



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des  
Sciences de la Nature et de la Vie

**Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire**  
**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme**  
**de Master Domaine : Sciences de la**  
**Nature et de la Vie**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : *Biochimie de la nutrition et santé***

Intitulé :

## **Etude du stress oxydatif dans la polyarthrite rhumatoïde**

**Présenté et soutenu par :**

**MENASRIA AMIRA**

**KIHAL CHAHINEZ**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury : ZITOUNIA**

**Rapporteur : HAFIA**

**Examineur : HAMIDECHIA**

***Année universitaire : 2016 /2017***

## **\*\*Remerciements\*\***

*Avant tout, louange à ALLAH le Tout Puissant de m'avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Nous remercions les plus sincères s'adressent à notre encadreur Pr **HAFI.A** qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements*

*Nous remercions les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail :*

**Pr ZITOUNI .A et Pr HAMIDECHI.A**

*Nous tenons également à remercier les personnes du laboratoire d'autoimmune à l'institut Pasteur (Alger)*

*Nos gratitudes en particulier à **Dr SALAH .S.S** qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements*

*Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs connaissances et leurs conseils.*

Merci



## **Dédicace**

*Tout d'abord louange a Allah qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de mes études et m'inspiré les bons pas*

*Je dédie ce travail à mes chers parents Merah et Fiaza que j'aime tant, sans lesquels je ne serais jamais arrivée là où j'en suis.*

*A ma grand-mère :Aldjia*

*A mon grand-père : Zoubir*

*A mes tantes, mes oncles.*

*A toute ma famille Menasria, Rezgui.*

*A mes très chères sœurs :Anfel, Abir.*

*A mes très chers frères :djebrane , tamer ,mouhamed*

*A toute ma famille, proche ou éloignée.*

*A toutes mes cousines :Boutaina ...*

*A tous mes cousins*

*A tous mes amis*

*A mon binome « chahinez » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.*

*Sans oublier mes braves amies de la promotion de Biochimie / nutrition moléculaire et santé.*

*AMIRA*

## **Dédicace**

***Tout d'abord louange a Allah qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de mes études et m'inspiré les bons pas***

***Je dédie ce travail à mes chers parents MASSOUAD et FAIROUZ que j'aime tant, sans lesquels je ne serais jamais arrivée là où j'en suis.***

***A ma grand-mère : BOUGHITA .Z***

***A mes tantes, mes oncles.***

***A toute ma famille KIHAL, KHARREB.***

***A mes très chers frères : : Sofiane et Housseem et Salleh***

***A mes très chères amies : « moufida et malak et rayen et sara .....»***

***A toute ma famille, proche ou éloignée.***

***A tous mes cousins et cousines***

***A tous mes amis***

***A mon binome « Amira » qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.***

***Sans oublier mes braves amies de la promotion de Biochimie / nutrition moléculaire et santé.***

*chahinez*



## Résumé

Le stress oxydatif n'a pas la même signification que le stress psychique qui nous connaissons tous. Il s'agit d'une oxydation des constituants de notre organisme due à un excès des radicaux libres qui viennent de l'oxygène que nous respirons pour vivre cette oxydation dénature nos protéines, nos lipides, nos sucres et même notre ADN. Cette agression de nos cellules est une des causes essentielles de nombreuses pathologies telle que la maladie auto-immune polyarthrite rhumatoïde qui attaque les articulations.

Notre étude consiste à l'évaluation d'un ensemble des marqueurs biologiques utilisés pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Pour cela on a dosé les anticorps anti-CCP (anti-CCP), les facteurs rhumatoïdes (FR), et étudié le polymorphisme des gènes de L'oxyde nitrique synthase (NOS2 ou iNOS) car La NOS jouant un rôle potentiellement important dans la maladie de PR.

Ce travail repose sur l'étude rétrospective de 100 sujets sains de [19 – 60] ans (57♀/43♂) avec une moyenne de 34.7 ans ; et 100 sujets atteints de PR de [19 – 75] ans (85♀/15♂) avec une moyenne de 45 ans.

Le dosage des biomarqueurs précédemment cités révèle que les anticorps anti-CCP est se retrouvent chez 70% de la population atteintes du PR. Et que 45% des atteints de PR possèdent des facteurs rhumatoïde positifs. Et pour l'étude des polymorphismes des gènes de NOS2 ou iNOS on a retrouvent une seul association entre les gènes INOS rs2779251 et la PR.

**Mots clés :** polyarthrite rhumatoïde, facteurs rhumatoïde, anticorps anti-CCP, les polymorphismes des gènes de NOS2.

## Summary

Oxidative stress does not have the same meaning as psychic stress that we all know. It is an oxidation of the constituents of our body due to an excess of the free radicals that come from the oxygen that we breathe to live this oxidation denatures our proteins, our lipids, our sugars and even our DNA. This aggression of our cells is one of the main causes of many pathologies such as autoimmune rheumatoid arthritis disease that attacks the joints.

Our study consists in evaluating a set of biological markers used for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). For this purpose, anti-CCP (anti-CCP) antibodies, rheumatoid factors (RF), and the polymorphism of nitric oxide synthase genes (NOS2 or iNOS) have been assayed since NOS plays a potentially important role in the PR disease.

This study is based on a retrospective study of 100 healthy subjects from [19 - 60] years (57♀ / 43♂) with an average of 34.7 years; And 100 subjects with RA of [19 - 75] years (85♀ / 15♂) with an average of 45 years.

The assay of the previously cited biomarkers reveals that anti-CCP antibodies are found in 70% of the RA population. And that 45% of RA patients have positive rheumatoid factors. And for the study of the polymorphisms of the genes of NOS2 or iNOS we find a single association between the INOS genes rs2779251 and PR.

**Key words:** rheumatoid arthritis, rheumatoid factors, anti-CCP antibodies, polymorphisms of NOS2 genes.

## ملخص

الأكسدة ليس لها نفس معنى الضغوط النفسية التي نعرفها جميعا. بل هي أكسدة مكونات جسمنا بسبب الجذور الحرة الزائدة التي تأتي من الأكسجين الذي نتنفسه فالأكسدة تشوه البروتين ، والدهون، السكر لدينا وحتى DNA فهو السبب الرئيسي للكثير من الأمراض مثل التهاب المفاصل الروماتيزمي مرض المناعة الذاتية تضر المفاصل. وتتطوي هذه الدراسة تحديد التهاب المفاصل الروماتيزمي من تقييم مجموعة من المؤشرات الحيوية. لذلك يعاير الأجسام المضادة CCP، عامل الروماتويد (RF) ، ودراسة الأشكال الجينية من NOS التي تعتبر مؤشر له علاقة بمرض الالتهاب المفصلي .

ويستند هذا العمل على دراسة استعادية من 100 شخص سليم [19-60] سنة (57♀ / 43♂) بمتوسط 34.7 عاما. و 100 شخص مصاب بالتهاب المفاصل الروماتيزمي [19-75] سنة (85♀ / 15♂) بمتوسط 45 عاما. العلامات البيولوجية تكشف أن الأجسام المضادة CCP مرتفعة جدا عند 70٪ من المرضى المصابين بالتهاب المفصلي . و أن 45٪ من المرضى المصابين لها عامل الروماتويد إيجابي فيما يخص دراسة الأشكال الجينية من NOS2 فهناك علاقة بين العلامة الجينية iNOS rs2779251 و مرض الالتهاب الروماتيزي .

**الكلمات الرئيسية:** التهاب المفاصل الروماتويدي، والعوامل المفاصل والأجسام المضادة CCP، تعدد الأشكال الجيني

NOS

# Liste d'abréviation

**AAN:** Anticorps antinucléaires

**Ac Anti CCP :** Les anticorps anti-protéines citrullinées

**ADN :** L'acide désoxyribonucléique

**ADP:** Adenosine DiPhosphate

**AGPI :**acides gras polyinsaturés

**ATP:** Adenosine TriPhosphate

**CO<sub>2</sub>' :** Dioxyde de carbone

**COX :** cyclooxygenase

**EDTA :** Éthylène Diamine Tétra-Acétique

**ELISA :** enzyme-linkedimmunosorbentassay

**EOA :** Espèces oxygénées activées

**ERO :** espèces réactives de l'oxygène

**FGF-1 et 2:** Fibroblast Growth Factors 1 and 2

**FR:** facteur rhumatoïde

**GPx :** Glutathion peroxydase

**GR :** Glutathion réductase

**GSSG :** glutathion-disulfure

**HO<sub>2</sub>' :** Hydroperoxyde

**HNE:** l'hydroxynonenal

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Peroxyde d'hydrogène

**HOCl :** Acide hypochlorique

**IL:** interleukin

**Ig:** immunoglobuline

**INOS :** inducible nitric oxide synthase

**LN :** Laser néphélémétrie

**MDA :** malonedialdéhyde

**NO :** oxyde nitrique

**NOS :** nitrite oxyde synthétases

**NOX :** NADPH oxydase

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup> :** Anion superoxyde

**O<sub>3</sub> :** Ozone

**O<sub>2</sub> :** Oxygène singulet

**OH<sup>·</sup> :** Hydroxyle

**ONOO<sup>-</sup> :** Peroxynitrite

**OR :** Odds Ratio

**PHGPx :** phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase

**PR :** polyarthrite rhumatoïde

**PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor

**PAD:** peptidyl-arginine désiminasés

**PCR :** Polymerasechainreaction

**PK :** Protéinase K

**RO<sub>2</sub>'** : Peroxyle

**RO'** : Alkoxye

**ROOH** : Hydroperoxyde

**ROS** : Radical Oxygen Species

**RL** : Radicaux libres

**SO** : stress oxydatif

**SDS** : Dodécylsulfate de sodium

**SLB** : Solution de lyse des globules blancs

**SLR** : Solution de lyse des globules rouges

**SS** : Sujets sains.

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism

**TBARS** : le acides thiobarbiturique

**TRIS**: Trishydroxyméthylaminométhane

**TE**: Tris EDTA

**TGFβ**: Transforming Growth Factor β

**VEGFV**: ascular Endothélial Growth Factor

**4- HNE** : le 4-hydroxynonenal

**8-OH2DG** : 8-OH-2'-deoxyguanosine

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : la balance pro-oxydants et antioxydants.....	3
<b>Figure 2</b> : Sources de stress oxydant endogènes et exogènes.....	4
<b>Figure 3</b> : Rôles physiologiques des espèces réactives .....	6
<b>Figure 4</b> : l'origine des différents radicaux libres oxygénés et les ERO.....	7
<b>Figure 5</b> : le pourcentage de production des radicaux libres in vivo.....	12
<b>Figure 6</b> : Génération du NO à partir de la L-arginine.....	16
<b>Figure 7</b> : Structure d'une sous-unité d'une NO synthase.....	18
<b>Figure 8</b> : Flux d'électrons dans les NOS.....	18
<b>Figure 9</b> : localisation du gène NOS2.....	20
<b>Figure 10</b> : Principaux dommages cellulaires induits par les EAO.....	21
<b>Figure 11</b> : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	22
<b>Figure 12</b> : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	23
<b>Figure 13</b> : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	24

<b>Figure 14:</b> Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des EAO.....	28
<b>Figure 15:</b> les principales réactions enzymatiques d'antioxydants.....	29
<b>Figure 16 :</b> schéma des défenses antioxydants enzymatiques par SOD.....	30
<b>Figure 17 :</b> schéma du fonctionnement de Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR).....	31
<b>Figure 18 :</b> les cycles réactionnels de vitamine C et vitamines E.....	33
<b>Figure 19 :</b> Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres.....	34
<b>Figure 20 :</b> Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au stress oxydatif.....	35
<b>Figure 21:</b> Articulations les plus souvent atteintes dans la PR.....	36
<b>Figure 22 :</b> La citrullination est un processus médié par PAD.....	42
<b>Figure 23 :</b> l'articulation inflammatoire.....	43
<b>Figure 24:</b> la destruction de l'articulation au cours de la PR .....	44
<b>Figure 25 :</b> Répartition des patients et des contrôles selon les tranches d'âge..	48
<b>Figure 26 :</b> schéma résume le protocole d'ELISA.....	54
<b>Figure 27 :</b> schéma représente la lyse des globules rouge et blanc.....	57
<b>Figure 28:</b> Différentes étapes du génotypage par la technologie TaqMan.....	61



<b>Figure 29</b> : schéma présentatif des étapes de TaqMan.....	63
<b>Figure 30</b> :Détermination du génotype en fonction du type de fluorescence.....	66
<b>Figure 31</b> : Répartition des patients selon le sexe.....	67
<b>Figure 32</b> : répartition des patients selon l'Age .....	68
<b>Figure 33</b> : Résultats du dosage des anti-CCP chez les patients PR et les sujets sains.....	70
<b>Figure 34</b> : Résultats du dosage du FR chez les patients PR et les sujets sains.....	71
<b>Figure 35</b> : Distribution des résultats des anticorps anti-CCP2/FR dans la population malade.....	71

# Liste des photos

<b>Photos 1</b> : centrifugeuse.....	49
<b>Photos 2</b> : bain-marie.....	50
<b>Photos 3</b> : Réfrigérateur.....	50
<b>Photos4</b> :lecteur d'EIISA.....	51
<b>Photos 5</b> : ADN finale après la précipitation d'ADN.....	58
<b>Photos 6</b> : dosage d'ADN.....	59
<b>Photos 7</b> : l'appareillage de TaqMan.....	64

# Liste tableaux

<b>Tableau 1:</b> Principales espèces réactives de l'oxygène.....	8
<b>Tableau 2:</b> les étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des ERO ou ROS .....	15
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques des enzymes NOS humaines.....	19
<b>Tableau 4:</b> Caractéristiques démographiques des patients PR et des contrôles.....	47
<b>Tableau 5 :</b> Références des AD Mix TaqMan utilisés dans cette étude.....	62
<b>Tableau 6 :</b> mélange réactionnels pour PCR.....	63
<b>Tableau 7 :</b> Programme de la PCR.....	64
<b>Tableau 8 :</b> les résultats de Single NucleotidePolymorphism d'INOS rs8078340A/G.....	73
<b>Tableau 9 :</b> les résultats de Single NucleotidePolymorphism d'INOS rs2779251A/G.....	74

# *Sommaire*

# Table des matières

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des photos**

**Introduction**

## **Partie théorique**

### **Chapitre 1 : I. Le stress oxydatif**

I.1	définition.....	3
I.2	sources de stress oxydatif.....	4
I.2.1	Sources endogènes.....	4
I.2.2	Sources exogènes.....	5
I.3	les radicaux libres.....	6
I.3.1	les différents types des radicaux libres .....	7
I.3.1.1	les espèces oxygénées activées radicalaires.....	8
-	anion super oxyde.....	8
-	Le radical hydroxyl.....	9
-	L'oxyde nitrique.....	9
I.3.1.2	les espèces oxygénées activées non radicalaires.....	11

	- L'oxygène singlet.....	11
	- Le peroxyde d'hydrogène.....	11
	- Le Peroxynitrite.....	12
	- L'acidehypochlorique.....	12
I.3.2	la production des radicaux libre.....	12
I.3.2.1	Mitochondrie.....	12
I.3.2.2	Peroxisome .....	15
I.3.2.3	Les microsomes .....	15
I.3.2.4	Le cytosol .....	15
	- La xanthine oxydase .....	16
	- La NO-synthèse .....	16
I.4	Les cibles biologiques du stress oxydatif .....	21
I.4.1	L'acide désoxyribonucléique.....	21
I.4.2	Les protéines .....	22
I.4.3	Les lipides.....	23
I.4.4	Les glucides.....	25
I.5	Les marqueurs biologiques du stress oxydatif.....	25
I.5.1	l'oxydation de l'ADN.....	25
I.5.2	l'oxydation des protéines .....	26
I.5.3	Peroxydation lipidiques .....	27

## **Chapitre II : systèmes antioxydants**

II	Systèmes antioxydants .....	28
II.1.	Systèmes enzymatiques .....	28
II.1.1	Superoxydedismutase.....	29
II.1.2	Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) .....	30
II.1.3	Catalase.....	31
II.2	Systèmes non enzymatiques .....	31
II.2.1	Oligoélément.....	31
II.2.2	Glutathion .....	32
II.2.3	Ubiquinones et cytochrome C .....	32
II.2.4	Vitamine E et vitamine C.....	32
II.3	la balance du système antioxydants et le stress oxydatif.....	34

## Chapitre III : le stress oxydatif et polyarthrite rhumatoïde

III	La polyarthrite rhumatoïde .....	36
III.1	Définition.....	36
III.2	Les origines et causes de la polyarthrite rhumatoïde.....	37
III.3	Mécanismes lésionnels du polyarthrite rhumatoïde.....	38
III.4	Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde .....	39
III.5	Auto anticorps de polyarthrite rhumatoïde.....	41
III.5.1	Facteur rhumatoïde.....	41
III.5.2	Anticorps anti-peptides citrullinés .....	42
III.5.3	Anticorps antinucléaires.....	43
III.6	La relation entre stress oxydatif et la polyarthrite rhumatoïde .....	43

## Partie pratique

### Chapitre IV : Matériel et méthode

	Objectif.....	45
IV.1	Lieu d'étude .....	47
IV.2	population étudiée.....	47
IV.3	Prélèvement sanguins.....	48
IV.4	Matériel de laboratoire.....	49
IV.5	Méthodes utilisées.....	52
IV.5.1	Recherche les anticorps anti CCP .....	52
IV.5.2	Dosage du Facteur Rhumatoïde .....	55
IV.5.3	Etude des polymorphismes des gènes de NOS2 .....	56
IV.5.3.1	Extraction d'ADN par la technique du Salting out .....	56
IV.5.3.2	Dosage de l'ADN extrait .....	59
IV.5.3.2	Etude du Single Nucleotide Polymorphism (SNP) par la technologie TaqMan .....	60

## **Chapitre V : résultats et discussion**

V.1	Répartition des patients selon le sexe .....	67
V.2	Répartition des patients selon l'âge.....	68
V.3	Etudes des marques biologiques.....	69
	V.3.1 Anticorps anti-CCP.....	69
	V.3.2 Facteurs rhumatoïdes.....	70
	V.3.3 Valeurs diagnostiques du FR et des anti-CCP.....	71
V.4	Etude des polymorphismes des gènes de NOS2.....	72

### **Conclusion**

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**



# *Introduction*

# Introduction

---

## Introduction

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies. Après diffusion au niveau des alvéoles pulmonaires, l'oxygène est fixé par l'hémoglobine des érythrocytes qui le transportent aux organes où il diffuse jusqu'aux mitochondries. Une bonne captation d'oxygène par les tissus à partir du sang nécessite leur irrigation par les capillaires. (1)

Au niveau mitochondriale le rôle principal de l'oxygène moléculaire c'est de donner de l'énergie à l'organisme via la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate). 95 à 99% de l'oxygène consommé est réduit pour produire de l'ATP à haut potentiel énergétique. Toutefois, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des espèces oxygénées activées (EOA), Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), ou le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'oxygène singulet ( $O_2$ ), (2) (3)

La production des espèces oxygénées activées (EOA) est proportionnelle à la consommation d'oxygène, Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription et la transduction de signaux cellulaires, au fonctionnement de certaines enzymes et la vasodilatation des vaisseaux et à la différenciation cellulaire... (2) (4)

Un système de défense antioxydant est capable de faire face et le détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance antioxydants/proxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et système de défense est à l'origine d'un état rédox altéré de la cellule appelé stress oxydatif. (5)

Le mot «stress oxydatif » n'a pas la même signification que le stress psychique ou psychosocial, il s'agit d'une agression chimique oxydative, de notre organisme. Car le stress physiologique a été défini comme une réponse physiologique de l'organisme à une situation

## ***Introduction***

---

épuisante, dangereuse ou angoissante et le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires Irréversibles (6) (7)

Le stress oxydatif est un des facteurs importants dans le déclenchement de différentes maladies par une production en excès des radicaux libres et les potentiels des antioxydants dans le corps.

Le stress oxydatif est impliqué dans le vieillissement mais aussi dans de nombreuses pathologies.

Il est aussi important de bien distinguer que le rôle de stress oxydatif dans la genèse de différentes pathologies (8)

### **Les maladies dues à une production insuffisantes de radicaux libres**

- Agreanulomatose septiques
- Psoiasis

### **Les maladies où le stress oxydant est la cause primordiale**

- Cancers
- Dégénérescence maculaire
- Photo-vieillissement cutané
- Hémochromatose .....

### **Les maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs**

- Alzheimer
- Maladies virales : HVB .EBV
- Athérome
- Insuffisance respiratoire
- Polyarthrite rhumatoïde.....

### **Les maladies entrainant un stress oxydant secondaire**

- Diabète
- Insuffisance rénale
- Infarctus du myocarde ....

# ***Partie théorique***

# *Chapitre I : le stress oxydatif*

Chapitre I : le stress oxydatif

I. Le stress oxydatif

I.1 Définition

Le stress oxydatif appelé aussi stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants. Il se développe lorsque les radicaux libres des molécules oxydantes sont produites plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme. Les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partie de l'oxygène moléculaire. Il retrouvera sa stabilité en participant à des réactions chimiques dont les conséquences sont l'oxydation des lipides membranaires, l'oxydation des acides aminés composant les protéines, l'oxydation des glucides et l'oxydation des acides nucléiques (3)(Figure 1)

De façon générale, l'excès des radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. (3)

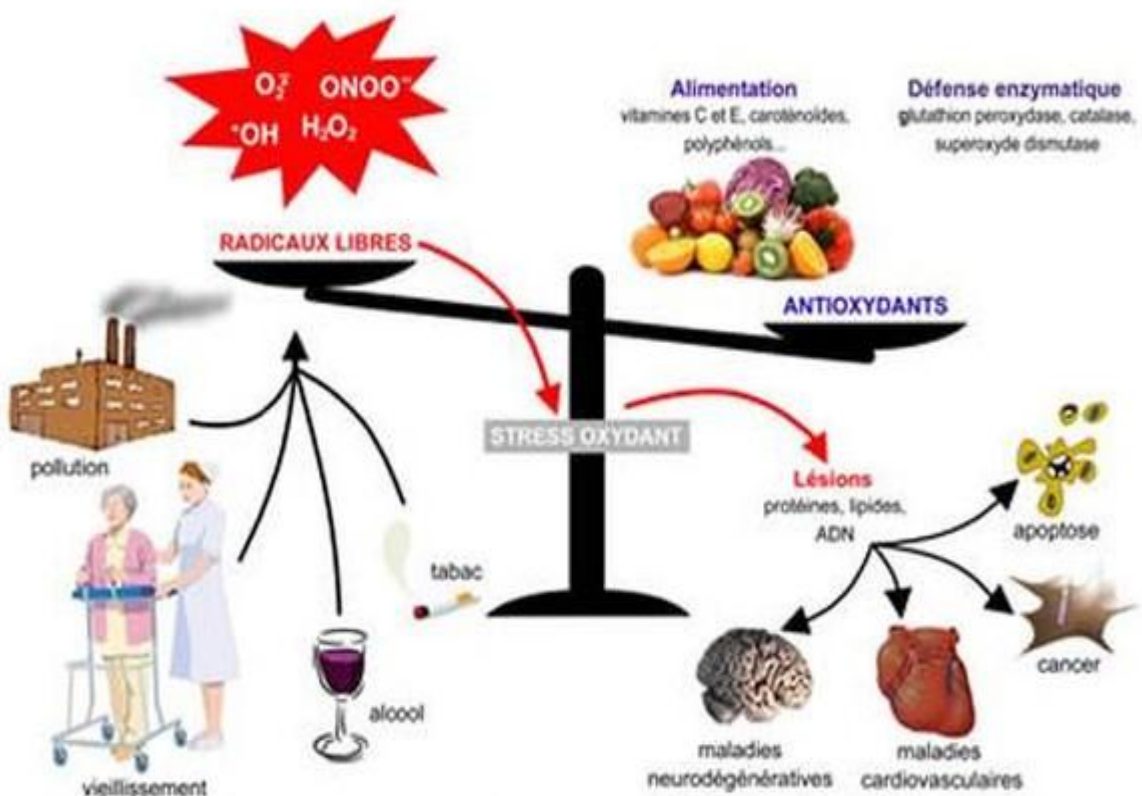
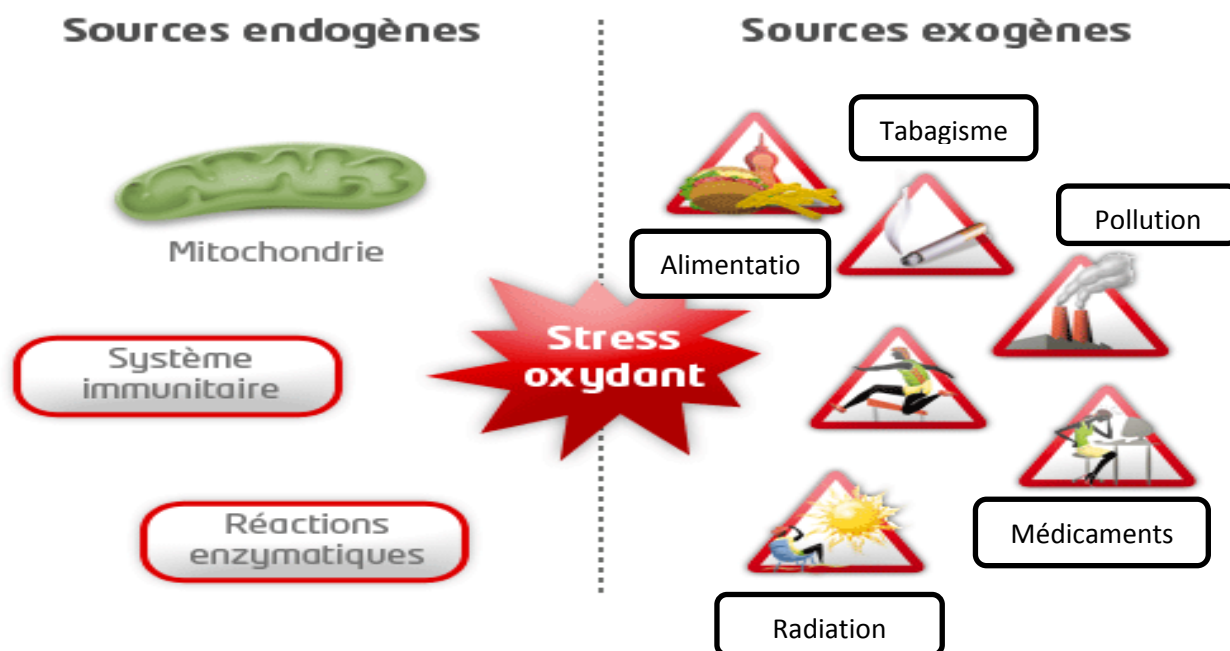


Figure 1 : Balance radicaux libres / antioxydants

Figure 1 : la balance pro-oxydants et antioxydants(9)

## I.2 Sources de stress oxydatif

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes (Figure 2)



**Figure 2 :** Sources de stress oxydant endogènes et exogènes (33)

### I.2.1 Source endogènes ou intérieurs

Les cellules de notre système immunitaire, tels les macrophages, sont une source interne de radicaux libres, dans le cadre de la réponse immunitaire. C'est également une des raisons pour laquelle, un système de défense antioxydant en bon état, capable de contrôler les radicaux libres, est également associé au bon fonctionnement du système immunitaire.

Une autre source interne de radicaux libres provient de notre respiration. Nous utilisons de l'oxygène moléculaire pour produire de l'énergie, durant ce processus, 0.4-4% de cet oxygène est mal contrôlé et produit des radicaux libres dérivés de l'oxygène, souvent connus sous leur abréviation anglaise: ROS, pour Radical Oxygen Species ou EOA.

Une troisième source de radicaux libres internes concerne la réaction des cellules à des processus inflammatoires. Comme dans le cas de la réponse immunitaire, la production de

radicaux libres correspond à un mécanisme de défense contre une agression. Ce processus est paradoxal, puisqu'il provoque lui-même une agression, qui lorsqu'elle n'est pas contrôlée, se développe en cascade et de façon relativement rapide (cascade oxydative: l'oxydation d'une espèce entraînant l'oxydation d'une autre espèce de façon cumulative). (10)

### I.2.2 Source exogènes ou extérieurs

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve:

- L'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, faible consommation d'antioxydants(3)
- Le CO<sub>2</sub> atmosphérique. (3)
- Les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, hydrocarbures), métaux occupationnels (métaux de transition tels le mercure, le fer, le cadmium et le nickel). Les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydriles (-SH), ils inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (3) (13)
- Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène). Un certain nombre de médicaments, notamment l'adriamycine, la bléomycine ...constituent une source renouvelable de radicaux libres, grâce à des phénomènes de recyclage,
- Les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes). L'irradiation peut affecter les acides nucléiques par l'intermédiaire de réactions physicochimiques complexes qui ont lieu dans leur environnement proche . (3.13)
- L'absorption dermique (insecticides, médicaments). (3)

Donc nous sommes tous les jours constamment exposés aux radicaux libres, qu'ils soient produits par nos cellules ou proviennent de notre environnement. Dans le cas d'une production et/ou exposition prolongée ou trop grande aux radicaux libres, les conséquences sont défavorables et sont à l'origine de dysfonctionnements cellulaires qui peuvent conduire au vieillissement accéléré et à plusieurs maladies (10)

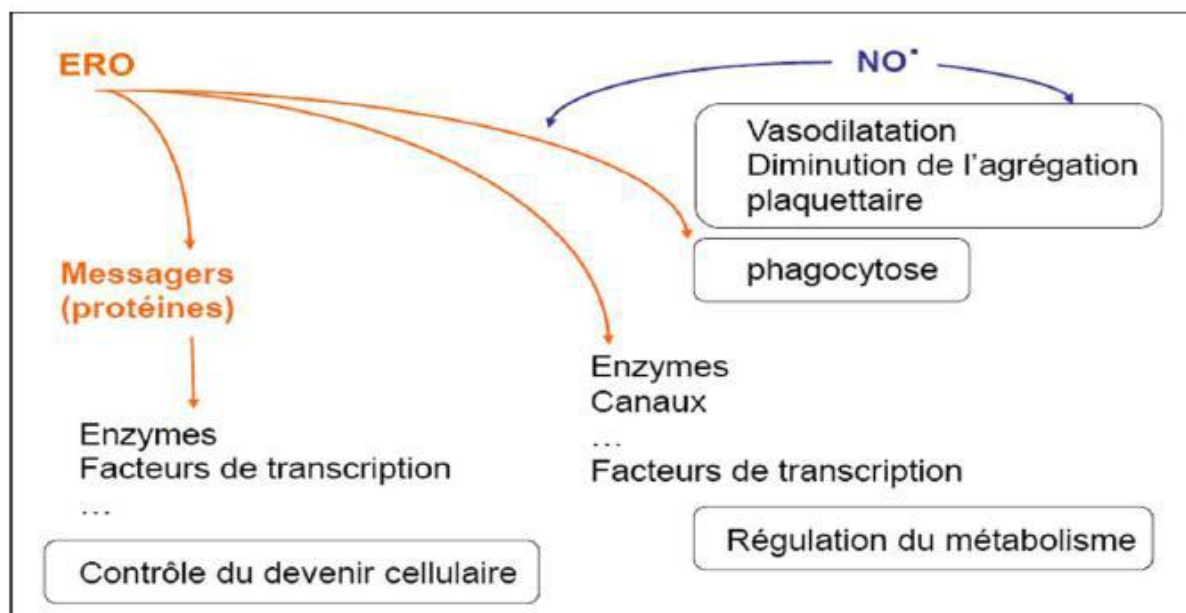


### I.3 Les radicaux libres :

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais la production peut devenir excessive ou résulter des phénomènes toxiques exogènes et/ou endogènes. L'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. (11)

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme médiateurs tissulaires ou résidus des réactions énergétiques ou de défense, cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales. On dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (11) (figure 3).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou électron non apparié) sur leur couche externe (12).



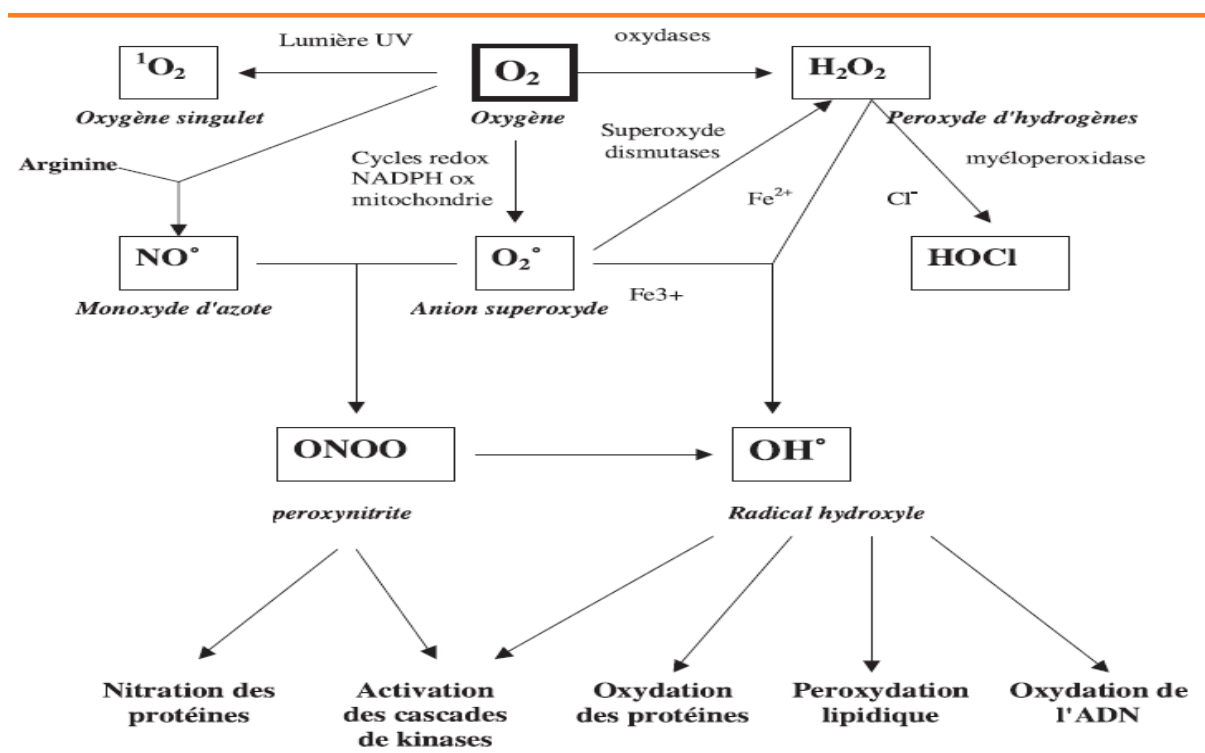
**Figure 3 :** Rôles physiologiques des espèces réactives (13)

## I.3.1 Les différents types des radicaux libres

Parmi les composés oxydants formés après réduction de l'oxygène que nous respirons. On distingue :

- **Les radicaux libres primaires :** ils dérivent directement de l' $O_2$  par une réaction de réduction.
- **Les radicaux libres secondaires :** ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires.
- **Les espèces actives de l'oxygène :** ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres.(15)

Les radicaux libres primaires et secondaires et les espèces actives de l'oxygène sont regroupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO ou EOA (ou « ROS » en anglais pour Reactive Oxygen Species).(Figure 4)



**Figure 4 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et les EOA(11)

## Chapitre I : le stress oxydatif

Les ERO comprennent l'oxygène singulet ( $O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'ozone ( $O_3$ ). Selon les auteurs, ils incluent également le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ), l'anion peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ), également désignés espèces réactives de l'azote (ERN), et les radicaux peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) et alkoxydes ( $RO^{\cdot}$ ). Les principales ERO sont énumérées dans le tableau 1 :

**Tableau 1** : Principales espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Radicaux libres (RL)	Espèces réactives non radicalaires
Anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )	
Hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )	Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) Acide hypochlorique ( $HOCl$ )
Hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ )	Ozone ( $O_3$ )
Peroxyde ( $RO_2^{\cdot}$ )	Oxygène singulet ( $O_2$ ) Hydroperoxyde ( $ROOH$ )
Alkoxyde ( $RO^{\cdot}$ )	Peroxydinitrite ( $ONOO^-$ )
Dioxyde de carbone ( $CO_2^{\cdot-}$ )	

### I.3.1.1 Les espèces oxygénées activées radicalaires

#### - Le radical anion super oxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire.



Il est produit en grande quantité dans les macrophages pendant la destruction bactérienne (phagocytose), dans la chaîne respiratoire mitochondriale (phosphorylation oxydative) et dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes. La réactivité et le pouvoir oxydant de l' $O_2^{\cdot-}$  sont faibles, mais son pouvoir réducteur en présence des métaux de transition (fer, cuivre et zinc) présents dans les sites actifs des enzymes est la base de la formation d'espèces plus réactives. Dans cette

logique, il est désormais bien établi que le radical super oxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) est le principal précurseur conduisant à la formation d'un puissant radical libre qui est le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). (13)

L'anion super oxyde  $O_2^{\cdot -}$  joue un rôle très important dans la génération d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , et l'oxygène singlet  $^1O_2$

L'anion super oxyde est capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique (13)

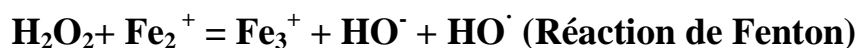


### - Le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ )

C'est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est le produit de la réaction de l'anion super oxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) avec l'hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ ).



Ainsi la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène donne deux radicaux hydroxyles. Cette fission peut être causée par la chaleur ou par des radiations ionisantes. Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton. C'est ce qu'on appelle réaction d'Haber-Weiss. Haber et Weiss, qui proposèrent le concept selon lequel le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ).  $OH^{\cdot}$  pouvait être généré suite à l'interaction entre  $O_2^{\cdot -}$  et  $H_2O_2$  (13)



### - L'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ )

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz incolore à température ambiante et l'une des molécules simples connues, mais il est impliqué dans une large variété de mécanismes de régulation allant de la vasodilatation, le contrôle de la pression artérielle jusqu'à la neurotransmission. Il est également impliqué dans l'immunité non spécifique et participe dans de complexes

## Chapitre I : le stress oxydatif

---

mécanismes des lésions tissulaires étant qu'il est considéré comme un médiateur majeur du processus inflammatoire et de l'apoptose (40).

$\text{NO}\cdot$  a, dans les milieux aqueux, une demi-vie de quelques secondes. Cependant, cette dernière peut dépasser les quinze secondes si la concentration en  $\text{O}_2$  est faible. Il s'agit d'une demi-vie élevée pour une espèce radicalaire ce qui lui confère une dangerosité potentielle en lui permettant de diffuser et d'agir au sein des cellules de l'organisme (15).

Le radical oxyde nitrique ( $\text{NO}\cdot$ ) ou monoxyde d'azote, est produit par diverses cellules à partir de l'arginine et de l'oxygène dans une réaction catalysée par des NO synthases constitutives et induites, présentes au sein des cellules endothéliales, vasculaires et neuronale ainsi que dans les macrophages et les neutrophiles. Même si le  $\text{NO}\cdot$  n'est pas un ERO comme la majorité de ces molécules, il possède des capacités oxydantes et peut avoir des propriétés néfastes vis-à-vis des cellules. Toutefois, il est bien établi que le  $\text{NO}\cdot$  étant hydrosoluble et liposoluble, il diffuse aisément au travers des membranes biologiques et provoque des effets néfastes sur le système nerveux central en altérant la plasticité synaptique et il peut agir comme une molécule de signalisation clé et comme neurotransmetteur puisqu'il favorise la relaxation endothéliale, régule le tonus vasculaire et la régulation de la pression sanguine (activation de la guanylate cyclase) et participe à la transduction du signal au niveau neuronal et la régulation de l'immunité. (13)(15).

Le radical  $\text{NO}\cdot$  représente la principale espèce radicalaire contenant un atome d'azote qui dans les conditions aérobies est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner naissance au radical dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2\cdot$ ).



Du fait de son grand pouvoir oxydant, le  $\text{NO}_2\cdot$  est impliqué dans plusieurs voies oxydatives, incluant la peroxydation lipidique au sein des molécules de cholestérol (LDL) en circulation et la peroxydation des protéines. (13)

### I.3.1.2 Les espèces oxygénées activées non radicalaires

#### - L'oxygène singlet ( $O_2$ )

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène  $O_2$  : il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état d'excité lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (13)

#### - Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  n'est pas une espèce radicalaire, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. De ce fait son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut diffuser dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau, ce qui en fait un ERO assez toxique. C'est un oxydant impliqué notamment dans la voie de l'apoptose

Le peroxyde d'hydrogène est produit à partir du radical super oxyde en solution aqueuse. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire. Cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase.(13)



#### - Le Peroxynitrite ( $ONOO^-$ )

La réaction du  $NO\cdot$  avec l'anion super oxyde donne naissance au peroxynitrite. Le peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Le Peroxynitrite apparait comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales.

Le peroxynitrite ( $OONO^-$ ) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotées des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle. (13)



### - L'acide hypochlorique (HOCl)

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant (13).



### I.3.2 La production des radicaux libres in vivo

Plusieurs inclusions intracellulaires sont des sièges importants pour la production des radicaux libres comme la mitochondrie, les microsomes, le cytosol(13) (Figure 5)

**Les mitochondries sont la principale source de production de radicaux libres**

Mitochondries	microsome	peroxysome	cytosol
45%	20%	30%	5%

**Exception pour le foie, où les microsomes sont les principaux producteurs**

Mitochondries	microsome	peroxysome	cytosol
15%	45%	35%	5%

**Figure 5:** le pourcentage de production des radicaux libres in vivo (16)

#### I.3.2.1 Mitochondrie

La mitochondrie est un organe intracellulaire qui est responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP ; elle est considérée comme une des principales sources des radicaux libres dans la cellule pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Au niveau de la membrane des mitochondries ; les composés réduits issus du cycle de Krebs (NADH et FADH<sub>2</sub>) sont oxydés, libérant de l'hydrogène (H<sup>+</sup>) et des électrons.

## Chapitre I : le stress oxydatif

Les électrons sont transférés le long de la chaîne de phosphorylation oxydatif au cours des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H<sub>2</sub>O

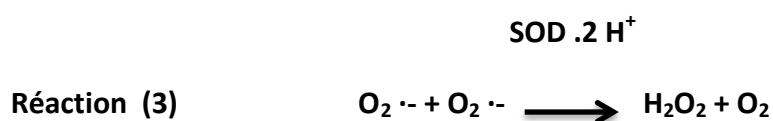


Environ 0.4-4 % de l'oxygène subit une réduction univalente conduisant à la formation du radical superoxyde.(13)



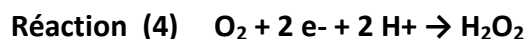
De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMN<sub>H2</sub>, FAD<sub>H2</sub>), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique.

Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3))

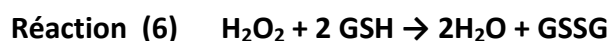
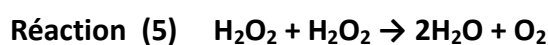


L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (4)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

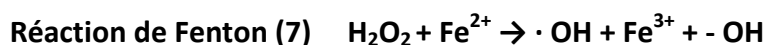




L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (5)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (6)).

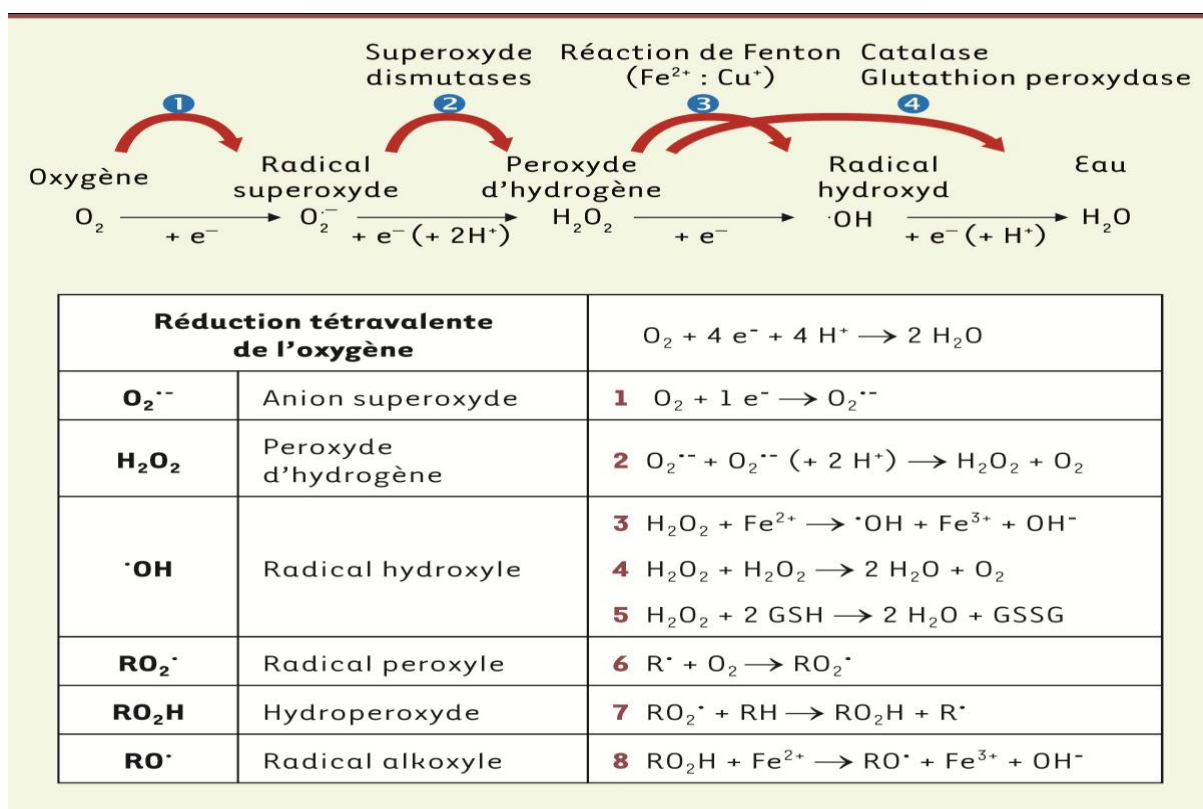


La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$  en présence de cations métalliques tels que  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction (7), dite de Fenton) ou  $\text{Cu}^+$



**Remarque :** le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  et l'anion basique  $\text{OH}^-$  sont tous deux formés au cours de la réaction (7). Toutefois, ce sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque l'une ( $\text{OH}^-$ ) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre ( $\text{OH}\cdot$ ) a un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette différence de structure électronique (17) (Tableau 2)

**Tableau 2 :** les étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des ERO ou EOA



### I.3.2.2 Peroxysome

Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  car cet organite contient de nombreuses enzymes générant du  $H_2O_2$ . Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de  $H_2O_2$  produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (13).

### I.3.2.3 Les microsomes

L'auto-oxydation du cytochrome P450 et l'oxydation du NADPH par le NADPH déshydrogénase sont les deux principales sources de production d' anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  (13)

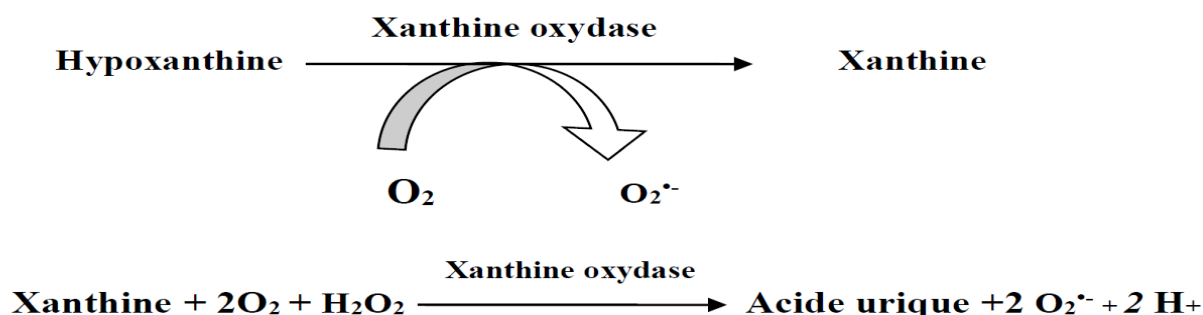
### I.3.2.4 Le cytosol

C'est la localisation des différentes réactions enzymatiques responsables à la production des radicaux libres.(13)

#### - La xanthine oxydase

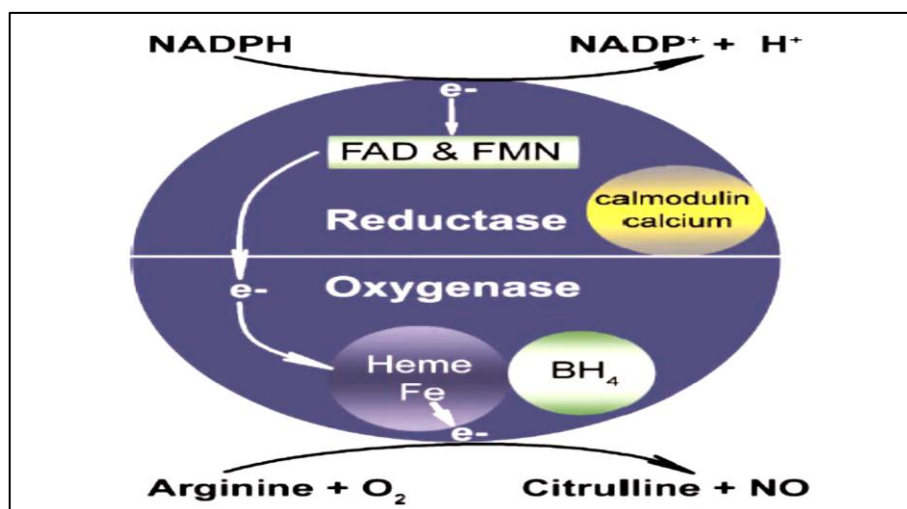
La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique soluble qui génère des ERO en réduisant l'Hypoxanthine en xanthine. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la

xanthine en acide urique. La production d'ERO par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais joue un rôle important lors de d'ischémie-reperfusion(13)

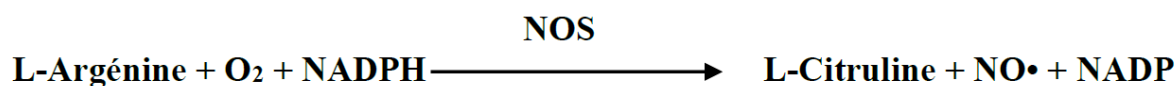


### - La NO-synthase

Beaucoup des cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote  $\text{NO}\cdot$  à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase (NOS). Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans le tonus vasculaire (13)



**Figure 6 :** Génération du NO à partir de la L-arginine (41).



➤ **Les isoformes de la NO synthase :** on a 3 isoformes :

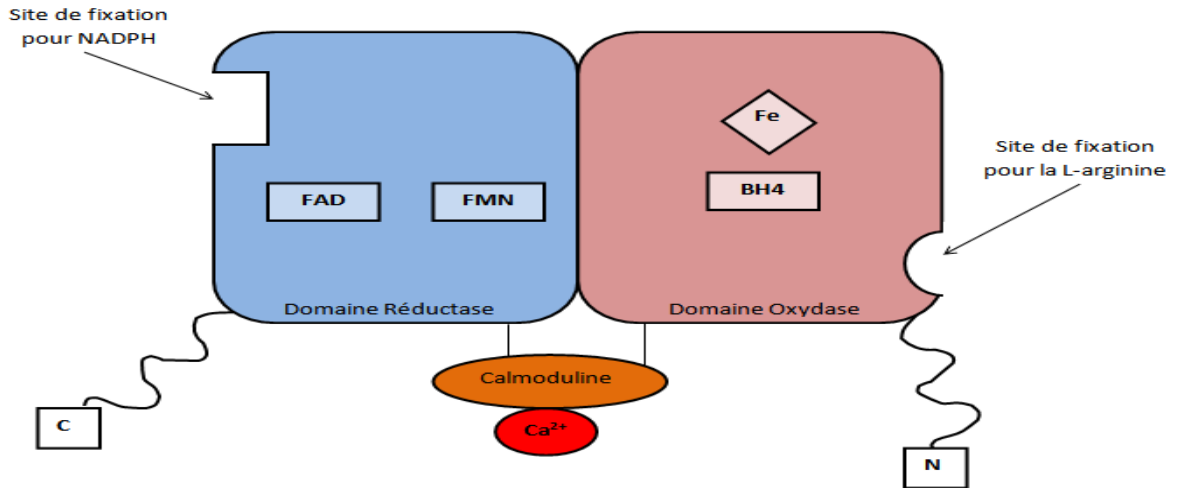
- La NOS neuronale (nNOS) exprimée de manière constitutive et prédominante dans le cytoplasme des cellules du système nerveux central. Elle est activée par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire

- La NOS inductible (iNOS) présente dans le cytoplasme des macrophages (mais aussi, en moindre mesure, dans les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules pancréatiques et les cellules endothéliales). Elle aussi est activée par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, après action d'un stimulus proinflammatoire ( $TNF\alpha$ , IL-1,  $IFN\gamma$ , lipopolysaccharide bactérien...). précisent que c'est la stimulation des lipopolysaccharides, des cytokines et d'autres agents qui induit l'expression de la NOS inductible des macrophages.

- La NOS endothéliale (eNOS) , exprimée de façon constitutive et associée aux membranes plasmiques et à l'appareil de Golgi des cellules endothéliales, des plaquettes et des cellules mésangiales rénales. Elle est également activée par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. (15)

### ➤ Structure des NO synthases

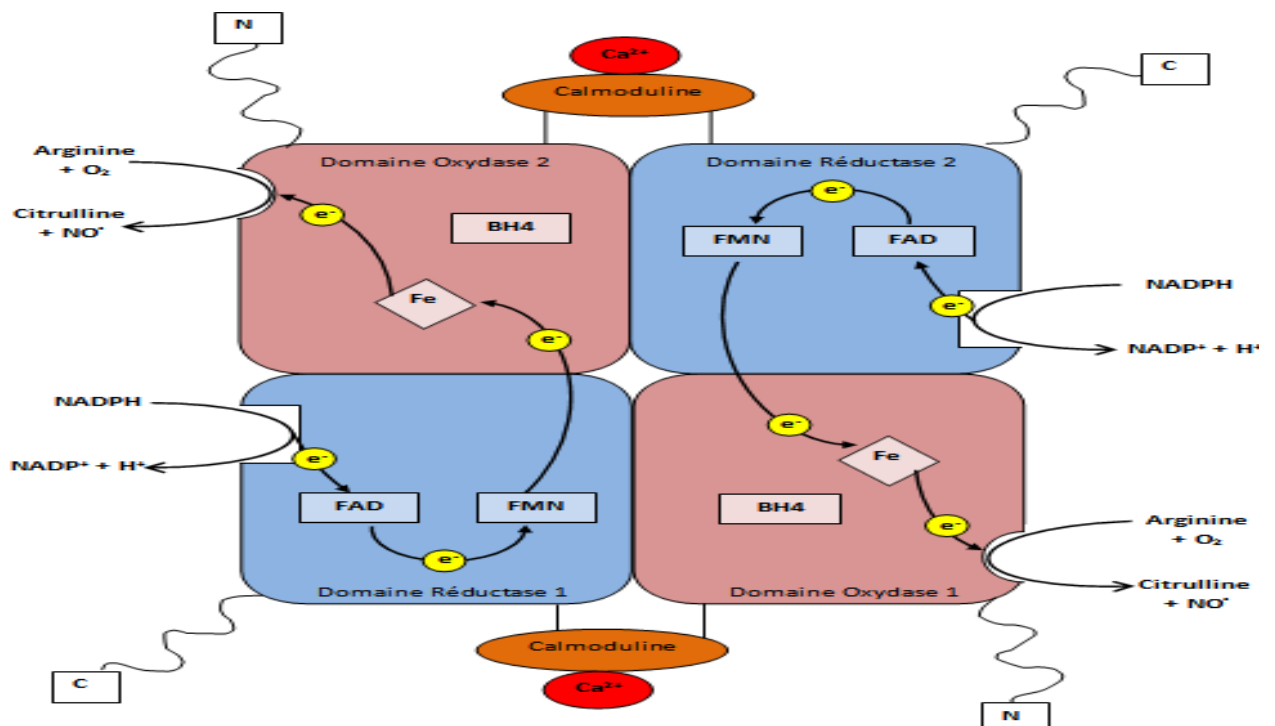
Les NOS sont associées en dimères et donc, formées de deux sous unités. Chaque sous unité, représentée sur la Figure 7, possède deux domaines : un domaine réductase à l'extrémité C-terminale et un domaine oxydase à l'extrémité N-terminale. Le domaine réductase possède deux flavines (FMN pour flavine mono nucléotide et FAD pour flavine adénine dinucléotide) et un site de fixation pour le NADPH. Le domaine oxydase possède un hème, un coenzyme particulier : la tétrahydrobioptérine (BH4) et un site de fixation pour la L-arginine. Les deux domaines sont reliés par un pont protéique capable de fixer une molécule de calmoduline. (15)



**Figure 7 :** Structure d'une sous-unité d'une NO synthase (15)

➤ **Cycles réactionnels**

Le flux d'électrons au sein du dimère s'effectue du domaine réductase d'une sous unité au domaine oxydase de la deuxième sous unité (Figure 8). NADPH est le donneur d'électrons initial puis les flavines permettent de donner transférer les électrons un par un, l'hème ne pouvant en accepter qu'un seul à la fois. Il semblerait que le domaine oxydase reçoive l'arginine puis un premier électron transféré depuis le NADPH puis le dioxygène et enfin, un deuxième électron transféré du BH<sub>4</sub>



**Figure 8 :** Flux d'électrons dans les NOS (15).

## Chapitre I : le stress oxydatif

La formation d'une molécule de NO° nécessite deux cycles. Tout d'abord, la L-arginine (R=NH) est hydroxylée en N-ω-hydroxyarginine (R=NOH) :



Ensuite, le deuxième cycle d'oxygénation permet la transformation de la N-ω-hydroxyarginine en citrulline, ce qui libère une molécule de NO° :



Au cours du deuxième cycle d'oxygénation, l'hème réagirait avec le substrat lorsque l'oxygène arrive au stade superoxyde. C'est alors le substrat qui fournirait le deuxième électron.

Le monoxyde d'azote produit par deux cycles au sein des NO synthases qui catalysent la réaction de formation est abondant dans les milieux biologiques et possède des actions bénéfiques et délétères pour l'organisme. (15)

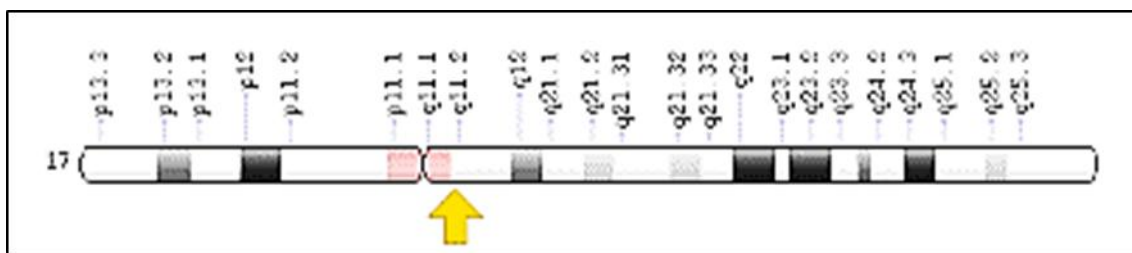
L'enzyme principalement responsable du rôle de NO dans le processus inflammatoire est la NOS inductible (iNOS ; NOS2), (Tableau 3)

**Tableau 3** : Caractéristiques des enzymes NOS humaines (43).

Caractéristiques	Nnos	Enos	Inos
Synonyme	NOS-1	NOS-3	NOS-2
Chromosome	12	7	17
Poids moléculaire (kDa)	1434	1202	1153
Interactions	Zn <sup>2+</sup> , BH <sub>4</sub> , CaM/Ca <sup>2+</sup> , FAD, FMN, hème, Cavéoline-1/3, Hsp90, Domaines PDZ	Zn <sup>2+</sup> , BH <sub>4</sub> , CaM/Ca <sup>2+</sup> , FAD, FMN, hème, Cavéoline-1/3, Hsp90	Zn <sup>2+</sup> , BH <sub>4</sub> , CaM/Ca <sup>2+</sup> , FAD, FMN, hème, Kalirin
Modifications covalentes	Phosphorylation	Phosphorylation, Myristoylation, Palmitoylation	Phosphorylation
Dépendance au Ca <sup>2+</sup>	Oui	Oui	Non
Production de NO	+	+	+++
Principal lieu d'expression	Neurones	Cellules endothéliales	Macrophages

### ➤ Implication du gène NOS2 (iNOS) en tant que facteur génétique

Le gène NOS2 est localisé au niveau du Chromosome 17 (17q11.2-q12), représenté par 27 exons sur une longueur de 40 Kb .Les polymorphismes de ce gène ont été étudiés dans différentes pathologies infectieuses, auto-immunes, neurologiques, allergiques et inflammatoires .Ces single nucléotide polymorphisme( SNPs) se localisent, essentiellement, au niveau de la région promotrice du gène (région régulatrice de la transcription) et pourraient avoir des conséquences sur l'activité pro-inflammatoire et antibactérienne du NO, via NOS2 . (Figure 9)



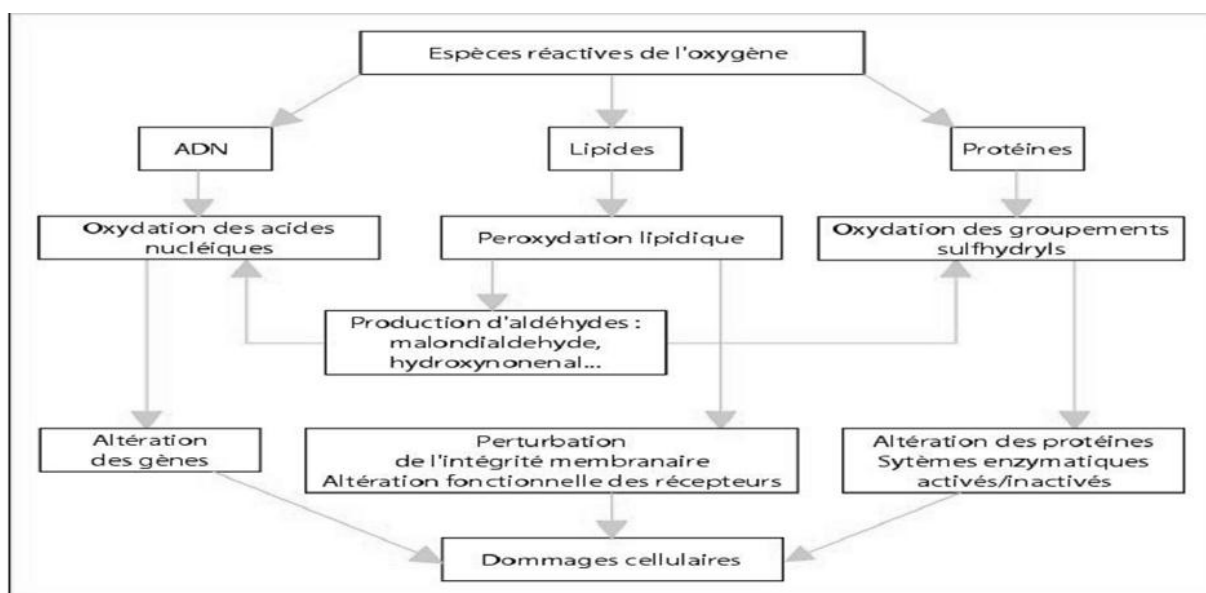
**Figure 9:** Localisation du gène NOS2.

Les SNPs du gène NOS2 ayant un impact fonctionnel sur la quantité ainsi que sur l'activité de l'enzyme sont : substitution A-277G, G-954C (associée à un taux élevé de NO), G-1026T,C-1173T, C-1659T, séquence répétitive tétra-nucléotidique bi-allélique (TAAA)<sub>n</sub> (transcription et expression altérée de NOS2), séquence répétitive hautement polymorphe (9 allèles) penta-nucléotidique (CCTTT)<sub>n</sub> (transcription et expression altérée de NOS2) (47)

### I.4 Les cibles biologiques du stress oxydatif

un stress oxydant dit « léger » entraîne une prolifération cellulaire accrue, un stress oxydant « moyen » provoque une apoptose cellulaire, un stress oxydant « fort » induit une nécrose cellulaire et enfin un stress oxydant « majeur » est responsable de modifications membranaires à l'origine de lyses cellulaires. (15)

La production excessive des ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Figure 10). L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des autoanticorps créant une troisième vague d'attaque chimique



**Figure 10:** Principaux dommages cellulaires induits par les EAO (30)

#### I.4.1 L'acide désoxyribonucléique ou ADN

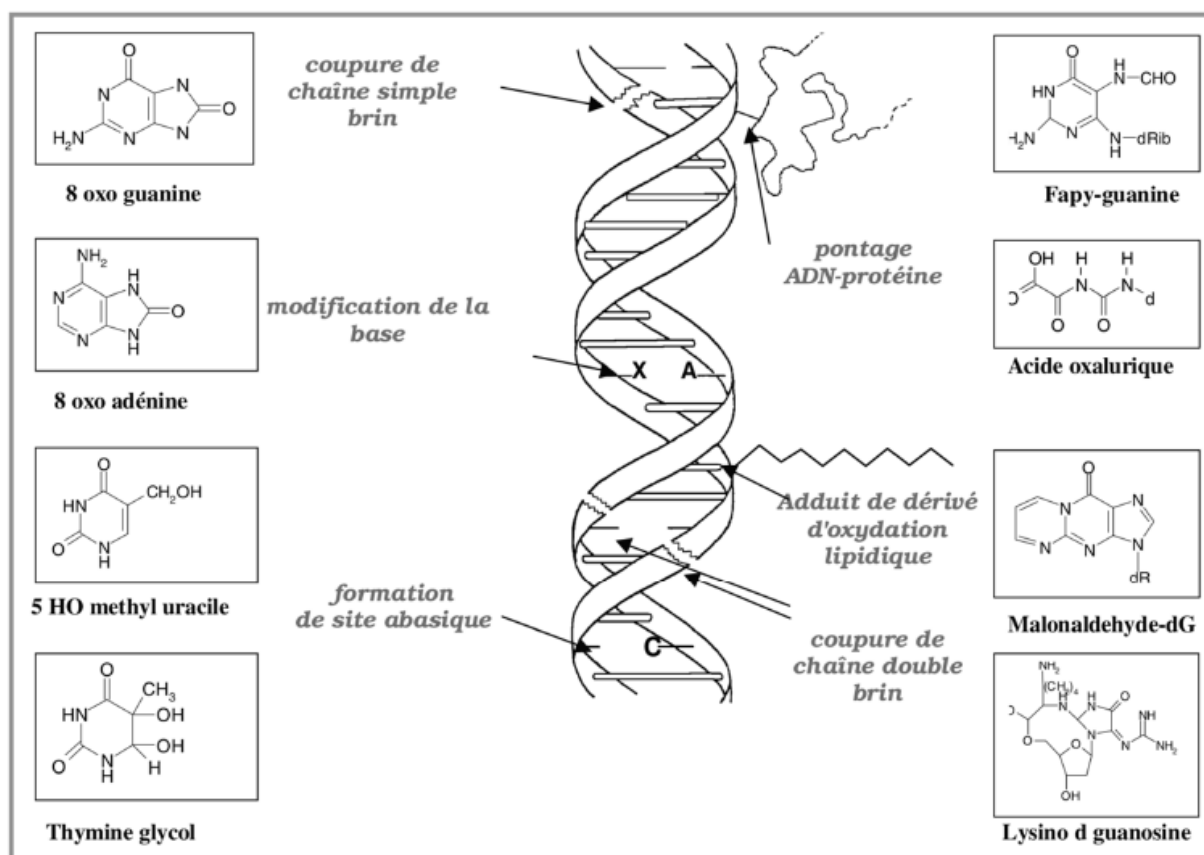
Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par le radical hydroxyle  $\text{OH}^\cdot$  peuvent être générées : les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaux, les cassures



de brins et les pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine sont sensibles à l'oxydation. (30) (Figure 11)

Les lésions des EOA sur l'ADN des cellules sont principalement provoquées par le radical hydroxyle. Le monoxyde d'azote peut également participer à une fragmentation de l'ADN.

Les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent aboutir à une mutagenèse, une perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction provoquant un arrêt des synthèses et pouvant mener à la mort cellulaire. Le stress oxydant accélère et amplifie toutes les lésions spontanées produites sur l'ADN.(15)



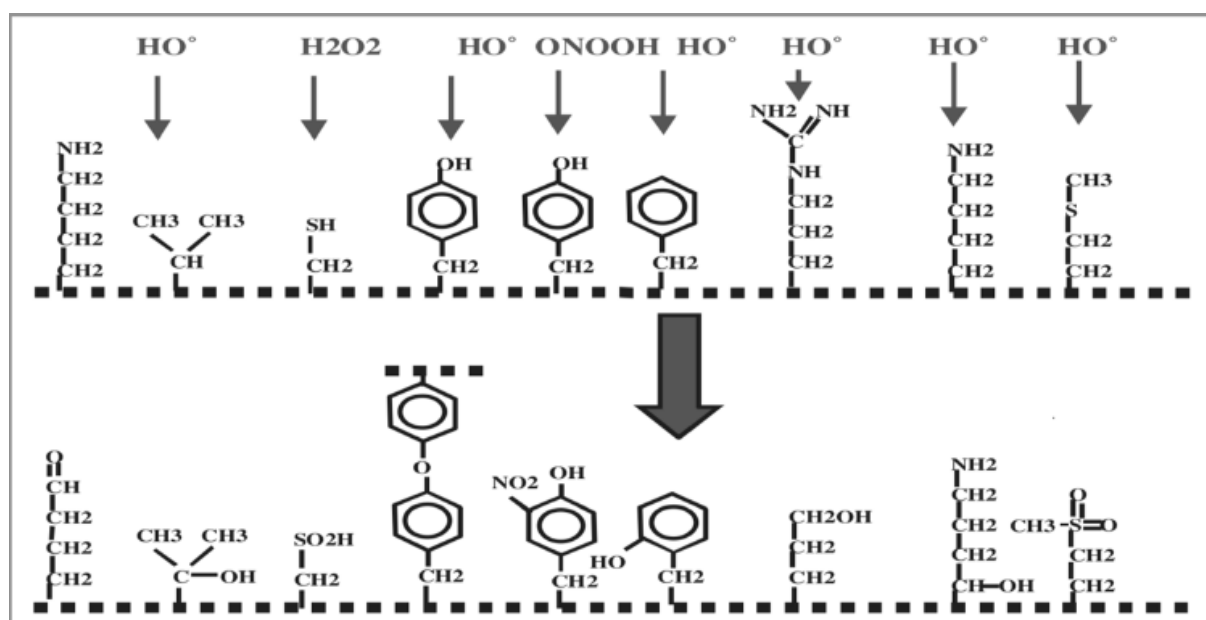
**Figure 11 :** Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (30)

### I.4.2 Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui

vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (Figure 12).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, antienzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés. (2)(30)

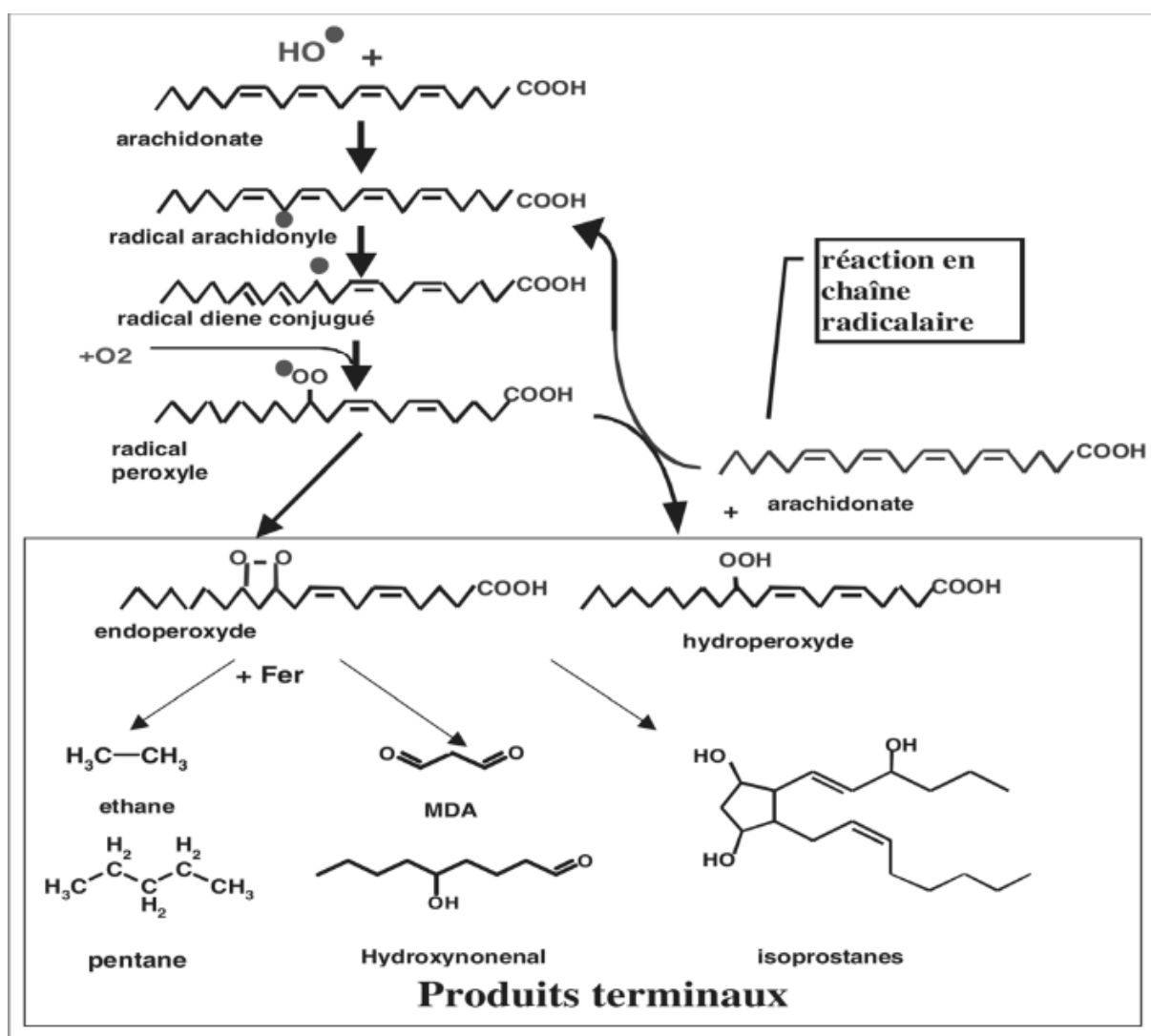


**Figure 12 :** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (30)

### I.4.3 Les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical  $\text{OH}^\bullet$  capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical  $\text{RO}_2^\bullet$ . Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical  $\text{RO}_2^\bullet$  formé se transforme en  $\text{ROOH}$  au contact d'un autre acide gras qui forme un

nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution: être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical RO<sub>2</sub>·, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (HNE) (Figure 13)(30)



**Figure 13 :** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (30)

### I.4.4 Les glucides

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les EOA attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et  $OH^\cdot$ , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant des produits de glycation avancée (ou AGE pour advanced glycation end products). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (30)

### I.5 Les marqueurs biologiques du stress oxydatif (produits d'oxydation)

L'évaluation d'un stress oxydant est proportionnelles par la production des radicaux libres (et ainsi d'avoir une idée du statut pro-oxydant) on peut le mesurer par le dosage de marqueurs biologiquement stables, produits par l'action des espèces oxygénées activées. Lorsqu'ils sont présents en quantité plus importante que les quantités physiologiques dans la circulation ou au sein d'un tissu, ils sont alors les témoins d'un stress oxydant se produisant en amont. (15)

#### I.5.1 l'oxydation de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des EOA. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire. (18)

Les mécanismes explicatifs proposés sont :

- 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial.
- 2°) sa localisation proche de la membrane interne.
- 3°) des mécanismes de réparations frustrés.
- 4°) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (18)

L'oxydation de l'ADN aboutit à la formation de fragments 8-OH-2'-deoxyguanosine (8-OH2DG). Ces derniers sont éliminés par les enzymes de réparation de l'ADN mais si ces systèmes sont défectueux ou dépassés, la 8 OH-2'-deoxyguanosine s'accumulera au sein de l'ADN pouvant causer des mutations.(29)

L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : **8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone.**

Mais le stress oxydatif (SO) peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine. (30)

### I.5.2 l'oxydation des protéines

Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$ .

Peuvent être classées en deux catégories :

- 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.
- 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur. Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les EOA(18)

### I.5.3 Peroxydation lipidiques

. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, **l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonenal (4- HNE)** sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. (18)

La peroxydation lipidique a lieu principalement dans les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires ou dans les acides gras polyinsaturés des lipoprotéines (LDL) Elle entraîne la formation de MDA.(28)

#### ➤ MDA

Le malonedialdéhyde (MDA) est un bon marqueur de la peroxydation lipidique. Seulement MDA n'est pas produit par l'acide Linoléique et ne représente que 1% des produits de décomposition des peroxydes lipidiques(28).

La concentration en MDA serait augmentée :

- Dans le plasma d'Hommes souffrant de diabète sucré
- Dans le plasma de femmes atteintes de pré éclampsie
- Dans le plasma et l'air expiré de patients asthmatiques
- Dans le tissu cérébral d'individus atteints de la maladie de Parkinson
- Dans les lésions d'athérosclérose présentes chez des patients diabétiques.(15)

*Chapitre II:*  
*systemes*  
*antioxydants*

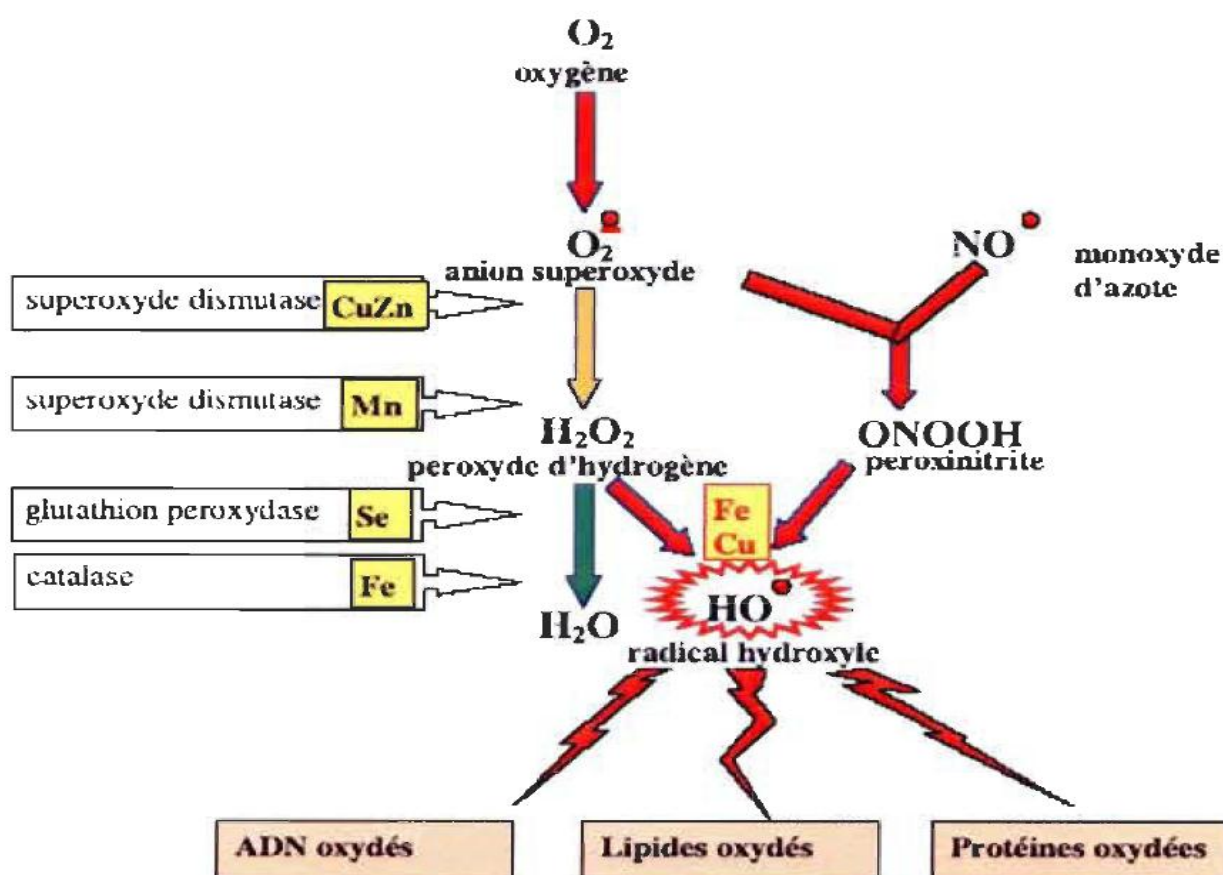
Chapitre II : systèmes antioxydants

II. Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des espèces réactives d'oxygènes (ERO) ou EAO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (18).

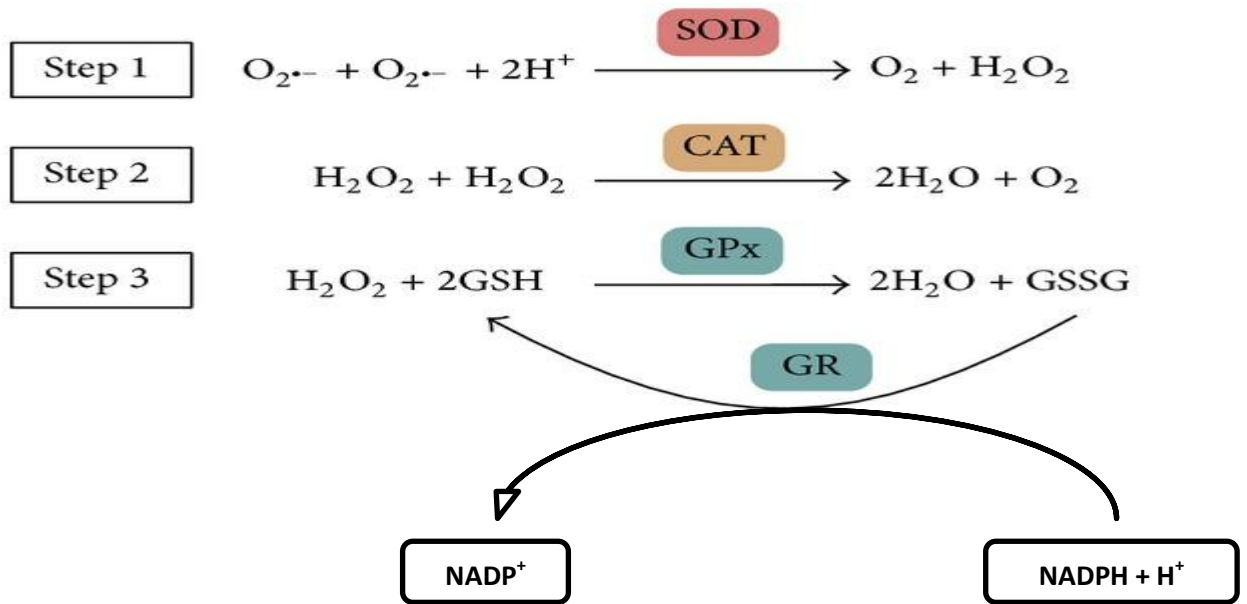
II.1 Systèmes enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase(SOD), la catalase(CAT), la glutathion peroxydase(GPx) et la glutathion réductase(GR)) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EAO. (Figure 14) (Figure 15)



**Figure 14:** Principaux systèmes enzymatiques antioxydants impliqués dans le contrôle des EAO (30)





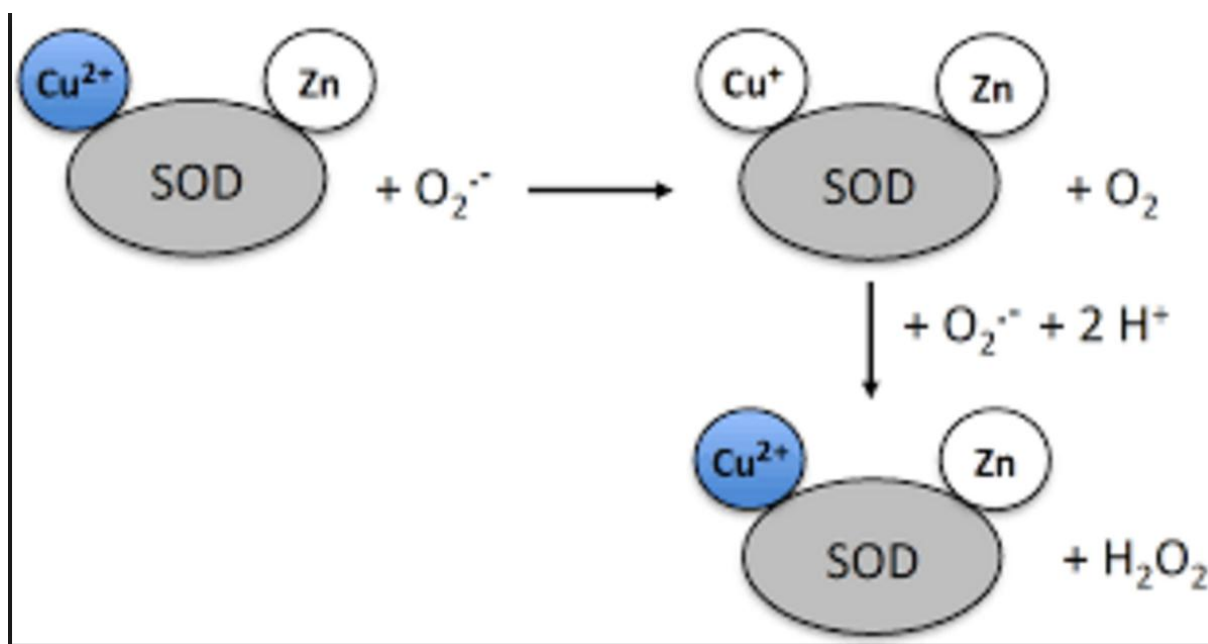
**Figure 15:** les principales réactions enzymatiques d'antioxydants (33)

### II.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante « anti- $O_2^{\bullet-}$  » la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée, L'absence de cette enzyme peut être létale. La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en dioxygène et  $H_2O_2$  selon la formule :



La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire. (Figure 16) (18)(30)



**Figure 16 :** schéma des défenses antioxydants enzymatiques par SOD (33)

### II.1.2 Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (18).

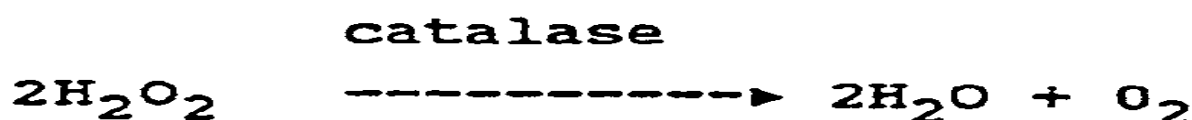
La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. (Figure 17)



**Figure 17 :** schéma du fonctionnement de Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)  
(34)

### II.1.3 Catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d' $H_2O_2$  par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.(18)



## II.2 Systèmes non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome C et les vitamines E et C.(18)

### II.2.1 Oligoéléments

Le cuivre (**Cu**), le zinc (**Zn**), le manganèse (**Mn**), le sélénium (**Se**) et le fer (**Fe**) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes anti oxydantes

requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent être très grave pour l'organisme et se solder par un diabète, des douleurs abdominales, des troubles hormonaux .... (18)

### II.2.2 Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (18).

### II.2.3 Ubiquinones et cytochrome C

les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de EOA. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les EOA.

Le cytochrome C présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O<sub>2</sub> •- produit au niveau de la chaîne respiratoire. (18)

### II.2.4 Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. (18)

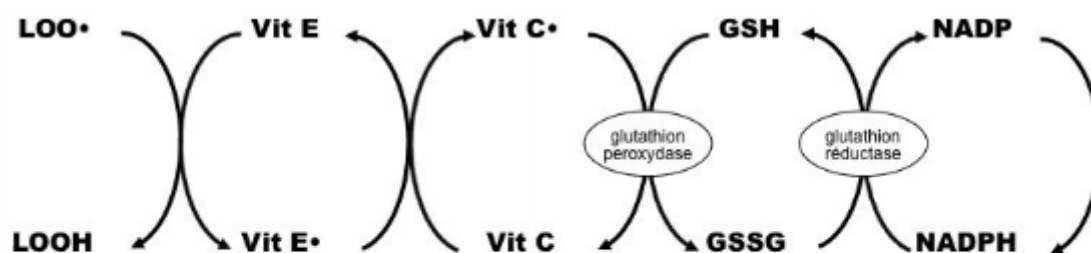
Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme.

## Chapitre II : systèmes antioxydants

Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' $\alpha$ -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet ( $O_2$ ) en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec, le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes (ROO) pour former un radical tocophéryle. L' $\alpha$ -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies; d'une part, la vitamine C, ou l'acide ascorbique, est capable de réduire le radical tocophéryle, d'autre part, une enzyme spécifique, glutathion dépendante, la tocophéryle réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en  $\alpha$ -tocophérol. Parallèlement, le glutathion à l'état réduit (GSH) est oxydé en glutathion oxydé (GSSG). Ce métabolisme implique la participation de la vitamine B2, cofacteur de la glutathion réductase, nécessaire à la régénération du GSH après son oxydation par le radical tocophéryle(19)

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux. Le produit formé est le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (figure 18) (19)

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $OH^\bullet$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E. (18)



### Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.

LOO $\bullet$ : Radical peroxyde lipidique; LOOH: hydroperoxyde lipidique  
Vit E $\bullet$ : Vitamine E radicalaire (alpha-tocophéryl); Vit E: Vitamine E active (alpha-tocophérol)  
Vit C $\bullet$ : Vitamine C radicalaire; Vit C: Vitamine C active  
GSH: Glutathion réduit; GSSG: Glutathion oxydé;

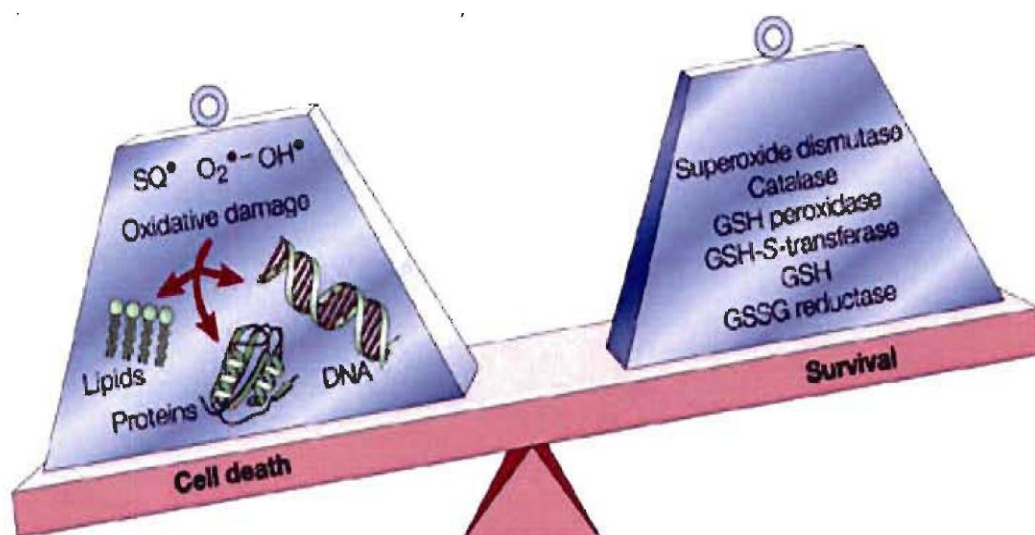
Sources:

Grégory Lacraz - Thèse Relation entre Stress oxydant et homéostasie Glucidique au cours du diabète de Type 2

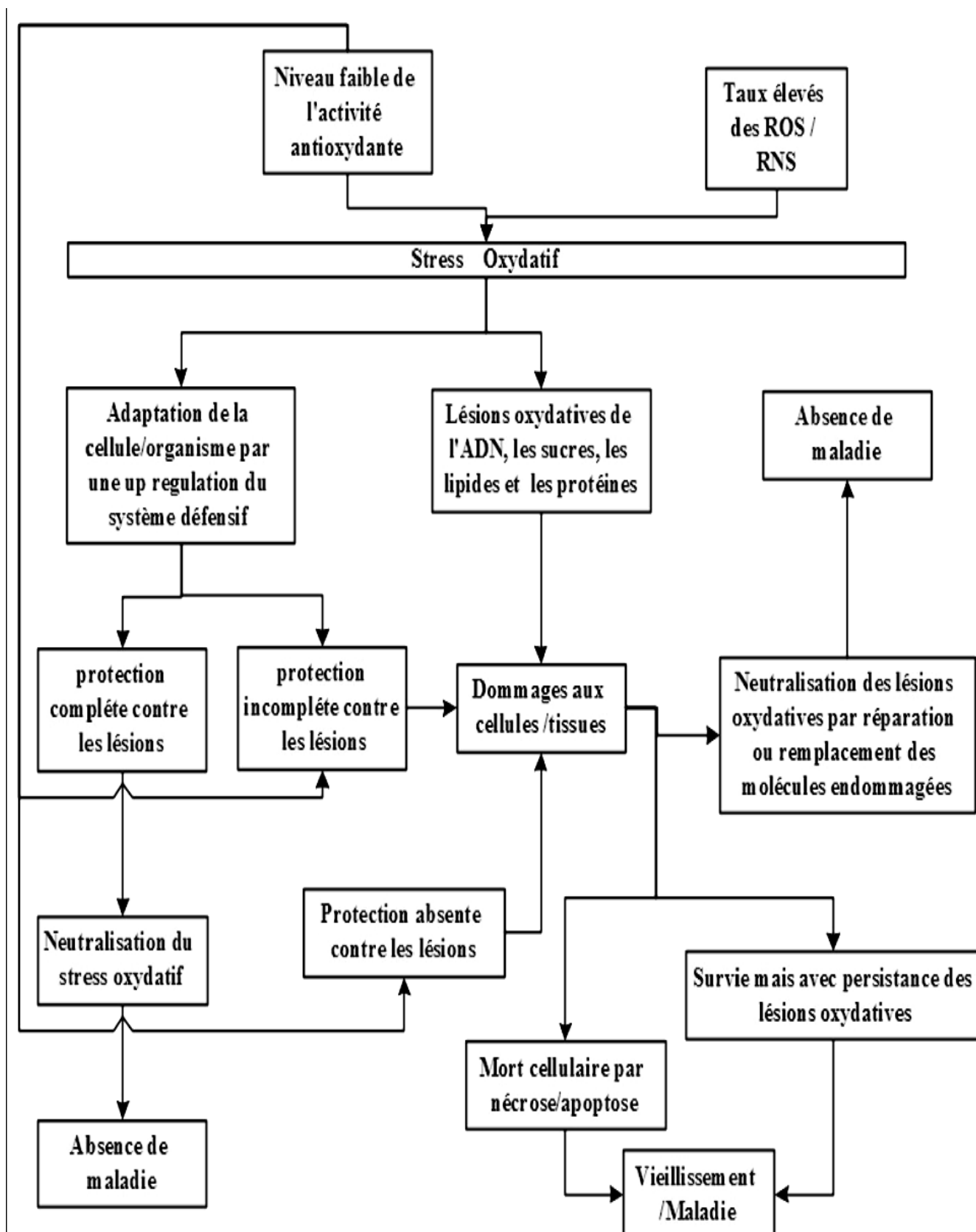
**Figure18 :** les cycles réactionnels de vitamine E et vitamine C (18)

### II.3 La balance et déséquilibres du système antioxydants et le stress oxydatif

Dans des conditions physiologiques normales, il y a un équilibre entre les radicaux libres et les défenses antioxydantes. Lorsque la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres, dû à un déficit en antioxydants ou une surproduction de radicaux libres, on observe un excès de ces molécules instables, appelé stress oxydant. Cette rupture d'équilibre peut causer des dommages cellulaires importants pouvant aller jusqu'à provoquer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose(4) (figure 19) (Figure 20)



**Figure 19 :** Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination de radicaux libres (4)



**Figure 20 :** Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au SO

***Chapitre III: le  
stress oxydatif et  
polyarthrite  
rhumatoïde***





La polyarthrite rhumatoïde (PR) est caractérisée par une atteinte articulaire bilatérale et symétrique, évoluant vers la destruction des articulations atteintes. Le terme « rheuma » veut dire « ce qui s'écoule » et désigne l'épanchement articulaire. La PR est une maladie systémique car elle ne concerne pas seulement les articulations. Le poumon, le coeur et le système nerveux peuvent être atteints. (23)

### **III.2 Les origines et causes de la polyarthrite rhumatoïde**

#### **III.2.1 Facteurs environnementaux**

Des facteurs environnementaux peuvent influencer la survenue de la maladie. Parmi ces facteurs, le tabac semble jouer un rôle très important dans le déclenchement de la Polyarthrite Rhumatoïde et dans la réponse au traitement (les patients fumeurs répondraient moins bien au traitement).(25)

#### **III.2.2 Facteurs hormonaux**

Des facteurs hormonaux jouent un rôle dans les poussées de la maladie, en particulier, les œstrogènes, hormones sexuelles féminines. En effet, la PR prédomine chez la femme, elle survient le plus souvent au moment de la ménopause et il existe une rémission fréquente de la maladie pendant la grossesse avec une poussée de la PR possible au décours de l'accouchement. Ces constatations suggèrent que le taux d'œstrogènes serait à priori bas durant les phases de déclenchement ou de poussée de la maladie et élevé durant les phases de « rémission » de la maladie. Néanmoins, d'autres facteurs hormonaux peuvent intervenir, comme le montre la survenue de PR chez les hommes. (25)

#### **III.2.3 Facteurs génétiques**

La Polyarthrite Rhumatoïde n'est pas une maladie héréditaire. Même si de nombreux facteurs génétiques ont été retrouvés, leur influence sur la survenue de la maladie reste faible. Il existe une prédisposition génétique, c'est-à-dire un terrain génétique favorisant le déclenchement de la maladie, ce qui explique l'existence de familles où plusieurs personnes sont malades, mais ce n'est pas à proprement parler une maladie génétique. Les gènes ne représentent que 30 % du déterminisme de la maladie. Autrement dit, la prédisposition génétique n'expliquerait qu'un tiers des origines possibles de la maladie. Ce n'est pas parce qu'on est porteur des gènes qu'on a forcément la maladie et inversement on peut déclencher

une maladie sans en être porteur. De ce fait, il n'existe pas de dépistage génétique de la maladie. Il est donc inutile de demander une recherche des gènes associés à la maladie, comme les gènes HLA DR1 et HLA DR4, chez les sujets atteints ni chez leurs enfants.(25)

### **III.2.4 Facteurs infectieux :**

Des facteurs infectieux sont de plus en plus incriminés notamment certaines bactéries (Porphyromonas gingivalis) responsables d'infection dentaire chez des personnes ayant une hygiène dentaire ou des soins dentaires insuffisants. (25)

### **III.2.5 Facteurs psychologiques (lien avec la fiche lutter contre le stress)**

Des facteurs psychologiques sont parfois retrouvés. Dans 20 à 30 % des cas, on constate que la polyarthrite survient après un événement marquant, « stressant » tel qu'un traumatisme physique ou psychique (deuil, séparation, accouchement, intervention chirurgicale, etc.) (25)

La membrane synoviale est enflammée et sécrète une quantité importante de liquide qui s'accumule dans l'articulation. L'articulation gonfle et devient douloureuse. Un épanchement de synovie apparaît.

L'inflammation de la membrane synoviale a des répercussions sur le cartilage et les os, mais également sur les tendons et ligaments qui entourent l'articulation(26).

## **III.3 Mécanismes lésionnels de la polyarthrite rhumatoïde**

Ils sont très incomplètement connus. L'atteinte est celle de la membrane synoviale, réalisant une synovite qu'elle va aboutir à des lésions du cartilage (et donc de la fonction articulaire) et des tendons. Ces lésions irréversibles d'où l'importance d'agir tôt dans le cours de la maladie. La synovite rhumatoïde et ses conséquences découlent de 4 types de mécanismes:

- mécanismes enzymatiques non spécifiques par production en large quantité d'enzymes protéolytiques (métalloprotéases dont les collagénases) qui dégradent le cartilage.

- mécanismes immunologiques à médiation humorale avec la production de facteurs rhumatoïdes, immuno anti-IgG.

- mécanismes immunologiques à médiation cellulaire avec une hyperactivité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

- mécanismes faisant intervenir diverses interleukines, en particulier IL1, TNF $\alpha$  et IL6 par leurs actions sur l'inflammation et la production d'enzymes protéolytiques (collagénases, stromélysines), IL8 par son action polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, la production d'IL2, d'IL4 et de l'Interféron. (27)

### **III.4 Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde**

Elle est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T. Plusieurs phases caractérisent l'évolution de la synovite rhumatoïde : initiation, recrutement cellulaire et inflammation, prolifération synoviale, destruction de l'articulation et réparation. Elles peuvent être individualisées de manière schématique, mais sont en réalité très intriquées. (29)

#### **III.4.1 Phase d'initiation**

Le mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Le premier événement pourrait être une réponse inflammatoire « non spécifique » à un stimulus encore non identifié, avec accumulation locale de monocytes/macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF $\alpha$  et l'IL-6 (29)

#### **III.4.2 Phase de recrutement et inflammation**

Le processus inflammatoire est donc initié par les macrophages. Ceux-ci contribuent ensuite au recrutement non spécifique des lymphocytes T et polynucléaires sanguins, grâce à l'action de cytokines à activité chimiotactique et à l'augmentation, par le TNF $\alpha$ , de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales.

Les macrophages interagissent in situ avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette activation est ensuite amplifiée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, responsables

d'activations cellulaires en cascade, de la production accrue de cytokines et de molécules effectrices, amplifiant l'inflammation locale et provoquant des destructions tissulaires (29)

➤ **Rôle des cytokines**

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pathogénique clé sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action pro inflammatoire, comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6, présentes en excès, et les cytokines à action anti-inflammatoire, représentées par l'IL-10, l'IL-4, l'IL-13, les récepteurs solubles du TNF $\alpha$  et l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1RA), qui sont présents en quantité insuffisante et ne peuvent bloquer l'action des premières.

Des cytokines favorisant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire sont également présentes dans la membrane synoviale : TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et FGF-1 et 2 (Fibroblast Growth Factors 1 and 2). Cette angiogenèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins. Ces cytokines et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques particulièrement importantes. (29)

➤ **Rôle des lymphocytes B**

Des lymphocytes B sont activés localement par les lymphocytes T CD4+. Ils se multiplient et se différencient en plasmocytes qui produisent des immunoglobulines polyclonales et du facteur rhumatoïde (FR). Ceux-ci participent au mécanisme lésionnel de la polyarthrite rhumatoïde. Ils interviennent dans les lésions de vascularites par l'intermédiaire de dépôts de complexes immuns FR-IgG sur les parois vasculaires. Les FR à la surface des lymphocytes B présentent de façon efficace des peptides antigéniques aux lymphocytes T. (29)

➤ **Rôle des polynucléaires neutrophiles**

L'augmentation anormale du nombre des polynucléaires neutrophiles dans le liquide synovial des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, serait due à un exsudat, lui-même favorisé par la production locale de facteurs chimiotactiques, produits de l'activation du complément et de l'activation cellulaire locale. En réponse à l'ingestion de complexes immuns et à l'activation locale par les cytokines et chimiokines, les polynucléaires

neutrophiles infiltrés dans la synoviale produisent des métabolites de l'oxygène et d'autres médiateurs de l'inflammation, dont les métabolites de l'acide arachidonique, qui renforceraient les phénomènes inflammatoires. (29)

➤ **Angiogenèse et fabrication du pannus synovial**

Les lésions observées initialement sont dues à une atteinte microvasculaire et à un infiltrat périvasculaire par des cellules myéloïdes, puis des lymphocytes. L'atteinte vasculaire, segmentaire ou focale, inclut des microthromboses et une néovascularisation. On note également une hyperplasie des cellules synoviales. Le tissu synovial inflammatoire et prolifératif, ou « pannus », tend à recouvrir le cartilage articulaire et serait le siège de la production d'enzymes, responsables de la destruction du cartilage et de l'os. (29)

**III.4.3 Phase de réparation**

La phase de réparation, responsable de la fibrose articulaire, a lieu parallèlement à la phase de destruction, mais ne compense pas le processus de destruction. Elle fait participer des facteurs de croissance et le TGFβ.(29)

**III.5 Auto anticorps de polyarthrite rhumatoïde**

**III.5 .1 Facteur rhumatoïde**

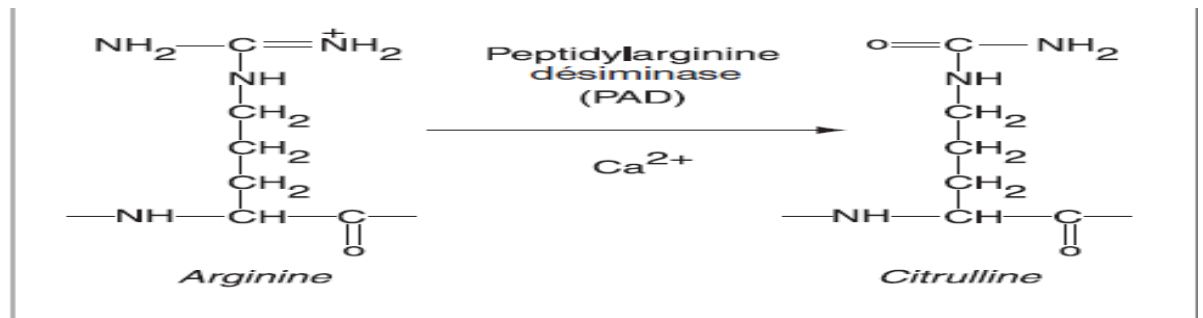
Le facteur rhumatoïde (FR) est une immunoglobuline, de type IgM le plus souvent, ayant une activité anticorps dirigée contre les immunoglobulines G humaines ou animales. Il était classiquement recherché par la réaction de Waaler-Rose (globules rouges de mouton sensibilisés par du sérum de lapin anti-globules rouges de mouton, la réaction se faisant contre les immunoglobulines anti-globules rouges) ou le test au latex (particules de polyester recouvertes d'immunoglobulines humaines, seuil de positivité : 1/80 de dilution).

Actuellement, la détection du FR par néphélobimétrie laser (technique automatisable exprimée en unités) ou par la technique ELISA est plus répandue et plus sensible (seuil : 20 UI/ml).

Le FR n'a pas de rôle direct dans le développement de la synovite rhumatoïde comme l'atteste le développement de polyarthrites très érosives chez des patients n'ayant pas de facteur rhumatoïde. À l'inverse, le facteur rhumatoïde est impliqué dans certaines complications extra-articulaires, en particulier dans la vascularite où il se dépose dans la paroi des vaisseaux et forme des complexes immuns de taille intermédiaire activant le complément et induisant l'inflammation vasculaire.(29)

### **III.5.2 Anticorps anti-peptides citrullinés**

Les anticorps anti-protéines citrullinées (Ac Anti CCP) : Produits dans l'articulation, au sein de la synoviale rhumatoïde, ces anticorps reconnaissent des épitopes « citrullinés » qui apparaissent sur diverses protéines (filaggrine, fibrine, etc.) du tissu synovial inflammatoire par suite de la transformation de leurs résidus arginyl en résidus citrullyl. Cette « désimination » de protéines, fréquemment qualifiée de « citrullination », est une modification post-traductionnelle catalysée par une famille d'enzymes, les peptidyl-arginine désiminases (PAD) (31) (figure 22)



**Figure 22 :** La citrullination est un processus médié par (PAD) (31)

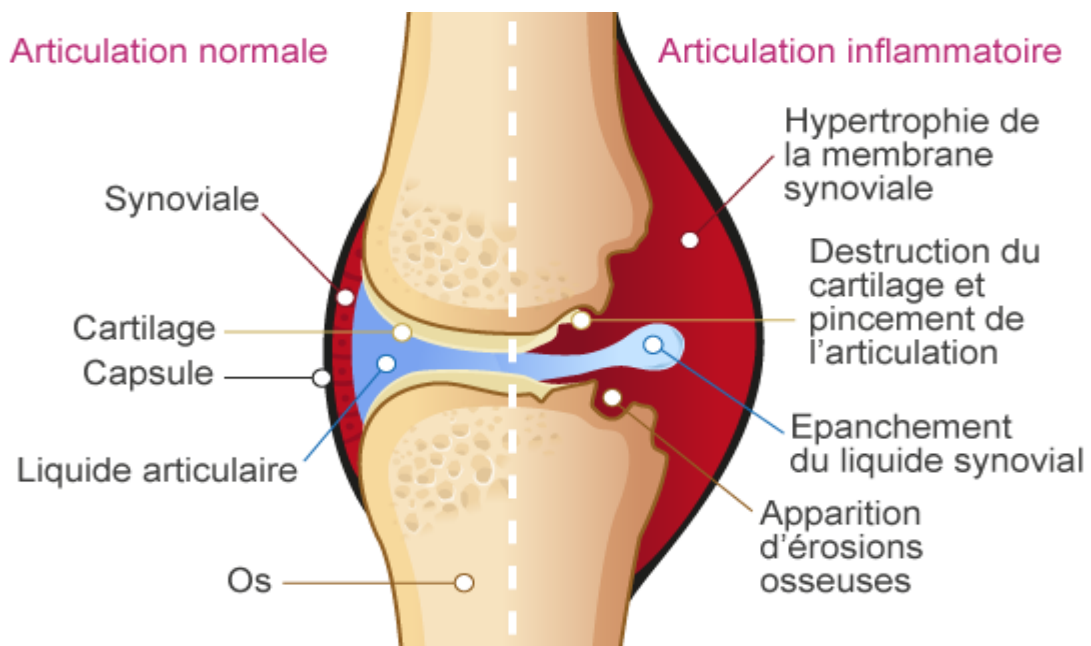
La production d' auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées est tout a fait spécifique de la PR. Cette production est la résultante d' une part de la citrullination de protéines, due à l' inflammation, d' autre part de la présence d' autres facteurs dont certains seraient génétiques ; on sait en effet qu'il existe un lien très étroit entre la production d' anticorps anti-CCP et les allèles HLA associés a un risque élevé de PR (31)

### III.5.3 Anticorps antinucléaires

La recherche des anticorps antinucléaires (AAN) doit être systématique au cours de la PR au début, notamment pour rechercher une connectivité, surtout une maladie lupique. Dans la PR, les AAN sont positifs dans 15 à 30 % des cas, à un titre généralement assez faible.(32)

### III.6 La relation entre stress oxydatif et la polyarthrite rhumatoïde (l'inflammation)

Dans le cadre de la Polyarthrite Rhumatoïde, on est dans une situation où les étapes de l'inflammation sont dépassées. La réaction inflammatoire est exagérée et pérennisée comme si l'organisme n'arrivait pas à éliminer l'agression de l'articulation. Le système inflammatoire est stimulé en permanence. Il en résulte une inflammation qui dure dans le temps encore appelée inflammation chronique. L'inflammation devient alors néfaste au niveau articulaire et entraîne des lésions de l'articulation. (Figure 23) (25)

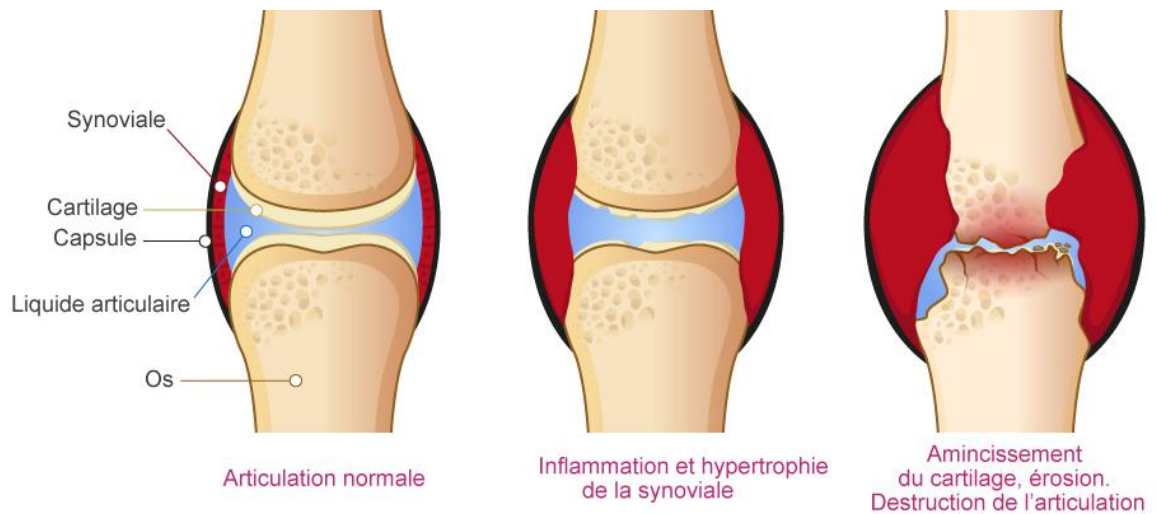


**Figure 23 :** l'articulation inflammatoire (25)

En absence de prise en charge adaptée, cette inflammation chronique articulaire entraîne un épaissement (hypertrophie) de la membrane synoviale ou pannus rhumatoïde. Ce pannus synovial peut alors être responsable des lésions de l'articulation, atteintes osseuses (érosions) et atteintes du cartilage (pincement de l'articulation, lésions des tendons et des



ligaments autour de l'articulation, les lésions peuvent conduire à une destruction de l'articulation (25) (figure 24).



**Figure 24:** la destruction de l'articulation au cours de la PR (25)

Lorsqu'un phénomène inflammatoire dans le cas de polyarthrite rhumatoïde survient, trois phases se succèdent comme expliqué au Une surproduction d'EAO survient lors de l'inflammation car :

- Il y a stimulation de l'expression d'enzymes constitutives comme les NOS endothéliales et neuronales, certaines NADPH oxydase (NOX) et cyclooxygénase-1 (COX1)

- Il y a activation des enzymes inductibles comme iNOS et COX2.

Les mécanismes à l'origine de la surproduction d'EAO sont initiés par des cytokines produites lors de l'inflammation et les cellules phagocytaires en sont les principales productrices même si les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes peuvent également produire des EAO. De plus, il a été montré que les EAO interviennent dans la régulation de l'inflammation par la stimulation de la synthèse de molécules d'adhérence et de médiateurs de l'inflammation. (25)

# ***Partie pratique***

***Chapitre IV:  
matériel et  
méthode***

### Chapitre IV : matériel et méthode

#### OBJECTIF

Le stage s'est révélé très intéressant et très enrichissant pour mon expérience professionnelle. En effet, ma spécialité s'inscrit précisément dans le domaine de La BIOLOGIE/BIOCHIMIE.

Le présent travail a été réalisé au sein du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie dans le laboratoire d'auto-immunité, encadré par Pr.Salah.

Ce stage en milieu professionnel est une excellente opportunité d'acquérir de l'expérience et des compétences qui serviront grandement lorsque viendra le temps d'entreprendre une carrière professionnelle. Le stage de la fin de cycle est l'occasion de tester ces connaissances théoriques et d'améliorer ses compétences et sa pratique. .

Donc les intérêts de ce stage sont:

- Connaître le milieu du travail.
- Connaître les conditions de travail du personnel.
- En savoir plus sur le domaine de la biologie.
- Savoir comment fonctionne un laboratoire.
- Avoir une idée sur ce que je ferais plus-tard.
- Mettre en pratique la théorie apprise en université dans un vrai travail qui tes confie
- Connaître les relations entre le personnel et les patients

Le stagiaire devient capable de :

- ❖ connaître les conditions d'utilisation des différents milieux biologiques
- ❖ connaître les précautions à respecter pour éviter les risques de contamination du personnel et de l'environnement
- ❖ Assimiler et mettre en pratique des techniques et des principes de base des appareillages les plus couramment utilisés
- ❖ Choisir des systèmes analytiques appropriés
- ❖ Maîtriser le degré d'urgence d'une demande d'analyses biologiques
- ❖ devient capable de commenter les résultats

## Chapitre IV : matériel et méthode

---

- ❖ décrire les principes des techniques d'analyses et des équipements utilisés en laboratoire
- ❖ décrire les critères de performance analytique et d'efficacité des méthodes et du matériel utilisés
- ❖ d'appliquer les notions d'épidémiologie et de bios statistiques à l'évaluation des méthodes d'analyses et à l'interprétation des résultats
- ❖ avoir la maîtrise des outils spécifiques à la spécialité nécessaires à la validation des résultats

### IV.1 Lieu d'étude

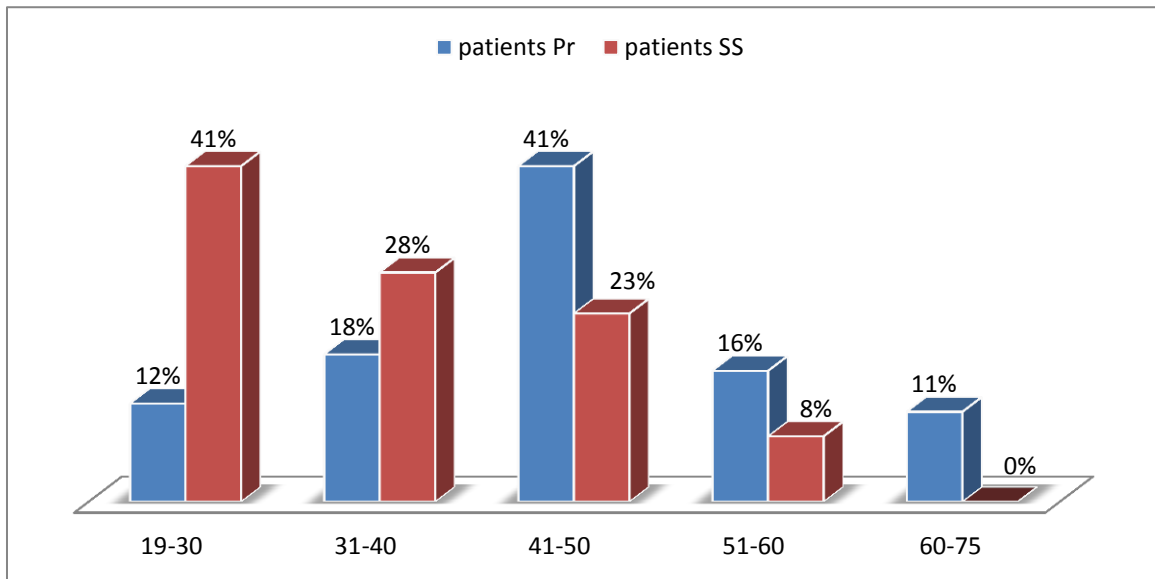
Notre étude était réalisée au niveau de l'institut *Pasteur* (Alger), durant la période du 05 Mai au 21 juin 2017. Les prélèvements de sang sont effectués au niveau de la salle des prélèvements tandis que les dosages sont réalisés dans le laboratoire auto-immun, sous la direction de docteur SALAH.S.S.

### IV.2 Population étudiée

. La population malade est constituée de 100 sujets atteints de PR recrutés et suivis par un rhumatologue expérimenté (Dr SALAH) remplissant au moins 4 des 7 critères de l'ACR<sup>(4)</sup>. L'âge varie entre 19 et 75 ans avec une moyenne de 45 ans. La tranche d'âge la plus représentée est celle comprise entre 41 et 50ans (41 %) (Tableau 4) (Figure 25)

**Tableau 4:** Caractéristiques démographiques des patients PR et des contrôles.

	Témoins	Patients PR
Nombre	100	100
Âge moyenne	34.7 ans	45 ans
Âges extrêmes	[19 – 60] ans	[19 – 75] ans
Sex Ratio	1.32 (57♀/43♂)	5.66 (85♀/15♂)
Durée d'évolution	± 0	± 7.87



**Figure 25 :** Répartition des patients et des contrôles selon les tranches d'âge.

Il s'agit d'une étude cas-témoins faite sur **200** sujets comprenant :

- Un groupe de sujets atteints de la PR : **100** patients.
- Un groupe contrôle : **100** sujets sains.

### IV.3 Prélèvements sanguins

L'échantillon est obtenu par un prélèvement sanguin qui s'effectue chez les sujets à Jeune.

Les prélèvements de sang veineux a été fait chez tous les sujets (patients PR et contrôles) sur :

- Tube sec pour les dosages sérologiques ( FR, anti-CCP2).
- Anticoagulant (EDTA) pour pour l'extraction d'ADN et le génotypage.

Les dosages de FR, anti-CCP et l'extraction d'ADN sont conservés entre 2-8 °C jusqu'à ce que la série soit complète pour la manipulation

### IV.4 Matériel de laboratoire

#### IV.4.1 Centrifugeuse

Une centrifugeuse est un appareil à force centrifuge, provoquant un mouvement de rotation créé par un moteur à rotor, ou par une manivelle amplifiée par un système d'engrenage, dans ce cas on parle de centrifugeuse à main. De ce fait, une centrifugeuse permet de séparer du mélange (sang, urine...) les éléments cellulaires ou solides inégalement denses en suspension, des éléments liquides. De même, pour la décantation, la distillation, la filtration, le but est le même mais ce sont les principes qui varient selon le procédé (photos 1)



**Photos 1** : centrifugeuse

#### IV.4.2 Bain marie

Bain marie est un appareil rempli de liquide chaud servant au chauffage d'un récipient contenant un mets ou une préparation à chauffer. Par extension, le bain-marie désigne également le récipient contenant le liquide chaud.

Le bain-marie contient un liquide (eau ou huile, par exemple), alors que le récipient au-dessus contient le mets ou la préparation. Cette technique de chauffage présente l'avantage d'éviter un apport de chaleur trop brutal et permet de contrôler le chauffage en évitant à peu près tout risque de calcination, même partielle. L'huile est utilisée lorsqu'il faut atteindre des températures supérieures à 100 °C. (photos 2)





**Photos 2** : bain-marie

### IV.4.3 Réfrigérateur de laboratoire

Un réfrigérateur est un appareil principalement utilisé en laboratoire, muni d'un compartiment principal qui maintient une température comprise entre 2 et 6 °C et souvent un compartiment pour la congélation à -18 °C appelé congélateur

Elle est généralement le refroidissement d'un corps ou produit par le transfert d'une partie de sa chaleur (photos 3)



**Photos 3** : Réfrigérateur

### IV.4.4 Lecteur ELISA

Le lecteur de microplaques, aussi appelé « lecteur Photométrique pour microplaques » ou « lecteur ELISA » est un spectrophotomètre spécialisé dans la lecture des résultats des tests ELISA, une technique utilisée pour détecter la présence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques dans des échantillons

La technique repose sur la détection d'un antigène ou d'un anticorps captures sur une surface solide au moyen d'anticorps directs ou secondaires marques, ce qui donne une réaction dont le produit peut être lu avec un spectrophotomètre. (Photos 4)



**Photos 4 :** lecteur d'ELISA

#### ➤ Mode d'emploi

Le lecteur de microplaques est un spectrophotomètre spécialisé permet la lecture sur un large éventail de longueurs d'onde, le lecteur de microplaques possède des filtres ou des grilles de diffraction qui limitent la gamme de longueurs d'onde à celles utilisées dans

Les tests ELISA, en général entre 400 et 750 nm (nanomètres).

Les échantillons à tester sont déposés dans des plaques spécialement conçues qui possèdent un certain nombre de puits où la réaction a lieu. Les plaques couramment utilisées ont 8 colonnes et 12 rangées, soit un total de 96 puits. Il existe aussi des plaques ayant un plus grand nombre de puits

### IV.5 Méthodes utilisées

#### IV.5.1 Recherche les anticorps anti CCP

➤ **but**

La recherche des anticorps anti CCP par techniques d'ELISA

➤ **ELISA**

Technique immuno-enzymatique simple sandwich quantitative permettant le dosage des anticorps anti CCP des 3 isotypes, notamment, IgA, IgG et la recherche des IgM monomériques (*TRITURUS*).

#### Principe du test

- Les échantillons dilués au 1 :101 sont incubés dans les microplaques coatées avec l'antigène spécifique « fragment Fc d'IgG humaines hautement purifié ». En cas d'échantillon positif (anti CCP+), les anticorps spécifiques d'isotype IgA, IgG ou IgM (monomérique) se lient au fragment Fc des IgG fixées.
  - La fraction non fixée est éliminée par lavage des microplaques.
  - Après, on incube avec un conjugué « anti-Ig humaines couplées à la peroxydase de raifort » qui réagit avec les complexes Ag-Ac formés.
  - Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.
  - L'addition du substrat TMB génère une réaction enzymatique colorimétrique (bleu) qui est arrêtée par de l'acide dilué (la couleur vire au jaune).
  - L'intensité de la coloration obtenue avec le chromogène est fonction du taux du conjugué fixé aux complexes Ag-Ac et ceci est proportionnel à la concentration initiale des Ac contenus dans les échantillons des patients.

#### Réactifs

- Diluent (diluer le tampon échantillon au 1 :5 éme avec de l'eau distillée)
- Tampon de lavage
- Contrôle négatif et le contrôle positif
- Le conjugué /substrat TMB /solution stops

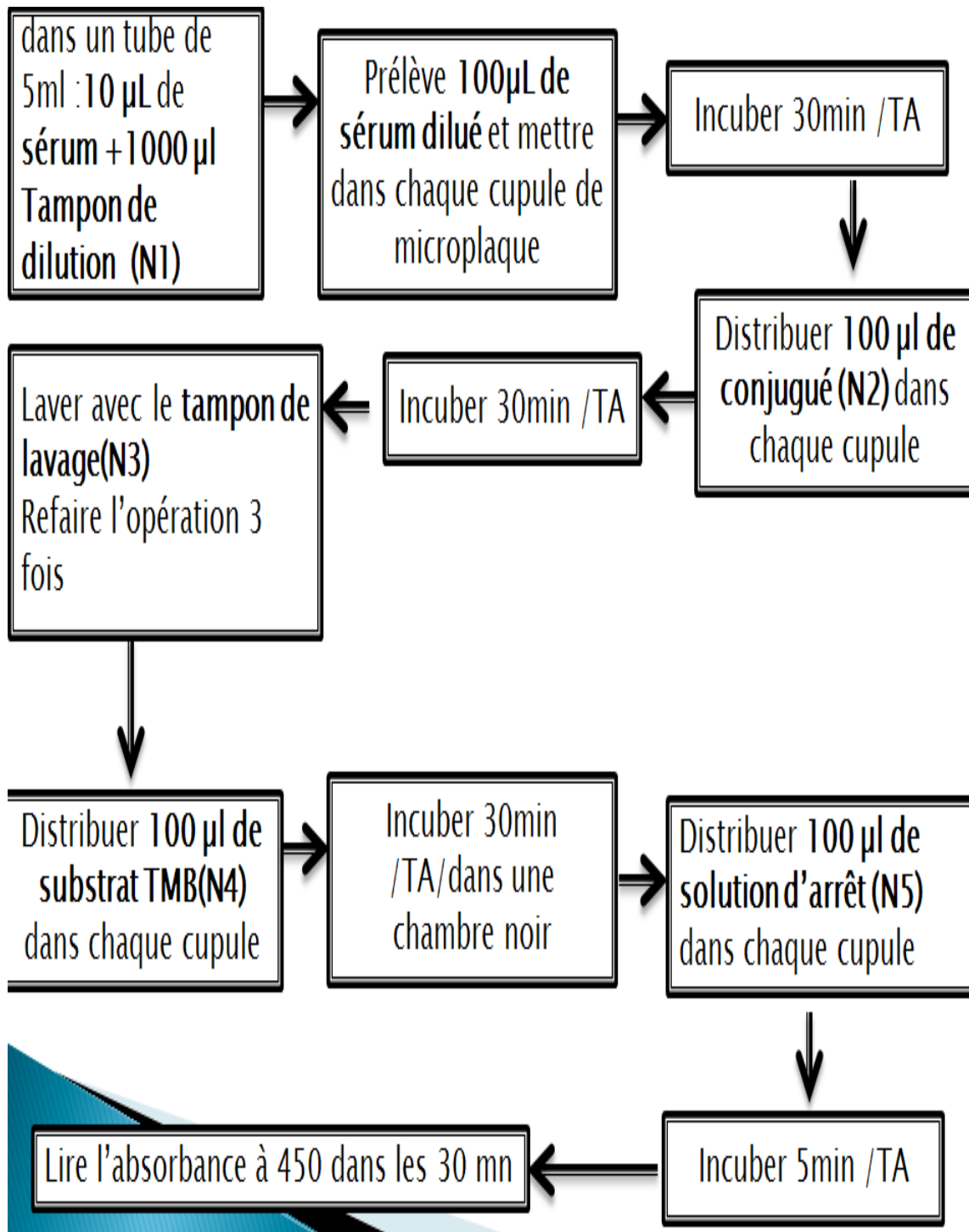
### Mode opératoire

- Les échantillons de sérum dilué au 1 :101<sup>ème</sup> sont incubés dans les microplaques sensibilisées avec l'antigène spécifique.
- Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque cupule.
- Incuber pendant 30 mn à une température de 20-32°C/68-89.6°F.
- Laver 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage
- Distribuer 100 µl de substrat TMB dans chaque cupule.
- Incuber pendant 30 mn à une température de 20-32°C/68-89.6°F et à l'abri de la lumière.
- Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre que pour la distribution du substrat.
- Incuber pendant au moins 5 mn.
- Agiter la plaque avec précaution pendant 5 secondes.
- Lire l'absorbance à 450 nm (450/620 recommandée) dans les 30 mn. (Figure 26)

### Interprétation des résultats

- Résultat négatif :  $x < 12$  UI/ml
- Résultat douteux :  $12 \leq x \leq 18$  UI/ml
- Résultat positif :  $x > 18$  UI/ml.

[UI : Unités Internationales



**Figure 26:** schéma résume le protocole d'ELISA

### IV.5.2 Dosage du Facteur Rhumatoïde

Ce dosage peut se faire selon deux techniques :

- La détection-dosage du FR IgM, IgG et IgA par technique Elisa simple sandwich.
- La détection-dosage du FR IgM par laser néphélométrie.

#### - Laser néphélométrie (LN)

Technique permettant le dosage du FR d'isotype IgM. Ce dernier a été réalisé en utilisant le *BN200 Nephelometer Analyzer (Behring-BMD)*.

#### ➤ Principe

Des particules de polystyrène recouvertes d'anti-immunoglobuline humaine de mouton, qui forment des complexes immuns lorsqu'elles sont en contact avec le FR IgM.

L'intensité de la lumière dispersée par le système est proportionnelle à la concentration du FR. L'exploitation se fait par rapport à un standard de concentration connue.

#### ➤ Interprétation des résultats

- Valeur négative :  $x < 40$  UI/L
- Valeur positive :  $x \geq 40$  UI/L

[UI : Unités Internationales]

### IV.5.3 Etude des polymorphismes des gènes de NOS2

#### IV.5.3.1 Extraction d'ADN par la technique du Salting out

- Prélèvements : sang total (4 ml) avec anticoagulant (EDTA) dans un tube de 45 ml.
- Reconstitution de la protéinase K (PK) à 10 mg/ml : mettre 1 ml d'eau distillée avec le lyophilisat de PK et laisser reposer au moins 15 mn. À conserver à + 4° C (2-8) (stable pendant 2 mois) ou à – 20 °C pour une longue conservation.
- Préparation des solutions :
  - Solution des lyses des globules rouges (SLR) : 10 ml d'EDTA (0,5M ; pH 08), 5 ml de Tris (1M ; pH 08), 500 ml d'eau distillée.
  - Solution des lyses des globules blancs (SLB) : 5 ml d'EDTA (0,5M ; pH 08), 5 ml de Tris (1M ; pH 08), 500 ml d'eau distillée.
  - SDS à 10% : 10 g SDS dans 100 ml d'eau distillée.
  - NaCl 6M : 35 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée.

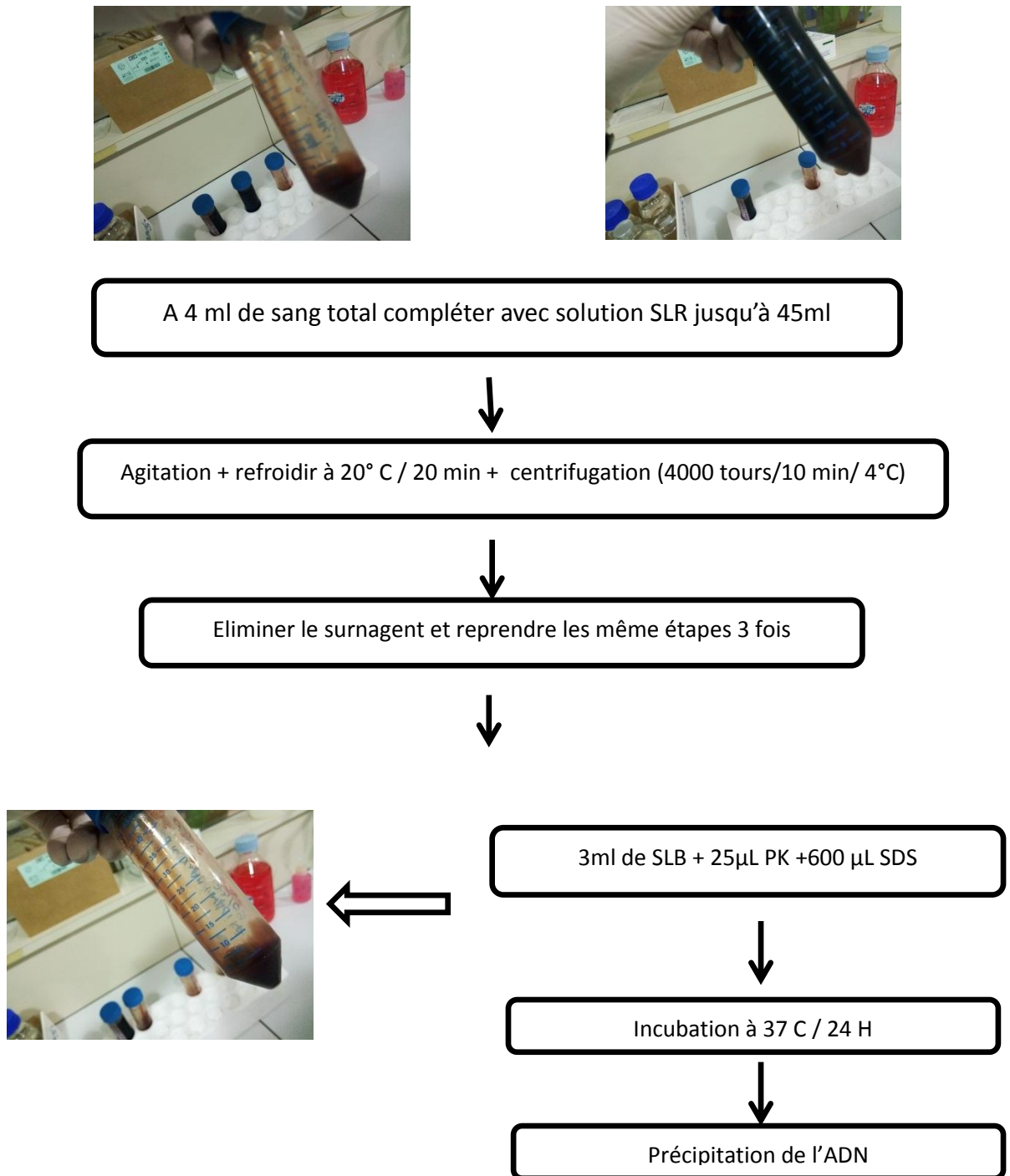
#### Mode opératoire

##### • Lyse des globules rouges (SLR)

- Ajouter de la SLR, au prélèvement de sang total de 10 à 15 ml, de telle sorte qu'on complète jusqu'à 45 ml.
- Agiter, énergiquement, puis mettre à – 20°C, pendant 20 mn, agiter chaque 10 mn, ce choc thermique va fragiliser la paroi des globules rouges.
- Centrifuger, pendant 10 mn, à 4000 tours/mn à + 4°C.
- Jeter le surnageant et refaire l'opération jusqu'à l'obtention d'un culot de globules blancs clair (2 à 3 lavages sont suffisants).

##### • Lyse des globules blancs (SLB)

- Resuspendre le culot de globules blancs dans 3 ml de SLB.
- Ajouter 35 µl de protéinase K (300 µl/ml).
- Ajouter 600 µl de SDS à 10%.
- Incuber le mélange à 37°C, pendant une nuit. (figure 27)



**Figure 27 :** schéma représente la lyse des globules rouge et blanc



- **Précipitation de l'ADN :**

- Ajouter 500  $\mu$ l de NaCl 6M ; agiter fortement.
- Centrifuger 25 mn à 3500 tr/mn à température ambiante (TA).
- Reprendre le surnageant et ajouter 3 ml d'éthanol absolu glacial.
- Mélanger, doucement, par retournement, jusqu'à l'apparition de la méduse d'ADN (l'ADN étant insoluble dans l'alcool).
- Récupérer la méduse d'ADN, à l'aide d'une pipette Pasteur.  
(photos 3)
- La laisser sécher, pendant 24 h, à température ambiante.
- Re-suspendre l'ADN dans 200  $\mu$ l d'eau distillée.

- **Re-suspension et conservation :**

- Casser le bout de la pipette Pasteur portant la méduse séchée, dans un tube Eppendorf contenant 500  $\mu$ l de solution TE (Tris EDTA) 10.1 composée de 100  $\mu$ l d'EDTA, 0,5 ml de Tris dans 500 ml d'eau distillée.
- Mettre le tube Eppendorf sous agitation douce pendant 24 à 48 h à température ambiante.
- Conserver le tube à +4°C.



**Photos 5** : ADN finale après la précipitation d'ADN

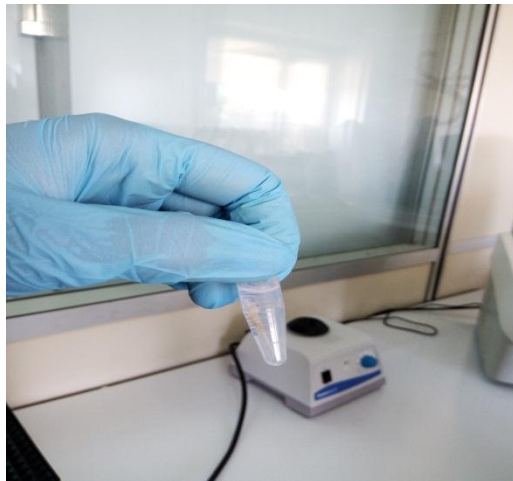
### IV.5.3.2 Dosage de l'ADN extrait

Ce dosage s'effectue, par spectrophotométrie, l'absorption à 260 nm ( $\lambda$ ). En outre, il est indispensable de mesurer l'absorption à 280 nm ( $\lambda$ ) permettant d'estimer une éventuelle contamination de l'extrait d'ADN par des protéines ou de l'ARN, en calculant le rapport DO 260/280.

#### ➤ Protocole

Dilution au 1/100 : 10 $\mu$ l ADN+ 990  $\mu$ l tris EDTA (TE) (photos 6)

Lire l'absorption à 260/280 nm par spectrophotométrie et déterminer la concentration d'ADN



**Photos 6** : dosage d'ADN

#### ➤ Interprétation des résultats

Une solution d'ADN doit avoir un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2,2. Si ce rapport est :

- Inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par des protéines.
- Supérieur à 2,2 : il est contaminé par de l'ARN.

### IV.5.3.3 Etude du Single Nucleotide Polymorphism (SNP) par la technologie TaqMan

Les six SNPs étudiés, dans ce travail, ont été génotypés par RT-PCR en utilisant la technologie TaqMan (Applied Bio-Systems™).

#### ➤ Principe

La PCR en temps réel, repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent étant directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés.

En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice).

Les produits d'amplification ont été détectés selon le principe, d'un marquage spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou de deux sonde(s) fluorescente(s) "Sondes TaqMan ou balises moléculaires". Dans ce travail ont été utilisées deux sondes discriminantes : "VIC" et "FAM". Dans ce cas de figure, la PCR requiert :

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

Chaque sonde TaqMan renferme :

- un fluorochrome, à l'extrémité 5', spécifique de chaque type d'allèle (VIC ou FAM)
- un quencher non fluorescent (NFQ), à l'extrémité 3' ;
- une molécule MGB (Minor Groove Binder) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex "ADN cible-sonde spécifique" et le stabilise (Figure13).

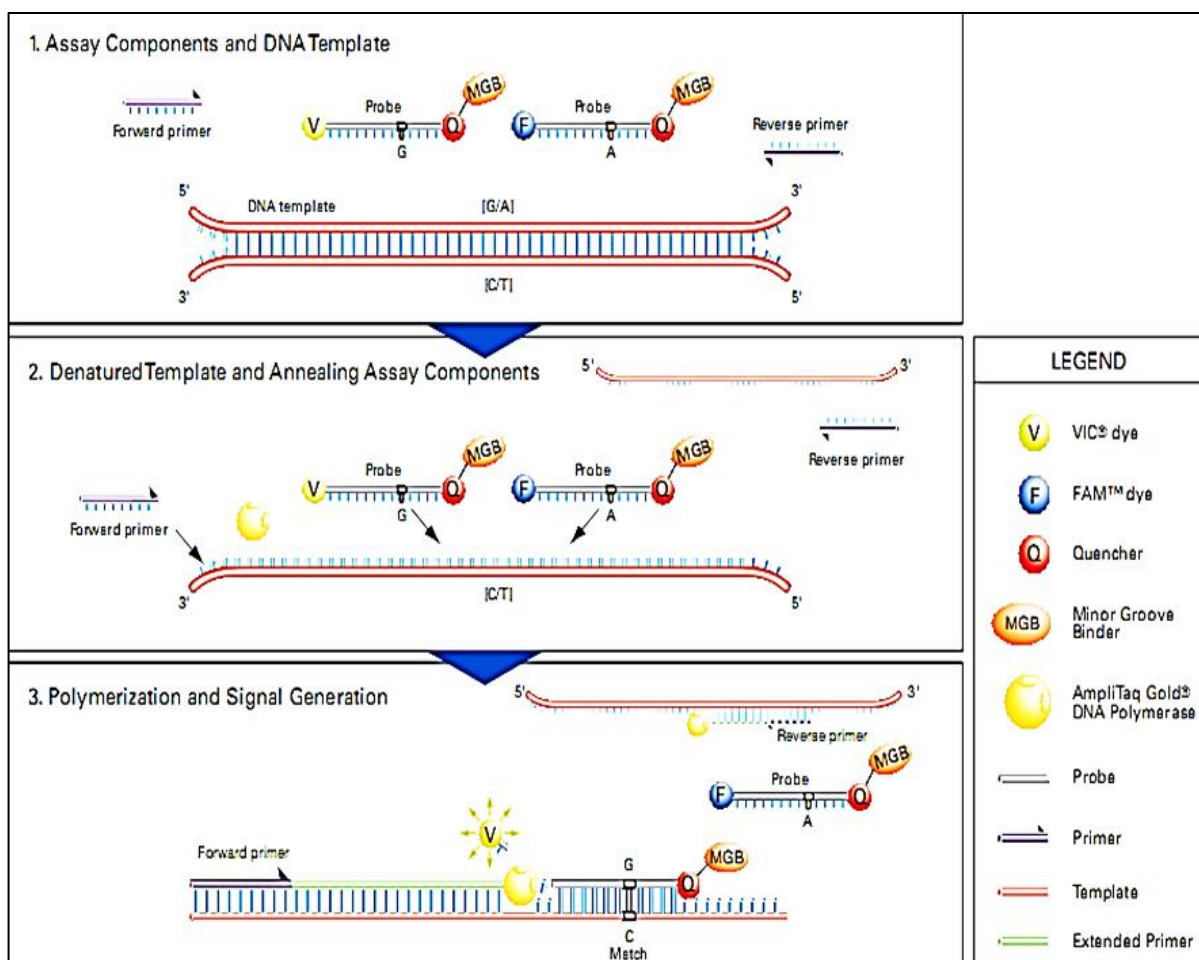
Cette stabilisation du complexe "ADN cible-sonde" va de pair avec la température de fusion du complexe ( $T_m$ ).

## Chapitre IV : matériel et méthode

Ainsi, le  $T_m$  d'une sonde parfaitement hybridée avec le produit de PCR sera plus élevé que celui d'une sonde s'hybridant imparfaitement. Ce phénomène est accentué par l'utilisation du Minor Groove Binder (MGB) qui va déstabiliser un duplex imparfait et donc faire chuter le Meltingtemperature  $T_m$ .

Au début de l'élongation, les sondes spécifiques d'allèle s'hybrident spécifiquement à la matrice, entre les deux amorces nécessaires à l'amplification. La proximité du fluorochrome et du quencher empêche la détection de la fluorescence.

Au cours de l'étape d'élongation de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde hybridée, ce qui entraîne une émission de fluorescence.



**Figure 18:** Différentes étapes du génotypage par la technologie TaqMan.

### ➤ Mode opératoire

Les conditions de PCR sont les mêmes quel que soit le polymorphisme étudié. Seules les solutions contenant les sondes et les primers sont spécifiques de chaque polymorphisme (Tableau 5).

**Tableau 5** : Références des AD Mix TaqMan utilisés dans cette étude

Gène/Locus	db SNP ID	Assay ID	NP	Localisation
NOS2	rs2779248(- 1657A/G)	C__2593688_10	/T	Chr.17
NOS2	rs8078 340(-277 A/G)	C__29024700_10	/G	Chr.17

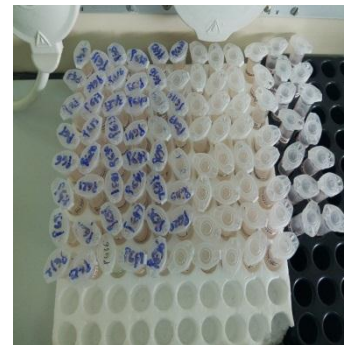
### ➤ Préparation des échantillons et du Mix de la PCR

- La concentration finale de l'ADN utilisé doit être ajustée à 20 ng/ml.
- Préparation du mix de la PCR :
  - Mettre le TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) et l'AD Mix TaqMan SNP Genotyping Assays (TaqMan MGB probes, FAM and VIC dye-labeled), spécifiques de chaque essai 30 minutes, avant la manipulation, à température ambiante (18 – 30°C).
  - Préparer le mélange réactionnel pour le nombre d'échantillon plus deux (n+2) (Tableau 6).

**Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la PCR.**

Composant	Quantité/Puits (Échantillon)
AD Mix	25 $\mu$ l
Master Mix	500 $\mu$ l
Eau distillée stérile	850 $\mu$ l

- Vortexer le Mix de la PCR.
- Déposer 1  $\mu$ L d'ADN de chaque échantillon dans une plaque de 96 puits, et 1  $\mu$ L d'eau distillée dans les 2 derniers puits utilisés comme témoin négatif.
- Distribuer le mix de l'amplification dans les tubes à PCR contenant l'ADN génomique, soit 19  $\mu$ l par tube (volume réactionnel final de 20  $\mu$ L).
- Fermer la plaque par une feuille thermocollante et la placer dans le thermocycleur.



850  $\mu$ l eau distille + 500  $\mu$ L master Mix + 25 AD Mix

Les échantillons d'ADN

Chaque puits : 688 $\mu$ L  
de mélange  
réactionnel +2 $\mu$ L ADN



Centrifugation+ lecteur  
de résultats

**Figure 29 :** schéma présentatif des étapes de TaqMan

### ➤ Programme de la PCR

Le programme de PCR est le même pour tous les polymorphismes (Tableau 7), soit :

**Tableau 7 :** Programme de la PCR.

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

La PCR est effectuée dans le thermocycleur 7500 real time PCR system (Applied Biosystems). (photos 7)



**Photos 7 :** l'appareillage de TaqMan

### ➤ Lecture des résultats

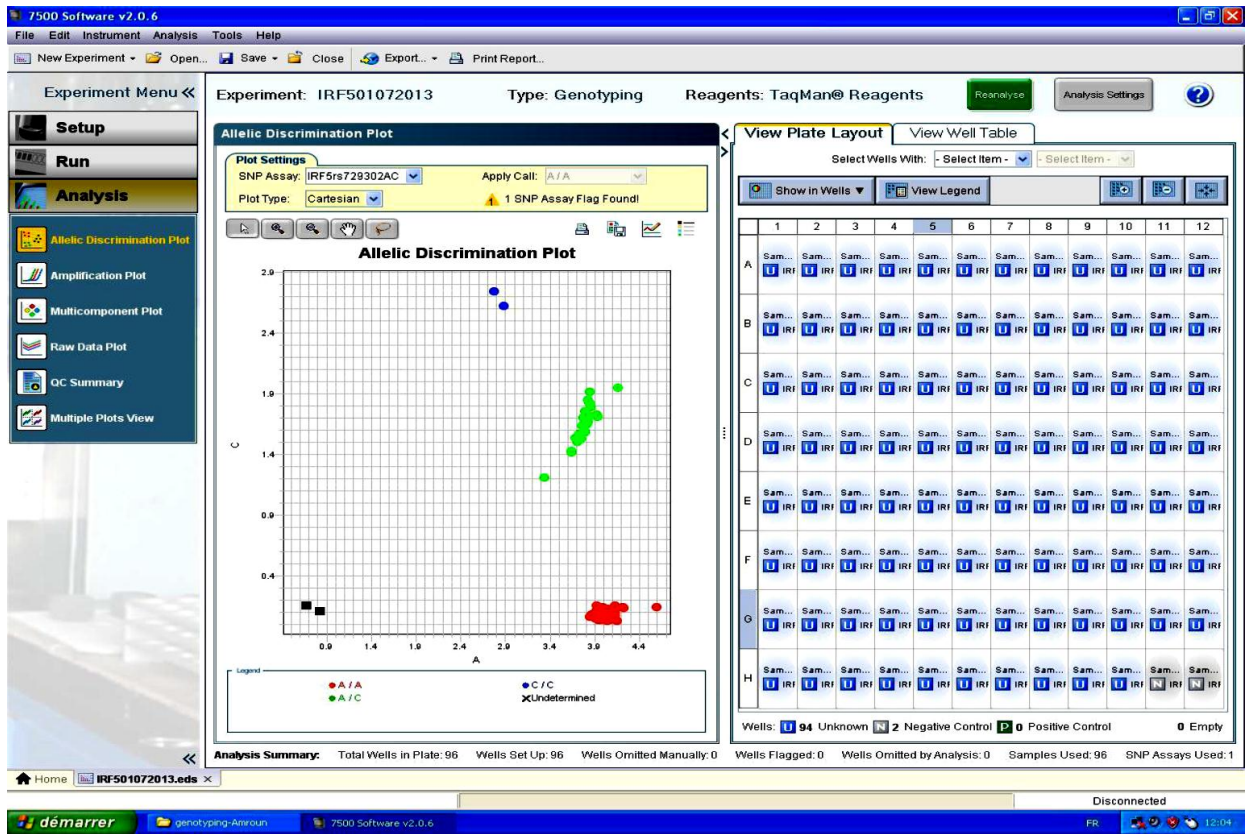
La lecture de la fluorescence se fait dans le détecteur couplé au thermocycleur et intégrée grâce au logiciel 7500 software v2.0.1 de l'ordinateur lié au détecteur (Applied Biosystems) : Chaque échantillon étant représenté par un point. Par la suite est défini le type de fluorescence associé à chaque point (Figure 29).

Exemple : le nuage de points exprimant :

- majoritairement de la fluorescence FAM (bleu) correspond à des échantillons homozygotes pour l'un des deux allèles ;
- le nuage rouge correspond à une fluorescence VIC majoritaire, donc, à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle ;
- tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences, donc, à des échantillons hétérozygotes pour le polymorphisme considéré.
- Les points noirs correspondent à une PCR qui n'a pas marché ou à un positionnement ambigu.

Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associé chacune des sondes VIC et FAM.





**Figure 30:** Détermination du génotype en fonction du type de fluorescence

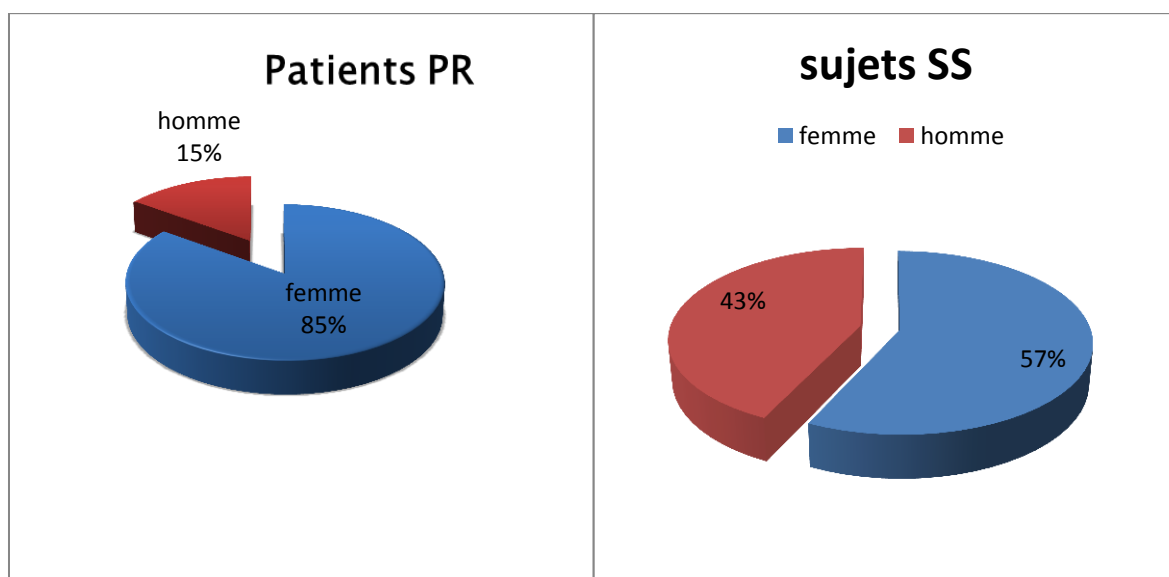
*Chapitre V:  
Résultats et  
discussion*

## Chapitre V : résultats et discussion

### V. Résultats et Discussion

#### V.1 Répartition des patients selon le sexe :

La répartition des patients, dans notre échantillonnage, selon le sexe est portée sur la figure 31. Cette dernière montre que notre population, qui regroupe 100 patients, est distribuée comme suit 15 hommes soit 15 % et 85 femmes soit 85 % avec un sexe ratio (F/H) de 5.66.



**Figure 31:** Répartition des patients selon le sexe

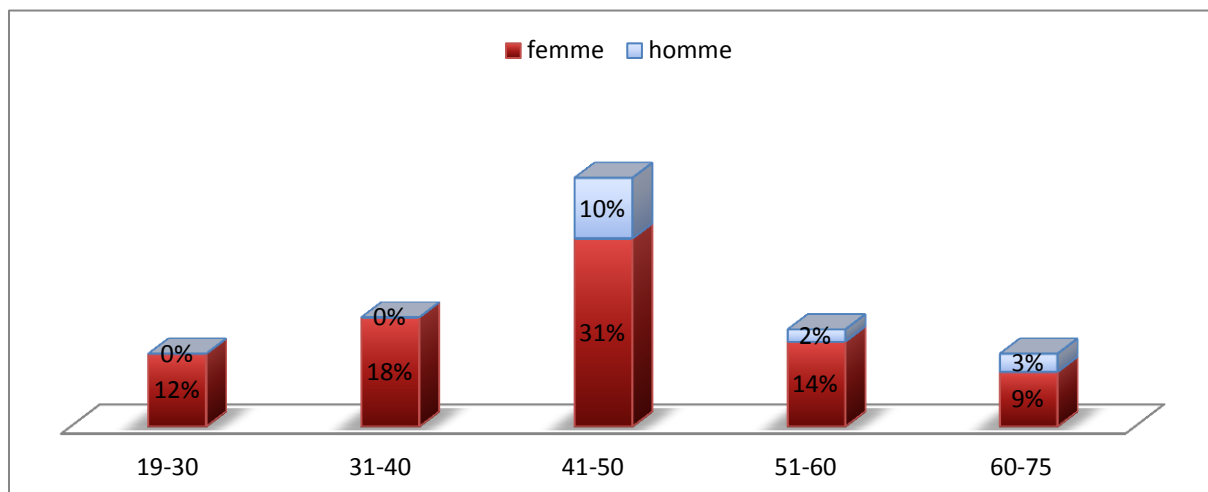
Ces résultats montrent que la PR est plus fréquente chez les femmes que les hommes, donc il existe une prédominance féminine. Cette différence pourrait être due à une influence des hormones femelles. Ces mêmes résultats sont reportés par **Akasbi** et ses collaborateurs (2013), qui ont trouvé une nette prédominance féminine avec un sexe ratio de 5 F/1H (83). Dans les Etats- Unis d'Amérique, Gabriel et al (1999) établit la prévalence de la maladie à 1% de la population adulte avec un ratio d'environ 2 femmes pour 1 homme (36).

Ces résultats sont très proches de ceux cités dans l'étude d'**Alain** (2006) ; il a montré que, en France, la PR touche en majorité le sexe féminin avec une prévalence de 3 femmes contre un homme (35).

D'après **Kaddem** (2011) la PR touche 0,7 à 1% de la population algérienne. C'est un peu plus de 300 000 personnes qui sont touchées par la polyarthrite rhumatoïde avec une très nette prédilection pour les femmes (trois fois plus de femmes que les hommes) (11).

## V.2 Répartition des patients selon l'âge

Notre échantillon est composé de 30 individus de 19 à 75 ans ; avec une moyenne de 45 ans.



**Figure 32 :** répartition des patients selon l'Age

L'histogramme porté dans la figure 32 montre que la PR chez les sujets jeunes (19-30ans) survient avec un faible pourcentage (12%). Au-delà de 41 ans on constate une élévation du pourcentage à 41% dans la tranche d'âge (41 -50 ans) et à 16% dans la tranche d'âge (51-60 ans), puis il diminue progressivement à 12% dans la tranche d'âge (60-75 ans).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Khaldi (2008)**, qui a trouvé que le pourcentage élevée des atteintes de la PR concerne la tranche d'âge (40-60 ans)(37).

Par ailleurs l'étude Canadienne de **Thompson et Homik (2011)** montre que la PR peut survenir à tout âge, et elle se déclare le plus souvent entre 25 -50 ans (38).

En Algérie, cette pathologie touche de 0,7 à 1% de la population, ce qui représente environ 300 000 Algériens atteints de polyarthrite rhumatoïde, estime le docteur **Ladjouze (2009)**, rhumatologue à d'Oran. Bien que la polyarthrite rhumatoïde puisse apparaître à tout âge, les premiers symptômes peuvent apparaître entre 30 ans et 50 ans(39).

### V.3 Etudes des marques biologiques

#### V.3.1 Anticorps anti-CCP :

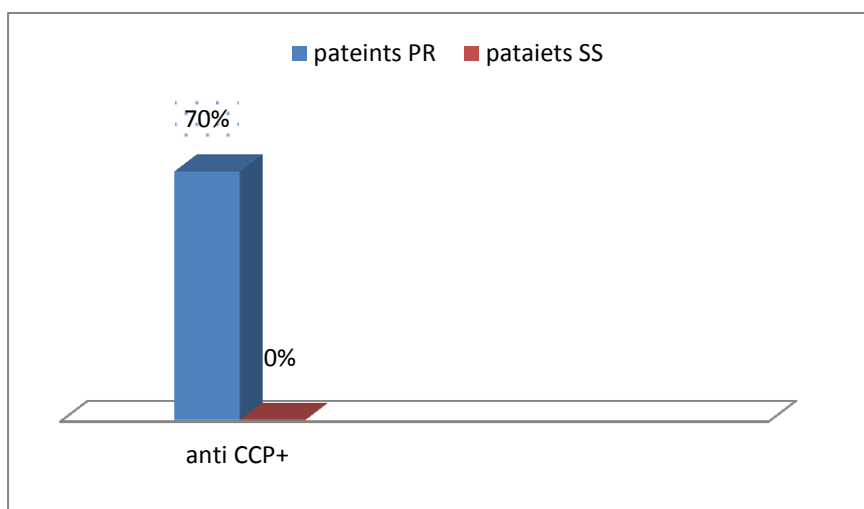
Quant aux anticorps anti-CCP2, ils étaient, dans la population malade, positifs chez 70 patients (70%) avec des résultats  $\geq 20$  UR/ml « Euroimmun ». Quant à la population témoin, nous avons obtenus des résultats négatifs en anti-CCP2 chez tous les sujets sains (100%) (Figure 32). Il faut confirmée ces résultats par le dosage de FR.

Les anticorps anti-CCP sont des marqueurs biologiques importants tant au plan de diagnostic que pronostic dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) parce que :

- Ils sont plus sensibles et plus spécifiques que les facteurs rhumatoïdes IgM dans les formes débutantes et dans les formes avérées de la maladie.
- Ils prédisent l'évolution vers une PR en cas d'arthrite inflammatoire in classée.
- Ils sont un marqueur prédictif des érosions au cours de la PR.
- Ils peuvent être détectés chez des sujets sains des années avant l'apparition de la PR.

Selon **Baeten et ses collaborateurs (2001)** la présence de ces anticorps est très précoce voire même avant l'apparition des premiers symptômes. C'est compatible avec le rôle de plus en plus évoqué des lymphocytes B dans la physiopathologie de la maladie. Des protéines citrullinées ont été mis en évidence dans la synoviale rhumatoïde et des anti-CCP sont produits localement. Leur signification et leur rôle dans le déclenchement de la maladie restent un sujet très controversé. Le titre de ces anti-CCP pourrait être également un élément important pour évaluer les patients attient d'une PR (40).

**Shellekens (1998)** a confirmé que le dosage des anticorps anti-CCP est une méthode fiable pour le diagnostic précoce de PR lorsque le dosage est positif ; il permet de prédire la PR avec une spécificité supérieur à 95% (41)



**Figure 33:** Résultats du dosage des anti-CCP chez les patients PR et les sujets sains.

### V.3.2 Facteurs rhumatoïdes

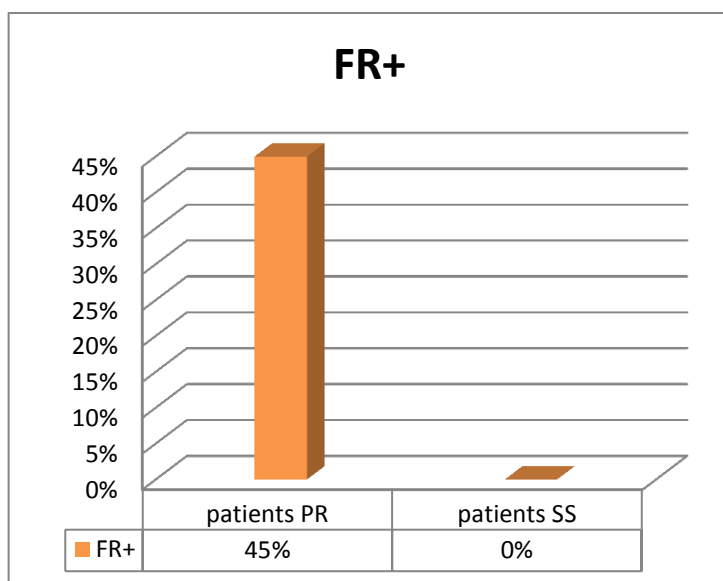
Les FR constituent une famille hétérogène d'auto-Anticorps qui a en commun de reconnaître la partie Fc des IgG

Dans la population malade (100 patients PR), le FR (IgM) est détecté, par LN, chez 45 patients (45%), le reste des patients, soit 55 sujets (55%), présente une PR sans FR [PR séronégative (FR IgM-)] (Figure 33).

Dans la population témoin (100 sujets sains), la recherche du FR est revenue négative chez tous les patients (100%) sujets sain

Ces résultats sont comparables à ceux de **Dao et Cush** (2006), ils ont considéré que les facteurs rhumatoïdes comme le prédictif le plus valable de l'activité et de la progression érosive de la PR (42).

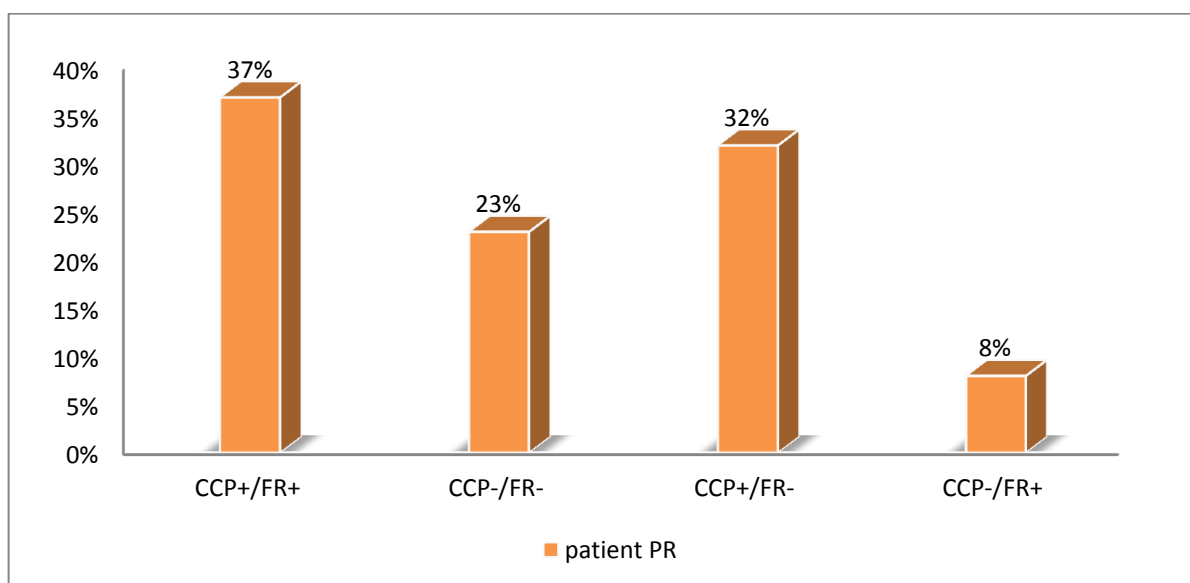
D'une part, on remarque que 43,33 % des patients atteints de la PR présentent des FR négatifs mais on ne peut pas dire que ces patients ne sont pas malades. La présence d'un taux significatif de facteur rhumatoïde dès le début de la maladie est un élément de mauvais pronostic. Mais la présence de facteur rhumatoïde est loin d'être synonyme de polyarthrite rhumatoïde : le FR n'est ni indispensable ni suffisant pour affirmer le diagnostic (43).



**Figure 34:** Résultats du dosage du FR chez les patients PR et les sujets sains.

### V.3.3 Valeurs diagnostiques du FR et des anti-CCP

Nous avons distribué la population malade, en se basant sur le statut en auto-anticorps, en groupes sérologiques (CCP+/FR+, CCP+/FR-, CCP-/FR+ et CCP-/FR-), nous observons que la positivité en anticorps anti-CCP est fortement associée au FR. Dans notre population, 8 (8%) patients sont positifs en FR et 32 (32%) patients avec anti-CCP. (Figure 35)



**Figure 35 :** Distribution des résultats des anticorps anti-CCP2/FR dans la population malade.

Ces mêmes résultats sont portés par **Meye** qui a trouvé que les anticorps anti-CCP sont présents chez 85 % des polyarthrites avec facteurs rhumatoïde positifs ; et 15% des polyarthrites avec facteurs négatifs (44).

Les travaux des chercheurs de l'Institut de Rhumatologie de Prague ont permis de conclure que la combinaison de la détection des anticorps anti-CCP et du dosage des facteurs rhumatoïdes de type IgM est la plus précise pour établir un pronostic structural (71). Parmi 104 patients atteints de PR, 83% de ceux qui souffraient d'au moins une érosion articulaire et 76% de ceux dont l'atteinte structurale s'aggravait, présentaient des taux d'anticorps anti-CCP et IgM significatifs (45)

### **V.4 Recherche d'une association entre les polymorphismes du gène de NOS2 et la susceptibilité à développer la PR**

#### **V.4.1 Analyse statistique**

Le calcul des fréquences génotypiques et alléliques s'est fait comme suit :

- **Fréquence allélique** = nombre de copies de l'allèle considéré/2 x nombre total de sujets.
- **Fréquence génotypique** = nombre de sujets portant le génotype considéré/ nombre total de sujets.

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été évalué par un test du  $\chi^2$ .

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

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

- L'Odds Ratio (OR) ou risque relatif rapproché, se définit comme le rapport des chances qu'un événement arrivant à un groupe de personnes A arrive, également, à un autre groupe B. Il a été calculé dans le cas où le pc < 0,05 ainsi que son intervalle de confiance à 95% (IC 95%) par le test exact de Fisher. Un OR < 1 est en faveur d'un effet protecteur, lorsqu'il est >1 il est en faveur d'un risque plus élevé alors qu'un OR proche de 1 est en faveur d'une absence d'effet.
- L'OR et l'intervalle de confiance à 95% ont été déterminés selon le test exact de FISHER.
- Le P a été corrigé selon la correction de Yates (pour les faibles échantillons).

Le logiciel « **Compare2** » a été utilisé pour tous ces calculs statistiques.



**V.4.2 Comparaison des fréquences alléliques et génotypiques des SNPs étudiés entre les patients atteints d'un PR et les sujets sains :**

➤ **INOS rs8078340A/G :**

Les résultats obtenus pour ce SNP figurent dans le Tableau 8 suivants

**Tableau 8 :** les résultats de Single Nucleotide Polymorphism d'INOS rs8078340A/G

	Patients SS (n=100)	Patients PR (n=100)	X <sup>2</sup>	P
<b>Allèles</b>				
G	162 (81%)	171 (85.5%)	1.45	0.22
A	38 (19%)	29 (14.5%)	1.45	0.22
<b>Génotypes</b>				
G/G	65 (65%)	73 (73%)	1.49	0.22
A/G	32 (32%)	25 (25%)	1.20	0.27
A/A	3 (3%)	2 (2%)	0.20	0.65

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle G est non significativement plus fréquent chez les patients PR vs. Sujets sains (85% vs. 81%) .l'allèle A étant plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients PR (38% vs. 29%)

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle une augmentation :

- la fréquence du génotype GG non significative chez les patients PR vs. Sujets sains (73% vs. 65%)
- la fréquence du génotype AG non significative de chez les sujets sains vs. Patients PR (32% vs. 25%)

- la fréquence du génotype AA non significative chez les Sujets sains vs. les patients PR: (3% vs. 2%).

➤ **INOS rs2779251**

Les résultats obtenus pour ce SNP figurent dans le Tableau 9 suivants

**Tableau 9** : les résultats de Single Nucleotide Polymorphism d'INOS rs2779251A/G

	Patients SS (n=100)	Patients PR (n=100)	X <sup>2</sup>	P	Pc	RO
<b>Allèles</b>						
<b>G</b>	<b>168 (84%)</b>	<b>153 (76.5%)</b>	<b>3.54</b>	<b>0.06</b>	-	-
<b>A</b>	<b>32 (16%)</b>	<b>47 (23.5%)</b>	<b>3.54</b>	<b>0.06</b>	-	-
<b>Génotypes</b>						
<b>G/G</b>	<b>73 (73%)</b>	<b>67 (67%)</b>	<b>0.85</b>	<b>0.35</b>	-	-
<b>A/G</b>	<b>22 (22%)</b>	<b>19 (19%)</b>	<b>0.27</b>	<b>0.59</b>	-	-
<b>A/A</b>	<b>5 (5%)</b>	<b>14 (14%)</b>	<b>4.71</b>	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>	<b>3.0 [1.00-10.31]</b>

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle G est non significativement plus fréquent chez Sujets sains vs les patients PR (84% vs. 76.5%). l'allèle A étant plus fréquent chez Patients PR vs les sujets sains. (47% vs. 32%)

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle une augmentation :

- la fréquence du génotype GG non significative chez les. Sujets sains vs patients PR (73% vs. 67%)
- la fréquence du génotype AG non significative de chez les sujets sains vs. Patients PR (22% vs. 19%)
- la fréquence du génotype AA significative chez les. patients PR vs les Sujets sains ((5% vs (14%), X<sup>2</sup>=4.71,P=0.03 , Pc=0.05 , RO =3.0 . IC 95% = [1.00-10.31])

Ces résultats sont confirmés par **V. S. Negi and All** (2016) ; leur étude de polymorphisme des gènes INOS 2 (rs2779248 - rs8078340) sur 242 sujets atteints par la PR et 279 sujets sains ont retrouvé une seule association entre les gènes INOS rs2779251 et les patients atteints de PR (46)

# *Conclusion*

### **Conclusion**

La polyarthrite rhumatoïde est l'une des maladies inflammatoires auto-immunes des articulations. Elle atteint environ 1 % de la population. Elle se caractérise par une inflammation chronique des articulations synoviales. Notre étude nous a permis d'étudier des bio marqueurs (anti-CCP ; facteurs rhumatoïdes) utiles principalement pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde. Il s'agit d'en décrire les méthodes de détection (Elisa, Laser néphélométrie) pour chaque paramètre respectivement. Et aussi nous avons étudié les polymorphismes des INOS par la technique de TaqMan pour connaître la relation entre les radicaux libre et l'ADN des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde

L'interprétation des résultats, sert pour le diagnostic et le suivi de la maladie. Cette étude est portée sur une population de 100 patients atteints par la PR. Cette population est répartie comme suit : 15 hommes et 85 femmes soit avec un sexe ratio (F/H) de 5,66. L'âge de ces patients est compris entre 19 et 75 ans. Une proportion de 100 patients sains possède un âge de 19 à 60 ans. Les résultats obtenus montrent que le FR et l'anti-CCP qui sont souvent utilisés comme biomarqueurs de la destruction articulaire et leur dosage est efficace pour le diagnostic positif de la PR. Ces résultats indiquent la présence d'une inflammation. Le dosage des anticorps anti-CCP révèle des taux élevés chez la majorité des patients (70%) par rapport à la normale ( $< 5$  UR/ml). Et pour l'étude du polymorphisme de gène NOS2 ou iNOS on a retrouvé une seule association entre les gènes INOS rs2779251 et la PR.

Cette étude confirme que la détermination d'un bilan immunologique, tel que l'anticorps anti-CCP et FR, est fiable pour l'évaluation de la polyarthrite rhumatoïde.



# *Références bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Pharmacorama** ( <https://www.pharmacorama.com/oxygene/> ) (2017) Oxygène
- 2- **J.Haleng, J.Pincemail, J.O.Defraigne, C.Charlier, J.P.Chapelle** (2007) Le stress oxydant. 62 : 10 : 628-638
- 3- **C.Rioux**, (2009) thèse : Stress oxydatif et prévention des maladies chroniques
- 4- **J.Carange** (2010) Mémoire : rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection
- 5- **I.Hininger-Favier** (2016) Le Stress oxydant (Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble)
- 6- **Psychologies** ( <http://www.psychologies.com/Dico-Psycho/Stress> ) (2017) Définition de Stress
- 7- **S.Lanasri** (2015) Le stress oxydants et les antioxydants, revue de santé (<http://www.revuedesante.com/Article/lestressoxydantsetlesantioxydants2298>).
- 8- **B.Lacroix** (2009) Stress oxydatif & pathologies nutriscience.
- 9- **H. Sekkiou** (2017) Tout sur la vitamine C ou Acide Ascorbique
- 10- **G.Rochat** (2014) Les radicaux libres et l'oxydation .O<sub>2</sub>score
- 11- **S.E.Kaddem** (2011). La polyarthrite rhumatoïde: de nouvelles révolutions thérapeutiques. Soir d'Algérie de dimanche 30 juillet 2011.
- 12- **O.Medjoujda** (2017) mémoire en ligne Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales
- 13- **A.Adoui A.Fartas H .Mecheri A** (2015) Mémoire : Effet du stress oxydant dans l'apparition de quelques complications du diabète mellitus
- 14- **D.Baeten, I.Peene, A.Union** (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid. Arthritis Rheumatoid. 44, 2255-62
- 15- **M.Magali** (2013) Thèse : origine et conséquences du stress oxydant, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT
- 16- **H.Puy** (2012) *Le cours n 7: Introduction aux radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène*

- 17- **M.Gardès-Albert, D.Bonnefont-Rousselot, Z.Abedinzadeh et D.Jore** (2003) Espèces réactives de l'oxygène, *Mécanismes biochimiques*
- 18- **B.Garait** (2006) LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR VOIE METABOLIQUE (REGIMES ALIMENTAIRES) OU PAR VOIE GAZEUSE (HYPEROXIE) ET EFFET DE LA GLISODIN.HAL archive ouverte .
- 19- **S.Kabouche** (2010) Mémoire : Etude de la relation du thé vert. Maladies cardiovasculaires et Stress oxydant
- 20- **F.Fisch** (2017) La biologie du stress oxydatif Infos Santé
- 21- **C.E Benammar** (2013) Mémoire : Détermination du statut antioxydant chez les patients diabétiques de la région de Tlemcen
- 22- **Polyarthrite Rhumatoïde Symptômes, Solutions, Traitements** (2017) [http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=polyarthrite\\_p\\_m](http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=polyarthrite_p_m)
- 23- **I.Auger** (2011) Thèse : nouveaux auto-anticorps dans la polyarthrite rhumatoïde
- 24- **Ma PR Mieux vivre ma Polyarthrite Rhumatoïde** (2017) <http://www.mieux-vivre-ma-pr.com/mieux-comprendre-gerer-maladie/ma-pr/>
- 25- **La polyarthrite rhumatoïde et l'inflammation** (2017) <http://public.larhumatologie.fr/grandes-maladies/polyarthrite-rhumatoïde/comment-se>
- 26- **P.Hord.** (2017) Polyarthrite rhumatoïde Causes, symptômes et traitement Santé Médecine sante médecine. journal des Femmes Santé
- 27- **Polyarthrite rhumatoïde** (2016) medecine , docs (<http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item121/texteI1.htm>)
- 28- **C.Jorgensen** (2011) Unité Inserm 844 "Cellules Souches Mésenchymateuses, Environnement Articulaires et Immunothérapies de la Polyarthrite Rhumatoïde
- 29- **Cofer** (2011) Polyarthrite rhumatoïde, Université Médicale Virtuelle Francophone
- 30- **Z.Bennamara** , ( 2017). Thèse : stress oxydant et pathologies humaines



- 31- J.Perrier** (2005) Le dosage des anticorps antiprotéines citrullinées : intérêt pour le diagnostic et le pronostic de la polyarthrite rhumatoïde. *Spectra biologie* n° 150
- 32- J.Morel et B.Combe** (2006) POLYARTHRITE RHUMATOÏDE/ RHEUMATOID ARTHRITIS *Rev Prat.* 2006 Mar 15;56(5):553-62
- 33- T.Parc** (2016) m2c2 biothechnologies végétales
- 34- Researhgate , net ,all right reserved** (2009)
- 35- A SARAUX** (2006). Épidémiologie des maladies rhumatismales. *Co-Président de la section Épidémiologie de la Société Française de Rhumatologie.*
- 36- S.E. Gabriel, S.C.Crowson, M. O’Fallonw** (1999). The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheumatoid.* 42, (3), 415-420.
- 37- Y. Khaldi** (2008) Luxation Atlo-Axoïdienne sur Polyarthrite Rhumatoïde. *Societe Algerienne de Neurochirurgie.* soit en remplace par J.A. Mathews. Atlanto-axial subluxation in rheumatoid arthritis. A 5 years follow up study. *Ann. Rheumtoid. Dis* 33 :526- 531, 1974
- 38- A.Thompson, J. Homik** (2011). Polyarthrite Rhumatoïde . Un aperçu des options de traitement. *Société de l’arthrite.*
- 39- A. Ladjouze** (2009). Nécessité d'un diagnostic précoce de la polyarthrite rhumatoïde.
- 40- D.M. Van der heijde, M.A .Van’t hof, P.L. Van riel** (1990). Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity. *Annals of Rheumatic Diseases.* 49(11), 916-20.
- 41- D. Baeten, I .Peene, A. Union** (2001). specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid. *Arthritis Rheumatoid.* 44, 2255-62
- 42- G.A. Shellekens** (1998). citrlline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific antibodies .*journal of clinical investigation.*101(1), 273-281.
- 43- A. Claude** (2011). Polyarthrite rhumatoïde. -Service de rhumatologie du Pr Meyer, CHU Bichat Oliver.

- 44- T.R. Mikuls, J.R. O'dell, J.A Stoner et All.** (2004). Association of Rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis Rheumatoid*.50, 3776-82
- 45- I. Vallbracht, J. Richer, M. Oppermann, F. Frger, U. Sichert, K. Hemke** (2004). Diagnostic and clinical value of anti cyclic citrullinated peptides influences the severity of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatoid*. 50, 2113-21.
- 46- V. S. Negi<sup>1</sup>, C. M. Mariaselvam .D. P. Misra . N. Muralidharan.C. Fortier<sup>3</sup>. D. Charron .R. Krishnamoorthy. R. Tamouza.** (2016) Polymorphisms in the promoter region of iNOS predispose to rheumatoid arthritis in south Indian Tamils
- 47- U.S. National Library of Medicine** (2017). NOS2 genenitric oxide synthase 2
- 48- N. Akasbi, L. Tahiri, G.S. Houssaini, T. Harzy** (2013). Les facteurs associés à l'infection au cours de la polyarthrite rhumatoïde.

# ***Annexe***

## Annexe 1: réactifs utilisés dans la techniques d'ELISA

Tampon échantillon : tris +chlorure de sodium ( NaCl) +sérum albumine bovine( BSA)+acide de sodium

Tampon de lavage :tris+NaCl+tween 20+acide de sodium

Contrôle négatif : sérum humain + sérum albumine bovine +acide de sodium

Conjugué IgA/G : immunoglobuline anti humaine conjugué à peroxydase de raifort + sérum albumine bovine( BSA)

Substrat TMB : tétra méthyl benzidine stabilisée et peroxyde d'hydrogène (TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Solution stop : acide chlorhydride

## Annexe 2 : les tableaux des résultats des patients de la PR

Age	19-30	31-40	41-50	51-60	60-75
patients Pr	12%	18%	41%	16%	11%
patients SS	41%	28%	23%	8%	0%

**Tableau 1 :** Répartition des patients et des contrôles selon les tranches d'âge

	ANTI CCP-	ANTI CCP +		FR-	FR+
patients SS	100%	0%	patients SS	100%	0%
patients PR	30%	70%	patients PR	55%	45%

**Tableau 2 :** Résultats du dosage du FR et des anti-CCP chez les patients PR et les sujets sains

	CCP+/FR+	CCP-/FR-	CCP+/FR-	CCP-/FR+
patient PR	37%	23%	32%	8%

**Tableau 3:** Distribution des résultats des anticorps anti-CCP2/FR dans la population malade.

Annexe

ID	Age	Sexe	EVO	Traitement	FR LN	CCP	INOS rs8078340	INOS rs2779251
PG2	48	M	3	CTC/Biothérapie	137	>250	G/G	A/G
PG3	42	F	1	CTC	>300	60	G/G	A/G
PG4	26	F	9	CTC/MTX	<8	<20	G/G	G/G
PG5	33	F	13	AINS/MTX/SZP/RTX	29	>300	G/G	G/G
PG6	56	M	9	MTX/SZP	<8	<20	A/G	A/A
PG8	47	F	13	CTC/Biothérapie	16	210	G/G	A/A
PG9	51	F	10	CTC/MTX	101	>300	G/G	G/G
PG12	49	F	22	CTC/AINS/MTX	<20	58	G/G	G/G
PG15	48	F	36	Plaquenil	H	>250	G/G	A/A
PG16	38	F	20	AINS/Plaquenil/SZP	<20	<20	G/G	A/A
PG17	47	F	11	CTC/AINS/MTX/RTX	28	>250	G/G	G/G
PG19	27	F	2	CTC/AINS/SZP/MTX/RTX	<20	<20	G/G	A/A
PG20	40	F	7	CTC/RTX/ARAVA	46	>250	G/G	G/G
PG21	46	M	9	CTCT/MTX/ETANERCEPT	22	150	A/G	A/A
PG22	27	F	3	CTC/SZP	36	>250	G/G	A/G
PG23	50	F	12	CTC	121	>250	A/G	G/G
PG25	44	M	13	CTC/MTX/RTX	86	>250	G/G	A/G
PG26	34	F	0,25	CTC	336	169	A/G	G/G
PG27	41	F	10	CTC/SZP	<20	<5	G/G	A/A
PG29	49	M	26	CTC/MTX/Plaquenil/SZP/Sels d'or	307	71	G/G	G/G
PG30	47	F	20	CTC	307	<5	A/G	G/G
PG31	47	M	6	CTC	128	10	G/G	G/G
PG35	44	F	15	CTC/MTX/Plaquenil	46	5	A/G	A/G
PG36	40	F	9	MTX	115	>250	A/G	G/G
PG38	43	F	1	AINS/CTC/RTX	128	<20	A/G	G/G
PG39	45	F	23	CTC/MTX/RTX	<20	>250	G/G	G/G
PG40	35	F	0,5	CTC	153	>250	G/G	G/G
PG41	52	F	10	SZP	<20	<20	G/G	G/G
PG43	46	F	10	CTC/RTX	58	>250	A/G	G/G
PG46	53	F	0,33	AINS/CTC	28	>300	G/G	G/G
PG47	48	F	15	AINS/MTX	238	>300	G/G	G/G
PG48	47	M	5	MTX/ETANERCEPT	<20	<20	A/G	G/G
PG49	46	F	15	CTC/MTX	<20	88	G/G	G/G
PG50	40	F	23	AINS/CTC/MTX	61	>250	A/G	G/G
PG87	49	F	4	Aucun	<8	<20	G/G	A/A
PG89	41	F	2	MTX	<20	125	A/G	G/G
PG90	29	F	1		31	<20	A/G	G/G
PG92	30	F	1	CTC/MTX	<20	74	G/G	G/G
PG94	35	F	5	CTC/MTX/Plaquenil	11	>250	G/G	A/A
PG96	45	F	5	SZP	>1270	>250	G/G	G/G
PG108	30	F	3	MTX/HUMERA	<10	89	G/G	A/A
PG115	36	F	3		276	>250	A/A	G/G
PG116	52	F	1	Antalgiques/AINS	<10	<20	G/G	G/G
PG117	36	F	0,58	MTX	32	>250	G/G	A/A
PG118	48	F	0,5	AINS	<10	<20	G/G	A/G
PG119	19	F	2	CTC	64	>250	A/G	A/G
PG120	51	F			<8	<20	A/G	G/G

Annexe

PG1	53	F	26	AINS/Antalgiques	17	<20	G/G	G/G
PG7	62	F	0,75	CTC/MTX	20	250	G/G	G/G
PG10	72	F	13	Mabthera	<20	51	A/G	G/G
PG11	59	F	24	CTC/ARAVA/RTX	<20	<20	G/G	G/G
PG13		F	9	CTC/RTX	<20	>250	G/G	A/A
PG14		F		CTC	27	<20	G/G	G/G
PG28	66	F	7	CTC/MTX	38	23	G/G	G/G
PG33	61	F	3	CTC/MTX	>1300	100	G/G	A/G
PG42	74	F	5	CTC/RTX	<20	<20	G/G	G/G
PG45	54	F	20	CTC/Plaquenil	<20	<20	G/G	G/G
PG51	60	F	22	CTC/MTX	24	24	G/G	G/G
PG59	58	F	3	MTX/Plaquenil	5	<20	G/G	G/G
PR-TO 1	45	F	0,92	MTX	1270	>250	A/G	G/G
PR-TO 3	23	F	0,33	Plaquenil	<8	58	A/G	G/G
PR-TO 4	67	F	3	MTX	<10	8	A/A	G/G
PR-TO 6	37	F	9	MTX	61	>250	A/G	G/G
PR-TO 7	57	F	0,67	MTX	1270	>250	G/G	G/G
PR-TO 8	42	F	4		49		G/G	G/G
PR-TO 9	22	F	0,25		32	>250	G/G	G/G
PR-TO 10	45	M	0,16	MTX	<8	<20	G/G	A/G
PR-TO 11	46	F	2		256	26	G/G	A/A
PR-TO 12	44	F	3	Enbrel	>256	188	G/G	G/G
PR-TO 13	52	F	4	MTX	256	191	A/G	G/G
PR-TO 14	36	F	6		24	268	A/G	G/G
PR-TO 15	32	F	0,67	MTX	>750	>250	A/G	A/G
PR-TO 16	26	F	0,5	MTX	<10	<20	G/G	A/G
PR-TO 18	49	F	4	MTX	<10	<20	G/G	G/G
PR-TO 19	45	F	28	MTX/SZP/Plaquenil/Enbrel	111	>250	A/G	G/G
PR-TO 20	35	F	2	MTX	93	<20	G/G	G/G
PR-TO 21	61	M	1		297	>250	G/G	G/G
PR-TO 22	31	F	5	Plaquenil	>750	<20	G/G	A/G
PR-TO 26	43	F	7	Plaquenil/Enbrel	150	>250	G/G	G/G
PR-TO 27	46	F	1	MTX	<20	44	G/G	A/G
PR-TO 28	52	M	1		680	>250	G/G	G/G
PR-TO 50	50	M	8	MTX	<20	25	G/G	G/G

29								
PR-TO 30	47	F	8	MTX	152	110	G/G	A/A
PR-TO 31	31	F	3		<20	>250	G/G	G/G
PR-TO 33	44	F			16(+)	>250	G/G	A/G
PR-TO 36	26	F	6		<20	55	G/G	G/G
PR-TO 37	62	F	1		>750	80	G/G	A/G
PR-TO 38	50	F	5		39	>250	A/G	G/G
PR-TO 39	42	F	8		93	57	G/G	G/G
PR-TO 40	44	M	10	CTC/MTX	24	>250	G/G	G/G
PR-TO 45	66	M			<10	147	G/G	A/G
PR-TO 46	60	F	3		254	>250	G/G	G/G
PR-TO 47	42	M	0,16	CTC	86,4	5	G/G	G/G
SE 2 (07)	43	F	2		173	269	G/G	G/G
SE 5 (07)	23	F	5	CTC/Arava	16	143	G/G	A/G
SE 7 (07)	37	F	14	CTC/MTX	124	252	G/G	G/G
SE 11 (07)	32	F	26	CTC/MTX	16	72	A/G	G/G
SE 18 (07)	68	M	27	CTC/MTX	102	217	G/G	G/G
SE 19 (07)	43	F	1	CTC	21	66	G/G	A/G
SE 23 (07)	75	F	2	CTC/MTX	15	1	G/G	A/G

**Tableau 4 :** les patients souffrants du PR (utiliser dans cette étude)

Annexe

ID	Age	Sexe	FR	CCP	INOS rs8078340	INOS rs2779251
SS/162	28	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/163	40	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/164	44	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/169	40	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/173	58	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/176	38	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/177	28	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/180	56	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/183	41	F	<10	<20	G/G	A/A
SS/184	60	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/185	48	F	<10	<20	A/A	G/G
SS/186	35	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/187	58	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/188	30	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/189	33	F	<10	<20	G/G	A/A
SS/191	46	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/198	50	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/199	35	F	<10	<20	G/G	A/G
SS/203	49	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/204	46	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/206	49	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/207	35	F	<10	<20	A/G	A/A
SS/211	28	F	<10	<20	G/G	A/A
SS/213	41	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/218	38	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/239	47	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/252	38	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/253	34	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/266	44	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/171	27	M	<10	<20	G/G	A/A
SS/214	55	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/219	49	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/220	38	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/222	47	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/224	32	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/228	38	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/233	42	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/234	57	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/236	35	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/240	41	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/242	27	M	<10	<20	G/G	G/G

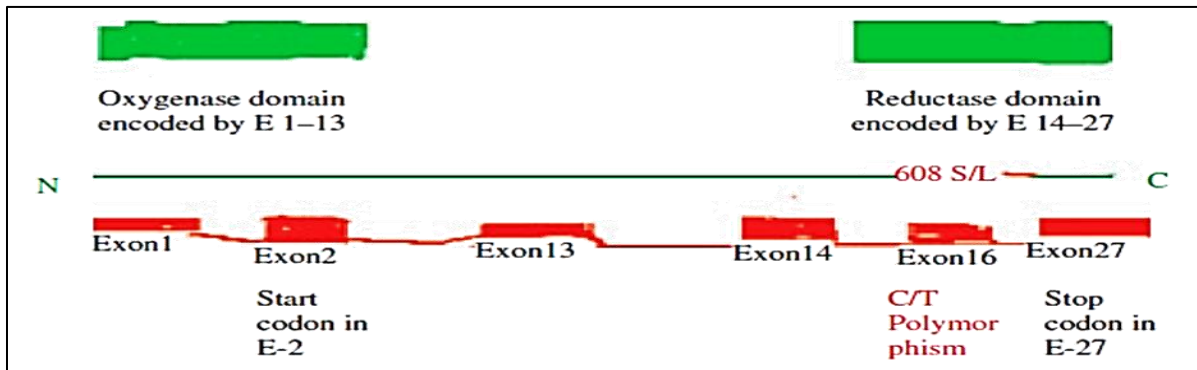


Annexe

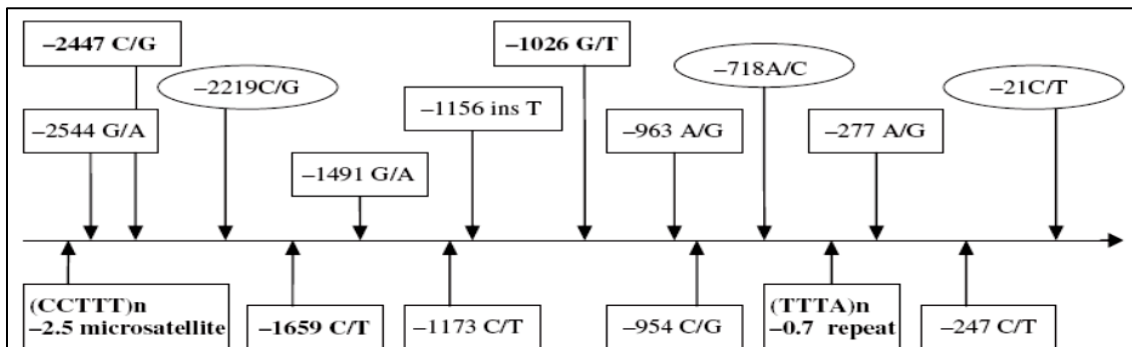
SS/248	29	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/249	32	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/254	37	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/257	29	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/258	32	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/259	33	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/262	29	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/263	36	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/270	37	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/271	42	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/274	42	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/285	32	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/292	31	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/318	47	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/323	23	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/324	23	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/325	25	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/326	56	F	<10	<20	G/G	A/G
SS/328	25	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/329	25	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/330	24	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/331	23	F	<10	<20	G/G	A/G
SS/332	24	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/333	25	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/363	44	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/364	29	F	<10	<20	A/G	G/G
SS/365	49	M	<10	<20	A/G	A/G
SS/366	33	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/367	24	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/38	19	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/41	25	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/42	22	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/48	21	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/50	19	F	<10	<20	G/G	G/G
SS/58	22	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/62	20	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/64	25	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/68	22	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/70	29	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/73	32	M	<10	<20	A/A	G/G
SS/76	52	M	<10	<20	A/A	G/G
SS/79	27	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/81	22	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/83	35	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/84	43	M	<10	<20	G/G	G/G

SS/85	47	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/86	35	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/87	47	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/88	34	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/89	34	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/91	23	M	<10	<20	A/G	A/G
SS/94	21	F	<10	<20	A/G	A/G
SS/95	23	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/96	19	M	<10	<20	A/G	A/G
SS/98	22	M	<10	<20	A/G	G/G
SS/103	20	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/105	27	M	<10	<20	G/G	A/G
SS/107	20	M	<10	<20	G/G	G/G
SS/108	20	M	<10	<20	A/G	A/G

**Tableau 5 :** les patients sains (utiliser dans cette étude)



**Figure 1:** Organisation du gène NOS2



**Figure 2:** Principaux polymorphismes du promoteur du gène NOS2

**Année universitaire : 2016 /2017**

**Présenté par : KIHAL CHAHINEZ**

**MENASRIA AMIRA**

## **Etude du stress oxydatif dans la polyarthrite rhumatoïde**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Nutrition Moléculaire et Santé

### **Résumé**

Le stress oxydatif n'a pas la même signification que le stress psychique qui nous connaissons tous. Il s'agit d'une oxydation des constituants de notre organisme due à un excès des radicaux libres qui viennent de l'oxygène que nous respirons pour vivre cette oxydation dénature nos protéines, nos lipides, nos sucres et même notre ADN. Cette agression de nos cellules est une des causes essentielles de nombreuses pathologies telle que la maladie auto-immune polyarthrite rhumatoïde qui attaque les articulations.

Notre étude consiste à l'évaluation d'un ensemble des marqueurs biologiques utilisés pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR) . Pour cela on a dosé les anticorps anti-CCP (anti-CCP), les facteurs rhumatoïdes (FR), et étudié le polymorphisme des gènes de L'oxyde nitrique synthase (NOS2 ou iNOS) car La NOS jouant un rôle potentiellement important dans la maladie de PR.

Le dosage des biomarqueurs précédemment cités révèle que les anticorps anti-CCP est se retrouvent chez 70% de la population atteintes du PR. Et que 45% des atteints de PR possèdent des facteurs rhumatoïde positifs. Et pour l'étude des polymorphismes des gènes de NOS2 ou iNOS on a retrouvé une seule association entre les gènes INOS rs2779251 et la PR.

**Mots clés :** polyarthrite rhumatoïde, facteurs rhumatoïde, anticorps anti-CCP, les polymorphismes des gènes de NOS2.

Jury d'évaluation :

- **Président du jury :** ZITOUNI ABDELBAKI
- **Rapporteur :** HAFI AMMAR / SALAH SOFIANE SAMIR
- **Examineur :** HAMIDECHI ABDELHAFID

**Laboratoire de recherche :** auto immunité / institut Pasteur. Alger