

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de BLIDA 1



Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Et Physiologie Cellulaire

Institut Pasteur Algérie

MEMOIRE

De : Fin d'Étude en Vue de l'Obtention Du Diplôme de Master

Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE.

Sous le sujet de recherche :

Implications des polymorphismes de NOS3 dans le développement de la PR et du LES dans la population Algérienne

Présenté par :

M^{elle} : BOUDIA Imène

M^{elle} : LABABOU Yasmine

Soutenu le : 17 /07/2019

Devant le jury composé de :

M^{me} RAHIM I.	MCB	USDB1	Présidente
M^{me} BOKRETA S.	MAA	USDB1	Examinatrice
M^{me} BENIDIR M.	MA	IPA	Promotrice
M^r BENYAHIA N.	MAA	USDB1	Co-Promoteur

Promotion 2018-2019

Remerciements

La gratitude est le secret de la vie. L'essentiel est de remercier pour tout. Celui qui a appris cela sait ce que vivre signifie. Il a pénétré le profond mystère de la vie.

Albert Schweitzer

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

*On voudrait remercier en premier lieu, notre encadreur de mémoire **Dr. Benidir Mounira**, chef de service de l'auto-immunité de l'IPA, d'avoir accepté de nous encadrer et nous accueillir au sein de son laboratoire, pour sa disponibilité, son aide, son dynamisme et ses précieuses orientations.*

*Ensuite notre Co-promoteur **Mr Benyahia**, pour sa disponibilité, son aide, son écoute et son sérieux, on tenait à le remercier également pour son soutien moral tout au long de l'année et son constant positivisme hautement motivant !*

*On souhaitera remercier également, les membres du jury, **Mme Rahim**, présidente du jury et **Mme Bokreta**, examinatrice, on vous remercie de nous avoir honoré de votre présence en ce jour !*

Sans oublier nos chers parents, qui, sans eux en ne serai jamais arrivés là où on en est aujourd'hui.

On tient à remercier aussi l'ensemble du personnel de l'Institut Pasteur d'Algérie pour leurs conseils pleins de sens et pour le suivi et l'intérêt qu'ils ont porté à nos travaux de recherche.

Enfin, on n'oserait oublier de remercier tout le corps professoral de notre université, pour le travail énorme qu'il effectue pour nous créer les conditions les plus favorables pour le déroulement de nos études durant toutes ces années universitaires.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers.

*A mes chers parents,
Sources de mes joies, secrets de ma force
Vous serez toujours le modèle
Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour nous
Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté
Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants
Grandissent et prospèrent
Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie
Au bien être de vos enfants
Merci d'être tout simplement mes parents
C'est à vous que je dois cette réussite
A mes sœurs,
En témoignage de l'attachement, de l'amour et de
L'affection que je porte pour vous.
A Mon frère, le chouchou de la famille,
Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de
Réussite et de sérénité.*

A mes chers amis,

*Un jour vous êtes rentrés dans ma vie et depuis vous me lisez, vous
m'écoutez et vous me consolez, quand je me sens abattue, vous réussissez
à me faire sourire.*

*Je vous souhaite une vie pleine de santé et de
Bonheur.*

BOUDIA Imene

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail de recherche particulièrement à mes grands-parents paternels et maternels qui auraient été tellement fiers de moi s'ils étaient toujours en vie ...

A mes parents, qui m'ont inculqué le sens de la droiture et de la réussite, votre fierté et votre tendresse sont un moteur pour moi au quotidien !

Papa, ma source de ma motivation, mon bras droit ! Tu as suivi mes aventures années après années, depuis petite, tu m'as toujours soutenu quoi que je fasse, pas à pas. Tu m'as appris que dans cette vie il faut croire en ses rêves et ne jamais baisser ses bras, et que rien n'est impossible à réaliser, et que quand on veut, on peut !

A ma mère, ma source de bonheur et de douceur, tu t'es tellement battu pour moi, tu m'as tellement motivé depuis petite, toi qui a veillé à ce que je devienne la forte personne que je suis aujourd'hui, toi et papa !

A mes beaux-parents qui m'ont toujours motivé et encouragé avec leurs ondes positives !

A mes sœurs d'amour et mon frère que j'aime énormément !

A ma belle-sœur et mes beaux-frères qui ont toujours été là pour moi !

A mon fiancé, pour son amour et son soutien quotidien indéfectible et son encouragement et motivation à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.

A mon petit neveu Wassim, ma petite boule d'amour et de joie !

Enfin, à toute ma famille et mes amis et toute personne qui était là pour moi !

LABABOU Yasmine.

Résumé

Le phénomène de stress oxydatif est généré par la production excessive de radicaux libres qui s'accumulent dans le corps. Ce processus joue un rôle majeur dans le développement des maladies chroniques et dégénératives telles que le cancer et des maladies auto immunes comme la PR et LES.

L'objectif de l'étude présente est d'étudier l'implication de 2 SNPs de NOS3 (+894G/T et -786C/T) dans la susceptibilité à développer la PR et le LES chez des patients algériens.

Notre étude a porté sur 142 patients atteints de PR (âge : 48 ± 12 ans ; sexe ratio : 1:5), 73 patients atteints de LES (âge : 48 ± 12 ans ; sexe ratio : 1:12) et 84 sujets sains (âge : 48 ± 12 ans ; sexe ratio : 1:6). Dans l'étude sérologique, nous avons recherché les anticorps spécifiques aux deux maladies (FR, ACPA et AAN) grâce à 4 techniques (Laser néphélométrie, ELISA, IFI et IFF) et pour l'étude génétique, nous avons fait appel à la technologie TaqMan.

Nos résultats montrent pour le SNP :

- NOS3 (+894G/T) une association entre l'allèle G et la susceptibilité à développer la PR tandis que l'allèle T est associé au développement du LES (OR = 7,32) et à la production des anticorps anti-ADN natif et anti-Sm (OR = 7,16 et 12,82). Quant aux génotypes de ce SNP, notre analyse révèle que le génotype TT est associé au LES (OR=17,16) ainsi qu'à la production des anti-ADN natif et anti-Sm (OR = 28,42 et 48,71) alors que les génotypes GT et GG sont associés à la PR (OR =5,14 et 4,67) et paradoxalement, le génotype TT est associé à la production des ACPA et du FR dans la PR (OR= 6,96 et 6,33).
- NOS3 (-786C/T) une association des génotypes TT et CC au LES (OR =2,44 et 3,51) et le génotype CC à la production des anti-ADN natif et anti-Sm (OR= 3,76 et 3,19) tandis que le génotype CT est associé à la PR (OR =9,72) sans qu'il n'y ait d'association à la production des ACPA et FR.

Nos résultats rejoignent ceux de la littérature et ont permis une caractérisation génétique quant au stress oxydant, en particulier concernant le gène NOS3, de patients algériens atteints de PR et de LES.

Mots Clés : Polyarthrite Rhumatoïde, Lupus Erythémateux Systémique, Auto-anticorps, TaqMan, Single Nucléotide Polymorphism, NOS3 (+894G/T), NOS3 (-786C/T).

Abstract

The phenomenon of oxidative stress is generated by the excessive production of free radicals that accumulate in the body. This process plays a major role in the development of chronic and degenerative diseases such as cancer and autoimmune diseases such as RA and SLE

The purpose of our work is to study the involvement of 2 SNPs of NOS3 (+ 894G/T and -786C/T) in the susceptibility to develop RA and SLE in Algerian patients.

Our study included 142 RA patients (age: 48 ± 12 years, sex ratio: 1: 5), 73 SLE patients (age: 48 ± 12 years, sex ratio 1:12) and 84 healthy individuals (age: 48 ± 12 years, sex ratio: 1: 6). In the serological study, we looked for the antibodies specific to the two diseases (RF, ACPA and ANA) thanks to 4 techniques (Laser nephelometry, ELISA, IFFT and Multiplex) and for the genetic study, we used TaqMan technology.

Our results show for the SNP:

- NOS3 (+ 894G/T) an association between allele G and the susceptibility to develop RA while allele T is associated with SLE development (OR 7.32) and the production of antibodies against native DNA and anti-Sm (OR 7.16 and 12.82). As for the genotypes of this SNP, our analysis reveals that genotype TT is associated with SLE (OR 17.16) as well as with the production of anti-native DNA and anti-Sm (OR 28.42 and 48.71) then that the GT and GG genotypes are associated with RA (OR 5.14 and 4.67) and paradoxically, the TT genotype is associated with the production of ACPA and RF in RA (OR 6.96 and 6.33);
- NOS3 (-786C/T) a combination of TT and CC genotypes at SLE (OR 2.44 and 3.51) and CC genotype for the production of anti-native DNA and anti-Sm (OR 3.76 and 3.19) while CT genotype is associated with RA (OR 9.72) without an association with ACPA and RF production.

Our results are consistent with those in the literature. And they allowed a genetic characterization of the oxidative stress, in particular concerning the NOS3 gene, of Algerian patients with RA and SLE.

Key words: Rheumatoid Arthritis, Systemic lupus erythematosus , Auto-antibodies , , TaqMan, Single Nucleotide Polymorphism, NOS3 (+894G/T), NOS3 (-786C/T).

الملخص

تولد ظاهرة الاجهاد المؤكسد نتيجة الانتاج المفرط للجذور الحرة الذين يتراكمون في الجسم. وتلعب هذه العملية دورا رئيسيا في تطوير الأمراض المزمنة والتتكسية مثل السرطان وأمراض المناعة الذاتية كالتهاب المفاصل الروماتويدي (PR) و الذئبة الحمامية الجهازية (LES).

الهدف من هذه الدراسة هو تأثير اثنين من SNPs من NOS3 (+894G/T, -786C/T) في القابلية لظهور PR وLES عند المرضى الجزائريين.

تناولت دراستنا 142 مريضا مصابا بال PR (العمر: 12 ± 48 سنة; نسبة الجنس: 1: 5)، 73 مريضا مصابا بال LES (العمر: 12 ± 48 سنة; نسبة الجنس: 1: 12) و 84 شخصا أصحاء (العمر: 12 ± 48 سنة; نسبة الجنس: 1: 6). في الدراسة المصلية، بحثنا عن أجسام مضادة محددة لكلا المرضين (ACPA، FR) و (AAN و بفضل 4 تقنيات (Laser néphélémetrie, ELISA, IFI et IFF) و في الدراسة الجينية، استخدمنا تقنية TaqMan. نتائجا تظهر لـ Snp:

- NOS3 (+ 894G/T) هناك علاقة بين أليل G والقابلية لظهور التهاب المفاصل الروماتويدي PR بينما يرتبط أليل T بظهور الذئبة الحمامية الجهازية LES وإنتاج أجسام مضادة ضد الحمض النووي الأصلي Anti-ADNn و أجسام مضادة Anti-Sm ($OR = 7.16$ و 12.82). بالنسبة للأنماط الجينية لهذا SNP، يكشف تحليلنا أن النمط الوراثي TT مرتبط بـLES ($OR = 17.16$) و بإنتاج Anti-ADNn و Anti-Sm ($OR = 28.42$ و 48.71) في حين أن الأنماط الجينية GT و GG مرتبطة بـ PR ($OR = 5.14$ و 4.67) والعكس مع النمط الوراثي TT فهو مرتبط بإنتاج ACPA و FR عند PR ($OR = 6.96$ و 6.33).

- NOS3 (-786C/T) هناك علاقة بين الأنماط الوراثية TT و CC في LES ($OR = 2.44$) و (3.51) والنمط الوراثي CC في إنتاج Anti-ADNn و Anti-Sm ($OR = 3.76$ و 3.19) في حين أنه يرتبط النمط الوراثي CT مع PR ($OR = 9.72$) مع عدم وجود أي ارتباط مع إنتاج ACPA و FR.

تتوافق نتائجا مع نتائج الدراسات العلمية وقد سمحت بتحديد خصائص وراثية للإجهاد التأكسدي، خاصة فيما يتعلق بجين NOS3 ، للمرضى الجزائريين المصابين بالتهاب المفاصل الروماتويدي و الذئبة الحمراء.

الكلمات الرئيسية: PR ، LES ، الأجسام المضادة التلقائية ، TaqMan ، SNP ، NOS3 (+894G/T) ، NOS3 (-786C/T) ،

INTRODUCTION	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	
I-1. RÉPONSE IMMUNITAIRE ET AUTO-IMMUNITÉ.....	2
I-2. POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.....	2
I.2-1. Définition.....	2
I.2-2. Étiopathogénie de la Polyarthrite Rhumatoïde.....	4
I.2.2-1. Facteurs environnementaux.....	4
I.2.2-2. Facteurs hormonaux.....	4
I.2.2-3. Facteurs génétiques.....	4
I.2-3. Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde.....	4
I.2.3-1. Phase d'initiation.....	5
I.2.3-2. Phase de recrutement.....	5
I.2.3-3. Phase de prolifération synoviale et des lésions articulaires.....	6
I.2-4. Diagnostic de la Polyarthrite Rhumatoïde.....	7
I.2.4-1. Manifestations cliniques de la Polyarthrite Rhumatoïde débutante.....	7
I.2.4-2. Évolution de la Polyarthrite Rhumatoïde.....	8
I-3. LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE.....	10
I.3-1. Définition.....	10
I.3-2. Étiopathogénie du Lupus érythémateux systémique.....	10
I.3.2-1. Facteurs environnementaux.....	10
I.3.2-2. Facteurs hormonaux.....	10
I.3.2-3. Facteurs génétiques.....	10
I.3-3. Physiopathologie du Lupus Érythémateux Systémique.....	11
I.3-4. Diagnostic du Lupus Érythémateux Systémique.....	13
I.3.4-1. Manifestation cliniques du Lupus Érythémateux Systémique.....	14
I.3.4-2. Évolution du Lupus Érythémateux Systémique.....	15
I-4. AUTO-ANTICORPS	15
I.4-1. Définition.....	15
I.4-2. Auto-anticorps spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde.....	16
I.4.2-1. Facteur rhumatoïde.....	16
I.4.2-2. Anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA).....	16
I.4-3. Auto-anticorps spécifiques du Lupus Érythémateux Systémique.....	16
I.4.3-1. Auto-anticorps anti-ADN natif.....	16
I.4.3-2. Auto-anticorps anti-Sm.....	16
I-5. STRESS OXYDATIF.....	17

I.5-1. Stress oxydatif dans la Polyarthrite Rhumatoïde et le Lupus Érythémateux Systémique.....	17
I.5-2. Monoxyde d'azote (NO) et la Nitric oxyde synthase (NOS).....	17
I.5.2-1. Monoxyde d'azote (NO).....	17
I.5.2-2. Nitric Oxyde Synthase (NOS)	18
I.5.2-3. Nitric Oxyde Synthase-3 (NOS3).....	21
I.5.2-4. Gène de la Nitric Oxyde Synthase-3 (NOS3).....	23

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II-1. MATÉRIEL.....	26
II.1-1. Population étudiée	26
II.1-2. Matériel biologique.....	26
II.1-3. Matériel non biologique.....	26
II-2. MÉTHODES.....	26
II.2-1. Étude sérologique.....	26
II.2.1-1. Dosage du Facteur Rhumatoïde.....	27
II.2.1-2. Dosage des anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA).....	27
II.2.1-3. Recherche des anticorps anti-nucléaires (AAN).....	29
II.2-2. Étude génétique.....	33
II.2.2-1. Extraction d'ADN.....	33
II.2.2-2. Étude des SNPs eNOS rs1799983 et rs2040744 par la technologie TaqMAN.....	34
II.2-3. Analyse Statistique.....	39

Chapitre III : Résultats

III-1. Caractéristiques de la population étudiée.....	40
III-2. Recherche d'une association entre les SNPs NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la susceptibilité à développer la PR et le LES dans la population étudiée.....	40
III.2-1. NOS3 rs1799983.....	40
III.2.1-1. Comparaison entre les patients PR et LES.....	41
III.2.1-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains.....	41
III.2.1-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains.....	41
III.2-2. NOS3 rs2070744.....	42
III.2.2-1. Comparaison entre les patients PR et LES.....	42
III.2.2-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains.....	42
III.2.2-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains.....	43
III.2-3. Distribution haplotypique.....	43
III.2.3-1. Comparaison entre les patients PR et LES.....	43
III.2.3-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains.....	44
III.2.3-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains.....	44
III-3. Recherche d'une association entre les SNPs NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques de la PR et du LES.....	44
III.3-1. NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques de la PR... ..	44
III.3.1-1. Production des ACPA.....	44
III.3.1.1-1. NOS3 rs1799983.....	44
III.3.1.1-2. NOS3 rs2070744.....	45
III.3.1.1-3. Comparaison des taux moyens en ACPA chez les patients PR en fonction des SNPs NOS3.....	46
III.3.1-2. Production du Facteur Rhumatoïde.....	47
III.3.1.2-1. NOS3 rs1799983.....	47
III.3.1.2-2. NOS3 rs2070744.....	48
III.3.1.2-3. Comparaison des taux moyens en FR chez les patients PR en fonction des SNPs NOS3.....	48
III.3-2. NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques du LES.....	50
III.3.2-1. Production des anticorps anti-ADN natif.....	50
III.3.2.1-1. NOS3 rs1799983.....	50

Sommaire

III.3.2.1-2. NOS3 rs2070744.....	51
III.3.2.1-3. Comparaison des taux moyens en anticorps anti-ADN natif chez les patients LES en fonction des SNPs NOS3.....	53
III.3.2-2. Production des anticorps anti-Sm.....	54
III.3.2.2-1. NOS3 rs1799983.....	54
III.3.2.2-2. NOS3 rs2070744.....	55
Chapitre IV : Discussion.....	58
CONCLUSION.....	64
Références Bibliographiques.....	66

Liste des abréviations

AAN	Anticorps Anti-Nucléaire
AC	Anticorps
ACPA	Anti-Citrullinated Peptides Antibodies
ACE	American College of Rheumatology
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
AP1	Adaptor-related Protein 1
BH4	Tétrahydrobiotérine
Ca²⁺	Calcium
CAM	Calmoduline
CCP	Cyclic Citrullinated Peptides
CD	Cluster of Differentiation
CD	Cellule dendritique
CDp	Cellule Dendritique Plasmacytoïde
Ck2	Caséine kinase 2
COX1	Cyclooxygénase-1
COX2	Cyclooxygénase-2
DAG	Diacylglycérol
DID	Diabète insulino-dépendant
EAO	Espèces actives de l'oxygène
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
eNOS	Monoxyde d'Azote Synthase Endothéliale
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAM	6-carboxyfluorescéine
Fc	Fragment constant

FGF	Fibroblast Growth Factor
FLS	Fibroblaste-like Synoviocyte
FMN	Flavine MonoNucléotide
FR	Facteur Rhumatoide
GATA-1	GATA Binding Protein 1
GB	Globule Blanc
GMPc	Guanosine Mono Phosphate cyclique
GR	Globule Rouge
GTP	Guanosine triphosphate
HEp2000	Human epithelialcell line type <i>2000</i>
HLA-DR1	Human Leukocyte Antigen
HLA-DR4	Human Leukocyte Antigen
Hsp-90	90 kDa-Heat Shock Protein
IFI	Immunofluorescence indirecte
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Monoxyde d'Azote Synthase inductible
IP-3	Inositol 1,4,5 Tri Phosphate
LB	Lymphocyte B
LES	Lupus érythémateux systémique
LPS	LipoPolySaccharide
LT	Lymphocyte T
MHP	Mitochondrial H ₂ O ₂ production
Mono/Mac	Monocyte/Macrophage
m-TOR	Mechanistic target of rapamycin
NAC	N-acétyl-cystéine
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NET	Neutrophil Extracellular Trap

NF1	Neuro-Fibromin-1
nNOS	Monoxyde d'Azote Synthase Neuronale
NO	Monoxyde d'Azote
NOS	Monoxyde d'Azote Synthase
NOX	NADPH Oxydase
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLC	Phospholipase C
PN	Polynucléaire neutrophile
PP2A	Protéine Phodphatase 2A
PR	Polyarthrite Rhumatoide
RANK	Receptor Activator of NK-Kb
RANK-L	Receptor Activator of NK-κB Ligand
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SLB	Solution de Lyse des globules Blancs
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SNP	Single Nucléotide Polymorphism
SP1	Specificity Protein-1
TCR	T-Cell Receptor
TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
UV	Rayonnements ultraviolets
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VNTR	Répétition en tandem à nombre variable
Zn²⁺	Zinc

Glossaire

Affection multifactorielle : Une maladie est dite multifactorielle quand son apparition renvoie à divers facteurs génétiques et environnementaux. C'est le cas de la plupart des pathologies courantes, associant dans leur étiologie le terrain héréditaire et l'histoire de vie du patient.

Apoptose : Processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire.

Arthrite : Désigne plus d'une centaine d'affections différentes qui se caractérisent par des douleurs à des articulations, des ligaments, des tendons, des os ou d'autres éléments du système musculosquelettique.

Articulations métacarpo-phalangiennes : Elles comprennent la tête de chacun des os du métacarpe et l'extrémité de chaque première phalange des doigts.

Articulations métatarso-phalangiennes : C'est une articulation qui unit la tête des os métatarsiens (du métatarse), à la base des premières phalanges des doigts du pied.

Endocardite : C'est une inflammation de l'endocarde (structures et enveloppe interne du cœur, incluant les valves cardiaques). C'est une maladie assez rare mais souvent grave.

Haplotype : Groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble.

Hyperplasie : C'est un terme médical désignant une augmentation de volume d'un tissu ou d'un organe due à une augmentation du nombre de ses cellules.

Myocardite : Est une inflammation du muscle cardiaque (myocarde) causée, la plupart du temps, par une infection virale. L'inflammation du cœur causé par le virus diminue sa force de contraction et sa capacité à fournir un apport en sang.

Nécrose : Elle correspond à la mort anormale et non programmée d'une cellule ou d'un tissu. Elle s'oppose donc à l'apoptose et caractérise un état pathologique : infection bactérienne ou fongique.

Pannus rhumatoïde : C'est un épaississement de la membrane synoviale responsable des lésions ostéo-cartilagineuses et tendineuses dans la Polyarthrite rhumatoïde.

Péricardite : Inflammation du péricarde, la membrane entourant le cœur. Elle peut s'accompagner ou non d'un épanchement péricardique. On la distingue d'un épanchement

péricardique, qui correspond à la présence de liquide dans le péricarde, sans obligatoirement d'inflammation.

Polymorphisme : Le polymorphisme génétique se définit par l'existence de plusieurs allèles dans une population. Ce phénomène résulte des mutations génétiques.

Prédisposition génétique : Configuration génétique d'un organisme qui le rend vulnérable à un problème de santé, l'environnement et les relations de l'organisme avec celui-ci ayant également une influence plus ou moins importante sur l'apparition ou non du problème.

Susceptibilité génétique : Une sensibilité latente à une maladie au niveau génétique qui pourrait être déclenchée dans certaines conditions.

Syndrome de Klinefelter : Ou 47, XXY est une aneuploïdie qui se caractérise chez l'humain par un chromosome sexuel X supplémentaire. L'individu présente alors deux chromosomes X et un chromosome Y, soit 47 chromosomes au lieu de 46. L'individu est alors de caractère masculin, mais infertile.

Tartrazine : C'est une molécule utilisée comme colorant alimentaire de couleur jaune, et aussi comme colorant dans les produits cosmétiques.

Tolérance : Etat de non réponse immunitaire à un antigène. Normalement, l'organisme est tolérant à ses propres constituants (Tolérance du soi, ou auto-tolérance).

Variant génétique : Région du génome qui est variable d'un individu à l'autre. Il peut s'agir d'une variation mononucléotidique, où dans une localisation donnée du génome deux nucléotides différents peuvent être observés dans la population (A/T, A/G, A/C, G/C, G/T ou T/C). Classiquement, lorsqu'un variant génétique est fréquent (> 1 % de la population) on parle de polymorphisme, lorsqu'il est rare on utilise plutôt le terme mutation. Les variants génétiques les plus fréquemment étudiés dans GWAS à ce jour sont les polymorphismes mononucléotidiques (SNP).

Liste des figures

Figure 1. Articulations les plus souvent atteintes dans la Polyarthrite Rhumatoïde.....	3
Figure 2. Schéma illustratif de la différence entre une articulation saine et une articulation d'un patient atteint de PR.....	3
Figure 3. Cytokines clés dans la physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde	6
Figure 4. Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde	7
Figure 5. Polyarthrite Rhumatoïde débutante: atteinte inflammatoire précoce de la main avec présence de synovite en (fuseau) sur les 3emes inter-phalangiennes proximales.....	8
Figure 6. Exemples des déformations dans une PR ancienne.....	9
Figure 7. Inflammation tissulaire dans le Lupus Érythémateux Systémique.....	12
Figure 8. Physiopathologie du Lupus Érythémateux Systémique.....	13
Figure 9. Manifestations dermatologiques dans le Lupus Érythémateux Systémique.....	15
Figure 10. Génération du Monoxyde d'azote (NO) à partir de la L- arginine.....	18
Figure 11. Structure d'une sous-unité de la NO synthase.....	19
Figure 12. Biosynthèse du Monoxyde d'azote endothélial.....	21
Figure 13. Voies d'activation d'eNOS.....	22
Figure 14. Structure du gène NOS3.....	24
Figure 15. Principe de la technique ELISA.....	28
Figure 16. Principe de l'IFI sur cellules HEp2000.....	29
Figure 17. Principe de la fluorimétrie en flux.....	30
Figure 18. Principe de la fluorimétrie en flux.....	31
Figure 19. Schéma récapitulatif de l'étude sérologique.	32
Figure 20. Différentes étapes du génotypage par la technique TaqMAN.....	36
Figure 21. Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.	38
Figure 22. Schéma récapitulatif de l'étude génétique.....	38
Figure 23. Comparaison des taux moyens en ACPA chez les patients PR en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.....	46
Figure 24. Comparaison des taux moyens en FR chez les patients PR en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.....	49
Figure 25. Comparaison des taux moyens en anticorps anti-ADN natif chez les patients LES en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.....	53

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques des iso-enzymes NOS humaines.....	20
Tableau II. Localisation des SNPs de la NOS3 étudiés dans des pathologies auto-immunes.....	25
Tableau III. Référence des AD Mix TaqMan utilisés dans cette étude.....	35
Tableau IV. Mélange réactionnel pour la PCR.....	37
Tableau V. Programme de la RT-PCR.....	37
Tableau VI. Caractéristiques de la population étudiée.....	40
Tableau VII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR, LES et sujets sains.....	40
Tableau VIII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR, LES et sujets sains.....	42
Tableau IX. Distribution haplotypique des SNPs NOS3 chez les patients PR, LES et sujets sains.....	43
Tableau X. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR, LES et sujets sains en fonction de la production des ACPA.....	45
Tableau XI. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production des ACPA.....	46
Tableau XII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production du FR.....	47
Tableau XIII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production du FR.....	48
Tableau XIV. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-ADN natif.....	50
Tableau XV. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-ADN natif.....	52
Tableau XVI. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-Sm.....	54
Tableau XVII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-Sm.....	56

INTRODUCTION

L'auto-immunité est un phénomène qui correspond à une rupture de tolérance du système immunitaire. Nous distinguons deux types de maladies auto-immunes : spécifiques et non spécifiques d'organes (**Owen et al., 2014**). Parmi les maladies non spécifiques d'organe figure la Polyarthrite Rhumatoïde (PR) qui est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires de l'adulte. Elle prédomine chez la femme, avec un sex ratio de 1:3 à 1:4 (Homme : Femme) et une prévalence mondiale de 0,5 à 1%. Le processus inflammatoire dans cette pathologie conduit à une destruction des articulations et peut atteindre les poumons, la peau et d'autres organes (**Gerhard et al., 2014**).

Le Lupus Érythémateux Systémique (LES) est une maladie auto-immune qui représente l'archétype des maladies auto-immunes systémiques. Cela signifie que le système immunitaire, censé protéger l'organisme, se dérègle et se retourne contre lui. Des processus inflammatoires toxiques se déclenchent à différents niveaux : peau, articulations et reins (**Marre et al., 2018**).

Le phénomène de stress oxydatif est généré par la production excessive de radicaux libres qui s'accumulent dans le corps. Ce processus joue un rôle majeur dans le développement des maladies chroniques et dégénératives telles que le cancer et des maladies auto-immunes telles que la PR et LES. Ces dernières ne sont, en effet, pas associées à une anomalie majeure d'un seul gène (comme dans l'hémophilie), mais ce sont différentes particularités génétiques qui, associées, prédisposent à développer la maladie (« maladie multigénique »). Ces petites différences génétiques des gènes de l'immunité sont appelées « polymorphismes » (**Amoura et al., 2008**). Certains polymorphismes génétiques affectent l'expression d'un gène donné voire la production d'une protéine donnée. De ce fait, il est raisonnable de penser que de tels polymorphismes puissent jouer un rôle capital dans la physiopathologie de certaines maladies.

Pour mettre en évidence les variations génétiques associées aux polymorphismes de type SNPs, du gène NOS3 chez les patients algériens atteints de PR, de LES et leurs corrélations avec les dosages des auto-anticorps, nous nous sommes fixés pour objectifs, dans notre étude :

- Dans un premier temps, établir une association entre ces SNP du gène NOS3 rs1799983 (+894G/T) et rs2070744 (-786T/C) et la susceptibilité à développer la PR et le LES.
- Dans un deuxième temps, rechercher une association entre ces SNPs et la production des auto-anticorps (Facteur rhumatoïde, anticorps anti-peptides citrullinés) pour la PR.
- Enfin, rechercher une association entre ces SNPs et la production des auto-anticorps (Anticorps anti-ADN natif, anticorps anti-Sm) pour le LES.

I. Synthèse bibliographique

I-1. RÉPONSE IMMUNITAIRE ET AUTO-IMMUNITÉ

Le fonctionnement du système immunitaire est rapide et hautement spécifique. Dans sa globalité, il implique tellement d'organes, de molécules, de cellules, et de voies tout au long de processus interconnectés et parfois circulaires. Il a pour objectif la protection contre les micro-organismes, les matières étrangères et toxiques, ainsi que les cellules malignes. L'immunologie contemporaine distingue deux types d'immunité, l'une dite « innée » et l'autre dite « adaptative » (**Owen et al., 2014**).

Au début du vingtième siècle, Paul Ehrlich a réalisé que le système immunitaire pouvait présenter des dysfonctionnements. Ainsi, au lieu de réagir uniquement contre des antigènes étrangers, il pouvait s'attaquer au soi. Cet état, qu'il a appelé « *horrorautotoxicus* », correspond à un syndrome clinique ayant pour nom générique « auto-immunité » (**Owen et al., 2014**).

Cette réponse inappropriée du système immunitaire, dirigeant son activité humorale liée à la production d'anticorps et/ou son activité cellulaire, par l'intermédiaire des cellules T, contre des composants du soi est la cause des maladies auto-immunes spécifiques d'organes ou non spécifiques d'organes, telles que la polyarthrite rhumatoïde et le Lupus Érythémateux Systémique (**Owen et al., 2014**).

I-2. POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

I.2-1. Définition

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par une inflammation des articulations avec production d'auto-anticorps. C'est une affection multifactorielle au cours de laquelle interviennent, entre autres, des facteurs génétiques et environnementaux (**Lain B et al., 2011**). Une fois réunis, ces facteurs concourent à activer une réponse immune exacerbée se traduisant par le développement d'une réaction inflammatoire exagérée, en particulier au niveau de la membrane synoviale, entraînant la destruction du cartilage et l'érosion de l'os par les cellules inflammatoires infiltrantes et les fibroblastes synoviaux. La PR peut affecter plusieurs articulations en même temps (**Figure 1**).

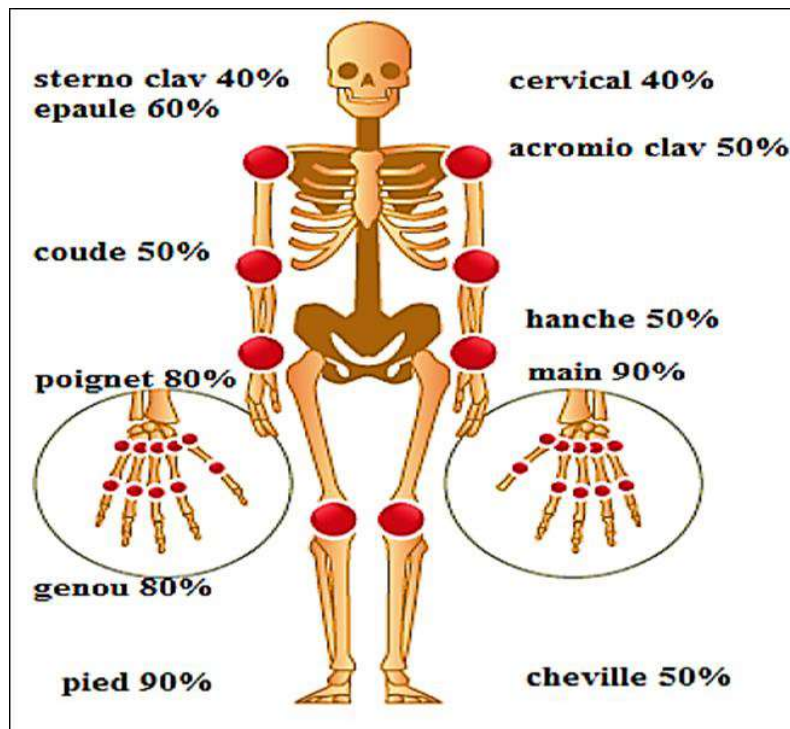


Figure 1. Articulations les plus souvent atteintes dans la Polyarthrite Rhumatoïde (Boissier et al., 2017).

Ces dernières gonflent, deviennent douloureuses et voient l'amplitude de leurs mouvements limitée (Figure2).

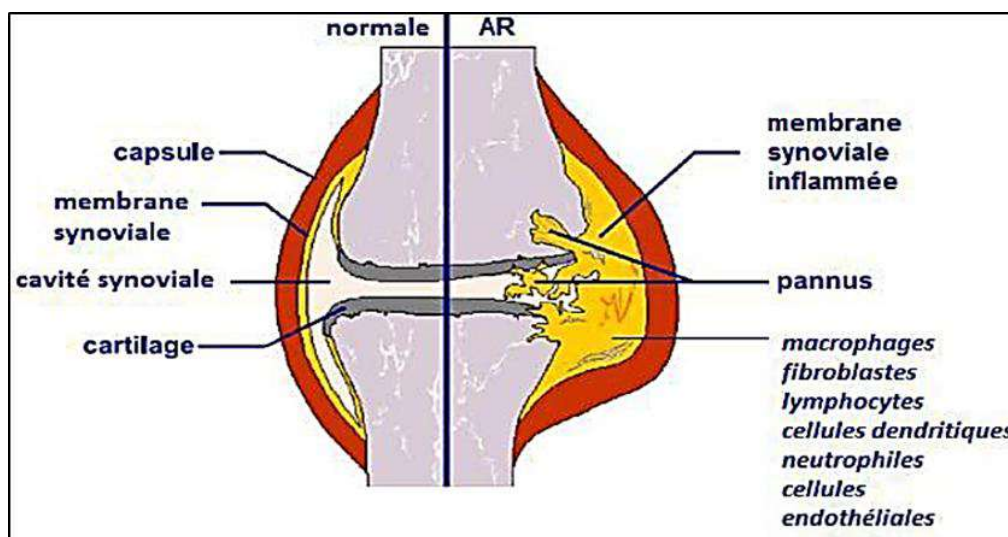


Figure 2. Schéma illustratif de la différence entre une articulation saine et une articulation d'un patient atteint de PR (Ozgoçmen et al., 2004).

I.2-2. Étiopathogénie de la Polyarthrite Rhumatoïde

I.2.2-1. Facteurs environnementaux

Ces facteurs influencent la survenue de la maladie. Parmi eux, le tabagisme semble jouer un rôle très important dans le déclenchement de la PR, dans la réponse au traitement (les patients fumeurs répondraient moins bien au traitement) (**Boissier et al., 2017**).

I.2.2-2. 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 possible au cours de l'accouchement. Ces constatations suggèrent que le taux d'œstrogènes est 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 (**Boissier et al., 2017**).

I.2.2-3. Facteurs génétiques

La PR n'est pas une maladie héréditaire, même si de nombreux facteurs génétiques ont été identifiés, 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'un individu est porteur des gènes qu'il développera forcément la maladie et inversement, un individu peut développer une PR sans porter les gènes de prédisposition. De ce fait, il n'existe pas de dépistage génétique de la PR. Il est, donc, inutile de demander une recherche des gènes associés, comme les gènes HLA-DR1 et HLA-DR4, chez les sujets atteints ni chez leurs enfants (**Boissier et al., 2017**).

I.2-3. Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde

Le développement de la PR passe par trois phases :

I.2.3-1. Phase d'initiation

Le mécanisme de déclenchement de la maladie reste méconnu. Le premier événement pourrait être une réponse inflammatoire non spécifique à un stimulus encore non identifié avec accumulation locale des monocytes/macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 β (IL-1 β), le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6) (**Imboden, 2009; Klareskog *et al.*, 2009; Calabrese *et al.*, 2014**).

I.2.3-2. Phase de recrutement

Le processus inflammatoire est initié par les macrophages qui interagissent avec les lymphocytes Th₀ en leurs présentant des peptides antigéniques « arthritogènes » associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA-II). Les lymphocytes Th₀ interagissent, par la suite, au niveau de la synoviale articulaire, avec le Fibroblast-Like Synoviocyte (FLS) via les molécules HLA-II et des molécules d'adhésion, l'aboutissement en est la différenciation de ces Th₀ en Lymphocytes Th₁₇. Ces derniers sont responsables de l'amplification de l'inflammation locale et provoquent des destructions articulaires et érosions osseuses (**Klareskog *et al.*, 2009; Calabrese *et al.*, 2014**). Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle clé dans ce processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage.

Il existe, dans l'articulation rhumatoïde, un déséquilibre entre les cytokines :

- Pro-inflammatoires telle que : TNF- α , IL-1 β , IL-17 et IL-6 présentes en excès ;
- Anti-inflammatoires représentées par l'IL-10, l'IL-4, l'IL-13, les récepteurs solubles du TNF- α et l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1RA), qui sont présentes en quantité insuffisante et ne peuvent bloquer l'action des premières (**Figure 3**).

D'autres cytokines favorisant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire sont également présentes dans la membrane synoviale, telle que le Vascular endothelial Growth Factor (VEGF) et le Fibroblast Growth Factor (FGF). Cette angiogenèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins (**Imboden, 2009**). Ces cytokines et leurs récepteurs constituent des cibles thérapeutiques particulièrement importantes (**Devauchelle *et al.*, 2002**).

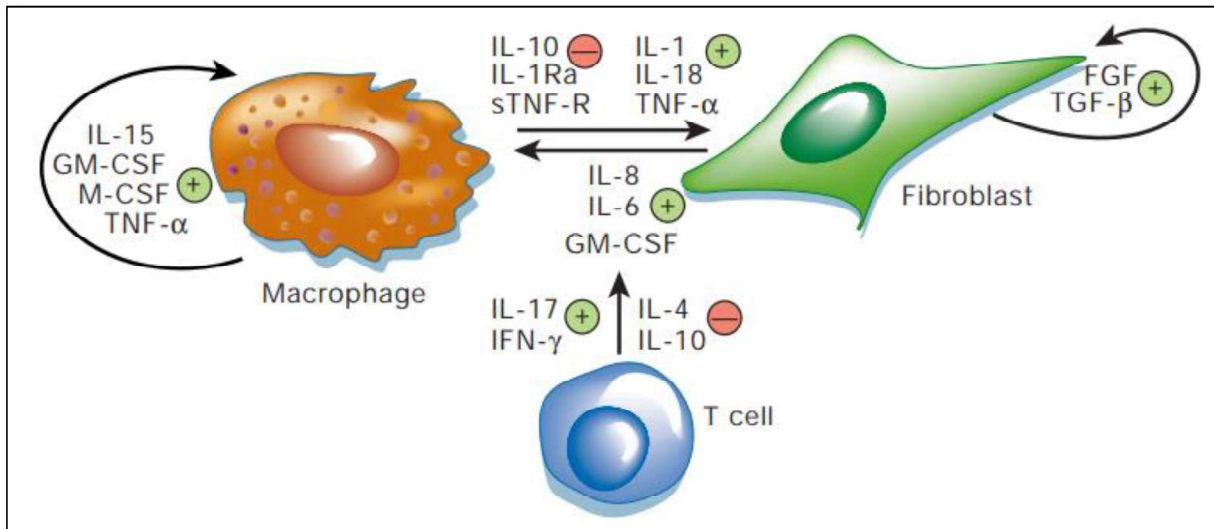


Figure 3. Cytokines clés dans la physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde (**Firestein *et al.*, 2003**).

I.2.3-3. Phase de prolifération synoviale et des lésions articulaires

Cette phase est caractérisée par le développement du pannus rhumatoïde avec apparition, éventuelle, de lésions cartilagineuses et osseuses. La synovite rhumatoïde est caractérisée par une prolifération pseudo-tumorale des FLS et des macrophages synoviaux avec une importante hyperplasie de la couche bordante, conséquence de la prolifération cellulaires non compensée par l'apoptose. Un infiltrat des cellules mononucléées des couches bordantes et profondes de la synoviale associé à des phénomènes d'angiogenèse et une dysrégulation des cytokines aboutit à une hyperplasie vilieuse par augmentation du nombre et du volume des franges synoviales, constituant ainsi le « pannus rhumatoïde ». La destruction du cartilage se produit à travers l'inhibition de la synthèse du collagène (**Figure 4**).

Suite à l'inflammation et à la dégradation du cartilage, les ostéoclastes stimulés par le RANK-L (facteur de différenciation des ostéoclastes) et le Monocyte Cell Stimulating Factor (M-CSF) sont responsables de l'érosion osseuse.

Par ailleurs, l'IL-17 augmente la différenciation des ostéoclastes à partir des macrophages tissulaires et leurs fonctions, en induisant l'expression de RANK-L, au niveau des FLS (**Nakashima *et al.*, 2008**).

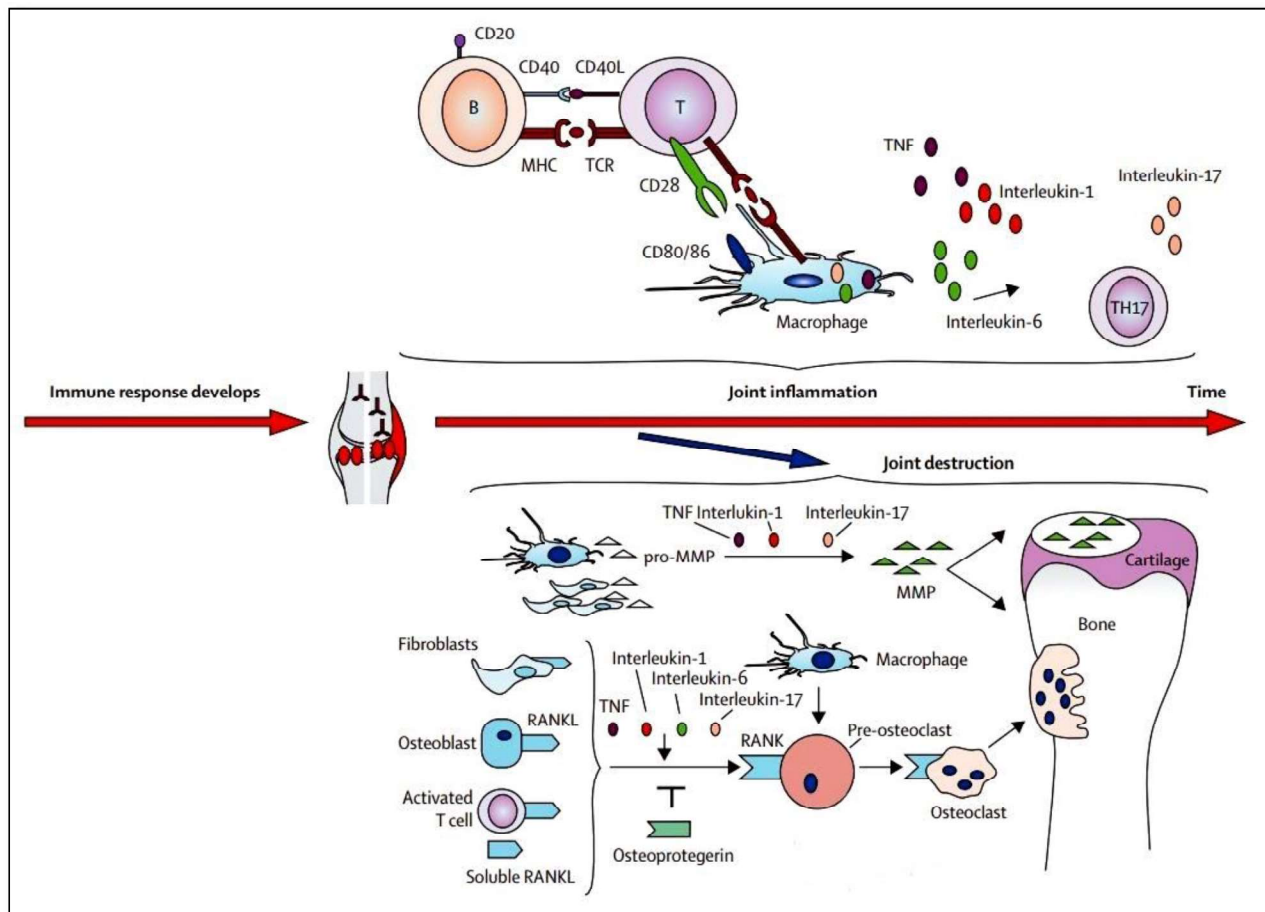


Figure 4. Physiopathologie de la Polyarthrite Rhumatoïde (Lars Klareskog *et al.*, 2009)

I.2-4. Diagnostic de la Polyarthrite Rhumatoïde

Le diagnostic et le traitement précoces sont déterminants dans le succès de la prise en charge de la PR, d'où l'importance de réseaux de soins efficaces et rapides. Le médecin généraliste est en première ligne pour détecter une possible PR débutante et adresser très rapidement le patient au rhumatologue, spécialiste en la matière. À la phase initiale, il est important de confirmer l'existence d'une arthrite ou d'une synovite correspondant à une PR, après avoir éliminé les autres rhumatismes inflammatoires. Il convient, ensuite, de rechercher des éléments pronostiques d'une évolution chronique et destructive de cette maladie.

I.2.4-1. Manifestations cliniques de la Polyarthrite Rhumatoïde débutante

Elle se caractérise par une atteinte articulaire bilatérale, le plus souvent symétrique et « nue » au début, ce qui signifie qu'il n'existe aucun signe extra-articulaire ou axial dans cette forme débutante.

Il s'agit, dans la majorité des cas d'une oligo-arthrite distale d'apparition progressive intéressant les poignets, parfois les avant-pieds, une ou plusieurs articulations métacarpo-phalangiennes ou

métatarso-phalangiennes et les articulations interphalangiennes proximales (IPP). Les interphalangiennes distales (IPD) ne sont que très rarement atteintes (**Figure 5**). Ces articulations sont douloureuses, partiellement enraidies et légèrement enflées. L'examen clinique peut révéler une douleur à la compression latérale des métacarpo-phalangiennes qui est assez évocatrice du diagnostic de la PR débutante (**Totoson et al., 2014**).

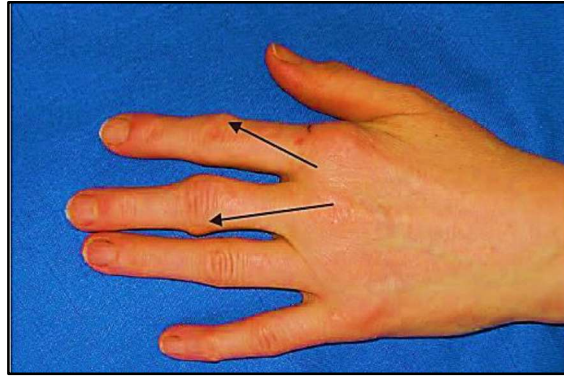


Figure 5. Polyarthrite Rhumatoïde Débutante : atteinte inflammatoire précoce de la main avec présence de synovite en (fuseau) sur les 3èmes interphalangiennes proximales (**Cofer, 2011**).

I.2.4-2. Évolution de la Polyarthrite Rhumatoïde

La PR, une fois installée, tend progressivement vers l'aggravation et l'extension des atteintes qui se fait, le plus souvent, par poussées. Le déclenchement des poussées reste, cependant, mal compris. Des facteurs infectieux et psychologiques sont les plus observés, en pratique courante.

L'évolution de la PR non traitée est, néanmoins, très hétérogène dans la forme et la durée d'installation des atteintes articulaires. Il existe certaines formes, d'emblée, sévères où cette évolution est très rapide, aboutissant à une PR généralisée, très inflammatoire, souvent très destructrice et handicapante au bout de deux ans. Elles représenteraient 10 à 20 % des formes de PR (**Figure 6**).

Rarement présentes au début, des manifestations extra-articulaires peuvent survenir au cours de l'évolution de la PR témoignant de son caractère systémique. Parmi ces manifestations extra-articulaires, sont notées, principalement, l'asthénie, l'anémie, l'amylose, les névrites, les adénopathies, les pneumopathies interstitielles diffuses, les atteintes oculaires et les vascularites rhumatoïdes. Elles peuvent, parfois, mettre en jeu le pronostic vital et contribuer, avec d'autres facteurs, à augmenter la mortalité de patients (**Totoson et al., 2014**).



Figure 6. Exemples des déformations dans une PR ancienne (Cofer, 2011).

*(A) Déformations de mains : atrophie des muscles interosseux, subluxation dorsale du carpe responsable d'un poignet dit « en dos de chameau », et déviation des doigts en « coup de vent » ;
(B) Luxation plantaire des métatarsiens au niveau des pieds ; (C) Arthrite destructrice et handicapante des genoux.*

I.3. LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE

I.3-1. Définition

Le lupus érythémateux systémique (LES) ou lupus érythémateux aigu disséminé (LEAD) est une maladie inflammatoire au long cours (chronique) pouvant affecter de nombreux organes et notamment la peau, les reins, les articulations, les poumons et le système nerveux. Les manifestations de cette maladie sont extrêmement variées. Le terme « systémique » signifie que la maladie atteint plusieurs organes. Le mot « lupus » (loup en latin) fait référence à l'aspect caractéristique, en forme de masque, de l'atteinte du visage. Enfin, « érythémateux » (rouge en grec) traduit la couleur rouge de l'éruption cutanée. Lorsque le lupus ne se manifeste qu'au niveau de la peau, on parle de lupus érythémateux cutané (**Gladman *et al.*, 2002**).

I.3-2. Étiopathogénie du Lupus érythémateux systémique

I.3.2-1. Facteurs environnementaux

Les facteurs d'environnement les plus influents dans cette maladie sont certainement les rayonnements ultraviolets (UV) capable d'induire des lésions cutanées mais également des poussées évolutives de la maladie. Les facteurs toxiques (Tartrazine) ou des médicaments peuvent également avoir un rôle, mais ne sont responsables que d'une minorité (moins de 10%) de maladies lupiques. Le rôle d'agents infectieux, en particulier viraux, est suggéré par l'étude de modèles animaux et fait l'objet de recherches approfondies (**Cooper *et al.*, 2004**).

I.3.2-2. Facteurs hormonaux

Ces facteurs sont particulièrement importants dans le lupus car la prise d'œstrogènes (pilule contraceptive, hormonothérapie substitutive) ou la grossesse peuvent déclencher une poussée de la maladie. Ces facteurs hormonaux expliquent aussi la gravité des lupus masculins survenant chez les patients atteints de syndrome de klinefelter et le rôle bénéfique, au moins expérimental, de l'hormonomodulation anti-oestrogénique (**Cooper *et al.*, 2004**).

I.3.2-3. Facteurs génétiques

Il existe un terrain génétique prédisposant aux maladies auto-immunes. "Dans une même famille, une personne sera par exemple touchée par une polyarthrite rhumatoïde, une autre par un lupus tandis qu'un troisième membre pourra développer une sclérose en plaques. Ce type de configuration n'est pas rare", analyse le Pr Sylviane Muller. "Il est possible de rencontrer aussi plusieurs patients lupiques dans une même famille, avec des formes différentes" (**Buxeraud *et al.*, 2016**).

Synthèse bibliographique

Différents facteurs génétiques ont été précisément décrits dans le lupus, en particulier les gènes des protéines du complément (C1Q, C2, C4). Il existe vraisemblablement d'autres gènes intervenant dans la réaction immunitaire dont certains sont portés par le chromosome 1. Certaines populations semblent également plus touchées que d'autres par cette maladie. C'est le cas de populations sud-américaines, asiatiques et plus globalement des personnes ayant la peau noire, sans pour autant que les raisons de cette prédisposition ne soient comprises (**Cooper *et al.*, 2004**).

I.3.3. Physiopathologie du Lupus Érythémateux Systémique

Le LES est une maladie auto-immune, ce qui suggère un dérèglement du fonctionnement du système immunitaire. Globalement, on observe une hyperactivité du système immunitaire humoral et cellulaire qui se traduit par une cascade d'événements inflammatoires à l'origine de la production de différents auto-anticorps et de diverses lésions tissulaires (**Figure 7**) (**Buxeraud *et al.*, 2016**).

Les phénomènes à l'origine de la plus grande fréquence de lésions de certains organes s'expliquent probablement par différents mécanismes :

- Dépôts non spécifiques de complexes immuns circulants dans certains organes prédisposés (rein, peau, tissu synovial) (**Morel *et al.*, 2005**).
- Formation « locale » de dépôts d'immuns complexes intra-tissulaires, dirigés contre des auto-antigènes tissulaires spécifiques de certains organes (rein, peau).

La phase initiale serait médiée par le matériel antigénique des cellules en apoptose capté par un type particulier de cellules dendritiques fournissant des antigènes et stimulant la production d'interféron (IFN). Une fois le processus initié, la production d'IFN provoque l'activation des cellules auto-réactives (B et T), la maturation et la survie des B auto-réactifs. Les auto-anticorps produits forment des complexes immuns constitués de molécules dérivées des cellules apoptotiques. Ces effets combinés aboutissent au « cercle vicieux » du processus auto-immun (**Figure 8**) (**Kuhn *et al.*, 2006**).

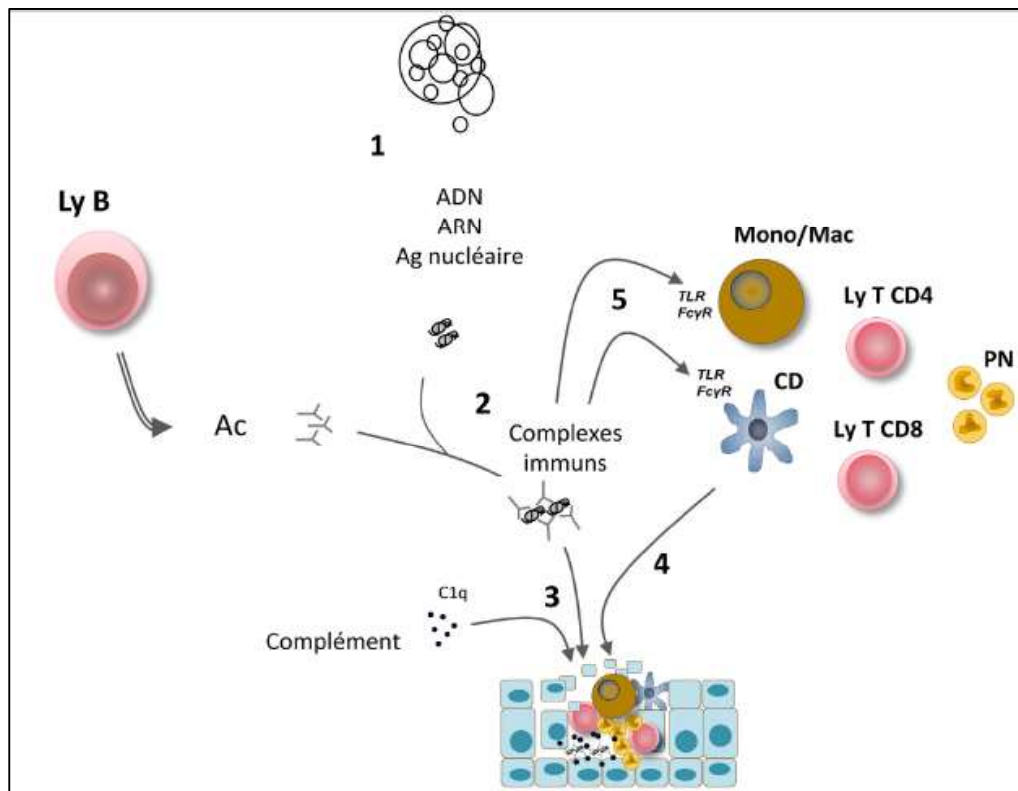


Figure 7. Inflammation tissulaire dans le Lupus Érythémateux Systémique (Mathian *et al.*, 2014).

Les complexes immuns initient les lésions tissulaires. (1) une apoptose anormale ou excessive et/ou une diminution de la clairance des corps apoptotiques induisent l'accumulation d'auto-Ag apoptotiques ; (2) les auto-anticorps se fixent aux auto-Ag dans la circulation ou dans les tissus pour former des complexes immuns (CI) ; (3) les CI activent la voie classique du complément (C1q) ; (4) la cascade du complément libère des facteurs chimiotactiques qui recrutent les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques et les lymphocytes qui induisent l'inflammation tissulaire; (5) les CI activent les macrophages et les cellules dendritiques par le biais des récepteurs de type Toll et des récepteurs pour le fragment Fc des IgG avec la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6).

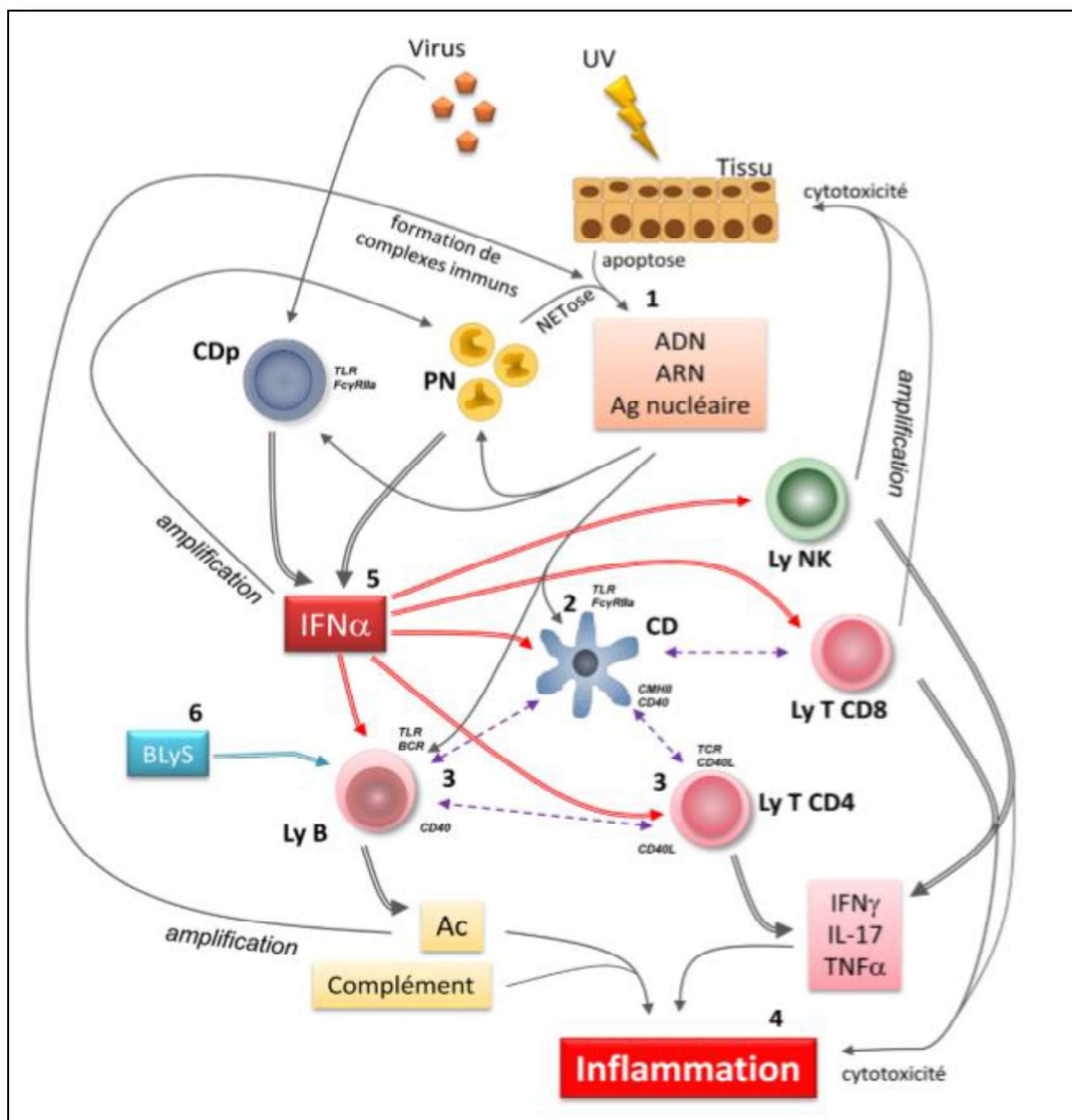


Figure 8. Physiopathologie du lupus Érythémateux systémique. (Mathian *et al.*, 2014)

- (1) Un excès de production et/ou un défaut de clairance des cellules en apoptose induisent l'accumulation de débris cellulaires. Les PN fournissent une seconde source d'auto-Ag, les NETs ; (2) les CD captent ces auto-Ag et activent les LT auto-réactifs qui facilitent et contrôlent l'activation et la sécrétion d'auto-Ac par les LB ; (3) les CD, les LT CD4 et CD8 et les LB interagissent par l'intermédiaire de molécules de co-stimulation ; (4) le dépôt tissulaire de complexes immuns, l'activation du complément, la sécrétion de cytokine et la cytotoxicité lymphocytaire induisent l'inflammation tissulaire ; (5) l'IFN α est la cytokine chef d'orchestre de la réaction auto-immune. Il est produit par les CDP et les PN exposés à différents matériels nucléaires seuls ou sous la forme de complexes immuns. Il active de nombreuses cellules immunitaires ; (6) BlyS augmente la survie et la sélection des LB immatures auto-réactifs, la survie, l'activation et la prolifération des LB matures et la production des plasmoblastes et des plasmocytes auto-réactifs. Des boucles de régulation entretiennent et amplifient la réaction auto-immune.

I.3.4. Diagnostic du Lupus Érythémateux Systémique

Le diagnostic initial peut être difficile mais il doit être fait précocement car certaines manifestations viscérales peuvent mettre en jeu le pronostic vital. Le début d'un LES peut-être

progressif, marqué par l'apparition successive de plusieurs signes cliniques, ou assez brutal, déclenché par une exposition solaire, une grossesse, un épisode infectieux, un traumatisme psychique ou physique ou la prise d'un médicament (**Gill JM *et al.*, 2003**).

Les critères d'ACR qui est un organisme médical américain à but non lucratif impliqué dans la prise en charge des personnes atteintes de pathologies rhumatismales et ceux plus récents du groupe SLICC ont désormais référence pour classer la maladie lupique.

Les critères ACR nécessitent la présence de quatre critères, présents de façon soit simultanée soit successive, parmi onze critères (**Annexe 1**) (**Audia *et al.*, 2009**).

Les critères SLICC permettent la classification de la maladie lupique en présence là aussi de quatre critères dont une clinique et un immunologique parmi une liste de manifestations ou en présence d'une néphrite lupique avec une confirmation histologique, associée à des auto-anticorps caractéristiques (**Annexe 2**) (**Audia *et al.*, 2009**).

I.3.4-1. Manifestation cliniques du Lupus Érythémateux Systémique

Les symptômes varient d'une personne à l'autre. De nombreux signes évocateurs apparaissent au début de la maladie :

- Des signes cutanés très évocateurs de cette maladie: rougeur de la face siégeant de part et d'autre du nez (en "aile de papillon"), alopecie, photosensibilité (la peau devient sensible à la lumière) (**Figure 9**), aphtes ;
- Une altération de l'état général avec fièvre et amaigrissement ;
- Des douleurs articulaires multiples parfois associées à une atteinte inflammatoire (polyarthrite) ;
- Troubles de vascularisation des extrémités ;
- Autres organes touchés : péricardite, inflammation de la plèvre, ... (**Rossant-Lumbroso *et al.*, 2018**).



Figure 9. Manifestations dermatologiques dans le Lupus Érythémateux Systémique (**Buxeraud et**

I.3.4-2. Évolution du Lupus Érythémateux Systémique

La maladie évolue par poussées associant les différents signes décrits plus haut. La maladie peut revêtir une forme bénigne (atteinte cutanée et articulaire) ou plus grave (atteinte rénale, cardiaque, neurologique et sanguine). Il est donc primordial d'assurer un suivi régulier des malades par la pratique régulière d'examens biologiques. La maladie régresse généralement après 50 ans (**Rossant-Lumbroso et al., 2018**).

I.4. AUTO-ANTICORPS

I.4-1. Définition

Une réaction immunitaire de type « auto-immune » peut se traduire par la production d'anticorps anormaux, appelés auto-anticorps. Ces auto-anticorps sont dirigés contre des constituants de nos propres cellules le plus souvent localisés dans le noyau de ces cellules, d'où le terme antinucléaire (**Amoura et al., 2010**). On distingue cinq catégories d'auto-anticorps pour le diagnostic des maladies auto-immunes :

- Les anticorps antinucléaires : ils sont des marqueurs des maladies auto-immunes non spécifiques d'organes comme le LES.
- Les anticorps anti-tissus ou anti-cellules : ce sont des marqueurs des maladies auto-immunes spécifiques d'organe comme le DID.
- Les anticorps anti-IgG : Il s'agit des facteurs rhumatoïdes.
- Les anticorps anti-phospholipides : des marqueurs du syndrome des anti-phospholipides qui peut être primitif ou secondaire.

- Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires : ils sont dirigés contre différentes enzymes cytoplasmiques des polynucléaires neutrophiles (**Mudau *et al.*, 2012**).

I.4.2. Auto-anticorps spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde

I.4.2-1. Facteur rhumatoïde

Le facteur rhumatoïde (FR) est une immunoglobuline (Ig), le plus souvent d'isotype IgM dirigée contre le fragment Fc des IgG humaines. Au début de la PR, la recherche du FR est un anticorps anti-IgG souvent négative, sa présence à un taux significatif serait un élément de mauvais pronostic. Il faut noter que le FR n'est pas très spécifique, puisque retrouvé dans d'autres pathologies et chez plus de 10% des sujets sains (**Morel *et al.*, 2005**).

I.4.2-2. Anticorps Anti-Peptides Citrullinés (ACPA)

Les anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) sont produits dans l'articulation, au sein de la synoviale rhumatoïde. Ils reconnaissent les épitopes « citrullinés » dont le dosage est primordial. La présence des ACPA permet de prédire avec une spécificité supérieure à 80% le diagnostic de la PR (**Kuhn *et al.*, 2006**).

I.4.3. Auto-anticorps spécifiques du Lupus Érythémateux Systémique

I.4.3-1. Auto-anticorps anti-ADN natif

Les anticorps anti-ADN natif sont des auto-anticorps détectés dans 60 à 70% des lupus systémiques, ce qui signifie qu'ils ne sont pas toujours présents.

Ces auto-anticorps, très utiles pour le diagnostic, sont détectés par des tests de laboratoire de routine. Ils font partie des examens utiles pour le suivi d'un lupus (**Amoura *et al.*, 2010**).

I.4.3-2. Auto-anticorps anti-Sm

Les anticorps anti-Sm anti-Sm sont les unités centrales des petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP), appelées A jusqu'à G, et se lient aux snRNP U1, U2, U4, U5 et U6, ils sont très spécifiques au lupus érythémateux systémique (LES). Les données de la littérature sont divergentes quant à leur intérêt pronostique et au cours du suivi. La corrélation entre les variations de leur taux, dosés par immunofluorimétrie en flux et l'activité de la maladie, ainsi que l'association entre anticorps anti-Sm et manifestations cliniques sont étudiées (**Schini *et al.*, 1993**).

I-5. STRESS OXYDATIF

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 produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être pris en charge et neutralisés par l'organisme. Les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l'oxygène moléculaire. Il retrouve sa stabilité, en participant à des réactions chimiques dont les conséquences sont l'oxydation des lipides membranaires, des acides aminés composant les protéines, des glucides et l'oxydation des acides nucléiques (**Rioux C, 2009**). De façon générale, l'excès des radicaux libres contribue au stress oxydatif, par une série de réactions en chaîne.

I.5-1. Stress oxydatif dans la Polyarthrite Rhumatoïde et le Lupus Érythémateux Systémique

Lors du processus inflammatoire, dans le cas de la PR et le LES, une surproduction d'EAO survient car il y a une :

- Stimulation de l'expression d'enzymes constitutives comme les :
 - Nitric Oxide Synthase (NOS) endothéliales et neuronales ;
 - Certains nicotinamide adénine dinucléotide phosphate "NADPH" oxidase (NOX) ;
 - Cyclo-oxygenase-1 (COX1).
- Activation des enzymes inductibles comme :
 - inducible NOS (iNOS) ;
 - Cyclo-oxygenase-2 (COX2).

Les mécanismes à l'origine de cette surproduction d'EAO sont initiés par les cytokines pro-inflammatoires et les cellules phagocytaires en sont les principales productrices même si les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes peuvent également en produire (**Calabrese et al., 2014**).

I.5-2. Monoxyde d'azote (NO) et la Nitric oxyde synthase (NOS)

I.5.2-1. Monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est la substance vasodilatatrice la mieux étudiée chez l'homme. C'est un gaz radicalaire dont la demi-vie est de l'ordre de la milliseconde mais qui est suffisante pour permettre son interaction avec différentes cibles cellulaires (**Mudau et al., 2012**). Sa biosynthèse est assurée par les NOS, en présence d'oxygène et de cofacteurs tels que le NADPH, le tétrahydrobioptérine (BH₄), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide

(FMN). La réaction d'oxydation transforme le substrat L-arginine en L-citrulline et NO (**Figure 10**). La production de NO est sous la dépendance des modifications post-traductionnelles de NOS et de la disponibilité en substrat (L-arginine) et en coenzyme (BH₄).

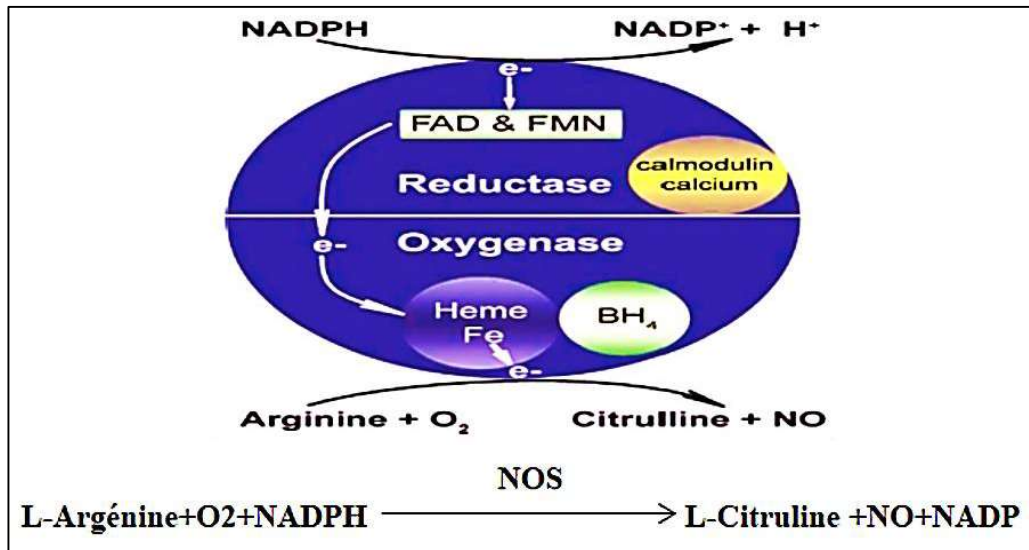


Figure 10. Génération du Monoxyde d'azote (NO) à partir de la L- arginine (**Baeten *et al.*, 2001**).

I.5.2-2. Nitric Oxyde Synthase (NOS)

a. Structure

Les NO synthase (NOS) constituent une famille d'hémoprotéines proches, structurellement, du cytochrome P450. C'est une protéine de 135 kDa, active seulement sous forme dimérique. Chaque monomère possède un domaine réductase et un domaine oxydase :

- Le domaine réductase (C-terminal) : fournit les électrons requis pour la synthèse du NO. Il contient les sites de fixation du FAD, du FMN et du NADPH (**Figure 11**) ainsi que le site de fixation de la Calmoduline en position 494-645 (**Balligand *et al.*, 2002**).
- Le domaine oxydase (N-terminal) : produit le NO, auquel se lie la L-arginine, l'IL-1β en position cystéine 99 et l'hème, relié par le site de fixation de la Calmoduline au domaine réductase.

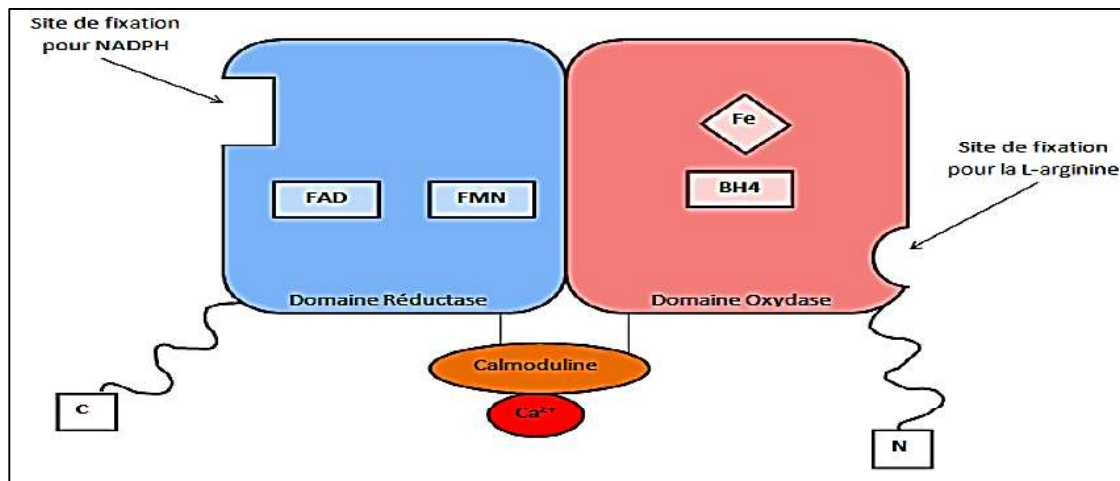


Figure 11. Structure d'une sous-unité de la NO synthase (Mongens *et al.*, 2013).

b. Différentes isoformes des Nitric Oxide Synthase (NOS)

Il existe trois isoformes de la NOS (**Tableau I**) :

1. Iso-enzyme de type I : NOS1, NOS neuronale ou nNOS

Exprimée de manière constitutive et prédominante dans le cytoplasme des cellules du système nerveux central (SNC). Elle est activée par l'augmentation de la concentration du Calcium intracellulaire (Calcium - Calmoduline dépendante).

2. Iso-enzyme de type II : NOS2, NOS inducible ou iNOS

Induite dans le cytoplasme des macrophages mais aussi, en moindre mesure, dans les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules pancréatiques et les cellules endothéliales. Elle est activée par l'augmentation de la concentration du Calcium intracellulaire, après action d'un stimulus pro-inflammatoire (TNF α , IL-1, IFN γ , LPS). Il s'agit de l'isoforme la plus apte à produire d'importantes quantités de NO.

3. Iso-enzyme de type III : NOS3, NOS endothéliale ou 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 (Calcium - Calmoduline dépendante) (Mongens *et al.*, 2013).

Tableau I. Caractéristiques des iso-enzymes NOS humaines (*Meyer, 2006*).

Caractéristiques	nNOS	eNOS	iNOS
Synonyme	NOS1	NOS3	NOS2
Chromosome	12	7	17
PM (kDa)	1434	1202	1153
Interactions	Zn ²⁺ BH ₄ CaM/Ca ²⁺ FAD FMN Hème Cavéoline-1/3 SLB90 Domaines PDZ	Zn ²⁺ BH ₄ CaM/Ca ²⁺ FAD FMN Hème Cavéoline-1/3 Hsp90	Zn ²⁺ BH ₄ CaM/Ca ²⁺ FAD FMN Hème Kalirin
Modifications Covalentes	Phosphorylation	Phosphorylation Myristoylation Palmitoylation	Phosphorylation
Ca²⁺ dépendante	Oui	Oui	Non
Production de NO	+	+	+++
Expression	Neurones	C. endothéliales	Macrophages

c. Rôle physiologique des Nitric Oxide Synthase (NOS)

Les NOS sont des enzymes complexes partageant un certain nombre de protéines communes. Alors que beaucoup d'enzymes d'oxydation utilisent un seul donneur d'électrons, l'oxydation de la L-arginine en NO par les NOS est une réaction d'oxydation à cinq électrons impliquant, outre le complexe Calcium-Calmoduline, de multiples autres cofacteurs. Les deux électrons donnés,

simultanément, par la NADPH sont transférés aux flavines et stockés, transitoirement, par celles-ci puis séquentiellement transférés à l'hème (Figure 12) :

- Dans un premier temps, l'hème catalyse l'oxydation de l'arginine en N-hydroxy-L-arginine.
- Dans un deuxième temps, la N-hydroxy-L-arginine est l'objet d'une attaque nucléophile, au niveau de son extrémité guanidino-carbonée avec génération de citrulline et de NO. L'interaction du NO avec l'hème de la NOS entraîne un rétrocontrôle négatif de sa propre synthèse (Nathan *et al.*, 1994).

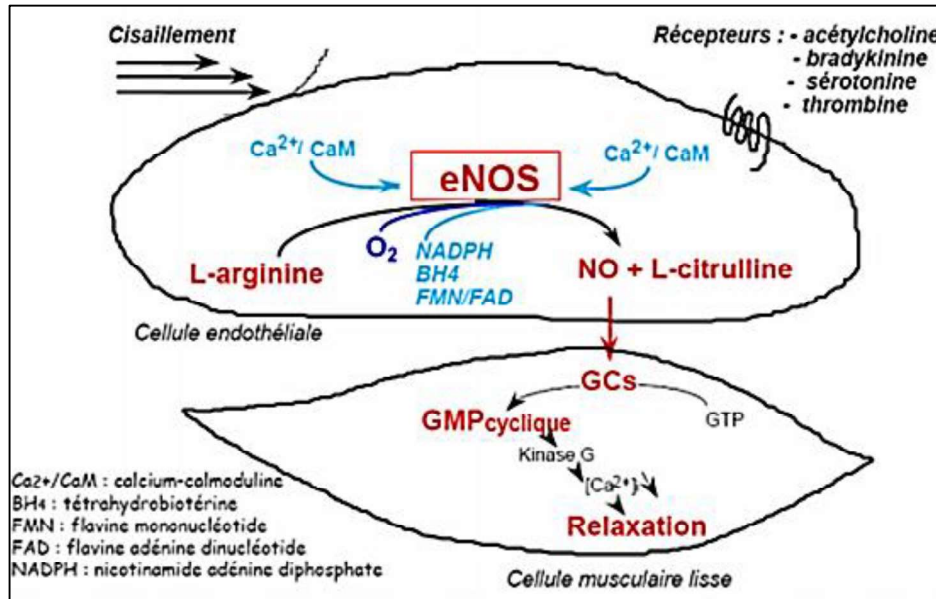


Figure 12. Biosynthèse du Monoxyde d'azote endothélial (Kim *et al.*, 2003).

1.5.2-3. Nitric Oxyde Synthase-3 (NOS3)

a. Mécanismes de transduction du signal d'activation de la NOS3

La majorité des facteurs chimiques, principalement la bradykinine, l'histamine, l'acétylcholine et l'endothéline, stimulent la cellule endothéliale, en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques couplés à des protéines G. Ces protéines deviennent capables d'activer la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidyl inositol-triphosphate, pour libérer les deux seconds messagers, l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). Après la fixation de l'IP₃ sur son récepteur, situé à la surface du réticulum endoplasmique, les canaux mobilisateurs du Calcium s'activent et entraînent, par la suite, l'élévation transitoire de la concentration du Calcium intracellulaire, dans la cellule endothéliale. Finalement, l'enzyme NOS3 (eNOS) se détache de la

Calvéoline-1 et l'élément auto-inhibiteur est déplacé (**Figure 13**), permettant la fixation du complexe Calcium-Calmoduline (**Michel *et al.*, 1997**).

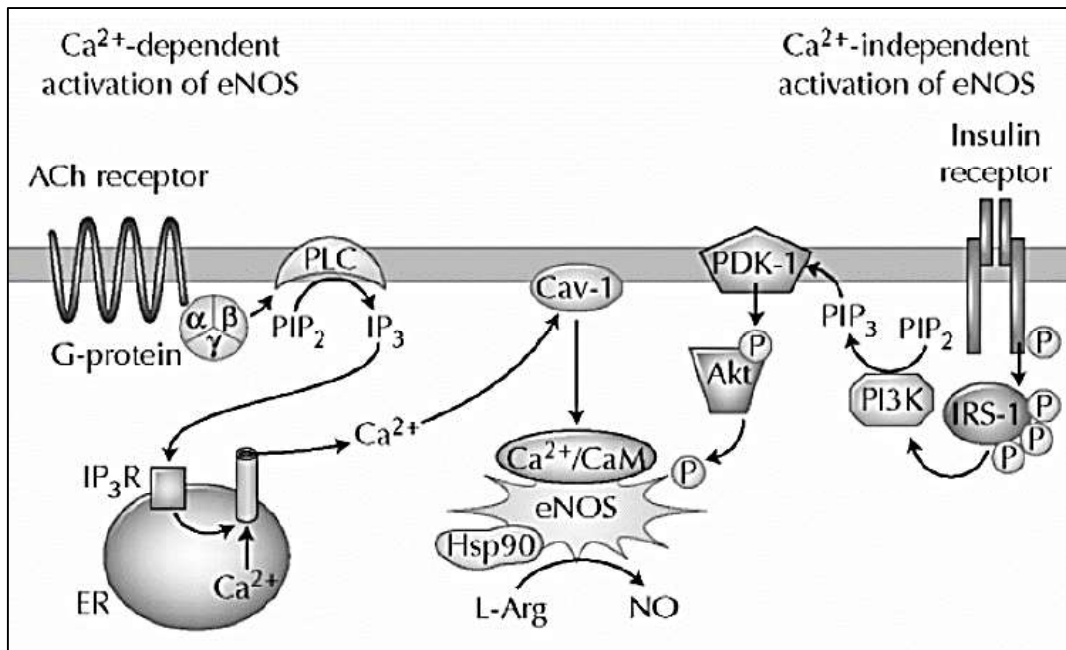


Figure 13. Voies d'activation d'eNOS (**Vincent *et al.*, 2003**).

Ce NO hydrophobe diffuse dans les cellules musculaires lisses où il stimule la guanylate cyclase provoquant une relaxation via la conversion de guanosine triphosphate (GTP) en guanosine-monophosphate cyclique (GMPC). Une partie du NO est relarguée dans la lumière vasculaire où il inhibe d'autres processus majeurs précédant la survenue de l'athérosclérose, dont l'adhésion, l'agrégation plaquettaires, la migration des leucocytes et la prolifération des cellules musculaires lisses (**Schini-Kerth *et al.*, 1999**).

Le principal facteur hémodynamique d'activation de la NOS3 est la contrainte de cisaillement. En effet, la friction du sang sur la cellule endothéliale y engendre des signaux de mécano-transmission de la contrainte hémodynamique au cytosquelette cellulaire passant par les molécules d'adhérence de la famille des intégrines et de signaux de mécano-transduction qui, à partir de la déformation de la membrane cellulaire, vont activer de seconds messagers cellulaires aboutissant à la mobilisation du Calcium (**Ruth *et al.*, 1993**).

b. Dysfonctionnement de la Nitric Oxyde Synthase-3 (NOS3)

L'activité enzymatique de la NOS3 peut être affectée par de nombreux facteurs. Il s'agit, notamment de modifications post-traductionnelles associées à sa localisation intracellulaire, protéines

pouvant interagir avec la NOS3 telle que la cavéoline-1 et la Heat shock protein-90 (Hsp90), biodisponibilité en cofacteurs (BH₄) ou en substrat (L-arginine).

c. Interactions "Protéines – NOS3" et régulation de l'activité enzymatique de la NOS3

Les études biochimiques ont montré que l'activité de la NOS3 est régulée par sa localisation dans les cavéoles (**Gratton *et al.*, 2004**) où elle interagit avec la protéine cavéoline-1. Cette interaction inhibe l'activité enzymatique de la NOS3 (**Ju *et al.*, 1993**).

Par ailleurs, la Hsp90 est une autre protéine jouant un rôle crucial dans la régulation de l'activité de la NOS3 (**Balligand *et al.*, 2002**). Contrairement à la cavéoline-1, l'interaction entre la Hsp90 et la NOS3 induit une augmentation de l'activité de cette dernière (**Garcia-Cardena *et al.*, 1998**). Cet effet serait lié, du moins en partie, au fait que la Hsp90 favorise la fixation de la Calmoduline sur la NOS3 (**Takahashi *et al.*, 2003**). De plus, la Hsp90 est essentielle au recrutement de l'Akt, une protéine responsable de la phosphorylation et donc, de l'activation de la NOS3 (**figure 13**) (**Hong *et al.*, 2015**).

I.5.2-4. Gène de la Nitric Oxyde Synthase-3 (NOS3)

a. Structure et localisation du gène NOS3

Le gène de la NOS3 endothéliale humaine est localisé sur le chromosome 7 en position 7q35-36 (7q36.1). Il se compose de 26 exons séparés par 25 introns et sa longueur est de 21kb (**Zhang *et al.*, 1995**) (**Figure 14**). La longueur de la région promotrice est de 200pb. Elle est dépourvue de séquence TATA mais très riche en d'autres séquences cis-régulatrices, dont :

- La séquence GC qui fixe le motif SP1 ;
- La séquence GATA fixant le motif GATA-1 ;
- La séquence TGAGTCA fixant le motif AP1 ;
- La séquence CAAT fixant le motif NF1 (Neuro-Fibromin-1).

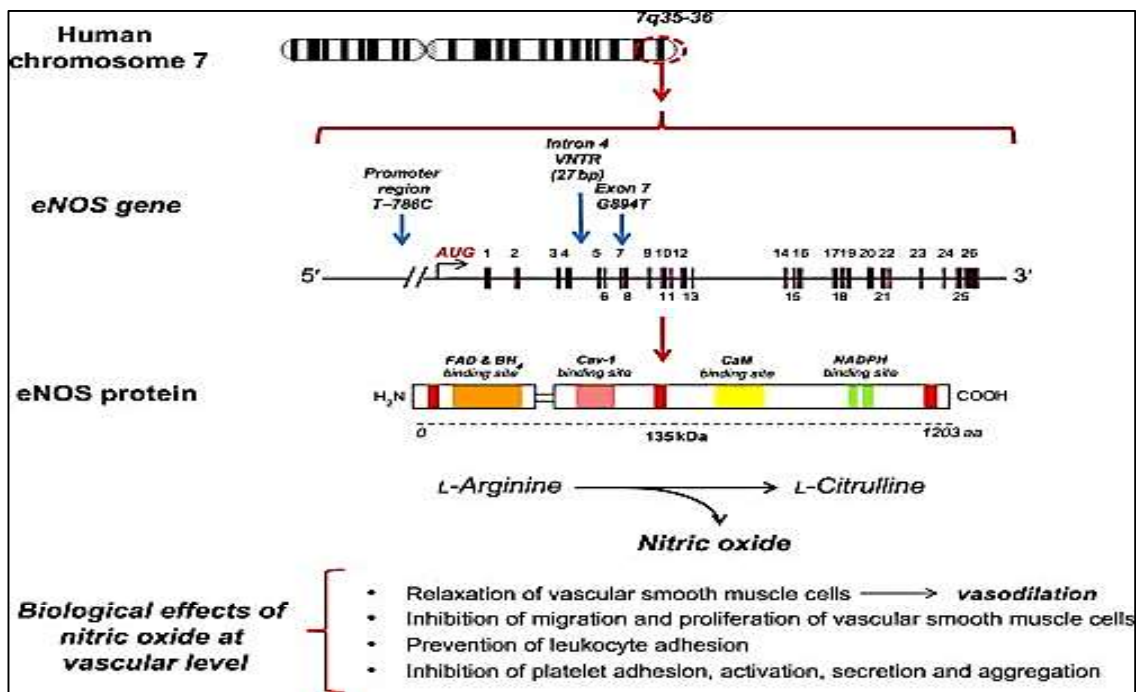


Figure 14. Structure du gène NOS3 (Casas *et al.*, 2006).

b. Régulation transcriptionnelle du gène NOS3

Des facteurs exogènes, chimiques comme les statines, ou physiques comme les forces de cisaillement, ayant un effet vasodilatateur, augmentent l'expression de la NOS3 via la molécule de l'iso-phosphatidyl-choline (Zembowicz *et al.*, 1995 ; Arnet *et al.*, 1996). Cette molécule agit sur la région promotrice du gène par le produit final d'une cascade d'activation de protéines kinases (Cieslik *et al.*, 2001). Dans le noyau, après fixation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) sur la caséine kinase 2 (Ck2), les produits finaux de la chaîne d'activation des kinases Erk1 et Erk2 se fixent au complexe "PP2A - Ck2", pour augmenter l'activité de la PP2A à phosphoryler la SP1. Et pour faciliter la fixation de cette protéine régulatrice sur son site spécifique au niveau du promoteur. Il a été signalé également, que la june-kinase est capable de phosphoryler la C-june favorisant ainsi, sa fixation sur son site spécifique Ap1 (Takahashi *et al.*, 2003). C'est ainsi que l'initiation de la transcription aura lieu pour former finalement un ARNm d'une taille de 4,2 à 4,4 kb (Cieslik *et al.*, 2001).

c. Polymorphismes du gène NOS3

Les SNPs de ce gène ont été étudiés dans différentes pathologies auto-immunes, et inflammatoires. Ils incluent :

- -786C/T (rs2070744) : au niveau de la région promotrice et impliqué dans la PR ;

- +894G/T (rs1799983) : au niveau de l'exon 7 ;
- Une répétition en tandem à nombre variable (VNTR) dans l'intron 4a : impliquée dans les maladies cardio-vasculaires dont :
 - Coronaropathie (**Ignarro et al., 1999**);
 - Infarctus du myocarde (**Popp et al., 1998**);
 - Hypertension artérielle (**Dahiyat et al., 1999**) ;
 - Accidents vasculaires cérébraux (**Hong et al., 2007**).

Le tableau II montre la localisation des SNPs de la NOS3, étudiés dans des pathologies auto-immunes.

Tableau II. Localisation des SNPs de la NOS3 étudiés dans des pathologies auto-immunes.

Gène/Locus	SNP ID (localisation)	SNP
eNOS	C-786T	C/T
eNOS	G+894T	G/T

La base de données du NCBI répertorie 180 SNPs dans le gène NOS3 dont trois SNPs identifiés au niveau de la région promotrice du gène :

- -1468T/A ;
- -922A/G ;
- -786C/T (**Nakayama et al., 1999; Poirier et al., 1999**).

Cependant aucune de ces trois mutations ne semble être localisée dans un site consensus de fixation de facteurs de transcription (**Miyahara et al., 1994**).

Au moins dix SNPs, dont quatre polymorphismes de répétition ont également été caractérisés dans les régions introniques du gène (**Miyahara et al., 1994**). Par ailleurs, différentes études ont permis d'établir le niveau d'expression, de traduction et de l'activité catalytique de NOS selon le SNP exprimé (**Nakayama et al., 1999**).

Le seul SNP identifié qui génère une substitution d'acides aminés au niveau de la protéine mature est le +894G/T. Ceci est dû à une substitution d'une guanine en une thymine au niveau de l'exon 7 induisant un changement d'acide glutamique en acide aspartique à la position 298 dans la protéine (**Hingorani et al., 1999**).

II. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire d'auto-immunité du département d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), durant cinq mois : du mois de Février au mois de Juin 2019.

II-1. MATÉRIEL

II.1-1. Population étudiée

Il s'agit d'une étude "Cas-Témoins", rentrant dans le cadre d'un projet de recherche officiel financé par l'IPA, portant sur 142 patients atteints de PR, 73 patients atteints de LES confirmés recrutés et suivis au sein du service de rhumatologie du CHU de Douera et 84 sujets sains recrutés au sein du centre de Transfusion Sanguine (CTS) du CHU Hussein Dey (ex-Parnet).

Fiches de consentement et de renseignement (**Annexe 3 et 4**).

II.1-2. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué par le sang prélevé à partir des patients atteints de LES, PR et des sujets sains, recueilli sur un tube :

- Sec puis centrifugé à 3500 tours/min pendant 5 minutes et le sérum est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Il sert à l'étude sérologique : dosage du FR des ACPA pour les patients PR, des anti-ADN natif et anti-Sm pour les patients LES dans la population étudiée.
- EDTA à partir duquel l'ADN génomique a été extrait, par Phénol-Chloroforme. Il sert à l'étude génétique : étude des SNPs eNOS -786C/T et +894G/T et leur association à la susceptibilité à développer la PR et le LES ainsi que l'association de ces SNPs à la production des auto-anticorps (FR, ACPA, anti-ADN natif et anti-Sm).

II.1-3. Matériel non biologique (Annexe 5)

II-2. MÉTHODES

II.2-1. Étude sérologique

Toutes les méthodes utilisées pour le dosage des auto-anticorps reposent sur la réaction spécifique "Antigène – Anticorps (Ag – Ac)".

II.2.1-1. Dosage du Facteur Rhumatoïde

Par la Laser-Néphélométrie qui est une technique permettant le dosage du FR d'isotype IgM, réalisée en utilisant l'appareil BN200 Nephelometer Analyzer (Behring-BMD).

a. Principe

Des particules de polystyrène recouvertes d'anti-Ig humaine provenant du sang de mouton ont été utilisées, 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. Les résultats ont été exploités par rapport à un standard de concentration connue.

b. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés selon les normes suivantes :

- Un résultat est négatif si la concentration du FR est en deçà de 40 UI/ml.
- Un résultat est positif si la concentration du FR dépasse 40 UI/ml.

II.2.1-2. Dosage des anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA)

Pour effectuer ce dosage, une technique immuno-enzymatique quantitative permettant le dosage des auto-anticorps humains d'isotype IgG ACPA "anti-CCP2" (dénomination commerciale) a été utilisée.

a. Principe

- Les échantillons dilués au 1 :101 sont incubés dans les microplaques coatées avec l'antigène spécifique « peptide cyclique citrulliné synthétique ». En cas d'échantillon positif, les anticorps spécifiques d'isotype IgG se lient à l'antigène.
- La fraction non fixée est éliminée par lavage des microplaques.
- Après, nous incubons avec un conjugué « anti-IgG humaines (lapin) couplé à la peroxydase » qui réagit avec les complexes Ag-Ac formés.
- Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.
- L'addition du substrat TMB/H₂O₂ génère une réaction enzymatique colorimétrique (bleu) qui est arrêtée par de l'acide dilué (la couleur vire au jaune) (**Figure 15**).
- L'intensité de la coloration obtenue avec le chromogène est en 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.

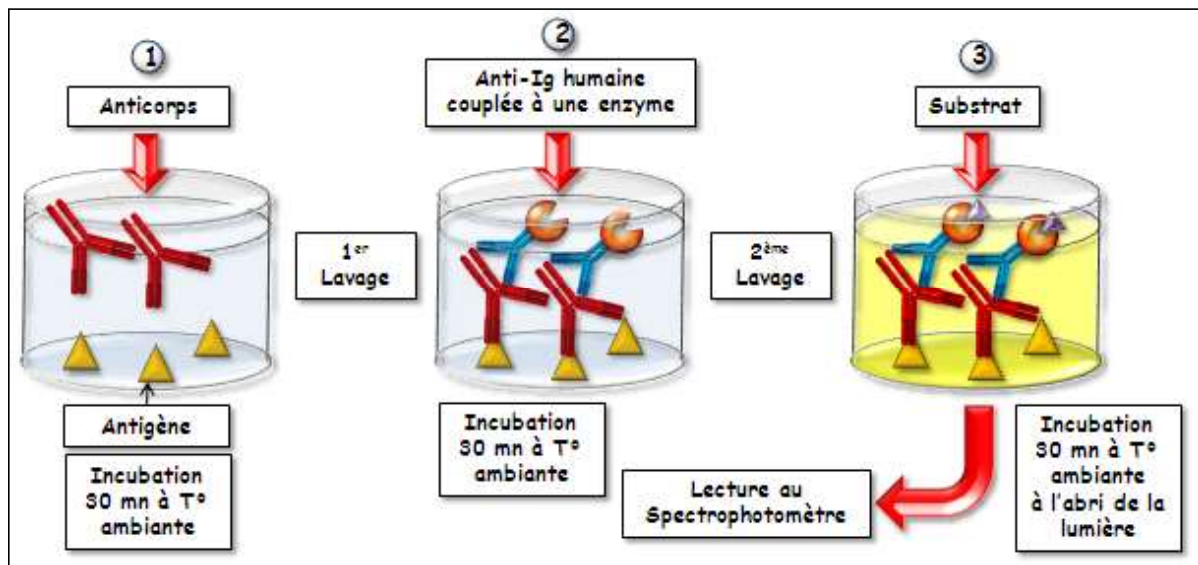


Figure 15. Principe de la technique ELISA (Benidir *et al.*, 2009)

b. Mode opératoire

- Déposer 100 µl du sérum de chaque patient, dilué au 1 :101 dans du tampon, dans le micropuits correspondant.
- Déposer 100 µl des calibrateurs ainsi que les contrôles négatif et positif dans les micropuits correspondant.
- Incuber 60 minutes à température ambiante (18-25°C).
- Laver 3 fois avec 300 µl du tampon de lavage.
- Déposer 100 µl du conjugué dans chaque micropuits.
- Incuber 30 minutes à température ambiante (18-25°C).
- Laver 3 fois avec 300 µl du tampon de lavage.
- Déposer 100 µl du substrat TMB/H₂O₂ dans chaque micropuits.
- Incuber 30 minutes à température ambiante (18-25°C), à l'abri de la lumière.
- Déposer 100 µl de la solution d'arrêt (H₂SO₄ 0,5M) dans chaque micropuits.
- Agiter doucement la plaque pendant 5 secondes afin d'assurer une bonne homogénéisation de la distribution de la solution d'arrêt.
- Lire l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm, dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

c. Interprétation des résultats

Au final, les résultats sont été interprétés selon les normes suivantes :

- Un résultat est négatif si la concentration des ACPA est en deçà de 5 UI.
- Un résultat est positif si la concentration des ACPA dépasse 5 UI.

II.2.1-3. Recherche des anticorps anti-nucléaires (AAN)

Cette recherche doit passer par un dépistage par Immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2000 puis une identification des cibles antigéniques de AAN par fluorimétrie en flux (technologie Multiplex).

a. IFI sur cellules HEp 2000

Le dépistage des AAN a été fait par une technique IFI sur frottis de cellules HEp2000 (*IMMUNOCONCEPT*).

Principe

- Les échantillons dilués au 1 :80 sont incubés, sur un frottis de cellules HEp2000. En cas d'échantillon positif, les anticorps spécifiques se lient à l'antigène. La fraction non fixée est éliminée par lavage au tampon PBS.
- Révélation des Ac fixés par un conjugué « anti-Ig humaines (lapin) couplé à la FITC (Isothiocyanate de Fluorescéine) » (**Figure 16**). Le conjugué non fixé est éliminé par lavage.
- Lecture au microscope à fluorescence permettant d'identifier l'aspect de la fluorescence obtenue et de donner un titre en cas de positivité, le titrage se faisant comme suit : 1 :80, 1 :160, 1 :320, 1 :1000 et > 1 :1000.

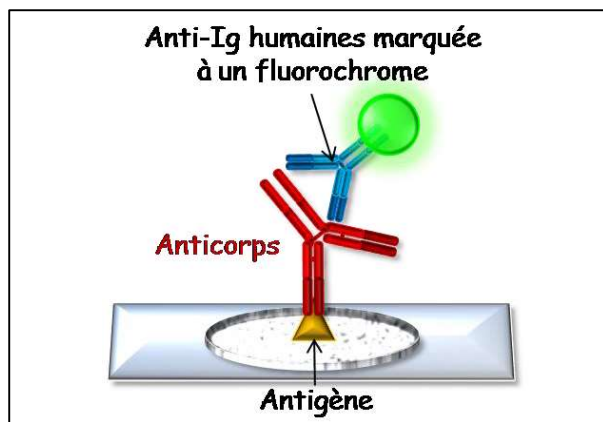


Figure 16. Principe de l'IFI sur cellules HEp2000 (**Benidir *et al.*, 2009**).

b. Technologie Multiplex (fluorimétrie en flux)

Principe

- Des billes de polystyrène de 5,6 µm de diamètre sont colorées par l'incorporation de deux marqueurs fluorescents rouge et orange en quantité variable, générant ainsi 100 types de billes différentes, chacune caractérisée par un code couleur.
- Sur chaque type de bille, un antigène différent peut être fixé de façon covalente, le plus souvent par l'intermédiaire d'un groupement aminé et des fonctions carboxyliques portées par les billes.
- Un mélange de billes est mis en présence d'un sérum de malade dans lequel la présence éventuelle d'AAN est recherchée.
- Après incubation, un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines humaines marqué à la phycoérythrine, permet de révéler et de quantifier la présence de ces AAN (**Figure 17**).

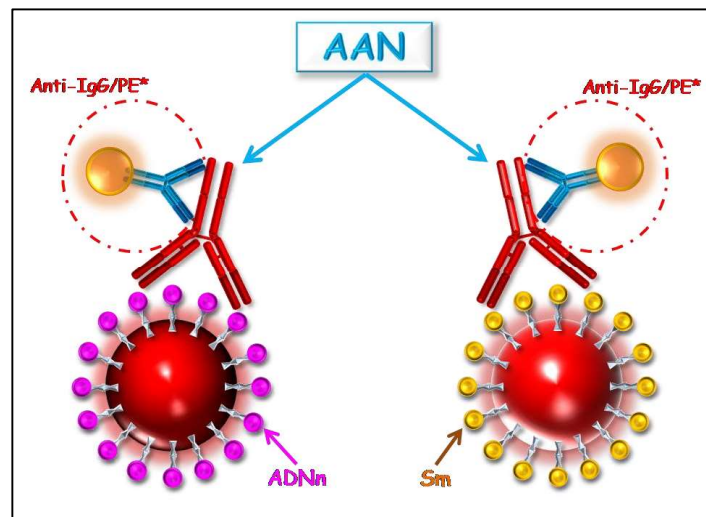


Figure 17. Principe de la fluorimétrie en flux (Benidir *et al.*, 2009).

- À l'étape finale chaque bille passe dans le faisceau de deux lasers d'un cytomètre, appelé également *fluorimètre en flux* :
 - Le laser rouge (635 nm) identifie le *code couleur* de la bille, donc, l'auto-antigène par sa fluorescence intrinsèque.
 - Le laser vert (532 nm) mesure la *quantité de conjugué*, donc, d'AAN fixée à sa surface (**Figure 18**).

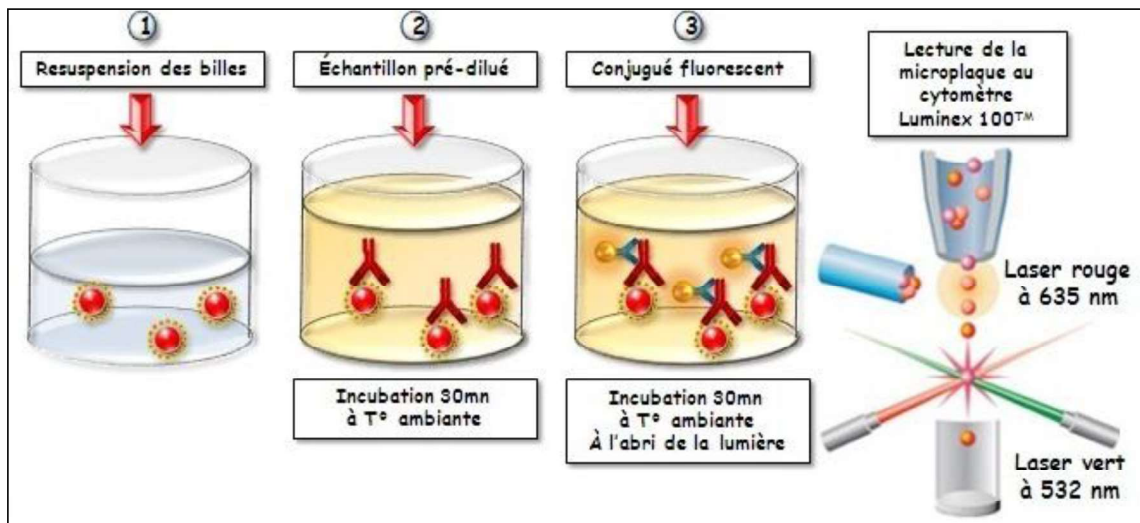


Figure 18. Principe de la fluorimétrie en flux (Benidir *et al.*, 2009).

Cette technique permet la détection :

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

La recherche des Ac anti-DNA natif, pour les échantillons revenus positifs en AAN à un titre $\geq 1 : 160$ (aspect de la fluorescence : homogène, moucheté ou mixte) s'est faite, également, selon 2 techniques :

- Technique multiplex (fluorimétrie en flux) : AtheNA-Multi-Lyte™ (ZEUS) ANA II.
- Technique IFI sur frottis de *Crithidia Luciliae* (parasite).

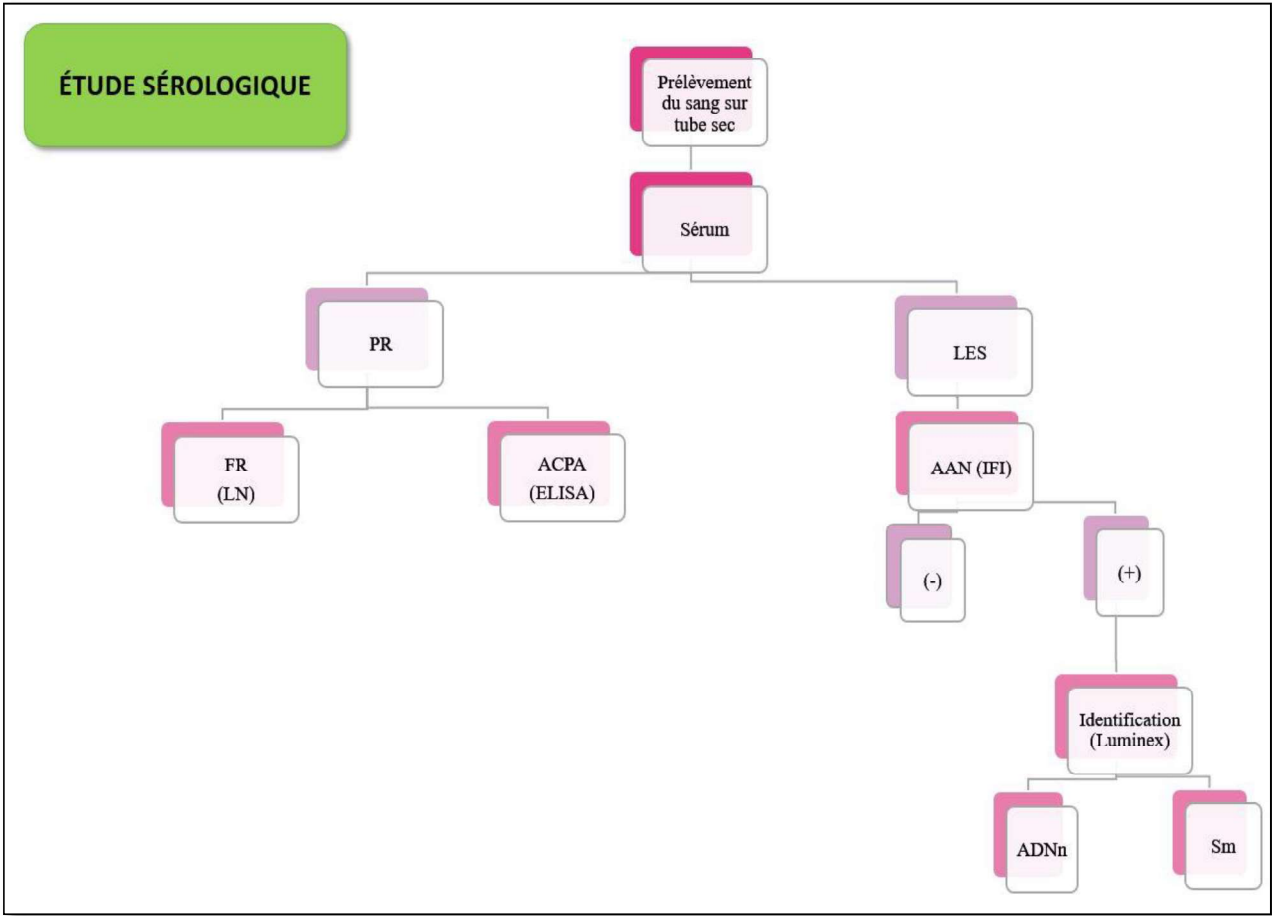


Figure 19. Schéma récapitulatif de l'étude sérologique.

II.2-2. Étude génétique

II.2.2-1. Extraction d'ADN

a. Principe

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

b. Mode opératoire

1. Lyse des globules rouges

- Préparer une solution de lyse des globules rouges (SLR) composée de :
 - EDTA : 10 ml, 0,5 M PH 8 ;
 - Tris : 5 ml, 1 M PH 8 ;
 - Eau distillée stérile : 500 ml.
- Ajouter de la SLR, au prélèvement de sang total de 10 à 15 ml, de telle sorte qu'on complète à 45 ml.
- Agiter, énergiquement, puis mettre à -20°C , pendant 20 min. Ce choc thermique va fragiliser la paroi des globules rouges.
- Centrifuger, pendant 10 min, à 4000 tours/min à $+4^{\circ}\text{C}$.
- Jeter le surnageant et refaire l'opération jusqu'à l'obtention d'un culot de globules blancs clair (2 à 3 lavages sont suffisants).

2. Lyse des globules blancs

- Préparer la solution de lyse des globules blancs SLB composée de :
 - EDTA : 5 ml, 0,5 M PH 8 ;
 - Tris : 5 ml, 1 M PH 8 ;
 - Eau distillée stérile : 500 ml.
- Resuspendre le culot de globules blancs dans 3 ml de SLB.
- Ajouter 35 μl de protéinase K (300 $\mu\text{l}/\text{ml}$).
- Ajouter 600 μl de SDS à 10%.
- Incuber le mélange à 37°C , pendant une nuit.

3. Extraction au Phénol-Chloroforme

- Ajouter 4 ml de Phénol-Chloroforme iso-amyl alcool.
- Bien agiter le mélange jusqu'à l'obtention d'un aspect laiteux du mélange.
- Centrifuger à 4000 tours/min, pendant 10 min.
- Transférer la phase aqueuse, dans un nouveau tube. Elle ne contient que des acides nucléiques, les protéines sont retenues, dans la phase de chloroforme.

4. Précipitation de l'ADN

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

5. Re-suspension et conservation

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

6. Dosage de l'ADN extrait

- Nous avons dosé l'ADN extrait, par spectrophotométrie, à la longueur d'onde 260 nm (λ). Toutefois, il nous est indispensable de mesurer l'absorbance à 280 nm, permettant d'objectiver une éventuelle contamination de l'ADN extrait par des Protéines voire de l'ARN, en calculant le rapport d'absorbance 260/280.
- Une solution d'ADN doit avoir un rapport 260/280 compris entre 1,8 et 2,2 : si ce rapport est inférieur à 1,8, l'ADN est contaminé par des protéines ; s'il est supérieur à 2,2 il est cette fois contaminé par de l'ARN.

II.2.2-2. Étude des SNPs eNOS rs1799983 et rs2040744 par la technologie TaqMAN

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

Le tableau suivant représente les références des AD Mix TaqMAN utilisés dans cette étude (**Tableau III**).

Tableau III. Références des AD Mix TaqMAN utilisés dans cette étude.

Gene/Locus	SNP	Assay ID	localisation
NOS3	rs1799983 (G+894T)	C__3219460_20	Chr.7
NOS3	rs2070744 (-786C/T)	C__15903863_10	Chr.7

Cette RT-PCR repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent étant directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice). La détection des produits d'amplification se fait selon deux grands principes, par marquage :

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

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

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

Chaque sonde TaqMAN renferme :

- Un fluorochrome, à l'extrémité 5', spécifique de chaque type d'allèle (**VIC** ou **FAM**).
- Un Quencher non fluorescent (NFQ), à l'extrémité 3'.
- Une molécule MGB (Minor Groove Binder) qui s'insère dans le petit sillon de la double hélice formée par le duplex "ADN cible – sonde spécifique" et le stabilise (**Figure 20**).

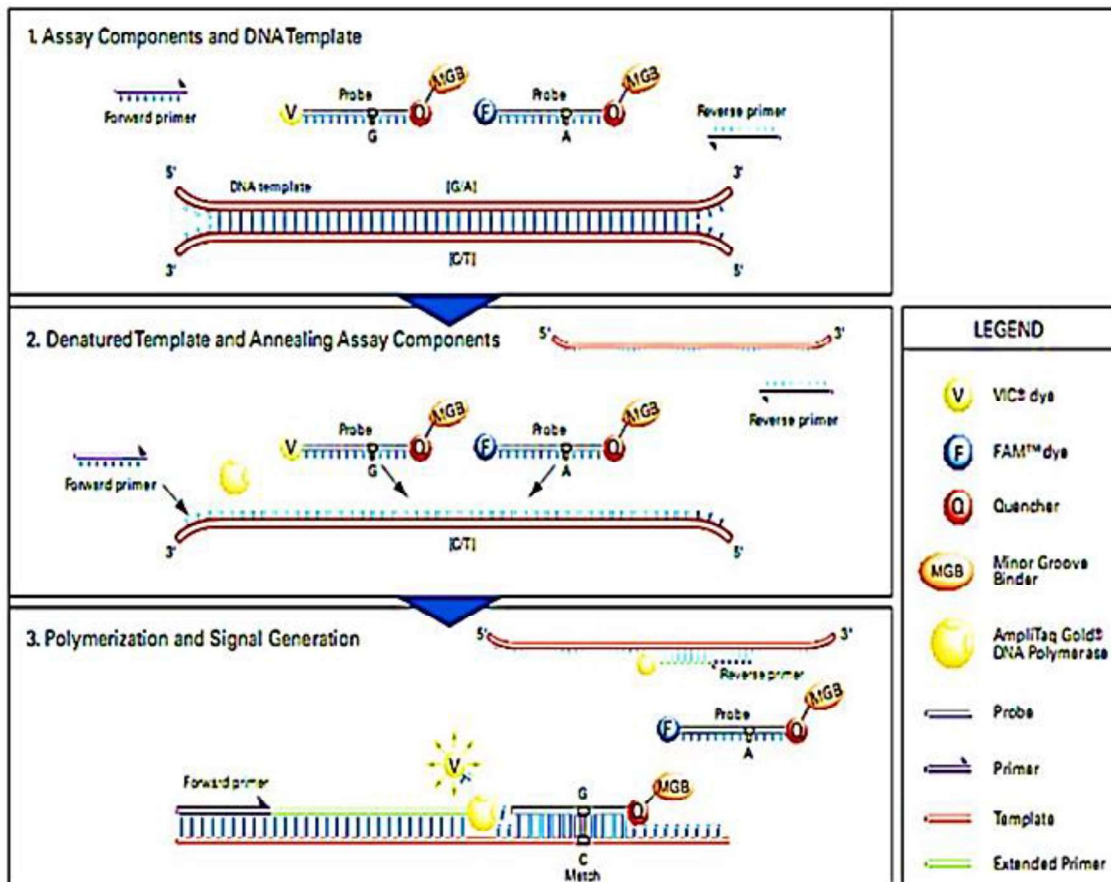


Figure 20. Différentes étapes du génotypage par la technique TaqMAN.

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

- Avant de commencer la manipulation, remise du TaqMAN et l'AD-Mix TaqMAN SNP Genotyping Assays (TaqMan MGB probes, FAM and VIC dye-labeled), spécifiques de chaque essai pendant 30 minutes à Température ambiante (18 – 30°C).
- Préparation du mélange réactionnel pour le nombre d'échantillons plus deux (n+2) (**Tableau IV**).
- Dépôts de 1 µl d'ADN de chaque échantillon dans chaque Puits d'une microplaque de 96 Puits (**Annexe 6 et 7**) et 1 µl d'eau distillée stérile dans les deux derniers Puits qui servent de témoins négatifs.
- Distribution de 19 µl du Mix d'amplification dans chaque Puits contenant l'ADN génomique pour un volume réactionnel final de 20 µl.
- Fermeture hermétique de la plaque avec une feuille thermocollante puis la placer dans le Thermocycleur.

Tableau IV. Mélange réactionnel pour la PCR.

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

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

Tableau V. Programme de la RT-PCR.

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

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

Par exemple : Le nuage de points exprimant majoritairement de la fluorescence **FAM** (bleu) correspond à des échantillons homozygotes pour l'un des deux allèles ; le nuage rouge correspond à une fluorescence **VIC** majoritaire, donc, à des échantillons homozygotes pour l'autre allèle ; tandis que le nuage vert correspond à une émission des deux fluorescences, donc, à des échantillons hétérozygotes pour le SNP considéré. Quant aux points noirs, ils correspondent à une PCR qui n'a pas marché ou à un positionnement ambigu. Pour chaque mixe, le fournisseur précise à quel allèle, sauvage ou muté, est associé chacune des sondes **VIC** et **FAM** (**Figure 21**).

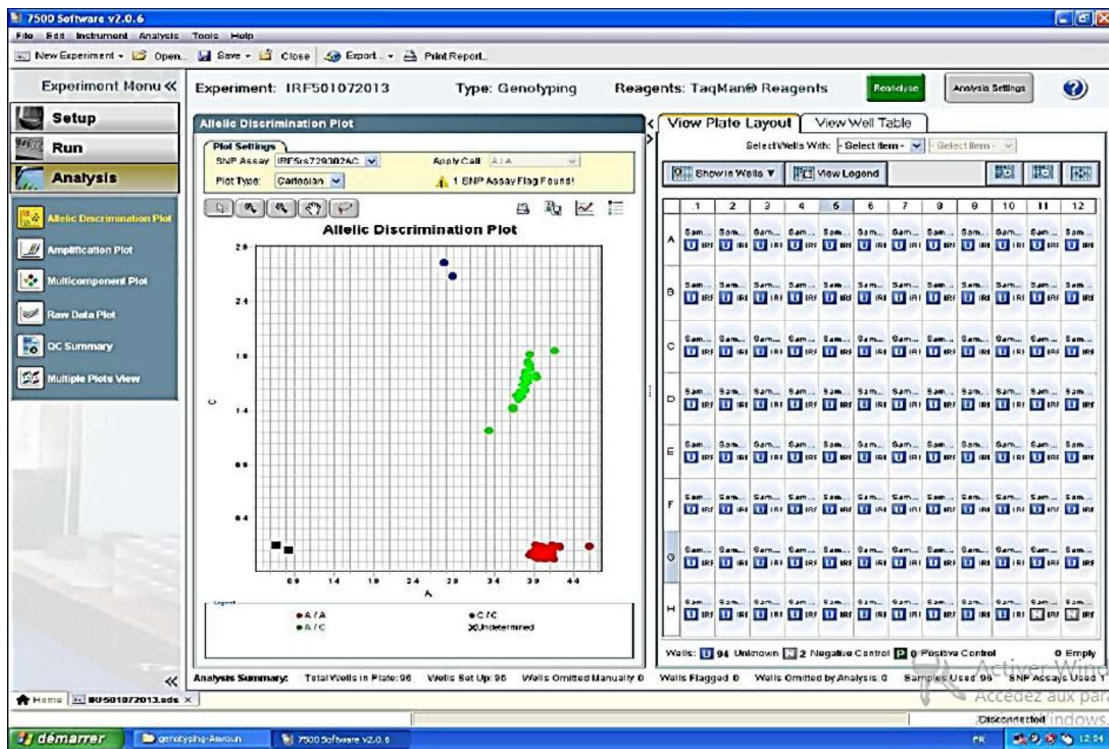


Figure 21. Détermination des génotypes en fonction du type de fluorescence.

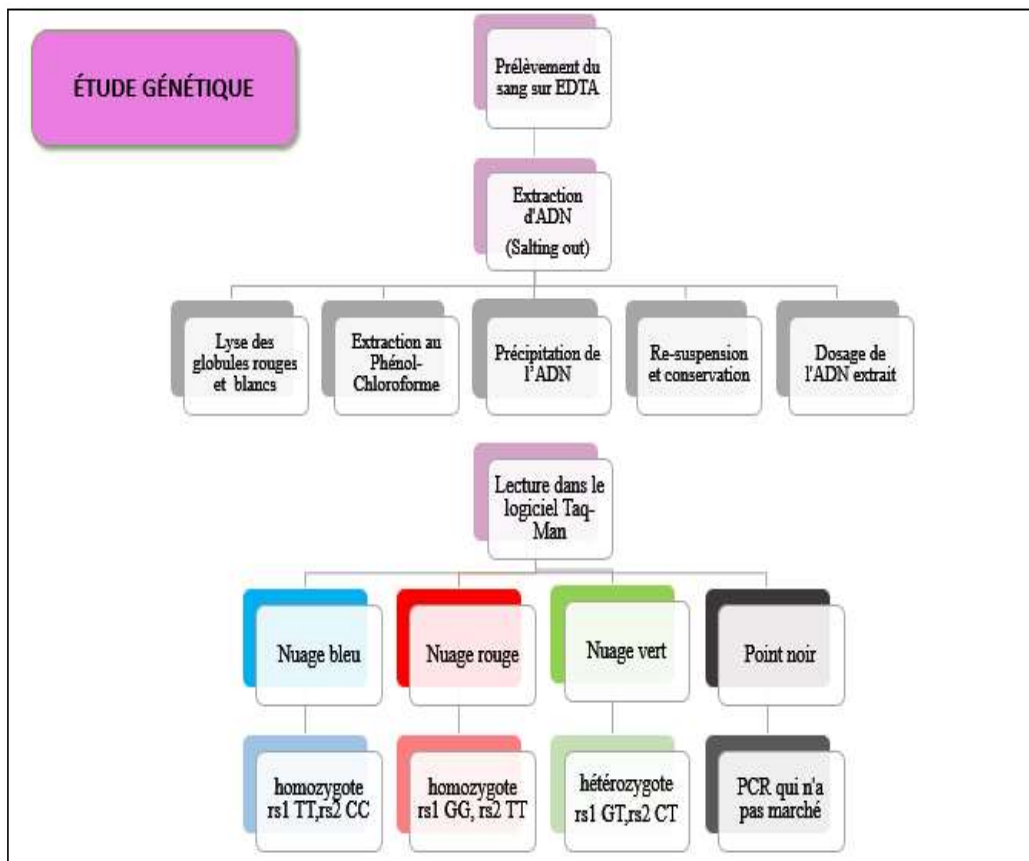


Figure 22. Schéma récapitulatif de l'étude génétique.

II.2-3. Analyse Statistique

Nous avons calculé les fréquences alléliques et génotypiques comme suit :

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

D'abord, nous avons généré les haplotypes grâce au logiciel Phase 2.1 puis, évalué l'équilibre de Hardy-Weinberg, ensuite, nous avons analysé ces fréquences (avec ou sans stratification) à l'aide du test du χ^2 . Nous avons considéré une différence comme étant "statistiquement significative" pour une valeur du $p < 0,05$. Dans ce cas précis, nous avons calculé : l'Odds Ratio (OR) qui se définit comme le rapport des chances qu'un événement arrivant à un groupe de personnes « A », arrive également, à un autre groupe « B » et l'Intervalle de confiance à 95% (IC 95%) selon le test exact de Fisher.

Un OR < 1 est en faveur d'un effet protecteur, lorsqu'il est > 1 il est en faveur d'un risque plus élevé alors qu'un OR proche de 1 est en faveur d'une absence d'effet. Enfin, les logiciels informatiques utilisés sont :

- Le Compare 2. V 3.11.
- Le Phase 2.1.
- Le Graph-Pad Prism v 5.01.

III. RESULTATS

III-1. Caractéristiques de la population étudiée

Les caractéristiques de la population étudiée figurent dans le **Tableau VI, annexe 8 et 9** :

Tableau VI. Caractéristiques de la population étudiée.

	Patients PR	Patients LES	Sujets Sains
Nombre	142	73	84
Age (moyenne ± 1 DS) [an]	48 ± 12	38 ± 13	35 ± 11
Âges extrêmes [an]	22 – 80	17 – 71	20 – 58
Sexe ratio (H : F)	1 : 5	1 : 12	1 : 6
Durée d'évolution (moyenne ± 1 DS) [an]	10	3	-

Dans notre étude, nous avons recherché :

1. Une association entre les SNPs NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la susceptibilité à développer la PR et le LES ;
2. Une association entre des SNPs et la production des auto-anticorps spécifiques de :
 - a. La PR : ACPA et FR ;
 - b. Le LES : Anti-ADN natif et anti-Sm.

III-2. Recherche d'une association entre les SNPs NOS3 rs1799983 et NOS3 rs2070744 et la susceptibilité à développer la PR et le LES dans la population étudiée

III.2-1. NOS3 rs1799983

Les fréquences alléliques et génotypiques de ce SNP figurent dans le **Tableau VII**.

Tableau VII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR, LES et sujets sains.

	PR (n = 142)	LES (n = 73)	SS (n = 84)	PR vs. LES		PR vs. SS		LES vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	93 (33%)	114 (78%)	53 (32%)	79,386	5,1 x 10⁻¹⁹	0,069	0,792	67,937	1,7 x 10⁻¹⁶
G	191 (67%)	32 (22%)	115 (68%)	79,386	5,1 x 10⁻¹⁹	0,069	0,792	67,937	1,7 x 10⁻¹⁶
Génotypes									
TT	19 (13%)	53 (73%)	7 (8%)	75,920	3,0 x 10⁻¹⁸	1,320	0,251	68,326	1,4 x 10⁻¹⁶
GT	55 (39%)	8 (11%)	39 (46%)	17,953	2,3 x 10⁻⁵	1,287	0,257	23,427	1,3 x 10⁻⁶
GG	68 (48%)	12 (16%)	38 (45%)	20,41	6,3 x 10⁻⁶	0,149	0,7	14,925	1,1 x 10⁻⁴

III.2.1-1. Comparaison entre les patients PR et LES

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Patients PR (OR 7,32 ; IC95% 4,50 – 12,02) et est associé à la susceptibilité à développer le LES plus que la PR.
- **G** est significativement plus fréquent chez les patients PR vs. Patients LES (OR 7,32 ; IC95% 4,50 – 12,02) et est associé à la susceptibilité à développer la PR plus que le LES.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype :

- **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Patients PR (OR 17,16 ; IC95% 8,03 – 37,01) et est associé à la susceptibilité à développer le LES.
- **GT** est significativement plus fréquent chez les patients PR vs. Patients LES (OR 5,14 ; IC95% 2,22 – 13,27) et est associé à la susceptibilité à développer la PR.
- **GG** est significativement plus fréquent chez les patients PR vs. Patients LES (OR 4,67 ; IC95% 2,23 – 10,31) et est associé à la susceptibilité à développer la PR.

III.2.1-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques ne montre aucune différence significative entre les patients PR et les sujets sains (**Tableau VII**).

III.2.1-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Sujets sains (OR 7,73 ; IC95% 4,51 – 13,32) et est associé à la susceptibilité à développer le LES.
- **G** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES (OR 0,95 ; IC95% 0,61 – 1,45) et est associé à une protection contre le développement du LES.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype :

- **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Sujets sains (OR 1,7 ; IC95% 0,64 – 5,00) et est associé à la susceptibilité à développer le LES.
- **GT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES (OR 0,14 ; IC95% 0,05 – 0,35) et est associé à une protection contre le développement du LES.

- **GG** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES (OR 0,24 ; IC95% 0,10 – 0,53) et est associé à une protection contre le développement du LES.

III.2-2. NOS3 rs2070744

Les fréquences alléliques et génotypiques de ce SNP figurent dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR, LES et sujets sains.

	PR (n= 142)	LES (n =73)	SS (n=84)	PR vs. LES		PR vs. SS		LES vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	148 (52%)	71 (49%)	94 (56%)	0,468	0,494	0,626	0,429	1,680	0,195
C	136 (48%)	75 (51%)	74 (44%)	0,468	0,494	0,626	0,429	1,680	0,195
Génotypes									
TT	33 (23%)	31 (42%)	27 (32%)	8,525	0,004	2,146	0,143	1,787	0,181
CT	82 (58%)	9 (12%)	40 (48%)	40,742	1,7 x 10⁻¹⁰	2,179	0,140	22,656	1,9 x 10⁻⁶
CC	27 (19%)	33 (45%)	17 (20%)	16,439	5,0 x 10⁻⁵	0,05	0,822	11,217	0,001

III.2.2-1. Comparaison entre les patients PR et LES

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence statistiquement significative entre les patients PR et LES (**Tableau VIII**). Par contre, l'analyse des fréquences génotypiques révèle que le génotype :

- **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Patients PR (OR 2,44 ; IC95% 1,27 – 4,66) et est associé à la susceptibilité à développer le LES plus que la PR.
- **CT** est significativement plus fréquent chez les patients PR vs. Patients LES (OR 9,72 ; IC95% 4,33 – 23,75) et est associé à la susceptibilité à développer la PR plus que le LES.
- **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Patients PR (OR 3,51 ; IC95% 1,80 – 6,87) et est associé à la susceptibilité à développer le LES.

III.2.2-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques et génotypiques ne montre aucune différence significative entre les patients PR et les sujets sains (**Tableau VIII**).

III.2.2-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence statistiquement significative entre les patients LES et sujets sains (**Tableau VIII**). Cependant, l'analyse des fréquences génotypiques révèle que le génotype :

- **CT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES (OR 0,15 ; IC95% 0,06 – 0,37) et est associé à une protection contre le développement du LES.
- **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES vs. Sujets sains (OR 3,25 ; IC95% 1,52 – 7,03) et est associé à une protection contre le développement du LES.

Tandis que le génotype TT ne montre aucune différence statistiquement significative entre les patients LES et les sujets sains.

III.2-3. Distribution haplotypique

Les fréquences haplotypiques obtenues grâce au logiciel Phase 2.1 et les haplotypes générés à partir des deux SNPs de NOS3 figurent dans le **Tableau IX**.

Tableau IX. Distribution haplotypique des SNPs NOS3 chez les patients PR, LES et sujets sains.

	PR (n=142)	LES (n =73)	SS (n=84)	PR vs. LES		PR vs. SS		LES vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Haplotypes									
GT	87%	18%	99%	98,221	3,7 x 10⁻²³	9,722	0,002	107,866	2,9 x 10⁻²⁵
GC	48%	26%	38%	9,564	0,002	2,051	0,152	2,593	0,107
TT	18%	79%	13%	77,808	1,1 x 10⁻¹⁸	0,802	0,371	69,814	6,5 x 10⁻¹⁷
TC	48%	77%	50%	16,411	5,1 x 10⁻⁵	0,094	0,759	11,881	0,001

Nous avons analysé, dans ce qui suit, la distribution haplotypique chez les patients PR, LES et les sujets sains.

III.2.3-1. Comparaison entre les patients PR et LES

L'analyse révèle que les haplotypes :

- **GT** et **GC** sont plus fréquents chez les patients PR vs. LES et sont associés à la susceptibilité à développer la PR plus que le LES :
 - **GT** : OR 29,88 ; IC95% 13,04 – 69,85 ;
 - **GC** : OR 2,61 ; IC95% 1,36 – 5,14

- **TT** et **TC** sont plus fréquents chez les patients LES vs. PR et sont associés à la susceptibilité à développer le LES plus que la PR :
 - **TT** : OR 17,25 ; IC95% 8,06 – 37,57 ;
 - **TC** : OR 3,58 ; IC95% 1,83 – 7,21.

III.2.3-2. Comparaison entre les patients PR et sujets sains

L'analyse révèle que seul l'haplotype **GT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients PR (OR 0,08 ; IC95% 0 – 0,51) alors que les autres haplotypes ne montrent aucune différence statistiquement significative entre les patients PR et les sujets sains (**Tableau IX**).

III.2.3-3. Comparaison entre les patients LES et sujets sains

La distribution des haplotypes entre les patients LES et les sujets sains montre que les haplotypes **TT** et **TC** sont significativement plus fréquents chez les patients LES vs. Sujets sains et sont associés au développement du LES :

- **TT** : OR 25,66 ; IC95% 10,21 – 66,13 ;
- **TC** : OR 3,29 ; IC95% 1,57 – 7,03.

Au moment où l'haplotype **GT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES (OR 0,003) et est associé à une protection contre le développement du LES tandis que l'haplotype **GC** ne montre aucune différence significative.

III-3. Recherche d'une association entre les SNPs NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques de la PR et du LES

III.3-1. NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques de la PR

III.3.1-1. Production des ACPA

III.3.1.1-1. NOS3 rs1799983

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR et les sujets sains, en fonction de la production ou non des ACPA, figurent dans le **Tableau X**.

Tableau X. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR, LES et sujets sains en fonction de la production des ACPA.

	ACPA (+) (n = 111)	ACPA (-) (n = 31)	SS (n = 84)	ACPA(+) vs. (-)		ACPA (+) vs. SS		ACPA(-) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	73 (33%)	20 (32%)	53 (32 %)	0,009	0,926	0,078	0,780	0,011	0,918
G	149 (67%)	42(68%)	115 (68%)	0,009	0,926	0,078	0,780	0,011	0,918
Génotypes									
TT	43 (39%)	12 (39%)	7 (8%)	0,000	0,998	23,185	1,4 x 10⁻⁶	5,149	9,9 x 10⁻⁵
GT	53 (48%)	15 (48%)	39 (46%)	0,004	0,950	0,033	0,855	0,035	0,852
GG	15 (14%)	4 (13%)	38 (45%)	0,008	0,930	24,314	8,2 x 10⁻⁷	10,212	0.001

a. Comparaison entre les patients PR producteurs et non producteurs d'ACPA

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients PR producteurs on non d'ACPA (**Tableau X**).

b. Comparaison entre les patients PR producteurs d'ACPA et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients PR producteurs d'ACPA et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **TT** est associé à la production des ACPA chez les patients PR (OR 6,96 ; IC95% 2,83 – 19,38) alors que le génotype **GG** protège contre la production des ACPA (OR 0,19 ; IC95% 0,09 – 0,40). Quant au génotype **GT**, il ne montre aucune différence significative, dans ce contexte.

c. Comparaison entre les patients PR non producteurs d'ACPA et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients PR non producteurs d'ACPA et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **TT** est associé au développement de la PR séronégative (OR 6,95 ; IC95% 2,14 – 23,42) alors que le génotype **GG** protège contre l'apparition de cette forme de la maladie (OR 0,18 ; IC95% 0,04 – 0,59). Quant au génotype **GT**, il ne montre aucune différence significative.

III.3.1.1-2. NOS3 rs2070744

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et les sujets sains, en fonction de la production ou non des ACPA, figurent dans le **Tableau XI**.

Tableau XI. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production des ACPA.

	ACPA (+) (n = 111)	ACPA (-) (n = 31)	SS (n = 84)	ACPA(+) vs. (-)		ACPA (+) vs. SS		ACPA(-) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	119 (54%)	29 (47%)	94 (56%)	0,906	0,341	0,213	0,645	1,533	0,216
C	103 (46%)	33 (53%)	74 (44%)	0,906	0,341	0,213	0,645	1,533	0,216
Génotypes									
TT	26 (23%)	7 (23%)	27 (32%)	0,010	0,922	1,837	0,175	0,994	0,319
CT	67 (60%)	15 (48%)	40 (48%)	1,424	0,233	3,135	0,077	0,005	0,942
CC	18 (16%)	9 (29%)	17 (20%)	2,585	0,108	0,525	0,469	1,001	0,317

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients PR :

- a. Producteurs ou non producteurs d'ACPA (**Tableau XI**) ;
- b. Producteurs d'ACPA et les sujets sains ;
- c. Non producteurs d'ACPA et les sujets sains.

III.3.1.1-3. Comparaison des taux moyens en ACPA chez les patients PR en fonction des SNPs NOS3

Nous avons comparé, en fonction des génotypes de chaque SNP NOS3, les taux moyens en ACPA chez les patients PR, grâce au test de Student (**Figure 23**).

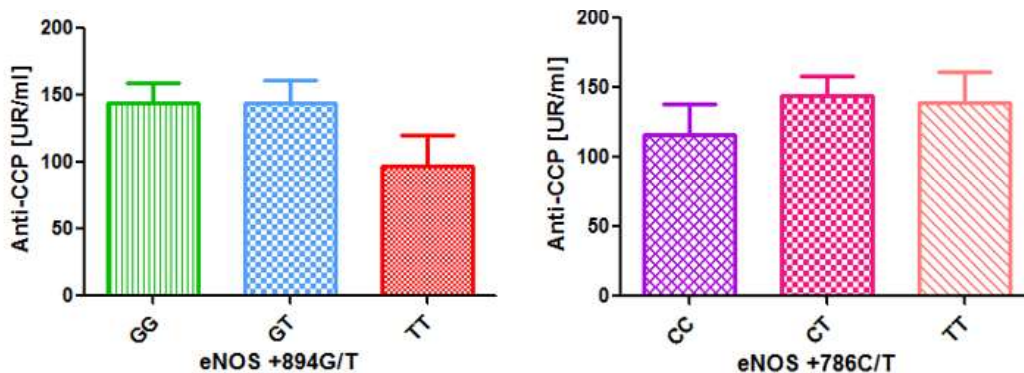


Figure 23. Comparaison des taux moyens en ACPA chez les patients PR en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.

Ainsi, nous avons obtenu pour le SNP :

- a. NOS3 rs1799983 (+894G/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :
 - o **GG** : 144 ± 15 UR/ml ;

- **GT** : 144 ± 17 UR/ml ;
 - **TT** : 97 ± 23 UR/ml.
- b. NOS3 rs2070744 (-786C/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :
- **TT** : 139 ± 22 UR/ml ;
 - **CT** : 144 ± 14 UR/ml ;
 - **CC** : 116 ± 22 UR/ml.

Le tout sans aucune différence significative en matière de production des ACPA.

III.3.1-2. Production du Facteur Rhumatoïde

III.3.1.2-1. NOS3 rs1799983

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR et les sujets sains, en fonction de la production ou non du FR, figurent dans le **Tableau XII**.

Tableau XII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production du FR.

	FR (+)	FR (-)	SS	FR (+) vs. (-)		(FR+) vs. SS		FR (-) vs. SS	
	(n = 104)	(n = 38)		(n = 84)	χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2
Allèles									
T	66 (32%)	27 (36%)	53 (32%)	0,364	0,546	0,001	0,970	0,376	0,540
G	142 (68%)	49 (64%)	115 (68%)	0,364	0,546	0,001	0,970	0,376	0,540
Génotypes									
TT	38 (37%)	17 (45%)	7 (8%)	0,788	0,375	20,304	6,6 x 10⁻⁶	21,942	2,8 x 10⁻⁶
GT	52 (50%)	16 (42%)	39 (46%)	0,695	0,404	0,237	0,626	0,198	0,657
GG	14 (13%)	5 (13%)	38 (45%)	0,002	0,962	23,450	1, x 10⁻⁶	11,798	0,001

a. Comparaison entre les patients PR producteurs et non producteurs du Facteur Rhumatoïde

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients PR producteurs ou non du Facteur Rhumatoïde (**Tableau XII**).

b. Comparaison entre les patients PR producteurs du Facteur Rhumatoïde et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients PR producteurs de Facteur Rhumatoïde et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **TT** est associé à la production du FR chez les patients PR (OR 6,33 ; IC95% 2,55 -17,79) alors que le génotype **GG** protège contre la production du FR (OR 0,19 ; IC95% 0,09 – 0,40). Quant

au génotype **GT**, il ne montre aucune différence significative entre les patients PR producteurs de FR et les sujets sains.

c. Comparaison entre les patients PR non producteurs du Facteur Rhumatoïde et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients PR non producteurs de FR et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **TT** est associé au développement de la PR séronégative (OR 8,9 ; IC95% 2,97 – 28,35) alors que le génotype **GG** protège contre l'apparition de cette forme de la maladie (OR 0,18 ; IC95% 0,05 - 0,54). Quant au génotype **GT**, il ne montre aucune différence significative.

III.3.1.2-2. NOS3 rs2070744

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et les sujets sains, en fonction de la production ou non du FR, figurent dans le **Tableau XIII**.

Tableau XIII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients PR et sujets sains en fonction de la production du FR.

	FR (+)	FR (-)	SS	FR (+) vs. (-)		(FR+) vs. SS		FR (-) vs. SS	
	(n = 104)	(n = 38)	(n = 84)	χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	105 (50%)	43 (57%)	94 (56%)	0,829	0,362	1,117	0,291	0,008	0,927
C	103 (50%)	33 (43%)	74 (44%)	0,829	0,362	1,117	0,291	0,008	0,927
Génotypes									
TT	21 (20%)	12 (32%)	27 (32%)	2,023	0,155	3,490	0,062	0,004	0,951
CT	63 (61%)	19 (50%)	40 (48%)	1,276	0,259	3,150	0,076	0,059	0,807
CC	20 (19%)	7 (18%)	17 (20%)	0,012	0,913	0,030	0,863	0,055	0,815

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients PR :

- a. Producteurs on non producteurs de FR (**Tableau XIII**) ;
- b. Producteurs de FR et les sujets sains ;
- c. Non producteurs de FR et les sujets sains.

III.3.1.2-3. Comparaison des taux moyens en FR chez les patients PR en fonction des SNPs NOS3

Nous avons comparé, en fonction des génotypes de chaque SNP NOS3, les taux moyens en FR chez les patients PR, grâce au test de Student (**Figure 24**).

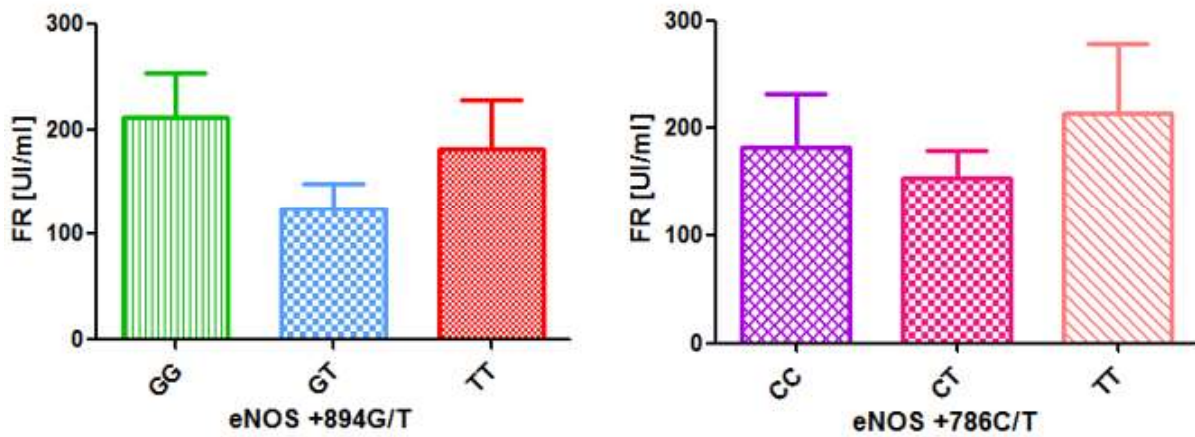


Figure 24. Comparaison des taux moyens en FR chez les patients PR en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.

Ainsi, nous avons obtenu pour le SNP :

a. NOS3 rs1799983 (+894G/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :

- **GG** : 212 ± 41 UI/ml ;
- **GT** : 125 ± 24 UI/ml ;
- **TT** : 182 ± 47 UI/ml.

Avec les patients exprimant le génotype GG qui produisent significativement plus de FR que les patients GT (p 0,026).

b. NOS3 rs2070744 (-786C/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :

- **TT** : 215 ± 64 UI/ml ;
- **CT** : 154 ± 25 UI/ml ;
- **CC** : 183 ± 49 UI/ml.

Le tout sans aucune différence significative en matière de production du FR.

III.3-2. NOS3 rs1799983 et rs2070744 et la production des auto-anticorps spécifiques du LES

III.3.2-1. Production des anticorps anti-ADN natif

III.3.2.1-1. NOS3 rs1799983

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et les sujets sains, en fonction de la production ou non des anticorps anti-ADN natif, figurent dans le **Tableau XIV**.

Tableau XIV. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-ADN natif.

	ADNn (+)	ADNn (-)	SS	ADNn (+) vs. (-)		ADNn (+) vs. SS		ADNn (-) vs. SS	
	(n = 43)	(n = 30)	(n = 84)	χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	66 (77%)	48 (80%)	53 (32 %)	0,219	0,640	46,663	8,4 x 10⁻¹²	42,063	8,8 x 10⁻¹¹
G	20 (23%)	12 (20%)	115 (68%)	0,219	0,640	46,663	8,4 x 10⁻¹²	42,063	8,8 x 10⁻¹¹
Génotypes									
TT	31 (72%)	22 (73%)	7 (8%)	0,014	0,907	55,140	1,1 x 10⁻¹³	49,240	2,3 x 10⁻¹²
GT	4 (9%)	4 (13%)	39 (46%)	0,294	0,588	17,505	2,9 x 10⁻⁵	10,306	0,001
GG	8 (19%)	4 (13%)	38 (45%)	0,357	0,550	8,733	3,1 x 10⁻³	9,670	0,002

a. Comparaison entre les patients LES producteurs et non producteurs d'anticorps anti-ADN natif

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients LES producteurs ou non d'anticorps anti-ADN natif (**Tableau XIV**).

b. Comparaison entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-ADN natif et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujet sains (OR 7,16 ; IC95% 3,80 – 13,71) et est associé à la production des anticorps anti-ADN natif.
- **G** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES producteurs d'anti-ADN natif (OR 0,14 ; IC95% 0,05-0,38) et est associé à une protection contre la production des anticorps anti-ADN natif.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujets sains

(OR 28,42 ; IC95% 9,32 – 91,27) et est associé à la production des anticorps anti-ADN natif. Tandis que les génotypes **GT** et **GG** sont significativement plus fréquents chez les sujets sains et sont de ce fait associés à une protection contre la production des anticorps anti-ADN natif :

- **GT** : OR 0,12 ; IC95% 0,03 – 0,34 ;
- **GG** : OR 0,28 ; IC95% 0,10 – 0,71.

c. Comparaison entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-ADN natif et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujets sains (OR 8,68 ; IC95% 4,09 – 19,30) et est associé à la susceptibilité à développer une forme de LES sans anticorps anti-ADN natif.
- **G** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES producteurs d'anti-ADN natif (OR 0,12 ; IC95% 0,05 – 0,24) et est associé à une protection contre le développement du LES.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujets sains (OR 30,25 ; IC95% 8,79 – 108,58) et est associé au développement d'une forme de LES sans production d'anticorps anti-ADN natif. Tandis que les génotypes **GT** et **GG** sont significativement plus fréquents chez les sujets sains et sont de ce fait associés à une protection le LES, quelle que soit sa forme :

- **GT** : OR 0,18 ; IC95% 0,04 – 0,58 ;
- **GG** : OR 0,19 ; IC95% 0,04 – 0,61.

III.3.2.1-2. NOS3 rs2070744

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients LES et les sujets sains, en fonction de la production ou non des Anti-ADNn, figurent dans le **Tableau XV**.

Tableau XV. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-ADN natif.

	ADNn (+) (n = 43)	ADNn (-) (n = 30)	SS (n = 84)	ADNn (+) vs. (-)		ADNn (+) vs. SS		ADNn (-) vs. SS	
				χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	38 (44%)	33 (55%)	94 (56%)	1,654	0,198	3,155	0,076	0,016	0,899
C	48 (56%)	27 (45%)	74 (44%)	1,654	0,198	3,155	0,076	0,016	0,899
Génotypes									
TT	16 (37%)	15 (50%)	27 (32%)	1,183	0,277	0,326	0,568	3,029	0,082
CT	6 (14%)	3 (10%)	40 (48%)	0,256	0,613	13,953	1,97x10⁻⁴	13,317	2,67 x 10⁻⁴
CC	21 (49%)	12 (40%)	17 (20%)	0,557	0,455	11,094	0,001	4,551	0,033

a. Comparaison entre les patients LES producteurs et non producteurs d'anticorps anti-ADN natif

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients LES producteurs ou non d'anticorps anti-ADN natif (**Tableau XV**).

b. Comparaison entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-ADN natif et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-ADN natif et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujets sains (OR 3,76 ; IC95% 1,57 – 9,04) et est associé à la production des anticorps anti-ADN natif, tandis que le génotype **CT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains et est associé à une protection contre la production des anticorps anti-ADN natif (OR 0,18 ; IC95% 0,06 – 0,49) et enfin, le génotype **TT** ne présente aucune différence significative entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-ADN natif et les sujets sains.

c. Comparaison entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-ADN natif et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-ADN natif et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-ADN natif vs. Sujets sains (OR 3,76 ; IC95% 1,57 – 9,04) et est associé au développement d'une forme de LES non productrice d'anticorps anti-ADN natif, tandis que le génotype **CT** est

significativement plus fréquent chez les sujets sains et est associé à une protection contre toute forme de LES (OR 0,12 ; IC95% : 0,02 – 0,45) et enfin, le génotype **TT** ne présente aucune différence significative entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-ADN natif et les sujets sains.

III.3.2.1-3. Comparaison des taux moyens en anticorps anti-ADN natif chez les patients LES en fonction des SNPs NOS3

Nous avons comparé, en fonction des génotypes de chaque SNP NOS3, les taux moyens en anticorps anti-ADN natif chez les patients LES, grâce au test de Student (**Figure 25**).

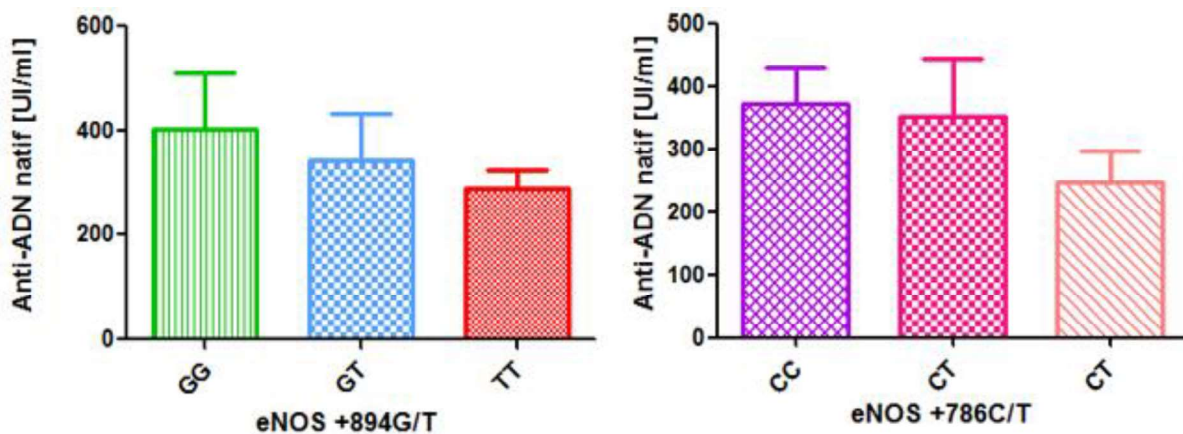


Figure 25. Comparaison des taux moyens en anticorps anti-ADN natif chez les patients LES en fonction des génotypes des deux SNPs NOS3.

Nous avons obtenu pour le SNP :

- a. NOS3 rs1799983 (+894G/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :
 - **GG** : 401 ± 111 UI/ml ;
 - **GT** : 341 ± 93 UI/ml ;
 - **TT** : 290 ± 36 UI/ml.
- b. NOS3 rs2070744 (-786C/T) des taux moyens pour chaque génotype comme suit :
 - **TT** : 248 ± 48 UI/ml ;
 - **CT** : 352 ± 93 UI/ml ;
 - **CC** : 371 ± 59 UI/ml.

Le tout sans aucune différence significative en matière de production des anticorps anti-ADN natif.

III.3.2-2. Production des anticorps anti-Sm

III.3.2.2-1. NOS3 rs1799983

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et les sujets sains, en fonction de la production ou non des Anti-Sm, figurent dans le **Tableau XVI**.

Tableau XVI. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-Sm.

	Sm (+)	Sm (-)	SS	Sm (+) vs. (-)		Sm (+) vs. SS		Sm (-) vs. SS	
	(n = 38)	(n = 35)	(n = 84)	χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	65 (86%)	49 (70%)	53 (32 %)	5,133	0,023	61,053	5,6 x 10⁻¹⁵	29,833	4,7 x 10⁻⁸
G	11 (14%)	21 (30%)	115 (68%)	5,133	0,023	61,053	5,6 x 10⁻¹⁵	29,833	4,7 x 10⁻⁸
Génotypes									
TT	31 (82%)	22 (63%)	7 (8%)	3,210	0,073	65,452	6,0 x 10⁻¹⁶	39,850	2,7 x 10⁻¹⁰
GT	3 (8%)	5 (14%)	39 (46%)	0,763	0,383	17,209	3,3 x 10⁻⁵	10,953	9,3 x 10⁻⁴
GG	4 (11%)	8 (23%)	38 (45%)	2,017	0,156	13,965	1,9 x 10⁻⁴	5,219	0,022

a. Comparaison entre les patients LES producteurs et non producteurs d'anticorps anti-Sm

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients LES producteurs ou non d'anticorps anti-Sm (**Tableau XVI**).

b. Comparaison entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-Sm et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-Sm vs. Sujet sains (OR 12,82 ; IC95% 6,03 – 28,88) et est associé à la production des anticorps anti-Sm.
- **G** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES producteurs d'anti-Sm (OR 0,08 ; IC95% 0,03 – 0,17) et est associé à une protection contre la production de ces auto-anticorps.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-Sm vs. Sujet sains (OR 48,71 ; IC95% 14,10 – 176,86) et est associé à la production des anticorps anti-Sm alors que les génotypes

GT et **GG** sont significativement plus fréquents chez les sujets sains et sont, donc, protecteurs contre le développement de la forme de LES associée à la production des anticorps anti-Sm :

- **GT** : OR 0,10 ; IC95% : 0,02 – 0,36 ;
- **GG** : OR 0,14 ; IC95% 0,03 – 0,46.

c. Comparaison entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-Sm et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques montre que l'allèle :

- **T** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-Sm vs. Sujet sains (OR 5,06 ; IC95% 2,66 – 9,77) et est associé à la non production des anticorps anti-Sm.
- **G** est significativement plus fréquent chez les sujets sains vs. Patients LES non producteurs d'anti-Sm (OR 0,2 ; IC95% 0,10 – 0,38) et est associé à une protection contre le LES.

Quant à l'analyse des fréquences génotypiques, elle révèle que le génotype **TT** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-Sm vs. Sujet sains (OR 18,62 ; IC95% 5,99 – 60,76) et est associé à une forme de LES sans anticorps anti-Sm alors que les génotypes **GT** et **GG** sont significativement plus fréquents chez les sujets sains et sont, donc, protecteurs contre le développement de LES :

- **GT** : OR 0,19 ; IC95% 0,05 – 0,57 ;
- **GG** : OR 0,36 ; IC95% 0,13 – 0,94.

III.3.2.2-2. NOS3 rs2070744

Les fréquences alléliques et génotypiques du SNP *NOS3 rs2070744* (-786C/T) chez les patients LES et les sujets sains, en fonction de la production ou non des Anti-Sm, figurent dans le **Tableau XVII**.

Tableau XVII. Fréquences alléliques et génotypiques du SNP NOS3 rs2070744 (-786C/T) chez les patients LES et sujets sains en fonction de la production des anticorps anti-Sm.

	Sm (+)	Sm (-)	SS	Sm (+) vs. (-)		Sm (+) vs. SS		Sm (-) vs. SS	
	(n = 38)	(n = 34)	(n = 84)	χ^2	(p)	χ^2	(p)	χ^2	(p)
Allèles									
T	38 (50%)	33 (47%)	94 (56%)	0,119	0,730	0,747	0,388	1,541	0,214
C	38 (50%)	37 (53%)	74 (44%)	0,119	0,730	0,747	0,388	1,541	0,214
Génotypes									
TT	17 (45%)	14 (40%)	27 (32%)	0,167	0,683	1,800	0,180	0,675	0,411
CT	4 (11%)	5 (14%)	40 (48%)	0,238	0,625	15,612	7,8 x10⁻⁵	11,674	0,001
CC	17 (45%)	16 (46%)	17 (20%)	0,007	0,933	7,812	0,005	8,001	0,005

a. Comparaison entre les patients LES producteurs et non producteurs d'anticorps anti-Sm

Ni l'analyse des fréquences alléliques ni celle des fréquences génotypiques ne révèlent de différence significative entre les patients LES producteurs ou non d'anticorps anti-Sm (**Tableau XVII**).

b. Comparaison entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-Sm et sujets sains

Sm (+) vs. SS:

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-Sm et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES producteurs d'anti-Sm vs. Sujets sains (OR 3,19 ; IC95% 1,27 – 7,94) et est associé à la production des anticorps anti-Sm, tandis que le génotype **CT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains et est associé à une protection contre la production des anticorps anti-Sm (OR 0,13 ; IC95% 0,03 – 0,42) et enfin, le génotype **TT** ne présente aucune différence significative entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-Sm et les sujets sains.

c. Comparaison entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-Sm et sujets sains

L'analyse des fréquences alléliques ne montre aucune différence significative entre les patients LES non producteurs d'anticorps anti-Sm et les sujets sains alors que l'analyse génotypique montre que le génotype **CC** est significativement plus fréquent chez les patients LES non producteurs d'anti-Sm vs. Sujets sains (OR 3,32 ; IC95% 1,29 – 8,45) et est associé à la production des anticorps anti-

RESULTATS

Sm, tandis que le génotype **CT** est significativement plus fréquent chez les sujets sains et est associé à une protection contre la production des anticorps anti-Sm (OR 0,13 ; IC 95% 0,03 – 0,42) et enfin, le génotype **TT** ne présente aucune différence significative entre les patients LES producteurs d'anticorps anti-Sm et les sujets sains.

IV. DISCUSSION

De nombreuses études d'association cherchent à identifier des facteurs de risque génétiques autres que les gènes HLA (gènes non-HLA) qui seraient impliqués dans la survenue de la PR et du LES. La plupart des gènes candidats, sélectionnés sur la base d'hypothèses physiopathologiques, codent pour des protéines impliquées dans des processus aussi divers que la régulation de l'inflammation, la prolifération cellulaire ou le maintien de l'homéostasie vasculaire (**Billaud *et al.*, 2013 ; Fischer *et al.*, 2018**).

Dans de telles études, les scientifiques comparent la distribution des allèles ou des génotypes de certaines mutations entre individus malades et témoins issus d'une population de sujets sains non apparentés. Plus la répartition est différente, plus le variant génétique est susceptible d'être impliqué dans la maladie étudiée. Ainsi, un allèle significativement plus fréquent dans la population malade aurait un effet délétère et serait lié au développement de la maladie ; dans le cas contraire, un allèle significativement plus fréquent chez les sujets sains aurait un effet bénéfique et serait donc protecteur contre le développement de la maladie (**Fischer *et al.*, 2018**).

Actuellement, de nombreux travaux tendent à associer au développement de la PR et du LES, certaines mutations du gène codant la NO synthase endothéliale (eNOS) ou NOS3 qui catalyse la synthèse de l'oxyde nitrique (NO), contrôle son niveau de production et par conséquent son activité (**Rafikov *et al.*, 2011**).

En effet, la synthèse du NO, médiateur important dans le développement des maladies de système, est étroitement régulée par les NOS dont existent trois isoformes :

- endothéliale : eNOS ;
- inductible : iNOS ;
- neuronale : nNOS.

L'oxyde nitrique synthase (NOS) catalyse la production du NO à partir de la L-Arginine qui participe à divers processus biologiques, y compris l'inflammation, l'apoptose et la production de faibles niveaux de NO qui possède des propriétés cyto-protectrices limitant les dommages tissulaires lors de l'inflammation (**Bigé *et al.*, 2013**).

Les mutations du gène NOS3 affectent directement l'activité de l'eNOS responsable du dysfonctionnement endothélial, qui joue un rôle prépondérant dans le développement de la PR et du LES (**Marsden *et al.* 1993**).

Parmi les variants génétiques de NOS3, les plus pertinents sont les SNPs :

- -786T/C rs2070744 : au niveau de la région promotrice ;
- +894G/T (Glu298Asp) rs1799983 : le seul SNP identifié générant le changement d'un acide aminé au niveau de la protéine mature. Il s'agit de la substitution d'une guanine par une thymine au niveau de l'exon 7 induisant un changement d'acide glutamique par un acide aspartique à la position 298 dans la protéine (**Hingorani *et al.*, 1999**).

Par ailleurs, au niveau du pannus rhumatoïde, site de l'inflammation synoviale, les macrophages, chondrocytes, ostéoblastes et ostéoclastes expriment l'iNOS et le NO produit au niveau de l'articulation enflammée qui contribue à l'érosion osseuse dans la PR (**Abramson *et al.*, 2001 ; Menasria *et al.*, 2016**). De la même manière, le stress oxydatif accentué chez les patients atteints d'un LES, est responsable de l'apparition des lésions tissulaires, dont la néphropathie lupique (**Oates *et al.*, 2006**).

Dans la présente étude, nous avons étudié les deux SNPs de NOS3 chez des patients algériens atteints de PR et de LES et les avons comparés à des sujets sains tout en prenant en considération l'équilibre de Hardy Weinberg pour la population témoin ($p > 0,05$). Après l'analyse de nos résultats nous les avons comparés à ceux déjà publiés, en tenant compte de l'existence de différences basées, entre autres, sur :

- L'ethnie ;
- L'effectif étudié ;
- L'âge et le sexe des patients étudiés ;
- La durée d'évolution de la maladie étudiée ;
- L'existence ou non de complications (érosion osseuse dans la PR, néphropathie lupique dans le LES) ;
- L'existence ou non de facteurs de risques (sujets apparentés ou non).

Étude du SNP NOS3 rs1799983 (+894G/T)***a. Chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde***

Nos résultats montrent que le génotype TT muté est lié à la production des auto-anticorps (ACPA et FR) chez les patients atteints de PR et est, donc, associé à la susceptibilité à développer cette maladie. De ce fait ; le génotype sauvage GG est protecteur contre le développement de la PR. Quant à l'expression du génotype GT, elle serait neutre (aucune différence significative entre les patients PR et les sujets sains).

Nous avons comparé nos résultats aux données de la littérature et avons obtenu ce qui suit :

- **Pehlivan *et al.* (2018)** avaient obtenu, en étudiant ce SNP chez des patients turques (74 patients atteints d'un rhumatisme PSO vs. 74 sujets sains ; OR 1,5), des résultats similaires aux nôtres démontrant que le génotype TT était associé au développement d'une arthrite chez les patients atteints d'un Psoriasis ;
- **An *et al.* (2012)** avaient démontré, au contraire, en étudiant ce SNP chez des patients chinois (196 patients PR vs. 201 sujets sains ; $p > 0,05$) que l'allèle T et les génotypes TT, GT et GG n'étaient pas associés au développement de la PR.

Par ailleurs, **Hingorani *et al.* (1999)** et **Scott *et al.* (2002)** ont montré que la présence d'un acide aspartique en position 298 diminuait significativement la concentration du NO en affectant l'activité enzymatique de « eNOS ». En effet, la protéine eNOS Asp 298 est plus susceptible au clivage protéolytique intracellulaire que la protéine eNOS Glu 298 (**Wang *et al.*, 2000**).

b. Chez les patients atteints du Lupus Érythémateux Systémique

Nos résultats montrent que l'allèle muté T est associé à la production des anticorps anti-ADN natif et anti-Sm, chez les patients atteints de LES et est, de ce fait, associé au développement de cette maladie. De même, les génotypes mutés GT et TT sont associés à la production de ces auto-anticorps et, donc, à la maladie, contrairement à l'allèle sauvage G et au génotype sauvage GG qui sont protecteurs contre le développement du LES, dans notre population. Ainsi, ce SNP est impliqué dans la susceptibilité génétique à développer le LES et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du LES, chose qui reste à démontrer dans les études futures.

Nos résultats rejoignent ceux de la méta-analyse de **Lee *et al.* (2012)** comptant 1297 patients LES vs. 1214 sujets sains. Tandis que **Alfadhli *et al.* (2011)** dans la population koweïtienne, n'ont trouvé aucune différence significative entre les patients LES et les sujets sains ni pour les fréquences

alléliques ni génotypiques, de même que **Sandoughi et al. (2016)** dans la population iranienne (106 patients LES vs. 196 sujets sains).

Étude du SNP NOS3 rs2070744 (-786T/C)

a. Chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde

Nos résultats ne montrent aucune différence significative ni en matière de fréquences alléliques ni génotypiques entre les patients PR et les sujets sains et, de ce fait, ce SNP n'est pas associé au développement de la PR dans notre population.

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par **Brenol et al. (2009)**, alors que **Melchers et al. (2006)**, **An et al. (2012)** et **Lee et al. (2012)** ont observé que l'allèle C et le génotype CC étaient associés au développement de la PR.

Mais alors quel serait le rôle de ce SNP de NOS3 dans le développement de la PR ?

Pour pouvoir répondre à cette question, il est impératif d'effectuer des études fonctionnelles et doser le NO dans le sérum des patients PR chose que nous envisageons d'effectuer dans des études futures. Cependant, les résultats des études fonctionnelles à travers le monde sont très controversés car contradictoires, dans certains cas, notamment ceux publiés par les équipes de :

- **Nakayama et al. (1999)** qui avaient montré une synthèse réduite de NO endothéliale en cas d'expression de l'allèle C du SNP NOS3 rs2070744 et avait démontré que le SNP NOS3 rs2070744 était associé à une réduction de 52% de l'expression du gène NOS3 ;
- **Casas et al. (2006)** avaient observé une baisse de la concentration de l'ARNm de NOS3 et une réduction du niveau de « Nitrate/Nitrite » dans le sérum des patients exprimant l'allèle C de ce SNP.
- **Sim et al. (1998)** qui avaient constaté que le SNP NOS3 rs2070744 n'avait aucun effet sur le promoteur du gène NOS3 chez les australiens d'origine caucasienne.

Par ailleurs, plusieurs études parlent d'une association entre les deux SNPs de NOS3 et l'apparition de maladies cardio-vasculaires de pronostic fâcheux, chez les patients PR, dont :

- Coronaropathie ischémique (**Ignarro et al., 1999**) ;
- Infarctus du myocarde (IDM) (**Popp et al., 1998**) ;
- Hypertension artérielle (HTA) (**Casas et al., 2006**) ;
- Accidents vasculaires cérébraux (AVC) (**Hong et al., 2007**).

b. Chez les patients atteints du Lupus Érythémateux Systémique

Nos résultats montrent que les génotypes CT et CC sont associés à la production des anticorps anti-ADN natif et anti-Sm chez les patients LES et sont, donc, associés au développement de cette maladie.

Ces résultats rejoignent, en partie ceux de **Sandoughi *et al.* (2016)** qui ont montré que l'allèle C et le génotype CC étaient associés au développement du LES

Étude de la distribution des haplotypes

Nous avons comparé les distributions haplotypiques entre les patients PR, LES et sujets sains seulement nous n'avons pas pu comparer nos résultats à d'autres études car nous n'avons pas trouvé, dans la littérature scientifique, de données bibliographiques traitant cette distribution haplotypique.

a. Chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde

La distribution des haplotypes chez les patients PR n'a montré aucune différence significative avec les sujets sains mis à part le fait que l'haplotype GT soit protecteur et donc, significativement plus fréquent chez les sujets sains.

b. Chez les patients atteints du Lupus Érythémateux Systémique

Nos résultats montrent que les individus porteurs des haplotypes TT et TC avaient plus de risque de développer le LES contrairement à l'haplotype GT qui est protecteur. Ceci étant bien sûr des constatations issues de l'analyse de nos résultats et doivent être confirmées ou infirmées, dans le futur, en les comparant aux données publiées.

Nos résultats ont été comparés aux données de la littérature, en tenant compte des points suivants :

- Pour les patients atteints de PR :
 - Le dosage du NO nous fait faute et il fait partie, d'ailleurs, des perspectives de notre étude.
 - L'érosion osseuse est assez fréquente dans la PR ce qui sous-entend une inflammation chronique et une production accrue de NO.
 - La production des anticorps ACPA et FR est directement liée à cette érosion.

- Quant aux patients atteints de LES :
 - Cette pathologie (LES) est caractérisée par la production d'une panoplie d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN natif (double brin) ainsi que les protéines liées à l'ARN (RBP : RNA Binding Proteins).
 - Les auto-anticorps anti-ADN natif sont rares chez les sujets sains.

DISCUSSION

- Ces auto-anticorps sont présents dans le sérum des patients LES plusieurs années avant l'apparition de la symptomatologie clinique et joueraient un rôle dans la pathogénie du LES.
- L'oxyde nitrique (NO), est surproduit dans le lupus actif.
- Une expression accrue de l'enzyme iNOS a été rapportée dans de nombreux tissus chez les patients atteints de LES. Plusieurs laboratoires ont décrit cette expression dans les glomérules des sujets ayant une néphrite lupique proliférative.
- Ainsi, peut être avancée l'hypothèse que "il pourrait y avoir des interactions entre l'activité de la maladie, la Néphropathie Lupique, la production des anticorps anti-ADN natif et les variations génétiques de NOS2". Il serait également possible que les variations génétiques de NOS2 prédisposent directement à ces variations
(Zheng *et al.*, 2006 ; Bollain *et al.*, 2009).

CONCLUSION

Le phénomène de stress oxydatif est généré par la production excessive de radicaux libres qui s'accumulent dans le corps. Ce processus joue un rôle majeur dans le développement des maladies chroniques et dégénératives telles que le cancer et des maladies auto immunes telles que la PR et le LES.

NO synthase (eNOS) codée sur le chromosome 7q35-36 par le gène NOS3 produit NO à partir de L-arginine. Il est nécessaire de savoir que les polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) du gène NOS3 sont associés à l'inflammation. Nos résultats montrent pour le SNP :

- NOS3 rs1799983 (+894G/T) :
 - Chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde : le génotype TT muté est lié à la production des auto-anticorps (ACPA et FR) chez les patients atteints de PR et est, donc, associé à la susceptibilité à développer cette maladie. De ce fait ; le génotype sauvage GG est protecteur contre le développement de la PR. Quant à l'expression du génotype GT, elle serait neutre (aucune différence significative entre les patients PR et les sujets sains).
 - Chez les patients atteints du Lupus Érythémateux Systémique : l'allèle muté T est associé à la production des anticorps anti-ADN natif et anti-Sm, chez les patients atteints de LES et est, de ce fait, associé au développement de cette maladie. De même, les génotypes mutés GT et TT sont associés à la production de ces auto-anticorps et, donc, à la maladie, contrairement à l'allèle sauvage G et au génotype sauvage GG qui sont protecteurs contre le développement du LES, dans notre population. Ainsi, ce SNP est impliqué dans la susceptibilité génétique à développer le LES et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du LES, chose qui reste à démontrer dans les études futures.
- NOS3 rs2070744 (-786T/C) :
 - Chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde : aucune différence significative ni en matière de fréquences alléliques ni génotypiques entre les patients PR et les sujets sains et, de ce fait, ce SNP n'est pas associé au développement de la PR dans notre population.
 - Chez les patients atteints du Lupus Érythémateux Systémique : les génotypes CT et CC sont associés à la production des anticorps anti-ADN natif et anti-Sm chez les patients LES et sont, donc, associés au développement de cette maladie.

Cette étude a permis une caractérisation génétique de la PR et du LES dans l'échantillon de notre étude sur une population algérienne, et une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des

pathologies rhumatismales. Elle a consisté à évaluer la prévalence des deux polymorphismes du gène NOS3 dans une population saine et malade, afin d'en dresser le profil génétique.

L'explosion actuelle des travaux scientifiques portant sur la génétique humaine, en particulier les études GWAS (Genome Wide Association Studies), a permis d'éclaircir et d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires. De plus, l'étude de la fréquence des différents SNPs, dans des populations d'origine ethnique différente, a contribué à positionner et caractériser notre population dans le monde.

Par ailleurs, grâce à notre étude sur les SNPs de la NOS3 et aux données de la littérature, en particulier dans la population saine, il serait possible, dorénavant, de mettre à profit la base de données créée (au niveau de l'IPA) pour explorer ces SNPs de la NOS3 dans d'autres pathologies où le gène NOS3 est impliqué. Quant à la population malade, les patients atteints de PR et de LES, et du fait que notre effectif soit insuffisant comparé à ceux utilisés dans les différents travaux, il serait intéressant d'élargir, dans nos études futures, l'effectif et éventuellement doser le NO chez ces patients.

En outre, il est important d'explorer d'autres gènes de réparation de l'ADN qui présentent des polymorphismes dont l'impact a été démontré sur le risque accru de développer la PR et le LES. Par ailleurs, une étude des facteurs environnementaux permettrait de réaliser une stratification des résultats en fonction du mode d'alimentation et de l'exposition à d'autres facteurs favorisant la PR et LES comme le tabagisme. Ainsi, des analyses d'interaction "gènes-environnement" permettraient une meilleure évaluation du rôle des facteurs de vulnérabilité environnementale, sachant qu'une bonne caractérisation des interactions entre les facteurs environnementaux et génétiques constitue un élément clé, dans la compréhension des maladies auto-immunes à substratum complexe dont la PR et LES.

Abramson SB1, Amin AR, Clancy RM, Attur M.

The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001 Dec;15(5):831-45.

Al Fadhli S, AlTamimy B, AlSaeid K, Haider M.

Endothelial nitric oxide synthase gene haplotype association with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2011. 20(7):700–708.

An JD, Li XY, Yu JB, Zhao Y, Jin ZS.

Association between the eNOS gene polymorphisms and rheumatoid arthritis risk in a northern Chinese population. *Chin Med J (Engl)* 2012. 125(8):1496-9.

Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, Lowenstein CJ.

Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. *J. Biol. Chem* 1996. 271:15069–15073.

Audia S, Lakomy D, Vinit J, Leguy V, Olsson NO, Besancenot JF, Lorcerie B, Bonnotte B.

Anticorps anti-Sm dosés par immunofluorimétrie en flux au cours du lupus érythémateux disséminé. *La revue de médecine interne* 2009. 30: 91.

Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, De Keyser F.

Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2255-62.

Balligand JL.

Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: following the leader *Circ. Res.* 2002. 90:838–841.

Benidir M, Salah SS, Amroun H, Acheli D, Attal N, Djoudi H, Abbadi MC.

Place de l'épitope partagé (SE) dans l'expression clinico-biologique de la PR dans la population Algérienne. *Mémoire de Fin de Résidanat en Immunologie. Institut Pasteur d'Algérie.* Octobre 2009. 19-21.

Bigé N, Boffa JJ, Lepeytre F et Shweke N.

Role of thrombospondin-1 in the development of kidney diseases. *Med Sci (Paris)* 2012; 29:1131–1137.

Billaud M et Straub AC.

Haemoglobin alpha regulates nitric oxide in endothelial cells. *Med Sci (Paris)* 2013, 29 : 471–473.

Boissier MC et al.

Physiopathologie, cibles et thérapies de la polyarthrite rhumatoïde, Bobigny. Unité Inserm 1125. Polyarthrite rhumatoïde : Une maladie modèle pour la recherche sur l'inflammation chronique. Mai 2017.

Bollain-y-Goytia JJ, Ramírez-Sandoval R, Daza L, Esparza E, Barbosa O, Ramirez D, Pacheco-Tovar G, Avalos-Diaz E, Rodríguez-Padilla C, Herrera-Esparza R.

Widespread expression of inducible NOS and citrulline in lupus nephritis tissues. *Inflamm Res*. 2009 Feb;58(2):61-6. doi: 10.1007/s00011-009-7215-1.

Brenol CV, Chies JAB, Brenol JCT, Monticelo OA, Franciscatto P, Birriel F, Neves AG, Xavier RM.

Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clinical Rheumatology* 2009. 28:201.

Burmester GR, Feist E, Dörner T.

Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2014. 10:77–88.

Buxeraud J.

Le lupus érythémateux systémique. *Actualités Pharmaceutiques* 2016. 55:45–47.

Calabrese LH, Rose-John S.

IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology* 2014. 10:720–727.

Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD.

Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol* 2006. 164:921–935.

Cieslik K, Abrams CS, Wu KK.

Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase gamma /Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1211-9.

Cieslik K, Lee CM, Tang JL, Wu KK.

Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an interaction between casein kinase 2 and protein phosphatase 2A. 1999. 3;274(49):34669-75.

COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie.

Lupus érythémateux disséminé. Syndrome des antiphospholipides. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2011.

<http://campus.cerimes.fr/rhumatologie/enseignement/rhumato14/site/html/>

Dahiyat M, Cumming A, Harrington C, Wischik C, Xuereb J, Corrigan F, Breen G, Shaw D, St Clair D.

Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene. *Ann Neurol.* 1999 Oct;46(4):664-7.

Devauchelle-Pensec V, Saraux A, Alapetite A, Colin A, Le Goff P.

Les radiographies des mains et des pieds sont-elles un bon critère de diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde débutante ? Services de rhumatologie et de radiologie (DC).2002. 69 : 859-67.

Firestein GS.

Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003. 423:356.

Fischer A.

Annuaire du Collège de France 2015-2016. Résumé des cours et travaux 116e année, Paris, Collège de France, juin 2018, p. 197-208.

<https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/12834>

García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC.

Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998 Apr 23;392(6678):821-4.

Gill JM, Quisel AM, Rocca PV, Walters DT.

Diagnosis of systemic lupus erythematosus. *American Family Physician.*2003.11:2179-2186.

Gladman DD, Ibañez D and Urowitz MB.

Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *The Journal of Rheumatology.* 2002. 2:288-291

Glinda S. Cooper, Mary Anne Dooley , Edward L. Treadwell, E. William St. Clair , Christine G. Parks, Gary S. Gilkeson.

Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus.*Arthritis and rheumatology.* 2004. 41:1714- 1724.

Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC.,

Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.*2004. 94:1408–1417.

Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ.μ

A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999. 100:1515–1520.

Hong CC, Ambrosone CB, Ahn J, Choi JY, McCullough ML, Stevens VL, Rodriguez C, Thun MJ, Calle EE.

Genetic variability in iron-related oxidative stress pathways (Nrf2, NQO1, NOS3, and HO-1), iron intake, and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Sep;16(9):1784-94. Epub 2007 Aug 28.

Hong C, Shen C, Zheng F, Ding H, Su H, Ma J, Huang S, Wei W, Mu Y.

Involvement of SR-B1 mediated p38 MAPK signaling pathway in serum amyloid A-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology* 2015. 66:340–345.

Iain B, et al.

The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine.* 2011.365:2205-2219.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C.

Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. 34:879–886.

Imboden JB.

The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2009. 4:417–434.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC.

Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18522-5.

Kim J, Chang H, Lee S, Kim J, Kim K, Lee S, Chung W.

Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003. 62:1083–1087.

Klareskog L, Catrina AI, Paget S.

Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009. 373:659–672.

Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM.

Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* 2006. 116:961–973.

Lee YH, Lee HS, Choi SJ, Ji JD, Song GG.

Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2012. 61:135-41.

Marre JP.

Lupus : une maladie auto-immune aux multiples visages - Pourquoi Docteur ? Comprendre pour agir. 2018.

- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT.**
Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *US National Library of Medicine National Institute of Health* 1993.268:23.
- Mathian A, Arnaud L, Amoura Z.**
Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *La Revue de Médecine Interne*. 2014. 35:503–511. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.334>
- Melchers I, Blaschke S, Hecker M, Cattaruzza M.**
The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006.10:3144-51.
- Menasria A, Kihal C.**
Étude du stress oxydatif dans la polyarthrite rhumatoïde. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 en Sciences de la Nature et de la Vie (Sciences Biologiques, Biochimie de la nutrition et santé). 2016. Université de Constantine.
- Meyer O.**
Apport de l'Immunologie dans le Diagnostic et la Prise en Charge Thérapeutique Précoce de la Polyarthrite Rhumatoïde. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2006, 37–43.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T.**
Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):15583-6.
- Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y.**
Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur. J. Biochem*. 1994. 223:719–726.
- Mongens M.**
Thèse pour le doctorat vétérinaire. La faculté de médecine de créteil. 2013. Origine et conséquences du stress oxydant - pdf [www document], n.d. url <https://docplayer.fr/37107163-origine-et-consequences-du-stress-oxydant.html> (accessed 5.3.19).
- Morel J, Combe B.**
How to predict prognosis in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005. 19:137–146.

Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H.

Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012 May;23(4):222-31. doi: 10.5830/CVJA-2011-068.

Nakashima T, Takayanagi H.

The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2008. 473:166–171.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K.

T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999. 99:2864–2870.

Nathan C, Xie QW.

Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994. 78:915–918.

Oates JC, Gilkeson GS.

The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2006 Dec; 121(3): 243–250.

Owen J, Punt J, Stranford S.

Immunologie-7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Dunod. 2014. 300–301.

Ozgocmen S, Kiris A, Kocakoc E, Ardicoglu O, Kamanli A.

Évaluation de la synovite rhumatoïde des articulations métacarpophalangiennes par échodoppler pulsé : relations entre vascularisation synoviale et densité osseuse périarticulaire. *Revue du Rhumatisme.* 2004. 71:763–767.

Pehlivan S, İnalöz HS, Nursal AF, Gülel A, Pehlivan M.

Is There any Association Between the Functional Variants of the NOS3 Gene and Psoriasis? *Istanbul Med J.* 2018. 152-7.

Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F.

Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999. 29:284–290.

Popp R, Fleming I, Busse R.

Pulsatile Stretch in Coronary Arteries Elicits Release of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: A Modulator of Arterial Compliance. *Circulation Research* 1998. 82:696–703.

Rafikov R, Fonseca FV, Kumar IS, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM.

eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol.* 2011. 210(3):271–284.

Rossant-Lumbroso J, Rossant L, Cardenas J.

Le lupus systémique ou lupus érythémateux aigu disséminé, LEAD. *Doctissimo Santé.* 2018. http://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie/sa_1588_lupus_system.htm

Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F.

Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 1; 90(7): 2623–2627. doi: 10.1073/pnas.90.7.2623

Sandoughi M, Salimi S, Zakeri Z, Darbandi EJ, Jahantigh M, Moudi B.

Association of eNOS gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in southeast Iran. *Int J Rheum Dis.* 2016. 19(6):606-12.

Sato S, Fujita N, Tsuruo T.

Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *US National Library of Medicine. National Institutes of Health.* 2000. 20:97.

Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM.

Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J* 1993. J 14 Suppl I, 16–21.

Schini-Kerth VB.

Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfusion Clinique et Biologique.* 1999. 6:355–363.

Scott BB, Zaratin PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR.

Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2002. 29(2):230-9.

Sim AS, Wang J, Wilcken D, Wang XL.

MspI polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian Caucasian population. *Mol Genet Metab.* 1998. 65(1):62.

Takahashi S, Mendelsohn ME.

Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem* 2003. 278:30821–30827.

Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C.

Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jan 24;16(1):202. doi: 10.1186/ar4450.

Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ.

Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep.* 2003 Aug;3(4):279-88.

Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J.

Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett.* 2000. 471(1):45-50.

Zembowicz A, Tang J, Wu KK.

Transcriptional Induction of Endothelial Nitric Oxide Synthase Type III by Lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 1995. 270:17006–17010.

Zhang R, Min W, Sessa WC.

Functional Analysis of the Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Promoter SP1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1995. 270:15320–15326.

Zheng L, Sinniah R, Hsu SI.

Renal cell apoptosis and proliferation may be linked to nuclear factor-kappa B activation and expression of inducible nitric oxide synthase in patients with lupus nephritis. *Hum Pathol.* 2006 Jun; 37(6):637-47.

Annexe 1 : Critères de classification du LES selon l'ACR. Références

1	érythème facial en aile de papillon
2	Lupus discoïde
3	Photosensibilité
4	Ulcération buccale ou nasopharyngée
5	Arthrite non déformante, atteinte d'une ou plusieurs articulations périphériques avec douleurs à la mobilisation, sensibilité, épanchement ou gonflement des parties molles sans déformation
6	Pleurésie ou péricardite (séríte)
7	Atteinte rénale : protéinurie persistante > 0,5 g/24 heures ou cylindres urinaires
8	Atteinte neurologique : psychose ou convulsion (en l'absence de cause médicamenteuse et/ou métabolique)
9	Atteinte hématologique
	Leucopénie < 4 000 à deux reprises
	Thrombopénie < 100 000 (en l'absence de drogue cytopéniante)
	Lymphopénie < 1 500 à deux reprises
	Anémiehémolytique
10	Anomalies immunologiques
	Présence d'anti-ADN à un taux significatif
	Présence d'anti-Sm
	Présence d'anticorps antiphospholipides : soit sérologie syphilitique dissociée positive à 2 déterminations à 6 mois d'écart, soit anticoagulant circulant de type lupique ou titre anormal d'anticorps anti-cardiolipine et IgG et/ou IgM
11	Taux anormal d'anticorps anti-nucléaires identifié par immunofluorescence ou une autre technique, persistant et en l'absence de médicaments inducteurs

Annexe 2 : Critères de classification du LES selon l'SLICC.

	Critères de classification du LED	Détails
Critères cliniques	Lupus cutané aigu ou subaigu	Rash malaire Lupus bulleux Nécrolyse épidermique toxique Rash maculopapuleux Rash dans le cadre d'une photosensibilité Lésion psoriasiforme Lésion annulaire polycyclique
	Lupus cutané chronique	Rash discoïde Lésion verruqueuse Panniculite lupique Lupus tumidus Lupus engelure Lésion type lichen plan
	Lésion muqueuse orale ou nasale	Palais, bouche, langue ou nez
	Alopécie non cicatricielle	Lésion diffuse avec des cheveux cassés visibles
	Synovites ≥ 2 articulations Ou douleur ≥ 2 articulations + dérouillage matinal	
	Sérite	Pleurésie ≥ 1 jour Péricardite ≥ 1 jour
	Atteinte rénale	Protéinurie > 0,5 g/24 h Ou hématurie
	Atteinte neurologique	épilepsie, psychose, mononévrite, myélite, neuropathie périphérique, état confusionnel aigu
	Anémie hémolytique	
	Leucopénie	Leucocytes < 4 000/mm ³ Ou lymphocytes < 1 000/mm ³
Thrombopénie	< 100 000/mm ³	
Critère immunologique	Autoanticorps ou anomalie de certaines fractions du complément	Anticorps anti-nucléaires > norme du laboratoire Anticorps anti-ADN double brin > norme du laboratoire Anti-Sm

Annexe 3 : Formulaire de consentement.

Formulaire de Consentement libre, éclairé
(Décret N°92-276 du 6 juillet 1992 portant code de déontologie médicale)

Nom :
Prénom :
Sexe :
Date de naissance :
Adresse :
Numéro de tel :

Le Docteur m'a proposé de participer à une étude intitulée :

.....
.....

J'ai reçu **oralement et par écrit** toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt et le déroulement de l'étude, les bénéfices attendus, les contraintes et les risques prévisibles.

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires à la bonne compréhension de ces informations et j'ai reçu des réponses claires et précises.

J'ai disposé d'un délai de réflexion suffisant entre les informations reçues et ce consentement avant de prendre ma décision.

En foi de quoi, **j'accepte librement et volontairement de participer à cette recherche.**

J'accepte que les résultats de cette étude, qui seront toujours anonymes, soient diffusés à des fins scientifiques et en respectant les règles déontologiques de la communauté scientifique.

Par ailleurs, je pourrai éventuellement être sorti(e) de l'étude par le médecin s'il l'estime nécessaire.

Signature :

Je reconnais avoir lu le présent formulaire de consentement et consens volontairement à participer à ce projet de recherche. Je reconnais aussi que le responsable du projet a répondu à mes questions de manière satisfaisante et que j'ai disposé suffisamment de temps pour réfléchir à ma décision de participer. Je comprends que ma participation à cette recherche est totalement volontaire et que je peux y mettre fin en tout temps, sans pénalité d'aucune forme, ni justification à donner. Il me suffit d'en informer le responsable du projet.

Signature du participant :

Date : / / 2019.

Annexe 4 : Fiche de renseignement des patients récoltés.



Institut Pasteur d'Algérie

SERVICE D'IMMUNOLOGIE
LABORATOIRE D'AUTO-IMMUNITE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS POUR BILAN D'AUTO-IMMUNITE

Toute fiche de renseignement incomplète ne sera prise en compte.

Nom Prénom : Sexe : Date de naissance : ... / ... /
Externe : Hospitalisé : Hôpital : Service :
En cas de de bilan(s) antérieur(s), préciser numéro(s) et date(s) :
Cachet et signature du médecin traitant (obligatoire)

ELEMENTS MOTIVANT LA DEMANDE

Date de début de la symptomatologie :
Signes cliniques :
Diagnostic suspecté :
Traitement éventuel :

EXAMENS DEMANDES

- 1- Recherche d'Anticorps anti-nucléaires (AAN) :
En cas de positivité des AAN, recherche :
a- d'anticorps anti-ADN natif :
b- d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles :
- Sm : - RNP : - SSA : - SSB : - Scl-70 : - Jo-1 :
- 2- Recherche de Facteur rhumatoïde (FR) :
- 3- Recherche d'anticorps anti-CCP2 :
- 4- Recherche d'ANCA :
- 5- Recherche d'anticorps anti-cardiolipine et anti- β 2-GPI :
- 6- Bilan maladie coeliaque :
- Anticorps anti-tTG : - Anticorps anti-gliadine :
- 7- Recherche d'anticorps :
- Anti-mitochondries : - Anti-muscle lisse : - Anti-LKM1 : - Anti-estomac :
- 8- Recherche d'anticorps anti-tissus :
- Anti-muscle strié : - Anti-Ilôts de Langerhans (voir fiche spécifique)
- Anti-peau : - Autres(préciser) :

Tél. : 021 37 26 74 / 021 36 35 88

Centre de prélèvements : Poste 261

Annexe 5 : Matériels non biologique

Le matériel non biologique utilisé a consisté en :

- Micropipettes (1µl, 10µl, 100µl et 1000µl).
- Tubes secs pour prélever le sérum.
- Tubes avec anticoagulant (EDTA).
- Vortex.
- Microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Automate pour immunofluorimétrie en flux (Luminex™).
- Cônes pour récupérer l'ADN (Eppendorf).
- Laser-Néphélémètre (BN200 Nephelometer Analyzer, Behring-BMD).
- Embouts jetables pour micropipette (avec et sans filtre).
- Éprouvettes en verre.
- Bêchers.
- Lecteur ELISA.
- TaqMAN (7500, Applied Biosystems™).
- TaqMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™).
- Plaque à 96 puits pour TaqMAN.

Annexe 6 : Feuille de travail Taq-Man de la PR.

FEUILLE DE TRAVAIL TAQMAN

SNP NOS3 rs1799983

(VIC/FAM)

Population : PR

- Dans chaque puits :
4,25 µl ED + 2,5 µl Master Mix + 0,125 µl AD Mix [Total : 6,875 µl] + 1 µl ADN
- 100 puits :
425 µl ED + 250 µl Master Mix + 12,5 µl AD Mix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PR1	PR9	PR17	PR25	PR33	PR41	PR49	PR57	PR65	PR73	PR81	PR88
B	PR2	PR10	PR18	PR26	PR34	PR42	PR50	PR58	PR66	PR74	PR82	PR89
C	PR3	PR11	PR19	PR27	PR35	PR43	PR51	PR59	PR67	PR75	PR83	PR90
D	PR4	PR12	PR20	PR28	PR36	PR44	PR52	PR60	PR68	PR76	PR84	PR91
E	PR5	PR13	PR21	PR29	PR37	PR45	PR53	PR61	PR69	PR77	PR85	PR92
F	PR6	PR14	PR22	PR30	PR38	PR46	PR54	PR62	PR70	PR78	PR86	PR93
G	PR7	PR15	PR23	PR31	PR39	PR47	PR55	PR63	PR71	PR79	PR87	PR94
H	PR8	PR16	PR24	PR32	PR40	PR48	PR56	PR64	PR72	PR80	C (-)	C (-)

Annexe 7 : Feuille de lecture Taq-Man du LES.

FEUILLE DE TRAVAIL TAQMAN

SNP NOS3 rs2070744

(VIC/FAM)

Population : LES

- Dans chaque puits :
4,25 µl ED + 2,5 µl Master Mix + 0,125 µl AD Mix [Total : 6,875 µl] + 1 µl ADN
- 100 puits :
425 µl ED + 250 µl Master Mix + 12,5 µl AD Mix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L1	L9	L17	L25	L33	L41	L49	L57	L65	L73	L81	L88
B	L2	L10	L18	L26	L34	L42	L50	L58	L66	L74	L82	L89
C	L3	L11	L19	L27	L35	L43	L51	L59	L67	L75	L83	L90
D	L4	L12	L20	L28	L36	L44	L52	L60	L68	L76	L84	L91
E	L5	L13	L21	L29	L37	L45	L53	L61	L69	L77	L85	L92
F	L6	L14	L22	L30	L38	L46	L54	L62	L70	L78	L86	L93
G	L7	L15	L23	L31	L39	L47	L55	L63	L71	L79	L87	L94
H	L8	L16	L24	L32	L40	L48	L56	L64	L72	L80	C (-)	C (-)

Annexe 8 : Les caractéristiques de la population étudiée.

Patients PR

Patients LES

Code	ACPA	FR	NOS3 rs1799983	NOS3 rs2070744	Code	DNA n	Sm	NOS3 rs1799983	NOS3 rs2070744
PR-77	240	1142	GG	TT	LES-1	89	P+	TT	TT
PR-79	65	172	GG	CT	LES-2	510	P+	TT	TT
PR-80	89	1086	GG	CC	LES-3	743	P+++	TT	CC
PR-81	189	212	TT	CC	LES-4	364	(-)	TT	TT
PR-82	38	263	TT	CT	LES-5	612	P+	TT	TT
PR-84	152	623	GG	CT	LES-6	153	P+	TT	TT
PR-85	318	129	GG	TT	LES-7	1045	P+++	TT	CC
PR-86	53	163	TT	TT	LES-8	88	(-)	TT	CC
PR-87	210	219	GT	CT	LES-9	87	(-)	TT	TT
PR-88	3	17	GG	CT	LES-10	86	P+	TT	TT
PR-90	37	167	TT	CT	LES-11	300	(-)	TT	CC
PR-92	211	172	GT	CT	LES-14	900	P+++	GG	CC
PR-93	278	169	GG	CT	LES-15	600	(-)	TT	CC
PR-94	99	51	GG	CT	LES-16	195	P+	TT	TT
PR-103	6	115	GT	TT	LES-17	1387	P++	GG	CC
PR-109	70	425	GT	CC	LES-18	88	(-)	TT	CC
PR-112	1	16	TT	TT	LES-19	345	(-)	GG	CC
PR-114	10	73	GG	CT	LES-20	270	(-)	TT	CC
PR-116	100	18	GT	CT	LES-21	387	(-)	GG	CT
PR-118	248	114	GG	CT	LES-22	77	(-)	TT	TT
PR-119	16	589	GG	CT	LES-23	1133	P+	TT	CC
PR-120	80	233	TT	CC	LES-24	137	(-)	TT	CC
PR-122	112	142	GG	CT	LES-26	341	(-)	TT	CC
PR-125	112	62	GT	CC	LES-27	66	P++++	TT	TT
PR-130	253	605	TT	TT	LES-28	120	P++++	TT	TT
PR-132	283	135	GG	CT	LES-29	500	P++++	TT	CC
PR-134	252	106	GG	CT	LES-30	77	(-)	TT	TT
PR-136	4	17	GG	CC	LES-32	630	P++++	TT	CC
PR-143	1	21	GT	CT	LES-33	238	P+	TT	CC
PR-145	32	199	TT	TT	LES-34	910	(-)	GT	CT
PR-150	2	106	GG	CT	LES-35	99	(-)	TT	TT

PR-156	63	69	GT	CT	LES-36	87	P++	TT	TT
PR-159	179	102	GT	TT	LES-37	925	P+	TT	TT
PR-160	61	11	GT	CT	LES-39	88	(-)	TT	TT
PR-161	38	31	GG	CT	LES-40	87	(-)	GG	CC
PR-163	25	101	TT	CC	LES-41	123	(-)	TT	TT
PR-164	214	26	GG	CT	LES-42	71	(-)	TT	CC
PR-165	107	415	GT	CT	LES-44	66	P+	TT	TT
PR-168	1	10	GG	CC	LES-45	65	(-)	TT	CC
PR-170	218	92	GT	CT	LES-46	357	P+	TT	TT
PR-171	184	37	GT	CT	LES-48	65	(-)	GG	TT
PR-173	12	221	GT	TT	LES-50	159	(-)	GG	TT
PR-177	47	715	GG	CT	LES-51	66	P+	TT	TT
PR-178	34	115	GG	CT	LES-52	441	P+	TT	CT
PR-179	134	180	GT	CT	LES-53	351	P+	TT	CT
PR-180	107	54	GG	CC	LES-57	384	P+	TT	TT
PR-181	188	491	GG	CT	LES-59	244	P+	TT	CC
PR-183	69	130	GT	CT	LES-60	393	P+	TT	TT
PR-185	100	148	GG	TT	LES-61	89	(-)	TT	TT
PR-186	3	32	GG	CT	LES-64	88	(-)	TT	TT
PR-189	200	32	GG	TT	LES-65	87	P+	TT	CC
PR-190	53	50	GG	CT	LES-67	86	(-)	GG	CC
PR-206	3	17	GG	CT	LES-68	221	(-)	TT	TT
PR-207	301	137	GG	CT	LES-70	759	P++	TT	TT
PR-208	12	301	GT	CC	LES-71	76	P+	TT	CC
PR-210	302	29	GT	CC	LES-74	604	P++	TT	CT
PR-211	4	7	TT	CT	LES-76	66	(-)	GT	CT
PR-212	250	20	GG	TT	LES-78	356	P+	GT	CC
PR-213	210	16	TT	CC	LES-79	634	P+	GT	CC
PR-214	341	101	GG	CT	LES-80	88	(-)	GG	CT
PR-215	11	8	GT	CT	LES-81	85	(-)	TT	CC
PR-216	4	9	GG	CC	LES-82	257	P+	GG	CT
PR-217	13	10	GG	TT	LES-83	86	P+	GT	CC
PR-218	333	11	GT	TT	LES-84	309	P++	TT	CC
PR-219	3	27	GT	CC	LES-85	66	(-)	GT	TT
PR-220	256		GG	CT	LES-87	55	P++	TT	CC
PR-221	2	12	GT	TT	LES-91	65	(-)	TT	CC

PR-222	255	28	GG	CT	LES-92	162	(-)	GG	CC
PR-223	280	707	GT	CT	LES-95	410	P+	TT	CC
PR-224	2	13	GG	CT	LES-98	64	(-)	GT	CT
PR-225	300	46	GT	CT	LES-103	143	(-)	TT	TT
PR-227	321	36	GT	CT	LES-105	1068	P+	GG	TT
PR-228	302	121	GG	CT	LES-106	603	(-)	GT	CC
PR-229	303	86	GT	CT					
PR-230	169	336	GG	TT					
PR-231	2	11	GG	CT					
PR-232	23	38	GT	CT					
PR-234	3	307	GT	CT					
PR-235	10	128	GG	CT					
PR-236	68		TT	CT					
PR-237	100	1301	GG	CT					
PR-239	5	46	GT	CT					
PR-240	255	115	GT	CT					
PR-241	2	128	TT	CC					
PR-242	288	18	GT	TT					
PR-243	290	153	GG	CT					
PR-244	1	11	GT	CT					
PR-245	3	12	GT	TT					
PR-246	257	58	GT	CT					
PR-248	3	13	GT	CC					
PR-249	301	28	GT	CC					
PR-250	322	238	GT	CT					
PR-251	4	14	GT	CT					
PR-252	88	15	GT	CT					
PR-253	257	61	GG	CT					
PR-254		24	GT	CC					
PR-255	277	600	GG	CC					
PR-256	160	253	GG	CC					
PR-258	288	94	GG	CT					
PR-259	291	107	TT	CT					
PR-260		65	TT	CC					
PR-261	255	21	GG	CT					
PR-262	2	5	GG	CT					

PR-265	39	20	GG	TT					
PR-266	3	3	GT	CT					
PR-268	30	2	GT	CT					
PR-291	256	1270	GG	TT					
PR-292	26	128	GG	CT					
PR-293	58	5	GG	TT					
PR-294	3	6	GG	TT					
PR-295	2	7	GT	CC					
PR-296	287	61	GT	CT					
PR-297	251	1270	GG	TT					
PR-298	299	49	GT	CT					
PR-299	300	32	GG	TT					
PR-301	26	256	GG	CT					
PR-302	188	256	GT	CT					
PR-303	191	256	GT	CC					
PR-304	248	24	GG	CT					
PR-305	256	758	GT	CT					
PR-306	2	8	GT	CT					
PR-307	280	140	TT	CT					
PR-308	3	9	GG	TT					
PR-309	255	111	GT	CT					
PR-310	4	93	GG	TT					
PR-312	4	780	GG	TT					
PR-313	251	21	GG	TT					
PR-316	254	150	GG	TT					
PR-317	44	11	TT	CT					
PR-318	300	680	GT	CC					
PR-319	25	12	GT	CC					
PR-321	301	13	GG	TT					
PR-323	302	16	GT	CT					
PR-324	66	7	GG	TT					
PR-325	303	105	GT	TT					
PR-343	55	11	GG	TT					
PR-344	80	751	TT	CT					
PR-345	251	39	GG	CT					
PR-346	57	93	TT	CT					

PR-347	461	24	GG	CT					
PR-353	251	254	GG	CC					
PR-354	186	40	GT	CC					

Annexe 9 : Répartition allélique et génotypique de notre échantillon.

Patients PR

Patients LES

NOS3 rs1799983		(n)	NOS3 rs2070744		(n)	NOS3 rs1799983		(n)	NOS3 rs2070744		(n)
T		93	T		148	T		114	T		71
G		191	C		136	G		32	C		75
TT		19	TT		33	TT		53	TT		31
GT		55	CT		82	GT		8	CT		9
GG		68	CC		27	GG		12	CC		33