bruserud et al., 2016).

1.8.2. Domaine SAND

PG228 est la première mutation homozygote à être identifiée en Italie, P.S278R. Cette mutation peut induire des maladies auto-immunes comme l'alopecia totalis, le rhumatisme et le mélanome (Bruserud et al., 2016).

1.8.3. Domaine PHD

PHD1 est un lecteur d'histone lysine 4, et PHD2 implique dans la liaison de chromatine, la plus commune mutation est la délétion de 13 paires de bases localisées en 3 terminale de PHD1 qui conduisant à un décalage du cadre de lecture et pour

Chapitre 1 : Revue de la littérature

conséquence une protéine tronquée (Bruserud et *al.*, 2016) d'autres mutations y compris C311y , P3266,P326I sont des mutations détectés dans un acide aminé crucial pour phd1 .

C302Y , PD312N sont des mutations trouves chez les patients attient ,et hypoparathyroidisme PG305S causes l'hépatite auto immune ,DT1et hypothyroïdisme (Bruserud et *al.*, 2016).

1.8.4. Domaines NLS

La mutation NLS affecte l'importation nucléaire de facteur de transcription à travers les pores nucléaires par la reconnaissance des récepteurs nucléaires d'importation plus précise les molécules d'importation α (Pellegrino et *al.*, 2018).D'autre mutation trouvés à l'extérieur de AIRE généralement est une mutation de la région promotrice de AIRE et caractérisé par la délétion de 23 paires de bases (Bruserud et *al.*, 2016)

EXON	Mutation
Exon 1	c.1A>T c.1A>G c.2T>C c.22C>T c.43C>T c.44G>T c.47C>T c.55G>A c.62C>T c.83T>C c.86T>C c.100G>A c.93_94insT c.64_69delGTGGAC
Exon 2	c.173C>A c.202A>G c.230T>C c.232T>A c.232T>C c.239T>G c.238G>T c.247A>G c.254A>G c.260T>C c.269A>G c.274C>T c.278T>G c.290T>C c.132+1G>C c.93_94insT c.205_208dupCAGG c.132+1_132+3delGTGinsCT c.267_275delCTATGGCCGExon
Exon 3	c.415C>T c.328delC c.402delC c.462A>T c.319_321delAGCinsTG
Exon 4	c.463G>A c.517C>T c.463+2T>C c.489dupC c.515_516ins13 c.540delG
Exon 5	c.607C>T
Exon 6	c.661A>T c.682G>T c.748A>T c.755C>T c.769C>T c.653- 387G>A c.653-1G>A c.652+14C>T c.789delC c.653-6_653- 4delTCC
Exon 7	c.834C>G c.845dupC c.798delC
Exon 8	c.892G>A c.892G>T c.901G>A c.906T>A c.905G>A c.908G>C c.913G>A c.932G>A c.934G>A c.977C>A c.977C>T c.983G>A c.879+1G>A c.966_969dupCCTG c.905_906delGT c.931delT c.958delC c.967_979del13
Exon 9	c.1072C>T c.995+5G>T c.1067_1071dupGGCCC c.995+3_995+5delGAGinsTAT c.1053_1060delGGCAGAGG
Exon 10	c.1096-1G>A c.1096-1G>C c.1095+6G>A c.1103dupC

Chapitre 1 : Revue de la littérature

	c.1155dupA c.1249dupC c.1242_1243insA c.1244_1245insC c.1163_1164insA c.1189delC c.1193delC c.1214delC c.1249delC c.1265delC c.1236_1239dupGGCC
Exon 11	c.1322C>T c.1336T>G c.1347C>A c.1370dupG c.1295_1296insAC c.1296delGinsAC c.1314_1326del13ins2 c.1344delCinsTT c.1344delC c.1314_1326del13ins2 c.1296delGinsAC c.1344delCinsTT
Exon 12	c.1411C>T c.1400+1G>A c.1450G>A
Exon 13	c.1513delG c.1516delG
Exon 14	c.1616C>T c.1638A>T c.1567-2A>G

Tableaux1.2 :les différentes mutations dans le gènes

2. APECED

Le syndrome auto-immune polyendocrinopathie candidose dystrophie ectodermique APECED ou reconnue sous le nom de syndrome polyendocrinien auto immunitaire de type 1 APS (APS1 ,OMIM 240300) (Zhu et al., 2017) .C'est la première maladie auto-immune localisée à l'extérieur de la région de complexe majeur d'histocompatibilité CHM (Finnish-German APECED Consortium, 1997). APECED est une maladie auto immunitaire récessive monogénique rare provoquée par une mutation dans le gène AIRE (Pellegrino et al., 2018). est caractérisée par des dysfonctionnements de multiples glandes endocriniennes et non endocriniennes ,son diagnostic est basé sur la présence de deux ou trois critères y compris hypoparathyroïdisme ,candidose muco-cutanée chronique CMC ,mais ces données cliniques suggèrent que ces critères sont incomplètes selon, le spectre phénotypique aux mutations de AIRE (Guo et al., 2018b).bien que la prévalence mondiale de APS1 est rare , elle est observée avec une fréquence élevée dans certaines populations spéciales telles que les Juifs iraniens 1/9000 , Finlandais 1/2500 (Fardi Golyan et al., 2019).France 1/500000, Slovaquie 1/43.000,norway1/80000 et poland1/129000(Guo et al., 2018b).

Les femmes sont plus sensibles aux maladies auto immunitaires APECED que les hommes (Berrih-Aknin et al., 2018).80% des patients atteints du syndrome de Sjogren ,la thyroïdite auto immunitaire et 60% à 75% atteints de RA, multiple sclérose et myasthénie sont des femmes (Berrih-Aknin et al., 2018).les hommes et les femmes ont des différences dans leur activité en raison des hormones sexuelles(Berrih-Aknin et al., 2018).le thymus masculin exprime des niveaux plus élevés de l'AIRE par rapport au

Chapitre 1 : Revue de la littérature

thymus femelle (Conteduca et *al.*, 2018). Des différents facteurs peuvent influencer l'expression de AIRE notamment les facteurs génétiques environnementaux et hormonaux, concernant les hormones androgènes et dihydrotestostérone qu'incérasses l'expression de AIRE dans les mTEC (femme et male) (Conteduca et *al.*, 2018). Androgène favorise l'expression de TSA dans les mTEC et déclenche par la suite l'apoptose de cellules T et son effet dépendent fortement de la dose et de type cellulaires (Berrih-Aknin et *al.*, 2018). à partir de la puberté les hormones sexuelles affectant la différenciation de thymus et modifiés par conséquent la différenciation des LT et augmente la sensibilité des maladies auto-immunes (Berrih-Aknin et *al.*, 2018). APS1 début généralement dans l'enfance, évaluant avec le temps et ayant une hétérogénéité (Chan and Anderson, 2015) et caractérisés par la présence des auto anticorps contre une large gamme des antigènes spécifiques notamment l'INF α , ω et peuvent utiliser comme un marqueur de diagnostic précoce pour différenciée entre ASP1 classique et non classique et ainsi peuvent utiliser comme stratégie thérapeutique (Guo et *al.*, 2018b). les patients atteints APS1 caractérisés par la présence des différentes types des auto anticorps tel que IL17A, IL17E et IL22 (Guo et *al.*, 2018b)

2.1. Rhumatoïde arthrites

RA est une maladie inflammatoire systémique chronique caractérisé par une synovite persistante et la présence d'auto anticorps (Feng et *al.*, 2015). est une maladie multifactorielle leur pathologie et écologie est resté inconnus, les facteurs environnementaux et génétiques jouent un rôle importantes dans le développement de la maladie (Yang et *al.*, 2018). AIRE régule l'expression d'une large gamme de TSA qui peut contribue au développement de LT et la sélection négative, une dysfonctionnement ou modification de niveau d'expression de l'AIRE peut altérer la tolérance et l'apparition des maladies auto immunes (Feng et *al.*, 2015). certaines polymorphismes dans le gène AIRE du ou développement des RA, une étude récente dans la population japonise a été identifie deux polymorphismes rs2025876 et rs760426 dans le gène AIRE et d'autre dans la population caucasienne rs878081 qui peut associés au risque de développement de RA (Feng et *al.*, 2015).

2.2 .CMC

Le CMC est associé à l'altération de la réponse de cellules TH17 et caractérisée par des infections muco- cutanées systématiques récurrentes ou persistances causés

Chapitre 1 : Revue de la littérature

par l'infiltration de candida principalement candida albicans qui affectent les ongles , la peau ,la cavité buccale et la muqueuse génitale (Humbert et *al.*, 2018). la prévalence de CMC serait plus élevée chez le patients présentant la mutation finlandaise AIRE R275X.

2.3. La maladie d'Addison AAD

est souvent associée à d'autre composant de syndrome polyendocrinien auto – immune ,les facteurs génétiques et environnementaux contribuent au risque de développer de AAD ,plusieurs gènes et régions génétiques ont été associées à l'ADN y compris CMH,CTLA-4 et protéine tyrosine phosphate non récepteur 22(PNTP22),différente mutation dans le gène AIRE notamment c.1411c>t ,c1507g>t(Bøe Wolff et *al.*, 2008)

2 .4. Alopecie areata

est une maladie auto immune cutanée spécifique aux tissus et caractérisée par un perd de cheveux inégales (Conteduca et *al.*, 2018) . avec une prévalence de 13% à40% chez les patients atteints APECED , une mutation homozygote dans l'exon 2 de gène AIRE(c173c>a, pALA58ASP) peut associer au risque de développer AA (Arousse et *al.*, 2018).

2.5. Diabète

Le DT1 est l'une des maladies auto immunes provoqué par la destruction des cellules β de pancréas ,il survient chez les patients atteints APECED ,mais seule une minorité des patients peuvent développer le DT1(Holmdahl, 2007). l'insuline est un auto antigène couramment ciblé dans le DT1 est codé par un gène dépendant de AIRE (INS)(Perniola, 2018). le DT1 a été associée à l'INS-VNTR qui affectent l'expression de l'insuline ,tandis que les allèles VNTR de classe 3 induisent un niveau d'expression d'INS plus élevé que les allèles de classe 1(Perniola, 2018) . une étude montre l'association de HLDR4 dans l'induction de développement de DT1 (Holmdahl, 2007).tandis que le HLADQB10602 joue un rôle protecteur dans le développement de DT1 associé aux APS à partir les travaux de gylling et al (Perniola, 2018). AIRE joue un rôle essentiel dans la régulation d'expression thymique de INS

Chapitre 1 : Revue de la littérature

2.6. Thérapie des patients atteints APS

Les patients atteints APS1 traités par l'utilisation des hormones , thérapie anti-invectives et immunosuppression(Guo et al., 2018b)

3. AIRE et le cancer

Les fonctions de AIRE dans mTEC pourrait limiter l'échappement des lymphocytes T auto réactives par la génération de Treg , et le RANK joue un rôle important dans le développement de mTEC^{hi}(Proekt et al., 2017) .AIRE régule l'expression de TSA qui comprennent des antigènes qui sont exprimés à la fois dans les tissus normaux et dans les cellules cancéreuses par exemple TRP1-Tyrosine etgp100.(Su and Anderson, 2019) . Aire et également exprimé dans les organes lymphoïdes (extra tymiques) et régule par la suite l'expression des antigènes dans eTEC , ladinine Lad1 est un antigène qui trouve dans les cellules cancéreuses de sein et les cellules extra thymique (Su and Anderson, 2019). d'autre antigène TRP1 qui est un antigènes exprimé dans les mélanocyte et mélanome , les LTCD4⁺réactives anti TRP1 subissent une délétion clonale (Sus2019rank). l'utilisation de traitement anti RANK(denosumale) améliorerait la réponse anti tumorale par l'aquisement de mTEC AIRE⁺ et diminution de l'expression de AIRE (Proekt et al., 2017) . les inhibiteurs de point de contrôles reposant sur la modulation de la tolérance immunitaire périphérique qui active les lymphocytes T spécifique de tumeur après leur sortie des thymus , et le traitement anti RANK repose sur l'aquisement de mTEC AIRE⁺, les chercheurs pensent pour développer une thérapie combinée entre RANK et les inhibiteurs de point de contrôles pour améliorer la réponse anti tumorales(Su and Anderson, 2019).

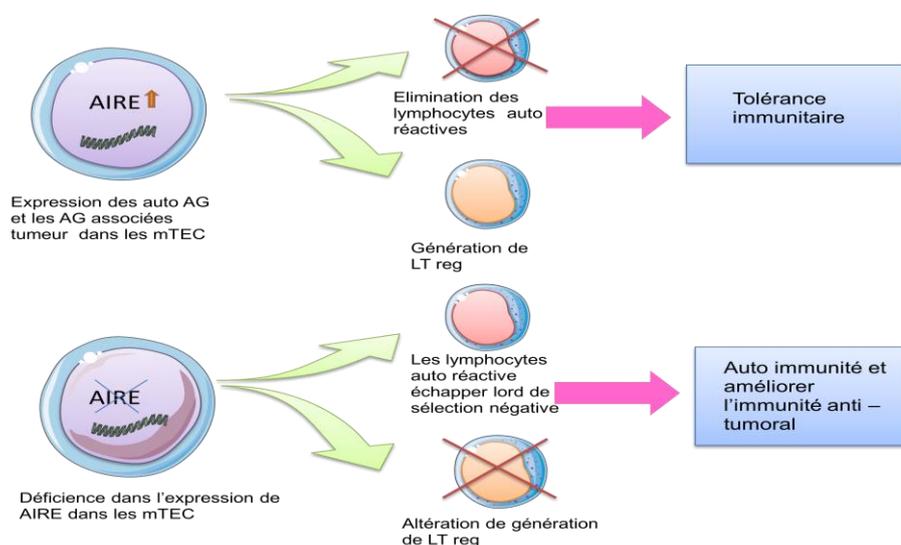


Figure 2. 1 : le rôle de l'AIRE dans auto immunité et l'immunité anti tumoral

Chapitre 1 : Revue de la littérature

4. La réaction en chaîne par polymérase PCR

L'ADN pourrait bien être le meilleur utile de stockage de données de la planète ,Ces dernières années, les chercheurs ont décrit plusieurs façons de coder les informations dans l'ADN.(Blow, 2017).L'amplification par PCR de l'ADN est l'un des développements technologiques les plus importants de l'histoire de la biologie moléculaire(Martin, 2019). La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est fondamentale pour la biologie moléculaire et la technique moléculaire la plus importante pour le laboratoire de recherche.(Kalendar et al., 2011).Le principe de cette technique a été également utilisé et appliqué dans de nombreuses autres technologies d'amplification d'acide nucléique simples ou complexes TAAN (Kalendar et al., 2017a). La réaction en chaîne par polymérase (PCR) peut également amplifier sélectivement un fragment par rapport à un autre . Parallèlement aux expériences de laboratoire d'amplification des approches in silico ou virtuelles (bioinformatique) ont été développées, parmi lesquelles l'analyse PCR in silico (Marx, 2017).

4 .1. Définition et les étapes de PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode d'amplification d'acide nucléique fondamentale pour la biologie moléculaire et la technique moléculaire la plus importante pour le laboratoire de recherche.(Kalendar et al., 2017a) .La PCR est un test enzymatique simple qui permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un pool complexe d'ADN. La PCR peut être effectuée en utilisant l'ADN source d'une variété de tissus et d'organismes. Chaque essai de PCR nécessite la présence d'ADN matrice, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase. L'ADN polymérase est l'enzyme clé qui relie les nucléotides individuels ensemble pour former le produit de PCR. Les nucléotides comprennent les quatre bases - adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, C, G) - qui se trouvent dans l'ADN. Ceux-ci agissent comme les blocs de construction qui sont utilisés par l'ADN polymérase pour créer le produit de PCR résultant. Les amorces dans la réaction spécifient le produit d'ADN exact à amplifier. Les amorces sont de courts fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire à l'ADN cible qui doit être détecté et amplifié.

Ceux-ci servent de point d'extension sur lequel l'ADN polymérase peut s'appuyer.(Garibyan and Avashia, 2013).Les brins d'ADN matrices sont amplifiés par les cycles répétés de deux ou trois étapes, y compris :

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1- la dénaturation thermique (dénaturation d'une matrice d'ADN double brin en simple brin.

2-recuit (recuit d'amorces sur une matrice d'ADN simple brin).

3- réaction d'extension (allongement des amorces par l'ADN polymérase).

(Kalendar et *al.*, 2017) .

Un certain nombre de techniques isothermes ont également été développées qui ne reposent pas sur le thermocyclage pour amplifier la réaction comme Le test TaqMan qu' est un exemple de détection homogène d'acide nucléique d'une technique de séquence cible qui utilise une sonde modifiée(Kalendar et *al.*, 2017).

4. 2 . Les avantages et limites de PCR

La PCR présente de plusieurs avantages PCR notamment leur facilité à comprendre et à utiliser, et elle produit des résultats rapides, il s'agit d'une technique hautement sensible pouvant produire des millions à des milliards de copies d'un produit spécifique pour le séquençage, le clonage et l'analyse. Bien que la PCR a des avantages mais aussi a des limites ,sachant que la PCR est une technique très sensible, toute forme de contamination de l'échantillon par des traces même d'ADN peut produire des résultats trompeurs De plus, afin de concevoir des amorces pour la PCR, certaines données de séquence antérieures sont nécessaires. Par conséquent, la PCR ne peut être utilisée que pour identifier la présence ou l'absence d'un agent pathogène ou d'un gène connu. Une autre limitation est que les amorces utilisées pour la PCR peuvent s'hybrider non spécifiquement à des séquences qui sont similaires, mais pas complètement identiques à l'ADN cible. (Garibyan and Avashia, 2013).

5. Choix d'amorces

5.1. Définition

Amorces ou primer sont de courts fragments d'ADN avec une séquence définie complémentaire à l'ADN cible qui doit être détecté et amplifié(Garibyan and Avashia, 2013). La réaction de PCR nécessite une paire d'oligonucléotides différents ou identiques (amorces)pour amplifier un morceau spécifique d'ADN en une seule réaction, les températures de fusion des deux amorces doivent être très similaires afin de permettre une liaison correcte des deux à une température d'hybridation similaire ,les amorces aussi doivent être très spécifiques, et d'amplifier uniquement les morceaux d'ADN qui sont la cible (Kalendar et *al.*, 2017b) .Plusieurs critères

Chapitre 1 : Revue de la littérature

généraux indispensables pour la sélection optimal pour assurer une bonne PCR , ces amorces doivent être hybrider uniquement la séquence cible ,parmi ces facteurs ;la longueurs de oligonucléotides (entre 16 à 26 nt),le taux de GC qui doit être entre , de 40 à70% .

5. 2. Outil

La méthode in silico aide à concevoir des amorces. Il existe différents programmes disponibles pour la conception d'amorces de PCR Comme «Primer3» et «Web Primer».

La validation in silico peut être effectuée à l'aide de l'outil BLAST et du logiciel Gene Runner, qui vérifient leur efficacité et leur spécificité. Par la suite, les amorces conçues in silico peuvent être validées en laboratoire humide. Après cela, ces amorces validées peuvent être synthétisées pour être utilisées dans l'amplification du gène / fragment d'ADN concerné(Kumar and Chordia, 2015) . Les séquences peuvent être récupérées à partir d'expériences de séquençage antérieures ou à partir de référentiels de séquences en ligne. Parmi les référentiels en ligne utiles figurent le National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, et l'Institut européen de bioinformatique, <http://www.ebi.ac.uk/>. (Mann and Haaf, 2010).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): c'est un programme utilisé pour rechercher des similitudes entre deux séquences . Dans la conception des amorces, BLAST peut être configuré pour rechercher des sites de liaison d'amorces sur un ensemble de séquences pour prédire une amplification alternative du produit. BLAST est disponible sur le site Web du NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/download.shtml> (Mann and Haaf, 2010).

Outil	Descriptio n	url
Primer3	Outil complet de conceptio n d'amorces de PCR	http://primer3.wi.mit.edu/
NetPrim er	Utilise Pour paire individuell	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index. html

Chapitre 1 : Revue de la littérature

	e ou primaire	
Gene Fisher2	Pour générer des amorces et accepter des séquence non alignée	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/
Web Primer	Conceptio n des amorce pour PCR ainsi pour le séquença ge	http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer
Primer BLAST	Primer spécifique cible	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Tableau 2. 1 : Différents outils disponibles pour la conception des l'amorces

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Problématique

L'AIRE a été identifiée comme un gène susceptible de provoquer des maladies auto-immunes mono géniques connue sous le terme de polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique Ou APS (PSA) chez l'homme , il est devenu clair que l' AIRE joue un rôle crucial dans l'établissement de la tolérance centrale et la génération de Treg , en effet la suppression de ce gène chez les souris entraînent le développement de la même syndrome décrit chez l'homme , ce qui suggère une association entre le gène AIRE et le développement des maladies auto immunes mono géniques , pour cela l'étude de gène AIRE par différentes méthodes biologiques comme la PCR offre une meilleure compréhension de rôle de ce gène dans l'auto immunité .Cela fait l'objet de notre étude qui consiste à concevoir les bonnes paires d'amorces qui peuvent être utilisées dans les futures études associées au gène AIRE .

OBJECTIF

L'objectif de notre travail est concevoir avec spécificité le couple d'amorces qui encadrent le gène AIRE associé avec le syndrome de polyendocrinopathie auto-immune .

But

Le but de notre étude est de concevoir les bonnes paires d'amorces pour assurer une amplification spécifique et efficace de la réaction de PCR , puis ces amorces peuvent être utilisées dans des futures études associées au gène AIRE et les maladies auto immunes .

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Chapitre 3 : Résultats

Chapitre 4 : Discussion

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Matériel et méthode

1. Conception des amorces

La conception des amorces est une étape essentielle dans tous les types de méthodes de PCR pour assurer une amplification spécifique et efficace d'une séquence cible, la sélection correcte et spécifique des amorces est une étape clé de la procédure de PCR (Kalendar et *al.*, 2017b).

Les amorces ont généralement une longueur de 18 à 35 bases et doivent être conçues de manière à avoir une identité de séquence complète avec le fragment cible souhaité à amplifier (Kalendar et *al.*, 2014).

2. sélection des amorces

L'efficacité des réactions d'amplification par PCR dépend de nombreux paramètres, et en particulier de la façon dont sont choisis les oligonucléotides servant d'amorces certains paramètres sont généralement essentiels : distribution au hasard des bases, pourcentage des GC d'environ 50 %, absence de structures secondaires surtout à l'extrémité 3', absence de complémentarité entre les deux amorces pour éviter la formation de dimères.

2. 1. la spécificité

La spécificité des amorces est l'un des paramètres les plus importants pour une bonne PCR. Les amorces optimales doivent s'hybrider uniquement à la séquence cible, en particulier lorsque l'ADN génomique complexe est utilisé comme matrice (Kalendar et *al.*, 2017b). la capacité de l'amorces à former un duplex stable avec le site spécifique sur l'ADN cible, et aucune formation de duplex avec une autre molécule d'amorce ou aucune hybridation sur tout autre site cible (Rychlik, 1995)

2.2. la longueur

Les amorces ont généralement une longueur de 18 à 35 bases et doivent être connue de manière identique de la séquence complémentaire de fragment cible (Kalendar et *al.*, 2014) La différence de la longueur des amorces directs et inverses ne dépassant pas 3 nt (Chuang et *al.*, 2013) le premier amorce directe se lie à un brin d'ADN et le deuxième amorce inverse se lie au brin complémentaire, la longueur de amorce est proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation.

2. 3. Température de fusion

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

La température de fusion (T_m) est définie comme la température à laquelle la moitié des brins d'ADN sont à l'état double hélicoïdal et la moitié à l'état "bobine aléatoire". La T_m pour les amorces courtes calculée par défaut en utilisant les paramètres thermodynamiques du plus proche voisin (Kalendar et al., 2014). Ou peut être obtenue en utilisant l'équation de Wallace pour calculer la T_m des duplex parfaits formés entre les amorces $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$. (Green and Sambrook, 2018). Des paires d'amorces doivent avoir des températures de fusion similaires. Une amorce avec une T_m significativement supérieure à la température de recuit de la réaction peut mishybridize et étendre à un emplacement incorrect le long de la séquence d'ADN étendre à tous.

2. 4. la teneur de GC

La teneur en GC d'un oligonucléotide est le facteur le plus essentiel qui influence la valeur T_m . (Kalendar et al., 2014). La proportion de GC est défini comme une valeur en pourcentage qui indique le rapport des nucléotides «G» et «C» qui apparaissent dans une amorce. Une proportion de GC appropriée d'une amorce se situe généralement entre 40 à 60%. (Chuang et al., 2013).

2. 5. La séquence de l'extrémité 3

Le placement de l'extrémité 3' de l'amorce est essentiel pour la réussite d'une réaction de PCR et également essentiel pour contrôler les erreurs d'amorçages (Dieffenbach et al., 1993). Une amorce avec une faible stabilité à son extrémité 3' fonctionnera bien en PCR car les appariements de bases proches et à l'extrémité 3' avec des sites non cibles ne sont pas suffisamment stables pour initier la synthèse. Par conséquent, les parties 5' et centrales de l'amorce doivent également former un duplex avec le site d'ADN cible afin de s'amorcer efficacement. Inversement, les oligonucléotides avec des extrémités 3' stables et riches en GC n'ont pas besoin de recuire avec la cible sur toute leur longueur pour s'amorcer efficacement, ce qui entraîne souvent une synthèse de produit non spécifique (Rychlik, 1995).

3. Recherche de la séquence de gène AIRE

Le gène AIRE est situé dans la région 22q3 du chromosome 21 chez l'homme et dans le chromosome 10 chez la souris, se compose de 14 exons couvrant environ 13Kb d'ADN génomique. Pour la conception des amorces pour ce gène tout d'abord il doit rechercher la séquence de gène AIRE dans la base de données en utilisant Ensembl qui est un système de bioinformatique d'annotation automatique de génomes qui peut être utilisé facilement grâce au site www.ensembl.org.

Premièrement en induisant le non du gène et sélectionné l'espace humaine puis tapé entrer pour donner la séquence du gène. celles-ci sont montrées dans la figure

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

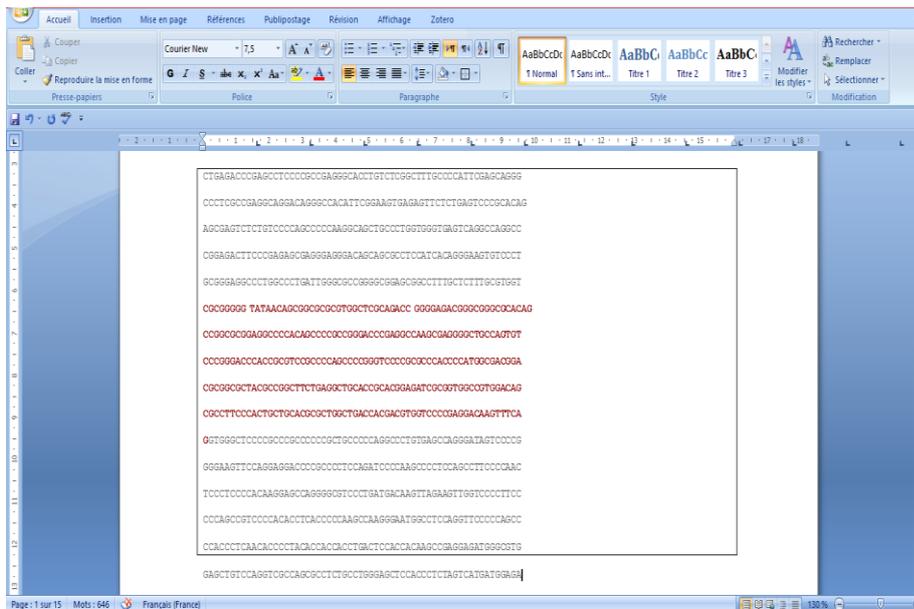


Figure 3.3: la sélection de séquence d'intérêt de gène AIRE copié dans le Word

4. L'outil primer blast

Primer-BLAST est un outil de conception d'amorces PCR spécifique à une cible à usage général qui offre un niveau de sensibilité, de flexibilité pour répondre aux différents besoins de conception d'amorce que l'on ne trouve dans aucun autre outil. Le programme Primer-BLAST est exécuté sur la base de données NCBI pour fournir un service plus rapide et plus fiable aux utilisateurs.

Cet outil est accessible au public

supplémentaires du laboratoire

[Ouvrir le Finder Frame Finder \(ORF Finder\)](#)
Un outil d'analyse graphique qui trouve tous les cadres de lecture ouverts dans la séquence d'un utilisateur ou dans une séquence déjà dans la base de données. Seize codes génétiques différents peuvent être utilisés. La séquence d'acides aminés déduite peut être enregistrée dans différents formats et recherchée dans des bases de données de protéines à l'aide de BLAST.

[Visionneuse PSSM](#)
Permet aux utilisateurs d'afficher, de trier, de sous-ensemble et de télécharger des matrices de score spécifiques à la position (PSSM), soit à partir des enregistrements CDD, soit à partir des recherches de protéines BLAST de position spécifique itérée (PSI). L'outil peut également aligner une protéine de requête sur le PSSM et mettre en évidence des positions de haute conservation.

[Intégrateur phénotype-génotype \(PheGent\)](#)
Prend en charge la recherche de relations phénotype / génotype humain avec des requêtes par phénotype, emplacement des chromosomes, identificateurs de gène et SNP. Comprend actuellement des informations provenant de dbGaP, du catalogue NHGRI GWAS et de GTeX. Affiche les résultats sur le génome, sur la séquence ou dans des tableaux à télécharger.

[Primer-BLAST](#)
L'outil Primer-BLAST utilise Primer3 pour concevoir des amorces de PCR sur un modèle de séquence. Les produits potentiels sont ensuite automatiquement analysés avec une recherche BLAST sur des bases de données spécifiées par l'utilisateur, pour vérifier la spécificité de la cible visée.

[ProSplign](#)
Un utilitaire pour calculer l'alignement des protéines sur la séquence nucléotidique génomique. Il est basé sur une variation de l'algorithme d'alignement global de Needleman Wunsch et tient spécifiquement compte des introns et des signaux d'épissage. Grâce à cet algorithme, ProSplign est précis dans la détermination des sites d'épissage et tolère les erreurs de séquençage.

[Passerelle des utilisateurs avancés de PubChem \(PUG\)](#)
PUG permet d'accéder aux services PubChem via une interface programmatique. PUG permet aux utilisateurs de télécharger des données, d'initier des recherches sur les structures chimiques, de normaliser les structures chimiques et d'interagir avec les

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/account/?back_url=https%3A%3F279www.ncbi.nlm.nih.gov

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Figure3.4: plateforme de la base de données NCBI.

Réinitialiser la page Enregistrer les paramètres de recherche Récupérer les résultats récents Publication Conseils pour trouver des amorces spécifiques

Modèle PCR

Entrez la séquence d'accèsion, gi ou FASTA (un enregistrement refseq est préférable) Clair

Intervalle

Apprêt avant Du Au 1 277 Clair

Apprêt inverse 621

Ou, téléchargez le fichier Choisir un fichier Aucun fichier choisi FASTA

Paramètres d'amorce

Utiliser mon propre amorce avant (5' -> 3' sur le brin plus) Clair

Utilisez mon propre apprêt inverse (5' -> 3' sur le brin moins) Clair

Min Max 70 1000

Taille du produit PCR 10

d'amorces à retourner

Différence Min Opt Max Max T^m

Figure3.5 : L'outil primer blast

5. Analyse de résultats

Le couple d'amorces choisi doit répondre aux critères suivant:

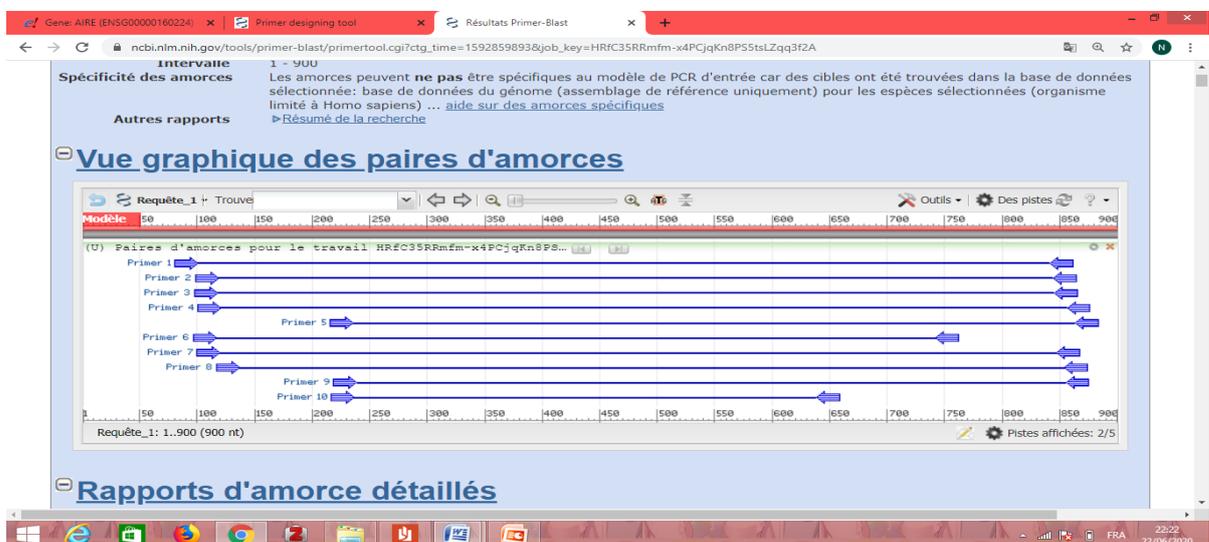
- Choisir le couple d'amorces qui donne le moins de produits aspécifiques, afin d'amplifier que le produit étudié
- Les températures d'hybridation des deux amorces doivent être les plus proches possibles, car la température d'hybridation lors d'une PCR est programmée en une seule température ne doit pas dépasser de 4°C
- La teneur en GC doit être proche de 40% surtout dans la région 3'
- Ignorer les produits aspécifiques de plus de 1000 pb, car lors d'une PCR il est moins probable d'amplifier une séquence de plus de 1kb
- Pas de auto-complémentarité dans chacune des amorces.

Chapitre 3 :Résultat

Résultat

1. Analyse de résultat de primer blast

A partir les résultats données par l'outil primer blast en trouve que les 9 amorces parmi les 10 couples d'amorces ont la capacité d'amplifier en plus un produit aspécifique de moins de 900 paire de base donc ce résultat n'est pas pris en charge . La sixième couple d'amorce a été choisi car elle amplifie seulement un produit spécifique de 666 paire de base . cette amorce a un longueur de 20 pair de base , généralement les nucleotides qui sont un longueur de 18 à 24Pb sont extremement spécifique de la séquence .la teneur en CG est entre 60 et 55 pour l'amorce sens et anti sens respectivement , la teneur en CG d'une amorce doit être compris entre 40et 60 . la temperature de fusion est entre 59 et 60 .la différence ente tm ne dépassent pas le 4 °C



Paire d'amorces 6

	Séquence (5' -> 3')	Brin de modèle	Longueur	Début	Arrêtez	Tm	GC%	Auto complémentarité	Complémentarité de soi 3'
Amorce avant	GAGAGTTCTCTGAGTCCCGC	Plus	20	97	116	59,55	60,00	6,00	2,00
Amorce inversée	AACTTGTCATCAGGACGCC	Moins	20	762	743	60,32	55,00	3,00	2,00
Longueur du produit	666								

Produits sur des modèles potentiellement indésirables

> [NC_000021.9](#) Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p12 Assemblée primaire

longueur du produit = 666
Caractéristiques associées à ce produit
[régulateur auto-immun](#)

Amorce sens 1 GAGAGTTCTCTGAGTCCCGC 20
Modèle 44285634 44285653

Amorce inversée 1 AACTTGTCATCAGGACGCC 20

Chapitre 3 : résultat

2. Confirmation de résultat

Figure 4. 1 :Résultat du Primer blast montrant les caractéristiques de la paire
La (d'amorces choisies

<https://genome.ucsc.edu/>

Tout d'abord en soumis les séquences des amorces dans un analyse de conformation les résultats de cette confirmation ont donne un produit situe dans le chromosome 21 et amplifie un produit de 666 donc ces résultats confirment la fiabilité et la spécificité des amorces que nous avants conçus

The image shows a screenshot of the UCSC In-Silico PCR tool interface. At the top, there is a navigation bar with links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, and Downloads. Below this is the title "UCSC In-Silico PCR". The main content area displays a DNA sequence for a 666bp region on chromosome 21, with coordinates 44285634 to 44286299. The sequence is shown in a monospaced font. Below the sequence, there is a section titled "Primer Melting Temperatures" which lists the forward primer melting temperature as 59.1 C and the reverse primer melting temperature as 62.4 C. A note at the bottom of this section states: "The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM amp".

Figure4. 2 : confirmation des résultats de primer blast

Chapitre 4 : Discussion

Discussion

Après la première découverte de gène AIRE dans les années 1997, il a été associé au développement de la maladie auto-immune, APECED qui est la seule maladie monogénique à transmission mendélienne décrite chez l'homme. L'étude de ce gène par l'utilisation de PCR in silico est une opportunité qui facilite la recherche scientifique concernant ce gène, en utilisant la conception des amorces qui est une étape critique dans tous les types de techniques de PCR pour garantir une amplification spécifique et efficace d'une séquence cible, plusieurs outils de bioinformatique ont été utilisés pour faciliter la conception des amorces.

AMORCRS	BUT	REFERENCE
AIRE ,intron 2 L'amorce sens 5'ACCCTCAACACCCCTACACC3' L'amorce anti sens 5'TGGCGACCTGGACAGCTC3'	Déterminer l'association des variants de polymorphisme d'AIRE avec le risque de développer la maladie Addison	DOI: 10.1038 / sj.gene.6364457.
AIREF1 Amorces sens 5'CGTGCCAGTGTCCCGGGACCCACC3' Amorces anti sens 5'GGCGGGGTTCTCCTGGAAGTTC3'	Evaluer les mutations génétiques d'AIRE HLA de classe II chez les patients atteints d'hyperparathyroïdisme chronique CH	DOI: 10.1111 / j.1365-2265.2010.03862.x
L'amorce sens 5'ATTGCTGACGCCCTCTT3' Anti sens 5'TAGGGCATTACCTGGTGA3'	Le but de cette étude était d'étudier plus en détail le rôle possible du gène AIRE sans la susceptibilité à la SEP dans la population iranienne	PMID 29849988
Amorces sens 5'GAGAGTGCTGAGAAGGACA3' amorce 5'GTTTAATTTCCAGGCACATGA3'	Etude de l'association de la polymorphisme rs878081 d'augmenter le risque de polyarthrite rhumatoïde.	DOI.org/10.1590/1414-431X20187944
Amorces sens 5'AGGTGGGGATGGAA TGCTA3' Amorces anti sens 5'CCTCATTCCAGCACTCAGTA3'	Examiner l'expression d'AIRE par Jmjd6 pour l'induction de la tolérance auto dans le thymus	DOI: 10.1038/ncomms9820
Amorces sens 5'TCTAGGGCGCAGTAGTCCAG3' Amorces anti sens 5' TACTGGAAAGACCGCAAGA3'	Définir les mécanismes utilisés par d'AIRE pour réguler l'expression des gènes	DOI.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.056

Tableau 5. 1 : l'étude de différentes amorces de gènes AIRE par la technique de PCR

Chapitre 5 : Conclusion

Chapitre 5 : Conclusion

Chapitre 5 : Conclusion

Conclusion

La tolérance immunitaire met en jeu les mécanismes qui permet de contrôler les réponses immunitaires, la tolérance centrale est l'une de ces mécanismes qui basé sur l'éducation des lymphocytes T cordonnée par le gène AIRE responsable de l'expression des auto antigènes restreint aux tissus dans les mTEC . Aire est un régulateur auto immune exprimé principalement dans les mTEC est joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique des TSA essentiel de l'auto immunité favorisant la tolérance centrale dans le thymus , mais son expression a été détecté dehors de thymique dans certains tissus notamment la rate , les gonglions lymphatiques . ils assurent des déférentes rôles principalement l'expression ectopique des auto antigènes , la sécrétion des chimiokines et des molécules d'adhérence intervient dans la déclenche l'apoptose . IL devenu clairement que AIRE joue un rôle clé dans l'établissement de la tolérance des lymphocytes T aux soi , une rupture de l'expression de ce gène conduit à des manifestations auto immune grave, parmi ces manifestations APECED est une maladie auto immune mono génique récessif rare caractérise par une CMC, une hypo parathyroïde et une insuffisance surrénalienne , mais ce syndrome accompagné avec divers symptômes secondaires peuvent se manifester différent d'un patient à un autre y compris alopecie , DT1 ,hépatite auto immune

La conception des amorces est une étape critique dans tous les types de techniques de PCR pour garantir une amplification spécifique et efficace d'une séquence cible, il existe plusieurs outils de bioinformatique qui permettent de retrouver les séquence d'intérêt des gènes et facilitent la concevoir des amorces .

Notre travail consiste à concevoir des amorces spécifiques à l'aide de brimer blast dans le but de sélectionner des paires d'amorces qui assure l'amplification de la réaction de PCR de notre gène , puis ces amorces peuvent être utilisés dans des futures études associés aux gène AIRE et les maladies auto immunes .

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Chapitre 6 : Référence bibliographique

A

Abramson, J., and Anderson, G. (2017). Thymic Epithelial Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 85–118.

Abramson, J., and Goldfarb, Y. (2016). AIRE: From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression. *Eur. J. Immunol.* 46, 22–33.

Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016a). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat Rev Immunol* 16, 247–258.

Anderson, M.S., and Su, M.A. (2016b). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 247–258.

Arousse, A., Boussofara, L., H'mida-Ben Brahim, D., Migaud, M., Aounallah, A., Ghariani, N., Casanova, J.-L., Nouria, R., Puel, A., and Denguezli, M. (2018). A novel AIRE gene mutation in a patient with autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy revealed by alopecia areata. *JAAD Case Reports* 4, 602–605.

B

Bansal, K., Yoshida, H., Benoist, C., and Mathis, D. (2017). The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers. *Nat. Immunol.* 18, 263–273.

Berrih-Aknin, S., Panse, R.L., and Dragin, N. (2018). AIRE: a missing link to explain female susceptibility to autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1412, 21–32.

Blow, N. (2017). PCR'S NEXT WAVE. *BioTechniques* 62, 149–152.

Bøe Wolff, A.S., Oftedal, B., Johansson, S., Bruland, O., Løvås, K., Meager, A., Pedersen, C., Husebye, E.S., and Knappskog, P.M. (2008). AIRE variations in Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndromes (APS): partial gene deletions contribute to APS I. *Genes Immun.* 9, 130–136.

Bruserud, Ø., Oftedal, B.E., Wolff, A.B., and Husebye, E.S. (2016). AIRE-mutations and autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology* 43, 8–15.

C

Chan, A.Y., and Anderson, M.S. (2015). Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1356, 80–89.

Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., and Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35, 1541–1549.

Conteduca, G., Indiveri, F., Filaci, G., and Negrini, S. (2018). Beyond APECED: An update on the role of the autoimmune regulator gene (AIRE) in physiology and disease. *Autoimmunity Reviews* 17, 325–330.

Cowan, J.E., Baik, S., McCarthy, N.I., Parnell, S.M., White, A.J., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2018). Aire controls the recirculation of murine Foxp3+ regulatory T-cells back to the thymus. *Eur. J. Immunol.* 48, 844–854.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Crossland, K.L., Abinun, M., Arkwright, P.D., Cheetham, T.D., Pearce, S.H., Hilkens, C.M.U., and Lilic, D. (2016). AIRE is not essential for the induction of human tolerogenic dendritic cells. *Autoimmunity* 49, 211–218.

D

Danso-Abeam, D., Humblet-Baron, S., Dooley, J., and Liston, A. (2011). Models of Aire-Dependent Gene Regulation for Thymic Negative Selection. *Front. Immun.* 2.

Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., and Dveksler, G.S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.* 3, S30-37.

Dopazo, J., Rodríguez, A., Sáiz, J.C., and Sobrino, F. (1993). Design of primers for PCR amplification of highly variable genomes. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 123–125.

F

Fardi Golyan, F., Ghaemi, N., Abbaszadegan, M.R., Dehghan Manshadi, S.H., Vakili, R., Druley, T.E., Rahimi, H.R., and Ghahraman, M. (2019). Novel mutation in AIRE gene with autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Immunobiology* 224, 728–733.

Feng, Z.-J., Zhang, S.-L., Wen, H.-F., and Liang, Y. (2015). Association of rs2075876 polymorphism of AIRE gene with rheumatoid arthritis risk. *Human Immunology* 76, 281–285.

Finnish-German APECED Consortium (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* 17, 399–403.

G

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.

Green, M.R., and Sambrook, J. (2018). Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2018.

Guo, C.-J., Leung, P.S.C., Zhang, W., Ma, X., and Gershwin, M.E. (2018a). The immunobiology and clinical features of type 1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1). *Autoimmunity Reviews* 17, 78–85.

Guo, C.-J., Leung, P.S.C., Zhang, W., Ma, X., and Gershwin, M.E. (2018b). The immunobiology and clinical features of type 1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1). *Autoimmunity Reviews* 17, 78–85.

H

Hamazaki, Y. (2015). Adult thymic epithelial cell (TEC) progenitors and TEC stem cells: Models and mechanisms for TEC development and maintenance. *Eur. J. Immunol.* 45, 2985–2993.

Hamazaki, Y., Sekai, M., and Minato, N. (2016). Medullary thymic epithelial stem cells: role in thymic epithelial cell maintenance and thymic involution. *Immunol. Rev.* 271, 38–55.

Herzig, Y., Nevo, S., Bornstein, C., Brezis, M.R., Ben-Hur, S., Shkedy, A., Eisenberg-Bord, M., Levi, B., Delacher, M., Goldfarb, Y., et al. (2017a). Transcriptional programs that control expression of the autoimmune regulator gene Aire. *Nat. Immunol.* 18, 161–172.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Herzig, Y., Nevo, S., Bornstein, C., Brezis, M.R., Ben-Hur, S., Shkedy, A., Eisenberg-Bord, M., Levi, B., Delacher, M., Goldfarb, Y., et al. (2017b). Transcriptional programs that control expression of the autoimmune regulator gene Aire. *Nat. Immunol.* 18, 161–172.

Herzig, Y., Nevo, S., Bornstein, C., Brezis, M.R., Ben-Hur, S., Shkedy, A., Eisenberg-Bord, M., Levi, B., Delacher, M., Goldfarb, Y., et al. (2017c). Transcriptional programs that control expression of the autoimmune regulator gene Aire. *Nat. Immunol.* 18, 161–172.

Holmdahl, R. (2007). Aire-ing self antigen variability and tolerance. *Eur. J. Immunol.* 37, 598–601.

Humbert, L., Cornu, M., Proust-Lemoine, E., Bayry, J., Wemeau, J.-L., Vantyghem, M.-C., and Sendid, B. (2018). Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. *Front. Immunol.* 9, 2570.

K

Kaasch, M., and Kaasch, J. (2016). [In process.]. *Acta Hist Leopoldina* 251–282.

Kalendar, R., Lee, D., and Schulman, A.H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98, 137–144.

Kalendar, R., Lee, D., and Schulman, A.H. (2014). FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. In *DNA Cloning and Assembly Methods*, S. Valla, and R. Lale, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 271–302.

Kalendar, R., Muterko, A., Shamekova, M., and Zhambakin, K. (2017a). In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *Methods Mol. Biol.* 1620, 1–31.

Kalendar, R., Muterko, A., Shamekova, M., and Zhambakin, K. (2017b). In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *Methods Mol. Biol.* 1620, 1–31.

Kianizad, K., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2014). Dedicated mTEC progenitors stay true, even into adulthood. *Immunity* 41, 675–676.

Kumar, A., and Chordia, N. (2015). In Silico PCR Primer Designing and Validation. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 143–151.

L

Lopes, N., Ferrier, P., and Irla, M. (2015). Induction de la tolérance centrale dans le thymus par le facteur de transcription Aire. *Médecine/Sciences* 31, 742–747.

M

Mann, W., and Haaf, T. (2010). Single Cell RT-PCR on Mouse Embryos: A General Approach for Developmental Biology. In *RT-PCR Protocols*, N. King, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3–12.

Martin, J. (2019). Updating PCR. *BioTechniques* 67, 3–5.

Marx, V. (2017). How to deduplicate PCR. *Nat. Methods* 14, 473–476.

Maslovskaja, J., Saare, M., Liiv, I., Rebane, A., and Peterson, P. (2015). Extended HSR/CARD domain mediates AIRE binding to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468, 913–920.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Matsumoto, M., Tsuneyama, K., Morimoto, J., Hosomichi, K., Matsumoto, M., and Nishijima, H. (2020). Tissue-specific autoimmunity controlled by Aire in thymic and peripheral tolerance mechanisms. *Int. Immunol.* 32, 117–131.

Mora, M., Hanzu, F.A., Pradas-Juni, M., Aranda, G.B., Halperin, I., Puig-Domingo, M., Aguiló, S., and Fernández-Rebollo, E. (2014a). New splice site acceptor mutation in AIRE gene in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *PLoS ONE* 9, e101616.

Mora, M., Hanzu, F.A., Pradas-Juni, M., Aranda, G.B., Halperin, I., Puig-Domingo, M., Aguiló, S., and Fernández-Rebollo, E. (2014b). New splice site acceptor mutation in AIRE gene in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *PLoS ONE* 9, e101616.

Morimoto, J., Nishikawa, Y., Kakimoto, T., Furutani, K., Kihara, N., Matsumoto, M., Tsuneyama, K., Kozono, Y., Kozono, H., Hozumi, K., et al. (2018). Aire Controls in *Trans* the Production of Medullary Thymic Epithelial Cells Expressing Ly-6C/Ly-6G. *J.I.* 201, 3244–3257.

O

O’Sullivan, B.J., Yekollu, S., Ruscher, R., Mehdi, A.M., Maradana, M.R., Chidgey, A.P., and Thomas, R. (2018). Autoimmune-Mediated Thymic Atrophy Is Accelerated but Reversible in RelB-Deficient Mice. *Front. Immunol.* 9, 1092.

P

Passos, G.A., Speck-Hernandez, C.A., Assis, A.F., and Mendes-da-Cruz, D.A. (2018a). Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology* 153, 10–20.

Passos, G.A., Speck-Hernandez, C.A., Assis, A.F., and Mendes-da-Cruz, D.A. (2018b). Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology* 153, 10–20.

Pellegrino, M., Bellacchio, E., Dharmo, R., Frasca, F., Betterle, C., and Fierabracci, A. (2018). A Novel Homozygous Mutation of the AIRE Gene in an APECED Patient From Pakistan: Case Report and Review of the Literature. *Front. Immunol.* 9, 1835.

Perniola, R. (2018). Twenty Years of AIRE. *Frontiers in Immunology* 9.

Proekt, I., Miller, C.N., Lionakis, M.S., and Anderson, M.S. (2017). Insights into immune tolerance from AIRE deficiency. *Current Opinion in Immunology* 49, 71–78.

R

Radhakrishnan, K., Bhagya, K.P., Kumar, A.T., Devi, A.N., Sengottaiyan, J., and Kumar, P.G. (2016). Autoimmune Regulator (AIRE) Is Expressed in Spermatogenic Cells, and It Altered the Expression of Several Nucleic-Acid-Binding and Cytoskeletal Proteins in Germ Cell 1 Spermatogonial (GC1-spg) Cells. *Mol. Cell Proteomics* 15, 2686–2698.

Ribeiro, C., Alves, N.L., and Ferreira, P. (2019). Medullary thymic epithelial cells: Deciphering the functional diversity beyond promiscuous gene expression. *Immunol. Lett.* 215, 24–27.

Rodrigues, P.M., Peterson, P., and Alves, N.L. (2018). Setting Up the Perimeter of Tolerance: Insights into mTEC Physiology. *Trends in Immunology* 39, 2–5.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Rychlik, W. (1995). Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* 3, 129–134.

S

Speck-Hernandez, C.A., Assis, A.F., Felicio, R.F., Cotrim-Sousa, L., Pezzi, N., Lopes, G.S., Bombonato-Prado, K.F., Juliatti, S., and Passos, G.A. (2018). Aire Disruption Influences the Medullary Thymic Epithelial Cell Transcriptome and Interaction With Thymocytes. *Front. Immunol.* 9, 964.

St-Pierre, C., Trofimov, A., Brochu, S., Lemieux, S., and Perreault, C. (2015). Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* 195, 498–506.

Su, M.A., and Anderson, M.S. (2019). Pulling RANK on Cancer: Blocking Aire-Mediated Central Tolerance to Enhance Immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 7, 854–859.

T

Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* 38, 805–816.

Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S., and Anderson, G. (2017). Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 295–305.

Tanaka, A., and Sakaguchi, S. (2015). Immunology. Early life Aire. *Science* 348, 506–507.

U

Ucar, O., and Rattay, K. (2015). Promiscuous Gene Expression in the Thymus: A Matter of Epigenetics, miRNA, and More? *Front Immunol* 6, 93.

W

Wang, H.-X., Pan, W., Zheng, L., Zhong, X.-P., Tan, L., Liang, Z., He, J., Feng, P., Zhao, Y., and Qiu, Y.-R. (2020). Thymic Epithelial Cells Contribute to Thymopoiesis and T Cell Development. *Front. Immunol.* 10, 3099.

Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, H.S., and Peterson, P. (2012). Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol* 3, 19.

Y

Yang, H., Li, J., Jiang, L., Jiang, X., Zhou, X., and Xu, N. (2018). The rs878081 polymorphism of AIRE gene increases the risk of rheumatoid arthritis in a Chinese Han population: a case-control study. *Braz J Med Biol Res* 51, e7944.

Z

Zhao, B., Chang, L., Fu, H., Sun, G., and Yang, W. (2018a). The Role of Autoimmune Regulator (AIRE) in Peripheral Tolerance. *Journal of Immunology Research* 2018, 1–6.

Zhao, B., Chang, L., Fu, H., Sun, G., and Yang, W. (2018b). The Role of Autoimmune Regulator (AIRE) in Peripheral Tolerance. *J Immunol Res* 2018, 3930750.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

Zhu, W., Hu, Z., Liao, X., Chen, X., Huang, W., Zhong, Y., and Zeng, Z. (2017). A new mutation site in the AIRE gene causes autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Immunogenetics* 69, 643–651.

Résumé

Introduction : Le régulateur auto immunitaire AIRE est un régulateur important de l'auto immunité favorisant la tolérance centrale en contrôlant la sélection des thymocytes T par l'expression ectopique des antigènes des tissus périphériques dans les cellules épithéliales médullaires thymiques. Les mutations de la protéine AIRE sont le facteur causal de développement de maladie humaine auto immunitaire. Le polyendocrinien auto-immun de type 1 également connu sous le nom polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique (APECED) est une maladie autosomique récessive rare caractérisée par trois symptômes hyperparathyroïdie, insuffisance corticosurrénale auto-immune et mucocutanée chronique CMC bien que d'autre auto immunité. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est fondamentale pour la biologie moléculaire et la technique moléculaire la plus importante pour le laboratoire de recherche grâce à leur sensibilité et spécificité, La conception de l'amorce est une étape essentielle dans tous les types de méthodes de PCR.

Objectif : nous allons concevoir avec spécificité le couple d'amorce de gène AIRE

But : le couple d'amorces connues au cours ce travail servira à étudier l'association de gène AIRE avec auto immunité.

Matériels et méthodes : recherche de la séquence de gène AIRE dans la base de données ensemble puis utilisé l'outil primer blast pour concevoir les paires d'amorces.

Résultats : outil primer blast donne 10 paires d'amorces, permis ces amorces en choisit un couple d'amorces de 20 nucléotides de longueur qui donne un produit de 666 paires de bases.

Mot clé : le gène AIRE, tolérance immunitaire, mTEC, polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique (APECED)

Abstract

Background : The autoimmune regulator AIRE is an important regulator of autoimmunity promoting central tolerance in the thymus by controlling the selection of the T cell through the ectopic expression of peripheral tissue antigens (PTAs) in medullary thymic epithelial cells (mTECs). Mutations in AIRE protein are the causative factor in development of the human disease autoimmune. Polyendocrinopathy type 1 (APS1) also named autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) is a rare autosomal recessive disease characterized by a triad of symptoms including hypoparathyroidism, autoimmune adrenal insufficiency and chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) although other autoimmunity. The polymerase chain reaction (PCR) is fundamental for molecular biology and the most important molecular technique for the research laboratory through to their sensitivity and specificity. The design of the primer is an essential step in all types of PCR.

Objective: we will design with specificity the pair of AIRE gene primer

Purpose : the pair of primers known during this work will be used to study the association of the AIRE gene with autoimmunity.

Materials and methods : search for the AIRE gene sequence in the database ensemble then used the primer blast tool to design the primer pairs

Results : primer blast tool yields 10 primer pairs, allowing these primers to pick a primer pair 20 nucleotides in length which gives a product of 666 base pairs.

Keywords: Aire gene, immune tolerance, mTEC, autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED)

ملخص

مقدمة : منظم المناعة الذاتية AIRE هو منظم مهم للمناعة الذاتية يعزز التسامح المركزي من خلال التحكم في اختيار الخلايا التائية عن طريق التعبير خارج الرحم عن مستضدات الأنسجة المحيطة في الخلايا الظهارية النخاعية الصغرى، الطفراوات في بروتين AIRE هي العامل المسبب في تطور أمراض المناعة الذاتية البشرية النوع الأول من الغدد الصماء المناعي الذاتي المعروف أيضًا باسم اعتلال الغدد الصماء المناعي الذاتي - داء المبيضات - حثل الأديم الظاهر (APECED) هو مرض وراثي جسمي متنحي نادر يتميز بثلاثة أعراض فرط نشاط جارات الدرقية، قصور قشر الكظر المناعي الذاتي و CMC الجلدي المخاطي المزمن على الرغم من المناعة الذاتية الأخرى، تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) أساسي للبيولوجيا الجزيئية وأهم تقنية جزيئية لمختبر الأبحاث بفضل حساسيتها وخصوصيتها يعد تصميم البرايمر خطوة أساسية في جميع أنواع طرق PCR.

الهدف: سوف نصمم بخصوصية زوج من الجينات AIRE التمهيدي

الغرض: زوج من البادئات المعروفين خلال هذا العمل سيتم استخدامهم لدراسة ارتباط جين AIRE بالمناعة الذاتية

المواد والأساليب: ابحث عن تسلسل الجينات AIRE في قاعدة البيانات معًا، ثم استخدم أداة الانفجار التمهيدي لتصميم أزواج التمهيدي
النتيجة: يعطي primer blast 10 أزواج من البادئات، وتسمح لهذه البادئات باختيار زوج من البادئات 20 نيوكليوتيدات في الطول مما يعطي منتجًا من 666 زوجًا أساسيًا.

الكلمة الرئيسية: جين AIRE، التحمل المناعي، APECED، mTEC.