

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Centre Universitaire Larbi Tebessi**

**Institut des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie**

*Thèse*

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Magister  
en Biologie appliquée

**Spécialité : Biologie et Physiologie Animale  
option Environnement et Santé**

Par:

**Mme Belguendouz- Lahmar Karima**

**Thème:**

**Rôle des dérivés du monoxyde d'azote et des auto-  
antigènes rétinien sur les différentes membranes de l'œil au  
cours des uvéites**

**Soutenue publiquement le    /    / 2007 devant le jury :**

M <sup>f</sup> Djabri B.	Maître de conférence, C.U.Larbi Tebessi	Président
M <sup>me</sup> Touil-Boukoffa C.	Professeur à la FSB, USTHB	Directrice de thèse
M <sup>me</sup> Laraba-Djebari F.	Professeur à la FSB, USTHB	Examinatrice
M <sup>f</sup> Arhab R.	Chargé de cours, C.U.Larbi Tebessi	Examineur
M <sup>me</sup> Lahlou-Boukoffa O.S. d'honneur	Professeur en ophtalmologie (Annaba)	Invitée

## **REMERCIEMENTS**

Le présent travail a été réalisé au sein de l'équipe « Cytokine et NOSynthase » au niveau du laboratoire de « Biologie Cellulaire et Moléculaire » de la Faculté des Sciences Biologiques à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene.

Tout d'abord, je ne saurais trop remercier Madame le Professeur TOUIL-BOUKOFFA. C., Chef d'équipe « Cytokines et NOSynthases » et Directrice du laboratoire de « Biologie Cellulaire et Moléculaire » de la Faculté des Sciences Biologiques, qui en dépit des nombreuses obligations administratives et scientifiques, a bien voulu m'accueillir au sein de son équipe et me confier ce modeste travail. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir accordé tout le matériel nécessaire à l'avancement de mon étude. Elle a guidé mes premiers pas de chercheur, m'a initiée aux techniques essentielles à un tel travail, puis suivi de près le déroulement de mes travaux et la rédaction de cette thèse. La confiance qu'elle m'a toujours accordée et sa constante disponibilité m'ont énormément aidée à résoudre les problèmes rencontrés dans ce travail. Je tiens à lui témoigner ici mon estime et mon attachement.

Je voudrais remercier Monsieur le Docteur DJABRI, S/Directeur chargé de la post-graduation au C.U. de Tébessa, qui malgré ses nombreuses occupations me fait l'honneur de présider ce jury et d'examiner le travail. Qu'il veuille bien trouver l'assurance de mon profond respect.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Madame le Professeur LARABA-DJEBARI, Directrice de l'équipe « Venins et immunothérapie » et Doyenne de la faculté des Sciences

Biologiques (FSB) à l'U.S.T.H.B., qui malgré ses nombreuses et lourdes charges, a eu l'amabilité d'accepter de prendre le temps d'examiner ce travail et d'accepter de se déplacer jusqu'à Tébessa pour me faire l'honneur d'être membre du jury. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma profonde reconnaissance.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Docteur ARHAB, chargé de cours au département de biologie du C.U.de Tébessa, en acceptant de critiquer et de juger ce mémoire. Qu'il soit particulièrement remercié.

La présence dans ce jury de Madame LAHLOU-BOUKOFFA, Professeur en Ophtalmologie à Annaba, m'honore très sincèrement. C'est à elle que revient l'idée d'entreprendre des recherches dans le domaine de la maladie de Behçet. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma haute considération.

Je tiens à remercier tout spécialement Monsieur AHMEDI, membre du laboratoire de BCM (USTHB), pour ses utiles conseils qui m'ont aidés à résoudre de nombreux problèmes. J'ai pu apprécier ses hautes qualités humaines et sa grande compétence dans le domaine de la biochimie.

J'exprime toute ma gratitude à Mlle BELGUENDOZ, membre du laboratoire de BCM (USTHB) qui m'a apportée son concours compétent et efficace d'immunologiste. En dépit de ses nombreuses obligations, elle a, par ses remarques objectives et son esprit critique, participé à l'élaboration de ce travail. Je lui suis très reconnaissante.

Il m'est bien agréable de pouvoir remercier aujourd'hui tous les membres de l'équipe « CYTOKINES ET NO-SYNTASE » : Qu'ils soient assurés de ma plus profonde gratitude et de mon immense satisfaction d'avoir travaillé à leurs côtés durant mon séjour au laboratoire de Biochimie-Immunologie.

## Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Rappels bibliographiques</b>	
<b>I. Structure de l'œil.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1. Rappel embryologique.....</b>	<b>6</b>
<b>I.2. Anatomie.....</b>	<b>8</b>
<b>I.3. Histologie et Histophysiologie.....</b>	<b>9</b>
<b>I.3.1 Tunique externe .....</b>	<b>9</b>
<b>A - Sclérotique ou Sclère .....</b>	<b>10</b>
<b>B – Cornée .....</b>	<b>10</b>
<b>a – Epithélium cornéen.....</b>	<b>10</b>
<b>b – Membrane de Bowman.....</b>	<b>11</b>
<b>c – Stroma cornéen ou tissu propre .....</b>	<b>11</b>
<b>d – Membrane de Descemet.....</b>	<b>11</b>
<b>e – Endothélium .....</b>	<b>11</b>
<b>I.3.2 - Tunique moyenne ou Uvée.....</b>	<b>11</b>
<b>A - Choroïde .....</b>	<b>11</b>
<b>B - Corps ciliaire.....</b>	<b>12</b>
<b>C - Iris.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.3- La rétine.....</b>	<b>13</b>
<b>A – Histologie.....</b>	<b>13</b>
<b>B -Structure de la rétine.....</b>	<b>15</b>
<b>II. Uvéite .....</b>	<b>17</b>
<b>II. 1. Définition .....</b>	<b>17</b>
<b>II. 2. Classification .....</b>	<b>17</b>
<b>II. 3. Etiologie.....</b>	<b>19</b>
<b>II. 4. Critères diagnostiques.....</b>	<b>21</b>
<b>II. 5. Thérapie.....</b>	<b>22</b>
<b>II. 6. Uvéite expérimentale auto-immune (EAU).....</b>	<b>22</b>
<b>III. Antigène S .....</b>	<b>27</b>
<b>III. 1. Structure moléculaire.....</b>	<b>27</b>
<b>III. 2. Localisation .....</b>	<b>29</b>
<b>III. 3. Rôle physiologique .....</b>	<b>30</b>
<b>III. 4. Rôle physiopathologique .....</b>	<b>30</b>

<b>IV. Le monoxyde d'azote (NO)</b> .....	<b>33</b>
<b>IV.1. Propriétés physico-chimiques</b> .....	<b>33</b>
<b>IV.2. Cibles cellulaires du NO</b> .....	<b>34</b>
<b>IV.3. NOSynthases</b> .....	<b>37</b>
<b>1. Régulation de l'activité de la NOS</b> .....	<b>39</b>
<b>a. Abondance du substrat et des cofacteurs</b> .....	<b>39</b>
<b>b. Inhibition par feedback du NO</b> .....	<b>39</b>
<b>c. Phosphorylation</b> .....	<b>39</b>
<b>2. Régulation de l'expression du gène de la NOS</b> .....	<b>39</b>
<b>a. Régulation de la eNOS</b> .....	<b>40</b>
<b>b. Régulation de la iNOS</b> .....	<b>40</b>
<b>c. Régulation de la n NOS</b> .....	<b>40</b>
<b>IV.4. NO et physiologie</b> .....	<b>42</b>
✓ <b>  Système cardio-vasculaire</b> .....	<b>42</b>
✓ <b>  Système nerveux</b> .....	<b>42</b>
✓ <b>  Système immunitaire</b> .....	<b>42</b>
<b>IV.5. NO et physiopathologie</b> .....	<b>43</b>
<b>IV. 6. NO et l'œil</b> .....	<b>43</b>
<b>V. Les cytokines</b> .....	<b>46</b>
<b>V.1. Caractéristiques générales</b> .....	<b>46</b>
<b>V.2. Structures des cytokines</b> .....	<b>47</b>
<b>V.3. Classification des cytokines</b> .....	<b>47</b>
<b>V.4. Récepteurs des cytokines</b> .....	<b>48</b>
<b>a. Classification</b> .....	<b>48</b>
<b>b. Transduction du signal</b> .....	<b>49</b>
<b>V.5. Physiologie</b> .....	<b>50</b>
<b>VI. Immunologie de l'œil :</b> .....	<b>51</b>
<b>VI. 1 Phase afférente de l'auto-immunité oculaire</b> .....	<b>51</b>
<b>VI. 2. Phase efférente l'auto-immunité oculaire</b> .....	<b>52</b>

## Chapitre II : Matériel et méthodes

### I. Matériel :

<b>I.1. Les yeux de bœufs</b> .....	<b>54</b>
<b>I.2. La souche bactérienne ATCC 8062</b> .....	<b>54</b>
<b>I.3. Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>54</b>

### II. Méthodes :

<b>A. Purification de l'antigène S</b> .....	<b>54</b>
<b>1. Préparation de l'extrait brut</b> .....	<b>54</b>
<b>2. Précipitation des protéines avec le sulfate d'ammonium</b> .....	<b>55</b>
<b>3. Purification de l'antigène S par chromatographie de gel filtration sur G150</b> .....	<b>55</b>
<b>4. Caractérisation biochimique et immunologique des différents extraits bruts et fractions</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1. Caractérisation de l'extrait brut et des différentes fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2. Caractérisation antigénique de l'extrait brut et des différentes fractions</b> .....	<b>56</b>
<b>4.2.1. Caractérisation par immuno-diffusion double (IDD)</b> .....	<b>56</b>

4.2.2. Caractérisation par ELISA.....	56
B. Culture d'explants de yeux de bœuf.....	56
C. Dosage des nitrites résiduels et totaux dans les surnageants des cultures d'explants de yeux de bœufs .....	57
D. Technique histologique.....	57
E. Immunohistochimie sur coupes en paraffine .....	57
F. Technique de microscopie électronique pour coupes semi-fines.....	58
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	
1 Purification de l'Ag S à partir de l'extrait rétinien soluble.....	59
1.1 Caractérisation biochimique des différents extraits.....	59
1.2 Caractérisation immunologique des différents extraits .....	59
1.3 Fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire de l'extrait précipité.....	61
2 Etude histologique de l'effet du NO sur les explants des yeux de bœufs en culture..	61
1. Etude histologique des cultures « témoin » des explants oculaires.....	64
2. Etude histologique de l'action des nitrites sur les explants oculaires bovins <i>in vitro</i>	
a. Effets des nitrites sur les explants oculaires postérieurs.....	64
b. Effets des nitrites sur les explants oculaires antérieurs .....	71
3. Etude histologique de l'action des nitrates sur les explants oculaires bovins <i>in vitro</i>	
a. Effets des nitrates sur les explants oculaires postérieurs.....	83
b. Effets des nitrates sur les explants oculaires antérieurs.....	83
4. Etude histologique de l'action du peroxy-nitrite sur les explants oculaires bovins <i>in vitro</i> .....	97
III. Etude de l'effet de l'antigène S sur les explants des yeux de bœuf <i>in vitro</i> .....	110
1. Etude histologique l'action de l'Ag-S sur les explants oculaires bovins <i>in vitro</i>	
a. Effets de l'Ag-S sur les explants oculaires antérieurs .....	110
b. Effets de l'Ag-S sur les explants oculaires postérieurs .....	110
2. Dosage des nitrites résiduels et totaux dans les surnageants des cultures d'explants de yeux de bœuf.....	120
3. Etude immuno-histochimique de l'expression des NOS au niveau des cultures d'explants de yeux de bœuf traités avec l'AgS.....	122
<b>Chapitre IV : Discussion générale.....</b>	<b>128</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>133</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>134</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>143</b>



## Introduction

L'uvéite est un terme générique englobant une multitude de maladies inflammatoires intraoculaires pouvant conduire à la cécité dans 10 % des cas aux USA (Caspi, 2001) et entre 5 % et 20 % en Europe (Van Laar et Van Hagen, 2006). En Algérie, elle cause également un problème de santé publique. L'uvéite peut être une maladie locale telle que de l'ophtalmie sympathique ou le signe d'une maladie systémique touchant différents organes comme la maladie de Behçet et la sarcoïdose. Le facteur auto-immun est un des mécanismes élucidant l'atteinte d'uvéite idiopathique. L'antigène S, protéine localisée essentiellement dans les photorécepteurs, est une des protéines majeures impliquées dans l'initiation des uvéites auto-immunes (Mc Kechnie et *al.*, 1986 ; Tripathi et *al.*, 2004).

Les mécanismes physiopathologiques de l'uvéite impliquent surtout les réponses immunitaires à médiation cellulaire (Caspi, 1999; Caspi, 2002). En effet, une activation importante des leucocytes, monocytes et lymphocytes est observée au niveau local impliquant une réponse contre les structures oculaires (Vallochi et *al.*, 2007). De plus, chez les animaux, l'injection de l'extrait protéique brut de la rétine induit une uvéite. Ceci est en faveur de la présence d'une réponse auto-immune.

Les cytokines jouent un rôle clé dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. L'infiltrât cellulaire, retrouvé au cours des uvéites, est attiré au site de l'inflammation par de nombreux médiateurs dont les principaux sont les cytokines (Caspi, 2001). Certaines cytokines, retrouvées au niveau des sérums des patients atteints d'uvéite, ont la propriété d'induire la synthèse d'une enzyme, la NO Synthase inductible, dans divers types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et l'épithélium pigmentaire rétinien (Dighiero, 1997 ; Trifilieff et *al.*, 2000 ; Sagoo, 2004). Dès lors, ces cellules produisent de façon continue et soutenue du monoxyde d'azote (NO). Le flux de NO, ainsi produit, exerce dans la cellule émettrice et dans son environnement une action antivirale, antibactérienne, antiparasitaire et également antiproliférative des cellules tumorales. Ainsi, le NO exercerait des fonctions immunorégulatrices dans les conditions physiologiques ou cytotoxiques selon sa concentration (Sueda, 2000). Le NO est un radical libre qui, dans un milieu aqueux et en présence d'oxygène, réagit rapidement avec ce dernier pour donner des dérivés oxygénés tels que les nitrites, les nitrates et le peroxy-nitrite. Ces composés seraient des effecteurs de l'action du NO, vu leur réactivité avec le milieu environnant.

L'objectif de notre étude s'inscrit dans le cadre du projet de recherche «Mécanismes immunitaires, pathogénèse et immunosurveillance dans les



maladies parasitaires et auto-immunes. Modèles d'études : Echinococcose et maladie de Behçet ». Il porte sur l'étude de l'effet de l'auto-antigène S et de l'effet des métabolites physiologiques du NO sur les différentes tuniques de l'œil de bœuf.

Cette étude est entreprise en vue de situer la diffusion et l'action du NO à travers les différentes structures de l'œil.

Notre travail a porté sur les points suivants :

- La purification de l'auto antigène rétinien « arrestine visuelle » ou Ag S à partir des rétines de bœuf.
- L'étude de l'effet de l'auto- antigène rétinien « Ag S » sur les explants oculaires de bœuf en culture.
- L'étude de l'effet de deux métabolites physiologiquement stables du NO, les nitrites et les nitrates, sur les différentes tuniques de l'œil de bœuf.
- L'étude de l'effet d'un métabolite hautement réactif du NO, le peroxy-nitrite, sur les différentes tuniques de l'œil de bœuf.

## I. Structure de l'œil

Organe de la vue, l'oeil est un organe pair. Il est chargé de la formation et de la transduction de l'image (transformation du signal lumineux en signal électrique transmissible par voies nerveuses). Le rôle de la partie antérieure de l'oeil composée de tissus transparents (cornée et cristallin séparés par un liquide) consiste à former une image nette sur la rétine. La rétine, tissu neuronal recouvrant le fond de l'oeil, reçoit des images inversées et les transmet au cerveau.

La sécurité de l'oeil est assurée par sa position dans une cavité osseuse de forme pyramidale, l'orbite. Le globe oculaire est suspendu dans cette cavité par des aponévroses orbitaires. Il baigne dans un milieu graisseux très fluide qui amortit les chocs. L'oeil est aussi relié à l'orbite par six muscles oculomoteurs qui en assurent les mouvements.

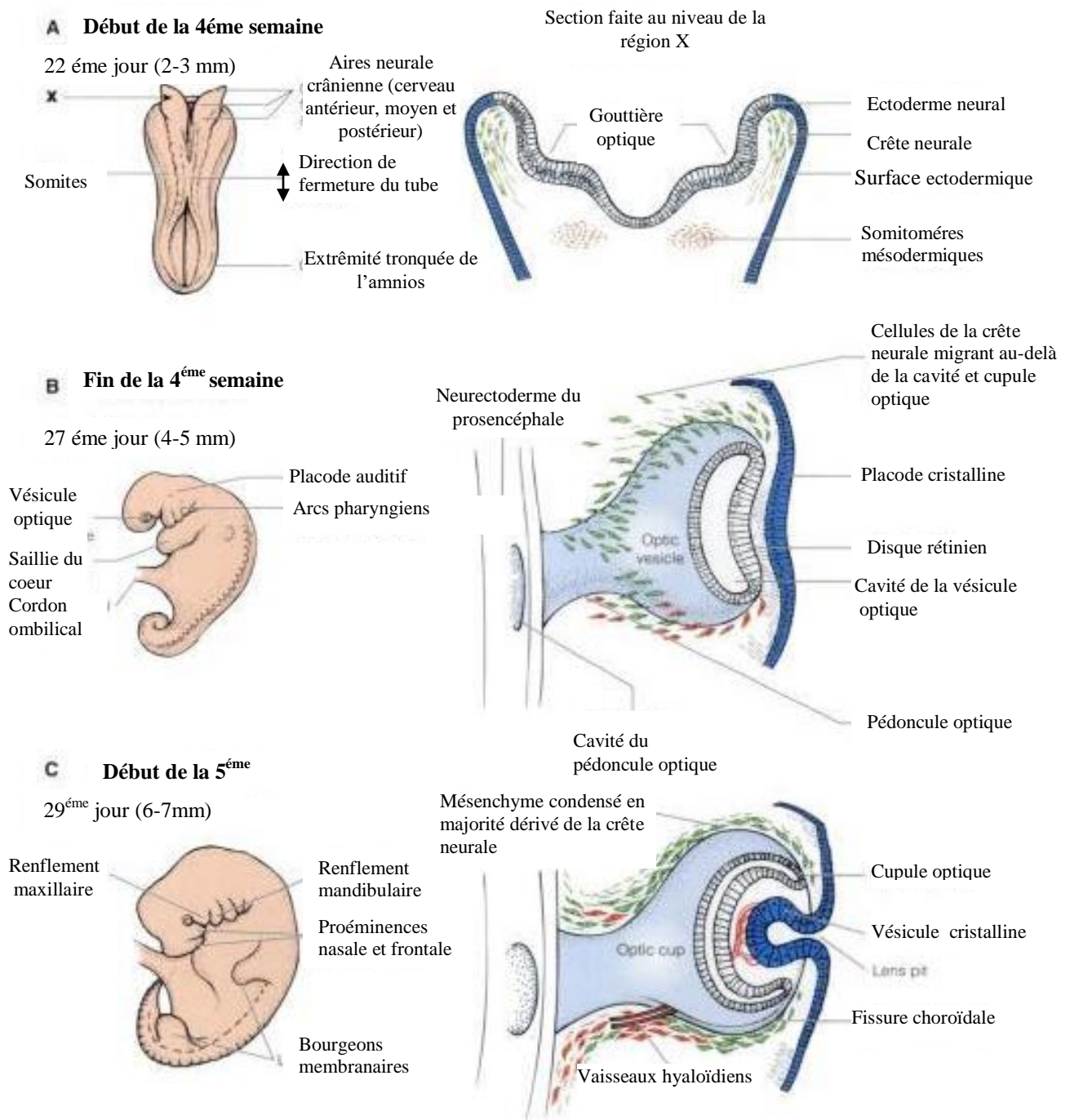
L'orbite est fermée à l'avant par les paupières, dont la sensibilité est accrue par la présence de cils. Elles se ferment d'une façon réflexe en cas d'agression lumineuse ou traumatique. Elles ont aussi un clignement spontané qui participe à la bonne répartition des larmes sur la cornée. Derrière la paupière supérieure, du côté extérieur du globe, se tiennent les glandes lacrymales, qui protègent la cornée et contribuent à la nourrir.

La vascularisation de l'oeil et de ses annexes est assurée par l'artère ophtalmique, issue de la carotide interne, et par ses ramifications. Les deux veines ophtalmiques (supérieure et inférieure) de chaque oeil rejoignent le sinus caveux puis débouchent dans la veine jugulaire interne.

### I.1. Rappel embryologique :

Le développement de l'œil se fait avec la coopération d'éléments d'origines différentes, ce qui dénote de sa longue évolution dans le temps et de ses différentes étapes successives : la rétine, d'origine nerveuse ; le cristallin et la cornée, d'origine ectodermique ; les enveloppes et les vaisseaux sanguins, d'origine mésodermique. La figure 2 schématise les différentes étapes de l'organogenèse de l'œil.

Au début de la quatrième semaine, avant la fermeture du neuropore antérieur, on voit apparaître, de part et d'autre du cerveau, deux dépressions, les gouttières optiques. Au moment de la division du prosencéphale en télencéphale et diencéphale, l'ébauche optique reste attachée à ce dernier.



**Figure 1 :** Diagramme schématisant le développement embryonnaire de l'œil du 22<sup>ème</sup> jour à la 8<sup>ème</sup> semaine. A gauche est représenté l'aspect externe de l'embryon durant la période équivalente. Les différentes origines embryonnaires sont colorées conventionnellement afin d'illustrer l'origine et la contribution de chacune dans la formation de l'œil final et les tissus périoculaires. (Forrester, 2001).

Les extrémités distales de cette première ébauche s'invaginent pour former les vésicules optiques reliées à l'encéphale par le pédoncule optique (futurs nerfs optiques). Ultérieurement, les vésicules optiques se replient et forment des cupules optiques à double paroi séparée par un espace. L'ectoblaste à proximité des cupules s'épaissit pour former les deux placodes optiques (futurs cristallins). Ces placodes s'invaginent pour donner les vésicules cristalliniennes creuses et positionnées dans les cupules optiques. La vésicule ainsi formée pénétrera dans la cupule optique et se transformera progressivement en cristallin. A partir de là, la fermeture de la fente embryonnaire va souder les deux berges des pédicules optiques.

Le mésenchyme situé dans la région où se développent ces deux ébauches donnera les autres éléments du globe oculaire.

## **I.2. Anatomie :**

Dans l'orbite, le globe oculaire est mobilisé par des muscles oculomoteurs et protégé par les paupières. Il a la forme d'une sphère mesurant en moyenne 24 mm dans son diamètre antéro-postérieur, complétée vers l'avant par une autre sphère de 8 mm de rayon, la cornée. La paroi du globe oculaire est formée de 3 tuniques (ou membranes) concentriques en périphérie (figure 2) :

- la tunique fibreuse
- la tunique uvéale
- la tunique nerveuse

Dans leur région centrale, ces tuniques enferment des milieux transparents :

- L'humeur aqueuse : Située dans la partie antérieure, c'est un liquide incolore qui occupe l'espace entre la cornée et la face antérieure du cristallin. Cet espace est divisé en chambre antérieure et postérieure par l'iris. Elle est résorbée au niveau de l'angle irido-cornéen.
- Le cristallin, est une lentille biconvexe, suspendue aux corps ciliaires par un appareil ligamentaire, la zonule de Zinn.
- Le corps vitré : Situé dans la partie postérieure, c'est un hydrogel transparent, de structure fibrillaire, remplissant la partie postérieure entre le cristallin et la rétine. Il occupe environ 80 % du globe oculaire. Le rôle essentiel du vitré est un rôle de tamponnement interne de la rétine pour que celle-ci reste accolée à la choroïde. Il a aussi un rôle dans l'absorption des chocs.

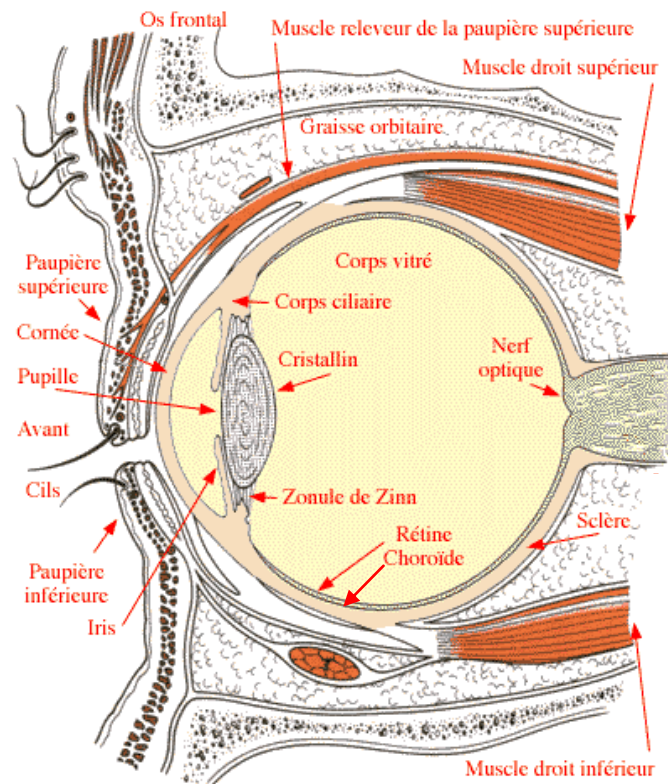


Figure 2 : Structure générale de l'œil

### I.3. Histologie et Histophysiologie :

#### I.3.1 La tunique externe :

C'est la tunique la plus externe. Entourant complètement le globe oculaire, elle est formée de la sclérotique en arrière (représentant environ les 4/5 de la surface du globe oculaire) et de la cornée en avant (constituant environ 1/5 de la surface du globe oculaire).

#### A - La sclérotique ou Sclère :

La sclérotique constitue le blanc de l'œil. Sa surface extérieure présente des insertions des muscles oculomoteurs responsables de la mobilité de l'œil.

Elle est composée de tissu conjonctif dense, formé de faisceaux de fibres collagènes, entre lesquelles se trouvent des fibroblastes aplatis et de fins réseaux de fibres élastiques. Elle est plus épaisse au pôle postérieur. Il y a très peu de vaisseaux sanguins dans la sclérotique, pas de vaisseaux lymphatiques et peu de fibres nerveuses.

A son pôle postérieur, elle présente une zone percée de nombreux orifices qui laissent passer les axones du nerf optique, la lame criblée. Au niveau de cette région, elle se continue avec la dure-mère.

## **B – La cornée :**

La sclère se prolonge en avant par la cornée qui est une tunique fibreuse entièrement transparente avec une surface lisse très sensible, et avasculaire. Son rayon de courbure est plus faible que celui de la sclérotique, ce qui contribue à la convergence des rayons lumineux. Elle est épaisse en périphérie et plus fine en son centre. Elle est composée de cinq couches de l'avant vers l'arrière, identifiables sur les coupes histologiques à l'exception de la dernière (endothélium):

- 1 – l'épithélium cornéen,
- 2 – la membrane de Bowman,
- 3 – le stroma cornéen ou tissu propre,
- 4 – la membrane de Descemet,
- 5 – l'endothélium.

### **a – L'épithélium cornéen :**

C'est un épithélium pavimenteux stratifié, non kératinisé, d'une épaisseur uniforme, formé en général de cinq à six couches de cellules. Il comprend une couche unique de cellules (kératinocytes) basales cylindriques. Ce sont les seules cellules douées d'une activité considérable de régénération. Elle est constituée de trois couches de cellules polyédriques et d'une ou deux couches de cellules pavimenteuses de surface. L'épithélium cornéen repose sur une fine lame basale qui se distingue de la membrane de Bowman en microscopie électronique. Cet épithélium contient de nombreuses terminaisons nerveuses libres amyéliniques et il est très sensible à l'environnement.

### **b – La membrane de Bowman :**

C'est une membrane uniforme, claire, constituée par un feutrage de minces fibrilles de collagène. Elle est perforée pour laisser passer les branches épithéliales des nerfs cornéens et se termine brusquement au bord de la cornée. Elle constitue une couche protectrice contre les traumatismes et la pénétration des agents microbiens.

### **c – Le stroma cornéen ou tissu propre :**

Le stroma cornéen constitue environ 90 % de l'épaisseur totale de la cornée. C'est un tissu conjonctif révélant une disposition très ordonnée de ses faisceaux de fibres collagène. Ces faisceaux forment de minces lamelles disposées en de nombreuses couches. A l'intérieur de chaque lamelle, les fibres sont parallèles, mais celles des lamelles successives changent de direction de

telle façon qu'elles se présentent presque à angle droit par rapport à celles des lamelles voisines. Il y a échange de fibrilles entre lamelles voisines de telle sorte que toutes les lamelles sont fermement solidaires entre elles. Les cellules, présentes dans le stroma cornéen, sont des fibroblastes minces, aplatis, logés dans des fentes étroites entre les lamelles successives. Les cellules et les fibres sont incluses dans une substance fondamentale riche en chondroïtine sulfate et en kératane sulfate ainsi que le sulfate de l'acide hyaluronique. Il existe néanmoins de rares cellules lymphoïdes (Gartner et Hiatt, 1997).

#### **d – La membrane de Descemet :**

C'est une couche homogène séparant le tissu propre de l'endothélium. La membrane de Descemet se présente simplement sous la forme d'une membrane basale très épaisse, constituée par de très minces fibrilles de collagène produites par l'endothélium disposées de façon hexagonale.

#### **e – L'endothélium :**

Il est formé d'une couche unique de cellules pavimenteuses tapissant la face interne de la cornée. Sa fonction est celle d'une pompe qui assèche le stroma, condition indispensable à la transparence de la cornée.

La cornée est non vascularisée mais très richement innervée par les nerfs ciliaires responsables de la sensibilité cornéenne. La cornée elle-même n'est pas vascularisée. Ainsi, elle permet à la lumière de traverser cette paroi.

### **I.3.2 - La tunique moyenne ou Uvée :**

La tunique vasculaire ou Uvée est la couche moyenne de la paroi du globe oculaire. Elle est pigmentée, richement vascularisée et contient des muscles lisses. Elle est constituée de trois régions : la choroïde, le corps ciliaire et l'iris.

#### **A - La choroïde :**

La choroïde est une couche mince, richement vascularisée, située immédiatement au-dessous de la sclérotique. Elle contient de nombreux vaisseaux sanguins entourés par un tissu conjonctif lâche riche en fibroblastes, en macrophages, en lymphocytes et en plasmocytes. Des mélanocytes, présents en nombre limité, donnent à cette couche une couleur brune.

Plusieurs couches constituent cette membrane, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La lamina fusca ou l'épichoroïde : Elle est formée par de fines travées conjonctives, de mélanocytes et de macrophages et des fibres nerveuses amyéliniques,
- La couche des vaisseaux : Elle se retrouve dans un tissu conjonctif riche en mélanocytes et contenant quelques cellules musculaires lisses,

- La couche chorio- capillaire : Des capillaires fenêtrés constituent cette couche,
- La membrane de Bruch ou la lame vitrée : c'est une assise acellulaire séparant la choroïde de l'épithélium pigmentaire.

La choroïde est un tissu nourricier qui assure la nutrition et l'évacuation des déchets de la rétine.

### **B - Le corps ciliaire :**

Le corps ciliaire est un épaississement circulaire, de forme triangulaire, de la choroïde située entre l'ora serrata et l'iris. C'est le prolongement antérieur, à la fois, de la choroïde et de la rétine.

Le corps ciliaire est constitué par de nombreux procès ciliaires, replis radiaux sécrétant l'humeur aqueuse et formant la couronne ciliaire à laquelle est fixé le ligament suspenseur du cristallin. Trois couches de muscles lisses, orientées de façon grossièrement méridienne, radiale et circulaire ont un rôle dans l'accommodation. Les procès ciliaires sont bordés par l'épithélium ciliaire constitué par deux couches cellulaires, une couche interne de cellules prismatiques non pigmentées et une couche externe pigmentaire.

Le corps ciliaire a deux fonctions : la sécrétion de l'humeur aqueuse qui donne au globe oculaire son tonus et le muscle ciliaire qui permet l'accommodation.

### **C - L'iris :**

C'est la partie antérieure de l'uvée. Il est relié à la partie antérieure du corps ciliaire par une racine (c'est un prolongement du corps ciliaire), qui est sa partie la plus fine. Il est plus épais au centre, mais, autour de la pupille, il est fin et repose contre la face antérieure du cristallin. La face antérieure est irrégulière, avec des fissures et des fentes. La surface postérieure est plus régulière, uniformément noire et ne présente que des sillons étroits.

Histologiquement, la couche antérieure est une simple couche de fibroblastes, sous- tendue par un délicat stroma conjonctif, avec relativement peu de fibres, mais contenant de nombreux fibroblastes et chromatophores.

En dessous de ce stroma, il y a une couche de vaisseaux sanguins, à disposition principalement radiale. Ces vaisseaux ont des parois inhabituellement épaisses placées dans un stroma délicat de tissu conjonctif contenant des mélanocytes et des cellules mésenchymateuses primitives.

Sous cette couche se trouve du tissu conjonctif contenant des fibres musculaires lisses, disposées en sphincter pupillaire. Ce dernier est annulaire, disposé autour de la pupille et comprend deux contingents :

- Le muscle dilatateur, nappe de cellules myoépithéliales à disposition radiale,



- Le muscle constricteur constitué de cellules musculaires lisses à disposition circulaire.

Ces muscles sont responsables de l'accommodation. Ainsi, l'iris contrôle l'ouverture de la pupille dont le diamètre est inversement proportionnel à l'intensité de la lumière.

L'angle irido-cornéen est une zone intermédiaire entre les tuniques externe et moyenne. Cette zone est recouverte en surface par l'épithélium postérieur de la cornée en continuité avec l'épithélium antérieur de l'iris. En profondeur, elle est occupée par un tissu conjonctif lacunaire constituant des travées séparées par des fentes bordées d'un endothélium appelées espaces de Fontana. C'est une zone de résorption de l'humeur aqueuse qui est filtrée par l'endothélium, puis véhiculée dans un canal sinueux développé, canal de Schlemm, pour retrouver la circulation.

### **I.3.3. La rétine :**

Issue du tube neural, la rétine est embryologiquement du tissu nerveux et assure un phénomène sensoriel qui est la vision.

#### **A - Histologie :**

La rétine est la couche la plus interne du globe oculaire. C'est une tunique incolore transparente qui tapisse la choroïde et que l'on voit par transparence lors de l'examen du fond de l'oeil.

Histologiquement, comme illustrée dans la figure 3, elle est composée de cellules épithéliales pigmentaires, de cellules photoréceptrices, de cellules de soutien rétinienne et de cellules nerveuses (Stevens et Lowe, 1992).

##### **a- Les cellules épithéliales pigmentaires :**

L'épithélium pigmentaire de la rétine comporte une simple couche de cellules polygonales contenant de la mélanine, s'étendant du nerf optique à l'ora serrata. Il est bordé en dedans par la couche de photorécepteurs de la rétine et en dehors par sa membrane basale, un des composants de la membrane de Bruch. Les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine ont pour fonction de phagocyter les débris des segments externes des cellules photoréceptrices.

L'épithélium pigmentaire est le siège d'échanges hydrolytiques et d'oxygène par des phénomènes passif et actif. Il synthétise la mélanine pour absorber la lumière après stimulation des cônes et des bâtonnets (effet écran). L'épithélium pigmentaire joue un rôle dans le métabolisme de la vitamine A en la stockant et en régénérant la rhodopsine après photo réception.

b - Les cellules photoréceptrices (à bâtonnet et à cône) :

Ce sont des cellules nerveuses modifiées, composées d'un segment externe (physiologiquement une dendrite) et d'un segment interne (physiologiquement un axone). Il existe deux types : les bâtonnets et les cônes différents sur la base morphologique du segment externe.

- les cônes, responsables de la vision précise et de la vision des couleurs, sont situés au fond de la fovéa, située elle-même au niveau de la macula ;
- les bâtonnets, responsables de la vision grossière des formes et de la vision nocturne, sont répartis au sein de la rétine périphérique.

c - Les cellules de soutien de la rétine :

Il existe deux types de cellules de soutien de la rétine : les cellules de Müller et les astrocytes.

\* Les cellules de Müller, cellules de soutien et de cohérence, sont les plus grandes. Elles s'étendent, d'un côté, de la base de l'article interne du photorécepteur cellulaire, où elles sont liées entre elles par des jonctions adhérentes pour former la membrane limitante externe, de l'autre, à la surface de la rétine, où elles constituent la membrane limitante interne.

\* Les astrocytes agissent en cellules de soutien avec leurs longs prolongements qui forment une sorte d'échafaudage pour les délicates fibres nerveuses.

d - Les cellules nerveuses de la rétine :

La rétine contient de nombreuses classes de cellules nerveuses qui se connectent avec les cellules photoréceptrices et relient entre elles les différentes couches de la rétine. Elles comportent les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules interplexiformes.

\* Les cellules bipolaires relayent les signaux entre les cellules photoréceptrices et les cellules ganglionnaires.

\* Les cellules ganglionnaires envoient des axones depuis l'œil jusqu'au cerveau par le nerf optique.

Les cylindraxes de la couche des cellules ganglionnaires se réunissent pour former le nerf optique qui transmettra les informations visuelles au cerveau par l'intermédiaire d'un relais important situé dans le Corps Géniculé Latéral.

Les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules interplexiformes sont des neurones d'association qui modulent l'impulsion nerveuse issue des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires.

Les cellules horizontales sont responsables de la synapse "récepteurs-bipolaires".

Les cellules amacrines, sont responsables de la synapse "bipolaires-ganglionnaires".

### **B -Structure de la rétine :**

La rétine est une structure composée de dix couches organisées de la manière suivante (Stevens et Lowe, 1992) :

- L'épithélium pigmentaire
- La couche des photorécepteurs des bâtonnets et cônes suit directement la couche de l'épithélium pigmentaire de la rétine et correspond aux articles internes et externes des cellules photoréceptrices.
- La membrane limitante externe n'est pas une véritable membrane, mais une ligne composée des zones de jonctions adhérentes entre les cellules de Müller et celles des articles internes des cellules photoréceptrices.
- La couche nucléaire externe (ou couche granuleuse externe) contient les corps cellulaires des cellules photoréceptrices avec formation de 8-9 rangs de noyaux. Les noyaux des bâtonnets sont petits avec une chromatine dense, tandis que ceux des cônes sont plus gros avec une chromatine claire et quelques corps cellulaires des cellules de Müller.
- La couche plexiforme externe contient les prolongements cellulaires et les synapses entre cellules photoréceptrices, neurones bipolaires. En outre, elle contient les prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller et des cellules horizontales.
- La couche nucléaire interne (ou couche granuleuse interne) est composée des noyaux et des corps cellulaires des cellules bipolaires, des cellules horizontales, des cellules interplexiformes et des cellules amacrines ; elle contient également les noyaux de Müller.
- La couche plexiforme interne contient les prolongements cellulaires et les synapses des cellules bipolaires, des cellules amacrines, des cellules de Müller et des cellules ganglionnaires.
- La couche des cellules ganglionnaires est constituée d'un rang de cellules ganglionnaires avec de gros noyaux et nucléoles, et un réticulum endoplasmique rugueux se traduisant en microscopie optique par le corps de Nissl. Les cellules ganglionnaires adjacentes sont séparées par le cytoplasme des cellules ganglionnaires. Cette couche comporte,

également, les corps cellulaires des neurones multipolaires et ceux des cellules gliales.

- La couche des fibres du nerf optique est composée des axones non myélinisés des cellules ganglionnaires en route pour le système nerveux central via le nerf optique ; elle contient également des astrocytes. Dans cette couche, on trouve les pieds des cellules de Müller et les cellules gliales.
- La membrane limitante interne est une membrane basale à peine visible à l'interface entre le vitré et la rétine. Elle comporte l'extrémité des prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller.

Les cellules visuelles s'articulent avec un premier puis un deuxième neurone, la cellule ganglionnaire dont les axones (prolongement issu du neurone et assurant la conduction de l'influx nerveux) se regroupent au sein de la papille pour former le nerf optique. Les informations provenant de la rétine sont conduites au cerveau, au niveau du globe occipital, pour y être interprétées.

Les cellules microgliales siègent autour des capillaires.

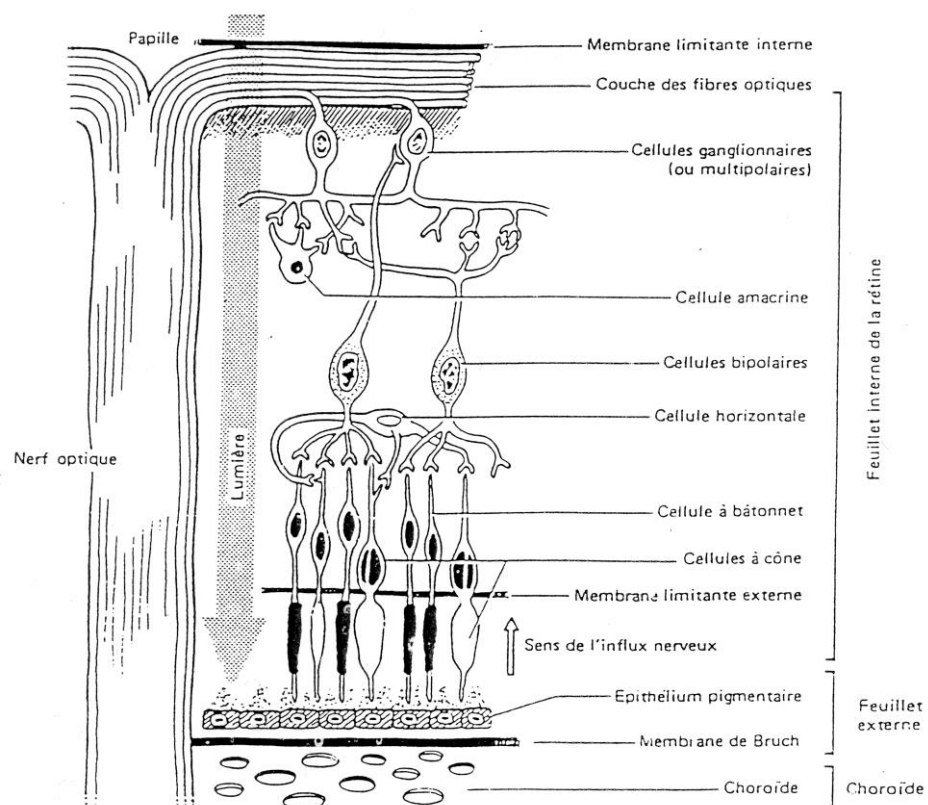


Figure 3 : Diagramme schématisant une coupe transversale au niveau de la rétine

## II. Uvéite :

Alors que les uvéites étaient imputées à la syphilis, la tuberculose et l'ophtalmie sympathique au début du siècle dernier, la réaction immunologique et l'auto-immunité ont été mieux prises en compte tout au long des années 1980 et certaines entités comme la maladie de Behçet, le syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, la rétinohoroidopathie de Birdshot et la sarcoïdose oculaire isolée ont ainsi gagné leurs lettres de noblesse. (Bodaghi et *al.*, 2004).

Définie comme une inflammation endoculaire, une uvéite peut être liée à une maladie générale ou constituer une entité isolée. L'intérêt majeur développé pour cette maladie est dû à ses complications pouvant être à l'origine d'une baisse de l'acuité visuelle voire la cécité (10 % aux USA, Caspi, 2001). Lorsque la démarche diagnostique est bien conduite, la cause d'une uvéite peut être identifiée dans 50% des cas et présumée chez 25 % des patients. Pour un quart des cas, l'origine de l'inflammation reste idiopathique (Brézin, 1999).

### II. 1. Définition :

L'uvéite est un terme générique englobant une multitude de maladies intraoculaires. Plus précisément, l'uvéite est l'inflammation de la tunique vasculaire de l'œil qui est le tractus uvéal. La continuité de cette tunique vasculaire et pigmentaire explique les diverses formes anatomiques et cliniques de cette affection

### II. 2. Classification :

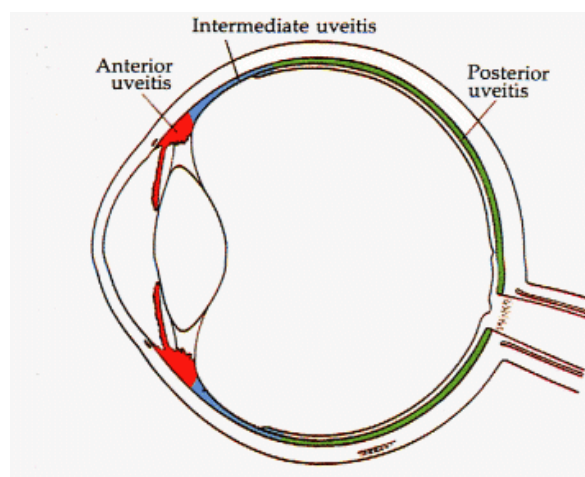


Figure 4 : Classification des uvéites selon les critères anatomiques

L'uvéite peut être classée de différentes manières : selon des critères cliniques, sémiologiques, topographiques ou étiologiques. Elle peut être considérée comme :

- antérieure, intermédiaire, postérieure ou panuvéite;
- aiguë ou chronique ;
- granulomateuse ou non (Flament, 2002).

La classification la plus utilisée actuellement reste la classification anatomique en association avec les deux secondes pour mieux décrire la maladie (illustrée dans la figure 4). Elle permet d'harmoniser les études internationales et le dialogue au sein de la communauté ophtalmologique. Elle a été élaborée par l'«International Uveitis Study Group» et repose sur le siège de l'inflammation oculaire (Bodaghi et *al.*, 2004). Les symptômes de l'uvéite sont, ainsi, variables selon que la forme soit aiguë ou chronique et selon la localisation de l'inflammation.

a- L'uvéite antérieure :

Elle représente 40 % des uvéites et touche les structures antérieures de l'œil : l'iris (iritis), le corps ciliaire (cyclite antérieure) ou bien les deux à la fois (iridocyclite). Cliniquement, elle se manifeste par une rougeur ciliaire périkératique, une douleur oculaire, une photophobie et par une baisse de vision d'importance variable, parfois très marquée.

L'iris est peu mobile, la pupille est resserrée (myosis). Des adhérences entre l'iris et le cristallin peuvent se former (synéchies irido-cristalliniennes) et gêner la dilatation de la pupille et donc l'examen du fond de l'œil. La pression intraoculaire est parfois élevée.

b- L'uvéite intermédiaire :

L'uvéite intermédiaire se traduit par un brouillard visuel et des mouches volantes. A l'examen, des cellules inflammatoires sont présentes dans le vitré antérieur et se déposent sur le pars plana. On retrouve parfois un exsudat inflammatoire appelé banquise qui recouvre le pars plana (pars planite). Il peut s'y associer des vascularites, un oedème papillaire ou un oedème maculaire inflammatoire. Celle-ci touche la chambre postérieure et donne lieu à une cyclite postérieure ou à une hyalite.

c- L'uvéite postérieure :

L'uvéite postérieure est cliniquement moins bruyante que l'uvéite antérieure mais ses conséquences fonctionnelles sont parfois très sévères. Cette atteinte touche la cavité vitréenne (la choroïde, la rétine et les vaisseaux

rétiniens); et, il en résulte fréquemment une inflammation du vitré (hyalite). Il peut s'y associer des vascularites (engainement inflammatoire autour des vaisseaux rétiniens), des foyers de rétinite, de choréïdite, de rétinohoréïdite, une papillite (oedème papillaire inflammatoire) et un oedème maculaire. L'uvéïte postérieure se traduit par un brouillard visuel et une baisse de l'acuité visuelle parfois très importante. Il n'y a ni rougeur ni douleur de l'oeil.

d- La panuvéïte ou uvéïte totale :

Elle touche toute l'uvéïte antérieure et postérieure et présente donc à la fois, les manifestations cliniques des différentes uvéïtes précédemment décrites.

### **II. 3. Etiologie :**

L'étiologie des uvéïtes est variée (tableau 1), même si une fois sur deux sa cause demeure inconnue. La figure 5 schématise une classification générale des uvéïtes selon leurs origines.

1/ Causes locales :

Les causes locales de l'uvéïte peuvent être soit un corps étranger intraoculaire profond méconnu, soit post- chirurgicales ou bien encore des symptômes de la maladie de Fuchs. Statistiquement, ses causes locales représentent 10% de l'étiologie des uvéïtes.

2/ Causes loco-régionales :

Les infections ORL ou dentaire de voisinage et l'ophtalmie «sympathique» sont des maladies qui provoquent l'uvéïte (20% des causes de l'uvéïte).

3/ Causes générales :

Les maladies générales représentent 30% des causes des uvéïtes. Elles sont variables et peuvent être subdivisées comme suit :

a / Causes infectieuses:

Les atteintes infectieuses (30%) causant des uvéïtes peuvent être de différents types :

- Virales: Herpès, Zona, CMV (SIDA).

- Bactériennes : Tuberculose, Syphilis, brucellose, leptospirose, lèpre,

- Parasitaires : dominées par la toxoplasmose, toxocarose (uvéïte postérieure avec chorioretinite) et candidose.

b / Causes rhumatologiques:

Un tiers des uvéïtes, causées par les maladies générales, est lié aux maladies rhumatologiques telles que : la spondylarthrite ankylosante avec HLA B27, le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter et la maladie de Still ou arthrite juvénile.

c/ Les autres maladies générales:

Elles représentent un tiers des causes des uvéïtes liées aux maladies générales. Quelques unes de ces maladies sont : la sarcoïdose, la maladie de Behçet et le Lymphome (uvéïte postérieure du sujet âgé)

4/ Idiopathique :

C'est la cause la plus fréquente. Environ 50% des uvéïtes ne font pas preuve de leur cause.

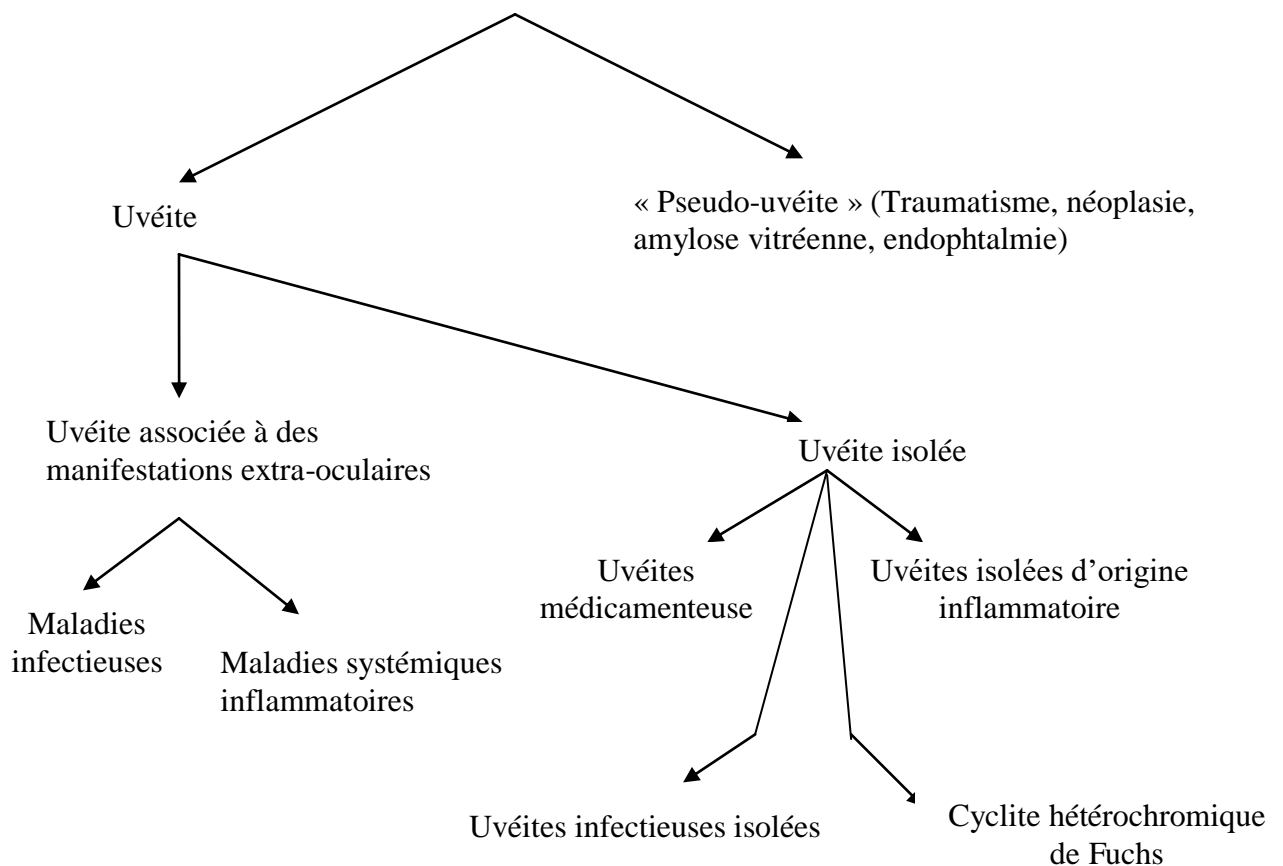


Figure 5 : Classification générale des uvéïtes (Brézin, 1999).



## II. 4. Critères diagnostiques :

Les méthodes moléculaires d'analyse appliquées aux liquides et tissus oculaires ont significativement amélioré le rendement du bilan diagnostique des uvéites. Ainsi, des critères de diagnostic de certaines maladies sont établis par des organisations reconnues mondialement tels que :

- Les critères de l'European Spondylarthropathy Study Group utilisés pour l'évaluation des uvéites de type B27,
- Les critères de l'International Study Group for Behçet's Disease utilisés pour le diagnostic de maladie de Behçet,
- Les critères établis par l'American Uveitis Society utilisés pour le diagnostic de syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada.

Selon Bodaghi et *al.* (2004), différentes techniques sont utilisées pour diagnostiquer la maladie, notamment :

- Le diagnostic bio-microscopique : Il est réalisé à la recherche d'une étiologie infectieuse surtout dans le cas de la cyclite hétérochromique de Fuchs et du syndrome de Posner-Schlossman.
- Le dosage d'interleukine-10 : Il se fait dans l'humeur aqueuse, en présence d'une hyalite dense et permet d'orienter le diagnostic différentiel vers un lymphome intraoculaire se manifestant comme une cyclite de Fuchs atypique (Cassoux et *al.*, 2003).
- Le test sérologique ELISA qui peut être complété par une recherche du coefficient de charge immunitaire et, dans le cas échéant, par une recherche du génome parasitaire par PCR chez l'immunodéprimé, pour confirmer le diagnostic d'une toxoplasmose.
- Une ponction de chambre antérieure permet de confirmer le diagnostic d'uvéites herpétiques par la présence du génome viral ou la production intraoculaire d'anticorps.
- L'analyse du vitré à la recherche de corps PAS positifs et la mise en évidence du génome bactérien sont appliquées au diagnostic de certaines uvéites bactériennes comme celles associées à la maladie de Whipple.

Certaines uvéites comme les uvéites granulomateuses chroniques imposent la réalisation d'un bilan plus large incluant l'intradermoréaction à la tuberculine, le dosage de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et du lysozyme sérique, la radiographie thoracique complétée le cas échéant par une tomodensitométrie thoracique, le lavage bronchoalvéolaire accompagné de biopsies bronchiques, voire la scintigraphie au gallium. La preuve histologique est nécessaire pour la confirmation diagnostique mais, en l'absence d'autres causes, en particulier infectieuses, le diagnostic d'uvéite sarcoïdique présumée pourrait être retenu.

Dans une étude antérieure, nous avons montré des profils cytokiniques différents au cours des uvéites Behçet et idiopathique. En effet, un profil mixte Th1/Th2 est caractéristique de l'uvéite Behçet alors que l'uvéite idiopathique

présente un profil Th1. Ce profil pourrait servir dans le diagnostic différentiel de l'uvéite Behçet (Guenane et *al.*, 2006).

## II. 5. Thérapie :

Le traitement de l'uvéite peut être symptomatique local, en faisant appel aux anti-inflammatoires et aux mydriatiques, ou bien général, en utilisant la corticothérapie pour les patients atteints d'uvéites non infectieuses. Cette dernière thérapie est efficace, mais des doses élevées et prolongées peuvent causer de sérieux effets secondaires systémiques. L'immuno-suppression vient en relais dans le cas des patients atteints de formes sévères d'uvéites et qui présentent une cortico-dépendance ou d'une corticorésistance (Nussenblatt, 1990; Bodaghi et *al.*, 2004). Les agents les plus connus sont la cyclosporine et le Tacrolimus (FK 506) (Oh-i, 2007). Récemment, l'injection intravitréale de l'acétate de triamcinolone a montré un effet bénéfique sur les patients (Sujita, 2007).

De nouvelles biomolécules sont commercialisées. Entre autres, l'IFN- $\alpha$ 2a est utilisé chez les sujets atteints d'uvéite sévère liée à la maladie de Behçet (Kötter, 2004 ; Bodaghi et *al.*, 2006) et l'anti-TNF-  $\alpha$ , très efficaces pour les uvéites de type Behçet (Rosenbaum et Smith, 2002 ; Lindsted et *al.*, 2005 ; Vazquez-Cobian et *al.*, 2006 ; ISICR, 2006) et ont montré leur efficacité thérapeutique lors des uvéites liées à l'arthrite idiopathique juvénile (Vazquez-Cobian et *al.*, 2006) avec un taux de 81 % et un taux de 88 % pour les uvéites isolées (Biester, 2007) avec des effets secondaires moindres (Mansour, 2007).

Toutefois, la thérapie de l'uvéite peut être étiologique chaque fois que le bilan met en évidence une origine possible (antibiothérapie). Le recours à la chirurgie n'est nécessaire que lors de complication de l'uvéite ou de son traitement (Flament, 2002).

## II. 6. L'uvéite expérimentale auto-immune (EAU) :

L'uvéite expérimentale auto-immune (EAU) est une maladie auto-immune véhiculée (médiée) par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Elle touche surtout la rétine neuronale et sert de modèle pour une série de maladies auto-immunes humaines entre autres l'uvéite auto-immune. Le rôle des antigènes oculaires dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'œil a été étudié dès le début du siècle dernier, mais ce n'est qu'à partir de 1965 que Wacker et Lipton ont pu démontrer qu'un homogénat de rétine de cobaye émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund (CFA) est une source tissulaire hautement efficace pour l'induction de EAU. Depuis, de nombreux antigènes oculaires induisant l'EAU chez les animaux du laboratoire (Caspi, 2006)(rat, souris, cobaye et primates autres que l'homme) ont été identifiés à travers les années, utilisant

comme matériel initial les extraits rétiens bovins. Ultérieurement, les gènes de ces antigènes ont été clonés à partir d'une variété d'espèces puis caractérisés. Leurs fragments pathogéniques sont, à l'heure actuelle, identifiés et quelques uns d'entre eux sont industriellement produits. Les mieux connus sont :

- L'Antigène S (Ag-S), une protéine intracellulaire de 48 kDa qui participe dans la phototransduction ;
- L'Interphotoreceptor Retinoid- Binding Protein (IRBP), une protéine de la matrice extracellulaire de 140 k Da qui transporte les dérivés de la vitamine A entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (Saari et *al.*, 1985 ; Liou et *al.*, 1989).
- La rhodopsine et sa forme active, l'opsine, un pigment visuel se trouvant au niveau des bâtonnets ayant un poids moléculaire de 40 k Da ;
- La recoverine, une protéine liant le calcium de 23 k Da ;
- La phototransducine, une phosphoprotéine cytosolique des photorecepteurs de 33 k Da.

Il existe beaucoup de similarités entre l'uvéite clinique humaine et l'EAU, mais cette dernière diffère par le fait qu'elle se limite d'elle-même, et nécessite un adjuvant pour induire la maladie. Typiquement, dès les 9-14 jours, les yeux deviennent infiltrés de cellules inflammatoires et des altérations des photorécepteurs s'ensuivent. L'EAU peut être induite par transfert adoptif de cellules T à partir d'animaux immunisés vers des animaux naïfs, hôtes génétiquement compatibles. La pathologie résultante à partir d'un transfert adoptif de cellules effectrices primées est essentiellement identique à celle induite par une immunisation active (Gregerson et *al.*, 1986 ; Caspi et *al.*, 1986 ; Chan et *al.*, 1998).

Les lésions retrouvées au cours de l'EAU incluent le détachement rétinien, l'invasion lymphocytaire, les altérations des photorecepteurs, la vascularite, la rétinite, la chorioidite et la vitrétite.

L'atteinte expérimentale ne peut être induite que chez les lignées animales sensibles (Sun et *al.*, 1998 ; Pennesi et Caspi, 2002). Les lignées EAU- sensibles sont génétiquement programmées pour être des répondeurs Th1 dominants. Les souches résistantes sont soit des répondeurs Th2 soit des répondeurs Th1 à bas niveaux sans évidence à être ouvertement Th2.

L'EAU est un modèle représentatif pour la compréhension de la physiopathologie de l'uvéite postérieure et de ses mécanismes immunitaires en vue de tester les modalités thérapeutiques précliniques.

Dans les modèles expérimentaux, les cellules T uvéitogéniques spécifiques à l'Ag-S peuvent adoptivement transférer l'EAU chez des receveurs naïfs et sont des cellules effectrices de phénotypes Th1 produisant de grandes quantités de IFN- $\gamma$  (Chan et *al.*, 1988), considérées comme cytokines Th1, et de faibles

quantités de Il-4 et Il-5, considérées comme cytokines Th2. Les populations de cellules T qui sont isolées à partir d'animaux EAU- résistants et produisant de petites quantités de IFN-  $\gamma$ , peuvent être converties en pathogénique, phénotype produisant de l' IFN-  $\gamma$ , par culture en présence d'Il-12 (Caspi, 2002).

Tableau 1 : Etiologie des uvéites (Brézin, 1999).

<b>Etiologie des uvéites</b>
<b>Uvéites habituellement associées à des manifestations extra- ophtalmologiques</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladies infectieuses : <ul style="list-style-type: none"> <li>◇ Infections bactériennes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tuberculose</li> <li>- Lèpre</li> <li>- Syphilis</li> <li>- Maladie de Lyme</li> <li>- Leptospirose</li> <li>- Maladie de Whipple</li> <li>- Brucellose</li> <li>- Rickettsioses</li> <li>- Chlamydioses</li> <li>- Maladie des griffes du chat</li> </ul> </li> <li>◇ Infections parasitaires <ul style="list-style-type: none"> <li>- Onchocercose</li> </ul> </li> <li>◇ Infections virales <ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus de la famille de l'herpès : le plus souvent symptomatologie oculaire isolée.</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Affections d'origine inflammatoire <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uvéites associées à l'HLA-B27</li> <li>- Entéocolopathies inflammatoires chroniques</li> <li>- Sarcoidose</li> <li>- Maladie de Behçet</li> <li>- Maladie de Vogt- Koyanagi- Harada</li> <li>- Sclérose en plaques</li> <li>- Arthrite chronique juvénile</li> <li>- Syndrome de néphrite tubulo-interstitielle aigüe et uvéite</li> </ul> </li> </ul>
<b>Uvéites habituellement non associées à des manifestations systémiques</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uvéites isolées d'origine infectieuse</li> <li>◇ Uvéites isolées d'origine parasitaire <ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxoplasmose oculaire</li> <li>- Toxocarose oculaire</li> </ul> </li> <li>◇ Uvéites isolées d'origine mycotique <ul style="list-style-type: none"> <li>- Histoplasmose présumée</li> </ul> </li> <li>◇ Uvéites isolées d'origine virale <ul style="list-style-type: none"> <li>- Segment herpétique</li> <li>- Uvéite antérieure associée au virus varicella- zona</li> <li>- Nécrose rétinienne aigüe</li> <li>- Uvéite associée à HTLV-1 (human T lymphotropic Virus type 1)</li> </ul> </li> <li>◇ Uvéites isolées d'origine inflammatoire <ul style="list-style-type: none"> <li>- Segment antérieur <ul style="list-style-type: none"> <li>Uvéite phaco-antigénique</li> <li>Syndrome de Posner Schlossman</li> </ul> </li> <li>- Uvéite intermédiaire idiopathique, Pars planite.</li> <li>- Segment postérieur</li> </ul> </li> </ul>

<p>Choriïorétinopathie de type <i>birdshot</i> Epithéliopathie en plaques Choriïdite serpiginieuse Ophtalmie sympathique Choriïdite multifocale Syndrome des tâches blanches évanescents Aures causes rares d'uvéïte postérieure Uvéïtes complicant les dégénérescences tapéto-rétiniennes</p> <p>Cyclite hétérochromique de Fuchs Uvéïtes médicamenteuses Uvéïtes induites par la rifabudine Uvéïtes et collyres <math>\beta</math>- bloquants Autres uvéïtes médicamenteuses</p>
<b>Uvéïtes associées aux sclérites</b>
<b>Pseudo-uvéïtes</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Traumatismes, corps étranger intra-oculaire<ul style="list-style-type: none"><li>- Pathologie tumorale<ul style="list-style-type: none"><li>Rétinoblastome</li><li>Lymphomes endoculaire</li><li>Manifestations oculaires des leucémies aigües</li><li>Mélanome malin de la choroïde</li></ul></li><li>- Amylose vitréenne</li><li>- Endophtalmies<ul style="list-style-type: none"><li>Endophtalmie chronique</li><li>Endophtalmies mycotiques</li></ul></li></ul></li></ul>

### III. Antigène S :

L'antigène S (ou l'arrestine visuelle), nommé également « Protéine 48 kDa », est une protéine soluble faisant partie d'une famille de six membres distribués à travers le corps. Cependant, l'arrestine visuelle est caractéristique des photorécepteurs rétiniens et de leurs équivalents dans l'épiphyse (Donoso et *al.*, 1985). La famille des arrestines montre un haut degré d'homologie. Cinq domaines de la séquence protéique sont conservés à travers tous ses membres.

L'antigène S est présent chez tous les vertébrés. Il est retrouvé aussi dans les photorécepteurs de divers invertébrés (Mirshohi et *al.*, 1985, De Kozak et Faure, 2000). Il est impliqué dans le contrôle de l'activité de la phosphodiesterase GMP dépendante dans les bâtonnets de la rétine, et il se lie à la rhodopsine phosphorylée photoactivée.

L'antigène S est l'antigène rétinien le plus apte à initier une réaction inflammatoire auto-immune au niveau des yeux. Il est aussi connu pour sa capacité d'induire l'uvéite expérimentale auto-immune.

#### III. 1. Structure moléculaire :

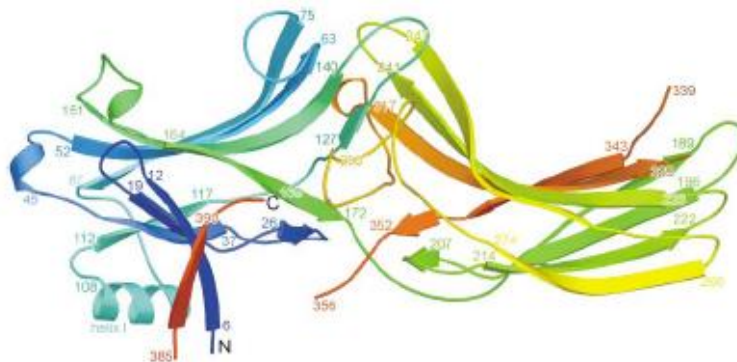


Figure 6 : Structure de l'antigène S (Han et *al.*, 2001)

L'antigène S est une protéine hydrophile formée d'une seule chaîne d'acides aminés, d'un poids moléculaire apparent de 48 kDa par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Toutefois, les valeurs de poids moléculaire varient de 43 à 55 kDa et dépendent des techniques de détermination utilisées (De Kozak et Faure, 2000).

L'antigène S rétinien humain a été isolé, purifié et caractérisé (Beneski et *al.*, 1984) et son gène a été déterminé (Yamaki et *al.*, 1990). La séquence complète en acides aminés de l'antigène S bovin ainsi que sa structure primaire et secondaire ont été déterminées par le cDNA et le séquençage partiel des acides

aminés a montré qu'il y avait 1623 paires de bases (cDNA) codant pour 404 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 45.275 Da (Shinohara et *al.*, 1987). L'analyse des carbohydrates suggère la présence d'au moins 4 moles de résidus glucidiques / mole d'Ag-S, ce qui explique les estimations différentes du PM (Shinohara et *al.*, 1987). Le tableau 2 montre une comparaison entre l'antigène S humain et l'antigène S bovin.

Cette séquence est remarquablement conservée au cours du développement phylogénétique des organes visuels (Mirshohi et *al.*, 1985). En effet, il existe 97% d'homologie de séquence entre celle du rat et celle de la souris et 81% entre celle du bœuf et celle de l'humain (De Smet et Chan, 2001). Par ailleurs, l'antigène S présente plusieurs homologies avec la sous unité alpha de la transducine (Shinohara et *al.*, 1987) et avec d'autres protéines G (De Kozak et Faure, 2000). Il présente également des homologies structurales avec les séquences amino-peptidiques de l'ADN polymérase du virus de l'hépatite B, la polyprotéine de gag-pol du virus endogène du babouin et celle du virus de la leucémie AKV murine (Singh et *al.*, 1990).

Les structures tertiaire et quaternaire de l'arrestine ont été étudiées par cristallographie à rayons X à haute résolution (Imamoto et *al.*, 2003). L'arrestine cristallise pour former un unique tétramère. Ce dernier est composé de deux dimères asymétriques. Chacun d'eux est composé de deux monomères d'arrestine. Le monomère de l'arrestine comprend deux domaines, dont chacun est composé de sept feuillets  $\beta$  (figure 6). Il possède une longue chaîne du côté C-terminal, très flexible, agissant avec une région charnière et un autre domaine du côté N-terminal. La forme dimérique de l'Ag-S est la forme inactive de la protéine alors que la forme monomérique est active. Le tétramère de l'arrestine pourrait avoir un rôle physiologique dans les conditions de photoexcitation.

L'utilisation de l'antigène- S, purifié et traité à pH 4 ou bien exposé à une forte chaleur (100°C) chez des cobayes, a montré que ce traitement réduisait largement son action pathogène vis-à-vis de l'uvéite (Kalsow et Wacker, 1988). Quelques épitopes sont spécifiques à l'antigène S bovin, alors que d'autres sont communs à l'antigène S de divers mammifères (Mirshohi et *al.*, 1985). Des anticorps anti-antigènes S ont été retrouvés dans les sérums d'animaux atteints d'uvéite expérimentale auto-immune et chez les patients atteints d'uvéite (Gregerson et Abrahams, 1983).



	Humain	Bovin
Poids moléculaire (HPLC)	48.000	ND
Poids moléculaire (PAGE)	52,000	50,500
Point isoélectrique (pI)	5,7	5,5
Absorption (Maximum)	280	280
Carbohydrates	(-)*	(-)
Acide sialique	(-)	(-)
Lipides	ND↑	4 nMoles/ mg
Groupes sulfhydryal libres	(-)	ND
Volume spécifique	.723	.741
Localisation	Cellules photoréceptrices	Cellules photoréceptrices

(-)\* : non détecté ; ND↑ : non déterminé.

Tableau 2 : Quelques propriétés physico-chimiques de l'antigène S (Beneski et al, 1984)

### III. 2. Localisation :

L'antigène S est présent dans les quatre compartiments des cellules photoréceptrices de la rétine: segment externe, segment interne, corps cellulaire et pédicule synaptique. Sa concentration est estimée à 2–8 mg/ml (Imamoto et *al.*, 2003).

Les résultats contradictoires sur l'abondance de l'arrestine au niveau des segments externes par rapport aux autres compartiments des photorécepteurs tendent à démontrer que cette localisation est influencée par la lumière (Mc Kechnie et *al.*, 1986 ; Philp et *al.*, 1987 ; De Kozak et Faure, 2000). Dans l'obscurité, l'immuno réactivité de l'arrestine est intense dans le segment interne et les compartiments plus profonds de la cellule, mais elle est absente du segment externe. Peu après l'exposition de l'animal à la lumière, l'arrestine apparaît dans le segment externe, et l'intensité du marquage diminue fortement dans les autres compartiments. Après exposition à la lumière, l'immuno réactivité Ag S est observée dans les cellules de l'épithélium pigmenté, la membrane de Bruch et les cellules endothéliales de la choriocapillaire, suggérant un transport de l'Ag S ou de ses fragments à la circulation choroïdienne (De Kozak et Faure, 2000).

L'arrestine a été observée non seulement dans les bâtonnets, mais également dans les cônes, grâce à des examens immuno-histochimiques utilisant l'anticorps S8D8 (Mirshohi et *al.*, 1985).

Les travaux de Breitman et son équipe (1991) ont mis en évidence la présence de l'Ag-S dans d'autres tissus que la rétine, tel que le cristallin, le cortex cérébral et le cervelet, ainsi que dans la glande pinéale. D'autres travaux ont mis en évidence la présence de l'Ag-S dans l'épithélium de l'iris et l'épithélium non pigmentaire ciliaire (Bertazolli-Filho et *al.*, 2001; Ghosh et *al.*, 2004).

### III.3. Rôle physiologique :

L'antigène S est une protéine régulatrice de la phototransduction. Elle se lie à la rhodopsine photoexcitée et bloque l'activation de la phosphodiesterase du GMP cyclique d'où le nom d'arrestine visuelle. La présence de cette dernière dans l'ensemble de la cellule photoréceptrice, y compris la région synaptique, et dans l'épiphyse non photosensible, suggère toutefois que l'Ag S pourrait exercer aussi d'autres fonctions (Sommer et Farrens, 2006).

Dans l'obscurité, les cellules photoréceptrices sont dépolarisées. La rhodopsine, pigment photosensible se trouvant dans les disques des cellules photoréceptrices, est constituée d'une apoprotéine, l'opsine (récepteur à sept domaines transmembranaire couplé à une protéine G : transducine), liée de manière covalente à un chromophore : le 11-*cis* rétinol. L'excitation lumineuse de la rhodopsine induit l'isomérisation du 11-*cis* rétinol en *all-trans* rétinol. Cette réaction conduit à la formation de la Méta II rhodopsine ou R\*, produit catalysant l'activation de la transducine. A son tour, cette dernière conduit à l'activation de la phosphodiesterase qui hydrolyse le GMPc. La diminution intracellulaire de GMPc induit la fermeture des canaux GMPc dépendante avec l'arrêt de l'entrée des ions sodiques et des ions calciques, provoquant ainsi, une hyperpolarisation des cellules photoréceptrices (Molday, 1998). L'état initial (obscurité) retrouvé, la cascade visuelle est arrêtée par l'inactivation de la rhodopsine via l'action de la rhodopsine kinase (phosphorylation ATP dépendante du domaine C terminal) (Palczewski et al., 1991; Mc Dowell et al., 1993) suivie par une liaison ultérieure à l'arrestine de façon compétitive (Krupnick et al., 1997 ; Kisselev et al., 2004) comme illustré dans la figure 8,.

### III .4. Rôle physiopathologique :

Des données récentes ont montré l'association de mutations géniques critiques au niveau du gène de l'arrestine avec la maladie de Oguchi chez des patients japonais. Ces mutations sont au niveau de : Asn 309 (délétion d'une paire de base), Arg175 (création d'un codon stop) et Arg292 (création d'un codon stop) (Nakamura et al., 2004). Les travaux de Hao et ses collaborateurs (2002) sur des souris transgéniques déficientes en antigène S exposé longtemps à la lumière ont montré que ces souris étaient sujettes à une dégénérescence rétinienne.

La maladie de Eales est aussi une maladie où l'arrestine jouerait un rôle dans son étiopathogénèse (Saxena et al., 1999).

Trois sites des antigènes S bovin et humain ont été identifiés comme immuno -pathogéniques chez le rat Lewis et sont : le peptide **303-320 (peptide M)**, le peptide **286-297 (peptide N)**, tous deux **non dominants**, et le peptide **343-362 (peptide G)** qui a des caractéristiques **immunodominantes** (Singh et

*al.*, 1999)(figure 7). Les séquences peptidiques M et N sont adjacentes sur l'antigène -S bovin (Singh *et al.*, 1988) (tableau 3).

Les résultats trouvés par Singh et ses collaborateurs (1988) suggèrent que le peptide N bovin possède des déterminants qui induisent la prolifération des lymphocytes ainsi que l'uvéitogénicité.

L'antigène S a également été impliqué dans la physiopathologie des uvéites humaines. En effet, plusieurs équipes de recherches ont montré la présence de nombreux déterminants antigéniques reconnus au cours de plusieurs pathologies oculaires (Hirose *et al.*, 1990, Kurhan-Yavuz *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2004) entre autres la maladie de Behçet et la sarcoïdose (De Smet et Dayan, 2000, De Smet *et al.*, 2001).

Numéro de la séquence	Composition en acides aminés
51-70	VDPDLVKGKKVYVTLTCAFR
181-200	VQHAPLEMGPQPRAEATWQF
191-210	QPRAEATWQFFMSDKPLHLA
251-270	VVLYSSDYVVKPVAMEEAQE
270-289 <sup>b</sup>	PNSSLTKTLTLVPLLANNRE
286-305	LLANNRERRGIALDGKIKHE
306-325	DTNLASSTIIKEGIDRTVLG
339-352	LGELTSSEVATEVP
352-364 <sup>c</sup>	PFRLMHPQPEDPD

<sup>a</sup> Basée sur des séquences humaines.

<sup>b</sup> Séquences bovines.

<sup>c</sup> C'est la séquence la plus immunopathogénique.

Tableau 3 : Les séquences pathogéniques de l'Ag-S (De Smet et Chan, 2001).

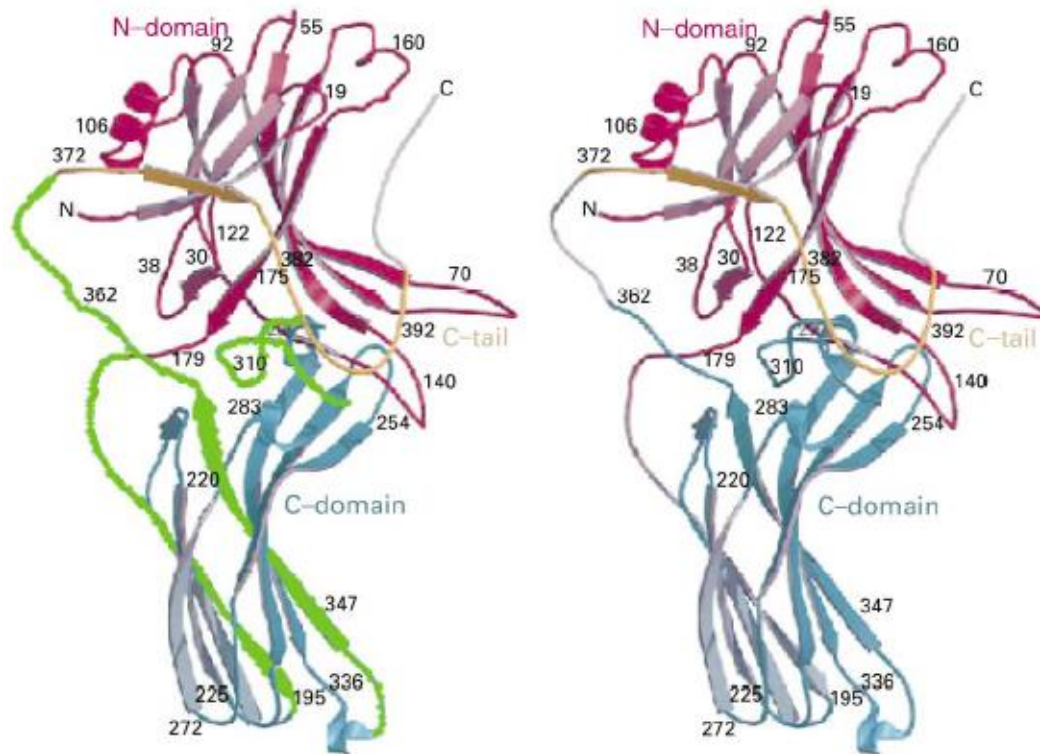


Figure 7: Structure de l'antigène S indiquant, en vert, les sites immunopathogéniques situés du côté C-terminal de la protéine (De Smet et Chan, 2001).

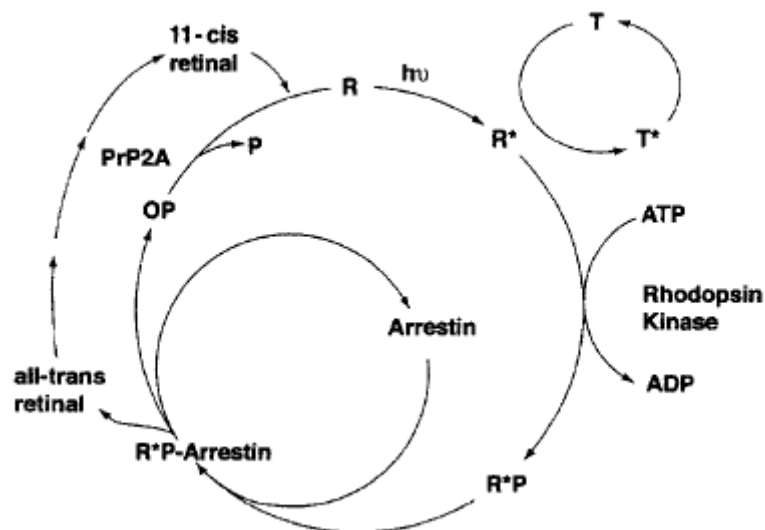


Figure 8 : Cycle de la rhodopsine et action de l'arrestine. Rhodopsine (R), Transducine (T), Opsine phosphorylée (OP), Rhodopsine kinase (PrP2A) (Hargrave, 2001)

## IV. Le monoxyde d'azote (NO):

Avant sa découverte comme produit de métabolisme cellulaire mammalien, le NO était initialement identifié comme un gaz toxique de l'environnement, mutagénique et carcinogène. Les travaux de Furchgott et Zawadski en 1980 sur le système vasculaire, ont montré que l'action vasodilatatrice de l'acétylcholine sur les vaisseaux requiert la libération, par les cellules endothéliales qui tapissent ces vaisseaux, d'un facteur myorelaxant. Celui-ci, baptisé EDRF (Endothelial Derived Relaxing Factor), agit sur les muscles lisses en activant une enzyme, la guanylate cyclase soluble, induisant ainsi une augmentation de concentration intracellulaire de GMPc qui servirait à son tour de second messenger diffusant à l'intérieur de la cellule le message extérieur apporté par EDRF. En 1987, l'EDRF a été identifié par l'équipe de Moncada comme étant le NO et en 1992, le NO a été consacré molécule de l'année par la revue Science (Crépel et Lemaire, 1995).

Produit par les cellules mammifères à des concentrations et durant des temps appropriés, le NO agit comme une molécule clé de signalisation dans des processus physiologiques aussi divers que l'immunité, la communication neuronale et la régulation vasculaire. D'autre part, un excès ou un dérèglement de la synthèse du NO est impliqué comme une cause directe engendrant aux conditions physiopathologiques comprenant des maladies chroniques et des maladies létales touchant l'homme telles que le choc vasculaire, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'arthrite, l'apoplexie et l'inflammation chronique. Contrairement aux molécules biosignalétiques conventionnelles agissant par liaison à des molécules réceptrices spécifiques, le NO manifeste ses actions biologiques à travers une large gamme de réactions chimiques.

Le NO est un radical libre qui diffuse facilement dans les cellules et les membranes cellulaires où il réagit avec les molécules cibles. Ces réactions précises dépendent de sa concentration finale et souvent des variations subtiles dans la composition du milieu intra et extracellulaire.

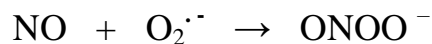
### IV.1. Les propriétés physico-chimiques :

Le monoxyde d'azote est un radical diatomique, libre, se présentant sous forme gazeuse à température et à pression ambiante. Sa solubilité dans l'eau est de l'ordre de celle de l'oxygène (solution saturée à 2-3 mM, 20°C, 1 atm). C'est une molécule non-polaire (charge nulle), qui diffuse rapidement à travers les membranes du fait de son caractère lipophile. Dans les milieux biologiques, le NO réagit fortement avec son environnement, d'où sa durée de vie courte (quelques secondes : demi-vie = 6 à 60 sec) et sa capacité de diffusion estimée à quelques fractions de millimètres. Des simulations cinétiques et de diffusion ont montré que, si  $t_{1/2} = 4$  s, la concentration de NO est non négligeable à plus de

huit diamètres cellulaires de sa source de production (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998). La stabilité du NO dépend de sa concentration (physiologique : 1-50 nM), du statut redox du système (par formation des espèces réactives à l'oxygène), et de la concentration de ses molécules et métaux cibles.

Le NO a un électron libre, sa perte génère le cation nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) et l'addition d'un électron forme l'anion nitroxyl ( $\text{NO}^-$ ). Suivant l'environnement, il sera oxydant ou réducteur. Ainsi, le NO possède une grande réactivité avec l'oxygène, le superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), les dérivés de l'azote et les métaux de transition.

Par ailleurs, le NO réagit avec le radical  $\text{O}_2^-$  donnant lieu à un intermédiaire instable, l'anion peroxydrite  $\text{ONOO}^-$ , en conséquence à une diffusion proximale des deux composés selon la réaction suivante (Gross et Wolin, 1995; Fukuto et Ignarro, 1997 ; Groves et Wang, 2000) :



Cette réaction est prédominante dans les cellules où sont produits simultanément le NO et le  $\text{O}_2^-$  comme dans les conditions inflammatoires. Le  $\text{ONOO}^-$  est un composé hautement réactif qui a une demi-vie de moins d'une seconde dans les conditions biologiques normales en raison de son équilibre avec l'acide peroxydriteux  $\text{ONOOH}$ . Le  $\text{ONOO}^-$  est un générateur de radical  $\text{OH}^-$  qui est un puissant oxydant.

#### IV.2. Les cibles cellulaires du NO :

Toutes les cellules sont sensibles à l'action du NO et sont une cible physiologique potentielle de ce dernier. Ainsi, il agit via les protéines, les lipides et l'ADN.

Le NO est capable de réagir avec les groupements thiols (R-SH) pour donner des S-nitroso-thiols (RSNO). Les S-nitrosothiols peuvent être formés, en particulier, au niveau des protéines tissulaires ou sanguines portant un groupement thiol (exemple : glutathion, hémoglobine, sérum albumine) et peuvent servir de substitut de NO ou de réservoir de NO (Davis et *al.*, 2001).

Une autre cible moléculaire du NO est celle des métaux, et plus précisément, les métalloprotéines (métaux de transition  $\text{Me}^+ / 2^+$ ). Ainsi, le NO réagit avec les hémoprotéines (hémoglobine, guanylate cyclase, prostaglandine H synthase), les protéines impliquées dans le métabolisme de l' $\text{O}_2$  et de  $\text{O}_2^-$  (comme : la superoxyde dismutase à Cu-Zn, à fer, à Mn). La formation de liaison de coordination entre le NO et le centre métallique de ces protéines conduit à des modifications réversibles de leurs propriétés les conduisant ainsi, dans certains cas, d'un état inactif vers un état actif (cas de la guanylate cyclase). Dans d'autres cas, les modifications peuvent conduire à des altérations de la fonction (Groves et Wang, 2000).

Le NO promouvoit, également, l'activation de l'ADN méthyle transférase ainsi que la déamination de la 5-méthylcytosine, avec pour conséquence, la formation de résidus thymidine (Kim et *al.*, 2001). La réaction de déamination induit aussi la cassure de brin d'ADN. Certains produits d'oxydation du NO ont le pouvoir de réagir avec les amines et causer leur nitrosation (formation de nitrosamines qui sont des acides nucléiques modifiés).

La toxicité du NO est médiée principalement par le  $\text{ONOO}^-$  et son acide (figure 9). Ces derniers oxydent les résidus thiol en acide sulfonique, et peuvent nitrater les peptides et les protéines sur les résidus tyrosine et tryptophane sur leur chaîne du côté de la chaîne phényle (Drapier et *al.*, 1996 ; Lamattina et *al.*; 2003).

Sur le plan physiologique, le NO à faibles concentrations, agit sur les processus de transduction du signal en activant ou inhibant des protéines via sa liaison avec leur hème ou leur groupement thiol. De plus, il intervient dans divers mécanismes cellulaires tels que la transcription, le métabolisme énergétique, la synthèse d'ADN, et la libération de fer (figure 10).

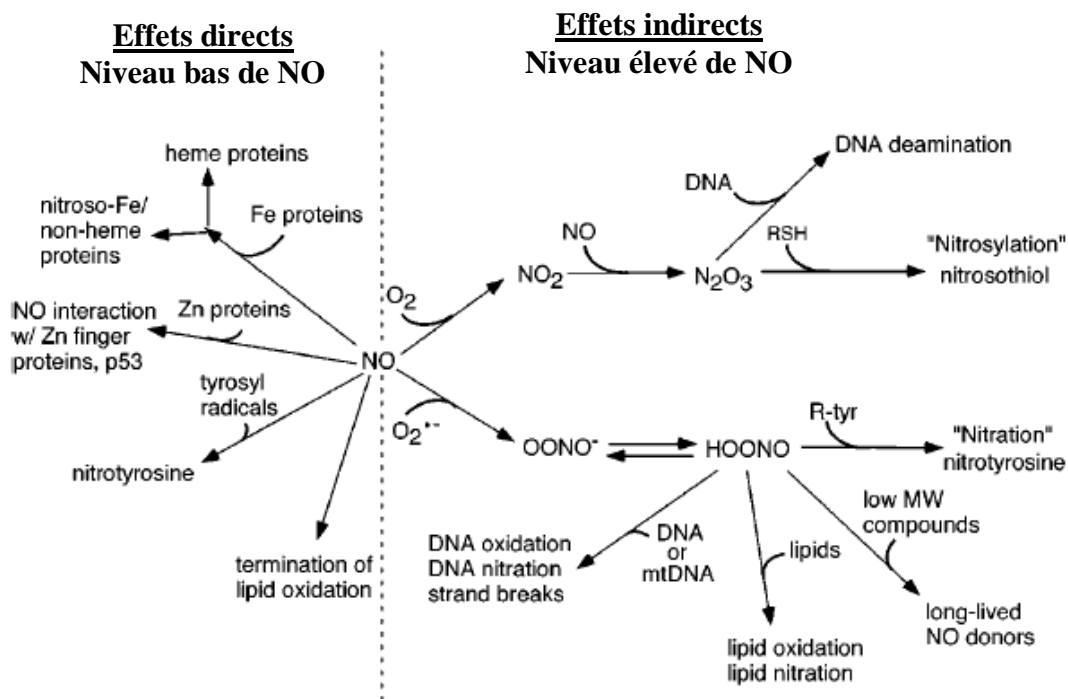


Figure 9 : Schéma global des effets directs et indirects du NO dans la cellule (Davis *et al.*, 2001).

*Effets de NO en tant que messager physiologique et agent cytotoxique*

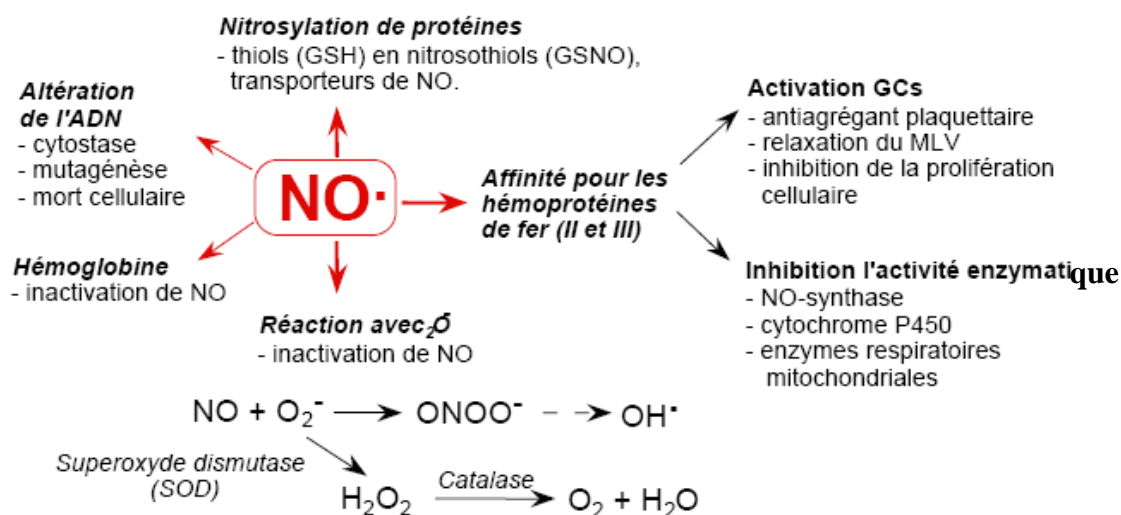


Figure 10 : Cibles moléculaires et cellulaires du NO.



### IV.3. Les NOSynthases :

Chez les mammifères, le NO est essentiellement synthétisé par un groupe d'enzymes nommé NOSynthases (EC1.14.13.39). Ces dernières oxydent la L-Arginine en L- Citrulline avec formation de NO (figure 12).

La famille des NOS compte jusqu'à aujourd'hui 3 principales isoformes : la NOS neuronale (nNOS) ou la NOS 1, la NOS inductible (iNOS) ou la NOS 2 et la NOS endothéliale (eNOS) ou la NOS 3. Chacune a été purifiée à partir de nombreux tissus et leurs ADNc clonés chez l'homme. Leur localisation cellulaire diffère selon l'isoforme considérée : La nNOS et la iNOS sont prédominantes sous forme d'enzymes solubles alors que la eNOS se retrouve sous forme de particules à 90 % (Tuteja et *al.*, 2004).

Les différences majeures entre ces isoformes sont leur mode d'expression (les NOS 1 et 3 sont constitutives (cNOS), la NOS2 est inductible) et la régulation des NOS 1 et 3, mais pas de la NOS 2, par la concentration en ions calcium. Ainsi, les c NOS produisent rapidement de faibles quantités de NO en réponse à une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (min) alors que la iNOS produit 1000 fois la quantité de NO que celle produite par les cNOS après leur induction.

En revanche, les NOS possèdent la même structure générale (voir annexe 1). En effet, ces enzymes dimériques sont composées de 2 sous unités identiques de poids moléculaire compris entre 130 et 150 Da. Elles possèdent 2 domaines catalytiques : un domaine N- terminal oxygénase et un domaine réductase C-terminal. Le domaine oxygénase contient les sites de liaison à la L- Arg, hème et BH4, alors que le domaine réductase possède les sites de liaisons aux FAD, FMN, et NADPH. Ces 2 sites catalytiques sont reliés par un site de liaison à la calmoduline. Les flavines médient le transfert des électrons à partir du NADPH au fer de l'Hème provoquant la production du NO via l'oxydation de la L- Arg en L- Cit.

Les NOS sont des dioxygénases utilisant l'oxygène moléculaire et le  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) pour transformer la L- Arg en L-Cit plus le NO (figures 11 et 13). La BH4 est un cofacteur clé pour toutes les NOS (Stuher, 1997; Groves et Wang, 2000 ; Gorren et *al.*, 2006) et en son absence, la NOS produit des superoxydes à la place du NO (Guzik et *al.*, 2003 ). Dans les conditions limitantes de concentrations de BH4 et de L-Arg, en présence de calmoduline, la NOS utilise le NO comme accepteur final de l'oxygène, et consomme du NADPH pour produire des anions superoxydes. Ces derniers, réagissant avec le NO, produisent de grandes quantités d'oxydes de nitrogène qui sont extrêmement réactifs et potentiellement toxiques (Gross et Wolin, 1995).

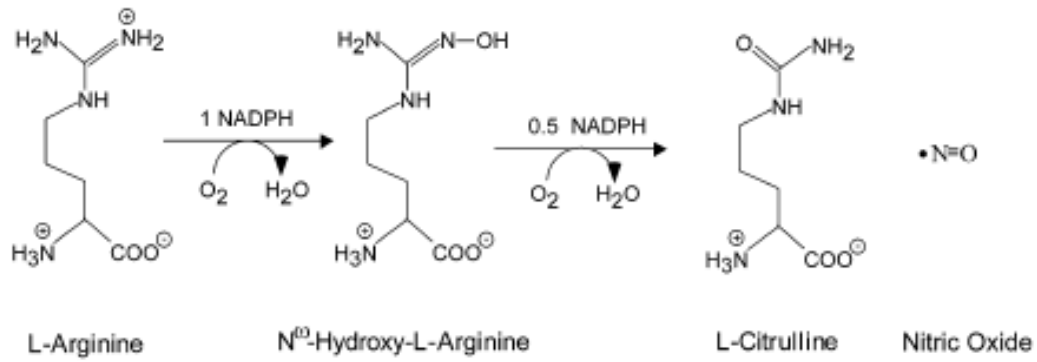


Figure 11: La réaction de synthèse du NO (Wei et al., 2003).

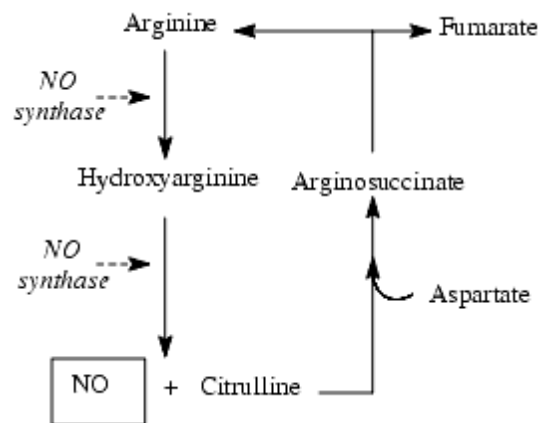


Figure 12 : le cycle du NO

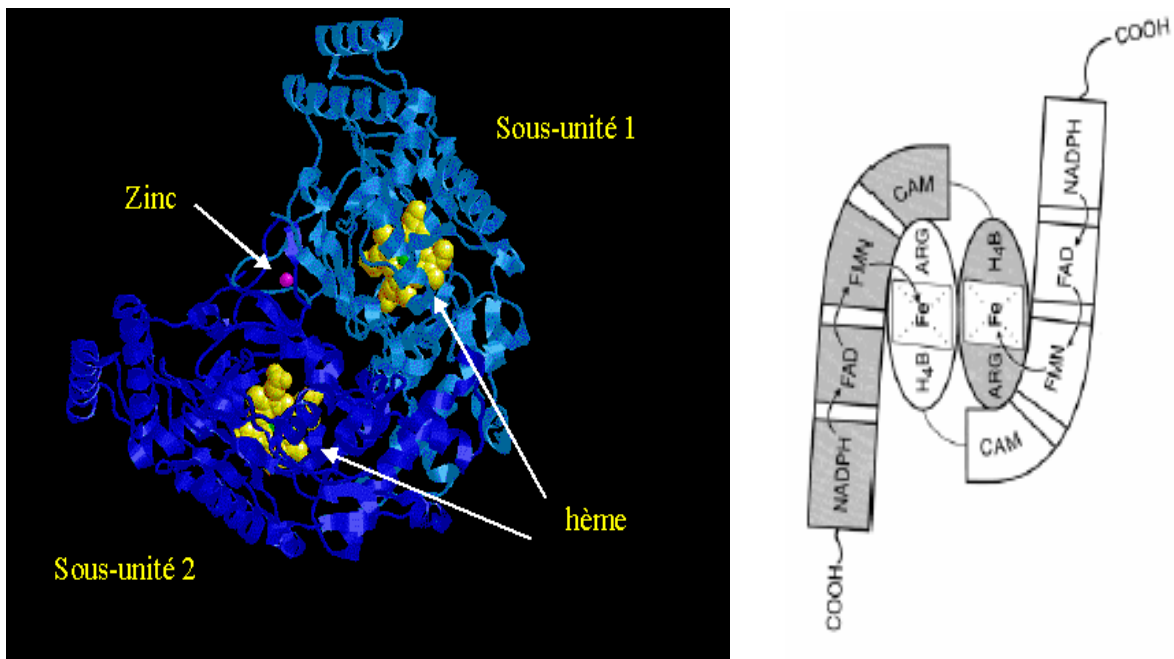


Figure 13: Structure dimérique de la NOS et la voie de transfert des électrons (Wei et al., 2003).

## 1. Régulation de l'activité des NOS :

Vu sa grande réactivité biologique et sa diffusibilité facile, de multiples facteurs contrôlent délicatement la biosynthèse du NO.

### a. Abondance du substrat et des cofacteurs :

La production du NO peut varier selon l'abondance de la L-Arg et des cofacteurs dans le milieu environnant extracellulaire. Dans les conditions physiologiques, la production du NO n'est pas limitée par la disponibilité du substrat car le stock de la L-Arg est suffisant. Cependant, lors des conditions pathologiques, lorsque la génération de NO est excessive et continue, les abondances de la L-Arg et du O<sub>2</sub> pourraient être des facteurs limitants (Lamattina *et al.*, 2003). La diminution de la L-Arg réduit l'expression de la iNOS. BH<sub>4</sub> est un cofacteur vital qui joue un rôle de stabilisateur de NOS pour la synthèse du NO et dans le transfert de l'électron.

### b. Inhibition par feedback du NO :

Le NO exerce un contrôle de feed back négatif sur la NOS en se liant au site héminique de l'enzyme. NOS peut subir simultanément la synthèse du NO et la formation du complexe ferreux- nitrosyl pendant la phase stable de la catalyse. Le NO formé durant l'oxydation de la L-Arg entre en compétition active avec l'O<sub>2</sub> pour se lier au fer ferreux dans le site héminique. Dès lors, le transfert d'électron pendant la synthèse du NO qui requiert le fer sous forme ferrique, le complexe ferreux- nitrosyl rend la NOS catalytiquement inactive (Stuher, 1997 ; Gautier *et al.*, 2004).

### c. Phosphorylation :

Plusieurs séquences de sites pour la phosphorylation par les protéines kinases sont trouvées dans les 3 NOS. La phosphorylation de la NOS a été associée avec l'activation ou l'inactivation de l'enzyme. La protéine kinase C (PKC), les protéines kinases calmoduline / Ca<sup>2+</sup> dépendantes : la Ca MK I et la Ca MK II, et la PKA régulent l'activité de la nNOS à travers la phosphorylation. Ainsi, la Ca MK I phosphoryle la NOS n au niveau du résidu Ser-741, et la Ca MK II au niveau du résidu Ser-847 pour inhiber ou supprimer son activité enzymatique.

Le récepteur NMDA régule 2 enzymes impliquées dans le contrôle de la nNOS, Ca MK II et la protéine cal-P1 phosphatase, et affecte la phosphorylation de la nNOS. La PKC phosphoryle préférentiellement les dimères de NOS qui ne sont pas stabilisés avec la BH<sub>4</sub>.

La phosphorylation PKC- dépendante au niveau du domaine de liaison à la calmoduline régule négativement l'activité de la eNOS. Cependant, la phosphorylation de la eNOS par la PKB /Akt ou la PI3 kinase / Akt active l'enzyme.

## 2. Régulation de l'expression du gène de la NOS :

Les trois isoformes de NOS possèdent un certain nombre de sites de liaison pour des facteurs de régulation et des domaines pour différents facteurs de transcription, cytokines et endotoxines dans leur région du promoteur.

**a. Régulation de la eNOS :**

L'expression de la eNOS est constitutive. Plusieurs cytokines ainsi que des facteurs extrinsèques régulent son expression. L'élément de réponse aux forces de cisaillement (5'GAGACC 3') est présent dans le gène humain et bovin. L'exercice chronique et le stress des forces de cisaillement augmentent l'expression de la eNOS. L'hypoxie augmente l'expression de cette dernière dans les cellules endothéliales aortiques bovines alors qu'elle diminue dans les cellules endothéliales des artères pulmonaires. Le TNF  $\alpha$  diminue la eNOS alors que le IFN $\alpha/\beta$  l'augmente. Les oestrogènes augmentent l'expression de la eNOS dans les cellules endothéliales humaines. Les oestrogènes agissent en réduisant la génération du O $2^-$  par les parois vasculaires et conduisent à une diminution du NO disponible (Moncada et Higgs, 2006).

**b. Régulation de la iNOS :**

La iNOS est prédominamment régulée au niveau expressionnel. Le NF $\kappa$ B (Barnes et Karim, 1997), l'LPP, l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  augmentent tous l'expression de la iNOS alors que l'IL-4, l'IL-8, l'IL-10, le MCP-1 et le MDF (Macrophage Deactivating Factor) sont des inhibiteurs de son expression (figure 14).

Les glucocorticoïdes anti-inflammatoires diminuent l'ARN m de la iNOS en augmentant l'expression de l'I $\kappa$ B $\alpha$  et, par conséquent, l'inhibition de l'activité du NF $\kappa$ B (Simmons *et al.*, 1996).

**c. Régulation de la nNOS :**

La diminution de l'expression de la nNOS a été observée après traitement avec des LPS dans le cerveau du rat et dans le squelette du cobaye. Lors d'une blessure au cerveau, le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et le GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) diminuent l'expression de la nNOS afin de prévenir la mort neuronale.

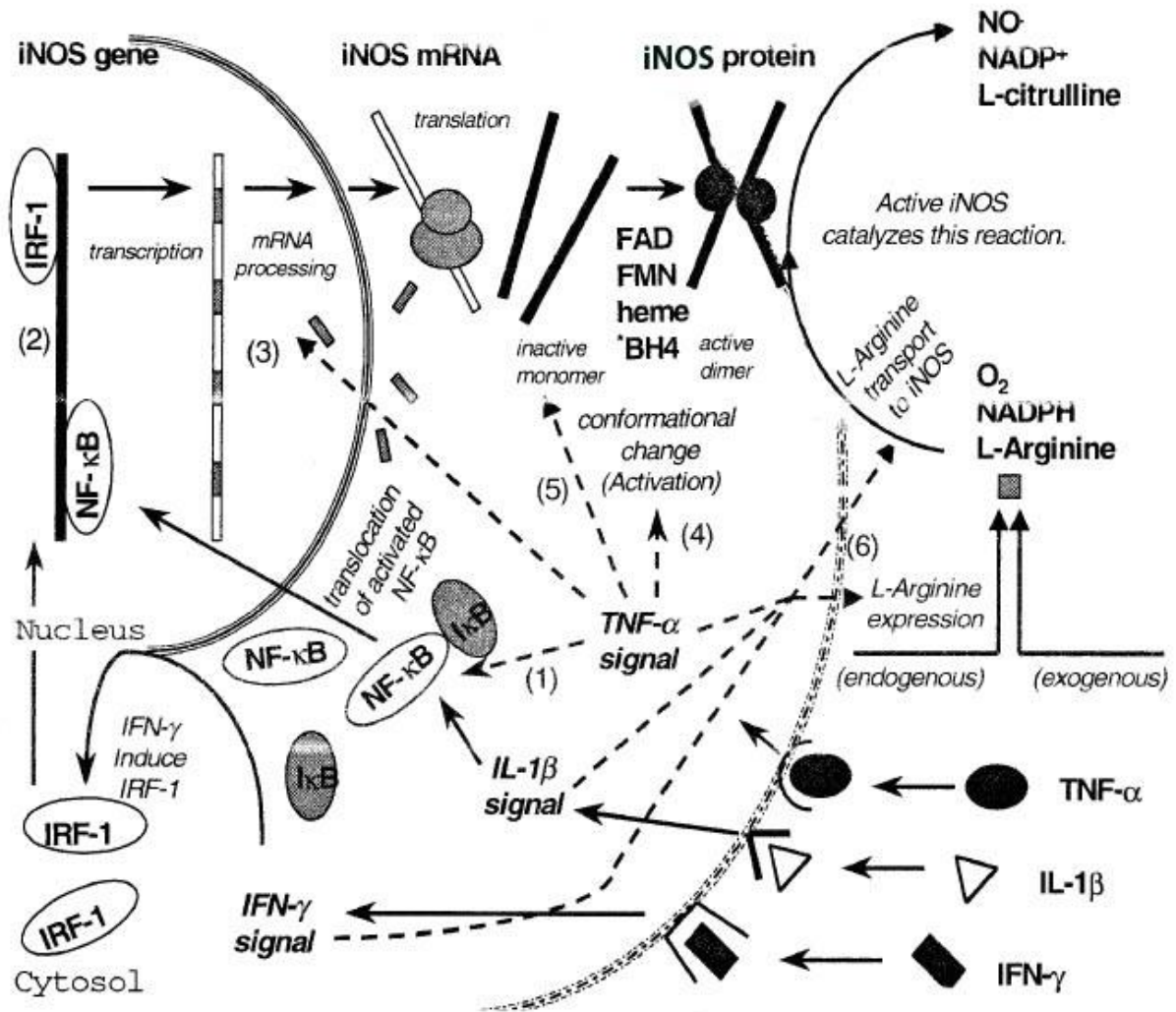


Figure 14 : Mécanismes proposés pour l'induction de la iNOS par trois cytokines (Kwon et George, 1999).

#### IV.4. NO et physiologie :

Vu sa grande réactivité avec le milieu environnant, le NO joue un rôle physiologique important.

✓ **Système cardio-vasculaire :** La eNOS et la iNOS sont retrouvées au niveau de l'endothélium. L'acétylcholine, la 5-hydroxytryptamine, thrombine, l'acide arachidonique, les forces de cisaillement et la pression sanguine induisent une production de NO par augmentation de  $Ca^{2+}$  libre cytoplasmique. Il en résulte une vasorelaxation (régulation du tonus vasculaire). Cette action aurait une répercussion sur la régulation physiologique de la pression artérielle (action hypotensive). Par ailleurs, il a été mis en évidence que le NO est un facteur anti-angiogénique et participe à l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire ainsi qu'à l'inhibition de l'adhésivité des leucocytes à la paroi vasculaire (Radomski et *al.*, 1996) .

Au niveau cardiaque, le NO diffusant des cellules de l'endocarde, des cellules des vaisseaux coronariens et celui synthétisé par les cellules myocardiques réduisent l'activité contractile du muscle cardiaque. Le NO inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses (Moncada et Higgs, 2006).

✓ **Système nerveux :** Le NO est un neuromédiateur. La production de NO a été mise en évidence dans les neurones par la nNOS et dans les cellules microgliales et les astrocytes par la iNOS. Le NO intervient lors du développement embryonnaire (rôle déterminant dans la mise en place des connections synaptiques). En outre, NO peut moduler la libération d'hormones par le complexe hypothalamo-hypophysaire, jouer ainsi un rôle dans la plasticité du SNC, ainsi que dans le phénomène de l'apprentissage (Crépel et Lemaire, 1995). Le NO synthétisé dans les neurones du système nerveux central agit comme neuromédiateur avec plusieurs fonctions physiologiques, y compris la formation de la mémoire, la coordination entre l'activité neuronale et le flux sanguin, et la modulation de la douleur (Brenman et Bredt, 1996). Dans le système nerveux périphérique, le NO est libéré par une vaste collaboration des nerfs non adrenergique non cholinergique (NANC), qui médie quelques formes de vasodilatations neurologiques et régule certaines fonctions gastro-intestinale, respiratoire, et urogénitale (Tuteja et *al.*, 2004).

✓ **Système immunitaire :**

En effet, la iNOS libère de grandes quantités de NO (rang micromoles) durant les réactions inflammatoires et de défense immunitaire. Elle est impliquée dans les altérations tissulaires. Le NO généré devient cytotoxique et contribue à l'élimination des cellules tumorales, des bactéries, des virus, et autres organismes envahissants. En outre, l'action immuno-régulatrice du NO

paraît cibler la balance Th1 /Th2 de la réponse immunitaire. Le NO peut induire l'expression de cytokines associées à la voie TH2 (IL-4) alors que IFN- $\gamma$  et IL-12 sont inhibés. L'activité du NO promouvoit l'apoptose qui affecte principalement les cellules Th1 (Tuteja et *al.*, 2004) et les cellules tumorales (Kim et *al.* 2001).

#### **IV.5. NO et physiopathologie :**

Le NO est impliqué dans diverses maladies par diminution ou excès de sa libération (tableau 6). La maladie du dysfonctionnement endothéliale est due à une baisse de la fonction endothéliale qui induit une diminution de la vasodilatation d'où une hypertension artérielle et un risque d'athérosclérose. Le taux réduit de NO peut résulter soit d'une altération de l'expression de la eNOS ou bien de changement dans ses substrats ou cofacteurs tels que la L-Arg ; la formation de ONOO- contribue à la réduction de la biodisponibilité du NO. Des auteurs ont rapporté l'association de diverses maladies à une diminution de production de NO telles que : l'hypercholestérolémie et la dyslipidémie, les maladies des artères coronariennes, et le diabète insulino-résistant (Rassaf et *al.*, 2002; Tuteja, 2004; Moncada et Higgs, 2006).

Certains auteurs associent le polymorphisme du gène de la NOS3 comme facteur de risque de maladies artérielles coronariennes (Förstermann et *al.*, 1998).

Les stimuli inflammatoires comme les LPS et les cytokines induisent la iNOS dans beaucoup de tissus. Le NO produit par la iNOS dans les vaisseaux sanguins est impliqué dans la profonde vasodilatation du choc septique. Les endotoxines (endotoxémie) induisent également la iNOS dans le myocarde où elle est responsable de dysfonctionnement et d'altération. Ces atteintes tissulaires seraient dues à l'inhibition respiratoire responsable de l'hypoxie métabolique induite par l'excès de NO. La surproduction de NO promouvoit l'apparition d'athéroscléroses par le biais de formation de ONOO-. Par ailleurs, le diabète insulino-dépendant d'origine auto-immune (Diabète Mellitus) est associé à une production excessive de NO par la iNOS contribuant à la neurotoxicité et à une angiogenèse observées durant les rétinopathies diabétiques (Abu El-Asrar et *al.*, 2001 ; Crager et *al.*, 2003). Une augmentation de production de NO est également observée dans les maladies auto-immunes du tube digestif telles que la colite ulcéraire et la maladie de Crohn (Beck et *al.*, 2004 ; Kolios et *al.*, 2004).

#### **IV. 6. NO et l'œil :**

Au niveau de l'œil, comme le montre la figure 15, les NOS constitutives ont été mises en évidence. En effet, la NOS I est localisée dans certaines cellules

amacrines, dans les cellules horizontales, les cellules photoréceptrices ainsi que dans les cellules gliales de Müller des différentes espèces (Bequet *et al.*, 1997). La NOS III est retrouvée au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins du segment antérieur, la choroïde et la rétine. La NOS II se trouve, quand à elle, dans les cellules gliales, les pericytes et dans les capillaires et les cellules endothéliales des capillaires (Goureau et Courtois, 1996).

Ainsi, le NO présent dans la rétine servirait de neurotransmetteur dans la transmission synaptique rétinienne car des donneurs de NO sont capables de modifier le couplage électrique entre les cellules horizontales, d'activer les courants ioniques indirectement par une augmentation de GMPc dans les cellules dipolaires et dans les cellules ganglionnaires.

Par ailleurs, le NO est capable de moduler la transduction visuelle (modulation de la conductance de certains canaux ioniques des photorécepteurs): le NO modifie la dépolarisation subite par les segments externes des photorécepteurs dans l'obscurité et altère leur réponse à la lumière.

Le NO agit, également, comme vasodilatateur lorsqu'il est produit par l'endothélium vasculaire ou par certaines terminaisons nerveuses (artère ophtalmique et artérioles rétiniennes).

La NOS2 n'est pas produite dans les rétines des sujets sains. Toutefois, elle est induite dans certaines pathologies telles que les uvéites induites par les endotoxines (Jacquemin *et al.*, 1996), les uvéites autoimmunes (telle que celle associée à la maladie de Behçet), les rétinites à cytomégalovirus au cours du SIDA (Dighiero *et al.*, 1994), la dégénérescence photo-induite ainsi que lors de l'ischémie rétinienne (Goldstein *et al.*, 1996).



### Dérèglement de la production de NO

(+ : production excessive de NO)

( - : sous-production de NO)

Isoforme probablement impliquée	Production de NO	Maladies liées à NO
<b>NOS-1</b>	+ -	Ischémie cérébrale Impuissance sexuelle masculine
<b>NOS-1 ou/et NOS-2</b>	+	Maladies neurodégénératives (Parkinson, sclérose latérale amyotrophique, ...)
<b>NOS-2</b>	+ + + +	Choc septique Arthrite rhumatoïdale Diabète Certains cancers

Tableau 6 : tableau montrant l'implication des NOS dans quelques maladies.

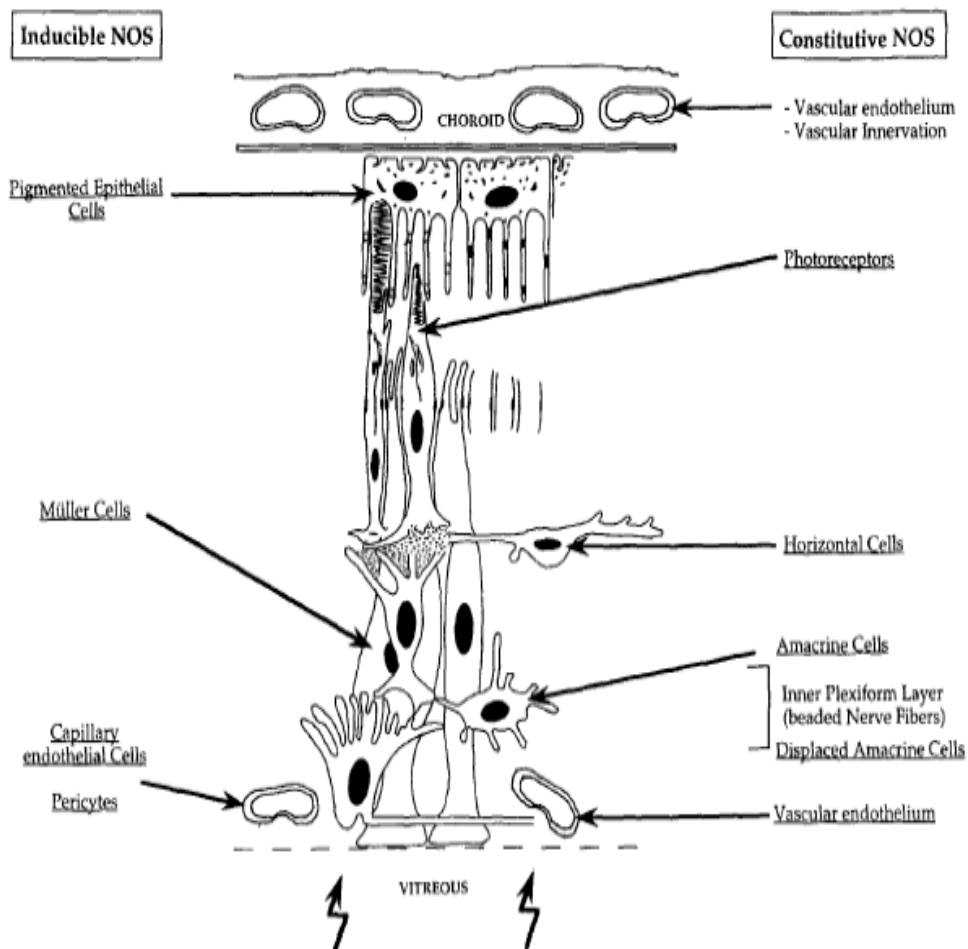


Figure 15: Localisation des différentes isoformes de la NOS au niveau de la rétine (Becquet et al., 1997) .

## V. Les cytokines :

Le fonctionnement du système immunitaire repose sur le dialogue entre diverses cellules et leur coopération par des contacts membranaires ou des médiateurs solubles qui assurent l'échange des informations. Parmi ces messagers solubles, les cytokines représentent les principales molécules de signalisation responsables d'effets biologiques par liaison à des récepteurs spécifiques membranaires. Ces derniers initient une cascade de réactions qui conduit à l'activation de la transcription de gènes cellulaires et à la synthèse de nouvelles protéines (transduction du signal).

Les premières cytokines découvertes ont reçu une appellation fonctionnelle. Ainsi, en 1957, a été découvert l'interféron qui a été nommé ainsi en raison de son interférence avec le cycle de réplication des virus. Puis, la dénomination des cytokines s'est faite selon leurs sources cellulaires (comme lymphokines et monokines). Le terme de cytokines est destiné aux médiateurs physiologiques de nature protéinique intervenant aussi bien dans l'immunité que l'inflammation, que dans la multiplication que l'inhibition cellulaire (Touil-Boukoffa, 1998).

### V.1. Caractéristiques générales :

Les cytokines sont de petites protéines, souvent glycoprotéines, solubles, de poids moléculaire supérieur à 10 kDa (exception faite des chémokines qui ont un poids légèrement inférieur), possédant un nombre variable de site de glycosylation et de ponts disulfures (indispensables à l'expression de l'activité biologique). Elles sont toutes synthétisées de novo et la régulation de leur synthèse se fait au niveau transcriptionnel.

Certaines cytokines sont exprimées sous forme soluble et sous forme membranaire et agissent comme de vrais et propres récepteurs de surface capables de transduire des signaux intercellulaires et peuvent également interagir avec des éléments de la matrice extracellulaire.

Une des principales caractéristiques de nombreuses cytokines est leur double ubiquité. Au niveau des cellules productrices, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et une cellule donnée peut produire des cytokines distinctes.

Les cytokines présentent les attributs de pléiotropie, de redondance, de synergie, d'antagonisme et d'induction de cascades, ce qui leur permet de réguler l'activité cellulaire d'une façon coordonnée et interactive. Elles se lient à des récepteurs membranaires spécifiques de leurs cellules cibles, ce qui conduit à l'activation de seconds messagers intracellulaires et, en retour, à l'induction d'une cascade biochimique qui aboutit à l'effet spécifique de la cytokine. Elles

déclenchent des voies de transduction du signal qui, en fin de compte, modifient l'expression des gènes de leurs cellules cibles. Une cytokine donnée exerce des actions autocrine, paracrine et endocrine.

La production en cytokines est faible, elles sont actives à des concentrations de l'ordre du nanomoles ou du picomoles. Certaines cytokines, produites en abondance sous l'influence du système d'amplification (boucle de contrôle) peuvent agir à distance de façon endocrine, au sein du système immunitaire ou sur d'autres organes ou systèmes (système nerveux central ou endocrinien) (Touil-Boukoffa, 1998).

### V. 2. Structure des cytokines:

La plupart des cytokines possèdent une structure hélicoïdale plus ou moins compacte dont la conformation est maintenue par des ponts disulfures intra-caténaux entre les résidus cystéine. Certaines cytokines présentent une structure en hélice  $\alpha$  (IL-2, IL-4) : quatre hélices  $\alpha$  amphipatiques en position anti-parallèle forment le corps de la molécule, dont la structure indispensable à l'activité est maintenue par un ou deux ponts disulfures. D'autres sont constituées de brins  $\beta$ , 12 ou 14 pour IL-1, ou organisées en feuillets  $\beta$  (TNF  $\alpha$ ), ou encore constituées (IL-8) d'une hélice  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  formé de plusieurs brins anti-parallèles. Des monomères peuvent s'assembler pour former des dimères (IL-5) ou des trimères (TNF  $\alpha$ ) qui représentent la forme biologiquement active de la molécule (Genetet, 1997 ; (Touil-Boukoffa, 1998).

### V. 3. Classification des cytokines:

Les cytokines sont classées selon leur structure en quatre groupes principaux (Scott *et al.*, 2002; Ozaki et Leonard, 2002):

a - Cytokines de la classe I ou hématopoïétines : c'est une famille de facteurs inducteurs de la différenciation et stimulant l'hématopoïèse, incluant différents membres dont certains portent la dénomination de CSF pour « Colony Stimulating Factor » précédée par l'initiale de la lignée sensible à ses effets. D'autres facteurs dénommés interleukines possèdent cette activité (comme l'IL-3, IL-7 et l'IL-5).

b - Cytokines de la classe II ou interférons : Autrefois appelés Macrophage Activating Factor, les IFNs sont classés en type I et type II selon la spécificité de leur récepteur et leur homologie de séquences. Le type I comprend l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$ , l'IFN- $\omega$  et l'IFN- $\tau$  (retrouvé uniquement chez les ruminants); ils ont une structure semblable et se lient à un récepteur hétérodimérique commun : IFNAR avec deux chaînes IFNAR1 et IFNAR2. L'IFN- $\gamma$  est le seul dans le type II qui se lie à un récepteur différent (IFNGR) et est codé par un locus chromosomal séparé (Touil-Boukoffa, 1998).

c - Cytokines de la classe III ou facteurs nécrosant des tumeurs (Tumor Necrosis Factor ou TNF) : La famille des TNF comprend deux membres : le TNF- $\alpha$  (cachectine) et le TNF- $\beta$  (lymphotoxine). Ces deux molécules partagent

30% d'homologie de structure et se lient aux mêmes récepteurs (le TNF-R1 et le TNF-R2) (Touil-Boukoffa, 1998).

d - Chémokines ou chimiokines : C'est une large famille de petites protéines (8-15 kDa) chémoattractantes qui contrôlent la circulation des sous-populations spécifiques de leucocytes dans les conditions physiologiques et dans les processus pathologiques. Elles sont classées à leur tour, selon l'arrangement des résidus cystéine du côté amine terminal, en quatre familles: C, CC, CXC et CX<sub>3</sub>C. Les chémokines jouent un rôle dans le recrutement des leucocytes impliquant leur accumulation dans les sites inflammatoires, induisent leur activation et contrôlent la différenciation des lymphocytes ainsi que leur fonction effectrice (Rollins, 1997 ; Loetscher et Clark- Lewis, 2001).

#### V.4. Les récepteurs des cytokines:

##### a- Classification :

Les récepteurs des cytokines peuvent être classés en familles sur la base de la structure moléculaire (Touil-Boukoffa, 1998). On distingue ainsi :

- La famille des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines : Cette famille regroupe deux sous familles : la famille des récepteurs des l'Il-1, dépourvues d'activités tyrosine kinase intrinsèques dans leurs domaines intracellulaires et la famille des récepteurs pour un grand nombre de facteurs de croissance (récepteur du M-CSF, du PDGF, de EGF....) qui contrairement aux précédents, expriment une activité tyrosine kinase au niveau de leurs domaines intra cytoplasmiques.

- La famille des récepteurs des cytokines de classe I ou Famille des récepteurs des hématopoïétines: Ce sont des glycoprotéines avec, dans leur partie extracellulaire, deux domaines d'une centaine d'acides aminés. L'un possède quatre résidus cystéine, engagés dans les ponts disulfures intrachânes, tandis que l'autre exprime un motif W-S- X- W-S (W : tryptophane, S : sérine, X : un quelconque acide aminé) qui est important pour la fixation du ligand.

- La famille des récepteurs des cytokines de classe II ou Famille des récepteurs des interférons (IFN): Ils partagent une organisation similaire dans un domaine extracellulaire qui contient des résidus cystéine et tryptophane dont la position est bien conservée.

- Famille des récepteurs des Tumor Necrosis Factor (TNF): Ils présentent dans leur partie extracellulaire quatre domaines riches en cystéine. Cette famille inclut non seulement les récepteurs du TNF mais également le récepteur pour le NGF (nerve growth factor), les molécules CD 40 et les récepteurs de « mort cellulaire » tels que les Fas.

- La famille des récepteurs des chémokines : Contrairement aux autres cytokines, ils possèdent sept régions transmembranaires et sont couplés au niveau de leur partie intracytoplasmique à une protéine G qui intervient dans la transduction du signal (Kunkel et Godessart, 2002).

.....

De nombreux récepteurs de cytokines sont en fait des complexes multimériques. Ainsi, selon leur organisation fonctionnelle, on peut les regrouper en trois grands types en fonction des sous unités qu'ils partagent.

a- La chaîne  $\gamma$ C : Elle est exprimée de façon constitutive dans toutes les cellules lymphoïdes. Elle constitue l'unité de transduction du signal de plusieurs récepteurs de cytokines connus. Ces derniers incluent par ailleurs un ou deux chaînes spécifiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ).

b- La chaîne  $\beta$ C : Elle est partagée par des récepteurs de cytokines impliquées dans l'hématopoïèse, le multi-CSF (IL-3), ou la différenciation plus spécifique d'une lignée granulomateuse (G-CSF), monocyttaire (M-CSF) et celle des éosinophiles (IL-5).

c- La gp 130 : Elle a été décrite comme une des composantes du récepteur de l'IL-6, qui s'associe à la sous unité spécifique (IL-6R $\alpha$ ) avec une forte affinité lorsque celle-ci est elle-même associée à l'IL-6. L'IL-11 et le LIF utilisent également le gp-130.

#### **b- Transduction du signal :**

La plupart des récepteurs de cytokines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque qui leur permet de transduire les signaux d'activation. Des kinases intracytoplasmiques doivent donc intervenir. Suite à l'activation des kinases, différentes protéines intracellulaires sont phosphorylées. Généralement, la transduction commence par la dimérisation des récepteurs induite par les cytokines. Différentes tyrosines protéines kinases inactives sont associées à différentes sous unités des récepteurs connus sous le nom de kinases Janus (JAK). La liaison de la cytokine induit l'association des deux sous unités séparées du récepteur des cytokines ainsi que l'activation de JAK associées aux récepteurs. Les JAK activées créent des sites d'ancrage pour les facteurs de transcription STAT (Signal Transducers And Activators of Transcription), par phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques des sous unités du récepteur des cytokines. Ces derniers (STAT) sont transloqués des sites d'ancrage du récepteur de la membrane vers le noyau, où ils initient la transcription du gène spécifique en se liant à l'élément de réponse du gène (Kuby, 2001).

Le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) est un facteur transcriptionnel qui peut réguler l'expression des gènes proinflammatoires, comprenant les cytokines et les molécules d'adhésion (Barnes et Karim, 1997). Dans le plasma des cellules inactives, NF- $\kappa$ B existe sous forme de complexe lié à son inhibiteur, la protéine inhibitrice  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B). Plusieurs stimuli visent la phosphorylation de I- $\kappa$ B, aboutissant à la dissociation du complexe NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B. Ainsi le NF- $\kappa$ B migre vers le noyau, où il se lie aux séquences du promoteur spécifique de l'ADN et initie la transcription du gène.

#### **V.5. Physiologie :**

---

Les cytokines sont de puissants agents pharmacologiques impliqués à la fois dans les réactions immunitaires et inflammatoires. Elles modulent les capacités fonctionnelles de nombreux types cellulaires et jouent un rôle essentiel au cours du développement de la réponse immune en contrôlant l'activation, la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules T et B en régulant la production des anticorps ou d'autres cytokines (Selmaj *et al.*, 1990 ; Kuwano et Hara, 2000). De plus, elles interviennent dans le contrôle de l'hématopoïèse (Yuo *et al.*, 1989) et participent aux réactions inflammatoires, aux phénomènes de résorption osseuse, de fibrose et de chimiotactisme (Rollins, 1997, Murdoch et Finn, 2000 ; Kunkel et Godessart, 2002).

Les cellules productrices restent essentiellement les cellules hématopoïétiques. Les cytokines forment un réseau physiologique de communication qui contrôle à tous les niveaux le développement des réactions immunitaires, et permet au système immunitaire d'interagir avec d'autres grands systèmes d'homéostasie de l'organisme, le système nerveux central et le système endocrinien (Schroder *et al.*, 2004).

Au cours de la réponse immunitaire, le lymphocyte T et les cellules présentatrices d'antigènes sont la source majeure de production des cytokines (Billiau *et al.*, 1998). Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principaux producteurs d'IL-12 et produisent également de l'IL-1, de l'IL-6, du TNF $\alpha$ , du G-CSF, du M-CSF, du GM-CSF, et de l'IL-8. Au niveau des tissus cibles d'une réaction immunitaire, les fibroblastes ainsi que les cellules épithéliales et les cellules endothéliales peuvent également produire des cytokines.

---

## VI. Immunologie de l'œil :

L'œil est un organe immunologiquement privilégié. Ce privilège immunitaire est un phénomène complexe qui implique divers processus agissant de concert afin de maintenir l'intégrité tissulaire et d'éviter les processus inflammatoires au sein de cet organe (Wenkel et Streilein, 2000). Le privilège immunitaire se manifeste par une absence de reconnaissance immunitaire « normale » d'antigènes situés au niveau des yeux car ceux-ci deviennent un milieu clos vis-à-vis du système immunitaire tôt dans l'ontogenèse. Lorsque ceux-ci sont injectés ou qu'un greffon de tissu qui les contient est placé dans les yeux, une réponse immunitaire déviée est mise en place, se caractérisant par une suppression de l'immunité cellulaire de type hypersensibilité retardée. Ce phénomène est appelé ACAID (Anterior Chamber Associated Immune Deviation).

Dans l'œil sain, le Fas ligand est constitutivement exprimé dans tous les tissus oculaires, favorisant la mort par apoptose des lymphocytes trouvant leur chemin vers les yeux (Dick et *al.*, 1999). D'autres molécules inhibitrices, qui suppriment la réponse immunitaire des lymphocytes uveitogéniques contre un antigène spécifique par un mécanisme de contact, sont présentes sur les cellules gliales, et sur les cellules épithéliales du corps ciliaire. Les fluides oculaires contiennent des substances immuno-inhibitrices, telles que le TGF- $\beta_2$  retrouvé en larges quantités dans l'humeur aqueuse sous forme active et inactive, l'IL-1RA, le MIF, le CGRP, le  $\alpha$ -MSH, le VIP et le cortisol libre (Yoshida et *al.*, 2000; Ohta et *al.*, 2000; Sugita et *al.*, 2006). Ainsi, l'intérieur de l'œil représente un environnement profondément immunodéprimé qui prévient l'activation des cellules T et leur prolifération. De plus, il prévient également la production de l'IFN- $\gamma$  et la libération du NO par les macrophages (Ohta et *al.*, 1999).

Comme le cerveau, l'œil est en contact avec une barrière hémato-tissulaire. Des jonctions serrées entre les cellules endothéliales vasculaires et les cellules épithéliales de divers structures oculaires adjacentes limitent l'entrée des molécules protéiques du sang ainsi que celle des cellules dans l'œil. Les fluides oculaires sont directement drainés vers le sang à travers le réseau trabéculaire, détournant le système lymphatique et l'implication d'une immunité conventionnelle.

Le privilège immunitaire touche également la cavité vitrénne et l'espace subrétinal (Willermain et *al.*, 2002).

## VI. 1 La phase afférente de l'auto-immunité oculaire :

Lorsque les mécanismes naturels de tolérance échouent, l'auto-immunité s'ensuit. Le phénomène conduisant à l'uvéite auto-immune réside dans la présentation de l'antigène oculaire (par exemple Ag-S ou l'IRBP) à la périphérie. Cette présentation peut survenir après un traumatisme au niveau de

l'œil, causant la libération d'antigènes oculaires normalement séquestrés vers les ganglions lymphatiques où ils provoquent une réponse immunitaire. Une infection concomitante de l'œil traumatisé pourrait avoir l'effet d'un adjuvant. Une autre possibilité serait une exposition de l'œil à des micro-organismes possédant une structure pouvant faire une réaction croisée avec les antigènes du soi. Ainsi, la réponse immunitaire à ces épitopes serait capable de rompre la tolérance aux épitopes du soi.

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans le développement de l'uvéite. Les lymphocytes T effecteurs spécifiques à l'antigène sont hétérogènes selon les fonctions effectrices qu'ils médient et les profils cytokiniques produits.

Les lymphocytes T effecteurs de phénotypes Th1 sont associés à l'immunité cellulaire. Ils produisent de l'IL-2 et le TNF- $\gamma$  et donc stimulent la phagocytose, activent la iNOS et la production de NO et d'autres intermédiaires oxygénés actifs. Ils amplifient, également, la liaison des Immunoglobulines au complément et l'opsonisation d'isotypes d'anticorps. La réponse de type 1 est efficace pour l'éradication de certains types de pathogènes, toutefois, elle cause des altérations au tissu environnant. Les lymphocytes T de phénotype 2 sont associés à l'immunité humorale et les réponses allergiques.

Les deux phénotypes sont retrouvés lors de l'uvéite mais ils sont mutuellement antagonistes car chaque type cellulaire inhibe l'autre en vertu des cytokines produites. Pour cela, une réponse immunitaire prolongée nécessite une polarisation vers un des deux phénotypes à partir d'un phénotype commun Th0.

Alors que certains travaux mettent en évidence que la voie Th2 est un bon pronostic pour l'uvéite, d'autres montrent des altérations tissulaires dues à des mécanismes différents. Ainsi, l'infiltration inflammatoire est dominée en majorité par les éosinophiles, très semblable à une réponse allergique.

L'IL-12 est une cytokine nécessaire pour la différenciation des cellules T effectrices uveitogéniques quel que soit le profil cytokinique (Tarrant et *al.*, 1998).

## **VI. 2. La phase efférente de l'auto-immunité oculaire :**

Initialement, la réponse immunitaire est non spécifique. Toutes les cellules immunitaires pénètrent dans l'œil en petit nombre ; toutefois, seules les cellules spécifiques à l'antigène sont aptes à recruter ultérieurement un nombre massif de cellules inflammatoires (lymphocytes, monocytes, et neutrophiles avec une majorité de cellules monocytaires) et induit une inflammation. Le recrutement cellulaire dépend de la production locale de cytokines par les premiers lymphocytes infiltrants (Erwig et *al.*, 1988). Il en résulte une induction de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire rétinien et production de chémoattractants à partir du tissu (Crane et *al.*, 2001; Xu et *al.*, 2003). Il s'établit donc un gradient chémoattractif pour les leucocytes. Le



recrutement cellulaire amplifie ensuite le processus en y contribuant avec ses propres facteurs. La dégranulation des mastocytes durant la maladie aide à rompre la barrière hémato-rétinienne. Ceci facilite l'entrée des cellules dans l'œil, l'échange de produits tissulaires et des médiateurs solubles dans la circulation. Ainsi s'amplifie l'atteinte oculaire.

Une importante partie des altérations tissulaires est causée par les produits actifs de l'oxygène comme le NO et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produits par les macrophages (Shimizu et *al.*, 1999).

Finalement, différents travaux impliquent l'IL10 pour la rémission de l'uvéite en diminuant la régulation de l'expression des antigènes de surface et par perte de l'activité migratoire et phagocytaire (Rizzo et *al.*, 1998 ; Broderick et *al.*, 2000).

## Matériel et méthodes

### III. Matériel :

#### I.1. Les yeux de bœufs :

Les yeux de bœufs ont été obtenus au niveau de l'abattoir de la Daïra de Hussein Dey. Les yeux ont été transportés, à + 4°C juste après énucléation, au laboratoire où ils ont été conservés jusqu'à leur utilisation.

#### I.2. La souche bactérienne ATCC 8062 :

La souche bactérienne est une souche de *Pseudomonas oleovorans*. Elle est caractérisée par la propriété biochimique : nitrate réductase « + ». Elle est utilisée afin de réduire les nitrates en nitrites lors des dosages du NO dans les échantillons. Elle nous a été fournie par le Dr J.C. Drapier (Directeur unité CNRS : Biosynthèse du monoxyde d'azote : signalisation, Gif sur Yvette, Paris).

#### I.3. Milieux de culture et réactifs :

Les différents réactifs et milieux de culture sont des produits de Sigma :

- Le DMEM, additionné de glutamine à 2 mM et de sérum de veau fœtal (SVF) à 10 %, a été utilisé pour les cultures d'explants des yeux. Un ensemble d'antibiotiques est également ajouté à mesure de  $10^3$  UI/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et de 5µg/ml de gentamycine.
- Le SIN-1 est utilisé en tant que donneur de peroxy-nitrite.
- L'anti-NOS (u NOS) est utilisée pour la mise en évidence de toutes les NOS confondues (iNOS, eNOS et nNOS) sur les coupes histologiques.

### IV. Méthodes :

#### A. Purification de l'antigène S:

##### 1. Préparation de l'extrait brut :

Du fait de la localisation intracellulaire de l'antigène S, son extraction nécessite la libération du contenu cellulaire avec un tampon hypotonique.

Les rétines sont prélevées, dans la semi-obscurité et à + 4°C. Elles sont immédiatement mises dans un tampon hypotonique (0,1 M Na Cl, 0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH : 7,2) à raison de 20 g de rétine/ 100 ml. Après homogénéisation, la suspension est centrifugée dans un premier temps à 1000 rpm pendant 30 min. Par la suite, le surnageant récupéré est centrifugé à 14000 rpm pendant 3h 30 min. Le dernier surnageant est filtré à 0,22 µ. L'extrait final est alors conservé à - 45°C jusqu'à son utilisation.

## **2. Précipitation des protéines avec le sulfate d'ammonium :**

Cette technique est basée sur une déshydratation interne de la protéine aboutissant à une précipitation.

La précipitation des protéines a été réalisée à 50 % de saturation au sulfate d'ammonium durant la nuit à + 4°C. La suspension obtenue est centrifugée à 3000 rpm pendant 15 min. Le culot est récupéré dans un minimum de tampon PBS puis conservé à -45°C après agitation jusqu'à son utilisation.

## **3. Purification de l'antigène S par chromatographie de gel filtration sur sephadex G150 :**

Les protéines précipitées et resuspendues dans un volume minimal de tampon subit une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G150 (les dimensions de la colonne utilisée sont 1m / 5cm). L'élution est réalisée avec le même tampon hypotonique (0,1 M Na Cl, 0,05M KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH : 7,2) avec un débit de 0,35 ml/ min. Les densités optiques des fractions collectées sont lues par spectrophotométrie à 280 nm puis les fractions protéiques sont poolées et concentrées à un volume final de 3ml.

## **4. Caractérisation biochimique et immunologique des différents extraits bruts et fractions :**

Les différentes fractions concentrées, obtenues par chromatographie d'exclusion moléculaire, ont été soumises à une caractérisation biochimique par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et à une caractérisation antigénique (IDD et ELISA).

### **4.1. Caractérisation de l'extrait brut et des différentes fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) :**

Cette technique permet la séparation des protéines selon leurs poids moléculaire selon une vitesse de migration dans un champ électrique.

Le SDS se fixe sur ces dernières leur conférant une forte charge négative constante quelque soit la protéine. Le principe de la séparation est fondé sur le ralentissement des polypeptides par la maille de la matrice de polyacrylamide.

Les fractions collectées et concentrées sont mélangées au tampon d'échantillon contenant du SDS (10%), du  $\beta$  mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol (10%) ainsi que l'extrait brut et les marqueurs de PM. Elles sont chauffées à 100° pendant 5 min. Dans chaque puits, un volume de 30  $\mu$ l est déposé. La séparation des protéines se fait par un gel à 13%. Afin de révéler les bandes protéiques après la migration, le gel est mis dans une solution de

coloration pendant toute la nuit, ensuite, dans une solution de décoloration-fixation à 10% d'acide acétique.

## **4.2. Caractérisation antigénique de l'extrait brut et des différentes fractions :**

### **4.2.1. Caractérisation par immuno-diffusion double (IDD) :**

Il s'agit d'une méthode d'immuno-précipitation basée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide à partir de puits placés en vis à vis. La liaison antigène - anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone d'équivalence sous la forme d'un arc visible à l'œil nu.

Des puits, voisins les uns des autres, sont creusés dans une gélose d'agarose préparée avec du tampon Véronal à 1%. Les différents réactifs sont déposés chacun dans un puits. Les arcs sont révélés avec une solution d'amidoschwarz.

### **4.2.2. Caractérisation par ELISA :**

La technique ELISA est une technique de dosage colorimétrique utilisant deux anticorps. Un premier anticorps de capture assurant la spécificité de la réaction et un deuxième, l'anticorps traceur couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré, réagit avec le complexe antigène- anticorps.

Les microplaques sont sensibilisées avec 100 µl/ puits à mesure de 20 µg/ ml d'Ag-S pendant une nuit à +4°C. Après plusieurs lavages avec une solution PBS- Tween à 0,02%, la saturation des sites non spécifiques est faite avec une solution PBS à 5% de BSA. Des dilutions successives au 1/2 du sérum de patient atteint de la maladie de Behçet (dilué préalablement au 1/10) sont utilisées à mesure de 100µl /puits. Après une incubation d'une heure à 37°C, le conjugué anti- IgG humain couplé à la peroxydase dilué au 1/500 est ajouté aux différents puits. Une autre incubation est réalisée à 37°C pendant une heure. Le substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est ajouté (avec le DAB). Après une incubation de 30 minutes, la réaction est arrêtée avec HCl 4N. La lecture de la densité optique est faite à 405 nm.

## **B. Culture d'explants de yeux de bœuf :**

Les yeux de bœuf sont mis à +4°C immédiatement après énucléation. Une incision est réalisée au niveau équatorial et les deux hémisphères sont séparés. La lentille est écartée et le vitré enlevé. Des explants sont prélevés de la partie antérieure et de la partie postérieure et déposés dans des boîtes contenant du DMEM, additionné de SVF à 10 % et d'antibiotiques, en présence ou en absence de l'effecteur considéré (nitrites, nitrates, SIN1 et l'antigène S) aux concentrations indiquées.

Les concentrations utilisées pour les traitements avec les nitrites et les nitrates varient entre 300  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$  et celles appliquées avec le SIN-1 varient de 100  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$ . Les inductions avec l'antigène S sont réalisées avec les concentrations 10 et 20  $\mu\text{g/ml}$ . La culture est réalisée à 37°C pendant 24 et 48 heures sous atmosphère humide à 5 % de  $\text{CO}_2$ .

### **C. Dosage des nitrites résiduels et totaux dans les surnageants des cultures d'explants des yeux de bœufs :**

Le dosage est réalisé par la méthode de Griess modifiée. Les nitrites totaux sont dosés après réduction des nitrates en nitrites par la souche ATCC 8062. Ainsi, l'échantillon est mélangé avec le réactif de Griess (Naphthyl-éthylène diamine dichloride à 0,5 % dans du HCl à 20%, sulfanilamide à 5% dans du HCl à 20%) en solution V/V avant l'addition d'eau distillée. Après un temps d'incubation de 10 minutes et une centrifugation, la densité optique est lue à 543 nm. En parallèle, une courbe étalon est effectuée avec du  $\text{NaNO}_2$  à différentes concentrations.

### **D. Technique histologique :**

Après incubation, les explants sont fixés dans du formol tamponné à 10% ou dans le fixateur de Verhoeff. Par la suite, une déshydratation graduelle dans des bains successifs d'alcool de degrés croissants est effectuée. L'imprégnation est réalisée avec le xylène. Les échantillons sont inclus dans de la paraffine. Des coupes de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à partir des blocs à l'aide d'un microtome (type Minot) et récupérées sur les lames. Les colorations utilisées pour distinguer les différentes structures sont la coloration de Mallory et la coloration à l'hémalum-éosine.

### **E. Immunohistochimie sur coupes en paraffine :**

Après avoir été déparaffinées et réhydratées (différents bains de 5 minutes : toluène, éthanol absolu, éthanol 95°, éthanol 70° puis rinçage à l'eau distillée), les sections tissulaires sont alors autoclavées pendant 20 minutes à 120°C dans une solution de tampon citrate 0,05M (pH 6,7). Les peroxydases endogènes sont inhibées par incubation des lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène 0,3% pendant 5 minutes à température ambiante. Une incubation ultérieure pendant une nuit dans une solution contenant 10% de lait de vache écrémé (Mincilait) permet de bloquer les sites non spécifiques d'attache des anticorps primaires. L'incubation de l'anticorps primaire uNOS dilué à 1/100 se fait à 37°C pendant 1 heure puis une nuit à +4°C. Elle est suivie d'une incubation d'une heure et 30 minutes avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué la

peroxydase dilué à 1/100. La révélation est réalisée avec de la 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Entre chaque étape, un lavage au PBS est effectué.

#### **F. Technique de microscopie électronique sur coupes semi-fines :**

Les explants induits avec l'Ag-S à une concentration de 20 µg pendant 48 heures sont fixés dans du glutaraldéhyde à 4% pendant 2 heures. Après rinçage avec le tampon de Sorensen, ils sont post-fixés dans le tétr oxyde d'osmium à 4% à température ambiante. Au bout d'une heure, les pièces sont rincées à l'eau bidistillée et subissent une déshydratation éthylique. Après passage à l'alcool 100°, les fragments d'explants sont traités puis inclus dans de l'araldite pendant 3 jours à 60°C. Coupées à l'aide d'un ultramicrotome, les coupes sont recueillies sur lames et colorées au Bleu de toluidine.

## Résultats et discussion :

### I. Purification de l'Ag S à partir de l'extrait rétinien soluble :

L'Ag S a été préparé et purifié à partir de l'extrait protéique rétinien soluble par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephadex G150 après une précipitation protéique au sulfate d'ammonium à 50 %. Cette purification a été effectuée selon le protocole établi au niveau de notre équipe par Belguendouz en 2005 (Belguendouz, 2005).

#### 1. Caractérisation biochimique des différents extraits :

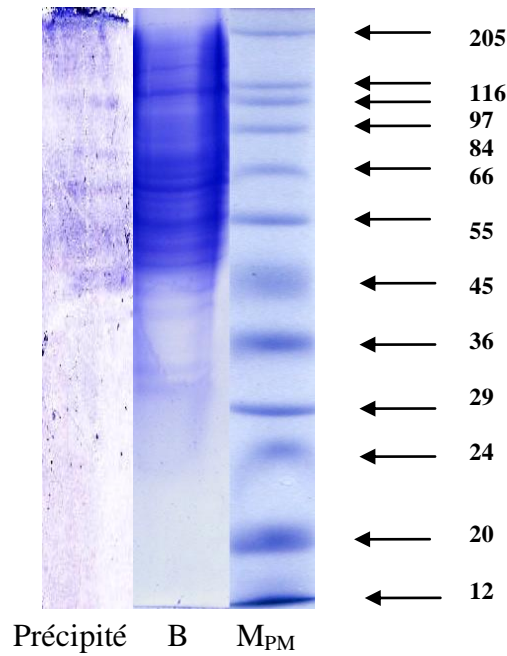
La caractérisation biochimique des différents extraits étudiés a montré, avec la méthode de Bradford, une concentration protéique très élevée (42,65mg/ml) ainsi qu'une très grande richesse protéique de l'extrait brut reflétée par le nombre important de bandes observé lors de l'analyse de l'échantillon par SDS Page. Ces différentes bandes correspondent à des PM variant entre 40 et 205 kDa.

L'extrait protéique correspondant aux protéines précipitées par le sulfate d'ammonium a montré une composition moins hétérogène en protéine (Figure 16). En effet, le profil obtenu par SDS Page est composé de 04 bandes majeures avec une bande majeure de 48 kDa pouvant correspondre à l'Ag S.

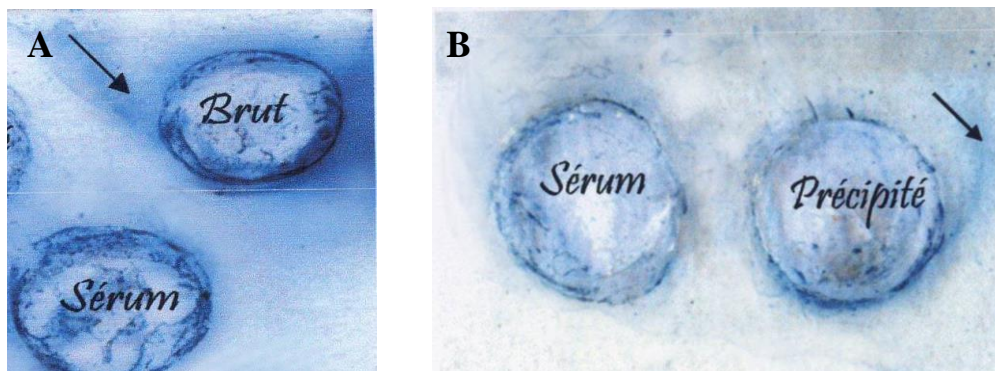
#### 2. Caractérisation immunologique des différents extraits :

L'étude des propriétés antigéniques des différents extraits protéiques vis-à-vis des sérums des patients atteints d'uvéïte « Behçet » a montré que l'extrait brut était doué d'un pouvoir antigénique reflété par la présence d'un arc de précipitation obtenu par la technique d'immuno-diffusion double (IDD) (Figure 17- A). De plus, la caractérisation antigénique par ELISA a permis d'obtenir un titre en anticorps spécifiques de 1280 (Figure 20).

L'extrait protéique obtenu après précipitation a également montré un pouvoir antigénique important vis à vis des sérums des patients. En effet, l'étude de l'antigénicité par IDD a donné un arc de précipitation (Figure 17- B). Cependant, les résultats obtenus par ELISA ont donné un titre en anticorps de 10240. Cette augmentation serait due à l'augmentation du degré de pureté de l'Ag S présent au niveau de l'extrait précipité, traduisant une forte élimination des protéines contaminantes (Figure 20).



**Figure 16:** Profil électrophorétique de l'extrait brut et du précipité (M<sub>PM</sub>: marqueurs de PM, B : extrait brut et précipité : extrait précipité) par SDS-PAGE.



**Figure 17:** Caractérisation antigénique par Immunodiffusion double de l'extrait brut et du précipité : présence d'un arc de précipitation pour l'extrait brut (A) et le précipité (B) (flèche).



### **3. Fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire de l'extrait précipité :**

Suite à la précipitation aux sulfates d'ammonium à 50 % de l'extrait rétinien, le fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G150 de l'extrait protéique obtenu a permis d'obtenir trois pics d'exclusion correspondant à trois fractions F1, F2 et F3 (Figure 18).

L'analyse de la composition des trois fractions a montré la présence d'une seule bande d'un PM avoisinant 48 kDa au niveau de F3 (Figure 19). Par ailleurs, cette fraction a été la seule douée d'un pouvoir antigénique vis-à-vis des sérums des patients atteints de la maladie de Behçet avec un titre en anticorps de 40960 (Figure 20).

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus précédemment au niveau de l'équipe (Belguendouz, 2005). Cette fraction correspondrait à l'Ag S. Elle a été utilisée par la suite dans les inductions des explants oculaires.

## **II. Etude histologique de l'effet du NO sur les explants des yeux de bœufs en culture :**

Le traitement des différents explants oculaires avec les dérivés physiologiquement stables du NO (nitrites et nitrates) ou avec le dérivé hautement réactif (peroxynitrite) a montré l'effet délétère de ces derniers sur les différentes tuniques de l'œil, aussi bien du côté antérieur que du côté postérieur.

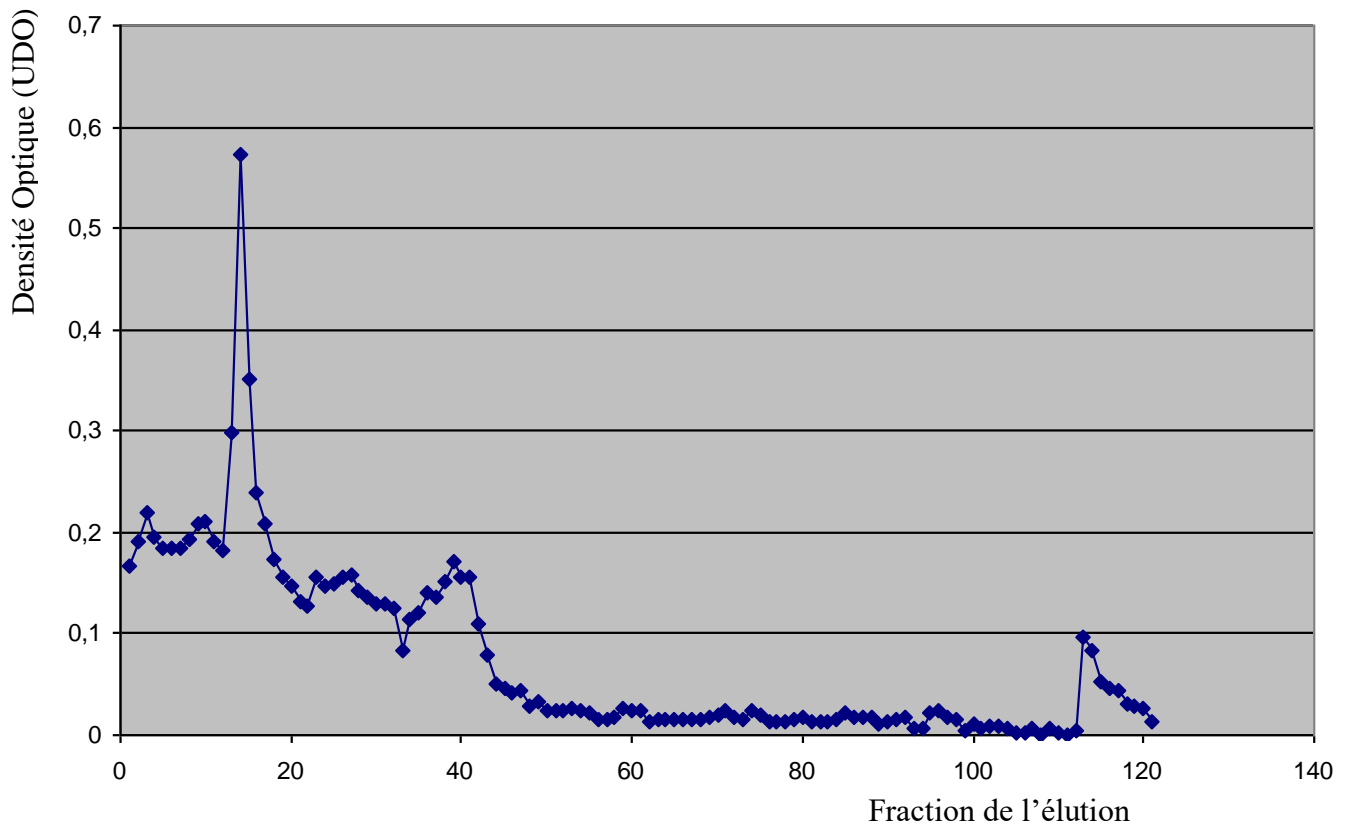
Toutes les structures étudiées ont montré après action des dérivés du NO, à différents degrés, certaines altérations communes:

- Un effet vasodilatateur,
- Une destruction cellulaire et tissulaire,
- Une activation cellulaire spécifique.

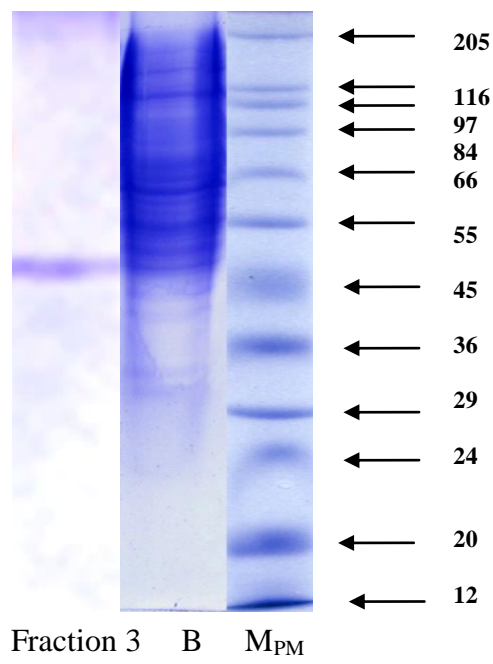
L'amplitude des altérations observées dépend de la nature et de la concentration du dérivé considéré.

En effet, nous avons observé une altération de l'épithélium de la cornée par desquamation ou vacuolisation cytoplasmique, une destruction de l'épithélium des procès ciliaires, une diminution de la densité de la trame conjonctive de l'iris ainsi qu'une vasodilatation des vaisseaux sanguins dans la partie antérieure de l'œil.

Du côté postérieur, la rétine montre une déstructuration de ses couches composantes. De plus, la choroïde, richement vascularisée, montre une vasodilatation plus ou moins importante ainsi qu'un épaissement marqué accompagné d'une forte densité cellulaire. Quoique la sclérotique soit peu ou pas altérée, nous avons remarqué une activation cellulaire au niveau de la trame du tissu conjonctif.



**Figure 18:** Profil de la chromatographie de gel filtration moléculaire sur Séphadex G150 de l'extrait protéique précipité rétinien



**Figure 19 :** Profil électrophorétique de l'extrait brut et de la fraction 3 (Ag S) ( $M_{PM}$  : marqueurs de PM, fraction 3 : profil de la fraction 3 par SDS-PAGE)

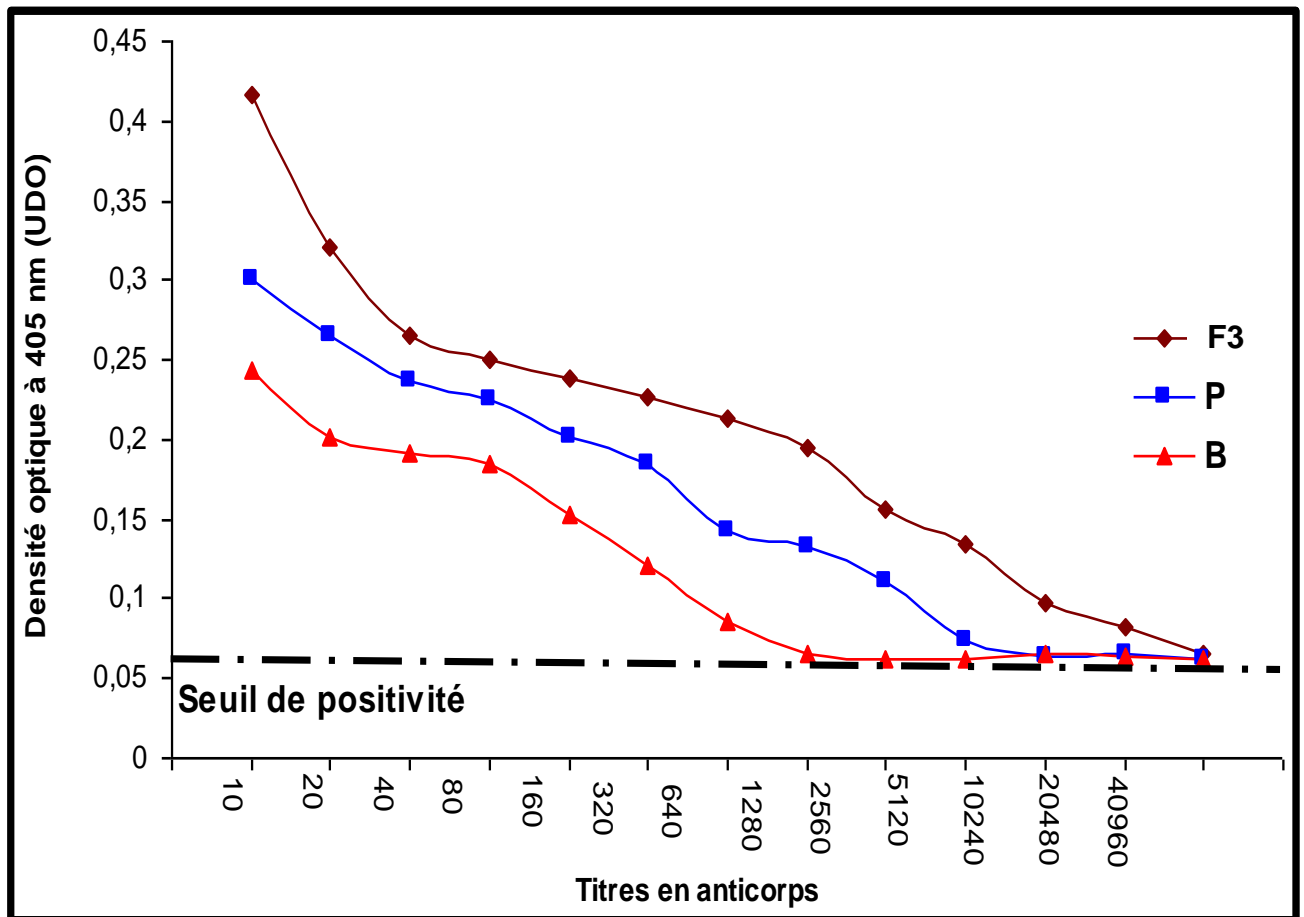


Figure 20 : Caractérisation antigénique par ELISA de l'extrait brut B, de l'extrait précipité et de la fraction F3 obtenue par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G150.

## 1. Etude histologique des cultures « témoin » des explants oculaires :

Les cultures des explants oculaires non traités (témoins) n'ont montré aucune altération avec une organisation générale similaire à celle des tissus sains. En effet, au niveau de la partie antérieure, la cornée présente un épithélium pluristratifié non kératinisé reposant sur une membrane de Bowman, un stroma dense et une membrane de Desmet et un endothélium (Figure 21). De même, le corps ciliaire, en continuité avec la cornée, est constitué d'un tissu conjonctif dense où se retrouve une riche vascularisation (Figure 26). Les procès ciliaires, d'allure homogène et formant des expansions à partir du corps ciliaire, possèdent un épithélium continu, bistratifié, l'un pigmentaire et l'autre non pigmentaire, entourant un stroma conjonctif vascularisé (Figures 27, 28). Relié au corps ciliaire, l'iris présente un épithélium antérieur reposant sur un stroma conjonctif contenant des fibroblastes et des chromatophores. En dessous de cette couche, se trouve une couche de vaisseaux sanguins à paroi très épaisse reposant sur des fibres musculaires qui constituent le sphincter (Figures 22- 25). Par ailleurs, la partie postérieure est composée d'une rétine stratifiée (Figure 29), d'une choroïde riche en vaisseaux sanguins et en cellules pigmentaires (Figure 30) et d'une sclérotique épaisse formée d'un tissu conjonctif très dense contenant quelques cellules pigmentaires (Figure 31).

## 2. Etude histologique de l'action des nitrites sur les explants oculaires bovins *in vitro*:

La mise en culture des explants oculaires en présence des nitrites a induit de nombreuses altérations tissulaires et cellulaires. Ces effets délétères ont touché les différentes tuniques à des degrés différents selon la concentration étudiée et la durée d'incubation.

### a. Effets des nitrites sur les explants oculaires postérieurs :

Les altérations tissulaires au niveau des explants commencent à apparaître au niveau de la rétine dès l'utilisation des concentrations égales à 300  $\mu\text{M}$  de nitrites après 24 h d'incubation. En effet, la rétine présente un aspect de désorganisation structurale similaire à celle que nous avons observée antérieurement (Belguendouz, 2005; Hartani *et al.*, 2006). Cet effet s'accroît avec la concentration utilisée et la durée d'incubation. Un effet maximal est observé au bout de 48h d'incubation (Figures 34, 36, 38, 39, 42, 43, 47, 48 et 51).

La choroïde montre des modifications structurales à des concentrations supérieures ou égales à 400  $\mu\text{M}$  (Figures 45- 48). Ces modifications correspondent à de très importantes vasodilatations accompagnées d'une augmentation de l'épaisseur de la choroïde. Au niveau des cultures de 48h, les

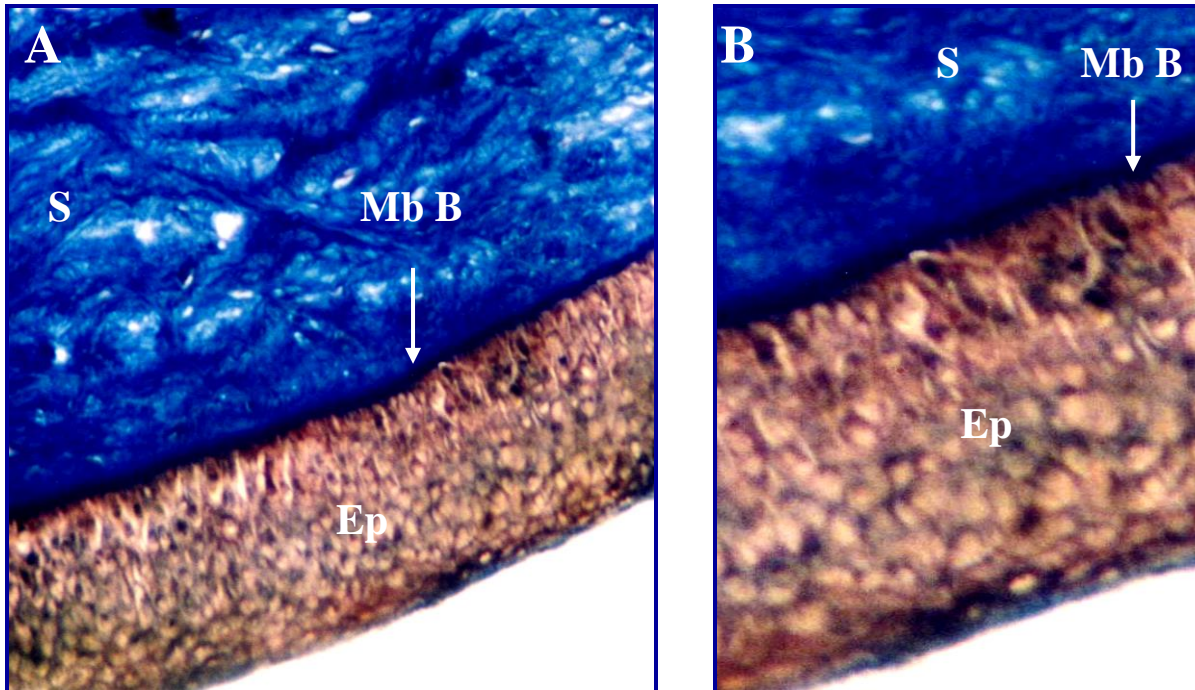


Figure 21: Coupe transversale au niveau de la cornée d'un œil sain. L'épithélium (Ep) est pluristratifié reposant sur la membrane de Bowman (Mb B). Le stroma (S) possède un aspect homogène avec des couches superposées liées entre elles. (A : Gx 20, B : G x 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

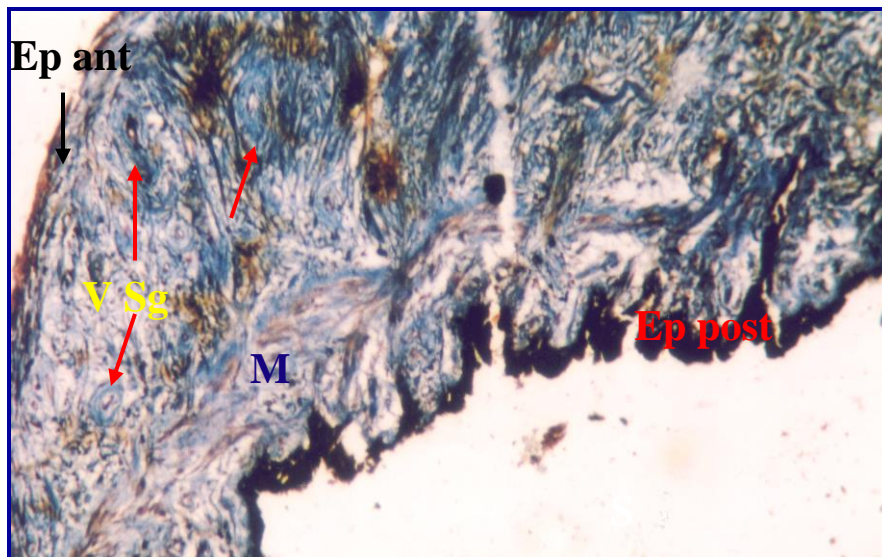


Figure 22 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'un œil sain. L'iris est bordé par deux épithéliums antérieur fin (Ep ant) et postérieur fortement pigmenté (Ep post). Le corps de l'iris est formé par du tissu conjonctif contenant des fibroblastes et des mélanocytes. Il abrite également des vaisseaux sanguins (V Sg) à paroi assez épaisse. Les fibres musculaires lisses (M) forment le sphincter et le muscle dilatateur. (Gx 20, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

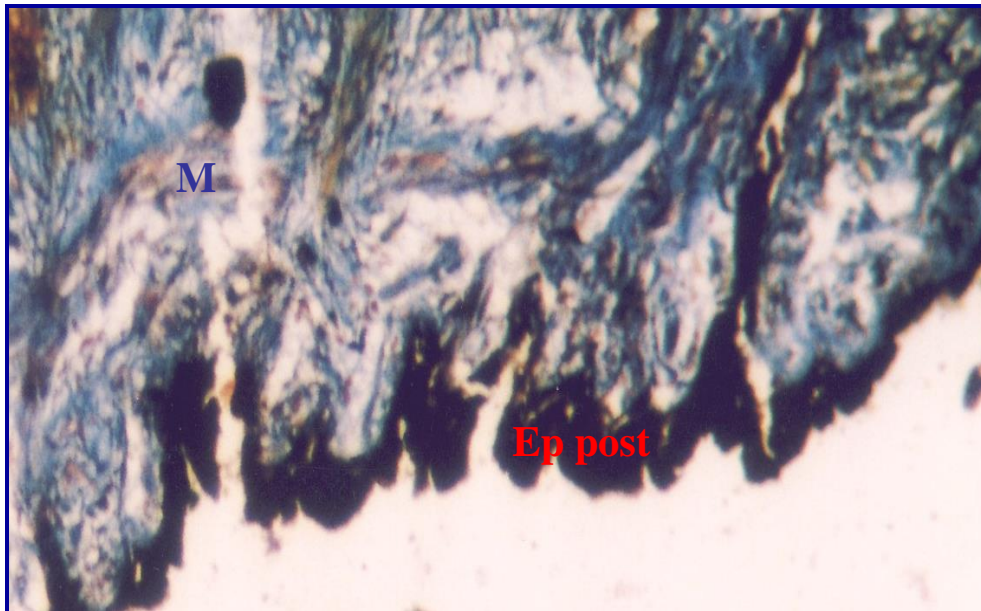


Figure 23 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'un œil sain. Détail de la partie postérieure de l'iris montrant l'aspect irrégulier de l'épithélium postérieur (Ep post) et très pigmenté. (G x 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

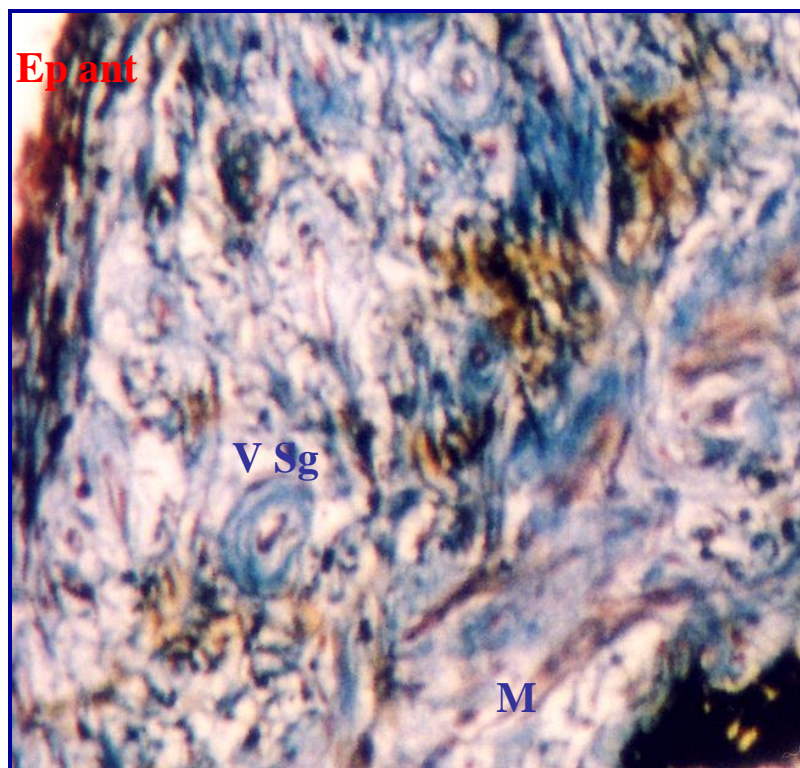
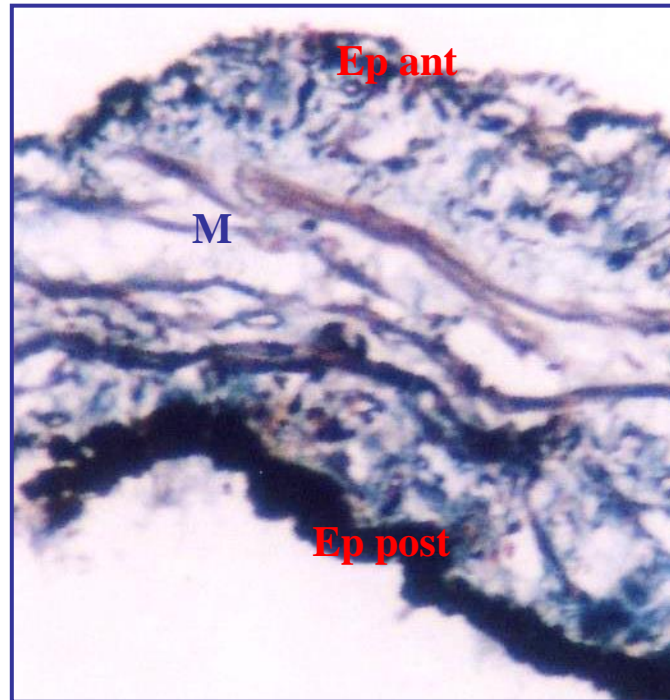
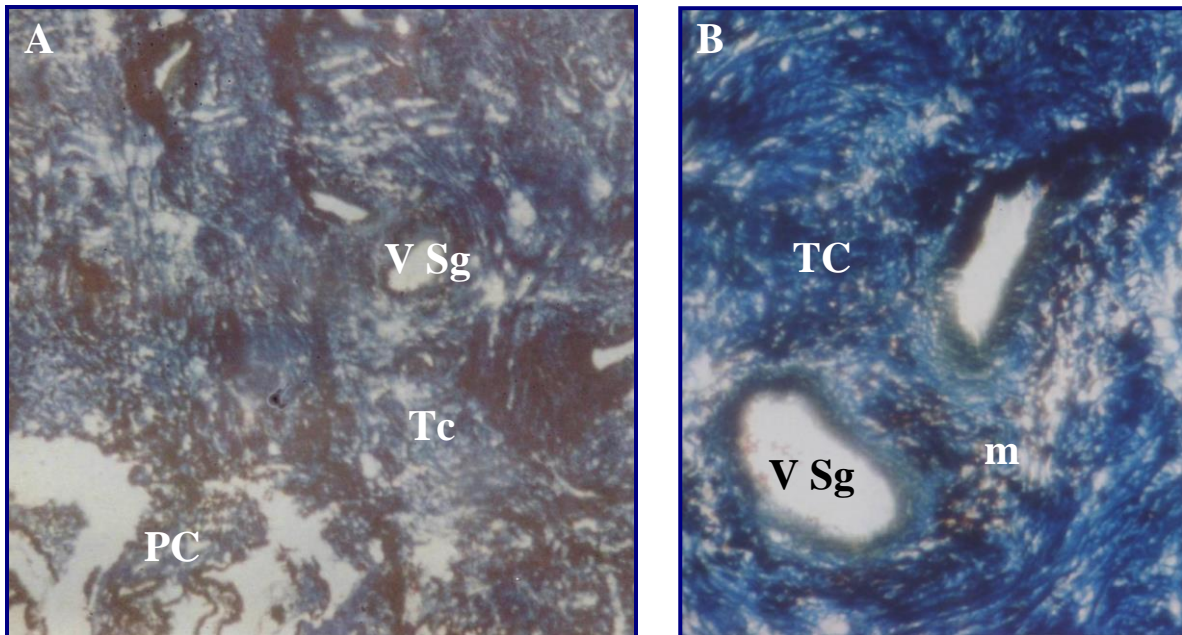


Figure 24 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'un œil sain. Détail de la partie antérieure de l'iris montrant l'épithélium antérieur (Ep ant) formé d'une fine couche de cellule sous-tendue par une trame conjonctive où se logent des vaisseaux sanguins (V Sg) à paroi épaisse . (Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



**Figure 25 :** Coupe transversale au niveau de l'extrémité distale de l'iris d'un œil sain. Les fibres musculaires lisses (M) formant le sphincter et le muscle dilatateur sont continues jusqu'à l'extrémité de l'iris afin de régler l'ouverture de la pupille. (Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



**Figure 26 :** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'un œil sain en vue générale (A). Il est formé par du tissu conjonctif (Tc) abritant des vaisseaux sanguins (V Sg) et donnant des prolongements axiaux pour former les procès ciliaires (PC) (G x 5, fixateur Verhoeff, coloration Mallory). (B) Détail d'une partie du corps ciliaire montrant les fibres collagènes orientées Tc de façon circulaire autour des vaisseaux et la présence de quelques mélanocytes (m) (G x 20, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

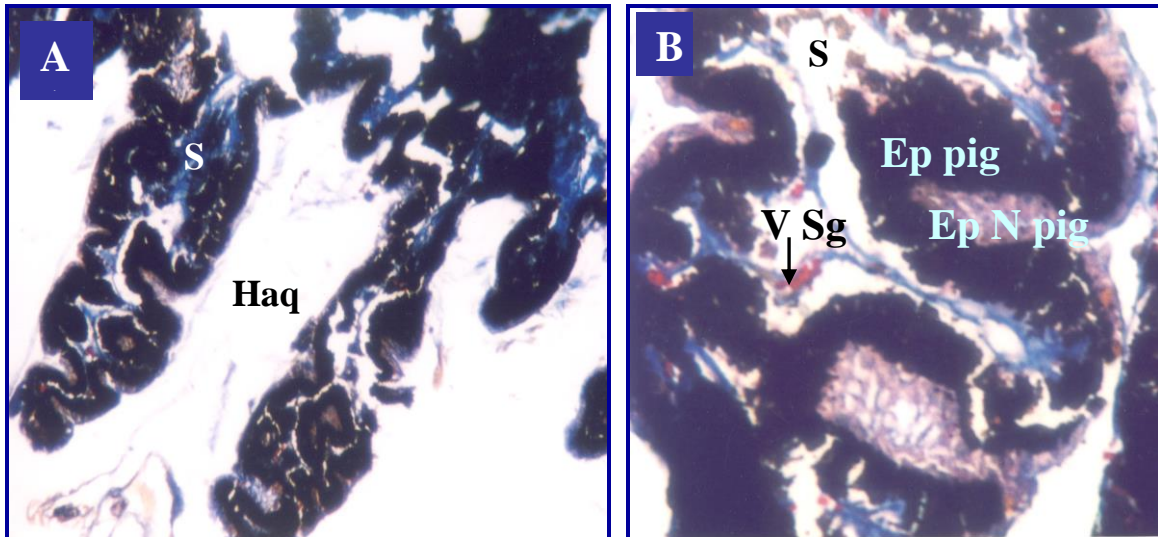


Figure 27 : Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'un œil sain en vue générale (A). Elles sont sous forme de villosités en continuité avec le corps ciliaire baignant dans l'humeur aqueuse (Haq) (G x 10, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).(B) Détail d'un procès ciliaire montrant les deux couches épithéliales l'une très colorée pigmentaire (Ep pig) et l'autre claire non pigmentaire (Ep N pig). Dans l'axe (S) du procès ciliaire se trouve du tissu conjonctif vascularisé (V Sg).

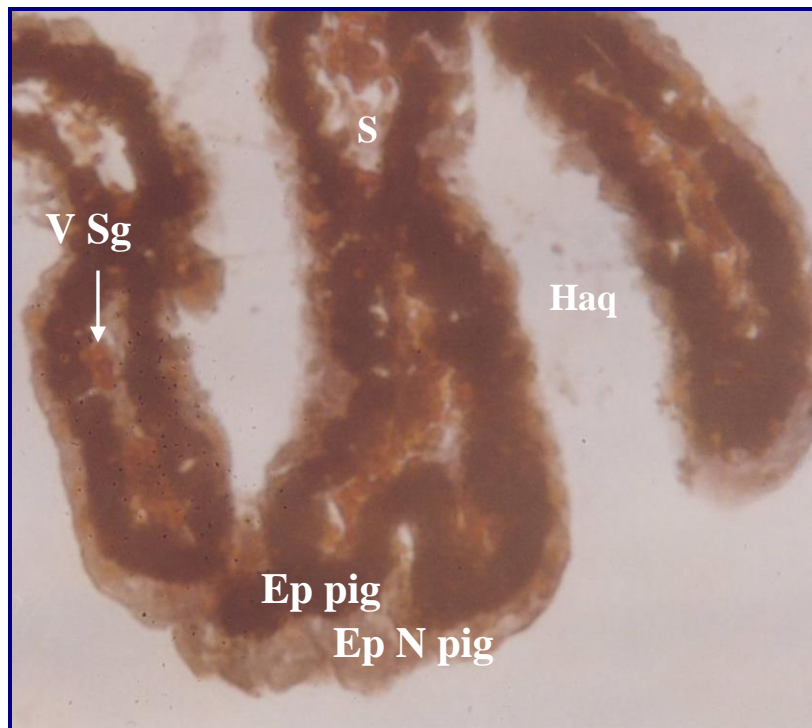
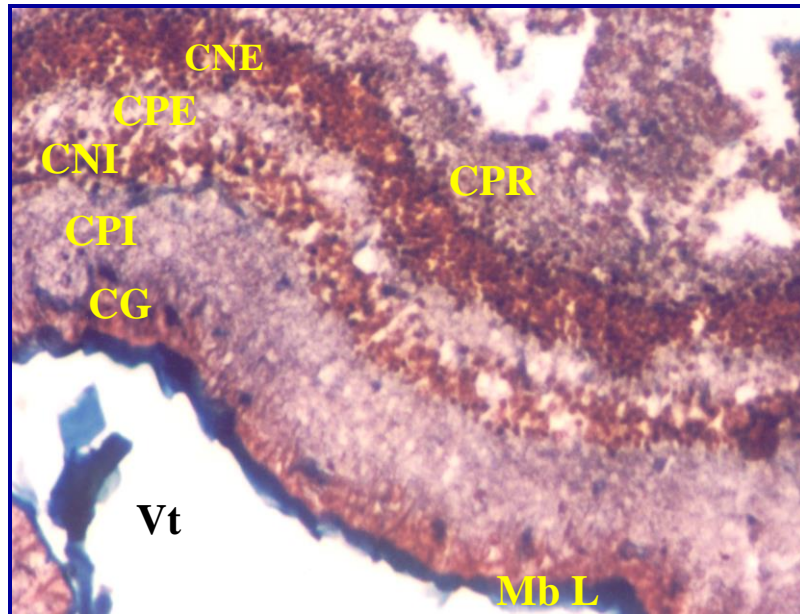
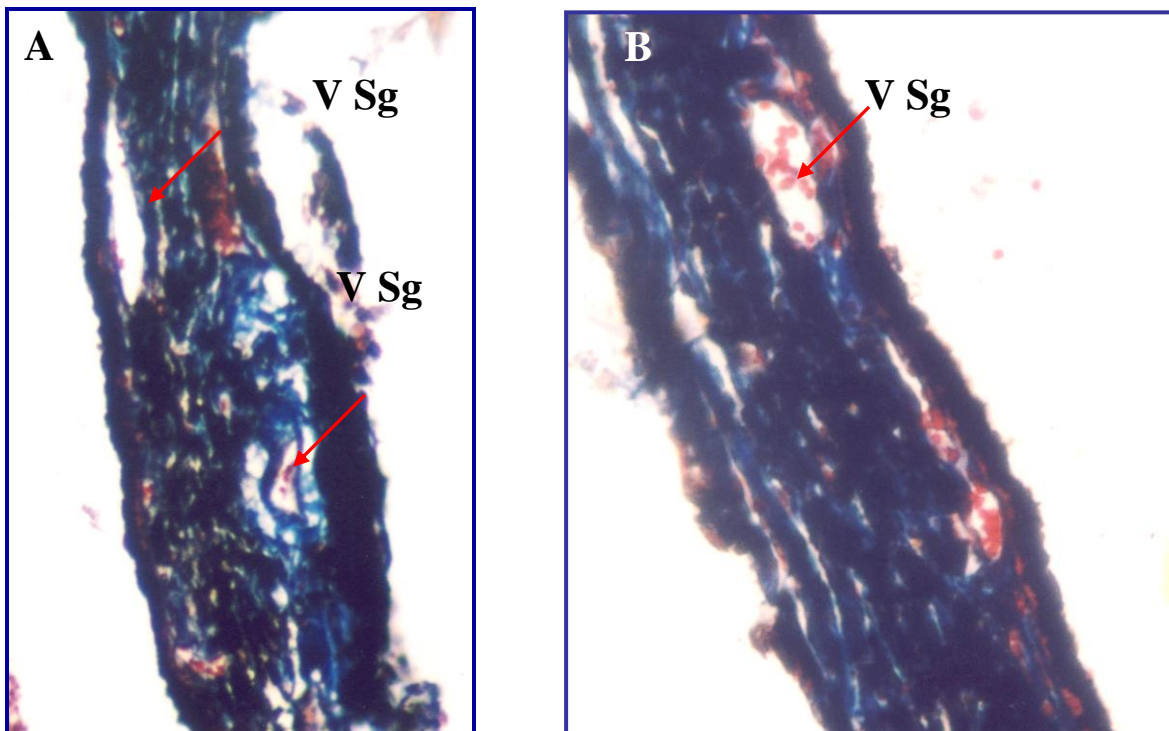


Figure 28 : Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'un œil sain. Détail d'un procès ciliaire au fort grossissement montrant ses deux couches épithéliales pigmentaire (Ep pig) et non pigmentaire (Ep N pig) entourant un tissu conjonctif (S) vascularisé (V Sg). (Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

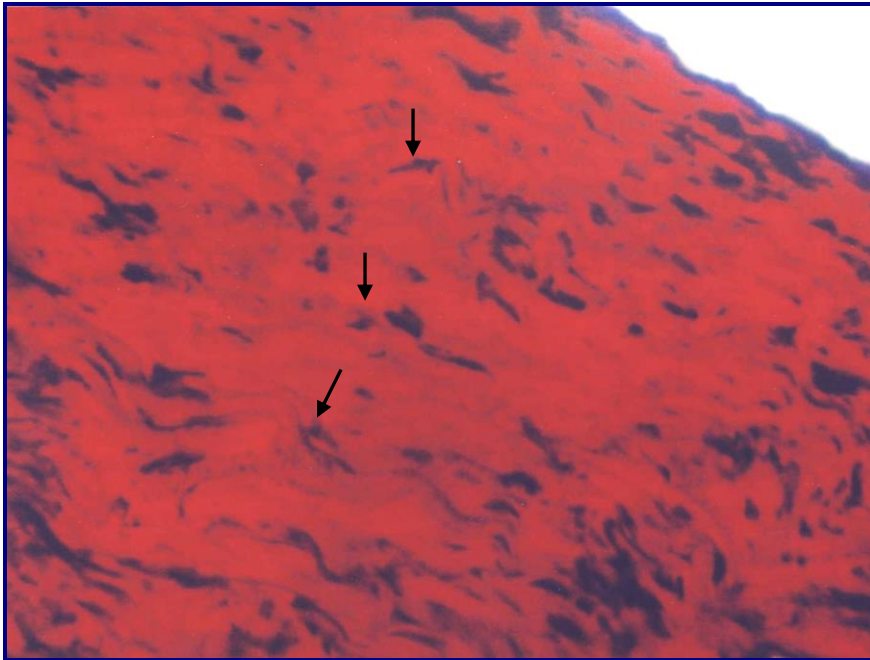




**Figure 29 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'un œil sain. La rétine présente une structure stratifiée limitée extérieurement par une membrane limitante (Mb L) en contact avec le vitré (Vt).(CG :couche ganglionnaire, CPI : couche plexiforme interne, CNI : couche nucléaire interne, CPE : couche plexiforme externe, CNE : couche nucléaire externe, CPR : couche des photorécepteurs). (Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



**Figure 30:** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'un œil sain. C'est une couche caractérisée par sa richesse en cellules pigmentaires, ce qui lui confère cet aspect très dense. Elle est riche en vaisseaux sanguins (V Sg). ((A) Gx 20, (B) Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



**Figure 31:** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'un œil sain. La sclérotique est formée de fibres collagènes disposées en faisceaux agencés parallèlement entre lesquelles se trouvent les fibroblastes fusiformes reconnaissables par leur noyau (→). Quelques fois, ces faisceaux se divisent et s'entrecroisent. (Gx 40, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

cellules se détachent en association avec les fibres collagène formant des lanières. De plus, les vaisseaux sanguins montrent une vasodilatation qui peut aller jusqu'à leur éclatement (figures 47, 48).

La sclérotique semble ne pas être affectée histologiquement par l'action des nitrites quelle que soit la concentration utilisée et/ou la durée d'incubation. Cependant, nous avons remarqué une activation cellulaire par rapport aux cultures témoins. Ces cellules activées sont essentiellement retrouvées du côté de la choroïde et autour des vaisseaux sanguins (figures 51-53).

#### **b. Effets des nitrites sur les explants oculaires antérieurs :**

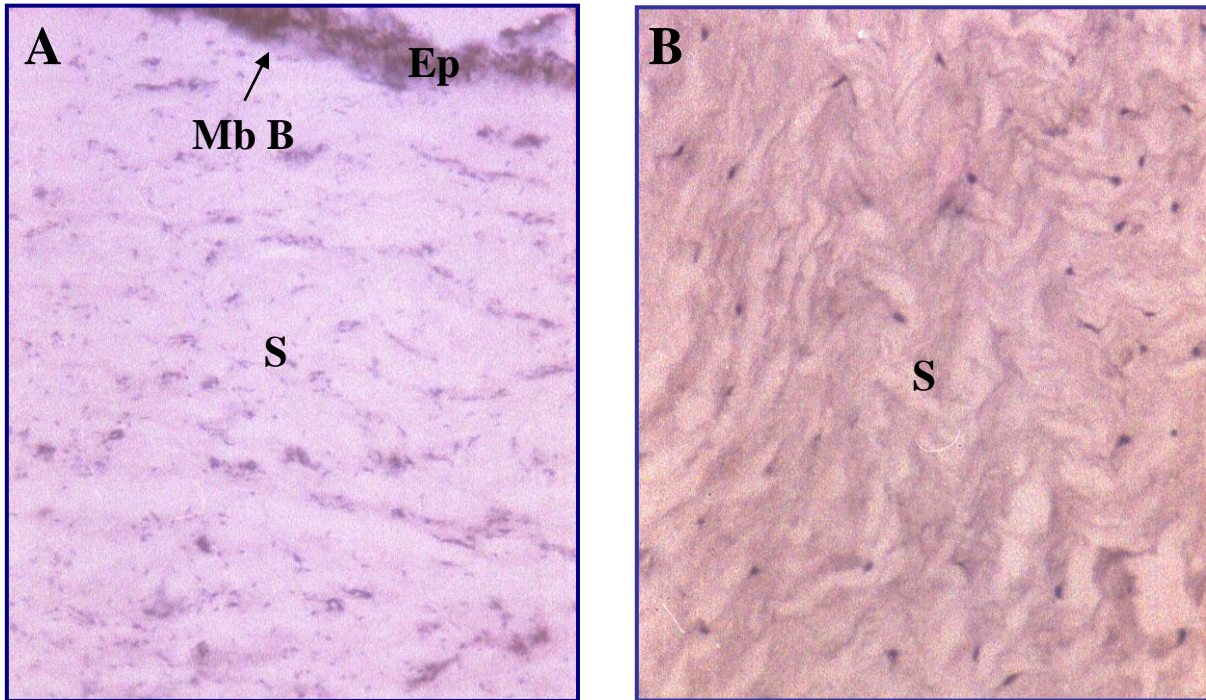
Le côté antérieur est également touché. La sensibilité des différents composants semble être liée au type tissulaire concerné.

L'épithélium cornéen se décolle de la membrane de Bowman montrant des cellules superficielles qui se détachent (desquamantes) à partir de la concentration 400  $\mu\text{M}$  après 24 h d'incubation (Figure 33). A plus forte concentration, l'épithélium montre une désorganisation générale avec apparition de cellules de petites tailles présentant une vacuolisation cytosolique et une libération de cellules de forme sphérique (Figure 35). Le stroma cornéen est également affecté avec une légère dissociation des fibres conjonctives qui serait due soit à un oedème ou à une rétraction des fibres collagènes entre elles (Figure 36). Ce phénomène est associé à des altérations cellulaires touchant les fibroblastes. Ces derniers sont moins fusiformes avec des noyaux plus denses à partir de la concentration 300  $\mu\text{M}$  après 48 h d'incubation (Figure 32).

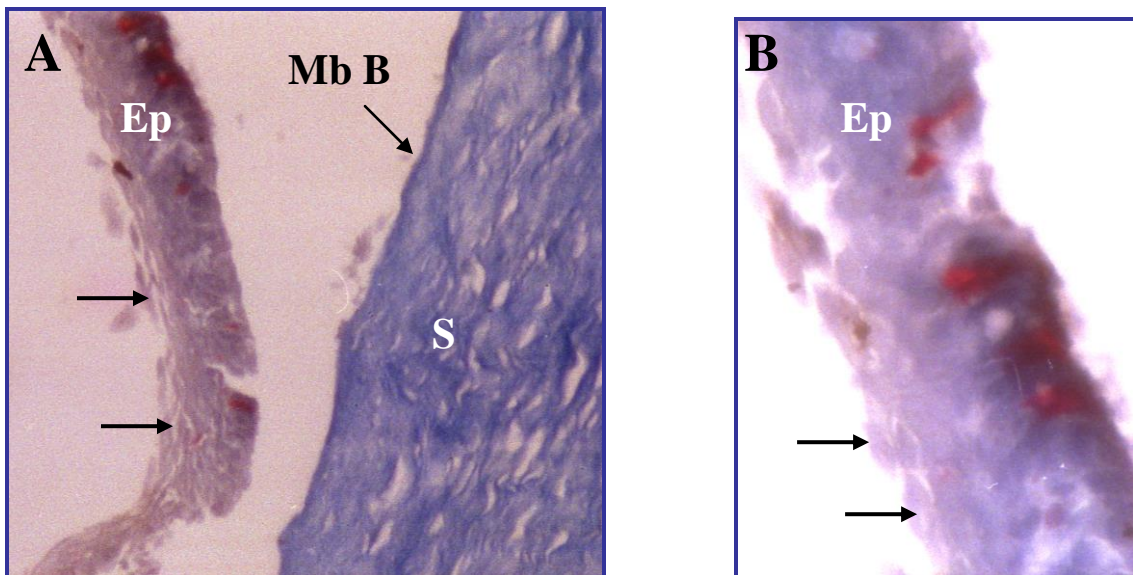
Les modifications structurales touchent également les procès ciliaires. En effet, ces derniers perdent, en premier lieu, leur épithélium non pigmenté par éclatement cellulaire en corrélation avec la concentration utilisée débutant à 300  $\mu\text{M}$  après 24h d'incubation (Figure 40). En effet, des fractions de membranes ont été observées à cette étape d'incubation. En revanche, l'épithélium pigmentaire n'est sensible à l'action des nitrites qu'à très forte concentration (Figure 42). Le tissu conjonctif ne semble pas être affectée.

L'iris est affecté par le traitement avec les nitrites : selon leur concentration, ces derniers induisent des lésions au niveau de l'épithélium (à 400  $\mu\text{M}$  après 24h d'incubation), la trame conjonctive devient lâche et le sphincter irien est pratiquement absent à 500  $\mu\text{M}$  après 48 h d'incubation (Figures 38, 39).

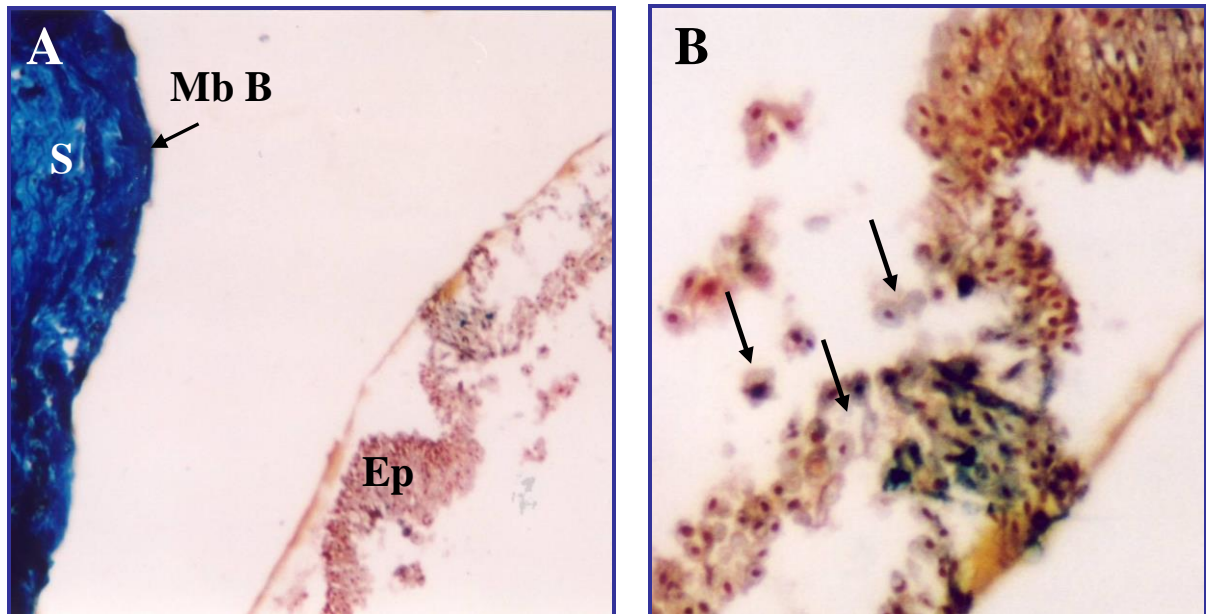
L'action des nitrites sur le corps ciliaire n'induit pas d'altérations structurales. Cependant, une activation et/ou infiltration de cellules activées est notée (Figures 40, 41). Nous avons noté avec intérêt une affluence leucocytaire.



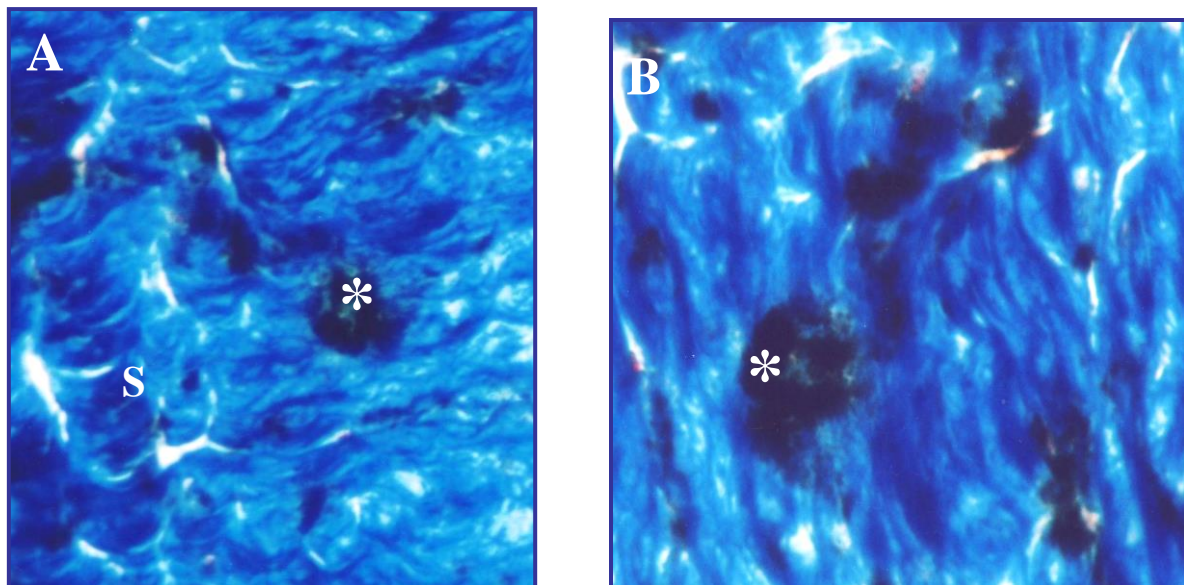
**Figure 32 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 300  $\mu\text{M}$  pendant 48h. L'épithélium (Ep) est pluristratifié reposant sur la membrane de Bowman (Mb B). Le stroma (S) possède un aspect homogène avec des couches superposées liées entre elles. ((A) Gx 20, (B) Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 33 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 24h. L'épithélium (Ep) est pluristratifié détaché de la membrane de Bowman (Mb B) avec des cellules superficielles desquamées ( $\rightarrow$ ). Le stroma (S) possède un aspect homogène avec des couches superposées liées entre elles. ((A) Gx 20, (B) Gx 40 fixateur formol, coloration Mallory).



**Figure 34 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48h. L'épithélium (Ep) détaché de la membrane de Bowman (Mb B) est déstructuré avec détachement des cellules entre elles ( $\rightarrow$ ). Le stroma (S) possède un aspect homogène. (Gx 10, fixateur formol, coloration Mallory).



**Figure 35 :** Coupe transversale au niveau de l'extrémité de la cornée d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Le stroma (S) possède un aspect homogène avec des cellules présentant des granulations denses (\*). (Gx 20, Gx 40, fixateur formol, coloration Mallory).

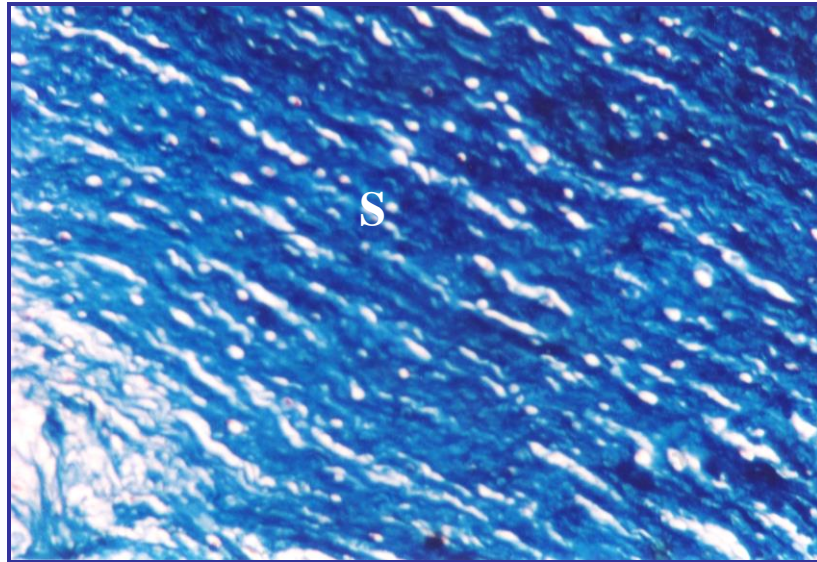


Figure 36: Coupe transversale au niveau du stroma d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Les faisceaux des fibres collagènes du stroma (S) ne sont pas adhérents entre eux. (Gx 10, fixateur formol, coloration Mallory).

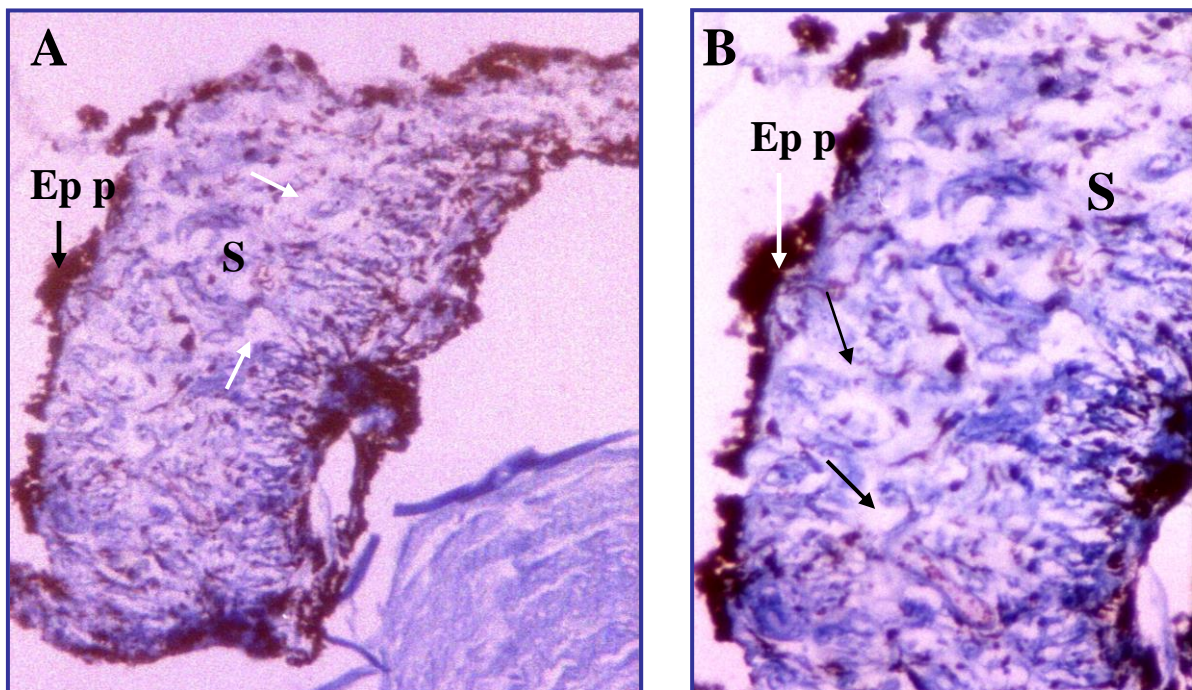


Figure 37: Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 24h. L'épithélium postérieur (Ep p) est altéré. Le stroma (S) possède un tissu conjonctif assez lâche ( $\rightarrow$ ). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).

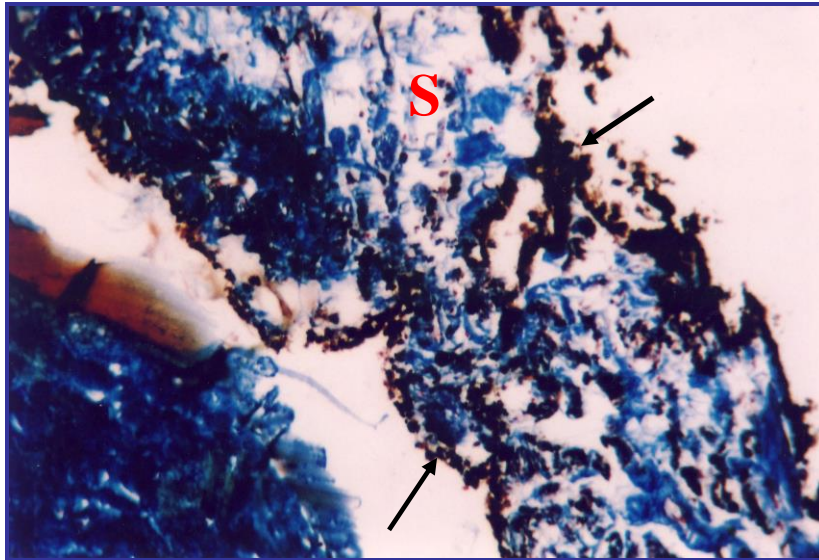


Figure 38 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Les deux épithéliums ( $\rightarrow$ ) de l'iris sont altérés et détachés du corps de ce dernier. Le stroma (S) possède une trame très lâche de tissu conjonctif. (Gx 10, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).

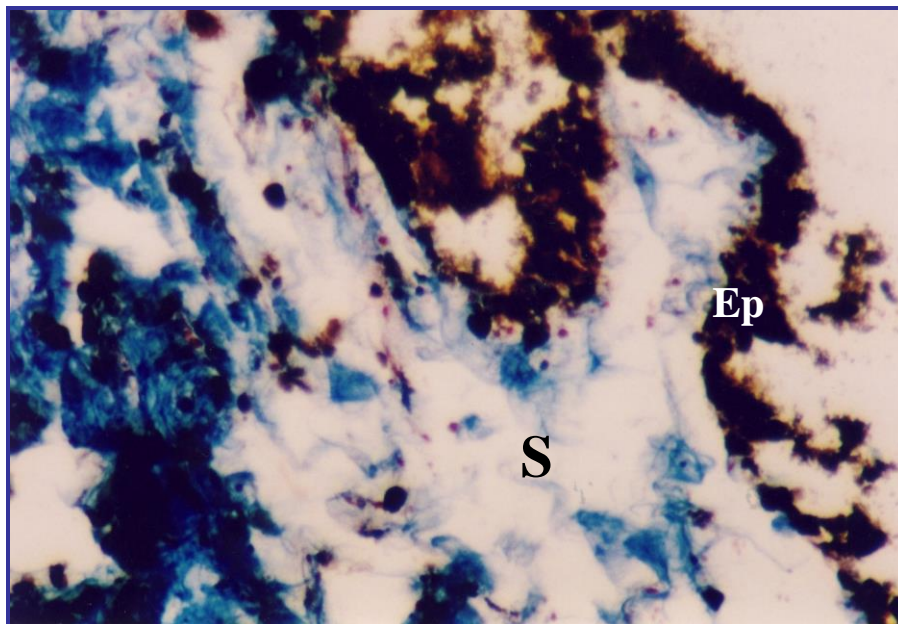
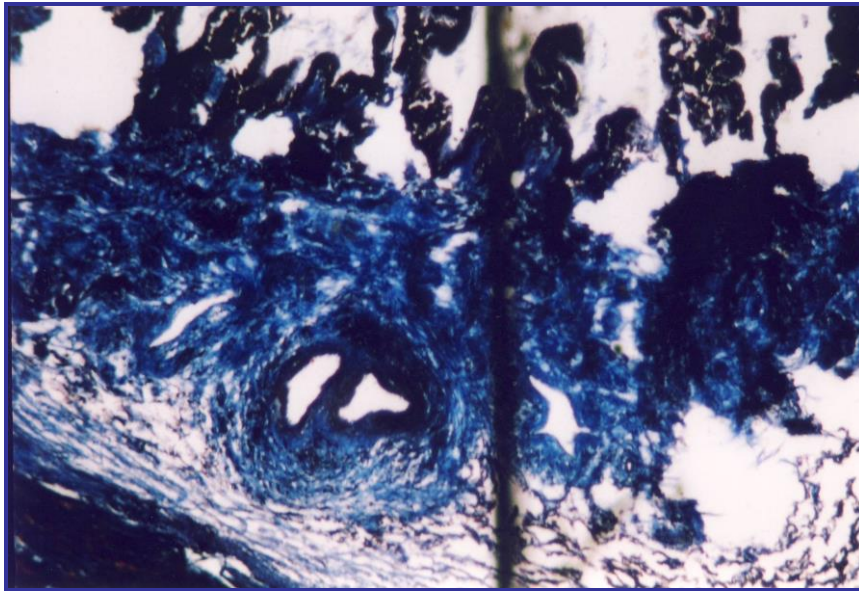
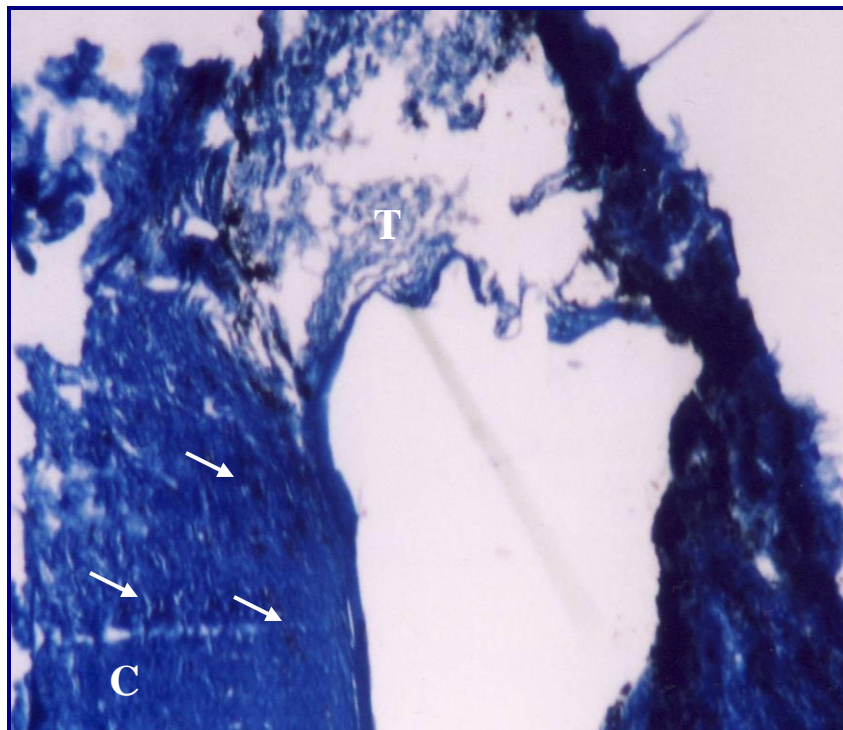


Figure 39 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Détail de l'épithélium (Ep) altéré et de la trame conjonctive qui montre des vides entre les fibres collagènes. (Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).

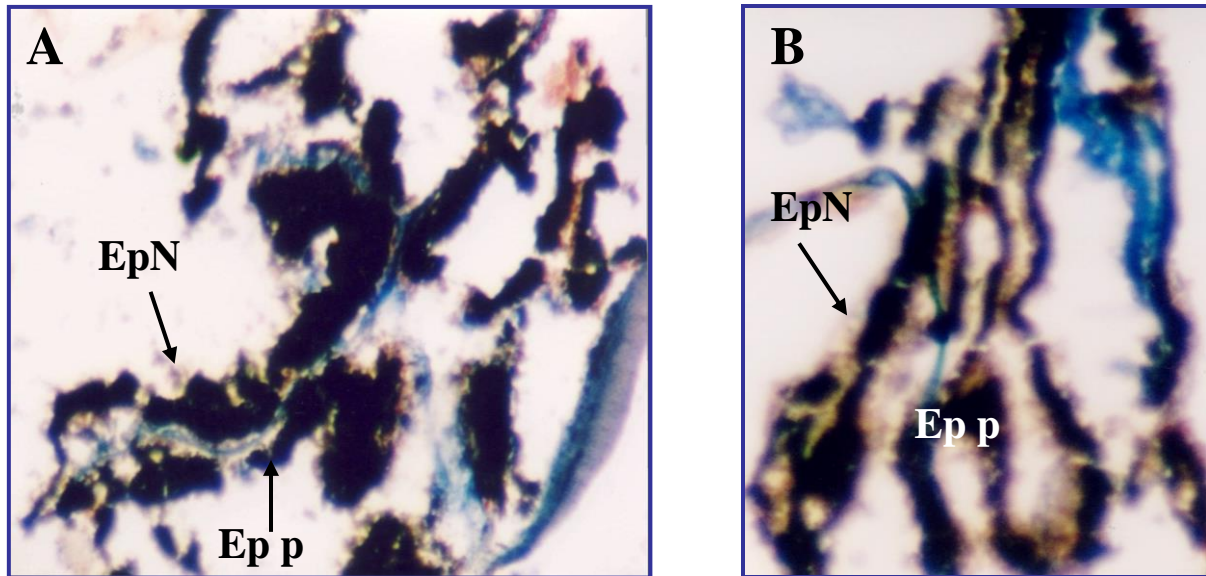


**Figure 40 :** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 300  $\mu$ M pendant 48h. Aspect général du corps ciliaire. (Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).

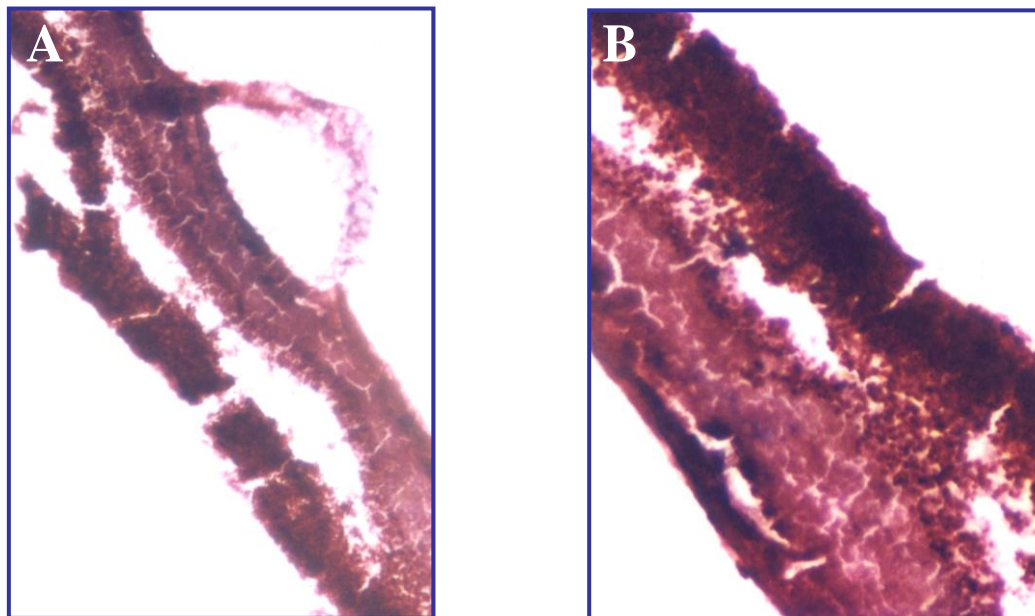


**Figure 41 :** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 300  $\mu$ M pendant 48h. Quelques activités ( $\rightarrow$ ) sont observées au niveau de la cornée (C) dans la région à proximité du réseau trabéculaire (T) . (Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).

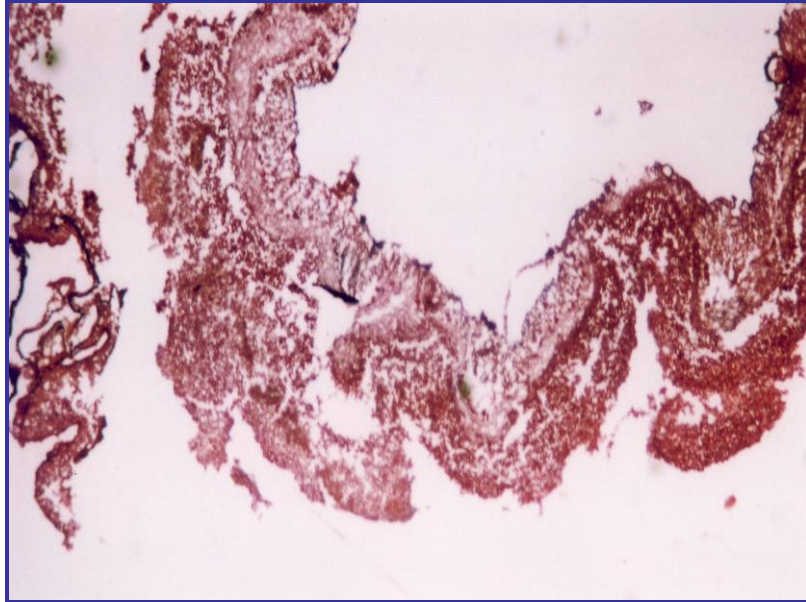




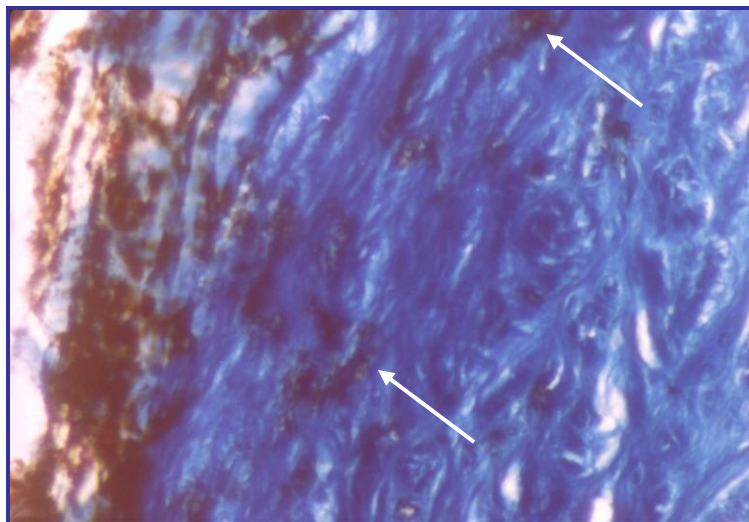
**Figure 42 :** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 300  $\mu\text{M}$  pendant 48h. L'épithélium non pigmentaire (EpN) est complètement altéré et les cellules de l'épithélium pigmentaire (Ep p) ne le sont pas mais la structure de ce dernier l'est légèrement. (Gx 40, fixateur formol, coloration Mallory).



**Figure 43 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Destruction des différentes couches composant la rétine. ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 44 : Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu$ M pendant 24h. La structure de la rétine est altérée. (Gx 5, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).**



**Figure 45 : Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu$ M pendant 24h. Quelques cellules (→) sont faiblement activées. (Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).**

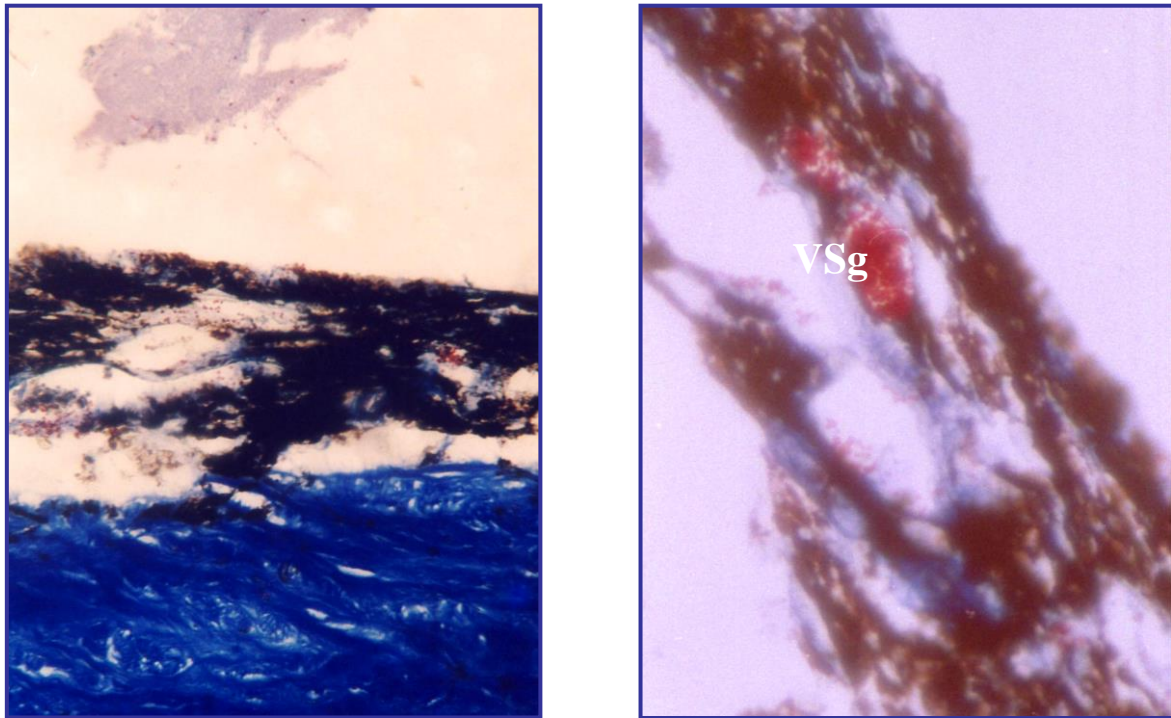


Figure 46 : Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48h. L'épaisseur de la choroïde n'est pas très augmentée. Les vaisseaux sanguins (VSg) montrent une vasodilatation. (Gx 20, fixateur formol, coloration Mallory).

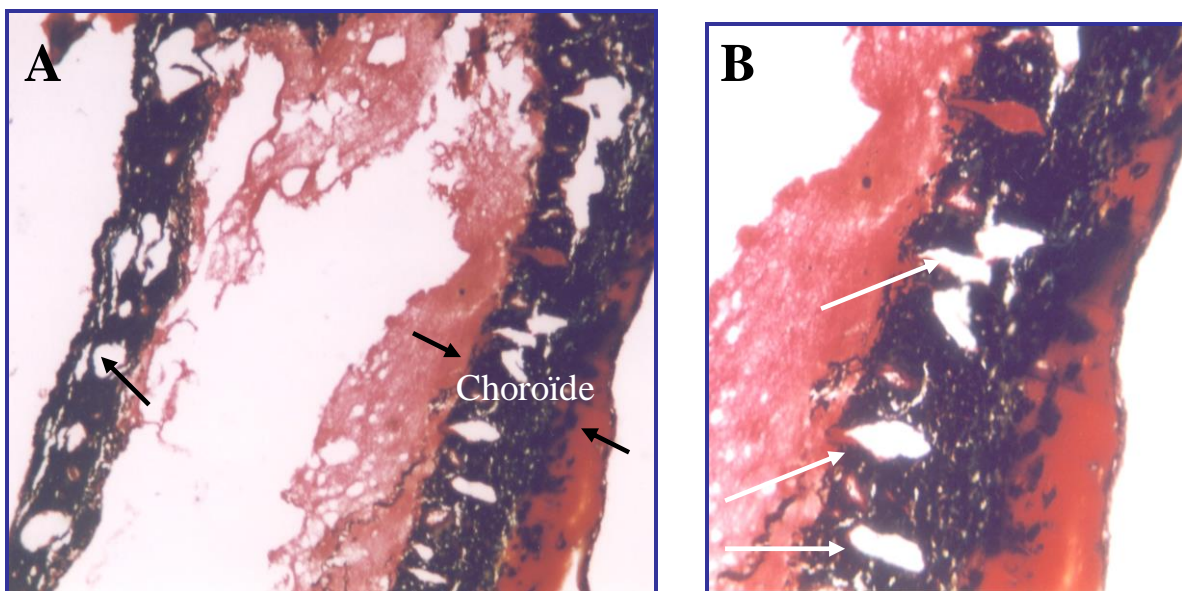
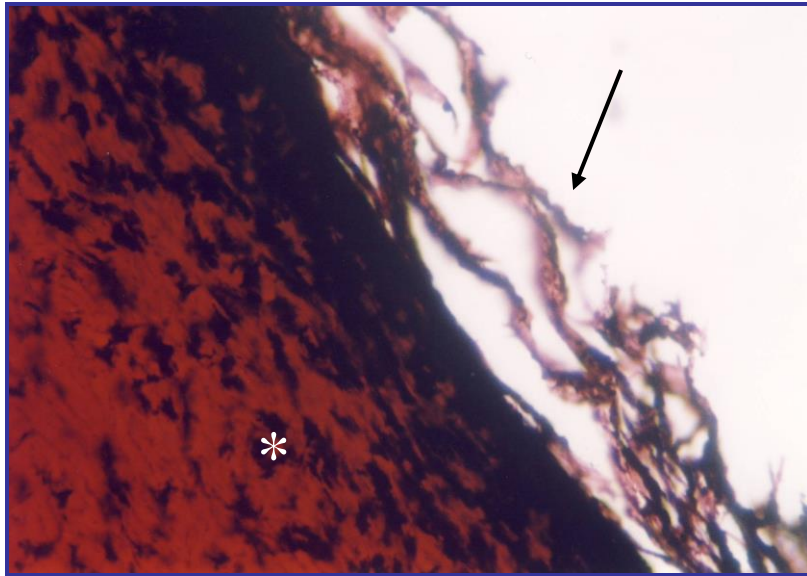
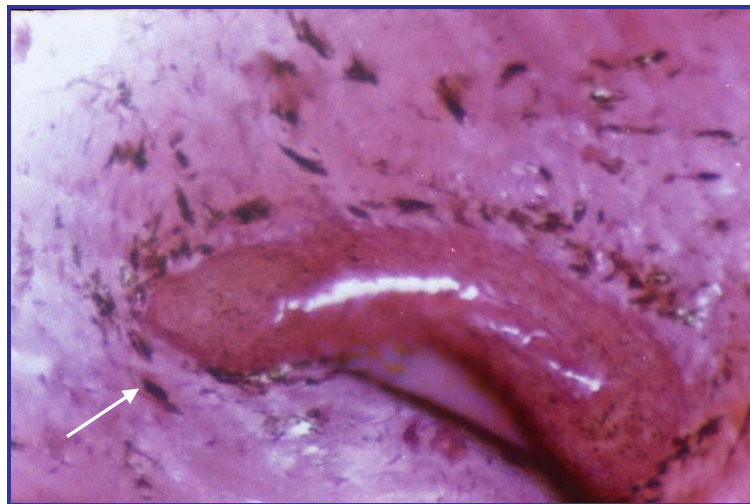


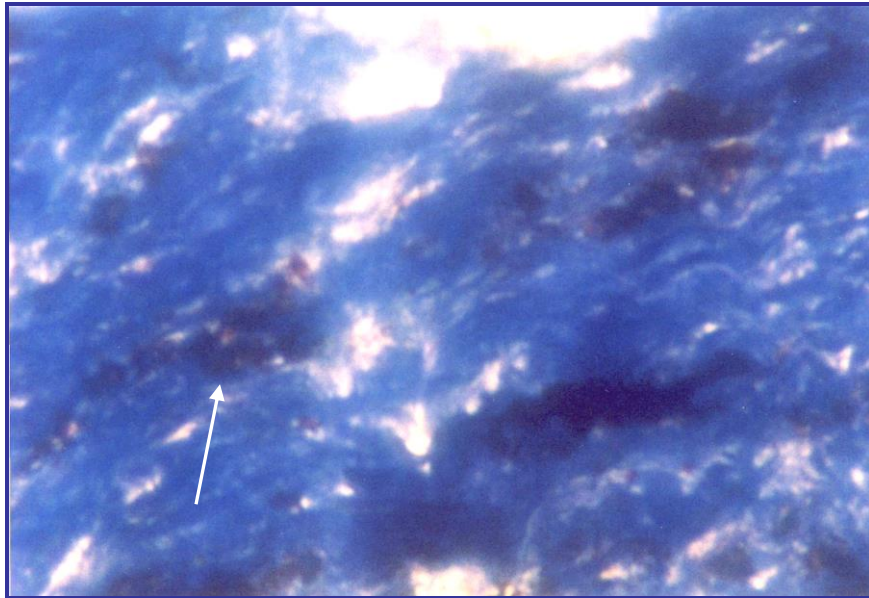
Figure 47 : Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 24h. L'épaisseur de la choroïde augmente et une vasodilatation (VSg) marquée est observée ( $\rightarrow$ ). ((A) Gx 5, (B) Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



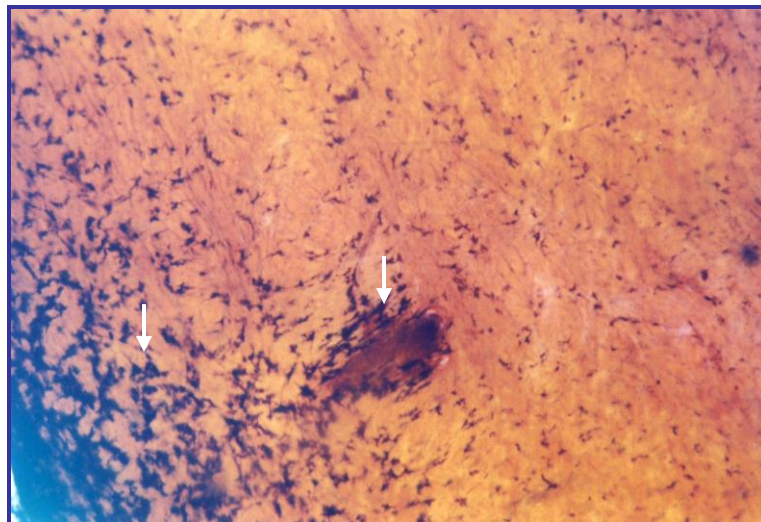
**Figure 48 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Cette dernière lésée montre un aspect en lanières détachées ( $\rightarrow$ ). Une forte concentration de cellules activées est présente au niveau de cette structure (\*) (Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



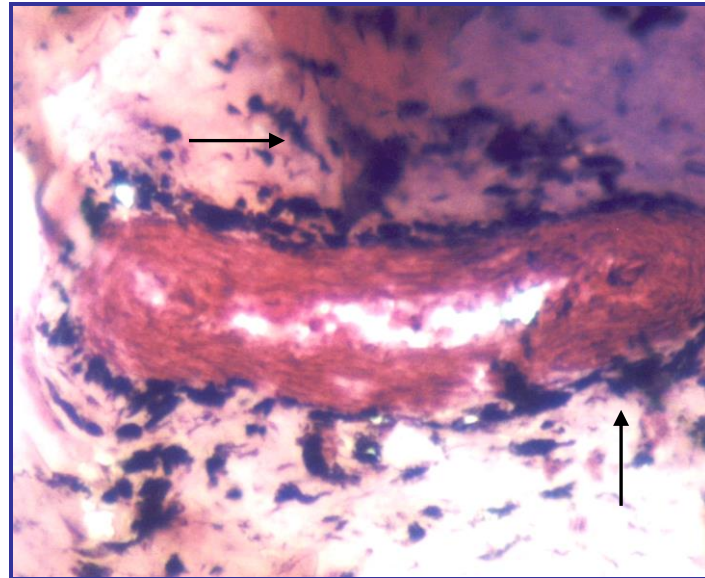
**Figure 49 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 300  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Détail d'un vaisseau sanguin entouré de quelques cellules activées ( $\rightarrow$ ). (Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



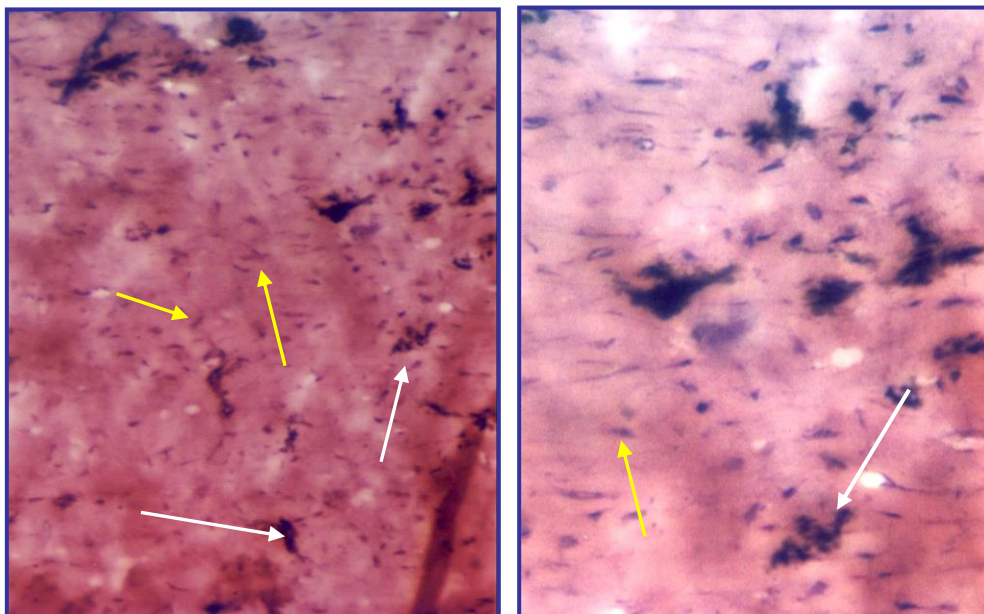
**Figure 50 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 400  $\mu\text{M}$  pendant 48h montrant des cellules activées ( $\rightarrow$ ) présentant des granulations denses . (Gx 40, fixateur formol, coloration Mallory).



**Figure 51 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Les fibres collagènes sont homogènes. Des cellules à aspect étoilées et dense à la coloration ( $\rightarrow$ ) sont présentes en nombre important près de choroïde et des vaisseaux sanguins. (Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 52 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu$ M pendant 48h. Détail d'un vaisseau sanguin entouré de cellules activées ( $\rightarrow$ ). (Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 53 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des nitrites à une concentration de 500  $\mu$ M pendant 48h. Elle montre une activation cellulaire ( $\rightarrow$ ) autre que les fibroblastes ( $\rightarrow$ ). Les faisceaux de fibres collagènes restent intacts. (Gx 20, fixateur formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

### **3. Etude histologique de l'action des nitrates sur les explants oculaires bovins *in vitro*:**

Le traitement *in vitro* d'explants oculaires avec les nitrates montre des effets similaires que ceux observés avec les nitrites (Figures 54, 59, 51, 70, 73 et 78). Cependant, les concentrations induisant une même altération tissulaire peuvent être égales ou supérieure à celles des nitrites en fonction de la structure étudiée.

Par ailleurs, nous avons noté que les nitrates semblaient avoir un effet vasodilatateur plus important que celui des nitrites, notamment au niveau des iris et des procès ciliaires (Figures 63, 70).

#### **a. Effets des nitrates sur les explants oculaires postérieurs :**

Les altérations tissulaires au niveau des explants commencent à apparaître au niveau de la rétine dès l'utilisation des concentrations égales à 300  $\mu\text{M}$  de nitrates après 24 h d'incubation. En effet, la rétine présente un aspect de désorganisation structurale similaire à celle que nous avons observée avec les nitrites. Cet effet augmente avec la concentration utilisée et la durée d'incubation. Un effet maximal est observé au bout de 48h d'incubation (Figures 75, 76, 79).

Les explants mis en incubation avec les nitrates pendant 48 h montrent une altération totale de la choroïde qui pratiquement n'existe plus. D'ailleurs, macroscopiquement, cette dernière se fragmente et se détache de la sclérotique. Ce phénomène serait dû à une importante vasodilatation qui aurait fait éclater cette couche (Figures 78, 79).

La sclérotique semble ne pas être affectée histologiquement par l'action des nitrates quelque soit la concentration utilisée et/ou la durée d'incubation. Cependant, une activation cellulaire moins importante que celle remarquée avec les nitrites est à relever (Figures 73, 74).

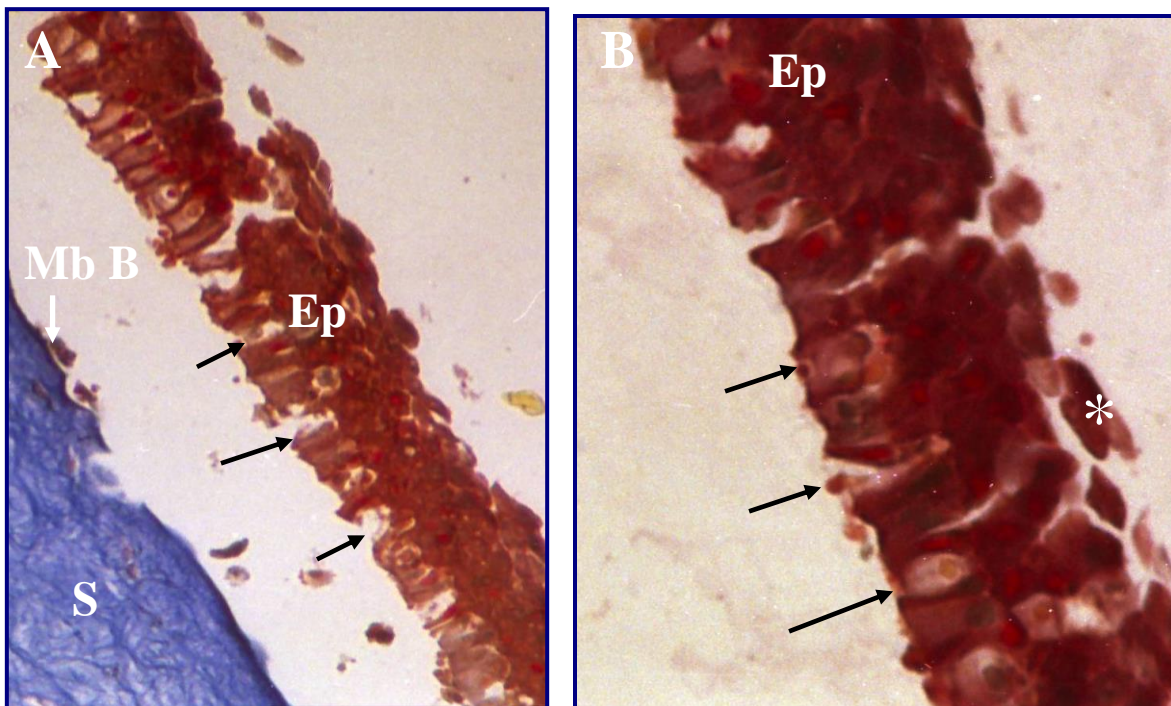
#### **b. Effets des nitrates sur les explants oculaires antérieurs :**

À partir de la concentration 300  $\mu\text{M}$  et après 24 h d'incubation, les lésions touchant la cornée ont montré que l'épithélium cornéen se détache de la membrane de Bowman, garde son aspect pluristratifié mais les cellules superficielles présentent un aspect aplati et se décollent de l'ensemble de la couche (Figure 54). Certaines cellules de la couche basale de l'épithélium cornéen montre de petit noyau et une vacuolisation cytoplasmique. A la concentration 400  $\mu\text{M}$  et après le même temps d'incubation, l'épithélium montre un aspect altéré, les cellules superficielles se détachent et ont une forme arrondie alors que les cellules de la couche basale gardent leur forme allongée (Figure 56). Toutes les cellules de l'épithélium cornéen, après incubation de 48h avec

300  $\mu\text{M}$  de nitrates, montrent une forme arrondie et lui donnent un aspect déstructuré (Figures 55, 57, 59). De plus, la vacuolisation cytosolique est observée pour la concentration 400  $\mu\text{M}$  après incubation de 48 h, une concentration de 500  $\mu\text{M}$  pour une même durée d'incubation, montre des cellules épithéliales individuelles, toutes détachées les unes des autres et un noyau très dense (Figure 58). Le stroma présente des altérations structurales à 500  $\mu\text{M}$  et de 24 h d'incubation, ce changement se manifeste par une dissociation des fibres collagène laissant des espaces entre elles (Figure 60).

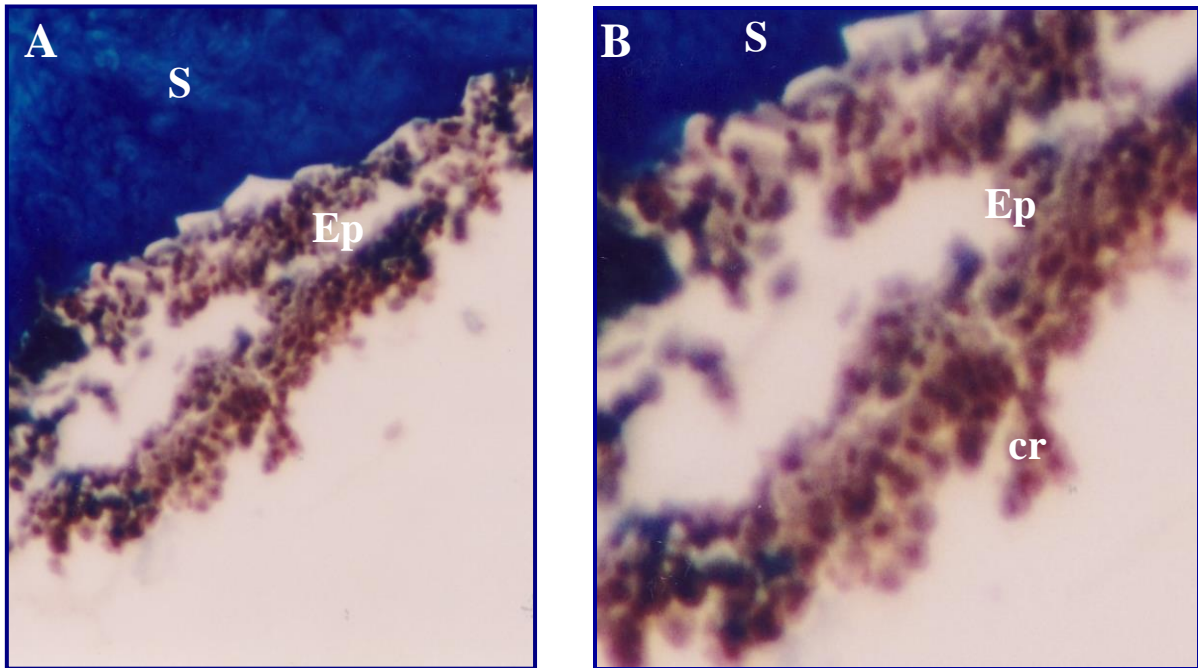
Le corps ciliaire montre une vasodilatation marquée à partir de 400  $\mu\text{M}$  après incubation de 24h associée à un début d'activation cellulaire. Nous observons, également, au niveau des procès cellulaires des altérations concentration et durée dépendantes. Le phénomène de vasodilatation est remarqué même dans les petits vaisseaux, l'épithélium non pigmenté est légèrement altéré par éclatement cellulaire à partir de la concentration 300  $\mu\text{M}$  après 24 h d'incubation. A 500  $\mu\text{M}$  et après 48 h d'incubation, l'épithélium pigmentaire se détache du stroma conjonctif (Figures 61-65)

L'iris présente des lésions au niveau du sphincter irien à parti de 300  $\mu\text{M}$  après 24 h d'incubation, au niveau épithélial à partir de 400  $\mu\text{M}$  après incubation de 48 h et au niveau de la trame conjonctive qui devient lâche à partir de 400  $\mu\text{M}$  après incubation de 48 h (Figures 70, 72).

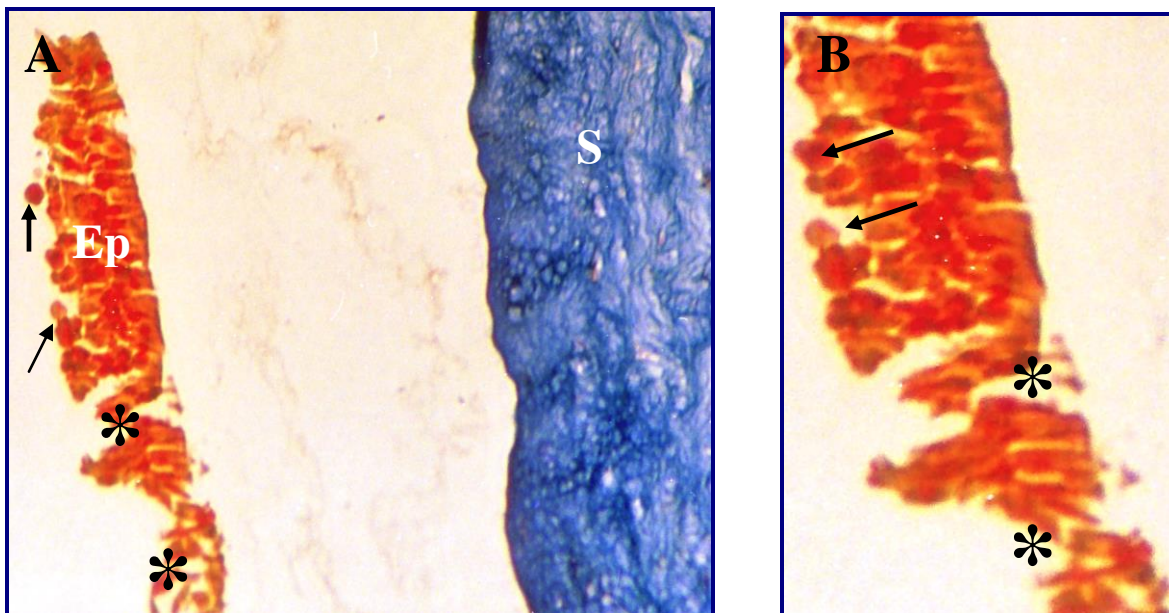


**Figure 54:** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 300 $\mu\text{M}$  de nitrates pendant 24h. L'épithélium (Ep) montre une desquamation des cellules superficielles (\*), une altération des cellules basales (  $\rightarrow$  ) et une dissociation de la lame basale (MbB). La structure du stroma est conservée (S). ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).





**Figure 55 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. Les cellules de l'épithélium (Ep) sont rondes (cr) et dissociées entre elles et sont décollées de la lame basale. La structure du stroma (S) est conservée. ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 56:** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 400 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. L'épithélium (Ep) est détaché du stroma (S), montre une déstructuration de ses cellules avec une adhésion entre elles réduite au niveau de certaines zones (\*). Les cellules superficielles prennent une forme circulaire et se détachent (→). La structure du stroma est conservée (S). ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).

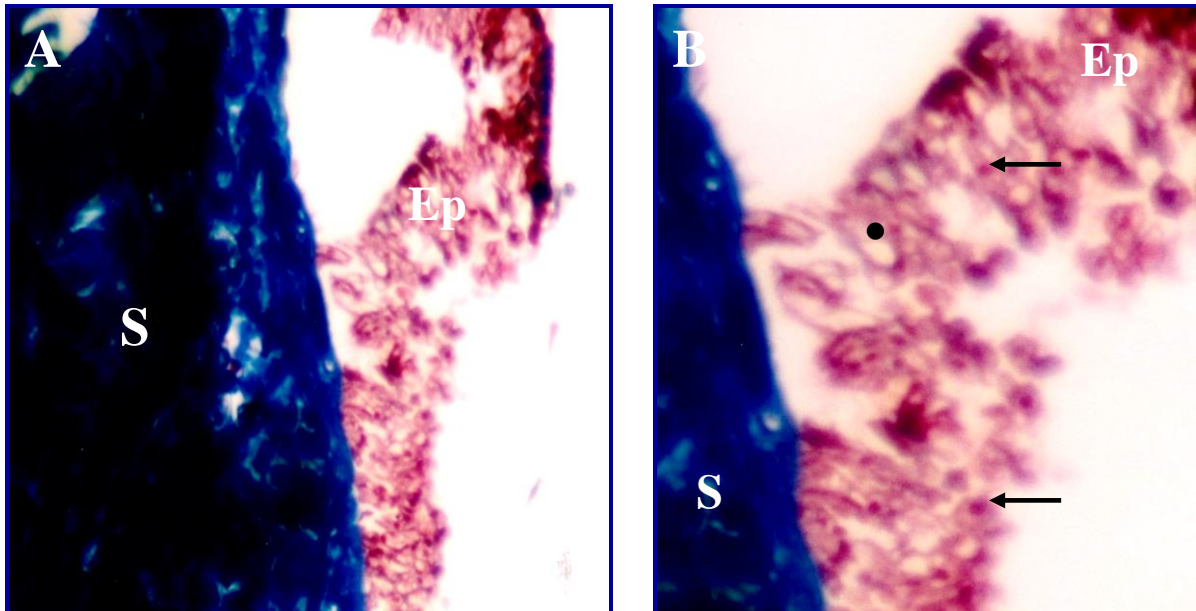


Figure 57 : Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 400 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. L'épithélium (EP) détaché et désorganisé présente des cellules possédant un cytoplasme vacuolisé (•) à la périphérie du noyau. Ce dernier est dense et excentrique (→). Le stroma (S) ne montre aucune altération ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).

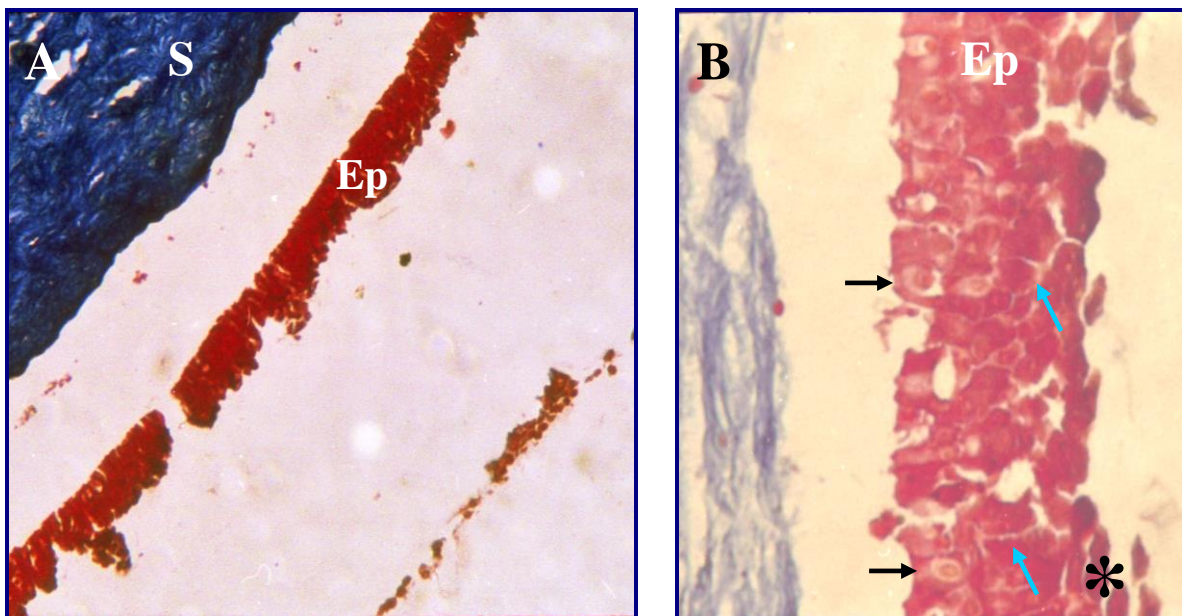
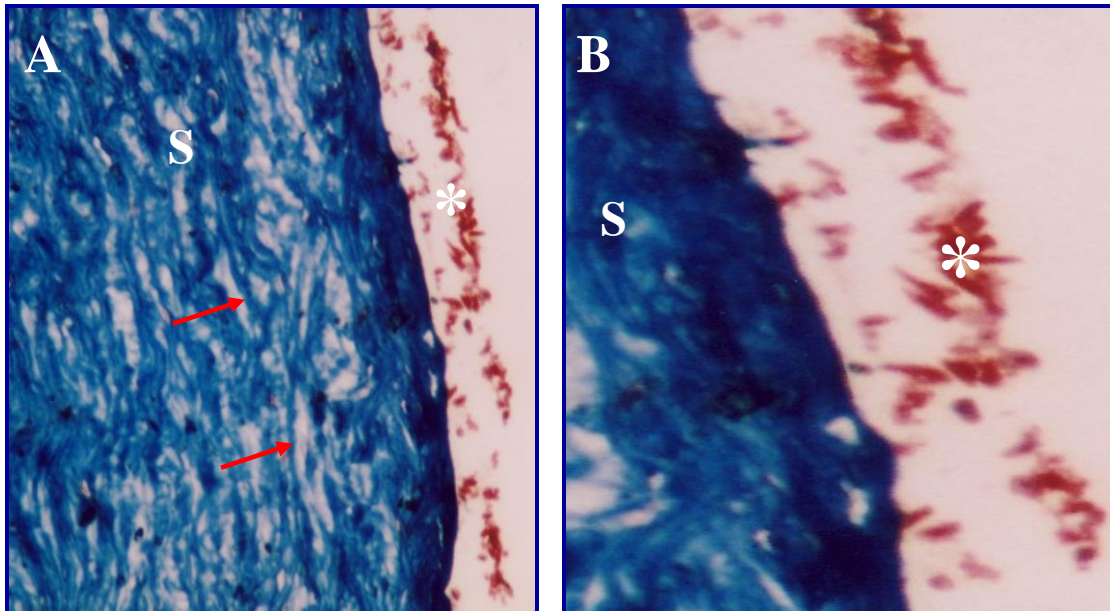
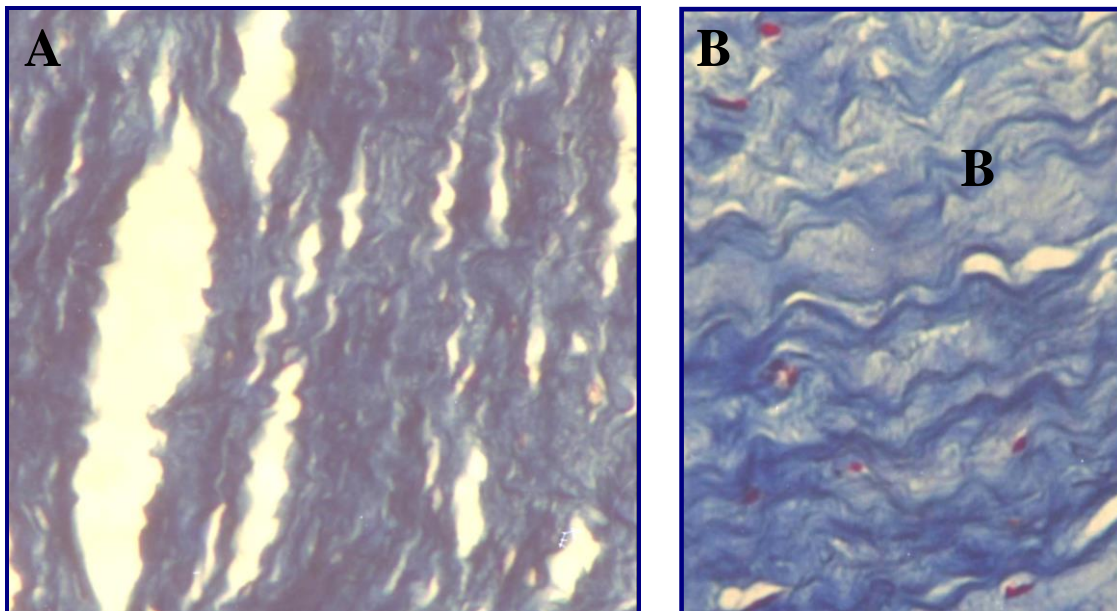


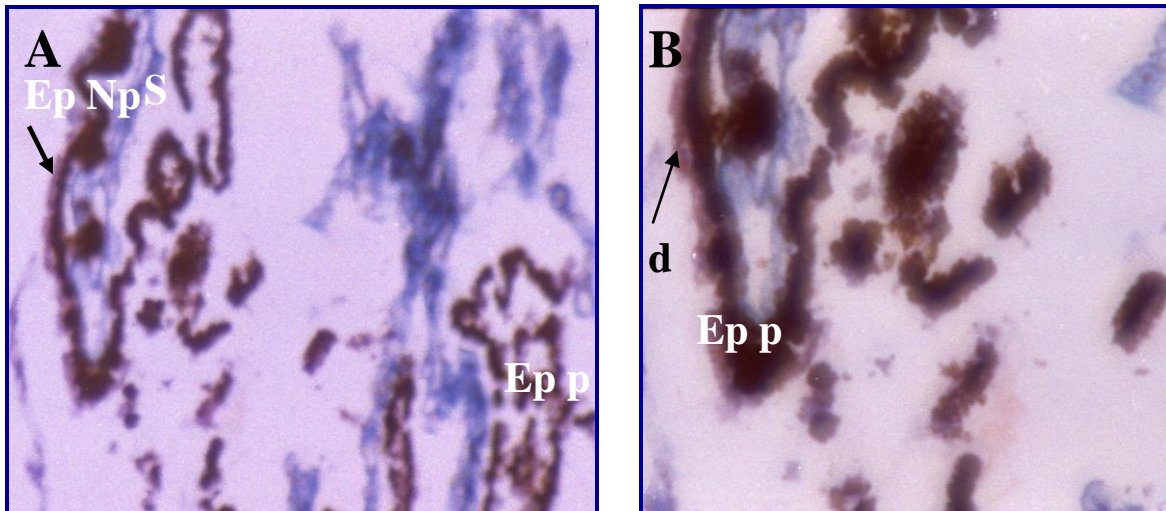
Figure 58 : Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. L'épithélium (Ep), non adhérent au stroma (S), montre un détachement des cellules superficielles avec une adhésion entre elles réduite (\*). Les cellules épithéliales présentent des espaces entre elles sous forme d'une ligne blanche (→). Certaines cellules ont un noyau condensé avec un cytoplasme plus clair. La structure du stroma est conservée (S). ((A) Gx 10, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



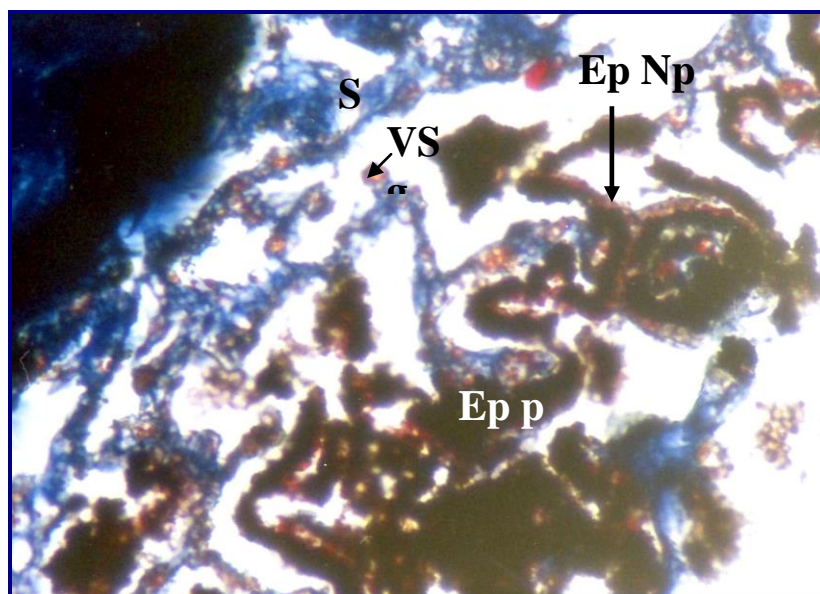
**Figure 59 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. L'épithélium (Ep) est complètement altéré avec désorganisation totale des cellules (\*) et un début de dissociation des faisceaux de fibres collagène (→) ((A) Gx 10, Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory).



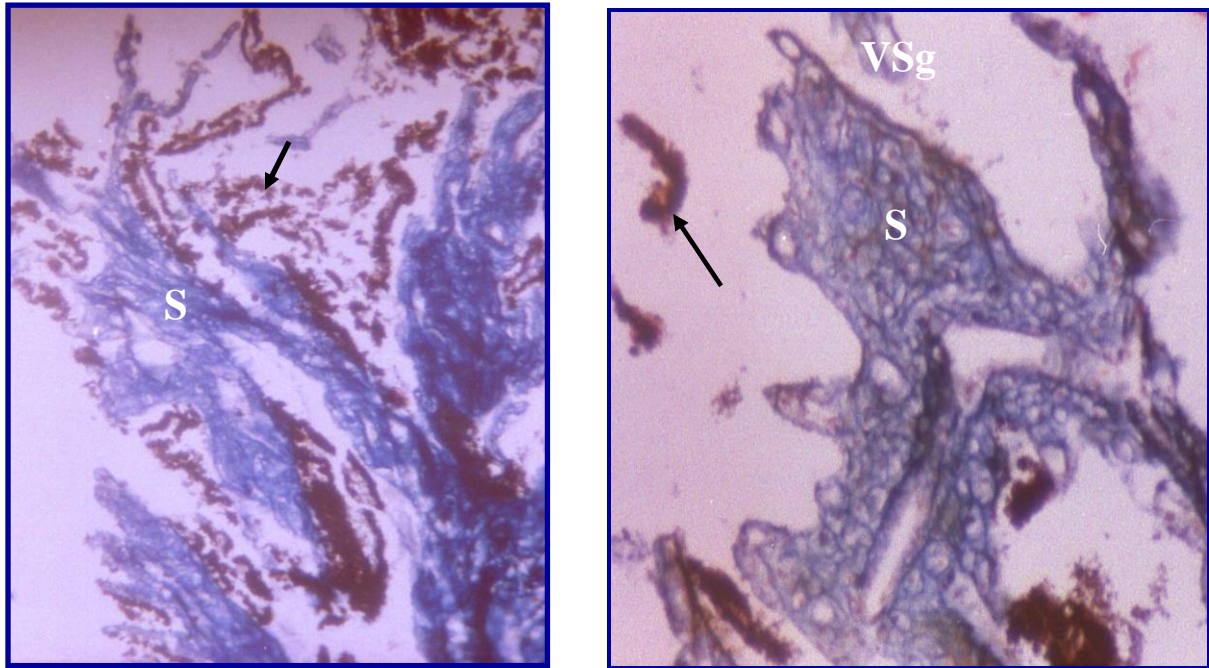
**Figure 60:** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. Le stroma cornéen, à cette concentration (S), montre des fibroblastes aplatis avec un petit noyau. Les fibres collagènes présente un aspect sinueux et dense dans certaines zones. ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



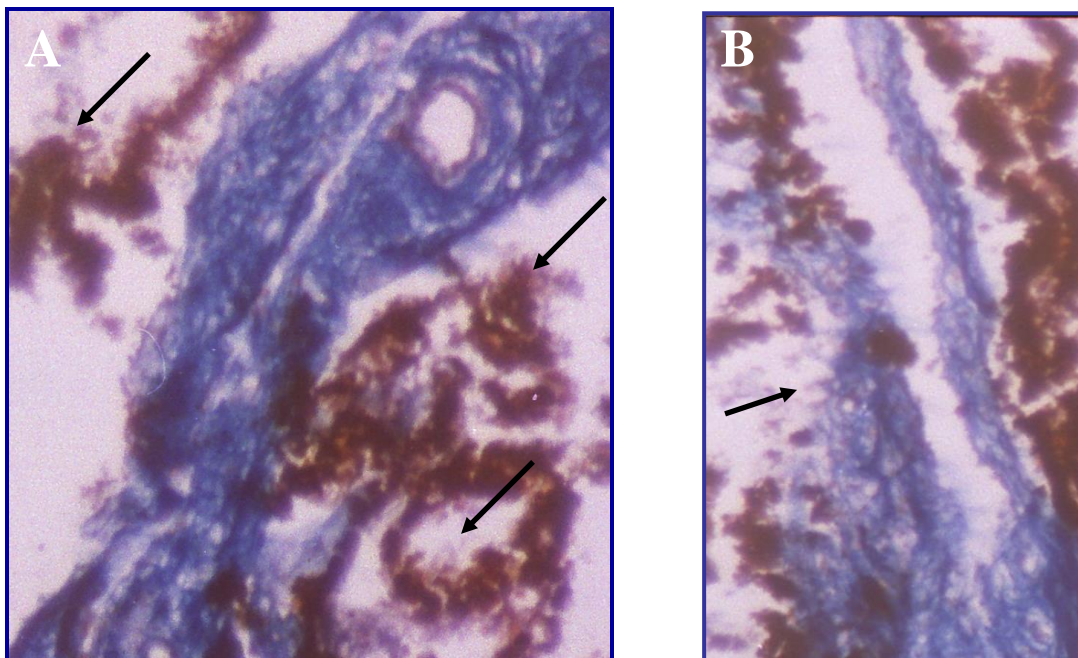
**Figure 61 :** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. L'épithélium non pigmentaire (Ep Np) est presque totalement altéré laissant des débris (d) et l'épithélium pigmentaire (Ep p) commence à être lésé ((A)Gx 20, (B) Gx 40fixateur Formol, coloration Mallory).



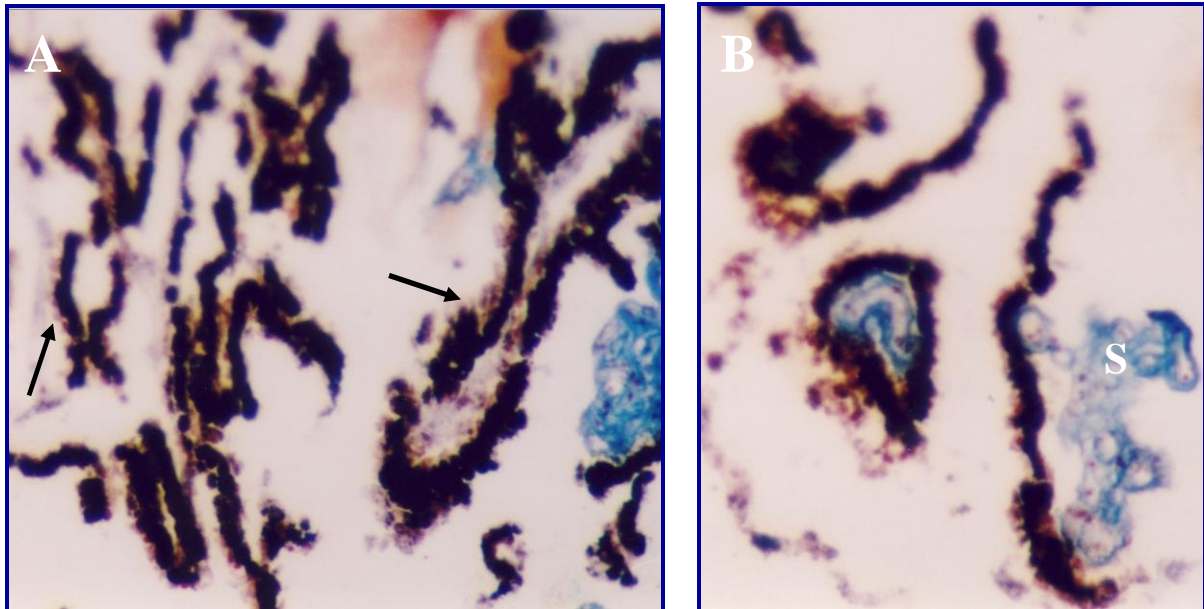
**Figure 62:** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 400 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. L'épithélium non pigmentaire (Ep Np) est commence à être altérer et l'épithélium pigmentaire (Ep p) est intact. Les vaisseaux sanguins montre une petite vasodilatation. (Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



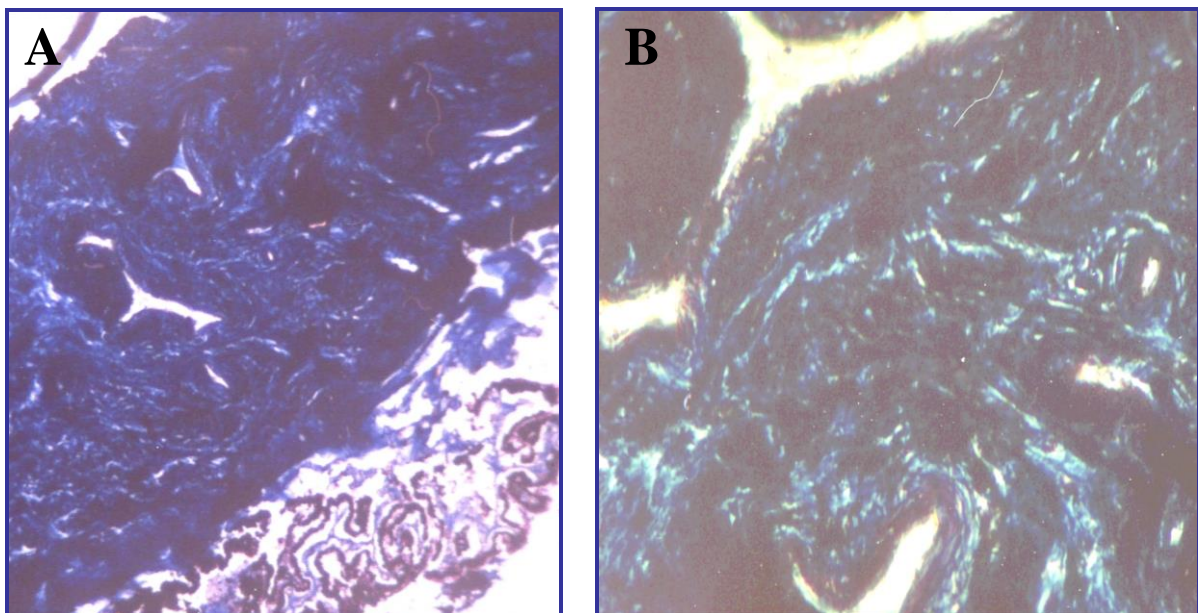
**Figure 63:** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 400µM de nitrates pendant 48h. Une altération profonde touche les deux épithéliums pigmentaire et non pigmentaire (→) avec une vasodilatation visible dans le stroma (S). ((A)Gx 10, (B) Gx 40 fixateur Formol, coloration Mallory)



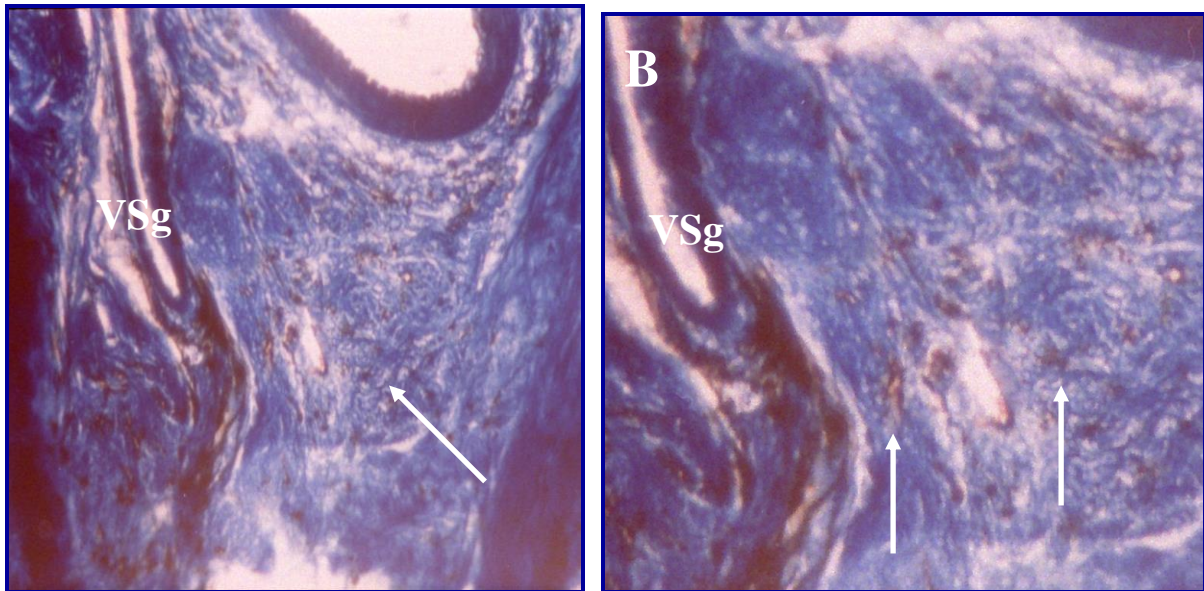
**Figure 64:** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 400µM de nitrates pendant 48h. Détail de l'altération touchant les deux épithéliums pigmentaire et non pigmentaire (→). ((A)Gx 10, (B) Gx 40 fixateur Formol, coloration Mallory).



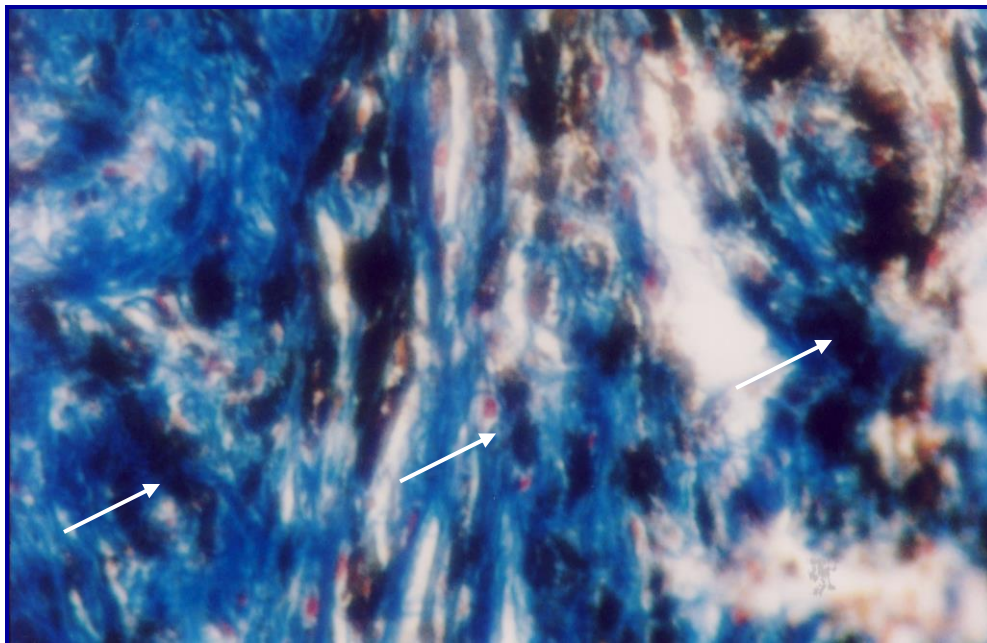
**Figure 65:** Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec  $500\mu\text{M}$  de nitrates pendant 48h. L'épithélium non pigmentaire est complètement altéré ( $\rightarrow$ ), l'épithélium pigmentaire a perdu sa continuité mais les cellules ne semblent pas être lésés. Le stroma (S) présente des capillaires dilatés. ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



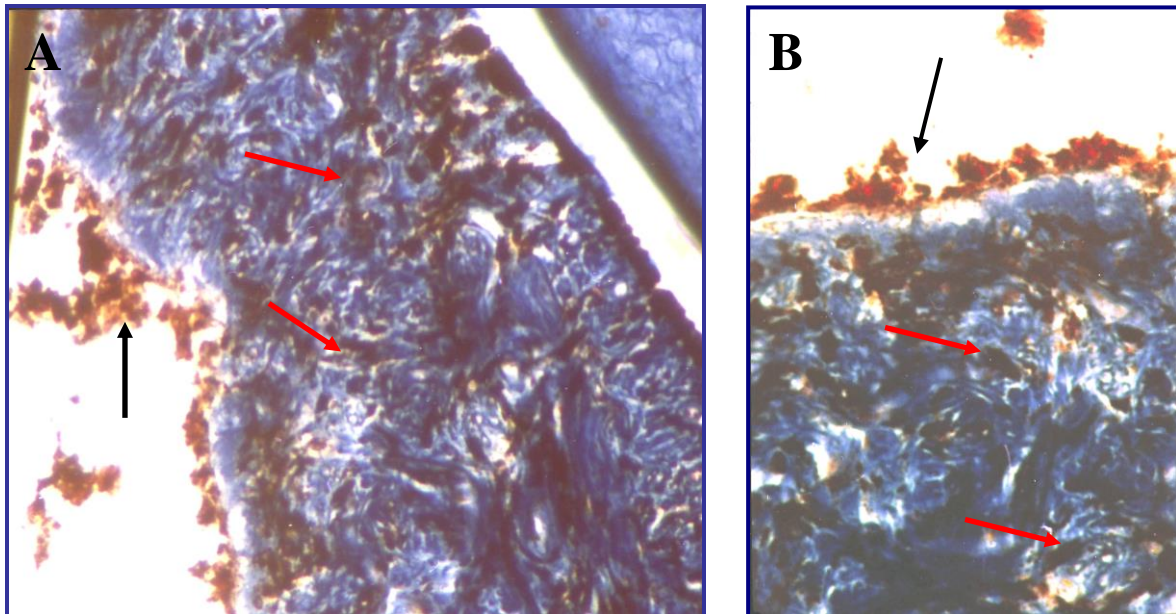
**Figure 66:** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec  $400\mu\text{M}$  de nitrates pendant 24h. Aucune lésion n'est remarquée. ((A) Gx5, Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory)



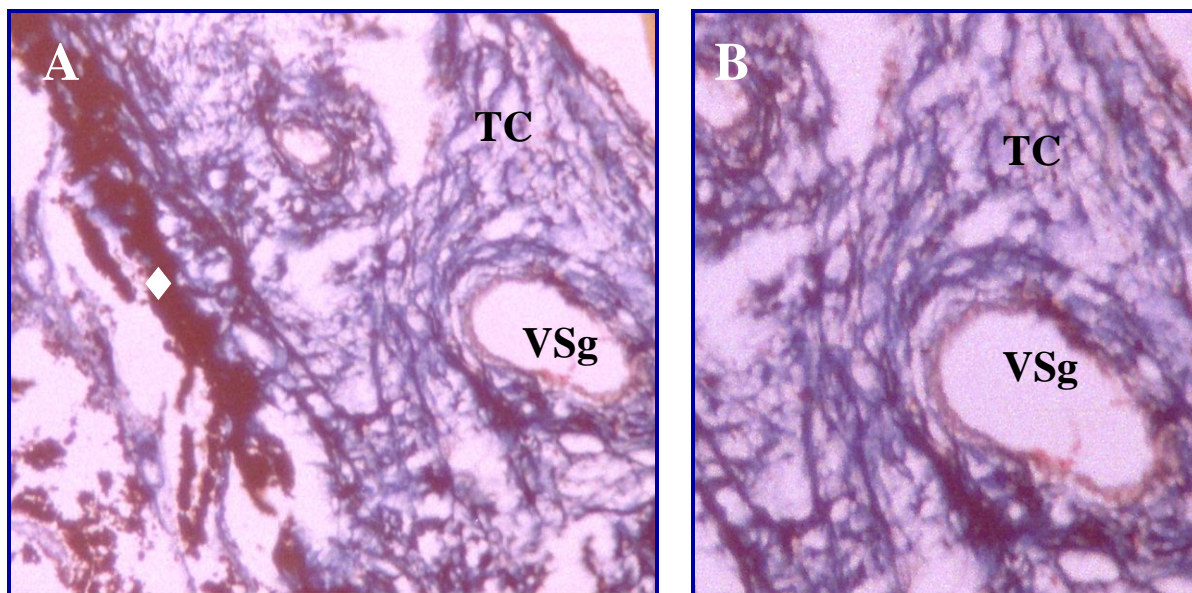
**Figure 67:** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec  $400\mu\text{M}$  de nitrates pendant 48h. Une vasodilatation (VSg) est visible et une activation cellulaire ( $\rightarrow$ ) tout autour également. ((A) Gx 20, (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 68:** Coupe transversale au niveau du réseau trabéculaire d'explant traité avec  $500\mu\text{M}$  de nitrates pendant 48h. Détail des cellules activées ( $\rightarrow$ ) autour des vaisseaux sanguins. (Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory)

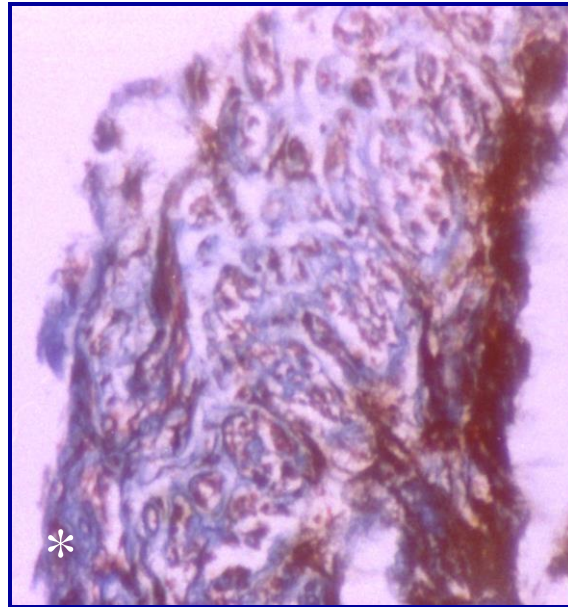


**Figure 69:** Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. L'épithélium postérieur est altéré ( $\rightarrow$ ). Une densité cellulaire est observée avec des cellules activées ( $\rightarrow$ ). ((A) Gx 20, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory)

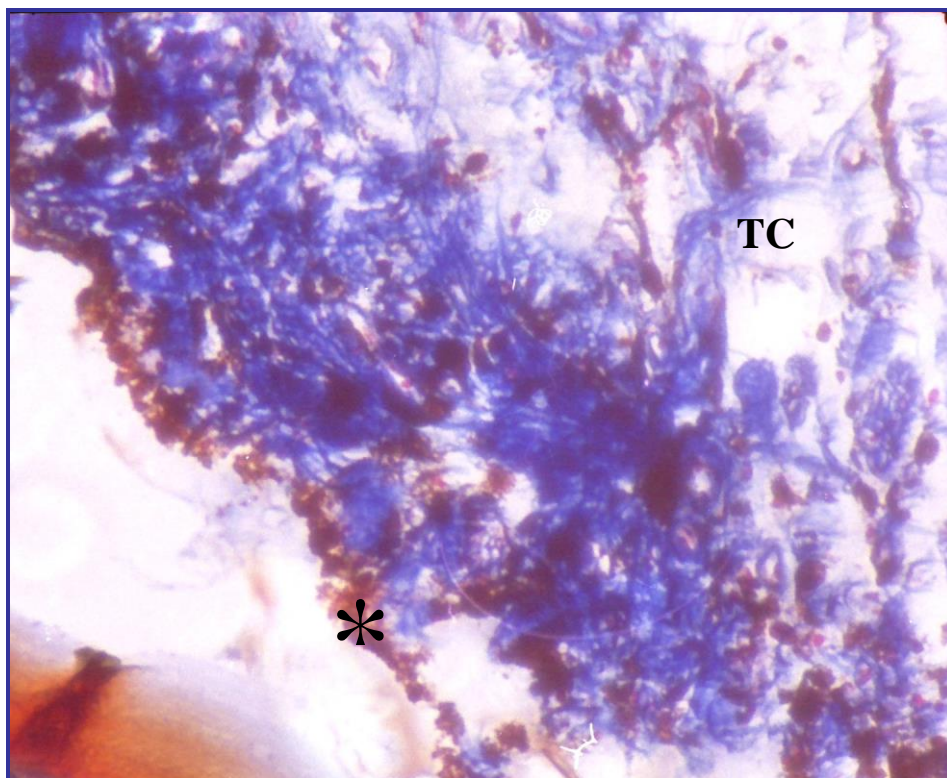


**Figure 70:** Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 400 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. L'épithélium postérieur ( $\blacklozenge$ ) de l'iris est altéré et la trame conjonctive (TC) est très lâche. Les vaisseaux sanguins (VSg) montrent une vasodilatation. (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory)

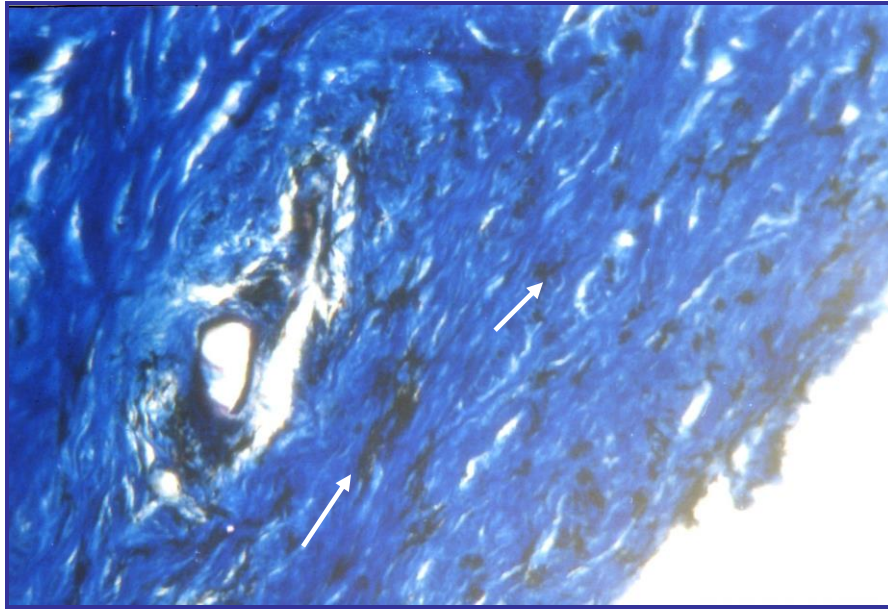




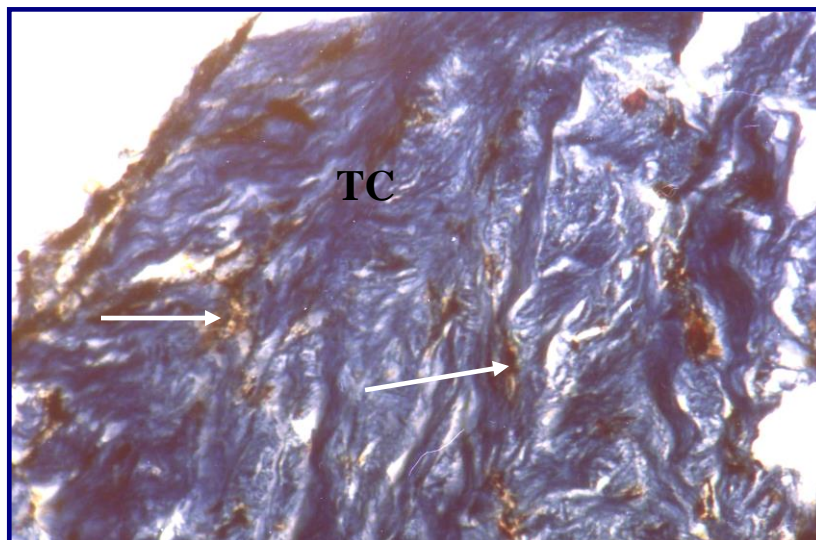
**Figure 71:** Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 400 $\mu$ M de nitrates pendant 48h montrant une altération légère de l'épithélium antérieur (\*). (Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory)



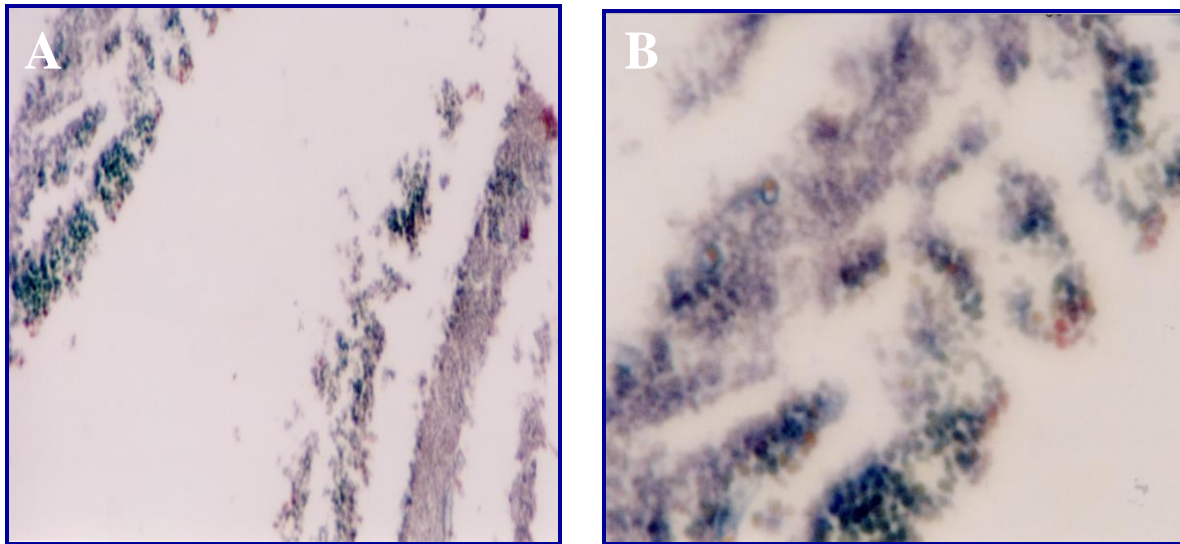
**Figure 72:** Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. La trame conjonctive (TC) est lâche. L'épithélium antérieur (\*) est détaché et dépigmenté. (Gx 20, fixateur Verhoeff, coloration Mallory)



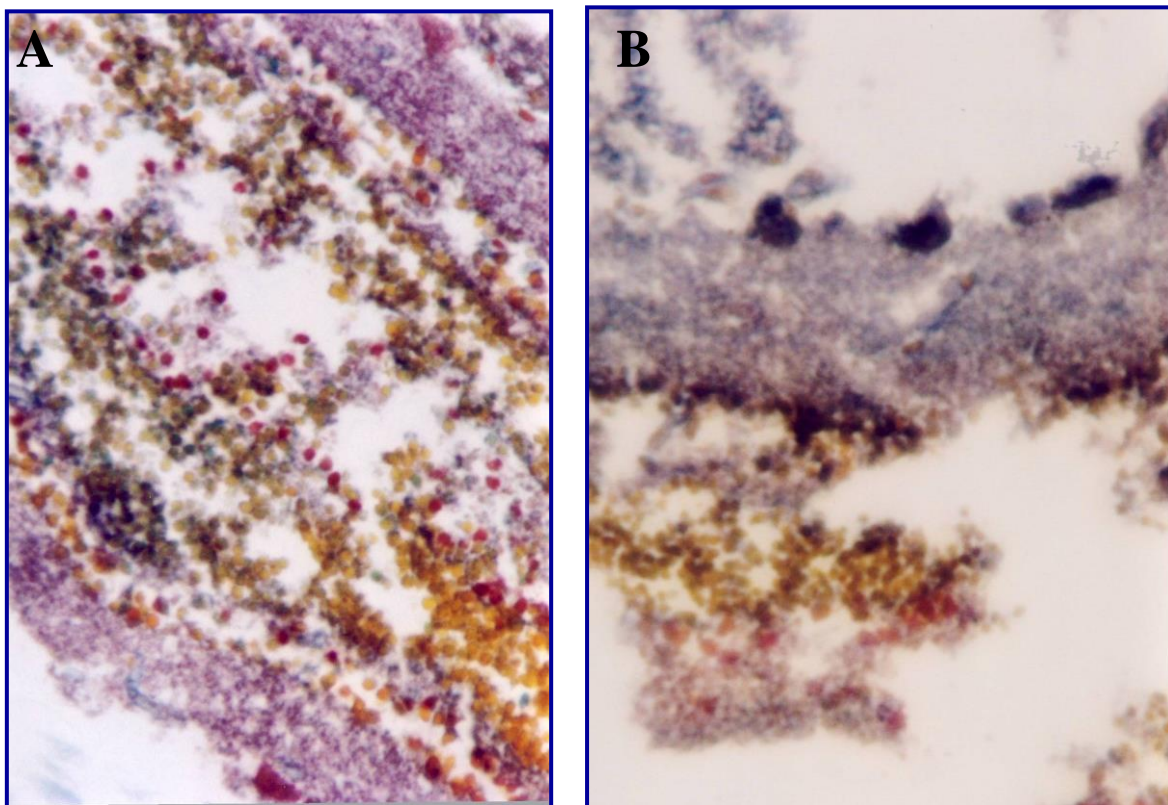
**Figure 73:** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. Le tissu conjonctif reste intact avec apparition de cellules activées ( $\rightarrow$ ) très colorées du côté de la choroïde. (Gx 10, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



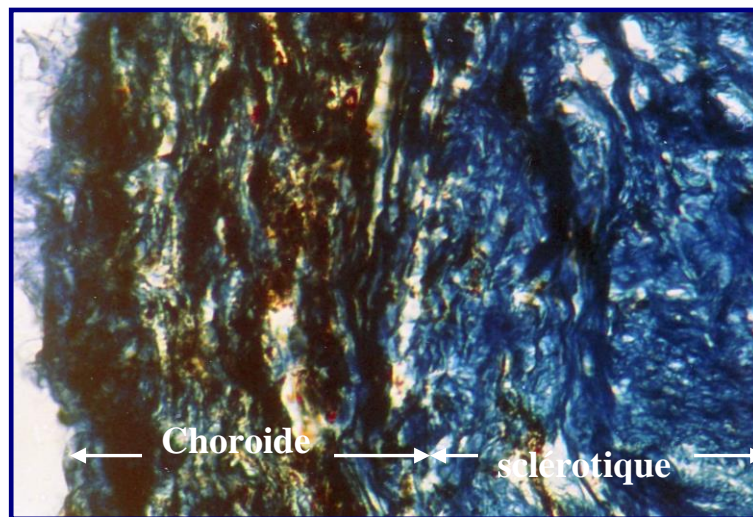
**Figure 74:** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. Le tissu conjonctif (TC) reste intact avec apparition de cellules activées très colorées du côté de la choroïde. (Gx 10, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



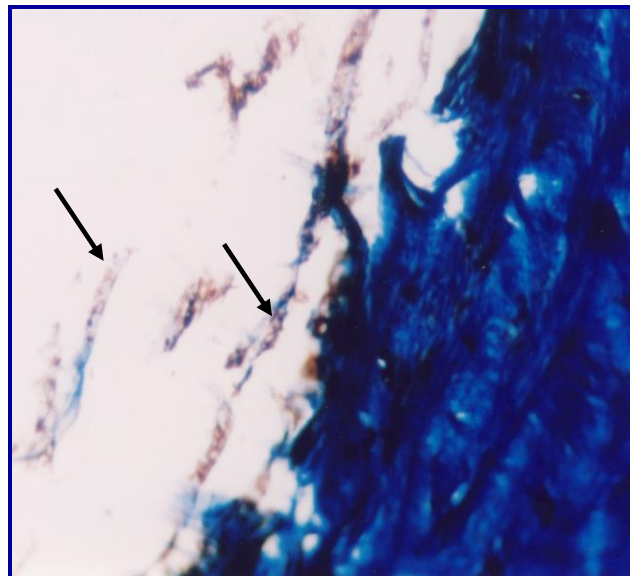
**Figure 75:** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. Nous remarquons l'altération de la structure. ((A) Gx 20, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory)



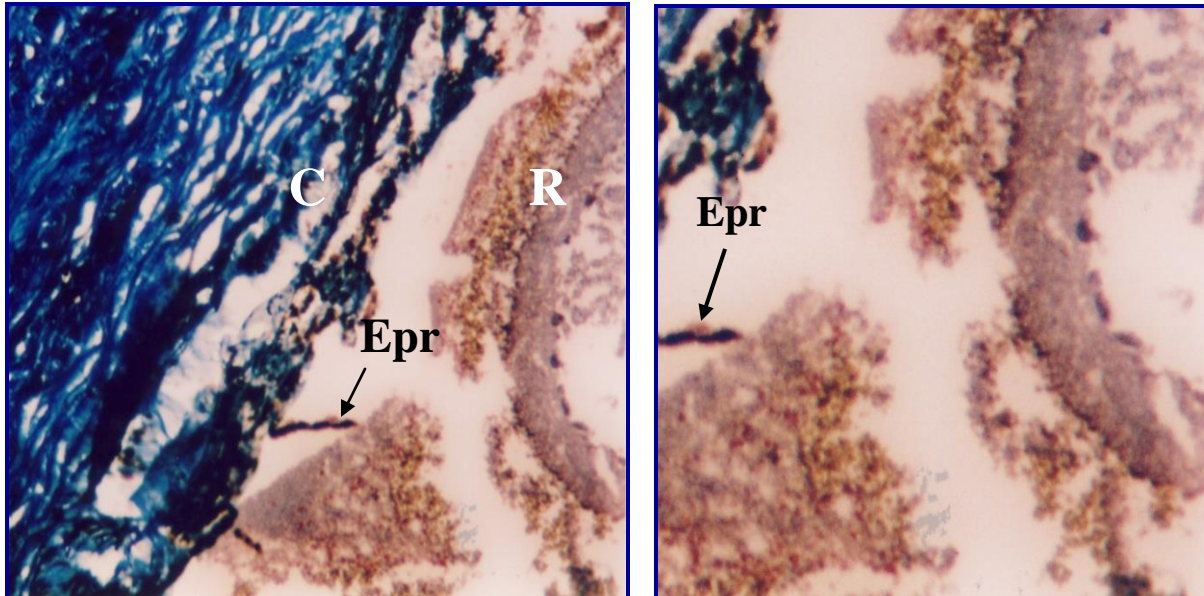
**Figure 76:** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. Détail des couches altérées montrant des noyaux ayant différentes affinités tinctoriales ainsi que la disparition des membranes cellulaires laissant un amas aléatoires. (Gx 40fixateur Formol, coloration Mallory)



**Figure 77:** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 500 $\mu$ M de nitrates pendant 24h. La densité cellulaire est augmentée ainsi que l'épaisseur de la choroïde. (Gx 20, fixateur Verhoeff, coloration Mallory).



**Figure 78:** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 300 $\mu$ M de nitrates pendant 48h. La structure de la choroïde est complètement altérée et se présente sous forme de lanières ( $\rightarrow$ ). (Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 79 :** Coupe transversale au niveau de la partie postérieure de l'œil passant par la choroïde et la rétine faite au niveau d'explant traité avec  $400\mu\text{M}$  de nitrates pendant 48h. Nous remarquons l'altération de la rétine (R), altération de l'épithélium pigmentaire rétinien (Epr) et une densité cellulaire au niveau de la choroïde (C) avec un détachement de ses fibres sous forme de lanières. ((A) Gx 20, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory).

#### **4. Etude histologique de l'action du peroxy-nitrite sur les explants oculaires bovins *in vitro*:**

Contrairement aux molécules étudiées précédemment, le peroxy-nitrite agit à de faibles concentrations. Ainsi, l'action de ce dernier se manifeste dès la concentration de  $100\ \mu\text{M}$  et pour un temps d'incubation de 24 h. Les altérations observées dans les différentes structures de l'explant sont celles retrouvées à fortes concentrations des nitrites et des nitrates.

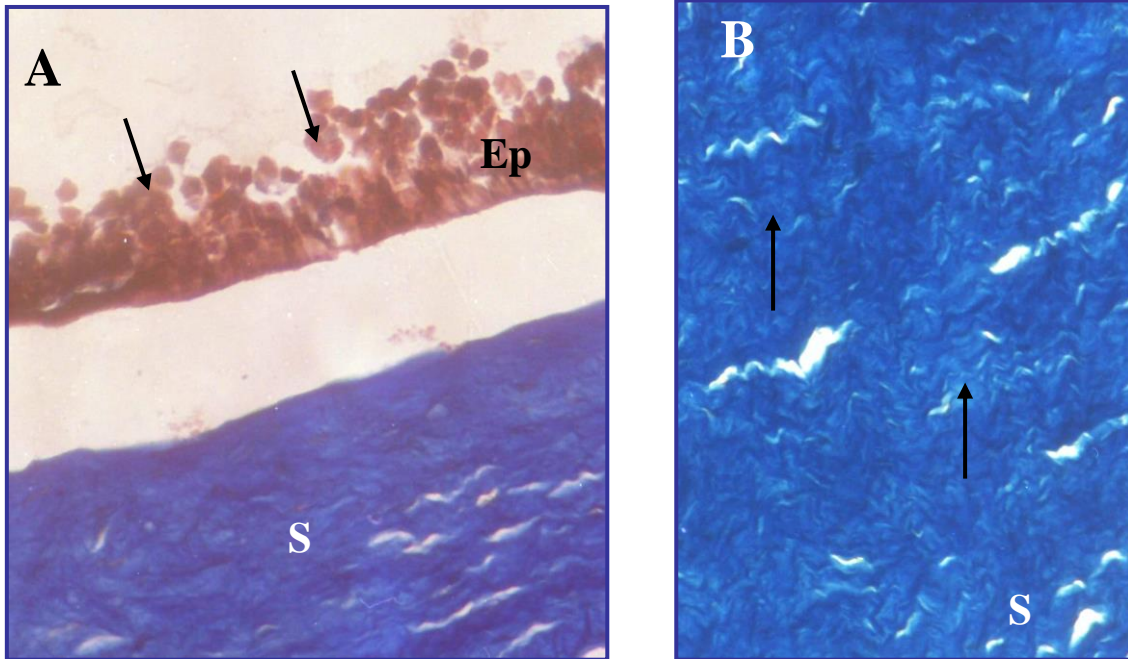
Au niveau de la cornée, un détachement de l'épithélium a été observé avec un phénomène de desquamation des cellules superficielles semblable à celui trouvé chez les explants induit avec des nitrates à  $300\ \mu\text{M}$  pendant 24 h. Ainsi, une rétraction intense des fibres collagène a été constatée prenant un aspect sinueux (Figures 80-82).

Le diamètre des vaisseaux sanguins de l'iris, des procès ciliaires et du corps ciliaire sont augmentés. De plus, l'épithélium externe des procès ciliaire présente une altération évoluant vers une destruction totale (Figures 83-85).

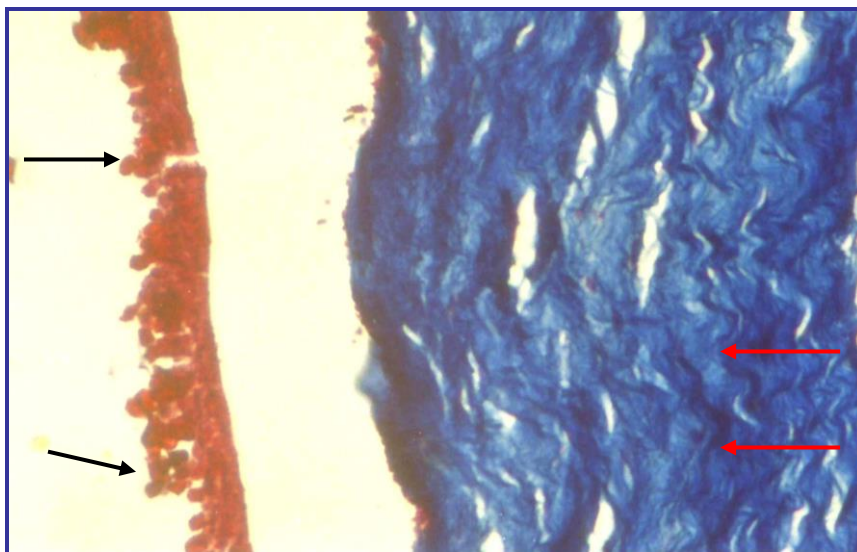
La choroïde montre une structure différente de celle retrouvée lors des traitements précédents. En effet, elle présente un aspect en lanières mais la trame est devenue sinuose et abrite des vaisseaux sanguins moyennement dilatés (Figures 91-96).

La rétine altérée est sous forme de couches dissociées apposées l'une à l'autre (Figures 88-90).

La sclérotique montre une dissociation des faisceaux de fibres collagènes laissant des vides entre elles. Nous remarquons également des cellules activées (Figures 97-102).



**Figure 80 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 100 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. L'épithélium (Ep) est détaché de la lame basale et montre une altération des cellules superficielles ( $\rightarrow$ ). Les fibres collagènes du stroma (S) présente une légère modification d'aspect ( $\rightarrow$ ). ((Aet B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 81 :** Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 300 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. L'épithélium est très altéré avec des cellules détachées ( $\rightarrow$ ) entre elles et le stroma présente des faisceaux de fibres collagènes ( $\rightarrow$ ) dissociés avec un aspect sinueux. (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).

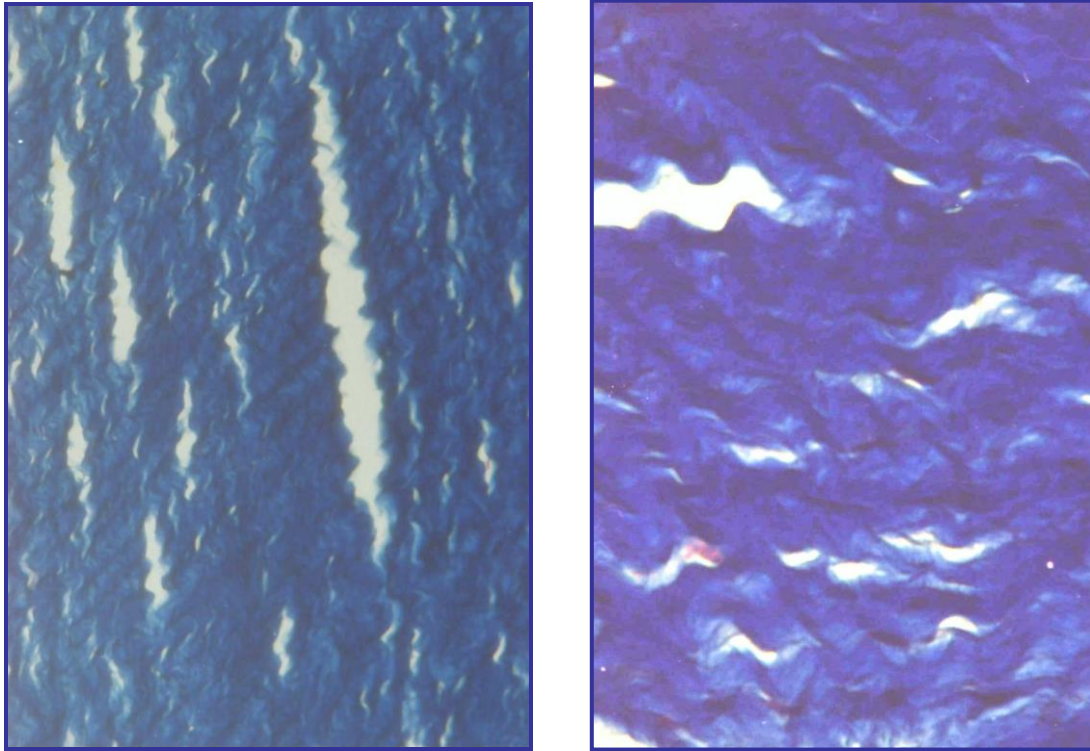


Figure 82 : Coupe transversale au niveau du stroma de la cornée d'explant traité avec 300 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. La structure du stroma est modifiée avec un aspect sinueux et dissocié (S). ((A) Gx 10, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory).

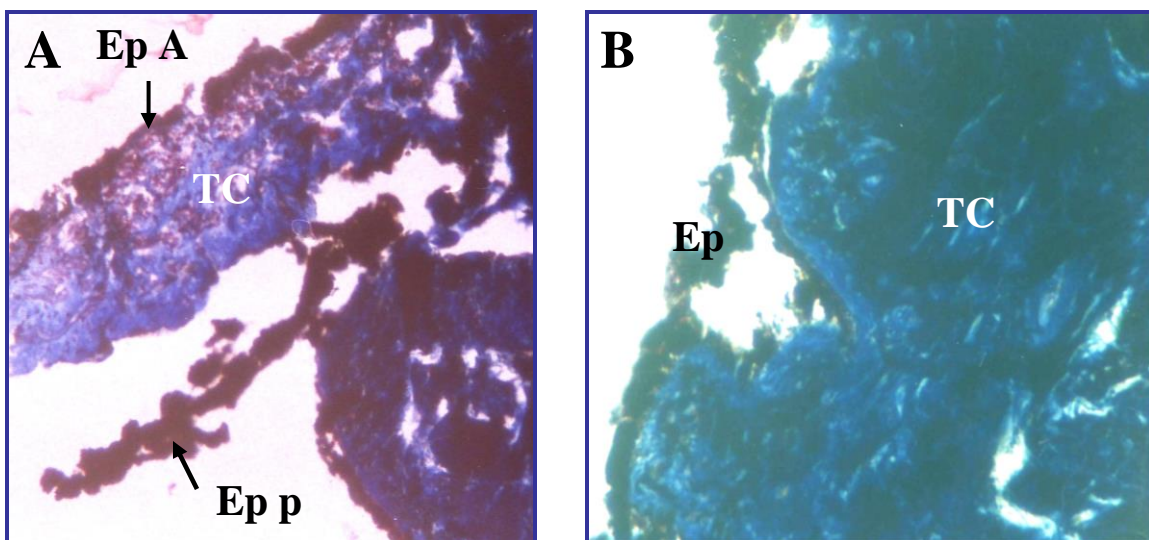
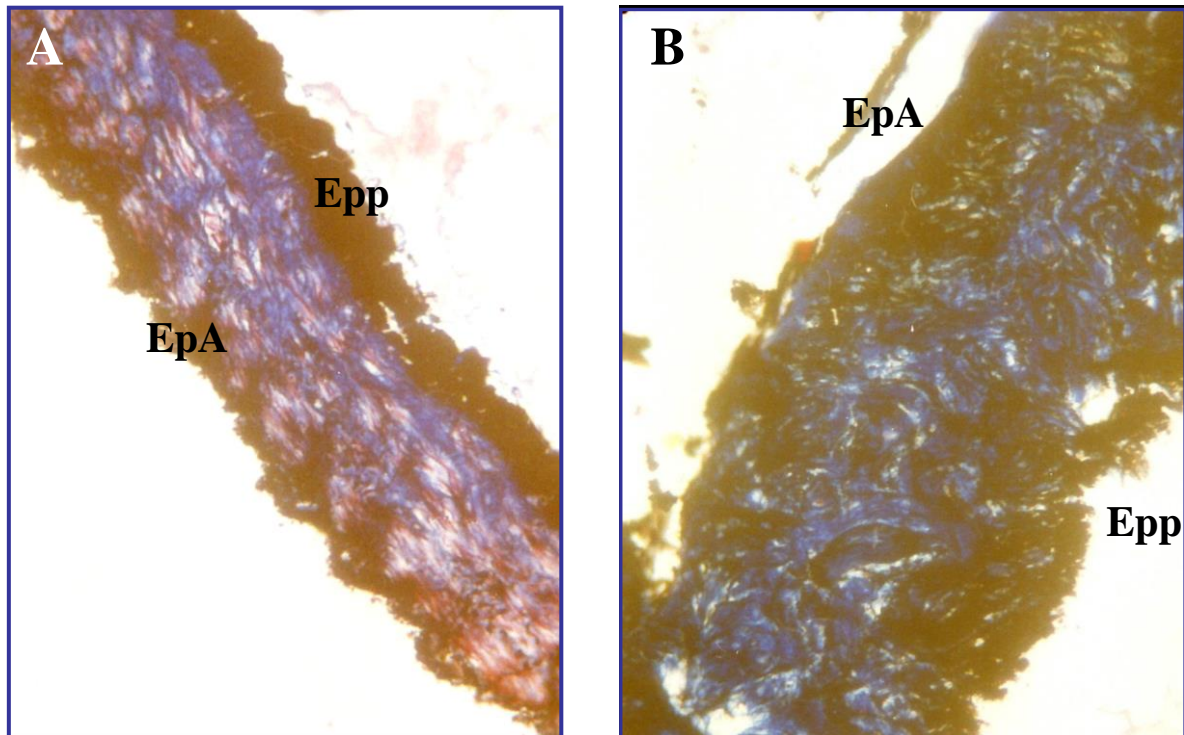


Figure 83 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 100  $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Les épithéliums antérieur (EpA) et postérieur (Epp) présente des lésions au niveau cellulaire. La trame conjonctive est assez dense (TC)((A)Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 84 :** Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. (A) Structure de la partie distale de l'iris montrant le sphincter, (B) Structure la partie proximale de l'iris. La membrane plasmique des cellules des épithéliums antérieur (EpA) et postérieur (Epp) est légèrement altérée mais le côté basal des cellules est toujours adhérent au tissu conjonctif. ((A) et (B) Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



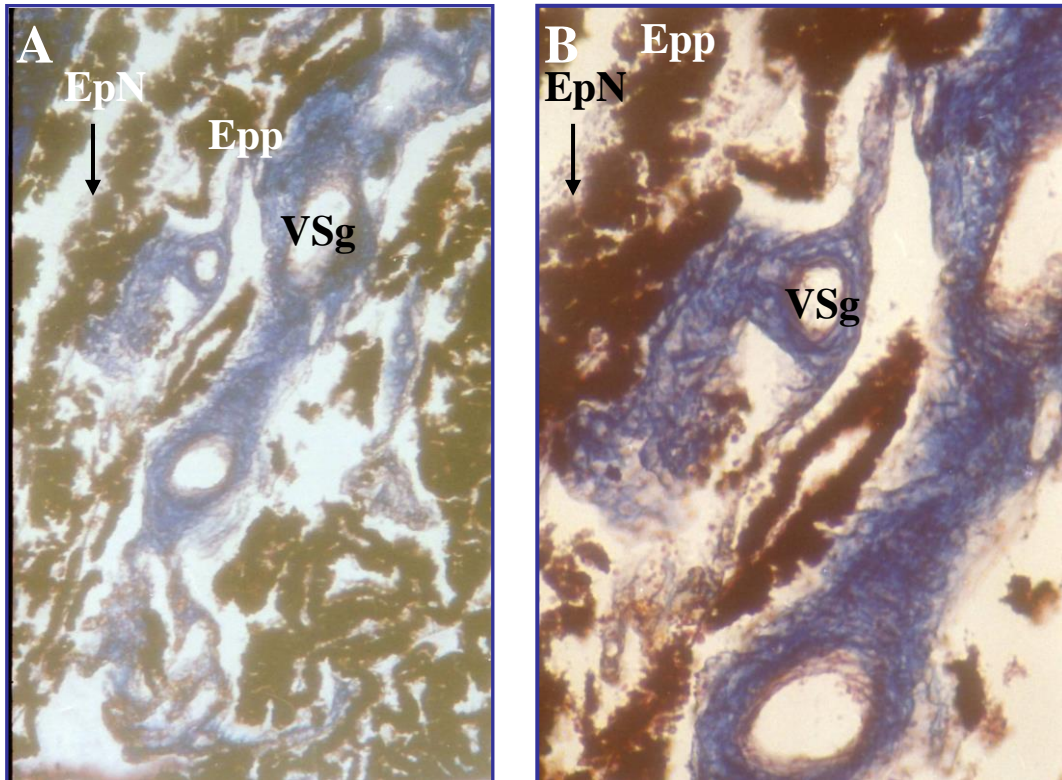


Figure 85 : Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Ils montrent une altération relative de l'épithélium non pigmentaire (EpN) et une vasodilatation marquée (VSg). (Gx 10, Gx 20 fixateur Formol, coloration Mallory).

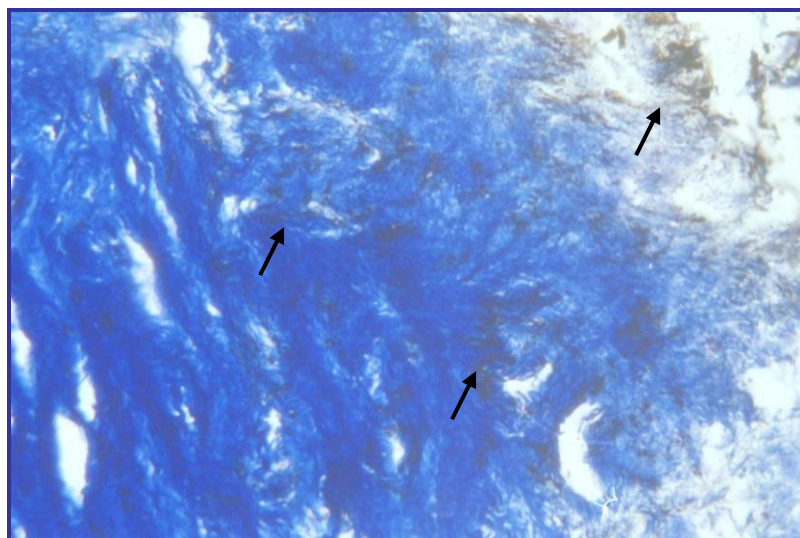
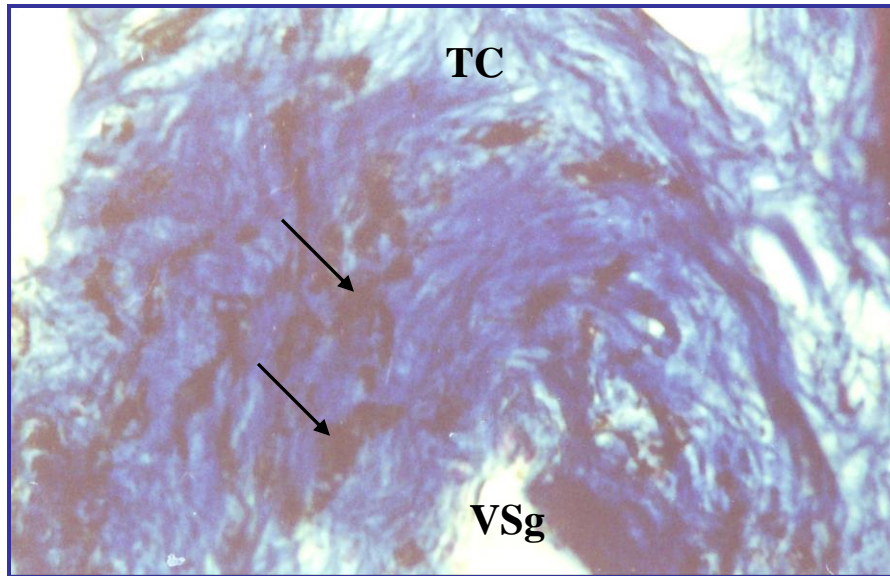
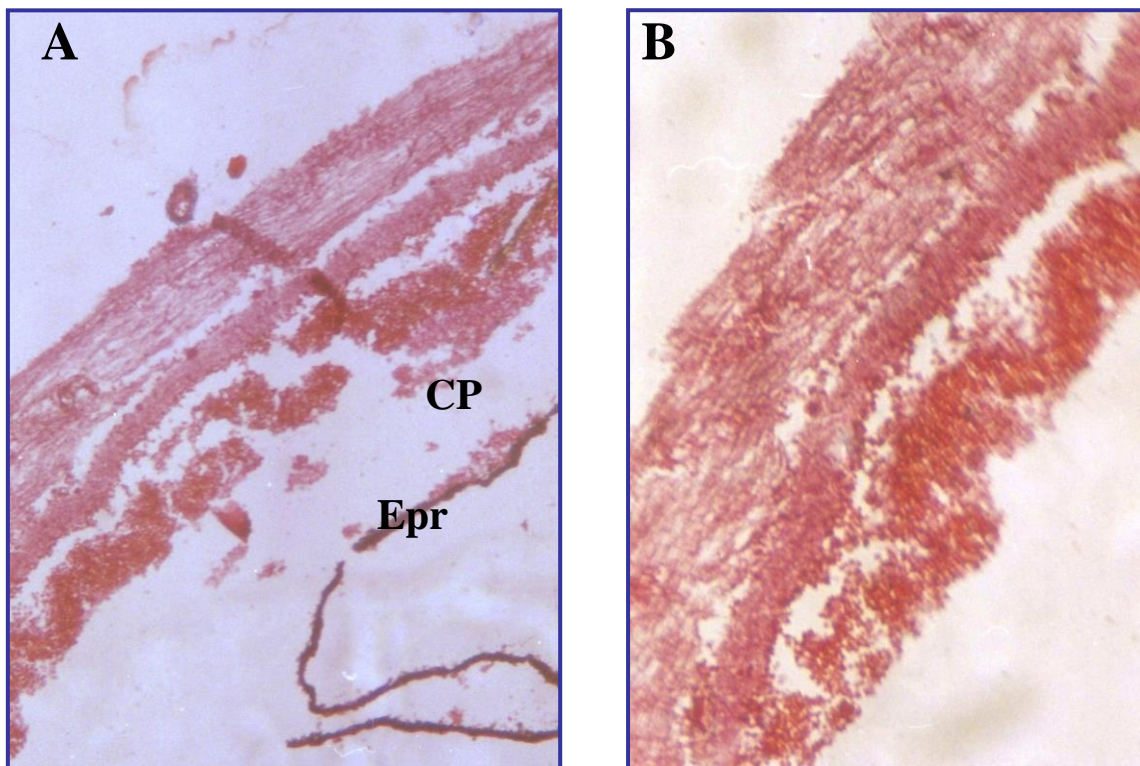


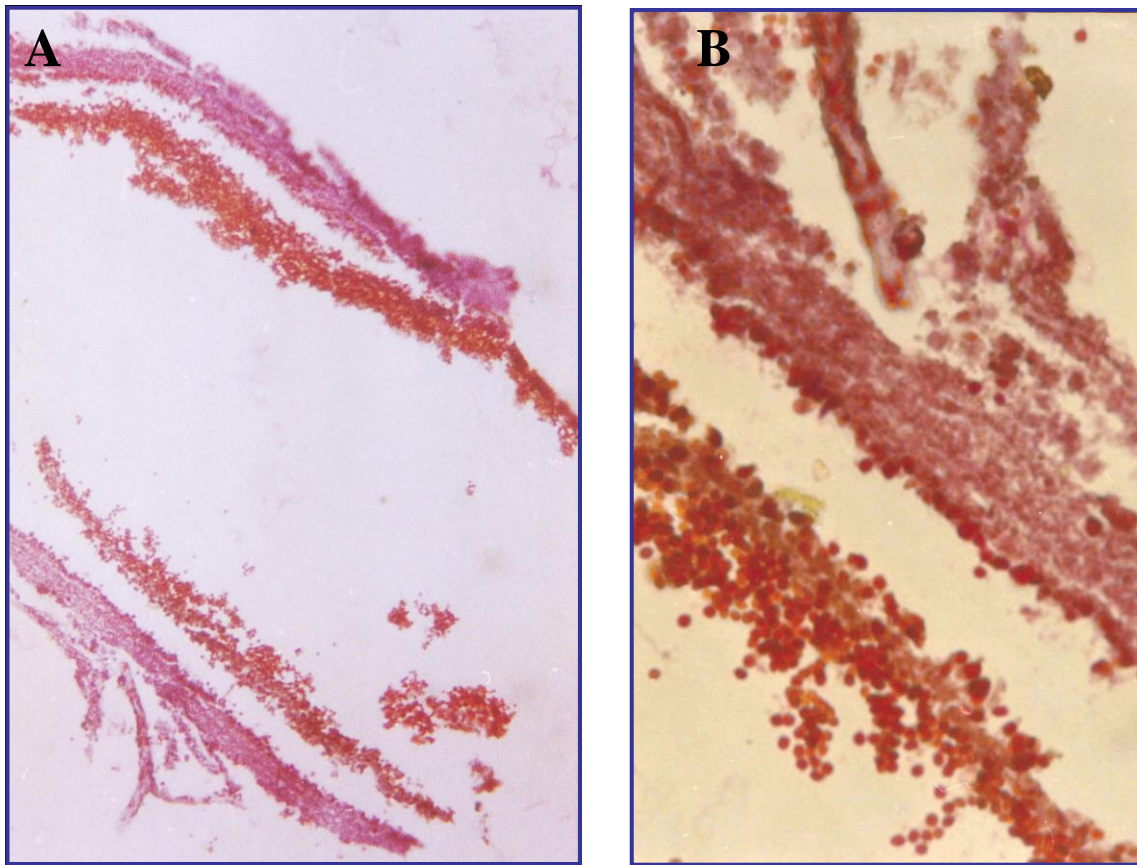
Figure 86 : Coupe transversale au niveau du trabéculum d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. A la jonction entre la cornée et l'iris, nous observons des cellules activées avec des granulations denses ( $\rightarrow$ ). (Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



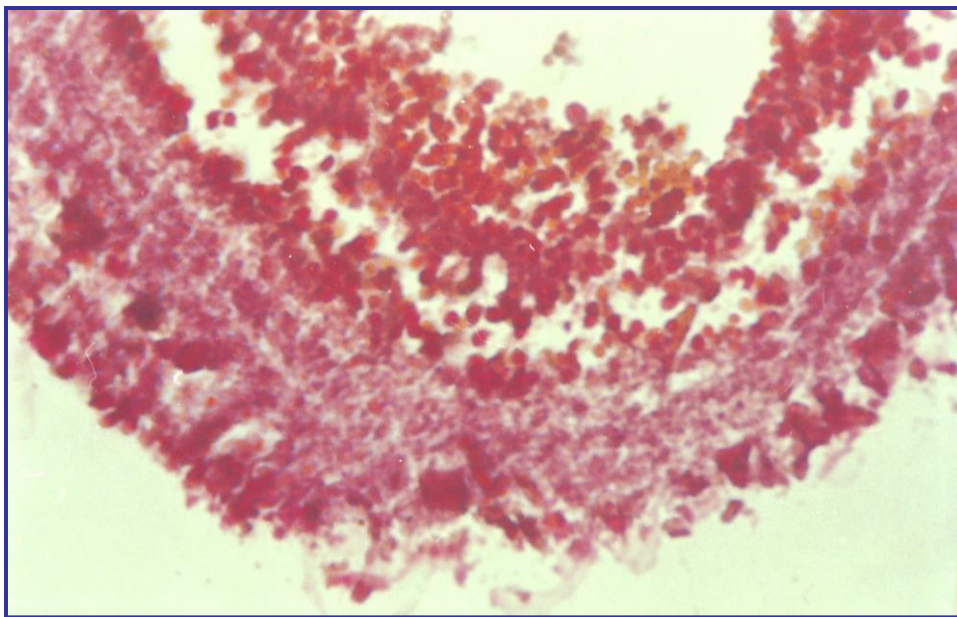
**Figure 87 :** Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec 300 $\mu$ M de peroxy-nitrites pendant 24h. Autour d'un vaisseau sanguin (VSg), nous remarquons des cellules activées denses ( $\rightarrow$ ) et une trame conjonctive lâche (TC). ((B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



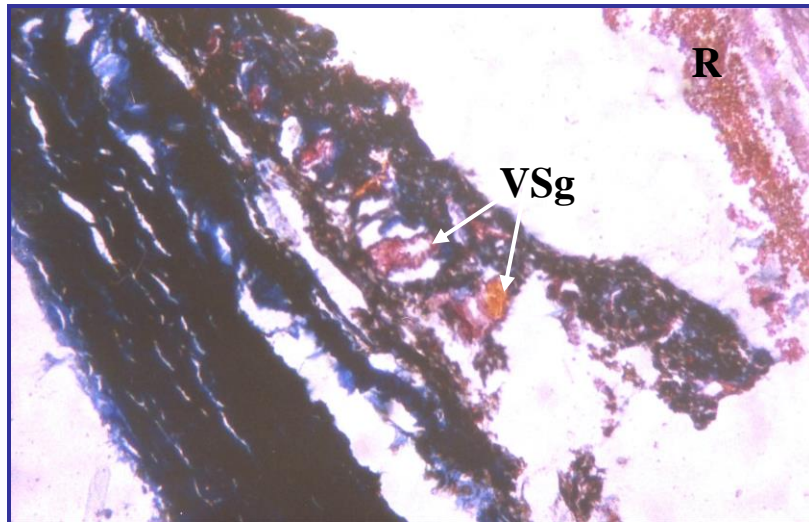
**Figure 88 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 100 $\mu$ M de peroxy-nitrites pendant 24h. La rétine montre une déstructuration de ces différentes couches, une altération des cellules photoréceptrices (CP) avec une dissociation de l'épithélium pigmentaire rétinien (Epr). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



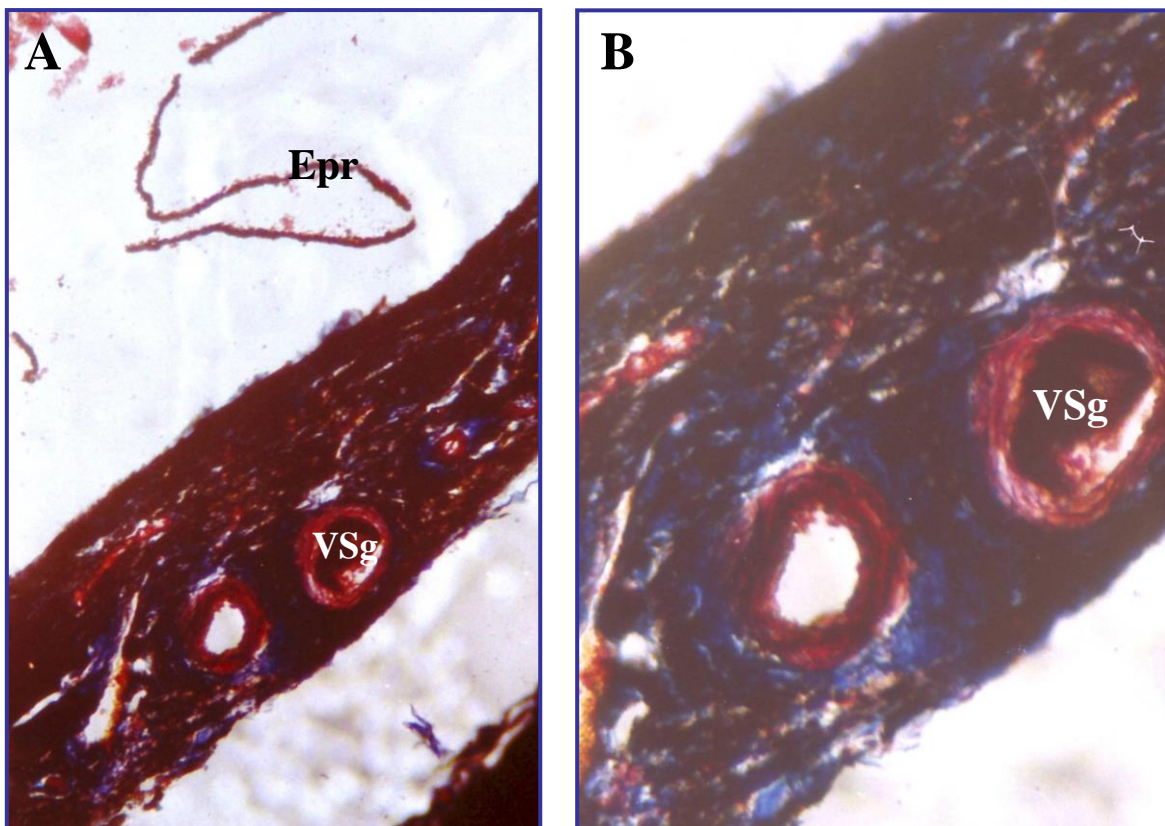
**Figure 89 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. La lésion est encore plus accentuée avec une destruction totale de la rétine. (Gx 10, Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



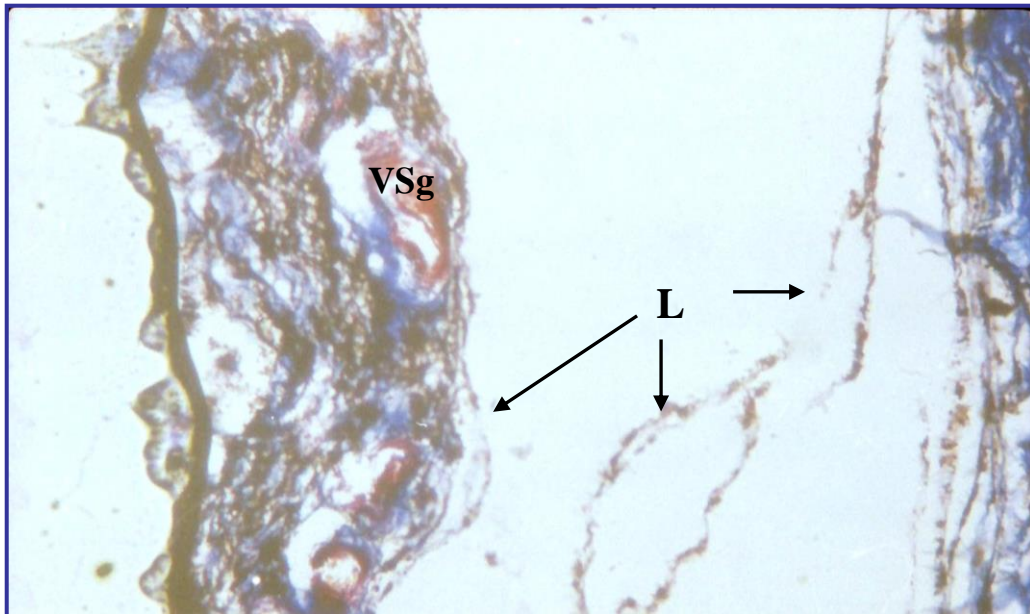
**Figure 90 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. (Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).



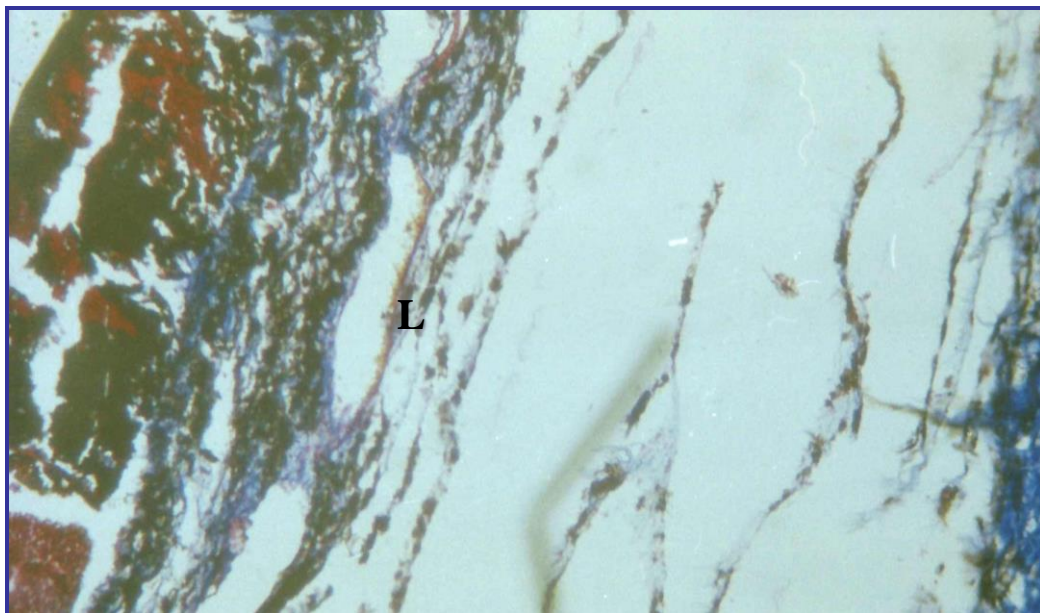
**Figure 91 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 100 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. La choroïde montre un épaissement avec une vasodilatation (VSg). La rétine (R) est dissociée de la choroïde. (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 92 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 100 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Les vaisseaux sanguins (VSg) sont dilatés. Un épaissement de la choroïde est également visible. Nous remarquons un détachement de l'épithélium rétinien (Epr). Gx 10, Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 93 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Nous observons une dilatation des vaisseaux sanguins (VSg) plus accentuée et la structure de la choroïde est altérée par dissociation des fibres composantes sous forme de lanières (L). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 94 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Détail de l'aspect en lanière qui retrouvé dominant (L). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).

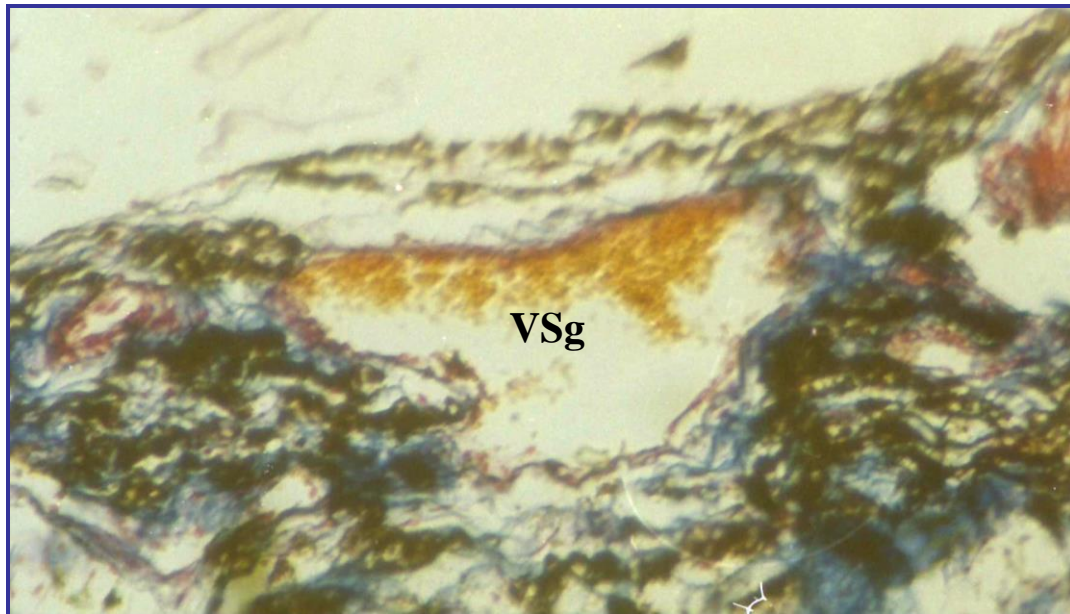


Figure 95 : Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. Détail d'un vaisseau sanguin dilaté avec une accumulation des globules rouges sur la paroi. (Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).

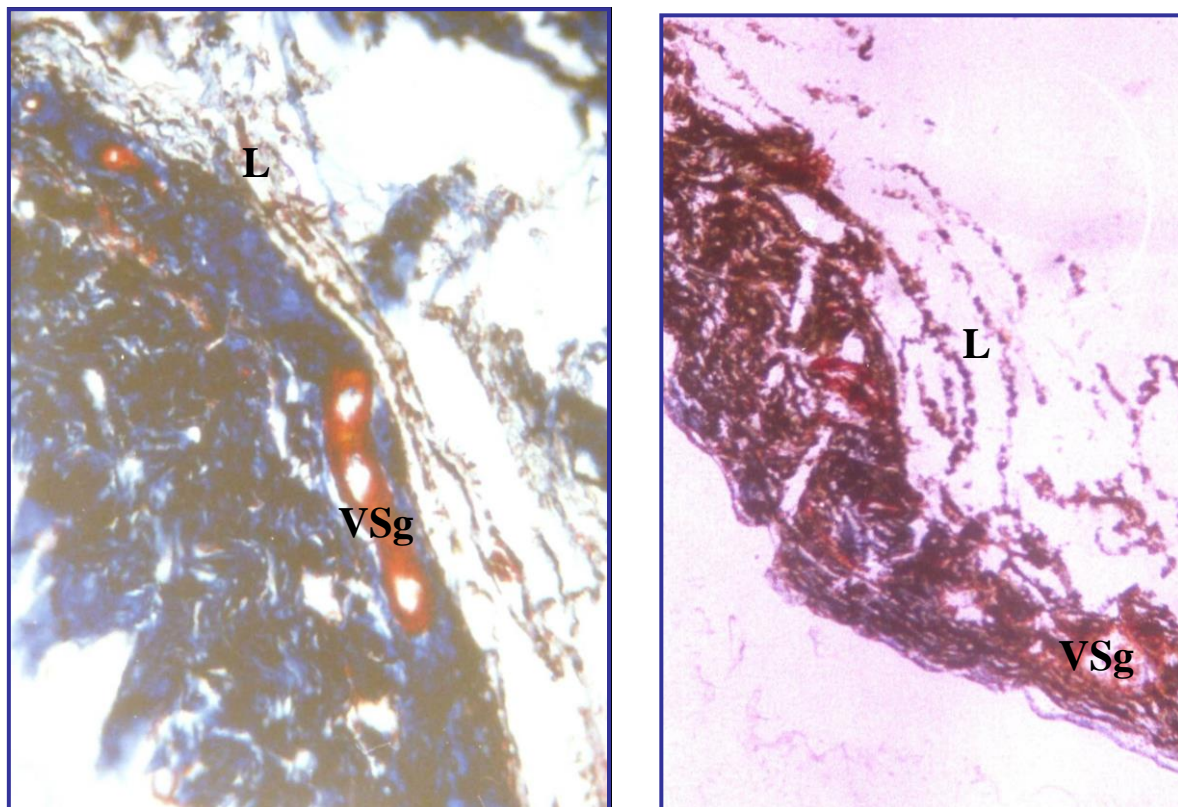
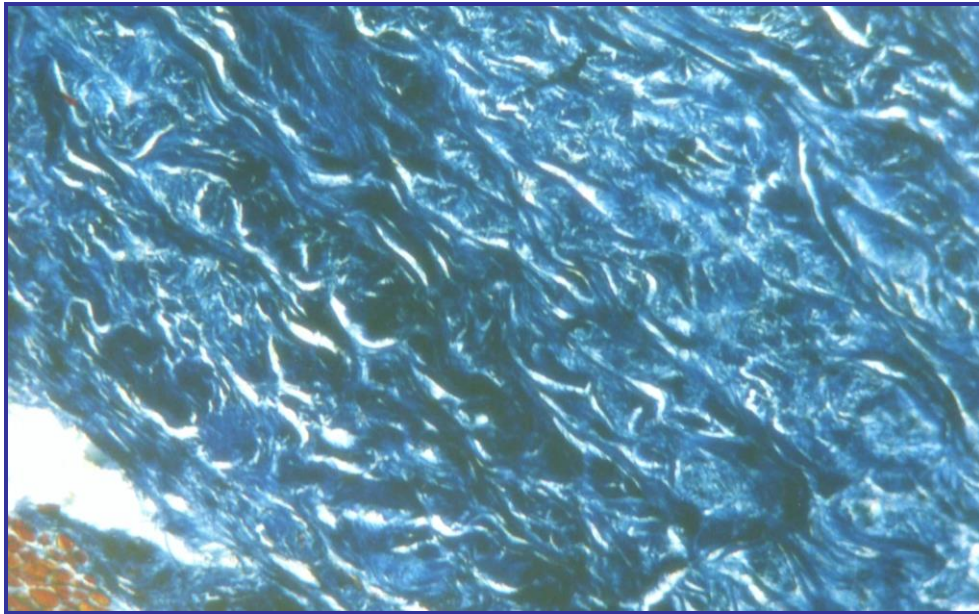
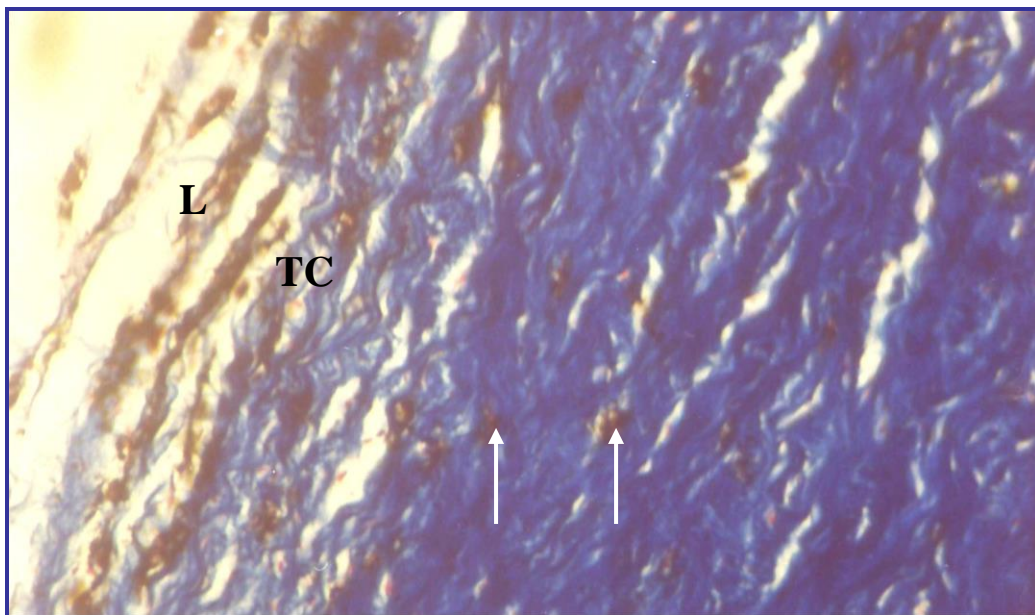


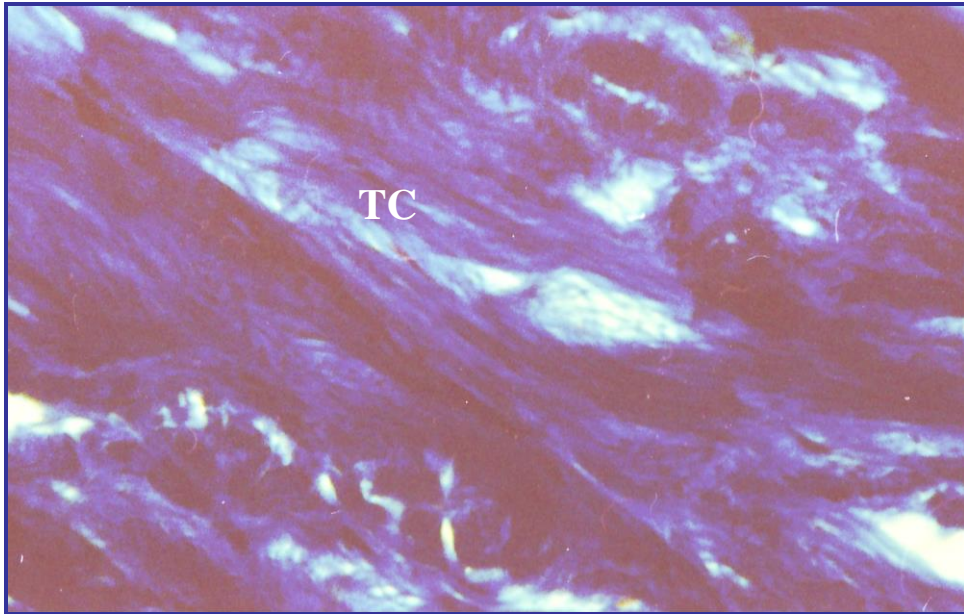
Figure 96 : Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 300 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. L'aspect altéré de la choroïde montre une dilatation de vaisseaux sanguins (VSg) et un aspect en lanière (L) dû à une dissociation des fibres collagènes. (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



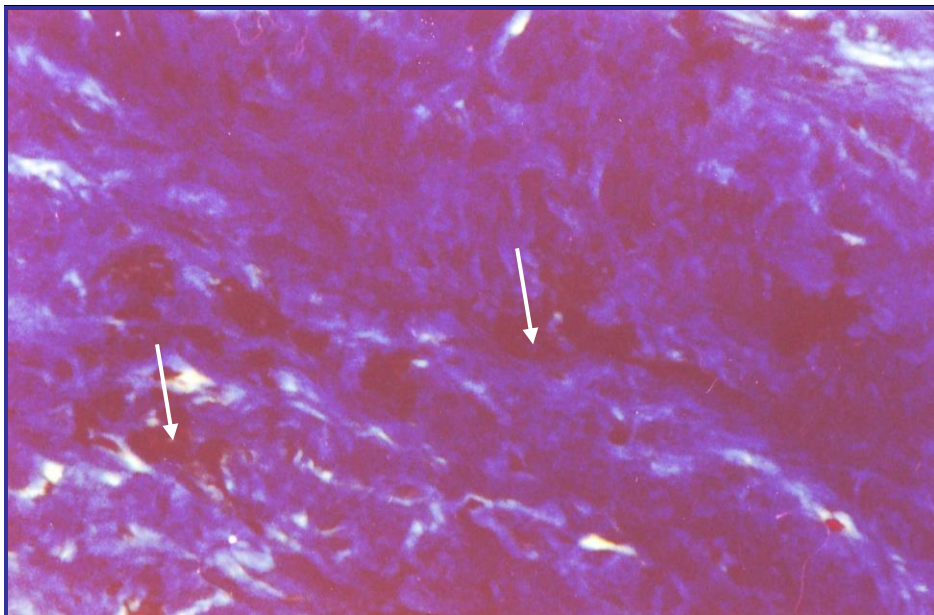
**Figure 97 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 100 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. La sclérotique présente une altération des fibres conjonctives. ( Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 98 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde et de la sclérotique d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxynitrites pendant 24h. La structure montre les fibres en lanières détachées (L) entre elles avec un tissu conjonctif les reliant ayant des fibres collagènes (TC) d'aspect sinueux. Quelques cellules activées ( $\rightarrow$ ) sont visibles au niveau de la sclérotique. ( Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).

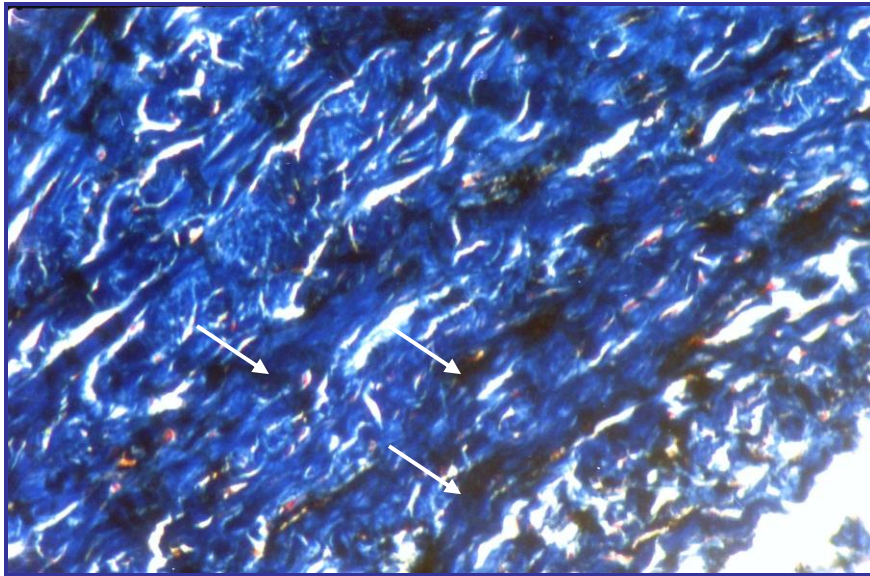


**Figure 99 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxy-nitrites pendant 24h. La trame conjonctive est lâche (TC). (B) Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).

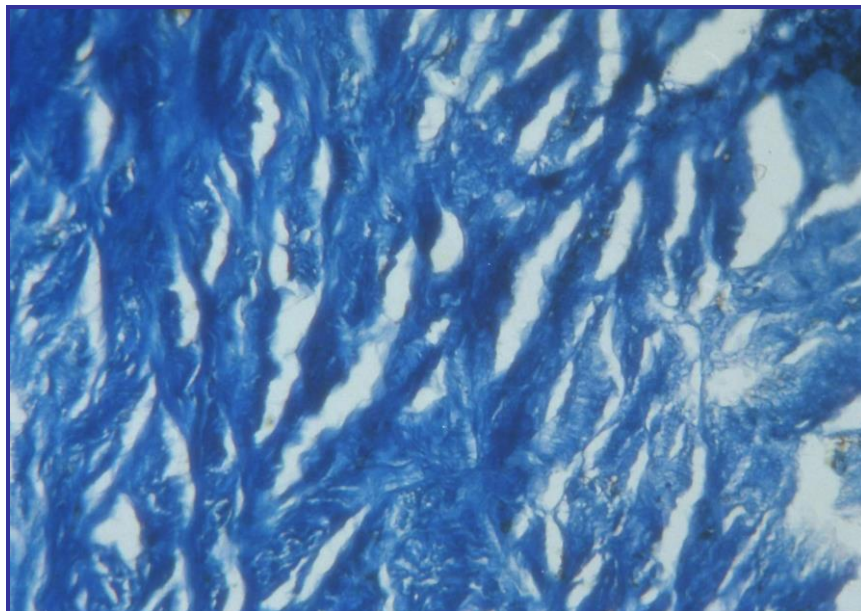


**Figure 100 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 200 $\mu$ M de peroxy-nitrites pendant 24h. Détail des cellules activées (→) au niveau de la sclérotique. (Gx40, fixateur Formol, coloration Mallory).





**Figure 101 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 300 $\mu$ M de peroxy-nitrites pendant 24h. La densité cellulaire ( $\rightarrow$ ) est assez forte au voisinage de la choroïde. Les fibres conjonctives présentent un aspect dense et discontinu (\*). (Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 102 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 300  $\mu$ M de peroxy-nitrite pendant 24h. La structure du tissu conjonctif est très altérée avec dissociation de fibres de collagène. (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).

### **III. Etude de l'effet de l'antigène S sur les explants des yeux de bœuf *in vitro* :**

Après incubation des explants oculaires en présence de l'antigène S purifié à 10µg/ml pendant 24, nous avons observé une production significative de NO associée à des altérations tissulaires et cellulaires. L'augmentation des taux de NO a été accompagnée d'une augmentation de l'expression des NOS au niveau des différentes structures. Nous n'avons pas observé de modifications histologiques notables lors de l'augmentation de la concentration de l'Ag S ou de la durée d'incubation.

#### **1. Etude histologique l'action de l'Ag-S sur les explants oculaires bovins *in vitro*:**

L'étude de l'effet de l'Ag-S sur les différentes tuniques des explants a montré des effets similaires des deux concentrations utilisées. Ces effets étaient très importants et affectent toutes les structures oculaires.

##### **a. Effets de l'Ag-S sur les explants oculaires antérieurs :**

Les effets de l'Ag- S, au niveau de la partie antérieure, montrent un décollement de l'épithélium cornéen sans que les cellules soient altérées (Figures 103-105).

L'iris garde une structure plus ou moins intacte où les parois vasculaires se montrent très épaissies et une densité cellulaire est observée au niveau du tissu conjonctif remplissant son centre (Figure 107). Les procès ciliaires perdent la continuité de leur couche épithéliale non pigmentaire (Figures 108, 119) et présentent une vasodilatation tout aussi bien que l'iris et le corps ciliaire (Figures 106- 108).

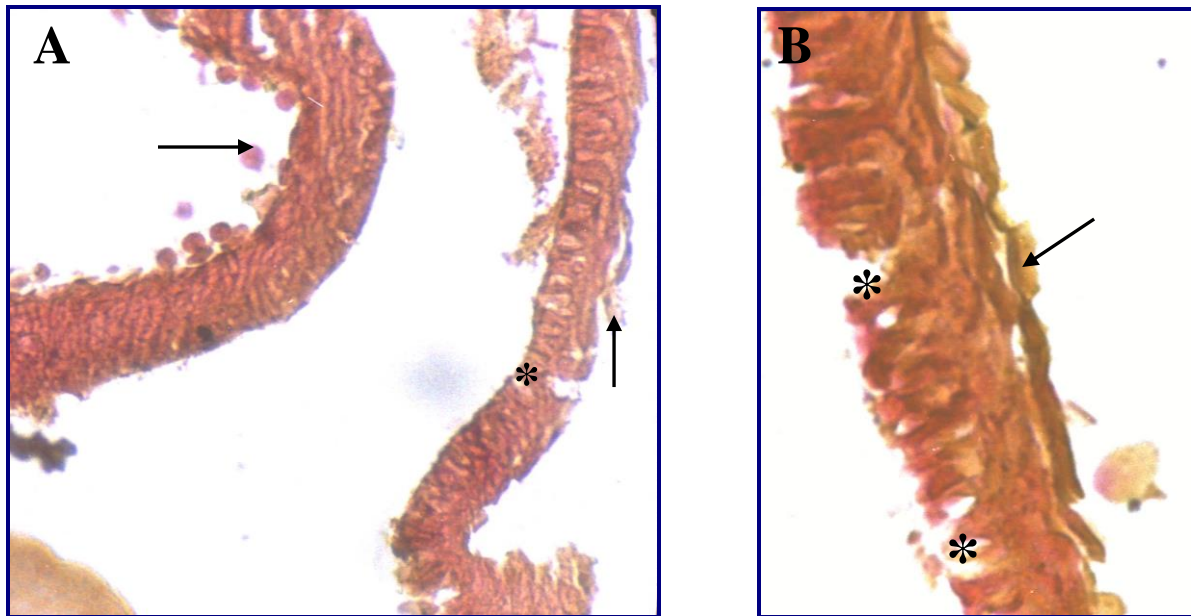
##### **b. Effets de l'Ag-S sur les explants oculaires postérieurs :**

Sous l'effet de l'induction faite avec l'antigène S, aux différentes concentrations, la rétine est totalement déstructurée et montre une vasodilatation importante. La choroïde présente un épaississement considérable accompagné d'une vasodilatation intense (Figures 109- 111). Ce dernier effet est retrouvé également au niveau de la sclérotique (Figure 117). La partie reliant la sclérotique à la choroïde est très lâche (Figure 110). Ces observations sont similaires à celles retrouvées utilisant les traitements avec les dérivés du NO. La présence de cellules en pleine activité cellulaire, stimulées par les dérivés du NO, jouerait un rôle dans l'immunité à travers l'action des macrophages ou des cellules dendritiques. Ces derniers seraient sollicités à l'échelle locale par effet direct du NO ou par un effet indirect via l'antigène S. Toutefois, une étude par immunomarquage (simple ou double marqueur) apporterait de plus amples informations.

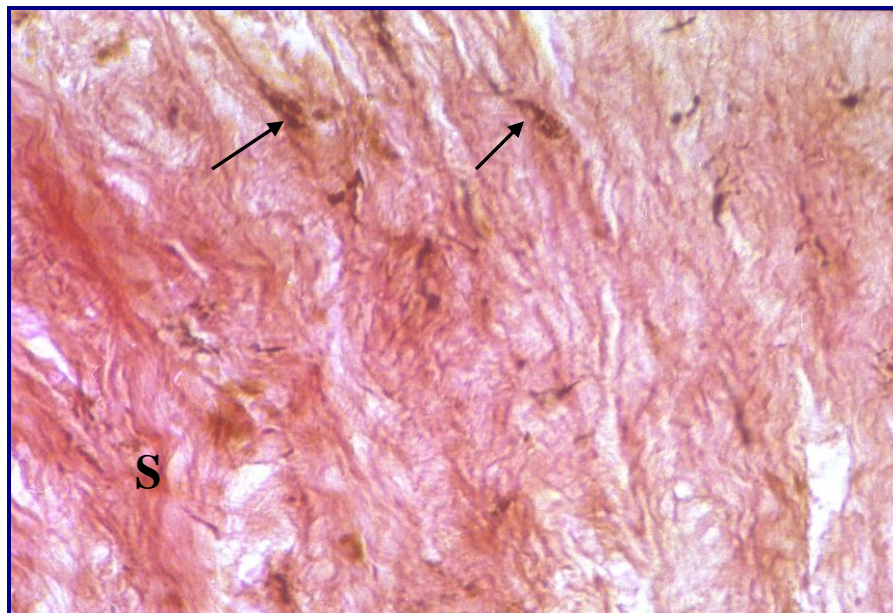
L'observation portant sur l'activation cellulaire en particulier les macrophages et les cellules dendritiques serait probablement liée à la stimulation par l'antigène S. L'action des dérivés du NO n'est pas à négliger. Une étude approfondie à l'échelle cellulaire nous apporterait des précisions.

Ces cellules auraient un rôle non négligeable dans le dysfonctionnement immunitaire local à savoir l'auto-immunité. Ces observations ouvrent des perspectives d'exploration à l'échelle cellulaire.

Nous relevons avec intérêt que l'induction des explants des yeux de bœuf avec l'Ag-S présenterait des similitudes morphologiques avec les cultures d'explants traités avec les dérivés du NO aussi bien pour les nitrites et les nitrates que pour le peroxy-nitrite.



**Figure 103 :** Coupe transversale au niveau de l'épithélium de la cornée d'explant traité avec 10  $\mu\text{g/ml}$  d'antigène S pendant 24h. L'épithélium (Ep) est détaché de la lame basale et montre une altération des cellules superficielles par desquamation (cellules aplaties) ( $\rightarrow$ ) avec quelques cellules basales altérées (\*). ((A) Gx 20, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 104 :** Coupe transversale au niveau de l'épithélium de la cornée d'explant traité avec 10  $\mu\text{g/ml}$  d'antigène S pendant 24h. Le stroma de la région péricornéenne montre quelques cellules activées ( $\rightarrow$ ). (Gx 20, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

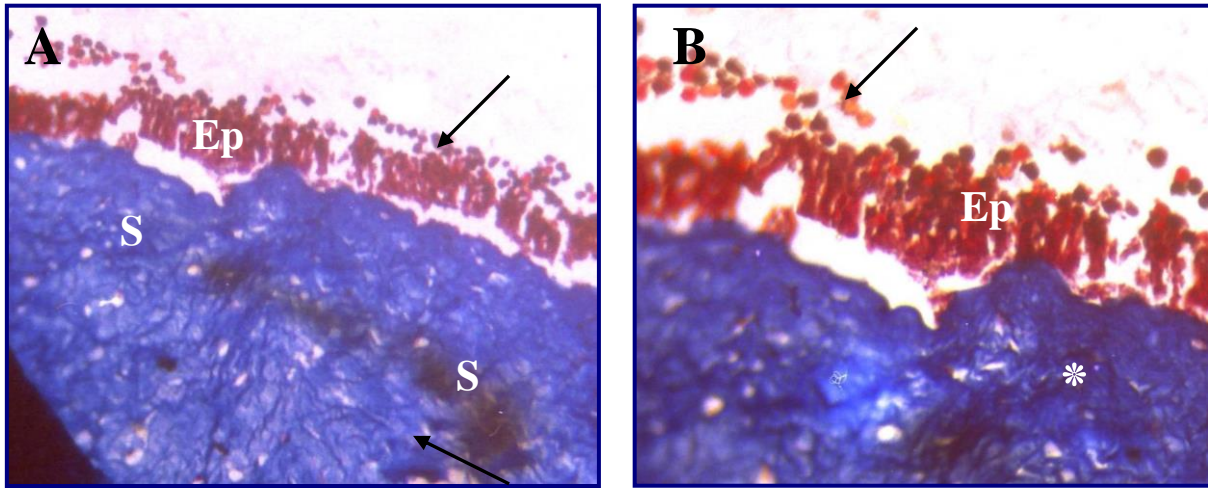


Figure 105 : Coupe transversale au niveau de l'épithélium de la cornée d'explant traité avec 20 µg/ml d'antigène S pendant 48h. L'épithélium (Ep) est détaché de la lame basale et montre une altération surtout des cellules superficielles (cellules rondes détachées) (→). Le stroma cornéen (S) présente des fibres collagènes avec un aspect légèrement sinueux (\*). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Mallory).

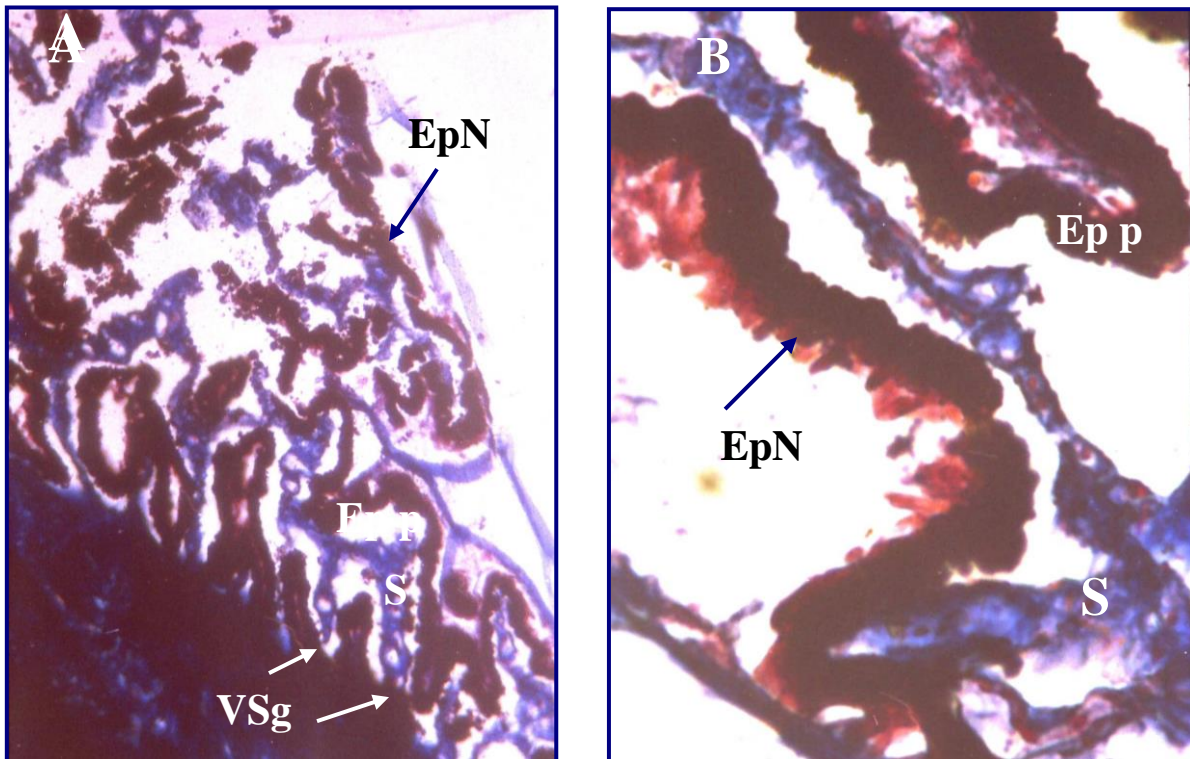


Figure 106 : Coupe transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec avec 20 µg/ml d'antigène S pendant 48h. L'épithélium non pigmentaire (EpN) est nécrosé (→) mais l'épithélium pigmentaire (Epp) ne présente aucune altération. Dans le stroma (S), nous observons une dilatation de vaisseaux sanguins (VSg). ((A) Gx 10, (B) Gx 40, fixateur Formol, coloration Mallory).

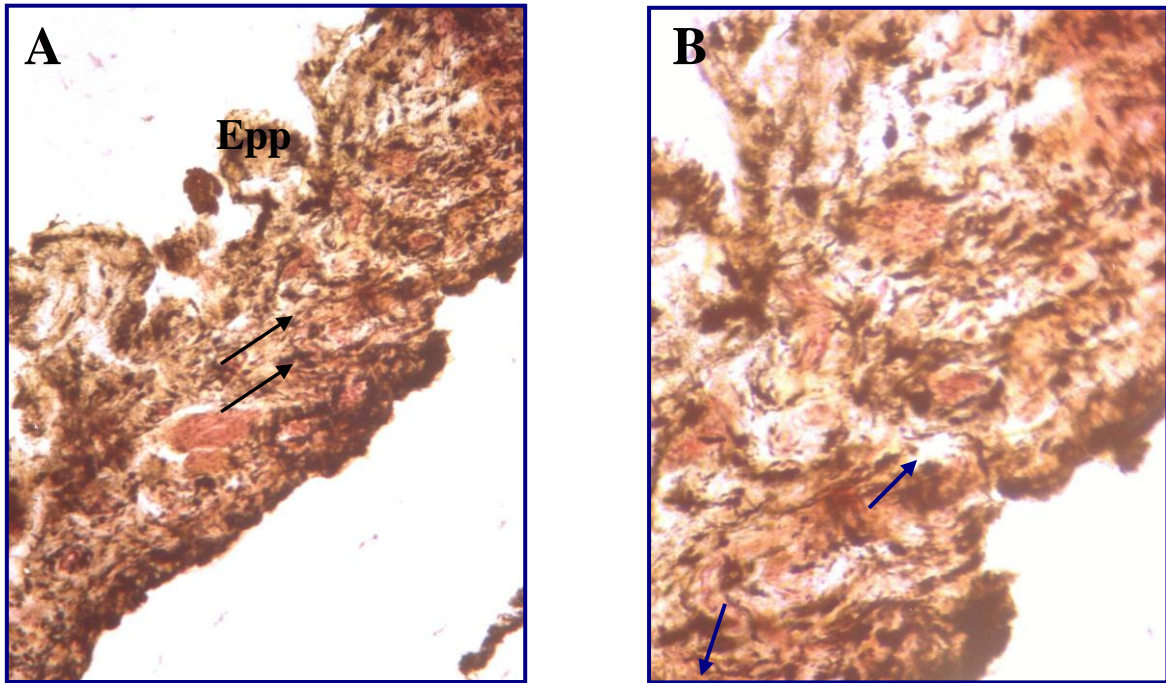


Figure 107 : Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 10 µg/ml d'antigène S pendant 24h. L'épithélium postérieur de l'iris est altéré (Epp),et nous observons des cellules activées au niveau de la trame conjonctive (→). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

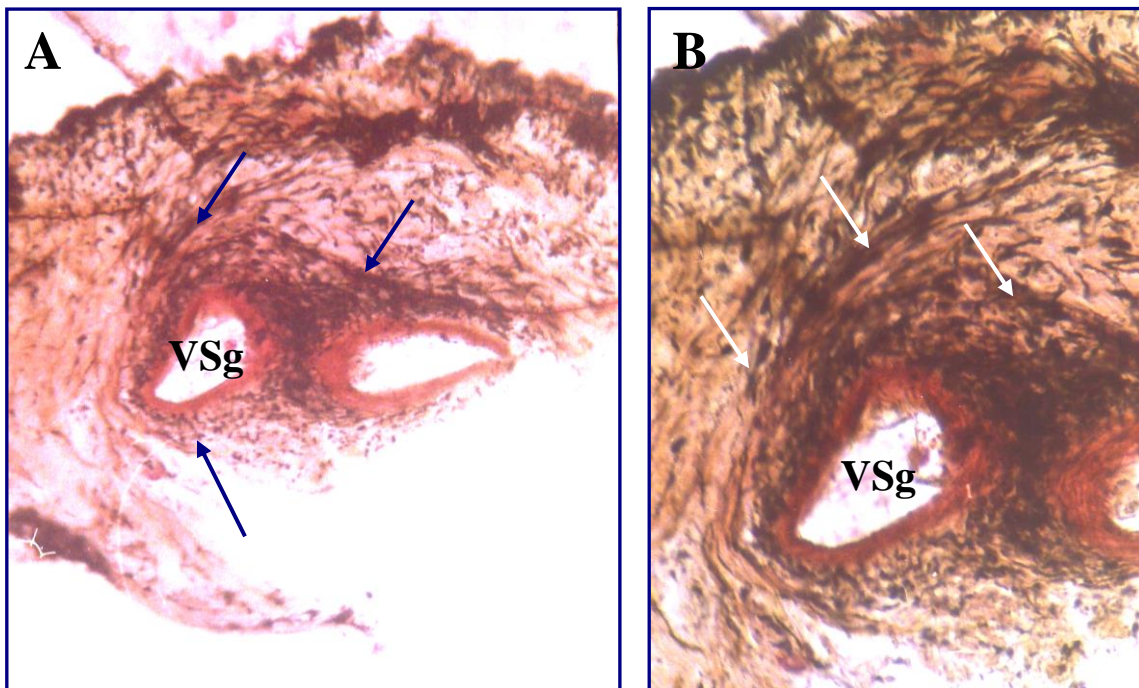
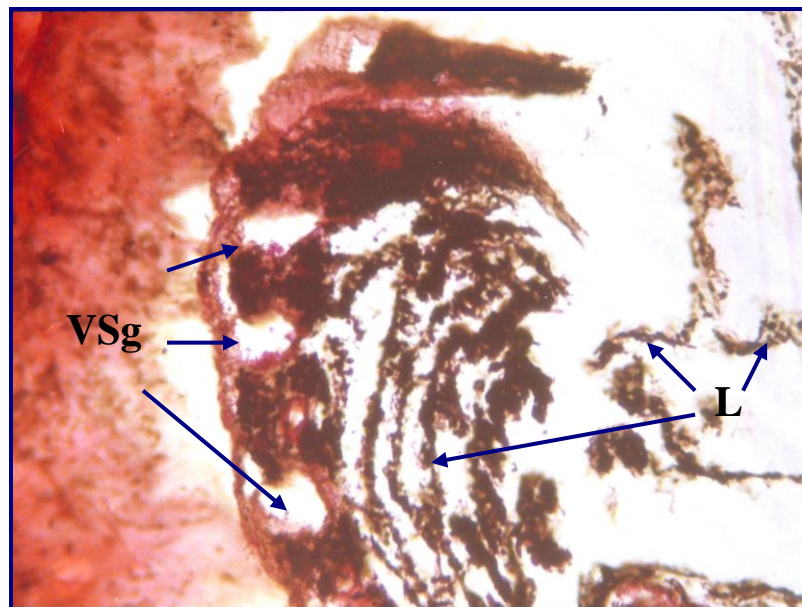
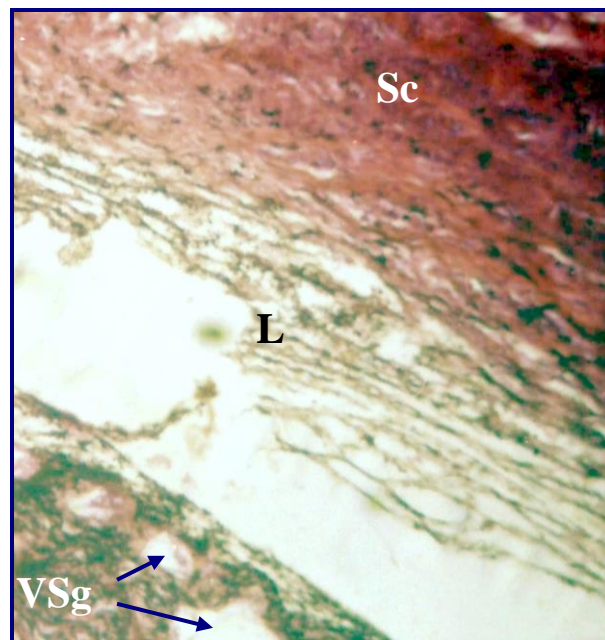


Figure 108 : Coupe transversale au niveau du corps ciliaire d'explant traité avec 20 µg/ml d'antigène S pendant 24h. L'épithélium est altéré (Ep),et nous observons une vasodilatation (VSg) et des cellules activées au niveau de la trame conjonctive et surtout autour de ces derniers (→). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 109 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 10 µg/ml d'antigène S pendant 24h. Nous observons une vasodilatation (VSg) et une altération de la trame conjonctive sous forme de lanières (L). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).



**Figure 110 :** Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 20 µg/ml d'antigène S pendant 24h. Nous observons une vasodilatation (VSg), une altération de la trame conjonctive sous forme de lanières (L) et des cellules activées au niveau de la sclérotique (Sc). (Gx 5, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

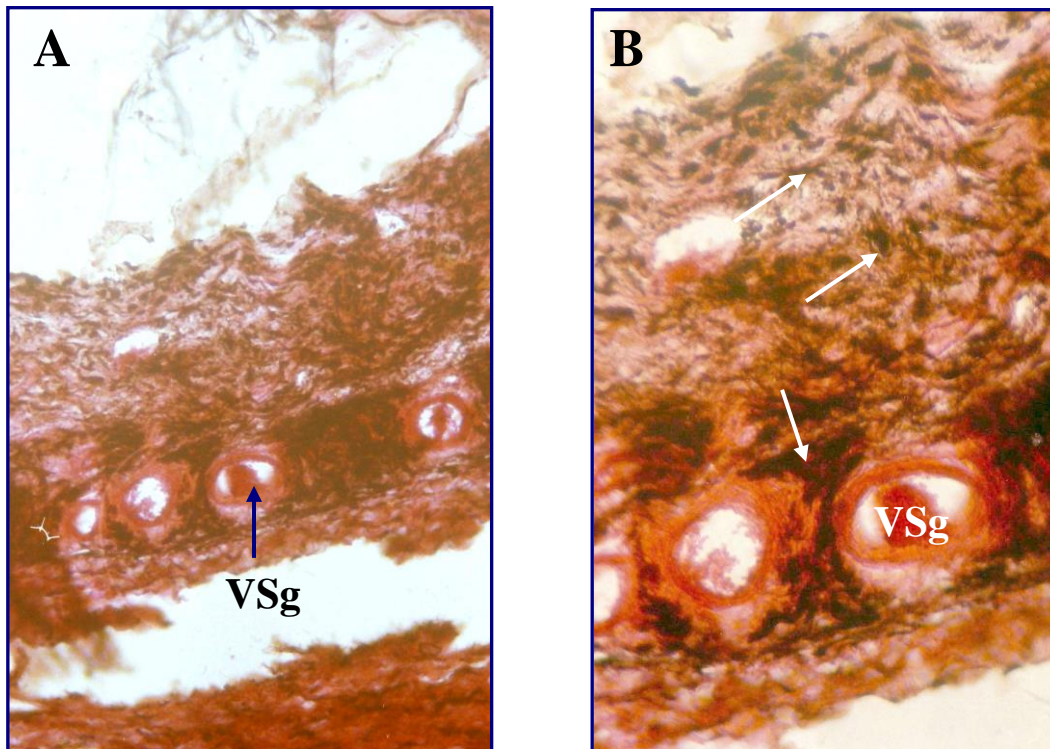


Figure 111 : Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 20  $\mu\text{g/ml}$  d'antigène S pendant 24h. Un épaissement très marqué de la choroïde est observé. Nous observons une vasodilatation modérée des vaisseaux sanguins et nous notons des cellules activées ( $\rightarrow$ ) surtout des vaisseaux sanguins (VSg). ((A) Gx 10, (B) Gx 20, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

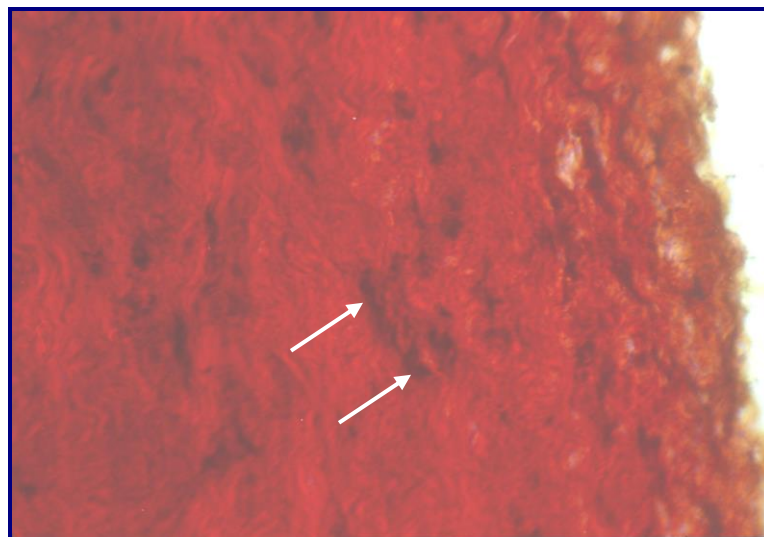
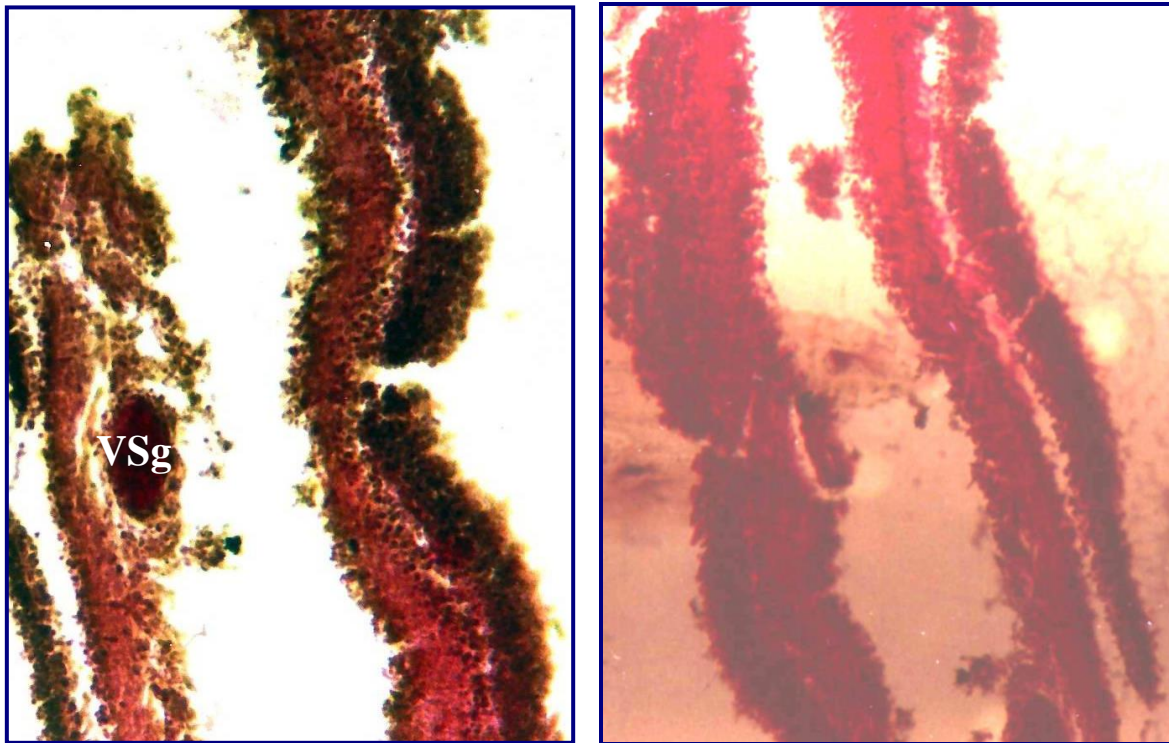
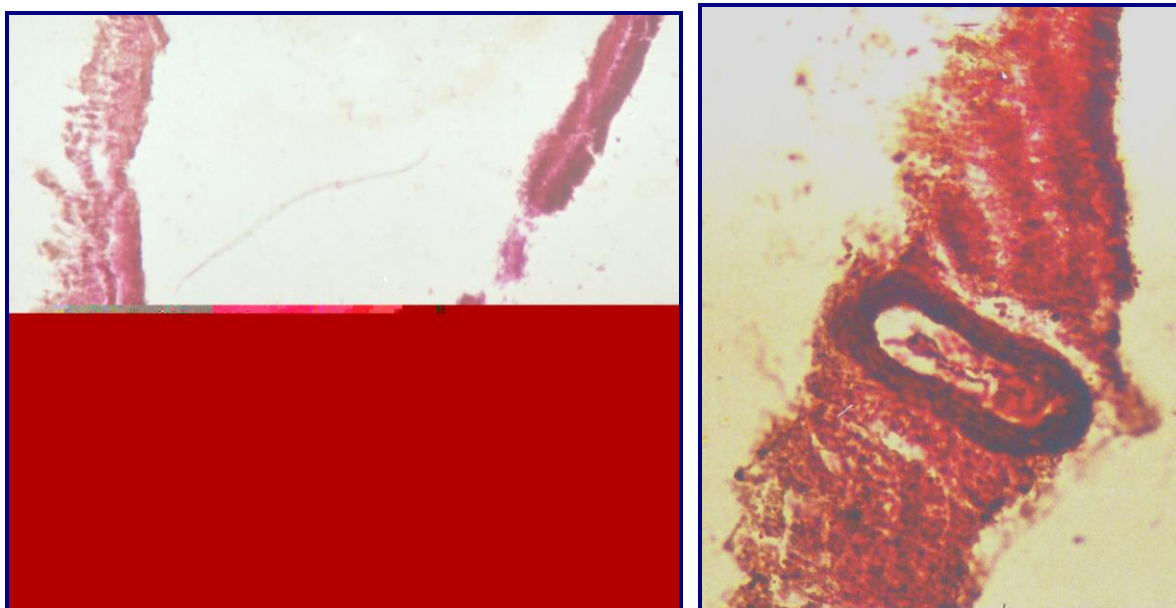


Figure 112 : Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 20  $\mu\text{g/ml}$  d'antigène S pendant 24h. Les faisceaux de fibres conjonctives ne présentent aucune altération où se retrouvent des cellules activées ( $\rightarrow$ ). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

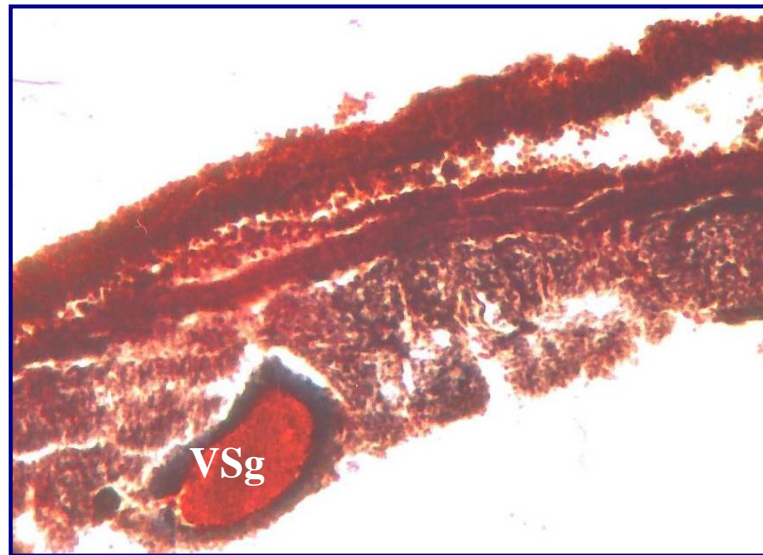




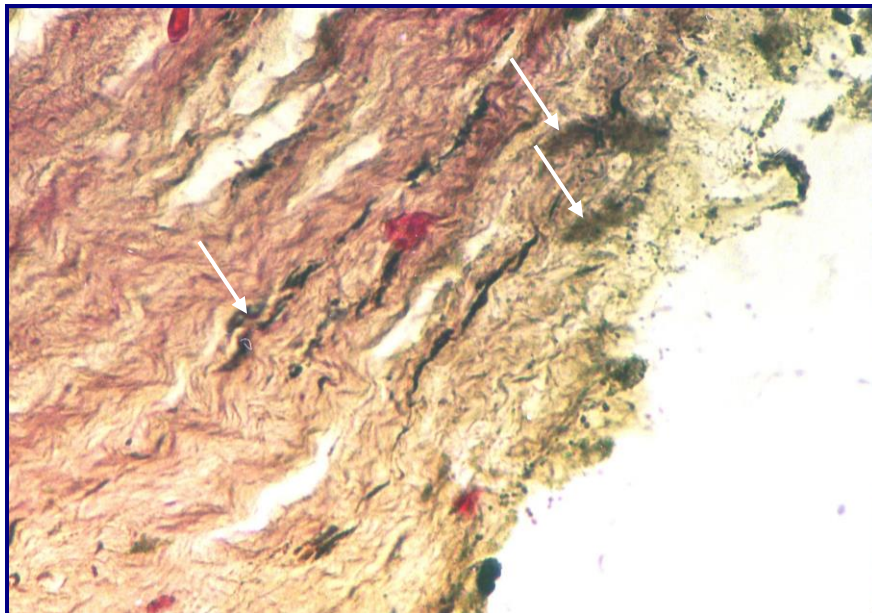
**Figure 113 : Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 10 µg/ml d'antigène S pendant 24h. La structure est altérée avec perte de la couche des cellules photoréceptrices. Les différentes couches sont apposées les une aux autres. Notons la présence d'un vaisseau sanguin dilaté (VSg). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).**



**Figure 114 : Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 20 µg /ml d'antigène S pendant 24h. La structure est altérée avec perte de la couche des cellules photoréceptrices. Notons la présence d'un vaisseau sanguin dilaté (VSg). (Gx 5, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).**



**Figure 115 :** Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 20µg/ml d'antigène S pendant 48h. Nous observons une destruction de la rétine et une vasodilatation d'un vaisseau sanguin (VSg). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).



**Figure 116 :** Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 20µg/ml d'antigène S pendant 24h. Détail de cellules activées au bord de la sclérotique (→). (Gx 10, fixateur Formol, coloration Mallory).

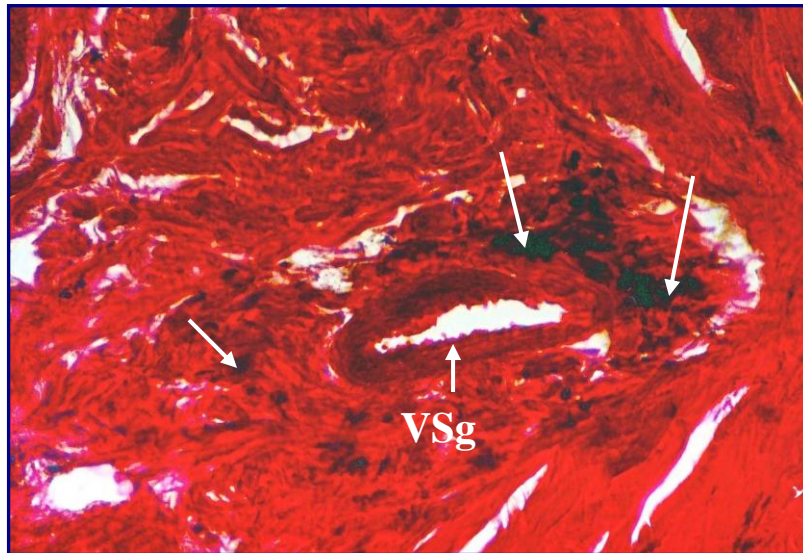


Figure 117 : Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 20µg/ml d'antigène S pendant 24h. La figure représente un vaisseau sanguin (VSg) entouré de cellules activées (→) et une altération des fibres conjonctives. (Gx 20, fixateur Formol, coloration Hématoxyline-Eosine).

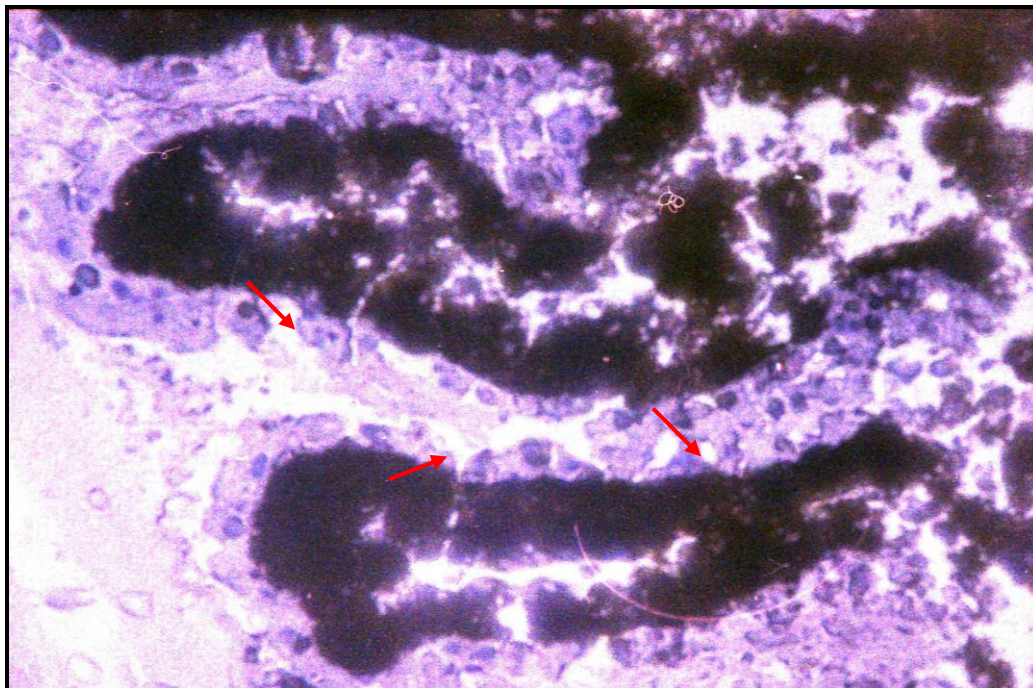


Figure 118 : Coupe semi-fine transversale au niveau des procès ciliaires d'explant traité avec 20µg/ml d'antigène S pendant 55h. La figure représente un des procès constitué d'un épithélium pigmentaire partiellement altéré entouré d'un épithélium non pigmentaire montrant une déstructuration tissulaire (→) et une altération de certaines cellules épithéliales. (Gx 40, double fixation : Glutaraldéhyde- Tétroxyde d'osmium, coloration Bleu de toluidine).

## 2. Dosage des nitrites résiduels et totaux dans les surnageants des cultures d'explants de yeux de bœufs :

L'étude de la production du NO par les explants oculaires a montré une production spontanée reflétée par les taux de nitrites résiduels présents dans les surnageants de culture des explants des parties antérieure et postérieure. Cette production serait due à la présence de NOS constitutive au niveau des tissus locaux (Gourreau et Courtois, 1996) (Figure 119).

Nous avons observé qu'après une incubation de 24h, les taux de nitrites résiduels produits au niveau de la partie antérieure sont supérieurs à ceux produits par la partie postérieure. Ce rapport est inversé après 48h. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations retrouvées après 24 et 48h d'incubation des explants antérieurs alors que nous observons une augmentation significative des taux de nitrites produits au niveau de la partie postérieure. Ces résultats reflètent l'hétérogénéité des sources cellulaires de NO et une différence probable dans le métabolisme de NO. En effet, la partie antérieure est essentiellement composée de structure uvéales riches en vaisseaux sanguins (NOS III) alors que la partie postérieure est composée d'un tissu nerveux (rétine : NOS I), de tissus conjonctif épais (sclérotique) et de vaisseaux sanguins présents dans la choroïde (NOS III).

L'induction des explants avec l'Ag S a également montré des profils différents de production de NO selon la partie considérée et la durée d'incubation (Figure 119).

En effet, au niveau de la partie antérieure, nous n'avons observé de différences significatives entre les deux concentrations utilisées. Cet effet serait dû à la faible présence de la Ag S au niveau des structures antérieures. En effet, il est faiblement exprimé au niveau de l'iris et du corps ciliaire. Cependant, nous avons noté une importante corrélation ( $R^2 = 0,71$ ) entre la production de NO et la durée d'incubation. Cette augmentation serait due à la production de NO par les NOS II suite à leur induction par l'Ag S.

Au niveau de la partie postérieure, nous avons observé une production importante de NO suite à la stimulation des cultures par l'Ag S et ce, avec les concentrations utilisées. Quoiqu'il n'y ait pas de différence significative entre les taux de nitrites retrouvés avec les concentrations de 10  $\mu\text{G/ml}$  et de 20  $\mu\text{g/ml}$  après 24h d'incubation, nous avons noté une augmentation significative après 48 h et 55 h d'incubation. Cette différence obtenue correspondrait au temps nécessaire au développement de la réponse immunitaire et à l'induction de la NOS II. Cette réponse est plus homogène que celle observée au niveau de la partie antérieure. En effet, nous avons observé une corrélation plus importante ( $R^2 = 0,89$ ). Ces résultats seraient dus à l'importante expression de l'AgS au niveau des photorécepteurs rétinien.

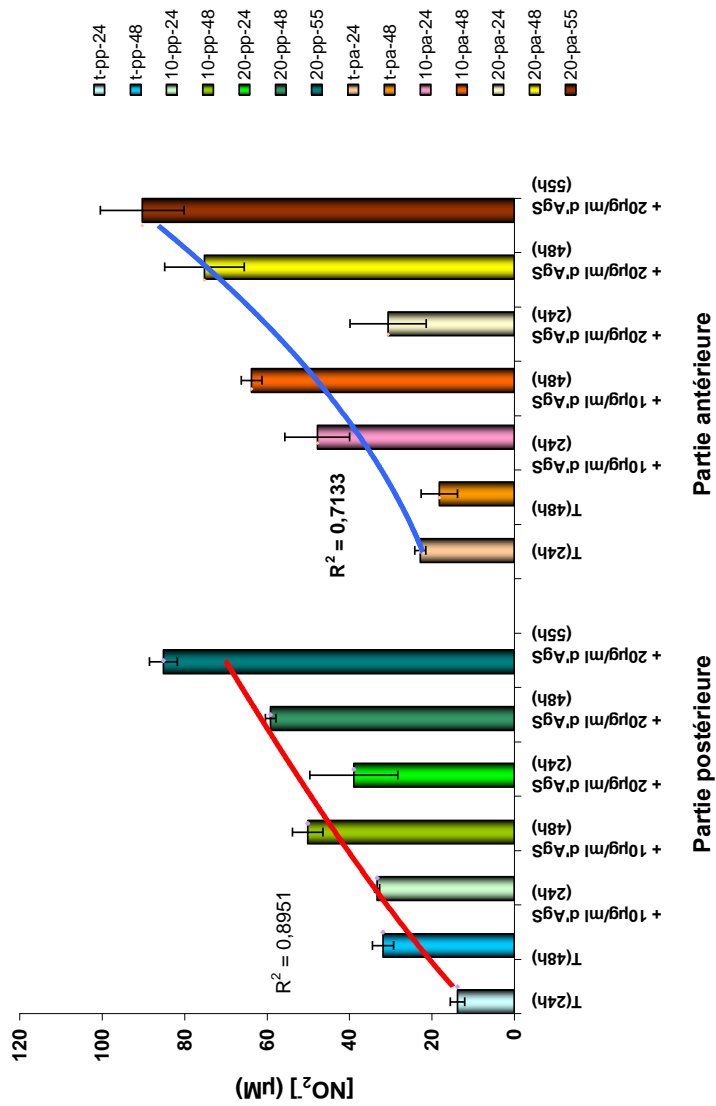


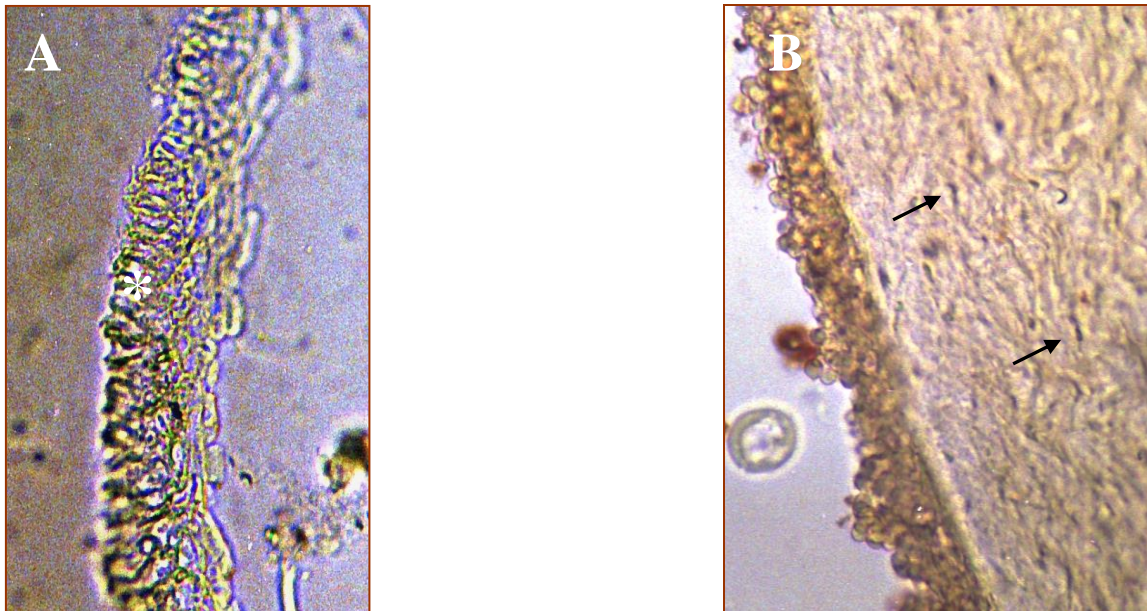
Figure 119: Concentrations des nitrites résiduels dans les surrègants des cultures des explants oculaires induits avec l'AgS

### 3. Etude immunohistochimique de l'expression des NOS au niveau des cultures d'explants de yeux de bœufs traités avec l'Ag S:

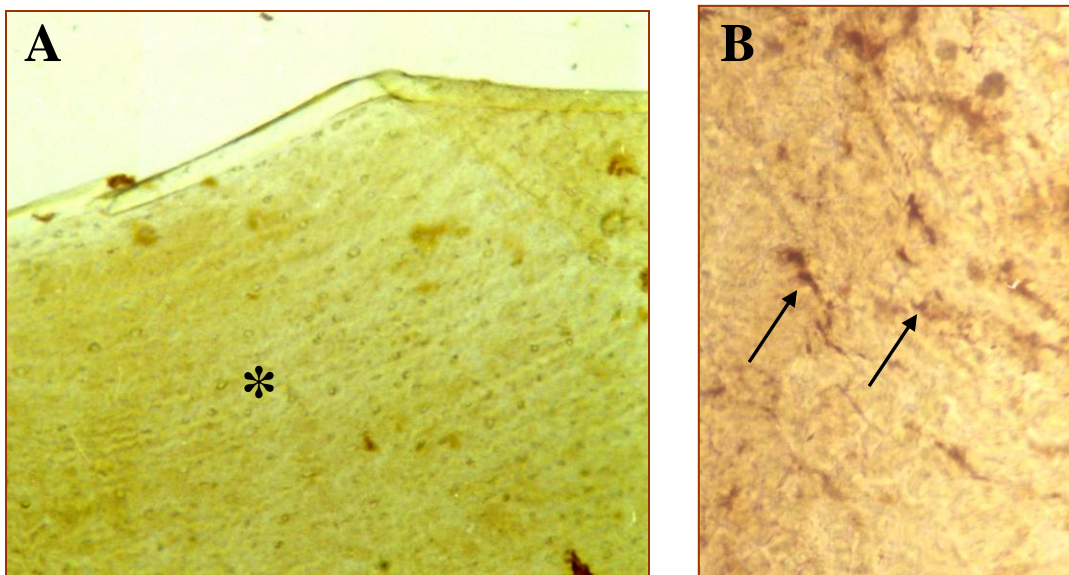
La mise en évidence des NOS au niveau des différentes structures des explants a montré la présence locale des NOS au niveau des différents tissus (Figures 120A, 121 A, 122A, 123A, 124). Les tissus exprimant fortement la NOS sont essentiellement l'iris, le corps ciliaire et la chororoïde. Les cellules correspondaient essentiellement aux cellules endothéliales et aux fibroblastes. Ces tissus correspondent à l'uvée, très vascularisée. De plus, le corps ciliaire régule partiellement le tonus oculaire via la production du NO (Gourreau et Courtois, 1996 ; Becquet *et al.*, 1997) .

Le traitement des explants avec l'Ag S a induit une augmentation de l'expression des NOS au niveau de toutes les structures oculaires (Figures 120 B, 121 B, 122B, 123B et C, 125, 126, 127, 128, 129). Ces NOS induites correspondraient à la NOS II. De plus, la répartition des NOS n'est pas homogène dans toutes les structures. En effet, quoique toutes les structures aient montré une expression des NOS, seul l'épithélium cornéen a exprimé fortement la NOS (Figure 120 B). Au niveau des structures uvéales, nous avons noté la présence de cellules activées allongées (fibroblastes) ou étoilées (cellules macrophagiques ou dendritiques) (Figures 122 B, 123 C, 125 B, 126,129).De plus, les cellules endothéliales et les péricytes au niveau des vaisseaux sanguins ont fortement exprimé la NOS (Figures 122 B, 126, 129).

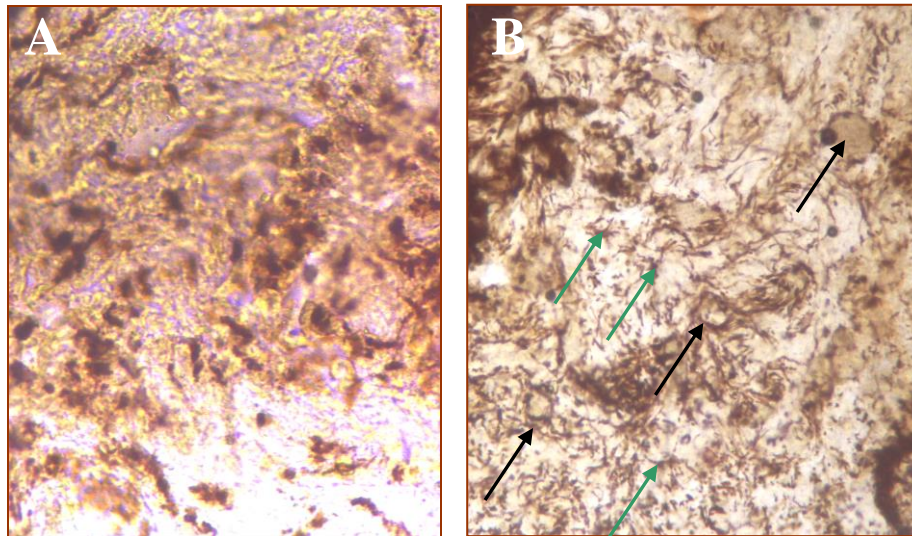
La rétine a montré une importante expression des NOS correspondant probablement aux NOS constitutives (I et III) et à la NOS II. En effet, les cellules gliales (astrocytes, microglies, cellules de Muller) et les cellules nerveuses (cellules ganglionnaires, cellules bipolaires) peuvent exprimer les différentes isoformes des NOS (Gourreau et Courtois, 1996 ; Becquet *et al.*, 1997) .



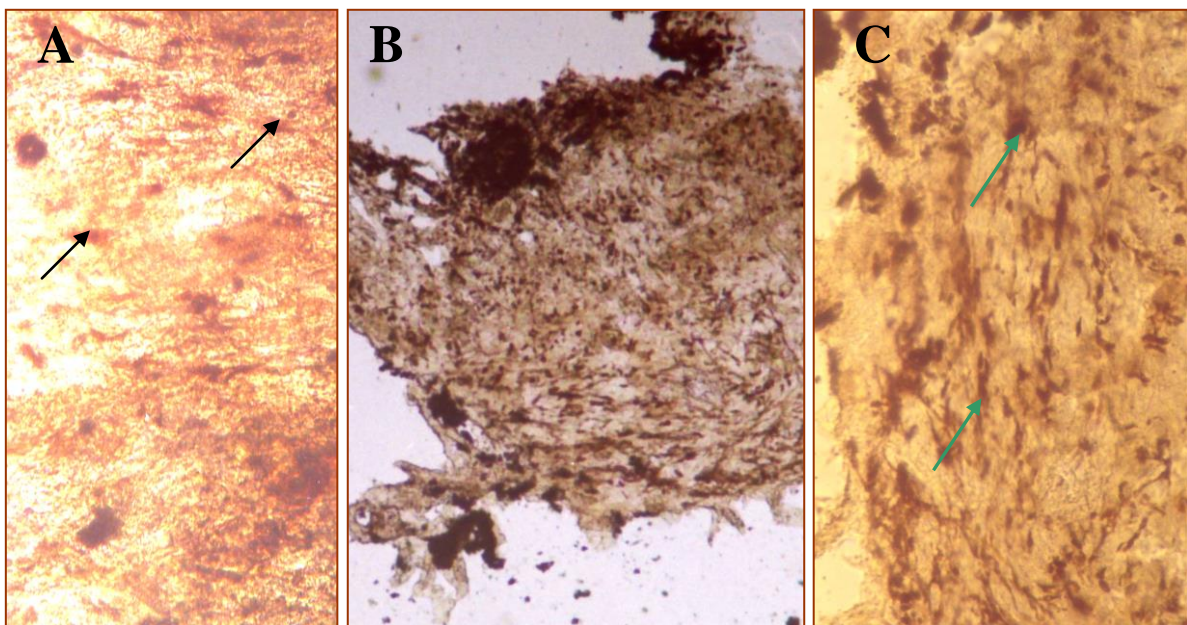
**Figure 120 : Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de la cornée d'un explant des yeux de bœuf témoins (A) ou induit avec 20µg/ml d'antigène S pendant 48h (B). Nous remarquons une forte présence de la NOS au niveau de l'épithélium cornéen (\*) et faiblement au niveau des fibroblastes (→) ((A) Gx 20, (B) Gx 20).**



**Figure 121: Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de la cornée d'un explant des yeux de bœuf induite avec 20µg/ml d'antigène S pendant 48h. La figure (A) représente le stroma cornéen (\*) qui de côté de l'endothélium ne présente presque pas de coloration. La figure B montre quelques fibroblastes (→) exprimant la NOS. ((A) Gx 5, (B) Gx 20).**

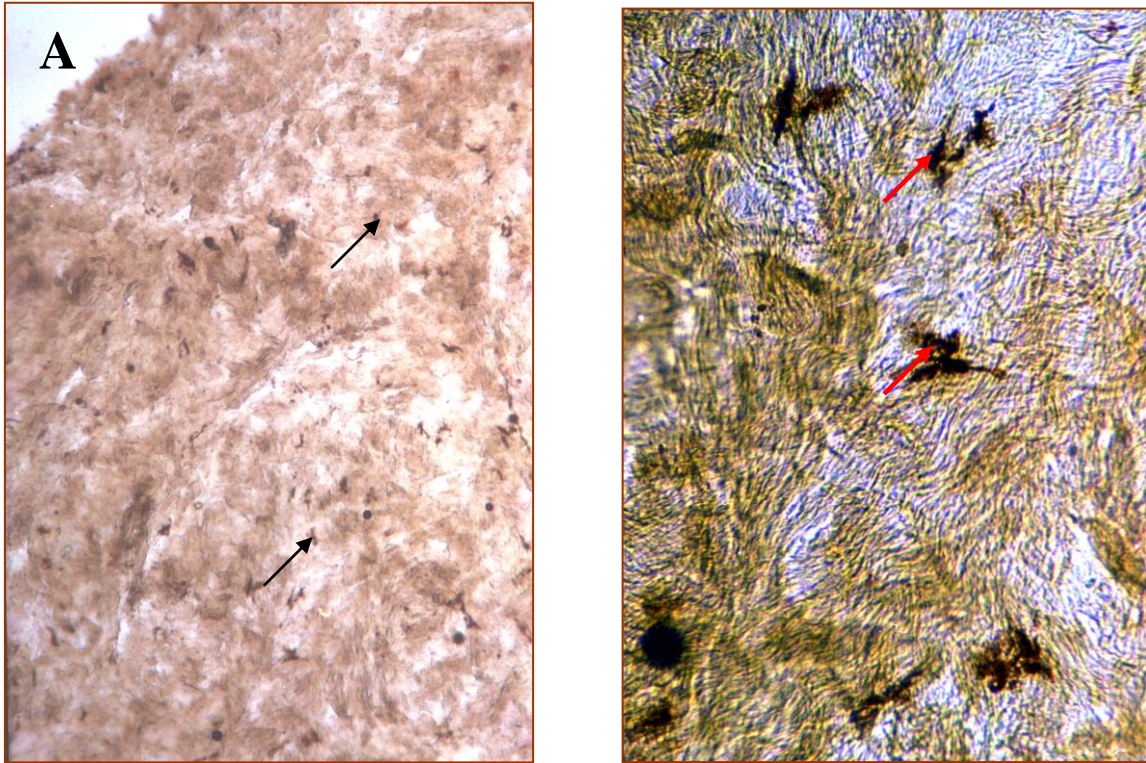


**Figure 122 : Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de l'iris d'un explant des yeux de bœuf témoins (A) ou induit avec 20µg/ml d'antigène S pendant 48h (B). Nous remarquons une forte présence de la NOS au niveau des cellules activées à aspect étoilé (→) et au niveau des vaisseaux sanguins (→) ((A) Gx 20, (B) Gx 20).**

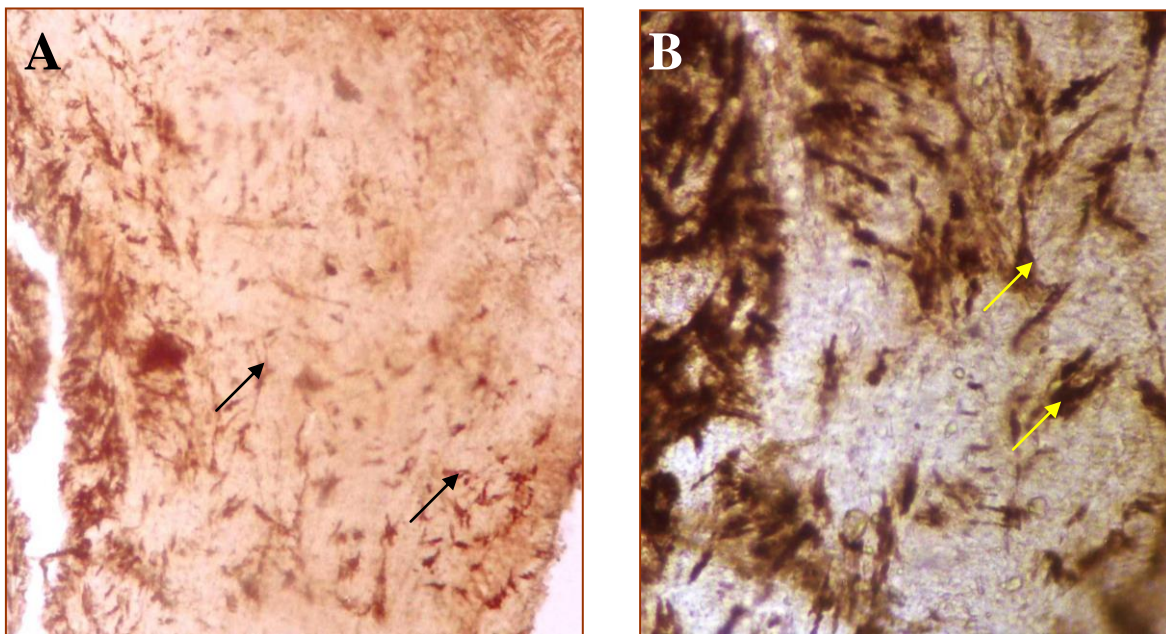


**Figure 123 : Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau du corps ciliaire d'un explant des yeux de bœuf témoins (A) ou induit avec 20µg/ml d'antigène S pendant 48h (B, C). Nous remarquons la présence de cellules non activées productrices de NOS (→) au niveau des explants témoins et une forte présence de la NOS au niveau des cellules activées à aspect étoilé ou allongé (→) au niveau des explants induits ((A) Gx 20, (B) Gx 5, (C) Gx 20).**

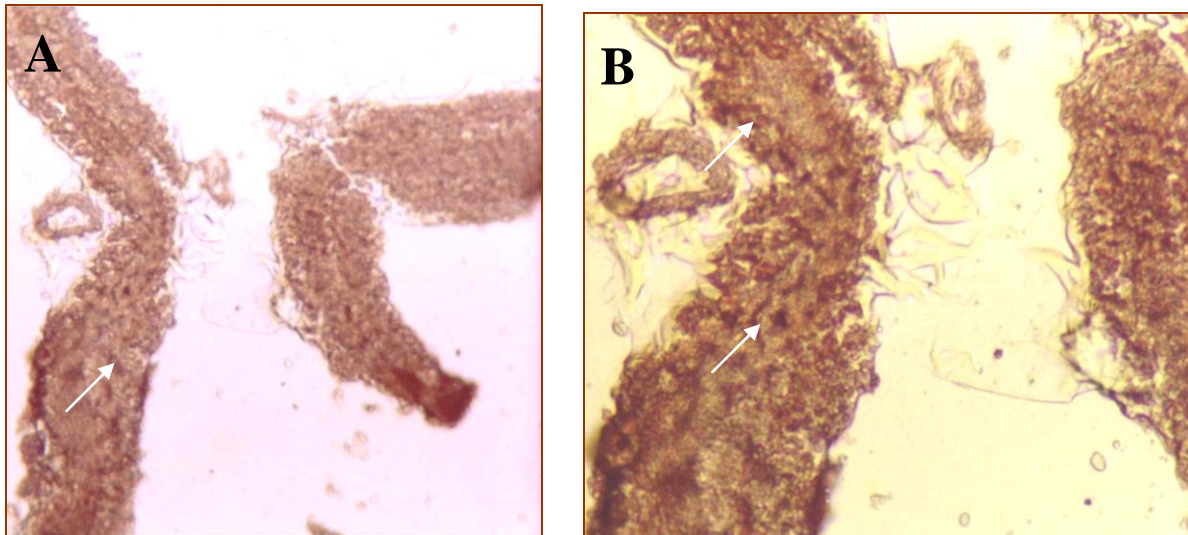




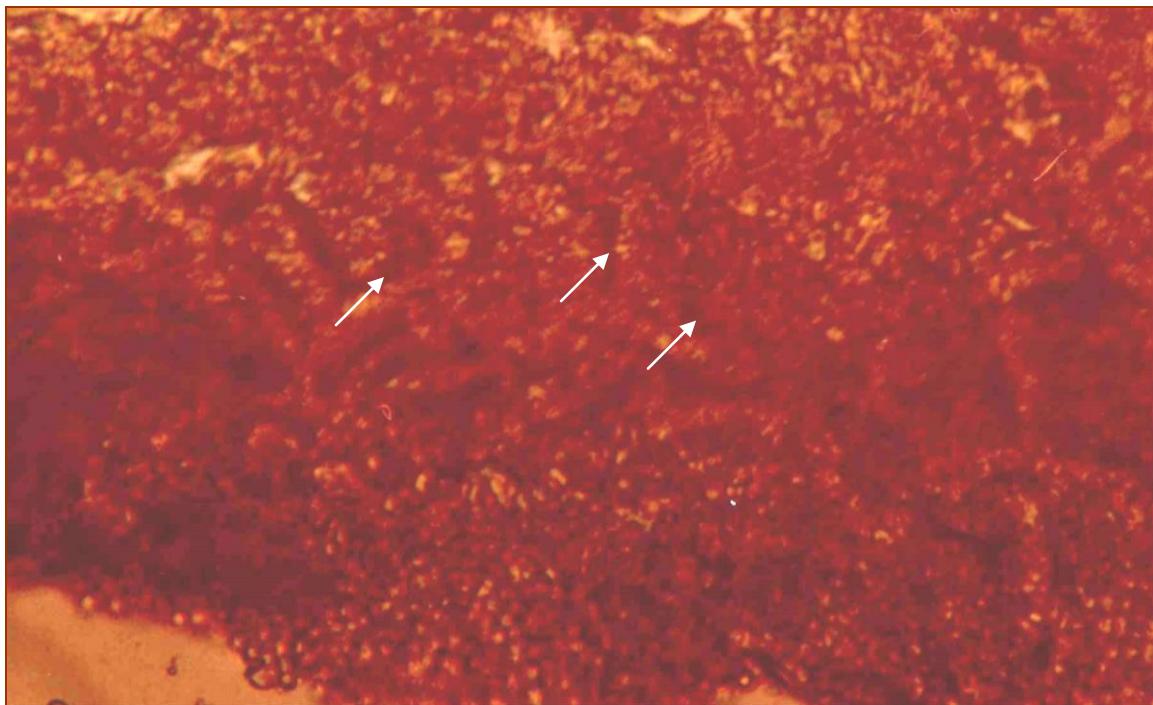
**Figure 124:** Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de la sclérotique d'un explant des yeux de bœuf témoin. Nous remarquons la présence de quelques rares cellules productrices de NOS (→). Le détail de ces dernières montre de petites cellules denses aplaties. ((A) Gx 5, (B) Gx 20).



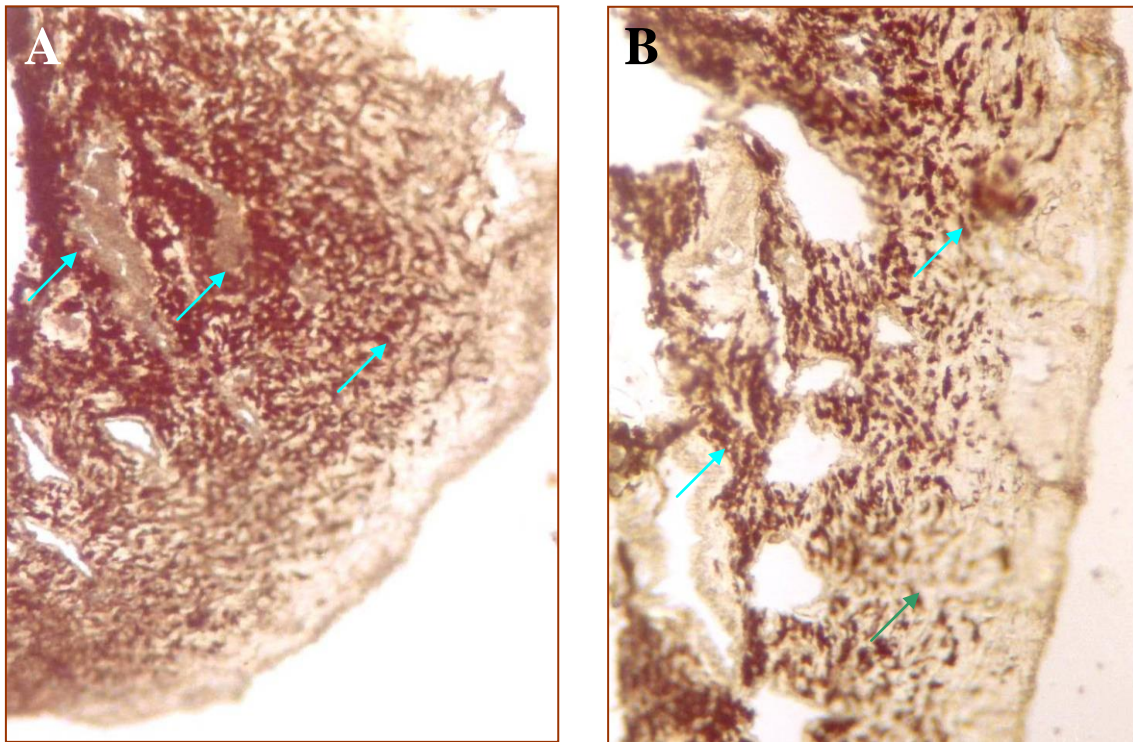
**Figure 125:** Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de la sclérotique d'un explant des yeux de bœuf induit avec 10µg/ml d'antigène S pendant 48h. Nous remarquons la présence de cellules productrices de NOS (→) plus nombreuses du côté de la choroïde. Certaines de celles-ci sont allongées alors que d'autres sont plus volumineuses avec des prolongements cytoplasmiques ((A) Gx 5, (B) Gx 40).



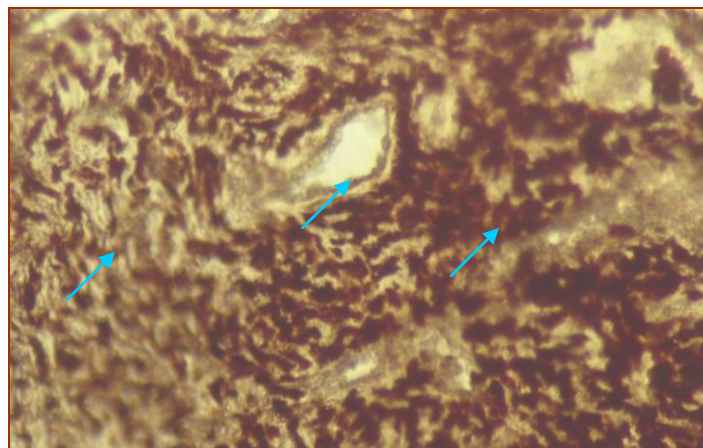
**Figure 126: Localisation immuno-histochimique de la NOS au niveau de la rétine d'un explant des yeux de bœuf induit avec 10 $\mu$ g/ml d'antigène S pendant 48h. Nous remarquons des régions intensément colorée (→) preuve de présence de la NOS. Ces régions peuvent correspondre à des cellules comme à des régions synaptiques. ((A) Gx 10, Gx 20)**



**Figure 127: Localisation immuno-histochimique de la NOS au niveau de la rétine d'un explant des yeux de bœuf induit avec 10 $\mu$ g/ml d'antigène S pendant 48h. A plus fort grossissement, nous remarquons des régions intensément colorée (→) preuve de présence de la NOS. Ces régions peuvent correspondre à des cellules comme à des régions synaptiques. (Gx 40)**



**Figure 128: Localisation immuno- histochimique de la NOS au niveau de la choroïde d'un explant des yeux de bœuf induit avec 10 $\mu$ g/ml d'antigène S pendant 48h. La choroïde est riche en cellules produisant la NOS ( $\rightarrow$ ). Celles -ci se retrouvent localisées en grand nombre autour des vaisseaux sanguins dilatés. Vers la périphérie, il n'y a que quelques unes qui la produisent ((A) Gx 5, (B) Gx 10)**



**Figure 129: Localisation immunohistochimique de la NOS au niveau de la choroïde d'un explant des yeux de bœuf induit avec 10 $\mu$ g/ml d'antigène S pendant 48h. A plus fort grossissement, les cellules produisant la NOS sont concentrées autour des vaisseaux sanguins. L'endothélium également exprime la NOS ( $\rightarrow$ ) (Gx 20).**

## Discussion générale

### 1. Effet des dérivés du NO sur les différentes structures oculaires :

Nos résultats ont montré différents effets des dérivés du NO selon leur nature, leur concentration et la durée d'incubation des explants oculaires. Les premiers effets concernent la rétine, l'épithélium cornéen et les vaisseaux sanguins. Les autres structures sont atteintes lors de l'utilisation de fortes concentrations et/ou de durée d'incubation prolongée. Seule la sclérotique reste peu sensible à l'action des dérivés du NO.

Conformément aux résultats précédemment obtenus au niveau de notre équipe, nous avons observé des altérations tissulaires et une cytotoxicité cellulaire des nitrites, nitrates et peroxy-nitrites d'une manière dose et temps dépendantes (Guenane, 2002 ; Belguendouz, 2005, Hartani *et al.*, 2006, Meddour, 2006). La toxicité du NO est généralement due à son action sur les enzymes cellulaires, notamment celles du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire, sur l'ADN et sur les lipides (Clémenti *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2001 ; Moncada et Higgs, 2006) . En effet, le NO peut directement ou via ses dérivés, surtout le peroxy-nitrite, inhiber les enzymes de la chaîne respiratoire notamment la cytochrome C oxydase induisant ainsi un épuisement de l'ATP, inhiber la glycolyse au niveau de la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, et activer les poly-ADP ribose polymérase (PARP) et synthétase (PARS) (Brown et Borutaite, 2002).

Quoique nous ayons utilisé les nitrites et les nitrates, nous avons obtenu des effets similaires à ceux du NO radicalaires. De nombreux travaux ont montré la présence de systèmes de réduction dans les cellules de mammifères. En effet, certains travaux ont montré que la Xanthine Oxydase pouvait réduire les nitrates et les nitrites en NO radicalaires dans certaines conditions. De même, il existe une « nitrite réductase » qui réduirait les nitrites en NO (Li, 2001). Ces mécanismes seraient à l'origine des effets que nous avons observés. Les peroxy-nitrites ont montré une toxicité extrêmement élevée notamment par comparaison aux deux autres métabolites du NO cité précédemment ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Cette molécule est connue pour sa haute réactivité à la base de son action sur différentes molécules (nitration des protéines, déamination de l'ADN et peroxydation lipidique). Ces actions induisent la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose (Kim *et al.*, 2001).

La cornée a montré une sensibilité différentielle aux dérivés du NO selon le type de tissu concerné. L'épithélium est le plus touché avec un phénomène initial de desquamation (apoptose) suivi d'un phénomène d'ulcération correspondant à la destruction totale du tissu épithélial par endroit. Cette destruction est accompagnée de l'apparition de cellules vacuolisées et de

cellules arrondies. Ces effets seraient le résultat des effets cités précédemment du NO et ou du peroxy-nitrite. En effet, ce dernier a induit les altérations les plus marquées. En plus, le NO pourrait induire des lésions en altérant les protéines du cytosquelette impliquées dans les jonctions cellulaires de type tight (l'actine F et la ZO-1) (Zech *et al.*, 1998). Le stroma de la cornée ne montre de changement morphologique que dans les concentrations élevées de nitrites et de nitrates. En effet, les fibres collagènes semblent être sensibles à l'action délétère du NO. Certains travaux ont montré que le NO présentait deux activités différentes selon les conditions expérimentales. Il peut exercer une action antifibrotique en agissant à la fois au niveau cellulaire et moléculaire. Ainsi, le NO diminue la production des protéines de la matrice extracellulaire, tel que le collagène type I, dans les fibroblastes. Le NO agirait par une inhibition directe de la synthèse du collagène par une hydroxylation de la proline, une stimulation des métalloprotéinases de la matrice, une réduction de la production du TGF $\beta$ , une initiation de l'apoptose des fibroblastes et une neutralisation des espèces réactives d'oxygène profibrotiques. Dans certaines conditions (tel que la sclérose), le NO agirait inversement en favorisant la synthèse du collagène et de granulations tissulaires (Dooley *et al.*, 2007). Toutefois, cet effet diffère selon la structure étudiée. En effet, la cornée est plus affectée que la sclérotique. Ces différences seraient dues aux différents types de collagènes constituant ou bien aux composés de la matrice extracellulaire. Ainsi, le stroma et la sclérotique sont formés de quatre types de collagène qui sont identifiés: types I, III, V, et VI. La cornée contient des glycosamino-glycanes (GAG ou mucopolysaccharides) qui sont reliées aux fibres de collagènes ou aux protéines solubles, et agissent comme des anions pour se lier aux cations et à l'eau. Les 3 fractions majeures de GAG sont: le keratane sulfate, la chondroïtine, et la chondroïtine sulfate A. Ces molécules existent peu ou pas au niveau de la sclérotique. Ceci serait à l'origine du peu d'effet des différents dérivés du NO sur cette structure (Myers et Tanner, 1998 ; Ferrini *et al.*, 2002 ; Hsu *et al.*, 2007) . Cependant, nous avons observé une activation cellulaire, notamment dans les régions adjacentes à la choroïde. Cette activation serait le résultat de l'activation des cellules phagocytaires (macrophage, cellules dendritiques) présentes localement par les débris des cellules et des molécules résultant de l'action cytotoxique du NO (Shimizu *et al.*, 1999 ; Rao *et al.*, 2003).

Au niveau des structures composant l'uvée, nous avons observé une importante vasodilatation et une destruction des différents épithéliums ainsi qu'un relâchement du tissu conjonctif et une activation cellulaire au niveau de l'iris et du corps ciliaire. Ces résultats reflètent des niveaux différents de sensibilité à l'action du NO. En effet, selon le type cellulaire et la présence de molécules à activité anti-oxydante, le NO peut exercer une action cytotoxique ou activatrice /anti-apoptotique (Brüne *et al.*, 1999).

Nous avons observé un phénomène de vasodilatation au niveau des vaisseaux sanguins de toutes les structures oculaires. Le NO est connu pour son

action vasodilatatrice (Moncada et Higgs, 2006). En effet, il peut induire la relaxation des muscles lisses par deux mécanismes essentiels. Le NO agit sur la guanylate cyclase en se liant à son groupement hème, il en résulte une augmentation de taux de GMPc, induisant une relaxation du muscle principalement par diminution du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. De plus, il peut activer directement les canaux  $K^+/Ca^{2+}$  dépendants.

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus *in vivo* sur des modèles expérimentaux (rat et lapin). En effet, le phénomène de vasodilatation locale due au NO a été démontré au niveau du corps ciliaire, de l'iris, de la choroïde, et de la rétine (Haefliger et *al.*, 1994 ; Nilsson, 1996 ; Delaey et Van de Voorde, Chuman *al.*, 1996 ; 1998 ; Koss, 1998 ; Pianka et *al.*, 2000 ; et Ando et *al.*, 2002).

## 2. Effet de l'antigène S sur les différentes structures oculaires :

Le traitement des explants des yeux de bœuf avec l'antigène S des concentrations de 10  $\mu\text{g/ml}$  et de 20  $\mu\text{g/ml}$  a induit des altérations similaires à celles observées au niveau des explants traités avec les dérivés du NO à fortes concentrations (vasodilatation, activation cellulaire, lésion tissulaire). De plus, la production locale de NO, reflétée par les concentrations des nitrites résiduels dans les surnageants de cultures, montre une augmentation significative des concentrations des nitrites suite à l'addition de l'Ag S. Cette augmentation est corrélée avec la concentration utilisée et la durée d'incubation. Ces résultats suggèrent que l'Ag S induirait la production de NO à fortes concentrations. L'étude de la distribution des NOS au niveau des différentes structures oculaires a montré une augmentation de l'expression de ces enzymes, correspondant probablement à l'induction de la iNOS. De nombreux travaux ont montré l'implication de l'Ag S dans la production de NO *in vivo* et *in vitro*. En effet, cet auto-antigène rétinien induit l'augmentation des taux de NO au cours de l'EAU (Wu et *al.*, 1997 ; Shimizu et *al.*, 1999 ; Jiang et *al.*, 1999 ; Kim et *al.*, 2002). De plus, de nombreuses pathologies oculaires, où l'Ag S a été impliqué, montrent une augmentation significative des taux de NO à la fois au niveau sérique et local (Belguendouz, 2005). Cette production serait liée à l'induction des iNOS par de nombreuses cytokines, notamment l' $\text{IFN}\gamma$ , le  $\text{TNF}\alpha$  et  $\text{IL}1\beta$ . Ces dernières sont retrouvées au niveau local (l'humeur aqueuse et le vitré) et systémique chez les animaux atteints d'EAU ou chez les patients atteints des pathologies oculaires auto-immunes (Egwuagu et *al.*, 1999 ; Muhaya et *al.*, 1999 ; Foxman et *al.*, 2002 ; Ahn et *al.*, 2006). De plus, la NOS inductible a été retrouvée au niveau des tissus atteints et au niveau des cellules infiltrantes (Robertson et *al.*, 2002 ; Rao et *al.*, 2003).

Les lésions observées au niveau des différentes structures, en dépit de quelques différences, sont similaires à celles retrouvés lors des uvéites expérimentales (Wacker, 1991 ; Caspi et *al.*, 1999 ; De Smet et Chan, 2001).

Les différences observées concernent l'amplitude des effets observés qui sont beaucoup plus importants dans notre cas. De plus, ces altérations correspondent à des concentrations très élevées de dérivés de NO. Ces résultats pourraient être expliqués par la concentration d'Ag S utilisée. Cette dernière est plus importante que celles utilisées au cours des immunisations des animaux (5 à 10 µg) (Wacker, 1986). De plus, les altérations produites seraient dues à l'action directe du NO produit et donc les phénomènes de réduction et de diffusion ne seraient pas impliqués. Nos résultats suggèrent l'implication des peroxy-nitrites qui agissent même à concentrations relativement faibles et induisent des effets aussi importants que ceux des nitrites et des nitrates à très fortes concentrations. En effet, les peroxy-nitrites ont été impliquées dans la physiopathogénèse des EAU où leur production a été observée ainsi que la présence des groupements nitrotyrosines au niveau des structures locales. Les peroxy-nitrites sont responsables de la majorité des effets toxiques de NO puisqu'ils agissent sur l'ADN au niveau du noyau cellulaire et induisent la peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires (Wu *et al.*, 1997 ; Liversidge *et al.*, 2002).

Nous avons noté avec intérêt la présence de cellules « activées » au niveau de la sclérotique, du corps ciliaire, de l'iris et à la périphérie de la cornée. Ces cellules sont peu nombreuses voire absentes au niveau des cultures témoins. Elles sont localisées près des vaisseaux sanguins et ont été fortement marquées par l'anti-NOS reflétant une importante expression des NOS. Ces cellules diffèrent des autres cellules tissulaires par leur aspect. En effet, elles sont plus volumineuses. De plus, elles présentent un aspect étoilé au niveau de l'iris et du corps ciliaire (uvée) alors qu'elles ont un aspect étiré ou sphérique au niveau de la sclérotique et à la périphérie de la cornée. Ces dernières pourraient correspondre à des fibroblastes ou à des macrophages résidents activés. Les cellules étoilées pourraient également correspondre à des cellules dendritiques activées. Les études réalisées sur les modèles animaux ont montré ce phénomène d'activation et de migration des cellules dendritiques et des macrophages vers les sites des lésions *in vivo* (Zhang *et al.*, 1999 ; Rao *et al.*, 2003). De plus, les structures oculaires qui forment l'uvée sont très riches en cellules immunitaires notamment en macrophages et en cellules dendritiques (Zhang *et al.*, 1999 ; Rao *et al.*, 2003). Ces cellules interviendraient dans l'initiation et le développement de la réponse auto-immune locale.

L'activation des fibroblastes au niveau cornéen a également été observée. Cependant, elle est moins importante. En effet, le nombre et la taille des cellules sont moins importants. Ceci pourrait être en rapport avec l'absence de vascularisation de la cornée et le nombre réduit des cellules présentatrices d'antigènes (Garter et Hiatt, 1997).

Au niveau rétinien, la mise en évidence de la NOS a montré une importante expression des NOS au niveau des différentes couches cellulaires. Cette expression serait due à l'expression des NOS constitutives au niveau des synapses rétinienne entre les différentes populations cellulaires (cellules

bipolaires, cellules horizontales, cellules amacrines et cellules ganglionnaires). En effet, le NO est second messenger au niveau du système nerveux central et niveau rétinien en particulier (Goldstein *et al.*, 1995 ; Becquet *et al.*, 1997 ). Cependant, la iNOS pourrait être également exprimée notamment au niveau des cellules ganglionnaires et des cellules gliales (astrocytes, microglies, cellules de Muller). En effet, ces cellules peuvent exprimer la iNOS dans les conditions inflammatoires. De plus, elles sont impliquées au cours de l'EAU où elles sont impliquées dans les mécanismes physiopathologiques de l'uvéite (Mandai *et al.*, 1994 ; Goureau *et al.*, 1999).



## Conclusion

Ce travail, initié dans le cadre de l'étude des différents mécanismes physiopathologiques au cours de l'uvéite "Behçet" et de l'uvéite "idiopathique", a permis de mettre au point la culture des explants de yeux de bœufs et le maintien de la survie tissulaire.

Notre étude a permis la mise en évidence de l'effet délétère des nitrites, des nitrates et du peroxy-nitrite sur les différentes tuniques de l'œil *in vitro*. Ces dérivés du monoxyde d'azote seraient impliqués dans les lésions cliniques des uvéites. Ainsi, le NO, tout comme ses dérivés, serait modérément synthétisé dans les conditions physiologiques alors que, durant des processus tels que l'inflammation où le NO est libéré en excès, son action deviendrait délétère sur les tissus environnants.

Nous avons également montré le rôle de l'antigène S dans les altérations tissulaires des différentes structures de l'œil (de bœuf). L'étude de la production du NO dans les surnageants de cultures induites avec l'Ag-S a montré une libération temps et concentrations dépendantes. Ceci serait en faveur de l'implication de l'Ag-S dans les complications des uvéites à travers la libération du NO et de ses dérivés. La présence de la iNOS révélée par immunohistochimie explique la libération importante de NO localement.

A travers nos résultats, le NO par ses formes physiologiques, nitrites et nitrates et peroxy-nitrites, agit de manière délétère sur les différentes tuniques de l'œil. Cet effet délétère est retrouvé lors de l'uvéite chez l'homme. Il est donc fort probable que le NO soit largement impliqué dans la toxicité tissulaire et cellulaire de l'œil par sa production locale et sa diffusion à travers les membranes.

L'action de l'Ag-S suggère fortement l'induction d'un dysfonctionnement immunitaire locale à savoir l'instauration d'un processus auto-immun localisé au niveau de l'œil.

Nos perspectives porteraient sur :

- l'identification des cellules et structures cibles de l'action des différents dérivés du NO.
- Situer l'action du NO et de ses dérivés sur chaque type cellulaire
- Situer les mécanismes impliqués dans la toxicité des dérivés du NO
- Caractérisation des cellules activées au niveau des différentes structures.
- la détermination des concentrations susceptibles d'induire une action au niveau cellulaire et tissulaire.

## Références bibliographiques

**A**

**Abu El-Asrar, A .M., Desmet, S., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L., et Geboes, K., (2001).** Expression of the Inducible Isoform of Nitric Oxide Synthase in the Retinas of Human Subjects With Diabetes Mellitus. *Am J Ophthalmol*;132:551–556.

**AHN, J-K., YU, H-G., CHUNG, H., et PARK, Y-G., (2006).** Intraocular Cytokine Environment in Active Behçet Uveitis. *American Journal Of Ophthalmology*, Vol. 142, N°. 3, pp.

**Ando, A., Yang, A., Nambu, H., et Campochiaro, P.A., (2002).** Blockade of nitric oxide sunthase reduces choroidal neovascularisation. *Mol.Pharmacol.*62: 539-544.

**B**

**Barnes, P.J., et Karim, M., (1997).** Nuclear factor-κB. A pivatal transcription factor in chronic inflammatory dideases. *The new England Journal of Medicine*. Vol.336, N° 15, issue of April 10, pp. 1066- 1071.

**Beck, P.L., Xavier, R., Wong, J., Ezedi, I., Mashimo, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Bhan, A.K., et Podolsky, D.K., (2004).** Paradoxal roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Physiol* 286: G137- G147.

**Becquet, F., Courtois, Y., et Goureau, O., (1997).** Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv.Ophthalmol.* 42, 71–82.

**Belguendouz, H., (2005).** Implication des auto-antigènes réiniens dans la production *in vivo* et *in vitro* des interleukines IL-8 et IL-12 et du monoxyde d'azote au cours de l'uvéite Behçet et idiopathique. Thèse de magister. FSB. USTHB.

**Beneski, D.A., Donoso, L.A., Edelberg, K.E., Magargal, L.E., Foiberg, R., et Merryman, C., (1984).** Human Retinal S-Antigen. Isolation, Purification, and Characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:686-690.

**Bertazolli-Filho, R., Wenhui Huang, S.G., Wollmann, G., et Coca-Prados, M., (2001).** Molecular evidence that human ocular ciliary epithelium expresses components involved in pototransduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284, 317–325.

**Biester, S., Deuter, C., Michels, H., Haefner, R., Kuemmerle-Deschner, J., Doycheva, D., et Zierhut, M., (2007).** Adalimumab in the therapy of uveitis in childhood. *Br. J. Ophthalmol.*; 91:319-324.

**Billiau, A., Heremans, H., Vermiere, K. & Matthys, P., (1998).** Immunoregulatory properties of Interferon-γ. An uptade. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 798: 22-32.

**Bodaghi, B., Wechsler, B., Du-Boutin, L.T.H., Cassoux, N., LeHoang, P., et Piette, J.-C., (2004).** Uvéites chroniques sévères: classification, démarche diagnostique et principes thérapeutiques. *La revue de médecine interne*, 24 : 794 – 802.

**Bodaghi, B., Gendron, G., Wechsler, B., Terrada, C., Cassoux, N., Le Thi Huong, D., Lemaitre, C., Fardeau, C., LeHoang P., et Piette, J-C., (2006).** Efficacy of interferon alpha in the treatment of refractory and sight-threatening uveitis: a retrospective monocentric study of 45 patients. *Br. J. Ophthalmol.* Published online 18 Oct 2006. doi:10.1136/bjo.2006.101550

**Brednman, J.E., et Bredt, D.S., (1996).** Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods in enzymolgy*, Vol.269.

**Broderick, C., Duncan, L., Taylor, N., et Dick, A.D., (2000),** IFN-g and LPS-Mediated IL-10–Dependent Suppression of

Retinal Microglial Activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41: 2613–2622.

**Breitman, M.L., Tsuda, M., Usukura, J., Kikuchi, T., Zucconit, A., Khoo, W., et Shinohara, T., (1991).** Expression of S-antigen in retina, pineal gland, lens, and brain is directed by 5'-flanking sequences. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.266, N° 23, issue of august 15, pp. 15506- 15510.

**Brézin, A.P., (1999).** Sémiologie et classification des uvéites. *Rev. Prat.*, **49**: 1982-1988.

**Brown G.C., et Borutaite, V., (2002).** Nitric oxide inhibition of Mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No. 11, pp. 1440–1450.

**Brüne, B., Von Knethn, A., et Sandau, K.B., (1999).** Nitric oxide (NO) : an effector of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **6**, 969-975.

## C

**Caspi, R.R., Roberge, F.G., Mcallister, C.G., El-Saeid, M., Kuwabara, T., Gery, I., Hanna, E., et Nussenblatt, R.B., (1986).** T cells lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *The Journal of Immunology*. Vol.136, N°3, February 1, pp: 928-933.

**Caspi, R.R., (1999).** Immune mechanisms in uveitis. Springer Semin. *Immunopathol.* **21**, 113–124.

**Caspi, R.R., (2001).** The role of cytokines in induction and regulation of autoimmune uveitis. From: *Contemporary Clinical Neuroscience: Cytokines and Autoimmune Diseases*. Edition V.K.Kuchroo, et al.

**Caspi, R.R.,(2002).** Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis. *Intern. Rev. Immunol.*, **21**: 197-208.

**Caspi, R.R., (2006).** Mechanisms Underlying Autoimmune Uveitis. *Drug Discovery Today: Disease mechanisms. Immunological disorders and Autoimmunity*. Vol.3, N°2, pp: 199- 206.

**Cassoux, N., Merle, H., Bodaghi, B., Giron, A., Le Hoang, P., (2003).** Dosage de l'interleukine 10 dans l'humeur aqueuse et le vitré dans le diagnostic de lymphome oculaire et cérébral primitif. *109e Congrès de la Société Française d'Ophthalmologie*. Vol.26, Hors Série 1.

**Chan, C-C., Caspi, R. R., Roberge, F. G., et Nussenblatt, R. B., (1988).** Dynamics of Experimental Autoimmune Uveoretinitis Induced by Adoptive Transfer of S-Antigen-Specific T Cell Line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* . **29**:411-418.

**Chuman, T., Chuman, H., Nao-i, N., Sawada, A., Yamamoto, R., et Wadaf, A., (1996).** Nitric Oxide-sensitive and -insensitive contractions of the isolated rabbit iris sphincter muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; **37**: 1437-1443.

**Clémenti, E., Brown, G.C., Feelish, M., et Moncada, S., (1998).** Persistent inhibition of cell respiration by Nitric Oxide: Crucial role of S- nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathion. *Proc.Nath. Acad. Sci*. Vol.95, pp. 7631- 7636, Medical Sciences.

**Crane, I.J., McKillop-Smith, S., Wallace, C.A., Lamont, G.R., et Forrester, J.V., (2001).** Expression of the Chemokines MIP-1a, MCP-1, and RANTES in Experimental Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; **42**:1547–1552.

**Crager, M.A., Lüscher, T.F., Cosentino, F., et Beckman, J.A., (2003).** Diabetes and vascular disease. Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy : part I. *Circulation.*; **108** : 1527-1532.

**Crépel, F., et Lemaire, G., (1995).** *Médecine/ sciences*; **11**; 1639-42.

## D

**Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., et Murad, F., (2001).** Novel effects of Nitric Oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41** : 203- 36.

**Delay, C., et Van de Voorde, J., (1998).** The effect of NO donors on bovine retinal

small arteries and posterior ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 1642-1646.

**De Kozak, Y., et Faure, J .P., (2000).** Auto-immunité contre la rétine. *Ophatalmol. Ges.*, 3, 183- 191.

**De Smet, M.D., Bitar, G., Mainigi, S., et Nussenblatt, R.B., (2001).** Human S-antigen determinant recognition in uveitis, *IOVS*, , Vol.42, N° 13, pp: 3233- 3238.

**De Smet, M.D., et Chan, C.C., (2001).** Regulation of ocular inflammation – What experimental and human studies have taught us. *Progress in Retinal and Eye Research.* Vol.20, N°.6, pp. 761- 797.

**De Smet, M.D., et Dayan, M., (2000).** Prospective determination of T-cell responses to S-Antigen in Behçet’s disease patients and controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci* , Vol.41, N° 11, pp: 3480-3484.

**Dick, A.D., Siepmann, K., Dees, C., Duncan, L., Broderick, C., Liversidge, J. & Forrester, J.V., (1999).** Fas-Fas Ligand-Mediated Apoptosis within Aqueous during Idiopathic Acute Anterior Uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40(10)** : 2258 - 2267.

**Dighiero, P., Reux, I., Hauw, J.J., Fillet, A.M., Courtois, Y., Goureau, O., (1994).** Expression of inducible nitric oxide synthase in cytomegalovirus-infected glial cells of retinas from AIDS patients. *Neurosci Lett.* Jan 17; 166(1):31-4.

**Dighiero, P., Behar-Cohen, F., Courtois, Y., et Goureau, O., (1997).** Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 38: 2045- 2052.

**Dooley, A., Gao, B., Shi-Waen, X., Abraham, D.J., Black, C.M., Jacobs, M., et Bruckdorfer, K.R., (2007).** Effect of nitric oxide and peroxynitrite on type I collagen synthesis in normal and scleroderma dermal fibroblasts. *Free Radic.Biol.*,  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.017

**Donoso, L.A, Merryman, C.F, Edelberg, K.E, Naidu, R, and Kalsow, C, (1985).** S-

Antigen in the Developing Retina and Pineal Gland: A Monoclonal Antibody Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26:561-567.

**Drapier, J.C., Payen, D., et Varreccha, C., (1996).** Monoxyde d’azote, un gaz à facettes. *Biofutur*, 153 :25-30.

## E

**Egwuagu, C.E., Sztein, J., Mahdi, R.M., et al. (1999).** IFN-g increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats. *J Immunol.*; 162:510–517.

## F

**Ferrini, M. G., Vernet, D., Magee, T. R., Shahed, A., Qian, A., Rajfer, J., et Gonzalez-Cadavid, N. F., (2002)**

Antifibrotic Role of Inducible Nitric Oxide Synthase. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, Vol. 6, No. 3, pp. 283–294.

**Flament, J., (2002).** Ophtalmologie. Pathologie de œil. Ed Masson, Paris, p:133-141.

**Forrester, J., (2001).** The eye basic sciences in practice. Second Edition. Elsevier Health Sciences. Medical/ Nursing. 447 pages.

**Förstermann, U., Boissel, J-P., et Kleinert, H., (1998).** Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of Nitric Oxide Synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12, 773–790.

**Foxman, E.F., Zhang, M., Hurst, S.D., et al. (2002).** Inflammatory mediators in uveitis: differential induction of cytokines and chemokines in Th1-versus Th2-mediated ocular inflammation. *J Immunol.*; 168:2483–2492.

**Fukuto, J. M., Switzer, C. H., Miranda, K. M., et Wink, D. A., (2005).** NITROXYL (HNO): Chemistry, Biochemistry, and Pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45:335–55

## G

- Gartner, L.P., et Hiatt, J.L., (1997).** Atlas en couleur d'histologie. 2<sup>e</sup> édition française. Editions Pradel. pp: 376-379.
- Gautier, C., Négrerie, M., Wang, Z-Q., Lambry, J-C., Stuehr, D.J., Collin, F., Martin, J-L., et Slama-Schwork, A., (2004).** Dynamic regulation of the inducible Nitric- Oxide Synthase by NO. Comparison with the endothelial isoforme. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, N°6, Issue of February 6, pp. 4358-4365.
- Genetet, N., (1997).** Immunologie. Editions Médicales Internationales.
- Ghosh, S., Salvador-Silva, M., Coca-Prados, M., (2004).** The bovine iris-ciliary epithelium expresses components of rod phototransduction. *Neuroscience Letters* 370 : 7–12.
- Goldstein, I.M., Ostwald, P., et Roth, S., (1996).** Nitric oxide: a review of its role in retinal functional and disease. *Vision Res.* , Vol 36, N° 18, pp. 2979–2994.
- Gorren, A.C.F., Marchal, S., Sørli, M., Andersson, K.K., Lange, R., et Mayer, B., (2006).** High- pressure studies of the reaction mechanism of nitric-oxide synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764 : 578-585.
- Goureau, O., et Courtois, Y., (1996).** Monoxyde d'azote et rénine : un médiateur aux deux visages. *Médecine/ sciences.*; 12 : 593-8.
- Goureau, O., Régnier-Ricard, F., et Courtois, Y., (1999).** Requirement for nitric oxide in retinal neuronal cell death induced by activated Muller glial cells. *J.Neurochem.* 72, 2506-2515.
- Gregerson, D., et Abrahams, W., (1983).** Immunologic and biochemical properties of several proteins bound by antibodies in sera from animals with experimental autoimmune uveitis and uveitis patients. *The journal of immunology.*, vol. 131, N° 1, pp: 259-264.
- Gregerson, D., Obritsch, W.F., Fling, S.P., et Douglas, J., (1986).** S-antigen-specific rat T cell lines recognize peptides fragments of S-antigen and mediate experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis. *The journal of immunology.*, vol. 136, N° 8, April 15, pp: 2875-2882.
- Gross, S.S., Wolin, M.S., (1995).** NITRIC OXIDE: Pathophysiological Mecanisms, *Annu. Rev. physiol.*, 57:737-69.
- Groves, J.T., et Wang, C.C-Y., (2000).** *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 :687-695.
- Guenane, H., Hartani, D., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.S., Mazari, F., et Touil-Boukoffa, C., (2006).** Production of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in Behcet's uveitis and idiopathic uveitis, *J Fr Ophthalmol.* ; 29(2):146-52.
- Guzik, T.J., Korbust, R., Adamek-Guzik, T., (2003).** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology*, 54, 4, 469-487.

## H

- Haefliger, I.O., Zschauer, A., et Anderson, D.R., ( 1994).** Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 35:991-997.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B., et Schubert, C., (2001).** Crystal structure of  $\beta$ -arrestin at 1.9Å<sup>o</sup>: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure*, Vol.9, 869-880.
- Hao, W., Wenzel, A., Obin, M. S., Chen, C-K., Brill, E., Krasnoperova, N.V., Eversole-Cire, P., Kleyner, Y., Taylor, A., Simon, M. I., Grimm, C., Remé C. E., et Lem, J., (2002).** Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nature genetics*, volume 32, pp. 254-260.
- Hargrave, P.A., (2001).** Rhodopsin structure, function, and topography. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, vol. 42, N°1.
- Hartani, D., Belguendouz, H., Guenane, H., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.Q., et Touil-Boukoffa, C., (2005).** Effet des nitrites et des nitrates sur les rétines de bœuf *in vitro*.

*J.FR.Ophthalmol.* ; 28, 5, 1-5.

**Hirose, S., Donoso, L.A., Schinohara, T., Palestine, A.G., Nussenblatt, R.B., et Gery, I., (1990).** Lymphocytes responses to peptide M and to retinal S-Antigen in uveitis patients. *Japanese Journal of Ophthalmology*, Vol.34: 298-305.

**Holtkamp, G.M., Kijlstra, A., Peek R., et de Vos, A.F., (2001).** Retinal Pigment Epithelium-immune system interactions: Cytokine production and cytokine-induced changes. *Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 20, No. 1, pp. 29- 48.

**Hsu, Y-C., Hsiao , M., Chien , Y.W., Lee W- R., (2007).** Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF- $\beta$ 1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner. *Nitric Oxide* 16 : 258–265.

## I

**Imamoto, Y., Tamura, C., Kamikubo, et Kataoka, M., (2003).** Concentration-dependent tetramerization of bovine visual arrestin. *Biophysical Journal*, Volume 85, 1186–1195.

## J

**Jacquemin, E., De Kozak, Y., Thillaye, B., Courtois, Y., et Goureau, O., (1996).** Expression of inducible Nitric Oxide Synthase in the eye from Endotoxin-Induced Uveitis rats. *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37: 1187- 1196.

**Jiang, H.-R., Lumsden, L., et Forrester, J.V., (1999).** Macrophages and Dendritic Cells in IRBP-Induced Experimental Autoimmune Uveoretinitis in B10RIII Mice, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40(13)**: 3177 – 3185

## K

**Kalsow, C.M., et Wacker, W.B., (1988).** Effect of Denaturation on the Immunogenicity and Uveitogenicity of Retinal S-Antigen. *Exp. Eye Res.* 47, 113-121.

**Kim, P.K.M., Zamora, R., Petrosco, P., et Billiar, T.R.,(2001).**The regulatory role

of nitric oxide in apoptosis, *International. Immunopharmacol.*, 1: 1421-41.

**Kim, J.C., Park, G.C., Kim, J.K., et Kim, Y.M., (2002).** The role of nitric oxide in ocular surface cells. *J.Korean Med Sci.*; 17: 389-94.

**Kisselev, O.G., McDowell, J.H., Hargrave, P.A., (2004).** The arrestin-bound conformation and dynamics of the phosphorylated carboxy-terminal region of rhodopsin. *FEBS Letters* 564 307-311.

**Kolios, G., Valatas, V., et Ward, S.G., (2004).** Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, **113**: 427-437.

**Koss, M.C., (1998).** Role of nitric oxide in maintenance of basal anterior choroidal blood flow in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 39:559-564.

**Kötter, I., Günaydin, I., Zierhut, M., et Stübiger, N., (2004).** The Use of Interferon  $\alpha$  2 in Behcet Disease: Review of the Literature. *Semin Arthritis Rheum* 33:320-335.

**Krupnick, J. G., Gurevich, V.V.,et Benovic, J.L., (1997).** Mechanism of Quenching of Phototransduction. Binding Competition Between Arrestin And Transducin For Phosphorhodopsin. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 272, No. 29, Issue of July 18, pp. 18125–18131.

**Kuby, J., Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., (2001).** Immunologie. Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Edition Dunod. Paris.

**Kunkel, S.L., Godessart, N., (2002).** Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmunity Reviews I*: 313-320.

**Kurhan-Yavuz, S., Direskeneli, H., Bozkurt, N., Özyazgan, Y., Bavbek, T., Kazokoglu, H., Eksioğlu-Demiralp, E., Wildner, G., Diedrichs-MÖHring, M., et Akoglu, T., (2000).** Anti-MHC autoimmunity in Behçet's disease: T cell responses to an HLA-B-derived peptide cross-reactive with retinal-S antigen in patients with uveitis. *Clin Exp Immunol*; 120:162-166.

**Kuwano, K., et Hara, N., (2000).** Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **22**: 147-149.

**Kwon, S., et George, S.C., (1999).** Synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. Vol.3, N° 4, pp. 348-357.

## L

**Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., et Pagnussat, G., (2003).** Nitric Oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**: 109-36.

**Lindstedt, E.W., Baarsma, G. S., Kuijpers, R.W.A.M., et van Hagen, P.M.,(2005).** Anti-TNF- $\alpha$  therapy for sight threatening uveitis. *Br J Ophthalmol* ; **89**: 533–536.

**Liou, G.I., Ma, Y-W., Greng, L., Zhu, C., et Baehr, W., (1989).** Human interstitial retinoid-binding protein. Gene structure and primary sequence. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 264, No. 14, Issue of May 15, pp. 8200-8206.

**Liversidge, J., Dick, A. et Gordon S., (2002),** Nitric Oxide Mediates Apoptosis Through Formation of Peroxynitrite and Fas/Fas-Ligand Interactions in Experimental Autoimmune Uveitis, *Am. J. Pathol.*, **160(3)**: 905 - 916.

**Loetscher, P., et Clark-Lewis, I., (2001).** Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* **69**: 881–884.

## M

**McDowell, J. H., Nawrocki, J. P., et Hargrave, P.A., (1993).** Phosphorylation Sites in Bovine Rhodopsin. *Biochemistry*, **32**, 4968-4974.

**Mandai, M., Yoshimura, N., Yoshida, M., Iwaki, M., et Honda, Y., (1994).** The role of nitric oxide synthase in endotoxin-induced uveitis: effects of N<sup>G</sup>-Nitro L-

Arginine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; **35**: 3673-3680.

**Mansour, A.M., (2007).** Adalimumab in the therapy of uveitis in childhood. *Br. J. Ophthalmol.* ; **91**; 274-276.

**Mc Kechnie, N.M., Al- Mahdawi, S., Dutton, G., et Forrester, J.V., (1986).** Ultrastructural localisation of retinal S-antigen in the human retina. *Exp. Eye Res.* **42**, 479- 487.

**Mirshohi, M., Doucheix, C., Collenor, G., Thillaye, B., and Faure, J-P., (1985).** Retinal S-Antigen Epitopes in Vertebrate and Invertebrate Photoreceptors, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**:1016-1021.

**Molday, R.S., (1998).** Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. *Investigative ophthalmology and visual science*, Vol.39, N° 13.

**Moncada, S., et Higgs, E.A., (2006).** The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, **147**, S193- S201.

**Murdoch, C., et Finn, A., (2000).** Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, **95 (10)**: 3032-3043.

**Myers, P.R., et Tanner, M.A., (1998).** Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen : Role of Nitric Oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **18**: 717-722.

## N

**Nakamura, M., Yamamoto, S., Okada, M., Ito, S., Tano, Y., Miyake, Y., (2004).** Novel Mutations in the Arrestin Gene and Associated Clinical Features in Japanese Patients with Oguchi's Disease. *Ophthalmology*, **111**:1410–1414.

**Nilsson, S.F.E., (1996).** Nitric Oxide as a mediator of parasympathetic vasodilation in ocular and extraocular tissues in the rabbit. *Investigative ophthalmology and visual science*; **37**:2110-2119.

**Nussenblatt, R.B., (1990).** The natural history of uveitis. *International Ophthalmology*; **14**: 303-308.

**O**

**Oh-i, K., Keino, H., Goto, H., Yamakawa, N., Murase, K., Usui, Y., Kezuka, T., Sakai, J.-I., Takeuchi, M., et Usui, M., (2007).** Intravitreal injection of Tacrolimus (FK506) suppresses ongoing experimental autoimmune uveoretinitis in Rats. *Br. J. Ophthalmol.* ; 91;237-242;

**P**

**Palczewski, K., Buczylko, J., Imami, N.R., McDowell, J.H., et Hargrave, P.A., (1991).** Role of the Carboxyl-terminal Region of Arrestin in Binding to Phosphorylated Rhodopsin. *The Journal Of Biological Chemistry.* Vol. 266, No. 23, Issue of August 15, pp. 15334-15339.

**Pennesi, G., et Caspi, R. R., ( 2002).** Genetic Control Of Susceptibility In Clinical And Experimental Uveitis. *Int. Rev. Immunol.* 21, 67–88.

**Philp, N. J., Chang, W., et Long, K., (1987).** Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEB Volume* 225, number 2, 127-132.

**Pianka, P., Oron, Y., Lazar, M., et Geyer, O., (2000).** Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of bovine iris sphincter: Role of endogenous Nitric Oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41:880–886.

**R**

**Radomski, M.W., Zakar, T., et Salas, E., (1996).** Nitric oxide in platelets. *Methods in Enzymology*, Vol. 269.

**Rao, N.A., et Wu, G-S., (2000).** Free radical mediated photoreceptor damage in uveitis. *Progress in Retinal and Eye Research* Vol.19, N°.1, pp. 41 – 68.

**Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Heib, C., Strauer, B-E., Feelish, M., et Kelm, M., (2002).**

Evidence for in vitro transport of bioactive Nitric Oxide in human plasma. *The Journal*

*of Clinical Investigation*, Volume 109, Number 9, pp: 1241- 1248.

**Rizzo, L.V., Xu, H., Chan, C-C., Wiggert, B., et Caspi, R., (1998).** IL-10 has a protective role in experimental autoimmune uveoretinitis, *International Immunology*, Vol. 10, N°. 6, pp. 807-814.

**Rollins, B.J, (1997).** Chemokines. *Blood*, Vol.90, N°3 (august1); pp 909-928.

**S**

**Saari, J.C., Teller, D.C., Crabb, J.W., et Bredberg, L., (1985).** Properties of an Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein from bovine retina. *The Journal Of Biological Chemistry.* Vol. 260, No. 1, Issue of January 10, pp. 195-201.

**Sagoo, P., Chan, G., Larkin, D. F. P., et George, A. J. T., (2004).** Inflammatory Cytokines Induce Apoptosis of Corneal Endothelium through Nitric Oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 45:3964–3973.

**Saxena, S., Rajasingh, J., Biswas, S., Kumar, D., Shinohara, T., Singh, V.K., (1999).** Cellular Immune Response to Retinal S-Antigen and Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein Fragments in Eales' Disease Patients, *Pathobiology* ;67:39-44.

**Scott, M.J., Godshall, C.J. , et Cheadle, W.G., (2002).** JAKs, STATs, cytokines, and sepsis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (6): 1153–1159

**Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., et Hume, D.A., (2004).** Interferon- $\gamma$  : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163–189.

**Shimizu, K., Wu, G.S., Sultana, C., Kalra, V.K., & Rao, N.A., (1999),** Stimulation of Macrophages by Retinal Proteins: Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Metabolites, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40 (13): 3215 - 3223.

**Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Xistow, G., Eachy, J.J., Donoso, L.A., Hortxitz, J., et Tao, R., (1987).** Primary and secondary structure of bovine retinal S- antigen (48-k Da protein)



Biochemistry . *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.84, pp. 6975- 6979.

**Selmaj, K.W, Farooq, M, Raine, C.S, et Brosman, C.F, (1990).** Proliferation of astrocyte *in vitro* in response to cytokines. *The journal of immunology* vol. 144, 129-135, N° 1, January 1.

**Simmons, W.W., Ungureanu-Longrois, D., Smith, G.K., Smith, T.W., et Kelly, R.A., (1996).** Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-Arginine transport. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol.271, N° 39, Issue of September 27, pp.23928-23937.

**Singh, V.K., Nussenblatt, R.B., Donoso L.A., Yamaki, K., Chan, C-C., et Shinohara, T., (1988).** Identification of a Uveitopathogenic and Lymphocyte Proliferation Site in Bovine S-Antigen. *Cellular Immunology*, 115, 413-419.

**Singh, V.K., Kalra, H.K., Yamaki, K., Abe, T., Donoso, L.A., et Shinohara, T., (1990).** Molecular mimicry between a uveitopathogenic site of S-antigen and viral peptides. *The journal of immunology* vol. 144, 1282- 1287, N° 4, February 15.

**Sommer, M. E., Farrens, D. L., (2006).** Arrestin can act as a regulator of rhodopsin photochemistry. *Vision Research* 46: 4532–4546.

**Stevens, A., et Lowe, J.S., (1992).** Histology. Editions Pradel.

**Stuher, D.J., (1997).** Structure- Function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol*, 37:339-59.

**Sueda, J., Hikita, N., Mochizuki, M., Jimi, A., et Kojiro, M., (2000).** Kinetics of apoptotic cells in Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 41: 799-804.

**Sugita, S., (2007).** Intravitreal anti-inflammatory treatment for uveitis. *Br. J. Ophthalmol.*; 91;135-136

**Sun, S-H., Silver, P.B., Caspi, R.R., Du, Y., Chan, C-C., Wilder, R.L., et Remmers, E.F., (1998).** Identification of genomic regions controlling Experimental Autoimmune Uveoretinitis in rats.

*International Immunology*, Vol. 11, N°. 4, pp. 529-534.

## T

**Tarrant, K.T., Silver, P.B., Chan, C-C., Wiggert, B., et Caspi, R.R., (1998).** Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *The Journal of Immunology*, 161: 122-127.

**Touil- Boukoffa, C., (1998).** Etude du système Interféron et cytokines au cours de l'hydatidose humaine. Implication de l'IFN-  $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , IL-6 et du NO dans les réponses immunitaires anti-fraction 5. Thèse de doctorat d'état. FSB. USTHB.

**Trifilieff, A., Fujitani, Y., Mentz, F., Dugas, B., Fuentes, M., et Bertrand, C., (2000).** Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors Suppress Airway Inflammation in Mice Through Down-Regulation of Chemokine Expression. *The Journal of Immunology*, 165: 1526–1533.

**Tripathi, P., Saxena, S., Yadav, V.S., Naik, S., and Singh, V.K., (2004).** Human S-antigen: peptide determinant recognition in uveitis patients. *Experimental and Molecular Pathology* 76 122– 128.

**Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., et Misra, M. K., (2004).** Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of biomedicine and biotechnology* : (2004) 227- 234.

## V

**Van Laar, J.A.M., and Van Hagen, P.M.,(2006)** Cytokine in Uveitis. *clinical Medicine & Recherche*, Volume 4, Number 4: 248-249.

**Vallochi, A. L., Commodaro , A. G., Schwartzman , J.P., Belfort Jr., et R., Rizzo, L.V. (2007).** The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine & Growth Factor, Reviews* 18, 135–141.

**Vazquez-Cobian, L.B., Flynn, T., Lehman, T.J., (2006).** Adalimumab

therapy for childhood uveitis. *J Pediatr*; 149:572–5.

## W

**Wacker, W. B., et Lipton, M. M., (1965).** Experimental allergic uveitis. Homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 206, 253–254.

**Wacker, W. B., (1991).** Experimental Allergic Uveitis: Investigations of Retinal Autoimmunity and the Immunopathologic. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Vol. 32. No. 13, pp: 3119-3128.

**Wei, C-C., Crane, B.R., Stuehr, D.J., (2003).** Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem. Rev.*, 103, 2365- 2383.

**Willermain, F., Caspers-Velu, L., Nowak, B., Stordeur, P., Mosselmans, R., Salmon, I., Velu, T., et Bruyns, C., (2002).** Retinal pigment epithelial cells phagocytosis of T lymphocytes: possible implication in the immune privilege of the eye. *Br J Ophthalmol*; 86: 1417-1421.

**Wu, G.S., Zhang, J. et Rao, N.A. (1997).** Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38** :1333-1339.

## X

**Xu, H., Forrester, J.V., Liversidge, J. et Crane, I.J. (2003),** Leukocyte Trafficking in Experimental Autoimmune Uveitis:

Breakdown of Blood-Retinal Barrier and Upregulation of Cellular Adhesion Molecules, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44(1)**: 226 - 234.

## Y

**Yamaki, K., Tsuda, M., Kikuchi, T., Chen, K-H., Huang, K-P., et Shinohara, T.,(1990).** Structural Organization of the Human S-Antigen Gene. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 265. No. 34, Issue of December 5, pp. 20757-20762.

**Yuo, A., Kitagawa, S., Suzuki, I., Urabe, A., Okabe, T., Saito, M., et Takaku, F. (1989).** Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. Potentialisation of metabolisms triggered by the Ca<sup>2+</sup> mobilizing agonists. *The Journal of Immunology*, Vol.142, 1678-1684, N° .5, March1.

## Z

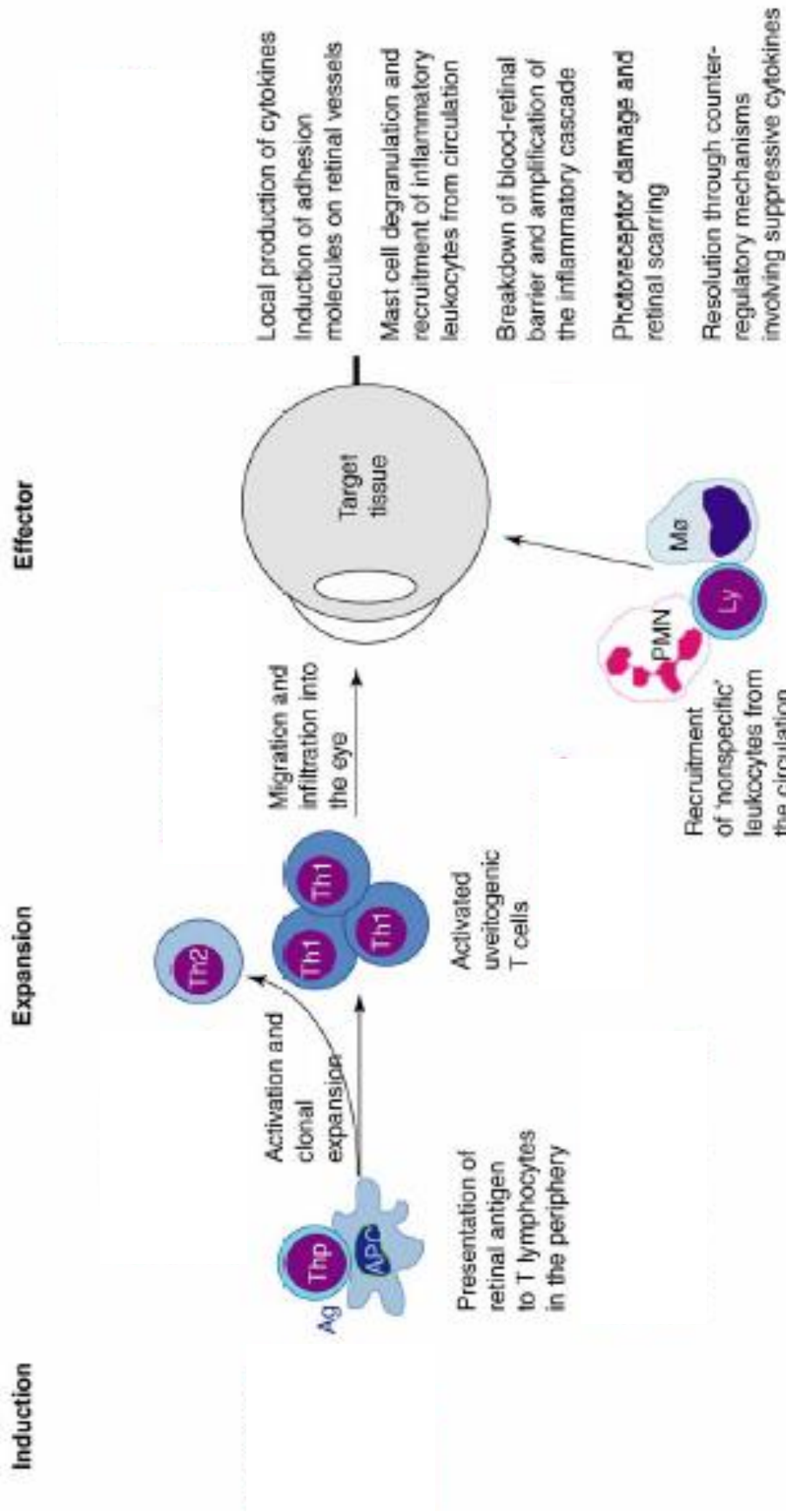
**Zech, J-C., Pouvreau, I., Cotinet, A., Goureau, O., Le Varlet, B., et de Kozak, Y., (1998).** Effect of cytokines and Nitric Oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Set.*;39:1600 -1608.

**Zhang, J., Wu, L-Y., Wu, S-G., et Rao, N.A., (1999).** Differential expression of nitric oxide in Axperimental Uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* ; **40**: 1899-1905.

**Références bibliographiques**

Annexe 1: Caractérisation de la protéine NO synthase humaine (Moncada et *al.*, 1997; Geller et Billiar, 1998 ; Tuteja et *al.*, 2004 ).

NOS humaine	NOS constitutive, type neuronal	NOS constitutive, type endothélial	NOS inducible
Chromosome	12q24.2	7q35 – 7q36	17cen – 17q11.2
Taille du gène	160 kb	21 kb	37 kb
Structure du gène	29 exons, 28 introns	26 exons, 25 introns	26 exons, 25 introns
Taille du cDNA	10.0 kb	4.4 kb	4.1 kb
Taille de la protéin	1434Aa, 160 k Da	1203 Aa, 133 k Da	1153Aa, 131 k Da
Site subcellulaire	Cytosol	Membrane >> Cytosol	Cytosol>> Membrane
Régulation	Ca <sup>2+</sup> / Calmoduline	Ca <sup>2+</sup> / Calmoduline	Transcription génique
Quantité de NO produite	Petite (pM)	Petite (pM)	Grande (µM)
Cofacteurs	BH <sub>4</sub> , NADH, FAD, FMN, hème.	BH <sub>4</sub> , NADH, FAD, FMN, hème.	BH <sub>4</sub> , NADH, FAD, FMN, hème.



Annexe 2 : Schéma représentant les points cruciaux de la pathogenèse de l'uvéïte (Caspi, 2006).

### Résumé :

L'uvéite est une inflammation de l'uvée atteignant toutes les structures intraoculaires. Elle peut être d'origine infectieuse, parasitaire, auto-immune, idiopathique ou faire partie des manifestations d'une maladie systémique telle que la sarcoïdose ou la maladie de Behçet. L'étude des réponses immunitaires au cours de cette pathologie a montré l'implication d'une composante auto-immune ainsi que de nombreuses cytokines dans les mécanismes physiopathologiques des différentes manifestations de la maladie. A cet effet, nous avons étudié l'effet des dérivés du monoxyde d'azote, des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et du peroxydinitrite (SIN-1) sur des explants de yeux de bœuf ainsi que l'effet d'un auto-antigène rétinien purifié, l'Ag S.

Nos résultats montrent que le traitement d'explants de bœuf en culture avec les différentes molécules étudiées induit des modifications tissulaires et cellulaires. Cet effet dépend des concentrations étudiées et de la durée d'incubation. Il est corrélé avec la production du monoxyde d'azote dans le cas de l'utilisation de l'auto-antigène comme agent inducteur.

Ces résultats sont en faveur d'une implication du monoxyde d'azote et/ou de ses dérivés ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et peroxydinitrite) dans les processus physiopathologiques impliqués dans l'uvéite ainsi que l'implication d'une réponse auto-immune probable contre la rétine.

**Mots clés :** uvéite, nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxydinitrite (SIN-1), antigène S.

### Abstract:

Uveitis is the inflammation of the uvea which touches all intraocular structures. It can be caused by infectious or parasitical agents, auto-immunity, idiopathic or it can be a manifestation of a systemic disease as sarcoidosis and Behçet disease. The studies of immunity's responses during this pathology have shown implication of auto-immunity and different cytokines in physiopathologic mechanisms of different manifestations of the disease. To this effect, we studied the effect of derivatives of nitric oxide, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and peroxydinitrite (SIN-1) on bovines' eyes explants and the effect of the purified retinal auto-antigen, S- Ag.

Our results show that the treatment of bovines' eyes explants *in vitro* with different studied molecules induces cellular and tissular modifications. This effect depended on the studied concentrations and the duration of incubation. It is correlated with the production of nitric oxide in the case of utilization of the auto-antigen as inductor agent.

These results are in favour to the implication of the nitric oxide and/ or his derivatives ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and peroxydinitrite) in the physiopathology processes involved in uveitis and a probable implication of an auto-immune response against retina.

**Key words:** uveitis, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxydinitrite, S-antigen.