

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة امحمد بوقرة - بومرداس-

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA - BOUMERDES -



Faculté de science

Département : Biologie

**Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de MASTER II**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** Biotechnologie et Pathologies Moléculaires

**Thème:**

**Etude de production d'oxide nitrique (NO) chez  
les patients atteints du lupus érythémateux systémique**

**Réalisé par :**

**BENZOHRA Imen Rahma**

**Déposé le 30 /09/2021 devant le jury composé de :**

|                    |                |              |
|--------------------|----------------|--------------|
| .....              | .....-UMBB     | Président    |
| .....              | .....-UMBB     | Examineur    |
| Mr. MESSAOUDENE. D | MCB -UMBB      | Promoteur    |
| Mme. BOUKACEM.S    | DOCTRANTE/UMBB | Co-Promoteur |

**Année universitaire : 2020/2021**

# Remerciements

Au terme de ce mémoire, je remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son élaboration.

Tout d'abord je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et la persévérance pour mener à bien ce mémoire.

Je remercie énormément tout particulièrement ma co-promotrice Madame BOUKACEM.S qui m'a accompagné tout au long de mon travail, pour ses précieux conseils, sa disponibilité, pour sa patience et son soutien précieux afin de mener ce travail à bon port.

Je tiens à remercier mon promoteur et le chef du département  
Mr. MESSAOUDENE. D,  
, pour son aide, son écoute, ses précieux conseils et ses encouragements.

Je remercie mes parents qui ont toujours été présent, leurs soutiens était la raison majeure pour surmonter tous les obstacles.

Je les remercie énormément de s'être sacrifié afin de financer mes études.

A mes frères.....A krabi youcef.....A tous ma famille..... Merci

## Résumé

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique caractérisé par un aspect clinique est très polymorphe et dont l'origine est multigénique, La physiopathologie de la maladie implique des dysfonctionnements immunitaires cellulaires et moléculaires. Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule produite par les iNOS, joue un rôle central dans de nombreux processus, elle devient pathologique quand elle est produite a des grandes quantités, Dans cette présente mémoire, nous avons étudié le taux de production du NO chez les patients atteints du LES et ce en fonction de plusieurs critères, nous avons observé prédominance féminine avec un sexe ratio de 0.15 et une haute fréquence (47%) chez les personnes appartenant à la tranche d'âge de [30 - 45 ans]. La comparaison globale des taux des nitrites totaux mesurés a montré une corrélation significative ( $p = 0,0003$ ) du NO chez les patients lupiques hommes et femmes dans toutes les tranches d'âges par rapport aux contrôles, avec une corrélation, Nos résultats ont montré aussi que les patients en poussées avaient des concentrations plus élevées du NO que les patients en rémission ( $p=0.0012$ ) ce qui confirme la relation entre l'activité de la maladie et la production du NO, les patients souffrants des manifestations néphrologiques présentent les taux de NO les plus élevée (avoisinant les  $300\mu\text{mol/l}$ ) indiquant de ce fait son implication dans la pathogenèse du LES et sa contribution dans l'apparitions de certains manifestations.

**Mots clés :** Le lupus érythémateux systémique (LES), monoxyde d'azote (NO), la NO synthase inductible (iNOS)

# Sommaire

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| <i>Introduction</i> .....                             | 1  |
| <i>I.LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE</i> :.....         | 3  |
| I.1Définition : .....                                 | 4  |
| I.2 Historique : .....                                | 4  |
| I.3 Epidémiologie : .....                             | 5  |
| I.4 Etiologie : .....                                 | 5  |
| I.6 physiopathologie : .....                          | 6  |
| I.7 manifestations cliniques : .....                  | 8  |
| I.7.1 Manifestations rhumatologiques : .....          | 9  |
| I.7.2 Manifestations cutanéomuqueuses : .....         | 9  |
| I.7.3 Manifestations cardiaques : .....               | 9  |
| I.7.4 Manifestations neurologiques : .....            | 9  |
| I.7.5 Manifestations hématologiques : .....           | 9  |
| I.7.6 Manifestations rénales : .....                  | 9  |
| I.8 diagnostique : .....                              | 9  |
| I.9 Traitement : .....                                | 10 |
| I.10 Le rôle pathogène de NO dans LES : .....         | 10 |
| <i>II. LE MONOXYDE D'AZOTE</i> .....                  | 12 |
| II.1 Rappel historique .....                          | 12 |
| II.2 la biosynthèse du NO : .....                     | 12 |
| II.2.2 Régulation de synthèse de NO .....             | 14 |
| II.3 Les isoformes de NOS .....                       | 15 |
| II.3.1 NOS1 ou nNOS .....                             | 15 |
| II.3.2 NOS3 ou eNOS .....                             | 16 |
| II.3.3 NOS2 ou iNOS .....                             | 16 |
| II.3.4 Structure des NOS .....                        | 17 |
| II.4 Role physiologique du NO.....                    | 18 |
| II.5 NOet système immunitaire .....                   | 18 |
| II.5.1 source de NO dans le système immunitaire ..... | 18 |
| II.5.2 fonctions immune du NO .....                   | 20 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.5.2.1 NO et contrôle du processus infectieux .....                        | 20 |
| II.5.2.2 régulation des facteurs de l'inflammation par le NO .....           | 21 |
| II.5.2.2.1 Voie NF-kB .....                                                  |    |
| II.5.2.2.2 Janus Kinases .....                                               |    |
| II.5.2.3 NO ET polynucléaire neutrophile .....                               | 22 |
| <i>III- Matériels et méthodes :</i> .....                                    | 23 |
| III.1. Matériels biologiques .....                                           | 24 |
| II.1.1 Population étudiée : .....                                            | 24 |
| III.1.2 Critères d'inclusions : .....                                        | 24 |
| III.1.3 Recueil des données : .....                                          | 24 |
| III.1.4 Prélèvement : .....                                                  | 24 |
| III.1. Matériels non biologiques .....                                       | 24 |
| III.2 Méthodes : .....                                                       | 24 |
| III.2.1 Dosage des nitrites totaux par la méthode de Griess modifiée : ..... | 25 |
| III.2.2 Principe : .....                                                     | 25 |
| III.2.3 Mode opératoire : .....                                              | 25 |
| III.2.4 Courbe d'étalonnage des nitrites : .....                             | 26 |
| III.2.5 Traçage de la courbe étalon $DO=f([NaNO_2])$ : .....                 | 27 |
| <i>IV. Résultats et discussion :</i> .....                                   | 28 |
| IV.1. Répartition des patients lupiques selon le sexe et l'âge : .....       | 29 |
| IV.2 Taux du NO chez les patients lupiques et les sujets sains : .....       | 30 |
| IV.3 Taux du NO chez les lupiques femmes et hommes : .....                   | 30 |
| IV.4 Taux du NO chez les lupiques selon la tranche d'âge : .....             | 31 |
| IV.5 Taux du NO chez les lupiques selon l'activité de la maladie : .....     | 32 |
| IV.6 Taux du NO chez les lupiques selon les manifestations cliniques : ..... | 33 |
| <i>Discussion</i> .....                                                      | 34 |
| <i>Conclusion et perspectives</i>                                            |    |
| Références                                                                   |    |

## Liste des figures et tableaux

**Figure 1** : rôle d'apoptose dans la pathogenèse du LES

**Figure 2** : Physiopathologie du lupus systémique

**Figure 3** : les fonctions immunorégulatrice du NO

**Figure 4** : Fonctionnement générale des NOS

**Figure 5** : La réaction de synthèse du NO à partir de la L-Arginine isoformes de NOS impliquées

**Figure 6** : principe de réaction de griess

**Figure 7** : Courbe étalon du dosage des nitrites par la méthode de Griess.

**Figure 8** : la réparation des patients lupiques selon le sexe

**Figure 9** : la réparation des patients lupiques selon les tranches d'âge.

**Figure 10** : taux de NO chez les patients lupiques et les sujets sains.

**Figure 11** : Concentration de NO chez les femmes et les hommes lupiques

**Figure 12** : production du NO chez les patients lupiques selon les tranches de d'âge.

**Figure 13** : Répartition des patients lupiques selon l'activité de la maladie

**Figure 14** : Répartition des patients lupiques selon les manifestations cliniques

**Tableau 1** : Caractéristiques des trois types du NO Synthèses humaine.

**Tableau 2** : vue générale des cellules du système immunitaire produisant du NO et les

**Tableau 3** : preparation de la courbe etalon pour le dosage des nitrites.

## La liste des abréviations

**CO** : Monoxyde de carbone  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NOS** : Monoxyde d'azote synthase  
**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**O<sub>2</sub>** : Oxygène  
**FAD** : Flavine adénine dinucléotide  
**FMN** : Flavine mononucléotide  
**BH<sub>4</sub>** : Tétrahydrobioptérine  
**CAM** : Calmoduline  
**CD23** : CD markers  
**IgE** : Immunoglobuline E  
**TNF- $\alpha$**  : Les facteurs de nécrose tumorale  
**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma  
**LPS** : Lipopolysaccharides  
**IL-1** : Interleukine-1  
**IL-4** : Interleukine-4  
**TGF- $\beta$**  : Facteur de croissance transformant beta  
**IL-10** : Interleukine-10  
**NK** : Natural killer  
**CCP32** : Cysteine protease32  
**Bcl2** : B-Cell lymphoma 2  
**NF-KB** : Nuclear factor-kappaB  
**IL-6** : Interleukine-6  
**GCSF** : Granulocyte colony-stimulating factor  
**STAT** : Signal transducer and activator of transcription

**JAK3** : Janus kinase3  
**JAK2** : Janus kinase2  
**AP-1** : Protéine activatrice-1  
**LES** : Lupus érythémateux systémique  
**NETs** : Neutrophile extracellulaire traps  
**Ac** : Anti-corps  
**Ag** : Anti-gène  
**BLYs** : B lymphocyte stimuleur facteur  
**CMV** : Cytomégalovirus  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**C1q** : Complément 1q  
**CI** : complexes immuns  
**TLR** : récepteurs TOLL like  
**ACR** : l'American College of Rheumatology



## Introduction

Les maladies auto-immunes systémiques résultent d'une réponse dirigée contre des antigènes disséminés dans tout l'organisme. Ces maladies reflètent un déficit général de la régulation de l'immunité qui conduit à des cellules T et à des cellules B hyperactives. Les dommages tissulaires disséminés sont ainsi provoqués par des réponses immunitaires à médiation cellulaire causées par des auto-anticorps. La majorité d'entre elles sont cependant causées par le dépôt de complexes immuns dans les vaisseaux sanguins. C'est l'exemple du lupus érythémateux systémique (LES) (bergereau, 2010).

Le lupus est une maladie auto-immune non spécifique d'organe de la famille des connectives, caractérisée par une importante production d'auto-anticorps et de complexes immuns, pouvant se déposer dans différents organes cibles. Ces dépôts de complexes immuns conduisent à une inflammation et à des lésions tissulaires responsables du polymorphisme clinique de la maladie. Les tissus et les organes le plus souvent atteints sont la peau, les articulations, les reins, les séreuses, le système nerveux central, et les cellules sanguines. (Mok et Lau, 2003)

Le monoxyde d'azote (NO), biomarqueur inflammatoire synthétisé par l'isoforme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) qui catalyse la production de grandes quantités de NO à partir de la L-arginine pendant des périodes prolongées au cours de plusieurs maladie auto-immunes, il s'agit d'une molécule diatomique simple très réactif. Le NO a initialement été connu pour ses effets biologiques en tant que facteur de relaxation dérivé de l'endothélium mais il joue également un rôle dans plusieurs processus physiologiques et pathophysiologiques : inhibition de l'agrégation des plaquettes, cytotoxicité des macrophages, métabolisme du fer, neurotransmission, neurotoxicité, inhibition de l'adhésion des monocytes et des fonctions leucocytaires. Le NO joue un rôle important et complexe dans la réponse immunitaire, il contribue au contrôle des infections microbiennes et des tumeurs. De plus, des phénomènes comme l'apoptose, l'angiogenèse, le péristaltisme, la miction, la reproduction, le métabolisme du glucose, la formation osseuse et le développement cardiaque sont d'autres exemples de processus physiologiques associés à la production de NO (dumas,2007).

Au cours du LES le NO semble avoir un rôle important dans la pathogenèse et sa production semble affecter aussi l'activité de la maladie.

Beaucoup des recherches sont mis en charge pour découvrir le rôle de NO au cours de la maladie de lupus. Cependant, les conclusions sont souvent divergentes et variables selon les ethnies et les régions du monde. C'est dans ce contexte que nous avons initié notre travail qui s'est déroulé au niveau du laboratoire de recherche 2.40 à l'université de l'UMBB en collaborations avec le service de médecine interne au centre hospitalo-universitaire Mustapha Pacha d'Alger pendant 2 mois (de 09 mai 2021 au 08 juillet 2021). Dans lequel nous avons réalisé une étude prospective descriptive sur 15 patients lupique, dont les objectifs étaient :

- Déterminer le taux de production de NO chez les malades lupiques et les témoins.
- Etablir une corrélation entre l'activité de la maladie et le taux de NO produits.
- Confirmer la contribution du NO dans l'apparitions de certaines manifestations cliniques.

*Chapitre I*  
*Etude Bibliographique*

# I.LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE :

## I.1Définition :

Lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune fréquente, protéiforme et spontanément grave, Il constitue le prototype des maladies non spécifiques d'organes qui touche préférentiellement la femme en âge de procréation, caractérisée par la production d'anticorps anti nucléaires dirigés principalement contre des antigènes nucléaires du soi. De nombreux facteurs ont pu être incriminés dans le développement de cette maladie. (o.meyer,2005 ;c.chizzolini et al.,2009 c.besson,2013)

La présentation clinique du LES est polymorphe, elle est caractérisée par l'inflammation de différents tissus/ organes, principalement la peau, les articulations, les reins, les séreuses, le système nerveux central et les cellules sanguines. (D.Cruz et al.,2007)

La diagnostic immunologique repose sur la mise en évidence d'anticorps antinucléaires à taux élevé, habituellement d'aspect homogène ou moucheté et, plus inconstamment, sur la mise en évidence d'anticorps anti-acide désoxyribonucléique (ADN) natif ou anti-nucléosomes(o.meyer,2005).

## I.2 Historique :

La maladie lupique a vu son appellation varier au cours des années. Ces multiples changements traduisent la meilleure connaissance de cette affection, initialement dermatologique, actuellement systémique. A l'origine, le terme lupus vient de "loup" en latin, en référence aux lésions ulcérales du visage qui symbolisaient un masque de loup, en 1845, Cazenave Hebra précise ces lésions cutanées qu'il décrit au visage en "ailes de papillon". Le terme "lupus érythémateux" est créé en 1851 par Cazenave, qui associe l'adjectif "disséminé" en rapport à l'évolution de l'éruption cutanée et non au caractère multi-viscéral de l'affection alors méconnu. En 1879 et 1880, Hutchinson différencie plusieurs formes de lupus cutanés comme le "lupus engelure" ou le lupus subaigu. C'est à partir de la fin du XIXe siècle que Kaposi remarque la présence de complications viscérales associées aux lupus cutanés. En 1904, Jadassohn contribue à la substitution du terme "lupus érythémateux disséminé " par celui de "lupus érythémateux systémique" ou mieux de « maladie lupique ». (m.belfatmi,2008)

### I.3 Epidémiologie :

Les études épidémiologiques du LES est renseignent sur l'incidence, la prévalence et les différentes tendances observées dans cette maladie en fonction de critères variés tels que la zone géographique, l'âge de développement de la maladie, le genre, l'origine ethnique ainsi que l'époque d'observation de ces paramètres. Selon ces données une forte variation géographique dans l'incidence et la prévalence du LES est observée, ce qui reflète soit des différences génétiques présentes dans les populations analysées, soit des variations environnementales. Les populations noires et asiatiques des Etats-Unis ou vivant dans les territoires des Caraïbes ont une prévalence de lupus plus forte que les sujets blancs contrairement aux populations noires vivant en Afrique ont une prévalence faible.

La prédominance de la maladie chez les femmes, plusieurs études ont tenté de démontrer le lien entre le LES et le génotype XX, ce qui explique la fréquence de la maladie chez les femmes (neuf fois supérieure à la fréquence rencontrée chez les hommes.) (m.moncan,2019 ; q.raimbourg et e. daugas,2019).

Le lupus affecterait plus de 5 millions de personnes dans le monde et entre 15 000 à 20 000 en Algérie. L'incidence et la prévalence de la maladie varie en fonction des ethnies, elles sont comprises respectivement entre 1 et 5 cas pour 100 000 habitants et entre 20 et 150 cas pour 100 000 habitants. (q.raimbourg et e. daugas,2019).

### I.4 Etiologie :

Le dérèglement du système immunitaire dans LPS est dû à la base à des différents facteurs génétique, hormonaux, environnementaux, immunologique et endocriniens (comme les infections, les vaccinations, la grossesse, le stress, l'estrogène,...), de plus un traitement par certains médicaments peut déclencher la manifestation clinique (incluant des antibiotiques, en particulier ceux de la classe des sulfonamides, des anticonvulsants, des anti-inflammatoires non-stéroïdiens), aussi que l'infection aiguë à cytomégalovirus (CMV) semblent avoir un rôle dans la genèse de cette maladie (c.chizzolini et al.,2009 ; eduardo et al.,2015 ; w.hachfi et al.,2011 ; jennifer lemieux,2016).

## I.6 physiopathologie :

La physiopathologie du lupus reste encore imparfaitement connue. Elle fait intervenir une rupture de tolérance avec des dérèglements des systèmes immunitaires inné et adaptatif. Des anomalies génétiques discrètes prédisposent le système immunitaire, dans un environnement particulier et sous l'influence d'événements aléatoires, qui induit le développement progressif et chronique d'une réponse immunitaire anormale.

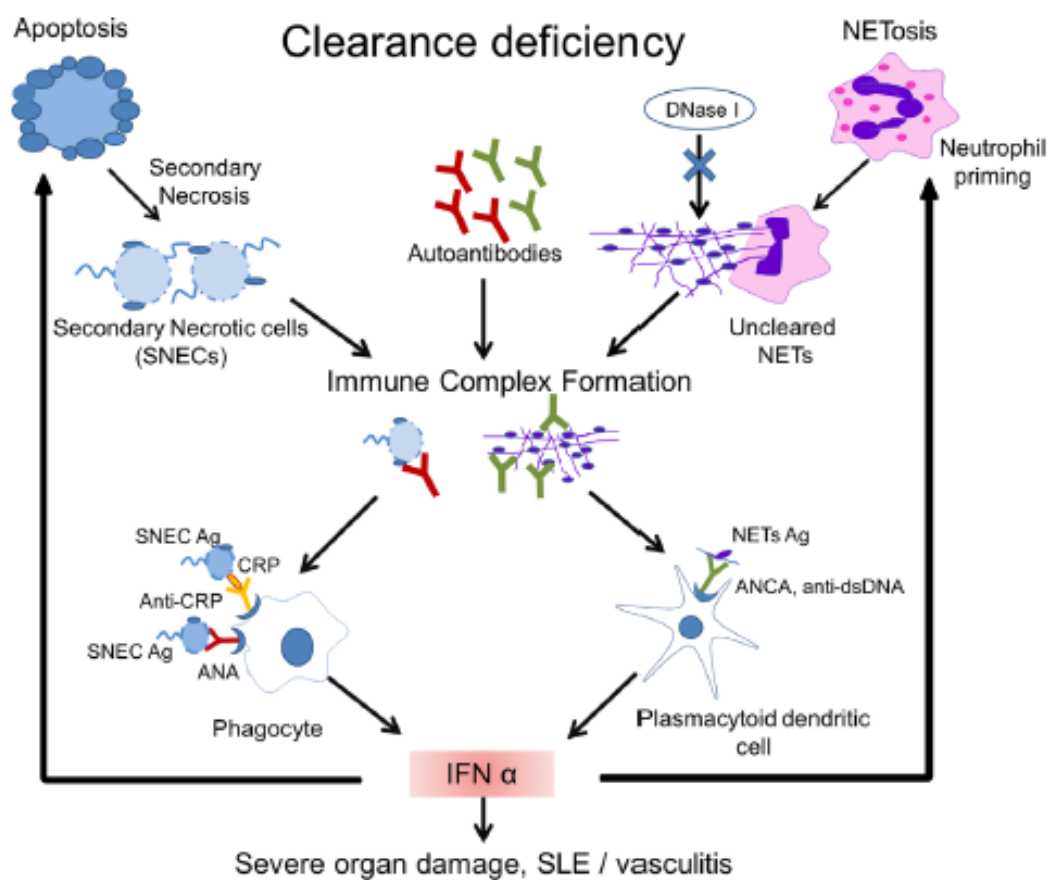
**Le dysfonctionnement immunitaire** Au cours du LES aboutit à la production d'auto-anticorps dirigés contre de nombreux auto-antigènes qui peuvent être des molécules intracellulaires, membranaires ou des protéines plasmatiques. La liaison des auto-anticorps aux antigènes cibles forme des complexes immuns circulants et tissulaires. Ces CI activent le système immunitaire avec notamment la voie classique du complément, les cellules de l'immunité naturelle monocyte/macrophage, polynucléaire, cellules dendritiques, cellules NK.... Ces processus inflammatoires sont responsables des lésions tissulaires. (Kowal et al.,2006)

Les auto-antigènes majeurs contre lesquels les patients lupiques développent des auto-anticorps (ADNn, nucléosomes, protéines RNP, SSA, SSB et phospholipides) sont regroupés spatialement dans les corps apoptotiques. (Casciola et al.,1994)

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui s'effectue par la fragmentation de la cellule en petite structure, appelés corps apoptotiques. En condition physiologique, les cellules en apoptose sont éliminées immédiatement par les macrophages tissulaires et les corps apoptotiques restent invisibles pour le système immunitaire, ne déclenchent pas d'inflammation mais au contraire une réponse immunologique tolérogène. Chez les lupiques Une apoptose anormale ou excessive ou une clairance défectueuse des corps apoptotiques par les macrophages conduisent à l'entrée dans un processus de nécrose inflammatoire, qui conduit d'une part à l'activation de récepteurs TOLL like (TLR) et de récepteurs pour le fragment Fc des IgG (FcγRs) suivie de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autre part, à l'augmentation de la présentation d'auto-Ag apoptotiques par les cellules dendritiques et à l'activation des LB et LT auto-réactifs (Nagata, 2010 ; Uderhardt et al.,2012 ; Janko et al.,2013)

Une autre source d'auto-Ag est constituée par les polynucléaires, ceux-ci sont présents en excès dans la circulation en particulier lors des poussées. Ces cellules peuvent induire des lésions tissulaires, notamment endothéliales et peuvent être une source d'IFN $\alpha$  suite à leur mort cellulaire, appelée NETose : le polynucléaire subit un processus de désintégration de sa membrane nucléaire et de sa chromatine. Ce processus aboutit à la formation de longs filaments de chromatine contenant de l'ADN couplé au contenu des granules qui prennent la forme de filets, les NET (Neutrophil Extracellular Trap). Ces NET couplés aux anti-ADN vont activer les cellules dendritiques et les LB (Lande et al. 2011; Mahajan et al. 2016) (Figure 1).

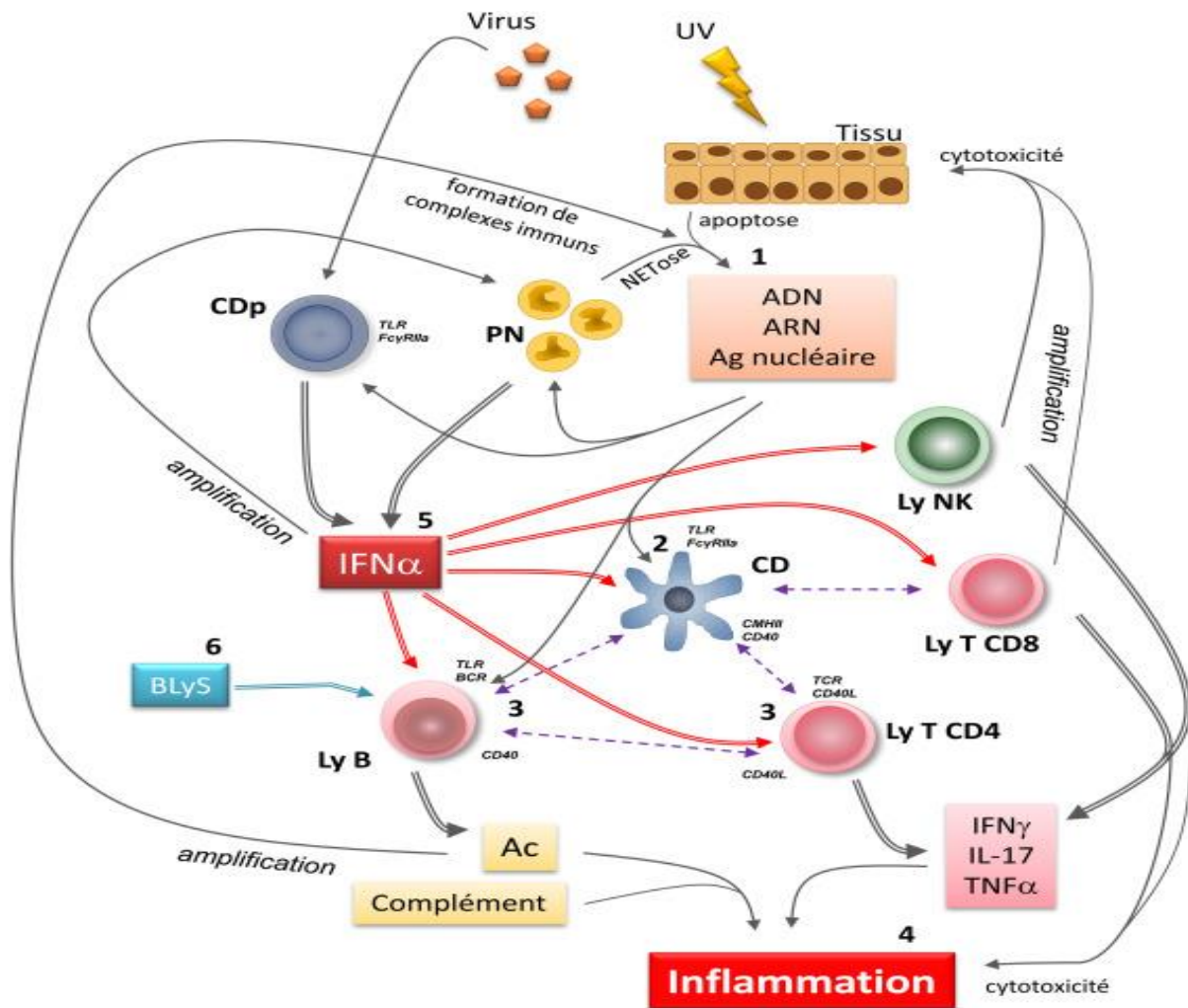
**Figure1:** rôle d'apoptose dans la pathogenèse de LES (Mahajan et al. 2016).



Le défaut de clairance des corps apoptotiques et des NETs conduit à une accumulation des cellules nécrotiques secondaires, la formation des CI, la phagocytose de ces CI par les CD et les macrophages ce qui provoque une libération des cytokines pro inflammatoires comme IFN $\alpha$ , augmente la mort cellulaire et les lésions tissulaires rencontrées dans le LES.

l'IFN $\alpha$  est la cytokine chef d'orchestre de la réaction auto-immune. Il est produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les polynucléaires neutrophiles sous l'effet de stimuli contenant du matériel nucléaire seul ou sous la forme de complexe immun. Il active de nombreuses cellules immunitaires aussi que activation secondairement de lymphocytes T et

lymphocytes B auto-réactifs et induit la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants d'origine nucléaire (A.Mathian et al.,2014 C.Contin-bordes et al .,2009) .



**Figure2** : Physiopathologie du lupus systémique(A.Mathian et al.,2014).

D'autres cytokines sont fortement impliquées dans la physiopathologie du lupus systémique : IFN  $\gamma$ , B-Lymphocyte Stimulator (BLyS) et monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) et de l'IL-10. Ces cytokines sont toutes présentes en excès chez les patients et sont les cibles de différentes biothérapies en cours de développement.

## I.7 manifestations cliniques :

Le LES se traduit par une grande diversité des symptômes, au cours de l'évolution de la maladie, il est fréquent d'observer des signes généraux (fièvre, asthénie, anorexie). Il s'agit souvent de signes d'évolutivité de la maladie.

Les atteintes les plus marquées sont les atteintes cutanéoparticulaires et viscérales (rein, système nerveux, séreuses) et parfois hématologique. (Weill et Batteux ,2010)



### I.7.1 Manifestations rhumatologiques :

Il s'agit surtout de douleurs articulaires de type inflammatoire pouvant toucher les petites et les grosses articulations. Le plus souvent ce sont des arthrites vraies (75%). (Weill et Batteux ,2010)

### I.7.2 Manifestations cutanéomuqueuses :

Les lésions cutanées sont parfois déclenchées ou aggravées par l'exposition solaire, ils sont très évocateurs de la maladie et peuvent être schématiquement classées en deux catégories :

- les lésions lupiques spécifiques : le lupus érythémateux aigu, subaigu et lupus discoïde.
- les lésions non spécifiques vasculaires ou non : le syndrome de Raynaud, érythème palmaire, livedo, purpura, alopecie des lésions bulleuses, des calcifications ect. (Vera- Recabarren et al, 2010).

### I.7.3 Manifestations cardiaques :

Le LES peut toucher les 3 tuniques du cœur, la péricardite est l'atteinte la plus fréquente (30% cas) souvent asymptomatique, Endocardite lupique de Libmann-Sacks pouvant survenir chez ces patients immunodéprimés ou encore La myocardite lupique qui est moins fréquente mais plus grave. (Guevara et al, 2008).

### I.7.4 Manifestations neurologiques :

Touche entre 20 à 50 % des cas, se traduit par des céphalées, des crises comitiales, des syndromes méningés récidivants, ou des syndromes cérébelleux (perte d'équilibre, incoordination, accident vasculaire...) (Roldan et Brey, 2007).

### I.7.5 Manifestations hématologiques :

Une anémie dont les deux types les plus fréquents sont l'anémie inflammatoire surtout au moment des poussées et l'anémie hémolytique autoimmune (Kokori et al, 2006).

### I.7.6 Manifestations rénales :

La néphropathie, peut être révélatrice de la maladie, survient au cours des cinq premières années (30 à 50 % des cas). La plupart des patients ayant une néphropathie lupique ont une glomérulonéphrite à complexe immuns ou d'immunoglobuline (Ig) (Karras et Martinez, 2012).

## I.8 diagnostique :

Le LES est une maladie polymorphe et multifactorielle, qui se traduit par une grande diversité des symptômes. La difficulté à établir un diagnostic a mené l'American College of Rheumatology (ACR) à proposer en 1992, une liste (révisée en 1997) de critères biologiques et

cliniques de caractérisation du lupus (*ANNEX1*). La présence de quatre critères parmi les onze décrits par l'ACR permet de classer la pathologie en tant que LES. Ces critères intègrent en particulier la recherche d'autoanticorps anti-nucléaire (AAN) qui est l'élément clé du diagnostic de lupus. (Hochberg, 1997)

## I.9 Traitement :

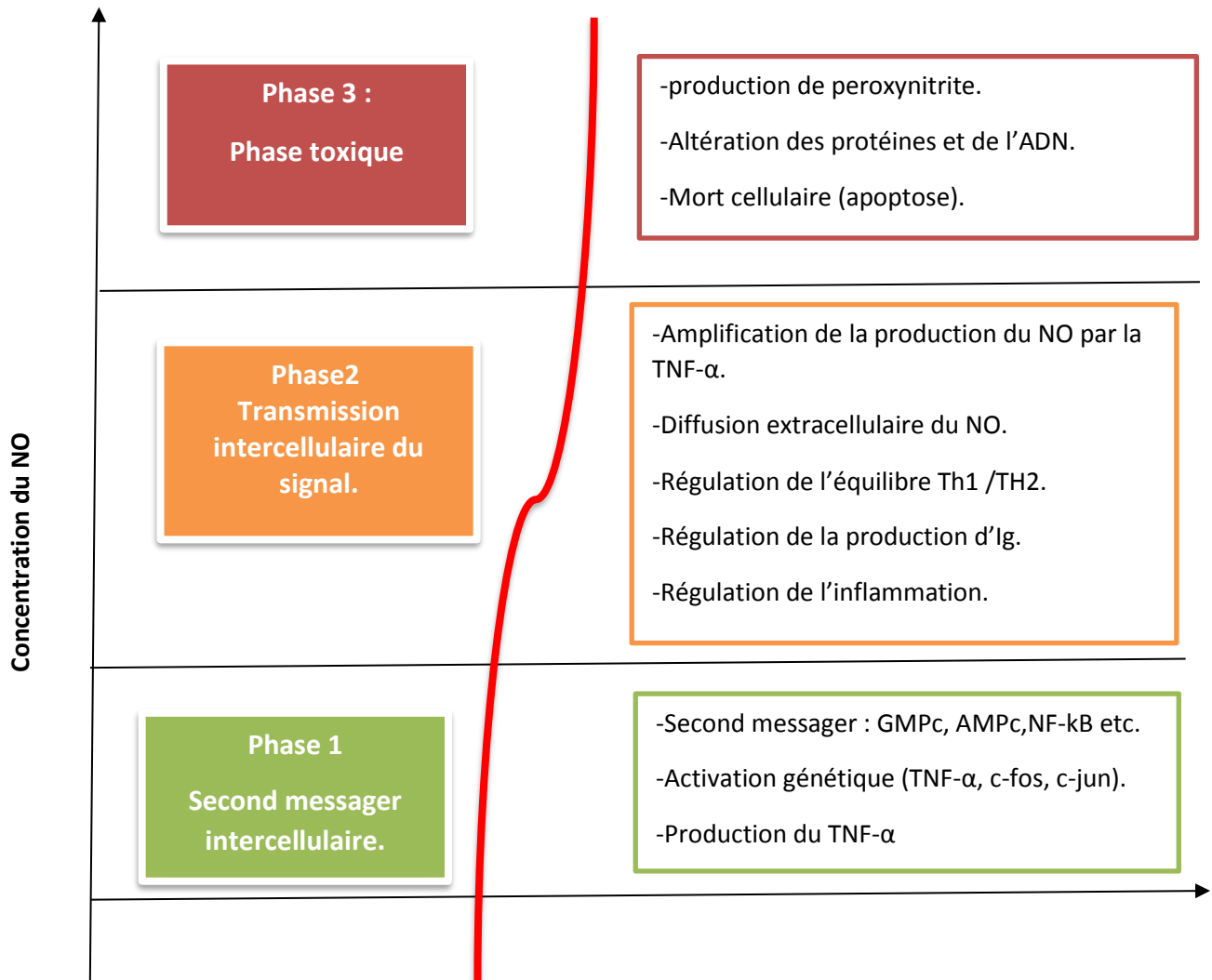
Actuellement, très peu de traitements sont disponibles pour soigner spécifiquement le LED. Ceux qui sont à la disposition des patients sont très variés et ne sont pas curatifs, ils atténuent les symptômes de la maladie pour ainsi améliorer la qualité de vie des patients. D'ailleurs, puisque ces symptômes sont très variables d'une personne à l'autre, les traitements sont personnalisés et adaptés selon les besoins des patients. Les traitements utilisés incluent les anti-inflammatoires, les corticostéroïdes, les antipaludiques, les immunosuppresseurs, les anticoagulants et les anticorps monoclonaux (Lemieux J, 2016).

## I.10 Le rôle pathogène de NO dans LES :

L'apoptose est un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire. Les cellules ont la capacité de répondre à des signaux très différents en activant un ensemble d'événements conduisant à leur mort par apoptose (ségal-bendirdjian,1999).

Des anomalies de ce processus sont impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies et surtout dans la maladie lupique (p.marchetti,2005).

Le rôle de NO est marqué comme un régulateur dans l'apoptose. Le NO possède des effets pro et anti apoptotique. L'augmentation de taux NO se traduit par un ensemble d'effets toxiques parmi, un défaut dans l'élimination des corps apoptotiques qui initie le déclenchement de la maladie (figure3) (nabil madour,2007).



**Figure3** : les fonctions immunorégulatrice du NO (nabil madour,2007)

Au cours du LES le pouvoir pathogène du NO se repose en grande partie sur l'étendue de sa production et sa possibilité de réagir avec l'anion superoxyde  $O_2^-$  pour générer du peroxynitrite  $ONOO^-$  qui est l'une des espèces réactives de l'azote (RNS), ce dernier est responsable de : lésions tissulaires via un oxydant direct, la nitration de la tyrosine des protéines et la modification des acides nucléiques. De plus, Le NO peut pénétrer directement dans les membranes cellulaires et oxyder les chaînes latérales des protéines ce qui provoque l'apoptose en activant les caspases, L'altération de ces protéines conduit à la formation des néo-épitopes efficaces pour activer les cellules T, conduisant à une forte réponse auto-immune. (Pan et al, 2020)

## II. LE MONOXYDE D'AZOTE

Le monoxyde d'azote est probablement avec CO, la plus petite biomolécule douée des propriétés de messenger chimique. Initialement découvert pour ses propriétés vaso-dilatatrices, de nombreuses autres fonctions lui ont été attribuées telles que la régulation de la neurotransmission et la modulation de la réponse immunitaire. Il est produit par une grande variété de cellules chez la plupart des organismes vivants (N. Belguendouz, 2005).

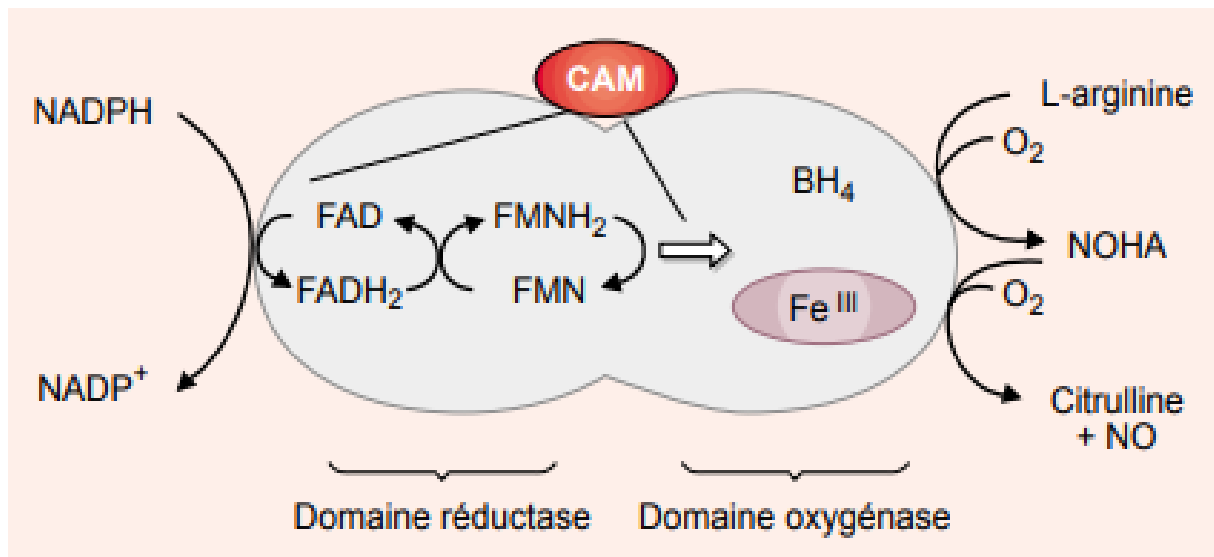
### II.1 Rappel historique

Le monoxyde d'azote (NO), élue molécule de l'année en 1990, a vu son intérêt grandir dans le domaine de la recherche scientifique et la physiopathologie de plusieurs organes chez l'Homme (cœur, poumon, utérus, cerveau), ainsi que les vaisseaux. En effet, vers 1980, Furchgott et Zawadzki se sont intéressés à l'endothélium vasculaire en y observant la production d'un facteur endothélial qu'ils ont dénommé : EDRF (endothelium-derived relaxing factor), provoquant la relaxation des artères isolées soumises à l'action de l'acétylcholine. En 1986, ils identifient l'EDRF au NO. Au début des années 90, le NO confirme son rôle dans la régulation du système cardiovasculaire (Chinbo et al., 2012).

### II.2 la biosynthèse du NO :

NO est synthétisé biologiquement par des enzymes appelées NO synthases, qui consomment du  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'O<sub>2</sub> pour oxyder la L-arginine en citrulline et NO (Sennéquier et Vadon-Le Goff, 1998), selon la réaction suivante : L-Arginine + O<sub>2</sub> → L-Citrulline + NO.

Les NOS utilisent pour fonctionner un ensemble de co-facteurs : dont la flavine adénine dinucléotide (la FAD), la flavine mononucléotide (la FMN), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (le NADPH), le tétrahydrobioptérine (le BH<sub>4</sub>) et d'un groupement hème. De plus, les NOS ont besoin de calmodulines afin de produire du NO, dont certaines sont dépendantes du calcium et d'autres indépendantes. Le rôle de la calmoduline consiste à faire augmenter le taux de transfert d'électrons provenant du NADPH (Dumas, 2007).

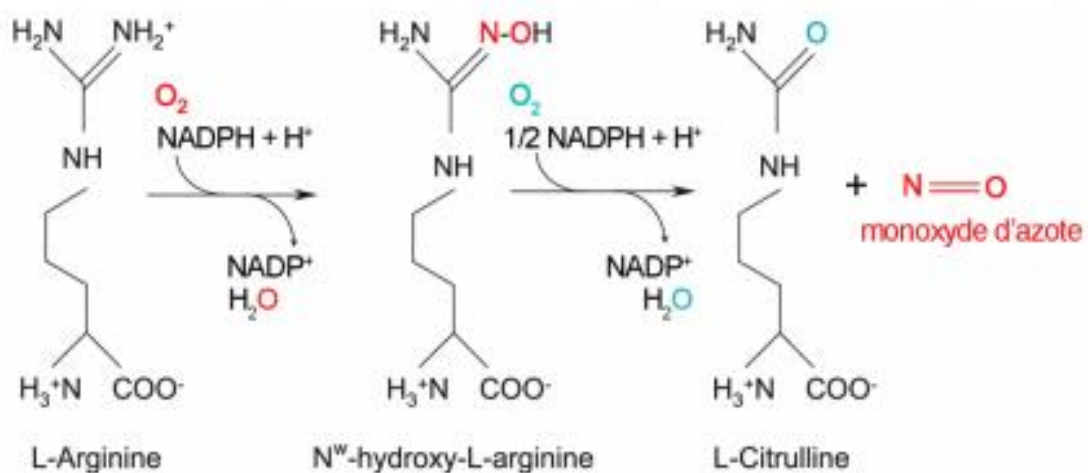


**Figure 4 : Fonctionnement général des NOS. (sennequier et vadon-le Goff, 1998)**

Les NOS doivent être sous la forme d'homodimères. Chaque monomère possède une structure en deux domaines : réductase et oxygénase. Le domaine réductase contient les sites de liaisons pour la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et le NADPH(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

La partie C-terminale de ce domaine est liée par le site de reconnaissance de la calmoduline (CaM) à la partie N-terminale du domaine oxygénase. Celui-ci contient les sites de liaison pour l'hème, la tetrahydrobiopterine (BH4) et la L-Arginine(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

Lorsque la NOS est sous forme de dimère et que les différents cofacteurs (NADPH, BH4, FAD, FMN, CaM) sont présents, le domaine réductase d'un monomère peut transférer les électrons de NADPH vers FAD puis FMN et enfin vers l'hème du domaine oxygénase de l'autre monomère. Ainsi activée, la NOS utilise l'oxygène moléculaire et les électrons pour oxyder la L-Arginine en Nw-hydroxy-L-Arginine, elle-même oxydée en NO et L-citrulline(Figure4) (Aude SÉLO-CARREAU,2011)



**Figure 5 : La réaction de synthèse du NO à partir de la L-Arginine (Aude SÉLO-CARREAU,2011)**

### II.2.2 Régulation de synthèse de NO

Vu sa grande réactivité biologique, les NOS contrôlent délicatement la biosynthèse du NO. La distinction entre isoformes constitutives et inducible s'étend à la régulation par de multiples facteurs :

1- Le couplage à la calmoduline (CaM): Les NOS-1 et 3 ne sont en effet actives qu'après couplage à la calmoduline, qui intervient comme un interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme . L'activité de ces deux isoformes est donc réglée par la concentration du milieu en ions et le calcium qui règle le couplage de la CaM . L'activité de la NOS-2 est, en revanche, indépendante des ions calcium, car cette isoforme est fortement couplée à la calmoduline(Belkhelfa Mourad,2009)..

2- L-arginine lui-même joue un rôle dans la régulation de l'activité des NOS ; La saturation en L-arginine provoque une diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH .Pour la NOS1, cette diminution résulte probablement de la régulation par la concentration en calcium. Pour la NOS2, la diminution de la consommation de NADPH lorsque le substrat vient à manquer pourrait être un mécanisme limitant la production d'espèces oxydantes si l'activité de cette isoforme devait être réglée par la concentration en L-arginine(Belkhelfa Mourad,2009).

3- L'arginine disponible, et donc la production de NO, pourrait être modulée par l'arginase, enzyme qui transforme l'arginine en urée et ornithine, et est présente (entre autres) dans les cellules endothéliales et les macrophages(Belkhelfa Mourad,2009).

4- Le monoxyde d'azote lui-même inhibe les NOS : il peut en effet se fixer à l'atome de fer des NOS, avant même de quitter le site actif. Le complexe inactif est présente 80 % de l'enzyme totale dans le cas de la NOS1(Belkhelfa Mourad,2009).

5-L'activation de CD23 (FcεRII) à la surface de monocytes/macrophages humains déclenchée par la liaison de certains anticorps monoclonaux spécifiques (ou d'IgE) stimule une nitricoxide synthase de type inductible, conduisant à la production de TNF-α qui agit alors comme facteur autocrine d'amplification. Cette voie exacerbée dans certaines maladies inflammatoires (Belkhelfa Mourad,2009).

6- Cytokines régulateur positif: L'IFN-γ, et le TNF-α sont les plus importants inducteurs de la transcription de la NOS2. Ces deux cytokines agissent en général en synergie . Elles peuvent également être combinées aux LPS et à l'IL-1 pour un effet maximal. L'IL-4 peut avoir un effet inducteur indirect sur la production du NO par l'induction de l'expression du CD23 . Cytokines régulateur négatif: TGF-β, l'IL-4 et l'IL-10 modulent directement la production du NO en inhibant l'expression de la NOS2 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Belkhelfa Mourad,2009).

### II.3 Les isoformes de NOS

La synthèse de NO, à partir de l'arginine, est catalysée par une des 3 formes de la NO Synthase (Tableau1).

-NOS1 ou nNOS : NOS neuronale (constitutive)

-NOS2 ou iNOS : NOS ( inductible )

-NOS3 ou eNOS : NOS endothéliale (constitutive)

Les NOS présentent des localisations cellulaires, des régulations et des propriétés catalytiques diverses(tableau1), ainsi qu'une homologie de 51-57%. Les quantités de NO produites sont très différentes selon l'isoforme. Les NOS1 et 3 sont constitutives et permettent de maintenir un taux basal assez faible de NO, alors que la NOS2 est exprimée en réponse à un stimulus et produit de fortes concentrations en NO sur un temps court. Selon la/les NOS active(s), les taux cellulaires locaux en NO sont variables de quelques nM à quelques μM (Aude SÉLO-CARREAU,2011).

#### II.3.1 NOS1 ou nNOS

La NOS1 est exprimée dans les neurones, les muscles squelettiques et l'épithélium du poumon. Le NO produit agit principalement comme un neurotransmetteur(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

### II.3.2 NOS3 ou eNOS

il est exprimée de façon constitutive et correspond à l'isoforme majeure exprimée dans le système cardiovasculaire. Le NO provenant de la eNOS joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire, la perfusion des tissus et la pression sanguine . Néanmoins, cette enzyme est également exprimée par plusieurs autres types cellulaires, dont les cardiomyocytes, les plaquettes et des cellules du système immunitaire telles que les monocytes, les neutrophiles, les cellules NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T ( marie-christine dumas, 2007).

### II.3.3 NOS2 ou iNOS

Le gène de la NOS2 est situé sur le chromosome 17, La iNOS, également nommée NOS2, est la seule forme inductible de NOS produisant du NO. Cela signifie que l'enzyme n'est pas présente dans les cellules en temps normal : sa synthèse est induite sous l'action de divers stimuli, contrairement aux deux autres NOS qui sont toujours présentes dans les cellules( mlle claire gIROUD,2008).

En fait, plusieurs signaux inflammatoires peuvent induire l'expression de la iNOS afin qu'elle produise du NO, tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et interféron- $\gamma$ ) et des composantes bactériennes (les lipopolysaccharides, la pneumolysine, la paroi bactérienne du pneumocoque et le pneumocoque entier). Diverses cellules peuvent exprimer la iNOS. Les macrophages sont reconnus pour la synthétiser sous stimulation, mais également les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK( Marie-Christine Dumas, 2007)

La forme inductible de NOS est décrite comme étant insensible au calcium, signifiant que l'enzyme n'a pas besoin d'un apport cellulaire en calcium pour fonctionner, ce dernier peut exercer des effets bénéfiques ou délétères dépendamment de l'endroit où il est produit. Le NO d'origine inflammatoire nuit généralement dans le cadre d'une pathologie cérébrale, en affectant l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, alors qu'il semble exercer un effet bénéfique au niveau pulmonaire en induisant l'apoptose de macrophages alvéolaires, aidant à la résolution de l'inflammation ( Marie-Christine Dumas, 2007).



| CARACTÉRISTIQUES DES TROIS TYPES DE NO SYNTHASE HUMAINE |                                           |                                                                          |                                    |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                         | NOS-1                                     | NOS-2                                                                    | NOS-3                              |
| <b>Type</b>                                             | Constitutive                              | Inductible                                                               | Constitutive                       |
| <b>Localisation</b>                                     | Cytosol                                   | Cytosol                                                                  | Cytosol<br>membranes, mitochondrie |
| <b>Nombre d'acide amine</b>                             | 1434                                      | 1153                                                                     | 1294                               |
| <b>Masse moléculaire</b>                                | 160 kDa                                   | 130 kDa                                                                  | 133 kDa                            |
| <b>Nombre de paires de bases du gène</b>                | $> 15.10^4$                               | $3,7.10^4$                                                               | $2,1.10^4$                         |
| <b>Activation</b>                                       | Augmentation de la $[Ca^{2+}]$            | Expression stimulée par des cytokines et/ou $[Ca^{2+}]_i$ et endotoxines | Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$   |
| <b>Co-facteurs identifiés</b>                           | NADPH, FAD, FMN<br>BH <sub>4</sub> , hème |                                                                          |                                    |

**Tableau1** : CARACTÉRISTIQUES DES TROIS TYPES DE NO SYNTHASE HUMAINE (sennequier et vadon-le Goff, 1998 )

#### II.3.4 Structure des NOS

Les NOS doivent être sous la forme d'homodimères pour être actives. Chaque monomère possède une structure en deux domaines : réductase et oxygénase.

- Le domaine reductase : La partie C-terminale des NOS est très similaire aux cytochrome P450 réductases avec lesquelles elle a environ 50 % d'homologie : elle possède un site de fixation de deux flavines FAD et FMN, ainsi qu'un site NADPH. Le rôle de la partie réductase est principalement d'assurer le transfert séquentiel vers le domaine oxygénase des électrons fournis deux par deux par le NADPH(Mlle Claire GIROUD,2008).

-Le domaine oxygenase : La partie N-terminale des NOS contient le site catalytique constitué du site de fixation de l'hème, du site de fixation du substrat L-arginine et du site de fixation

du cofacteur (Hb4). L'hème est ancré dans la protéine par une cystéine qui sert de ligand proximal au fer (Mlle Claire GIROUD,2008).

## II.4 ROLE PHYSIOLOGIQUE DU NO

Le monoxyde d'azote (NO) est un élément radicalaire à demi-vie courte impliqué dans la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques à l'état normal ou pathologique, la production de NO est fortement augmentée grâce à l'augmentation de l'expression d'une iNOS. Dans ces conditions, le NO pourrait induire une toxicité directe sur un grand nombre de fonctions d'organes. Un effet délétère indirect est également possible par nitrosylation des protéines cellulaires et par production de peroxynitrite. Ces composés peuvent inhiber la chaîne respiratoire et donc avoir une toxicité mitochondriale. Le NO induirait une dysfonction micro- et macro-vasculaire, myocardique, immunitaire et neuronale (E.besnier et al.,2015).

-Dans le système vasculaire Le NO est responsable de la relaxation des muscles lisses et par la voie de conséquence, sur la vasodilatation et l'adhésion plaquettaire via l'augmentation du GMPc(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

- dans le système immunitaire, le NO est un inhibiteur puissant de l'activation des cellules inflammatoire et l'activation des monocytes dans le cas d'une inflammation. Quand les concentrations produites sont fortes ,NO devient toxique ;cette propriété est utilisée par les cellules inflammatoire (principalement les macrophages) en réponse à des pathogènes ou des cellules tumorales ,pour induit l'apoptose .enfin, NO agit comme un protecteur des infection parasitaires par des actions cytostatiques et cytotoxiques sur les micro-organismes(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

-Dans le système nerveux le NO joue un role dans le contrôle de l'activation neuronal de différentes régions du système nerveux central, mais il intervient également dans la plasticité neuronale(Aude SÉLO-CARREAU,2011).

## II.5 NO ET SYSTEME IMMUNITAIRE

### II.5.1 SOURCE DE NO DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE

De nombreuses cellules du système immunitaire produisent du NO: cellules dendritiques, cellules NK, monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. D'autres cellules impliquées dans les réactions immunes produisent elles aussi du NO: cellules endothéliales, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses vasculaires ou bronchiques. De plus, plusieurs études ont retrouvé la NOS-2 et la NOS-3 dans les macrophages, les cellules dendritiques et des cellules dérivées des lignées B et T. Enfin, les trois isoformes de NOS ont

été retrouvées dans les cellules B et T (Tableau 2) (Jean-Marc TADIE, 2012).

| Cellules                                                       | Stimulus                                  | Nos impliquée | Effets du NO                                                   |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Macrophages</b>                                             |                                           |               |                                                                |
| <b>Macrophages rat et homme</b>                                | IFN- $\gamma$ +LPS ; IFN- $\gamma$ ; IL-4 | NOS-2         | Activité antimicrobienne                                       |
| <b>Macrophages alvéolaires rat</b>                             | Surfactant                                | NOS-3         | Effets anti-inflammatoires ?                                   |
| <b>Cellules dendritiques</b>                                   |                                           |               |                                                                |
| <b>Cellules de Langerhans, souris</b>                          | IFN- $\gamma$ +LPS                        | NOS-2         | Effets pro inflammatoires ?                                    |
| <b>Cellules dendritiques immatures (moelle osseuse souris)</b> | IFN- $\gamma$ +LPS                        | NOS-2         | Diminution de la croissance bactérienne                        |
| <b>Cellules dendritiques (thymus rat)</b>                      | Aucun                                     | NOS-2         | Pro-apoptotique                                                |
| <b>Cellules Natural Killer</b>                                 |                                           |               |                                                                |
| <b>Cellules NK rate souris</b>                                 | IL-2, IL-12                               | NOS-2         | Libération IFN- $\gamma$ et augmentation effet cytotoxique     |
| <b>Cellules NK sanguines humaines</b>                          | IL-2 et anti-CD16 ou cellule cible        | NOS-3         | Effet antiapoptotique                                          |
| <b>Cellules NK sanguines humaines</b>                          | IL-12, TNF                                | NOS-2         | Diminution effets cytotoxiques, diminution granzyme <b>B</b> . |
| <b>Cellules T</b>                                              |                                           |               |                                                                |
| <b>Cellules T souris</b>                                       | Anti-CD3                                  | NOS-1         | Effet pro-apoptotique                                          |
| <b>Cellules T leucémiques homme (jurkat)</b>                   | SDF1 $\alpha$                             | NOS-3         | Augmentation de la réponse chimiotactique au SDF1 $\alpha$     |
| <b>Cellules B</b>                                              |                                           |               |                                                                |
| <b>Cellules lymphome de Burkitt.</b>                           | Aucune                                    | NOS-2         | Effet anti-apoptotique                                         |
| <b>Cellules B leucémie lymphoïde chronique</b>                 | Aucune                                    | NOS-2         | Effet anti-apoptotique                                         |

**Tableau 2 :** vue générale des cellules du système immunitaire produisant du NO et les isoformes de NOS impliquées ( Jean-Marc TADIE, 2012).

### II.5.2 FONCTIONS IMMUNES DU NO

Le NO produit par les NOS II, joue par conséquent un rôle important dans la régulation, l'initiation et le développement des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. L'activation des macrophages par les cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS II. Le NO produit peut alors agir sur les cellules tumorales, des bactéries ou des parasites intracellulaires par son action cytostatique et cytotoxique. Le NO est impliqué dans d'autres fonctions du système immunitaire tel que : le chimiotactisme, l'agrégation et l'apoptose des polynucléaires neutrophiles, elles même productrices de NO(blibek karim,2009).

- NO a des effets bénéfiques. En effet, le NO est toxique pour les bactéries, les cellules tummorales et les parasites(blibek karim,2009).
- NO peut également entrainer des effets délétères tels que l'hypotension artérielle, l'inhibition de métabolismes intermédiaires, l'apoptose et la production d'un radical oxydantperoxynitrite,produit de réaction du NO avec l'anion superoxyde(blibek karim,2009).
- Le NO est doué d'importantes propriétés immunorégulatrices, il agit directement comme une molécule immunorégulatrice autocrine ou paracrine régulant notamment la balance Th1/Th2(blibek karim,2009).
- NO joue un rôle soit pro-apoptotique, soit anti-apoptotique dans de nombreux types cellulaires. A faible concentrations, le NO protège les cellules de l'apoptose en activant la protéase CCP32 like et en augmentant l'expression de la protéine Bcl2. Les effets pro-apoptotique du NO font intervenir sa possibilité de réagir avec l'anion superoxyde  $O_2^-$  - pour générer du peroxynitrite  $ONOO^-$  - ont également été impliquées(blibek karim,2009).

#### II.5.2.1 NO ET CONTROLE DU PROCESSUS INFECTIEUX

L'exposition de cellules immunitaires à des composés bactériens comme le LPS, peptidoglycane, de l'ADN bactérien voire des bactéries intactes entraînent une augmentation de l'expression de la NOS-2 et une augmentation de la production de NO. Ainsi, la formation de NO par la NOS-2, essentiellement par l'action des peroxynitrites, agit comme une molécule cytotoxique. De plus, le rôle fondamental du NO et de la NOS-2 dans le contrôle des processus infectieux a été clairement établi sur des modèles murins KO pour le gène de la NOS-2, illustrant le rôle central de cette molécule dans la défense contre les infections virales, bactériennes ou fongiques. Cependant, le rôle de la NOS-2 dans les réactions antimicrobiennes est moins bien établi. Les effets cytotoxiques du NO initialement supposés directement sur les

agents infectieux portent aussi sur les tissus hôtes et entraînent des destructions tissulaires( Jean-Marc TADIE,2012).

#### II.5.2.2 REGULATION DES FACTEURS DE L'INFLAMMATION PAR LE NO

Les réponses cellulaires au stress oxydatif et/ou nistrosatif sont généralement régulées au niveau transcriptionnel ( Jean-Marc TADIE,2012).

##### II.5.2.2.1 VOIE NF-KB

Cette voie joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire/immunitaire cellulaire chez l'homme : prolifération des cellules B et T, expression et synthèse cytokinique et des molécules d'adhésion, régulation de l'apoptose. L'activation de NF- $\kappa$ B est essentielle à l'expression de la NOS-2 et le NO peut réguler de différentes façons NF- $\kappa$ B. En effet, le NO peut inhiber l'activité de NF- $\kappa$ B par Snitrosylation de la sous-unité p50. Cependant, il a été démontré que le NO pouvait être activateur de NF- $\kappa$ B, en agissant sur les facteurs régulant négativement son activité (S-nitrosylation du facteur inhibiteur de l'activité NF- $\kappa$ B p21ras) . De plus, le NO peut réguler négativement l'activité de la voie NF- $\kappa$ B en diminuant l'activité de l'IK kinase, à l'origine de la dissociation de l'I $\kappa$ B de NF $\kappa$ B, permettant l'activation de NF- $\kappa$ B, même si de faibles concentrations de NO entraînent l'effet inverse. Enfin, des études in-vivo ont retrouvé un rôle activateur de NF- $\kappa$ B du NO dans des situations d'état de choc hémorragique ou d'ischémie reperfusion( Jean-Marc TADIE,2012).

##### II.5.2.2.2 JANUS KINASES

Les Janus Tyrosine Kinases sont exprimées de façon ubiquitaire et jouent un rôle très important dans la régulation de grandes fonctions cellulaires. Elles permettent la conversion d'un signal extracellulaire à la surface de la cellule en une réponse transcriptionnelle de la cellule en phosphorylant certaines protéines intracellulaires comme les protéines STAT (signal transducteur and activator of transcription). Il a été démontré que le NO pouvait inhiber l'activité de Jak2 et Jak3. De plus, le NO produit par les macrophages alvéolaires activés joue un rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire T. Ce rôle inhibiteur repose sur une inhibition de Jak1 et 74 Jak3 par le NO 212. Cependant, là encore, le rôle du NO n'est pas clairement uniciste. En effet, chez la souris en état de choc hémorragique, le NO produit par l'activation de la NOS-2 permettrait une stimulation de Stat3 à l'origine d'une augmentation de synthèse de l'IL6 et du G-CSF. Le NO est à l'origine d'une régulation d'autres facteurs de transcription : bactériens (OxyR, SoxR) ; AP-1, via des mécanismes GMPC dépendant ou de S-nitrosilation( Jean-Marc TADIE,2012).

### II.5.2.3 NO ET POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE

La synthèse de NO par le polynucléaire neutrophile (PNN) et son action diffèrent en fonction de l'espèce étudiée. Il a été démontré chez le rongeur que les PNN pouvaient produire du NO via la NOS-2, en réponse à une stimulation par le LPS, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Chez l'homme, la production de NO par le PNN est plus controversée. Plusieurs études n'ont pas retrouvé de production de NO par le PNN. Cependant, les PNN isolés dans la cavité buccale et dans l'urine de patients présentant une infection urinaire exprimaient la NOS-2. De plus, les PNN ayant phagocyté des bactéries semblaient exprimer la NOS-2. Enfin, il semblerait que, même si les PNN activés ne peuvent pas synthétiser directement du NO, ils peuvent convertir la N-hydroxy-L-arginine en nitrite, nitrate et citrulline. En plus de ses effets anti-microbiens directs, le NO peut réguler les fonctions du PNN. En effet, des études in-vitro ont démontré que le NO et des donneurs de NO entraînaient une diminution de la dégranulation, de la production des leucotriènes, de la synthèse d'anions superoxide ainsi que la migration des PNN. De plus, le NO a un rôle important dans le recrutement des leucocytes ainsi que dans l'adhérence de ces cellules à l'endothélium ( Jean-Marc TADIE,2012).

## *Chapitre 2*

### *Matériels et méthodes*

### III- Matériels et méthodes :

Nous avons mené une étude prospective descriptive au sein du service de médecine interne au centre hospitalo-universitaire Mustapha Pacha d'Alger.

La durée de l'étude s'est étalée sur une période de 2 mois (de 09 mai 2021 au 08 juillet 2021).

#### III.1. Matériels biologiques

##### III.1.1 Population étudiée :

L'étude a concerné 30 sujets appartenant à une population d'origine algérienne comprenant :

- 15 patients atteints de LES remplissant les critères de l'ACR (American College of Rheumatology).
- 15 témoins volontaires sains.

##### III.1.2 Critères d'inclusions :

Les patients diagnostiqués lupique et ayant au moins 4 critères sur les 11 critères de l'ACR ont été inclus dans l'étude.

Les critères d'inclusion pour le groupe témoin sont l'acceptation de participer, la bonne santé et l'absence de maladies auto-immunes,

##### III.1.3 Recueil des données :

Pour chaque patient recruté les données ont été collectées à partir des informations renseignées dans des fiches d'exploitation regroupant l'ensemble des items épidémiologique, cliniques, paracliniques, thérapeutiques et évolutifs.

##### III.1.4 Prélèvement :

Des prélèvements du sang veineux ont été réalisés chez les patients lupiques ainsi que les sujets sains sur des tubes à anticoagulant (EDTA) dans le but de mesurer le taux de NO chez ces personnes.

#### III.1. Matériels non biologiques

Au cours de la réalisation de notre études nous avons utilisé une variété d'appareillages et de réactif. L'ensemble du matériel est cité dans l'annexe.

### III.2 Méthodes :

Les sangs prélevés sur les tubes à EDTA sont numérotés, étiquetés et transportés directement au laboratoire de recherche 2.40 à l'université de l'UMBB dans une glacière isotherme a



+4°C, puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min.

Le plasma est prélevé dans des eppendorfs et conservé à une température de -20°C jusqu'au jour de dosage.

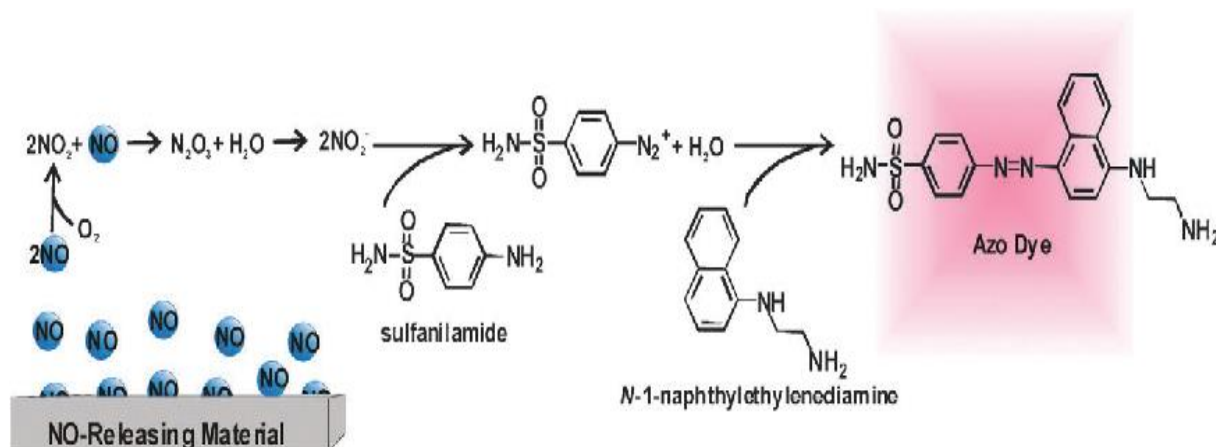
### III.2.1 Dosage des nitrites totaux par la méthode de Griess modifiée :

La mesure des concentrations en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) est fréquemment utilisée pour explorer le métabolisme du monoxyde d'azote (NO) et l'implication de ce radical dans de nombreuses situations pathologiques. Parmi les méthodes décrites, la réaction de Griess est la plus couramment utilisée. (f-grand et al.,2001)

### III.2.2 Principe :

La réaction de Griess décrite pour la première fois en 1879 est une réaction de diazotation en deux étapes en milieu acide, permettant le dosage des ions nitrite.

L'espèce  $\text{NO}^+$ , générée par l'acidification de  $\text{NO}_2^-$ , réagit avec le sulfanilamide pour produire un ion diazonium. Après couplage avec la N-(1-naphtyl) éthylenediamine, un chromophore azoïque stable est formé (couleur rose) dont l'absorbance à 543 nm est proportionnelle à la concentration des ions nitrites.



**Figure6** : principe de réaction de griess

### III.2.3 Mode opératoire :

- 100 µl d'échantillon à analyser(sérum) sont pipetés dans un eppendorf opaque.
- Puis on ajoute 100 µl de réactif de Griess (50µl de Griess A + 50µl Griess B)
- le volume est ensuite ajuster avec 800 µl d'eau distillée (donc un volume total de 1000 µl)

- les solutions préparées sont mélangées à l'aide d'un vortex et incubées pendant 15min à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- après 15min, le mélange est centrifugé pendant 5min à 2800 tr/min.
- La lecture s'effectue par un spectrophotomètre à une longueur d'onde  $\lambda = 543 \text{ nm}$ .
- La détermination de la concentration des nitrites se fait par extrapolation de la valeur de la DO obtenue par la courbe étalon  $DO = f([NaNO_2])$ .
- on utilise la courbe d'étalonnage pour trouver la concentration de NO chez les patients.

### III.2.4 Courbe d'étalonnage des nitrites :

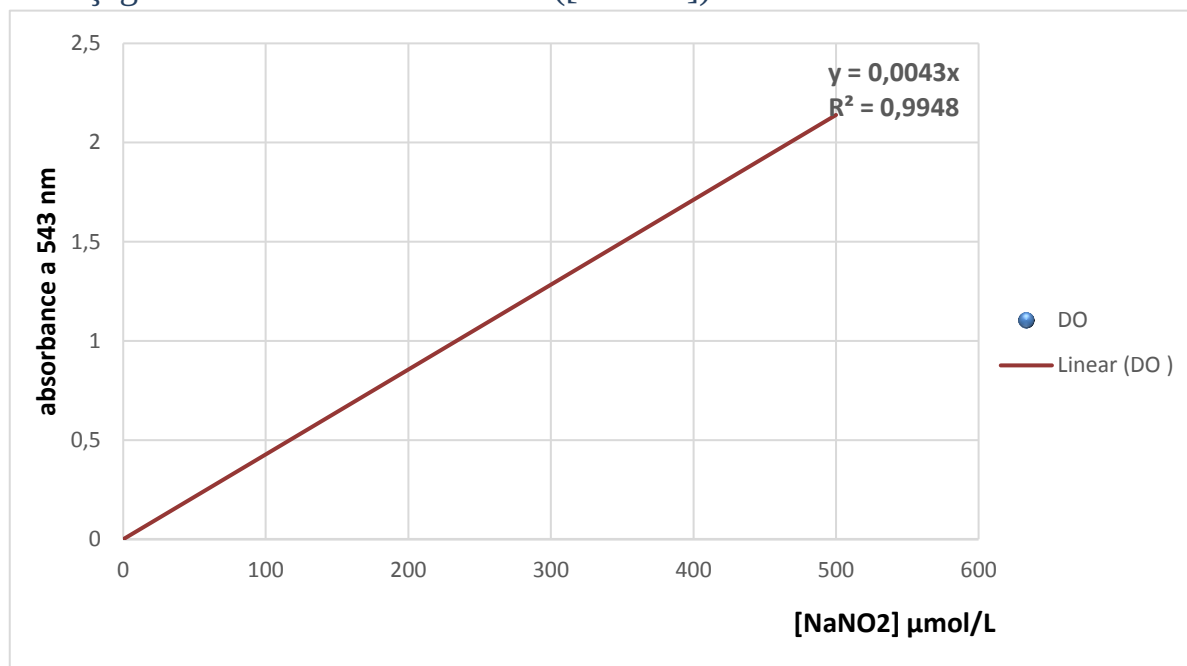
Une gamme étalon est préparée à partir des volumes croissants des nitrites de sodium ( $NaNO_2$ ) sur un intervalle croissant allant de 0 à 50 $\mu$ l, puis ce volume est ajusté à 100 $\mu$ l par l'ajout de PBS stérile. 50 $\mu$ l de chacun des réactifs de Griess (A et B) sont additionnés à la solution puis le volume est complété à 1ml avec de l'eau distillée.

L'incubation s'effectue à l'obscurité à température ambiante pendant 15min suivi de la lecture de DO à une longueur d'onde de 543 nm.

| Numéro | $NaNO_2$ ( $\mu$ l) | PBS ( $\mu$ M) | Griess A ( $\mu$ l) | Griess B ( $\mu$ l) | H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l) |
|--------|---------------------|----------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1      | 0                   | 100            | 50                  | 50                  | 800                         |
| 2      | 10                  | 90             | 50                  | 50                  | 800                         |
| 3      | 20                  | 80             | 50                  | 50                  | 800                         |
| 4      | 30                  | 70             | 50                  | 50                  | 800                         |
| 5      | 40                  | 60             | 50                  | 50                  | 800                         |
| 6      | 50                  | 50             | 50                  | 50                  | 800                         |

**Tableau3:** préparation de la courbe étalon pour le dosage des nitrites.

### III.2.5 Traçage de la courbe étalon DO=f ([NaNO<sub>2</sub>]) :



**Figure7** : Courbe étalon du dosage des nitrites par la méthode de Griess.

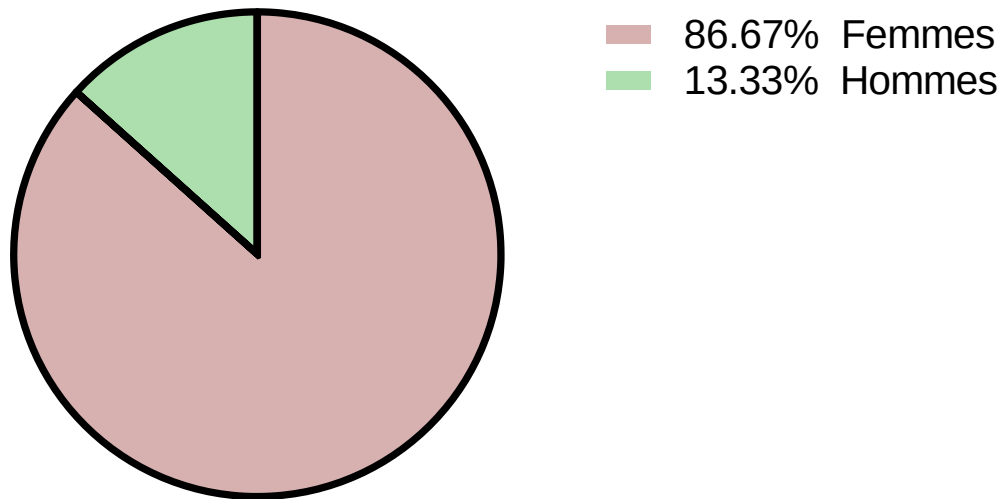
# *Chapitre 3*

## *Résultats et discussion*

## IV. Résultats et discussion :

### IV.1. Répartition des patients lupiques selon le sexe et l'âge :

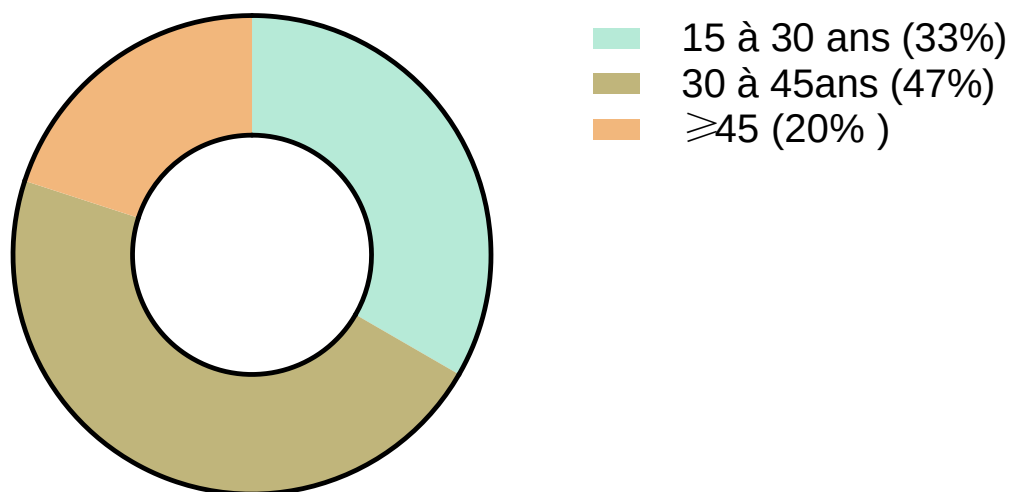
Notre étude a été effectuée sur 15 patients (13 femmes, 2 hommes). La prédominance du sexe féminin est clairement visible, soit à (86,67%) chez les femmes et (13,33%) chez les hommes avec un sexe ratio global de 0,15.



**Figure8** : la répartition des patients lupiques selon le sexe

#### ◦ L'âge :

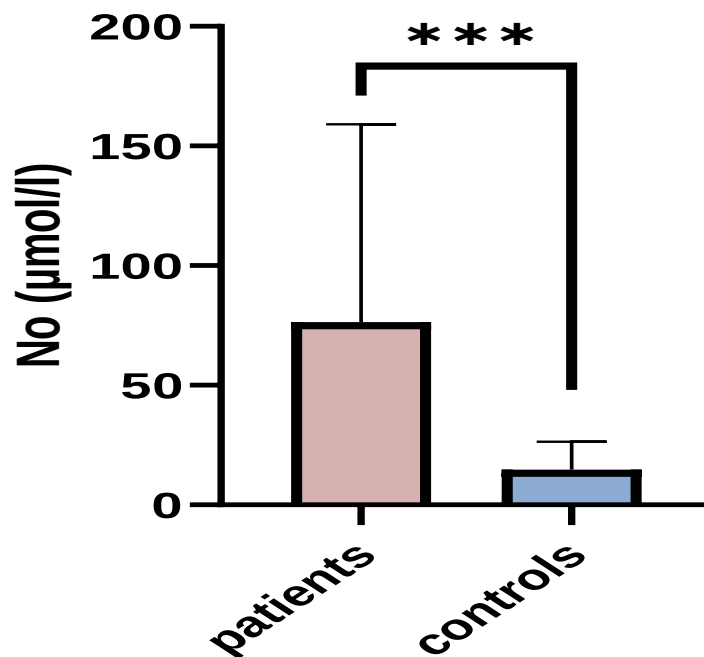
L'âge moyen de notre série d'étude est de 36 ans avec des valeurs extrêmes de 18 et 57 ans et un écart type de 13,33. Un maximum de fréquences est observé dans la tranche d'âge comprise entre 30 et 45 ans.



**Figure9** : la répartition des patients lupiques selon les tranches d'âge.

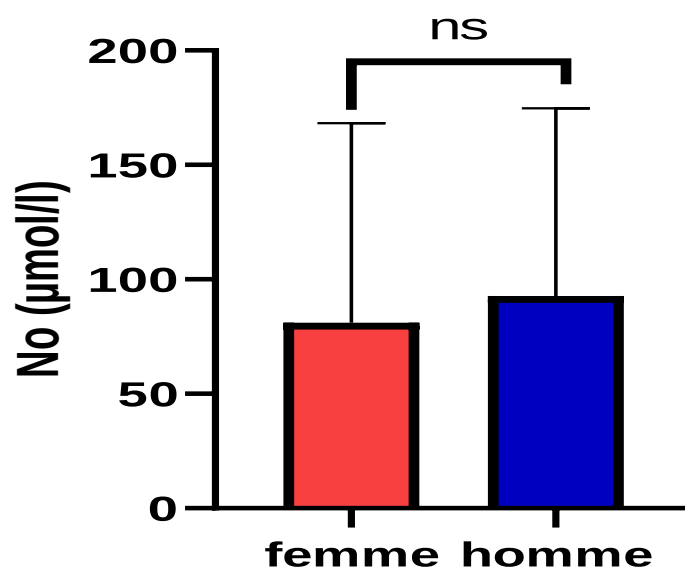
#### IV.2 Taux du NO chez les patients lupiques et les sujets sains :

La comparaison globale des taux des nitrites totaux mesurés chez les patients lupiques présentant des différentes manifestations avec les sujets sains indique que les sérums des malades comportent des teneurs en nitrites supérieures ( $15.81 \pm 297.44 \mu\text{M}$ ) à celles observées pour les sérums des témoins ( $1.16 \pm 47.44\mu\text{M}$ ). ( $p = 0,0003$ )



**Figure 10:** taux de NO chez les patients lupiques et les sujets sains.

#### IV.3 Taux du NO chez les lupiques femmes et hommes :



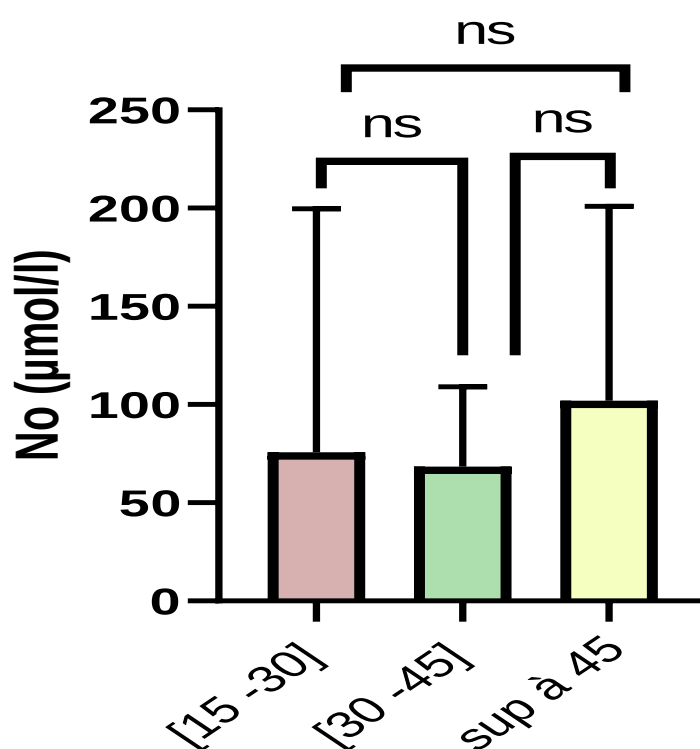
**Figure11 :**Concentration de NO chez les femmes et les hommes lupiques

Chez les patients lupiques hommes ou femmes les concentrations du NO semble être similaire, le résultat de comparaison est clairement non significatif ( $p < 0.58$ ) ce qui indique que la production du NO ne corrèle pas avec le sexe du malade.

#### IV.4 Taux du NO chez les lupiques selon la tranche d'âge :

L'étude de comparaison entre le taux des nitrites totaux produites par les patients lupiques présentant des différentes manifestations réparties en différents tranches d'âges montre une similarité de concentrations de NO chez toutes les catégories d'âges.

Aucune différence de concentration sérique du NO n'a été observé chez les différentes tranches d'âge ( $p = ns$ ). Les patients jeunes [15 -30] ont un taux sérique du NO similaire aux patients plus âgés [30 – 45] et de même pour les malades de plus de 45ans.



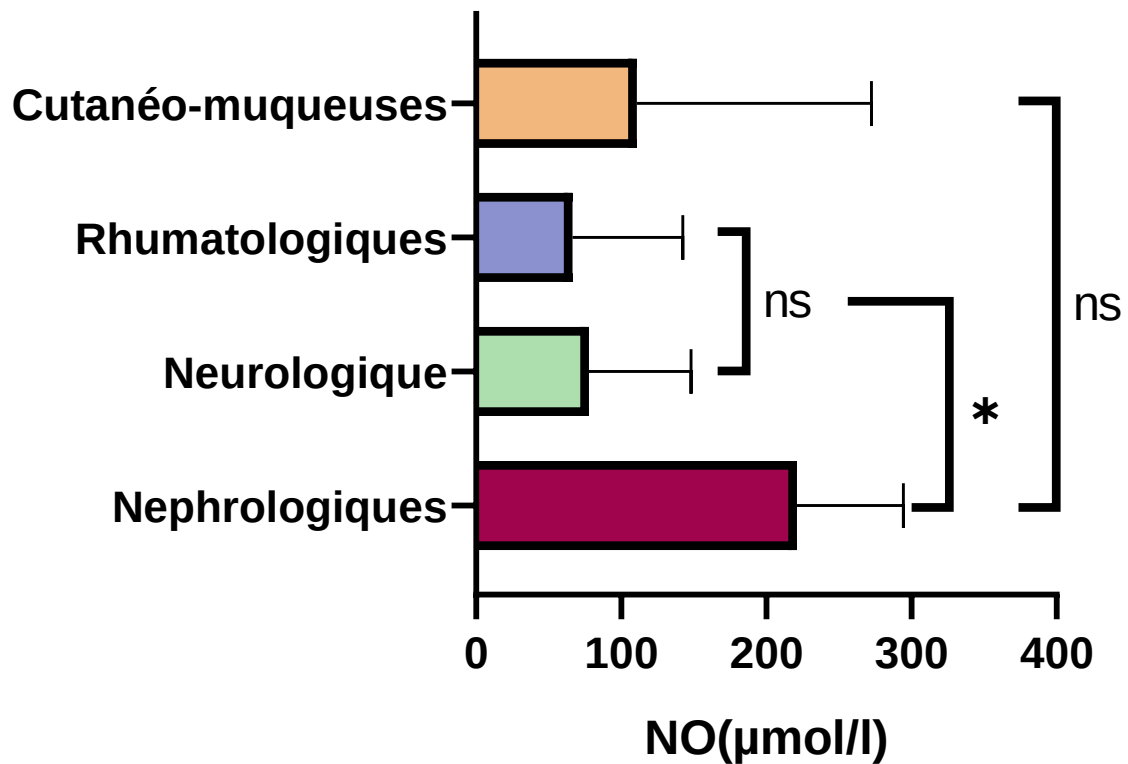
**Figure12** : production du NO chez les patients lupiques selon les tranches de d'âge.





#### IV.6 Taux du NO chez les lupiques selon les manifestations cliniques :

Dans le but de déterminer l'origine de l'augmentation de taux du NO, nous avons réparti nos patients dans des groupes selon leurs manifestations cliniques et comparer ensuite leurs concentrations de NO produits.



**Figure14** : Répartition des patients lupiques selon les manifestations cliniques

D'après les résultats le taux de NO était significativement plus élevé dans le groupe des patients souffrants des manifestations néphrologiques dont il atteint presque les 300μmol/l, de même le groupe des patients présentant des manifestations cutanéomuqueuses contrairement aux patients qui ont des atteints rhumatologiques et neurologique, la concentration de NO était plus basse et ne dépasse pas les 150μmol/l. ( $p=0.02$ )

## Discussion

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique dont l'aspect clinique est très polymorphe et dont l'origine multigénique laisse la place à des facteurs environnementaux. Cette affection chronique est marquée par une succession de poussées s'accompagnant d'une altération de l'état général et de périodes de rémission sans symptômes (buxeraud., 2016). L'objectif principal de notre travail était de rechercher une corrélation entre le taux de production du NO et l'activité de la maladie lupique, ce dernier est impliqué dans des nombreuses pathologies notamment auto-immunes.

La prédominance féminine est classique au cours du lupus, nos résultats montrent que les femmes sont plus touchées par cette maladie (86,67%) par rapport aux hommes (13,33%) avec un sexe ratio (Homme /Femme) global de 0.15 ceci est en accord avec plusieurs études (goran-kouacou et al,2016). parmi une étude italienne (Govoni et al, 2006) portée sur 201 patients dont le sexe ratio était 0.11, une autre étude tunisienne (Mahfoudh et al. 2010) avec des résultats qui rejoignent les nôtres dont le sexe ratio était 1,79.

Dans notre série l'âge moyen est 36 ans avec des extrêmes de [18-57ans], l'âge de début de la maladie varie selon les études, les races et les ethnies et même au sein d'un même groupe, suggérant l'aspect multifactoriel de la maladie. Dans notre étude le pic de fréquence est localisé dans la tranches d'âge 30 à 45 ce qui est en accord avec l'étude brésilienne de Beltrão et al,2013. Cela peut être dû au fait que la maladie touche essentiellement les femmes à l'âge adulte et est rare chez l'enfant puisque seuls 10 à 17 % des cas sont diagnostiqués avant l'âge de 16 ans (bader-meunier et al.,2003).

L'apparition de la maladie est plus fréquente chez les femmes en âge de procréer et elle s'atténue à la ménopause, d'après Cutolo et al,2006 la prédominance féminine est due aux facteurs hormonaux qui influencent le système immunitaire, notamment les œstrogènes qui stimulent la réponse immunitaire humorale d'un côté et la progestérone et les androgènes qui exercent un effet suppresseur sur la réponse immunitaire de l'autre, plusieurs études ont pointé un rôle délétère de la grossesse et des œstrogènes exogènes chez les femmes lupiques. Le chromosome X comprend plus de 1000 gènes, y compris des micro-ARN et de nombreux gènes codant des protéines connues pour contrôler directement ou indirectement la réponse immunitaire et suggère que chromosomes X est un facteur de risque dans le lupus ( jean-charles guéry,2019).

Par ailleurs, la mesure du taux de NO produit dans notre série de patients était significativement élevée, des teneurs en nitrites supérieures ( $15.81 \pm 297.44 \mu\text{M}$ ) à celles observées pour les sérums des témoins ( $1.16 \pm 47.44 \mu\text{M}$ ) ( $p = 0,0003$ ). Ce qui rejoint de nombreuses études effectuées dans le même contexte. Tel que les travaux de Wanchu et al, 1998 qui ont porté sur 26 patients dont la concentration du NO chez les patients était significativement supérieure aux témoins ( $P < 0,001$ ). De même pour les travaux de Gilkeson et al, 1999 les taux sériques de nitrate/nitrite étaient significativement plus élevés chez 26 patients par rapport à 19 témoins (moyenne  $29,5 \mu\text{M}$ , plage de 1 à 438), témoins, (moyenne  $9,6 \mu\text{M/ml}$ , plage 0-51;  $p = 0,0004$ ). Dans l'ensemble, il y avait une corrélation significative. Contrairement à une étude coréenne (Lee et Kim, 2001) menée sur 70 patients lupiques et 10 contrôles, la concentration sérique de nitrate chez les patients ne différait pas de celle des témoins.

Notons tout de même, que la comparaison du taux du NO produits entre les femmes et les hommes lupiques était non significative, de même pour les différentes tranches d'âge aucune différence de concentration sérique du NO n'a été observée, cela reste difficile d'être étudié devant le faible effectif et les résultats pourraient être désuètes.

La différence du taux de NO produit chez les patients en phase active et inactive de la maladie était très significative. Les patients en poussées avaient des concentrations qui avoisinent les  $300 \mu\text{M}$  versus  $74.65 \mu\text{M}$  maximum pour les patients en remissions, Ces données ont déjà été rapportées par les études de Belmont et al, 1997 qui ont montré aussi une surexpression des iNOS pendant la phase active de la maladie ce qui constitue une source potentielle de production excessive de NO, Ipan et al, 2020 ont aussi rapporté une surexpression d'iNOS au niveau de l'ARNm chez les patients lupiques en poussées

Sur le plan clinique notre étude confirme le polymorphisme du LES en Algérie, Les signes généraux sont fréquents au cours du LES et témoignent habituellement de l'évolutivité de la maladie. Dans notre série, la mesure des taux de NO produit en fonction des manifestations cliniques indique que le groupe des patients souffrants des atteintes néphrologiques marquent un taux élevé du NO (avoisinant les  $300 \mu\text{M}$ ), ce qui est en accord avec les données de la littérature (Joates et al, 2008) et (Elzawawy et al, 2014).

Ces résultats suggèrent que l'oxyde nitrite plasmatique pourrait être lié à la maladie rénale, cela due à une expression accrue d'iNOS, en particulier dans l'endothélium vasculaire des reins. (Belmont et al, 1997)

L'atteinte cutanéomuqueuses représente l'atteinte la plus fréquente dans notre série et présente elle aussi une haute production du NO, contrairement aux autres groupes avec des manifestations neurologiques, rhumatologiques, le NO était plus bas et une corrélation non significative a été observée, peu d'études ont été réalisées dans ce contexte ce qui nous a pas permis de comparer nos résultats avec ceux de la littérature.

Le NO est un radical libre qui joue un rôle important dans plusieurs processus biologiques, Il est synthétisé par les iNOS qui se trouve principalement dans cellules immunitaires, notamment les macrophages et cellules dérivées des macrophages. Dans le lupus érythémateux systémique (LES), il existe des preuves à l'appui de l'idée que la surproduction de radicaux libres en l'absence d'infection conduit à une rupture de la tolérance immunitaire, lésions tissulaires et altération de la fonction enzymatique. Les intermédiaires réactifs d'oxygène et d'azote (RONI) jouent un rôle important dans les processus de signalisation cellulaire lorsque pro-réduit à de faibles niveaux. A des niveaux plus élevés, ces molécules peuvent provoquer une toxicité directe pour les cellules et induire des modifications aux lipides, acides aminés, ARN et ADN (J-Oates et G-Gilkeson.,2007).

Le NO a différentes actions pro-inflammatoires qui conduisent aux lésions tissulaires et inflammatoires chroniques en raison de son implication dans plusieurs fonctions cellulaires, il peut conduire à la survenue d'une mutation génétique via la désamination de la cytosine, il peut aussi conduire à une diminution de la phosphorylation oxydative en raison de l'inhibition enzymatique du cluster fer-soufre mitochondrial.

Le peroxynitrite, un des produits stables du NO est plus réactif et plus toxique que le NO, il imprègne les membranes pour attaquer les compartiments cellulaires et l'acide nucléique dans les cellules menant à des lésions cellulaires, Il peut aussi induire l'apoptose via cytochrome-C en activation des caspases de ce fait les cellules apoptotiques circulantes peuvent conduire à une accumulation d'auto-anticorps au cours du LES, De plus, ONOO<sup>-</sup> peut également jouer un rôle dans l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que la protéine activatrice-1 (AP-1) et nucléaire facteur-kappa B (NF-κB).

## ***Conclusion et perspectives***

## *Conclusion et perspectives*

Le lupus érythémateux systémique est une maladie inflammatoire chronique rattachée au groupe des maladies auto-immunes. Sa physiopathologie est encore à l'heure actuelle mal connue même si de nombreux progrès ont été faits grâce à la biologie moléculaire et à l'immunologie. Le NO joue un rôle important et complexe dans la réponse immunitaire au cours de la maladie lupique.

Notre étude a été menée dans le but de réaliser une étude prospective descriptive sur la production du NO chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique.

Nos travaux ont révélé des résultats de notre série d'étude qui sont en excellent accord avec les données décrites par de nombreuses séries de la littérature :

Sur le plan épidémiologique notre série a attesté de l'habituelle prédominance féminine avec un sex-ratio Hommes /Femmes des plus faibles (0,15) avec un pourcentage de 86,67% des femmes. Un maximum de fréquences a été observé dans la tranche d'âge comprise entre 30 et 45 ans.

Au regard de nos résultats, nous avons montré qu'il existe une corrélation significative entre le taux de nitrites totaux et la maladie lupique, la production massive du NO chez les patients lupiques étaient clairement détectée par rapport aux témoins qui avaient des taux plus bas, par contre aucune différence significative n'a été observé entre les quantités de NO produites chez les patients des deux sexe (femme et homme) ou chez les différentes tranches d'âge.

Dans un autre volet, en voulant rechercher une relation entre le taux de nitrite élevé et l'activité de la maladie chez les patients lupiques et étant donné qu'il est produit en grandes concentrations chez les patients en poussées contrairement aux patients en rémissions. Une corrélation positive a été conclue ce qui signifie que le NO semble avoir une implication dans la progression et la sévérité de la maladie lupique.

De plus, afin de déterminer la contribution du NO dans l'apparitions de certaines manifestations cliniques, nous avons évalué sa concentration au cours des différentes manifestations cliniques chez nos patients, nos résultats ont montré que les patients souffrants des manifestations néphrologiques présentent les taux de NO les plus élevée ainsi ceux qui ont des manifestation cutanéomuqueuses, par contre les patients souffrant des manifestations rhumatologique et

neurologique avaient des taux plus bas, Les effets du NO dépendent donc de sa concentration. L'augmentation de la production de NO joue un rôle important rôle dans la pathogenèse du LES. D'après nos résultats, l'implication du NO dans la maladie de lupus est claire et elle affirme les recherches déjà faites dans le même contexte. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les propriétés cellulaires et moléculaires et les mécanismes par lesquels le NO régule les cellules immunitaires et leurs fonctions. Ainsi l'inhibition de la iNOS peut représenter une nouvelle approche dans le traitement des maladies auto-immunes chroniques notamment le lupus érythémateux systémique.

# **Références bibliographiques**



## B

- Besnier, E., Delile, E., Coquerel, D., & Tamion, F. (2015). Les voies du monoxyde d'azote dans le sepsis. *Réanimation*, 24(2), 191-200.
- Blibek, K. (2009). *Etude de la modulation de la NO synthase 2 par l'extrait de pépins de raisin, au cours de l'hydatidose humaine: Impact sur la production du monoxyde d'azote (NO)* (Doctoral dissertation, USTHB, Alger, Algérie).
- Belkhelfa, M. (2009). *Rôles des cytokines Th1 et de la NO synthase (NOS2) dans les désordres immunitaires associés à la maladie d'Alzheimer et mise au point d'un biomarqueur pathogénique* (Doctoral dissertation, Alger).
- Belguendouz, H. (2005). *Implication des auto-antigènes rétinien dans la production, in vivo et in vitro des interleukines 8 et 12 et du monoxyde d'azote au cours des uvéites Behçet et des uvéites idiopathiques* (Doctoral dissertation).
- Besson, C. (2013). *Le lupus érythémateux systémique: actualités sur la physiopathologie et les traitements* (Doctoral dissertation, Thèse de Pharmacie, Université de Clermont I).
- Bouatba, L., Bachir, H., Ammouri, W., Maamar, M., Harmouche, H., Adnaoui, M., & Mezalek, Z. T. (2014). Lupus érythémateux systémique au Maroc: étude analytique monocentrique de 440 patients. *La Revue de Médecine Interne*, 35, A142-A143.
- BELFATMI, M. (2008). *Lupus erythemateux systemique et amyotrophie spinale chez l'enfant* (Doctoral dissertation).
- Belmont, H. M., Levartovsky, D., Goel, A., Amin, A., Giorno, R., Rediske, J., & Abramson, S. B. (1997). Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 40(10), 1810-1816.
- Buxeraud, J. (2016). Le lupus érythémateux systémique. *Actualités*
- Boussetta, N., Guediche, N. H., Arfaoui, B., Ajili, F., Abdelhafidh, N. B., Sayhi, S., & Louzir, B. (2021). Cœur et lupus en feedback. *La Revue de Médecine Interne*, 42, A102-A103.

- Bader-Meunier, B., Quartier, P., Deschênes, G., Cochat, P., Haddad, E., Koné-Paut, I., ... & Lévy, M. (2003). Le lupus érythémateux disséminé de l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 10(2), 147-157.
- Bergereau, E. (2010). *Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC: influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

## C

- Chinbo, M., Choukai, W., Anwar, W., & Souhaili, Z. Rôle du monoxyde d'azote dans l'athérosclérose.
- Contin-Bordes, C., Lazaro, E., Pellegrin, J. L., Viallard, J. F., Moreau, J. F., & Blanco, P. (2009). Lupus érythémateux systémique: de la physiopathologie au traitement. *La Revue de médecine interne*, 30(12), H9-H13.
- Chizzolini, C., Cohen, C. D., Eisenberger, U., Hauser, T., Hunziker, T., Leimgruber, A., ... & Trendelenburg, M. (2009). Création d'une cohorte suisse de patients lupiques: The Swiss systemic lupus erythematosus cohort study (SSCS). *Revue médicale suisse*, 5(199), 808-811.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., & Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 1317-1330.

## D

- Dumas, M. C. (2007). Rôle du monoxyde d'azote lors d'une pneumonie à pneumocoque. Effet bénéfique du nitroprusside de sodium.
- DA-RIZ, V., & GUILLARD, A. S. (2000). Nitrites et nitrates dans les produits alimentaires: le point sur la normalisation. *Bull. Liaison CTSCCV Vol*, 10(6).
- D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*2007 ; 369:587–96.
- de Lacroix-Szmania, I., Cacoub, P., Fremaux-Bacchi, V., Weiss, L., Kahn, M. F., Godeau, P., & Piette, J. C. (1996). @ ðeme angioneurotique acquis au cours du lupus. *La Revue de médecine interne*, (17), 376s.

## F

- Francès, C., Barète, S., & Piette, J. C. (2008). Manifestations dermatologiques du lupus. *La Revue de médecine interne*, 29(9), 701-709.

## G

- Grand, F., Guitton, J., & Goudable, J. (2001, October). Optimisation des paramètres du dosage des nitrites et nitrates sériques par la technique de Griess. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 59, No. 5, pp. 559-65).

- Guendouzi, Y. (2011). Contribution à l'étude de l'impact de la pollution chimique sur l'herbier a Posidonie dans la baie d'Alger.

- Guevara, J. P., Clark, B. J., & Athreya, B. H. (2001). Point prevalence of cardiac abnormalities in children with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 28(4), 854-859.

- Gilkeson, G., Cannon, C., Oates, J., Reilly, C., Goldman, D., & Petri, M. (1999). Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *The Journal of rheumatology*, 26(2), 318-324.

- GORAN-KOUACOU, A. P. V., ADOU, A., YEBOAH, O., BIGOT, C., SIRANSY, K., & HIEN, S. (2016). PRÉVALENCE DES FACTEURS ANTINUCLÉAIRES ET DES ANTICORPS ANTI-ADN NATIF CHEZ DES SUJETS PRÉSENTANT DES MANIFESTATIONS DU LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE. *Revue Bio-Africa-N*, 15, 51-57.

- Guéry, J. C. (2019). Pourquoi le lupus est-il plus fréquent chez les femmes?.

## H

- Hachfi, W., Laurichesse, J. J., Chauveheid, M. P., Houhou, N., Bonnet, D., Longuet, P., & Leport, C. (2011). Infection aiguë à cytomégalo virus révélatrice d'un lupus érythémateux systémique. *La Revue de médecine interne*, 32(1), e6-e8.

- Hochberg, M. C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 40(9), 1725-1725.

## **J**

- Janko, C., Munoz, L., Chaurio, R., Maueröder, C., Berens, C., Lauber, K., & Herrmann, M. (2013). Navigation to the graveyard-induction of various pathways of necrosis and their classification by flow cytometry. In *Necrosis* (pp. 3-15). Humana Press, Totowa, NJ.

## **K**

- Kowal, C., DeGiorgio, L. A., Lee, J. Y., Edgar, M. A., Huerta, P. T., Volpe, B. T., & Diamond, B. (2006). Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19854-19859.

- Karras, A., & Martinez, F. (2005). Rein et lupus: données récentes. *Revue du rhumatisme* (Ed. française), 72(2), 162-167.

## **L**

- Lemieux, J. (2016). Étude du profil des populations cellulaires du sang en vue d'une application au diagnostic du lupus érythémateux disséminé.

- Lemieux, J. (2016). Étude du profil des populations cellulaires du sang en vue d'une application au diagnostic du lupus érythémateux disséminé, Maîtrise en microbiologie, université LAVAL, Québec, Canada, p7

- Lee SS., Kim YA (2001). Correlation of Serum Nitric Oxide Levels and Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus. *Korean Association of Medical Journal Editors. Chonnam Med J.* 2001 Jun;37(2):119-123.

## **M**

- MARCHAND-LEROUX, P. C. (2008). *Étude du mécanisme des NO synthases: importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème* (Doctoral dissertation, UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES).

- Mathian, A., Arnaud, L., & Amoura, Z. (2014). Physiopathologie du lupus systémique: le point en 2014. *La Revue de médecine interne*, 35(8), 503-511.

- Moncan, M. (2019). *Pathophysiologie des défauts génétiques du Lupus Erythémateux disséminé pédiatrique: implications du stress du réticulum endoplasmique et de la voie PI3K dans le développement de l'auto-immunité* (Doctoral dissertation, Sorbonne Paris Cité).
- Medour, N. (2007). *Implication des auto-antigènes rétinien dans la production du monoxyde d'azote au cours de la maladie de behçet* (Doctoral dissertation).
- Meyer, O. (2005). Lupus érythémateux systémique. *EMC-Rhumatologie-Orthopédie*, 2(1), 1-32.
- Madrane, S., & Ribi, C. (2012). Atteintes neurologiques centrales du lupus érythémateux systémique. *Rev Med Suisse*, 8(337), 848-53.
- Marchetti, P. (2005). L'apoptose: bases fondamentales et applications médicales. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 33(9), 632-641.
- Mouriès-Martin, S., Mathian, A., Devilliers, H., Aubart, F. C., Hie, M., Haroche, J., ... & Amoura, Z. (2018). Surveillance biologique au cours du Lupus Systémique: le dosage sérique d'interféron alpha chez les malades en rémission est prédictif du risque de poussée lupique dans l'année. *La Revue de Médecine Interne*, 39, A59-A60.

## N

- Nares, E. M., Iñiguez, A. L., & Mercado, H. O. (2015). Poussée de lupus érythémateux systémique déclenchée par une morsure d'araignée. *Revue du Rhumatisme*, 82(6), 416-419.
- Nagata, S. (2010). Apoptosis and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209(1), 10-16.

## O

- Oates, J. C., & Gilkeson, G. S. (2007). Nitric Oxide in Systemic Lupus Erythematosus. *Systemic Lupus Erythematosus: A Companion to Rheumatology*, 301.
- Oates, J. C., Shaftman, S. R., Self, S. E., & Gilkeson, G. S. (2008). Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis & Rheumatism*, 58(1), 263-272.

## P

- Piette, J. C., Amoura, Z., & Francès, C. (2003). Lupus érythémateux systémique-Syndrome des anti-phospholipides. *Rev Prat*, 53, 2175-2182.

- Pan, L., Yang, S., Wang, J., Xu, M., Wang, S., & Yi, H. (2020). Inducible nitric oxide synthase and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *BMC immunology*, 21(1), 1-10.

## R

- Raimbourg, Q., & Daugas, É. (2019). Atteintes rénales du lupus. *Néphrologie & Thérapeutique*, 15(3), 174-189.

- Roldan, J. F., & Brey, R. L. (2007). Neurologic manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Current rheumatology reports*, 9(2), 109-115.

## S

- Sennequier, N., & Vadon-Le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *MS. Médecine sciences*, 14(11), 1185-1195.

- Sélo-Carreau, A. (2010). *Rôle du monoxyde d'azote dans la reconnaissance cellulaire: étude d'un modèle endothélial lié au mélanome* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).

- Seror, R. (2012). Évaluation thérapeutique dans le lupus érythémateux systémique. *Lupus érythémateux*, 209-221.

- Ségal-Bendirdjian, E. (1999). Mort cellulaire: signalisation et exécution de l'apoptose. *Hématologie*, 5(5), 376-87.

## T

- Tadie, J. M. (2010). *Rôles clinico-biologiques du monoxyde d'azote produit par les voies aériennes* (Doctoral dissertation, Université Paris-Est).

## U

Uderhardt, S., Herrmann, M., Oskolkova, O. V., Aschermann, S., Bicker, W., Ipseiz, N., ... & Krönke, G. (2012). 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity*, 36(5), 834-846.

## W

- WEILL B et BATTEUX F. (2010). HAS / Service des maladies chroniques et dispositifs d'accompagnement des malades. 17-18.

- Wanchu, A., Khullar, M., Deodhar, S. D., Bamberg, P., & Sud, A. (1998). Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*, 18(2), 41-43.

## **Z**

-ZEGGANE, L. (2017). *Mise en évidence de la sérum albumine dans les kystes hydatiques: rôle potentiel dans la chronicité* (Doctoral dissertation, Université de Bouira).

## Résumé

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique caractérisé par un aspect clinique est très polymorphe et dont l'origine est multigénique, La physiopathologie de la maladie implique des dysfonctionnements immunitaires cellulaires et moléculaires. Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule produite par les iNOS, joue un rôle central dans de nombreux processus, elle devient pathologique quand elle est produite a des grandes quantités, Dans cette présente mémoire, nous avons étudié le taux de production du NO chez les patients atteints du LES et ce en fonction de plusieurs critères, nous avons observé prédominance féminine avec un sexe ratio de 0.15 et une haute fréquence (47%) chez les personnes appartenant à la tranche d'âge de [30 - 45 ans]. La comparaison globale des taux des nitrites totaux mesurés a montré une corrélation significative ( $p = 0,0003$ ) du NO chez les patients lupiques hommes et femmes dans toutes les tranches d'âges par rapport aux contrôles, avec une corrélation, Nos résultats ont montré aussi que les patients en poussées avaient des concentrations plus élevées du NO que les patients en rémission ( $p=0.0012$ ) ce qui confirme la relation entre l'activité de la maladie et la production du NO, les patients souffrants des manifestations néphrologiques présentent les taux de NO les plus élevée (avoisnant les  $300\mu\text{mol/l}$ ) indiquant de ce fait son implication dans la pathogenèse du LES et sa contribution dans l'apparitions de certains manifestations.

**Mots clés :** Le lupus érythémateux systémique (LES), monoxyde d'azote (NO), la NO synthase inductible (iNOS)

## ملخص

الذئبة الحمامية الجهازية هي مرض مناعي ذاتي يتميز بظهور أعراض سريرية متعدد الأشكال وتعود أسباب هذا المرض إلى حدوث خلل على مستوى المناعة الخلوية والجزيئية للجسم، مصدر المرض غير معروف و لكن يرجح أنه للعوامل الجينية والعوامل البيئية دور كبير في ظهوره.. أكسيد النيتريك (NO) هو جزيء تنتجه انزيمات تدعى iNOS ، ويلعب دورًا مركزيًا في العديد من الوظائف الحيوية للجسم ، ويصبح مرضيًا عند إنتاجه بكميات كبيرة، في هذه الدراسة ، درسنا معدل إنتاج أكسيد النيتريك عند المرضى الذين يعانون من مرض الذئبة الحمراء وهذا وفقًا لعدة معايير ، لاحظنا ان الإناث أكثر عرضة للإصابة بنسبة 0.15 بين الجنسين وان اغلب المرضى ينتمون إلى الفئة العمرية. [30-45 سنة] بنسبة (47%). كما أظهرت المقارنة الإجمالية لمستويات النترت المفرزة عند مرضى الذئبة الحمراء أن هناك تباين في كمية الـ NO المفرزة ( $p = 0.0003$ ) مقارنةً بالأشخاص السليمين ، بينما لا يوجد اختلاف في تركيز هذه الأخيرة بين الذكور والإناث و في جميع الفئات العمرية. أظهرت نتائجنا أيضًا أن المرضى في حالة انتكاسة لديهم تركيزات أعلى من NO مقارنة بالمرضى في حالة استقرار ( $P = 0.0012$ ) مما يؤكد العلاقة بين نشاط المرض وإنتاج NO. بالإضافة إلى أن المرضى الذين يعانون من أعراض الكلى لديهم أعلى مستويات NO (حوالي 300 ميكرومولتر / لتر) ، مما يشير إلى علاقة هذا الأخير في التسبب في مرض الذئبة الحمراء ومساهمة في ظهور بعض المظاهر.

**الكلمات المفتاحية:** الذئبة الحمامية الجهازية، أكسيد النيتريك، انزيمات iNOS

## Abstract

Systemic lupus erythematosus is a systemic autoimmune disease characterized by a clinical appearance, highly polymorphic and multigenic in origin. The pathophysiology of the disease involves cellular and molecular immune dysfunctions. Nitric oxide (NO) is a molecule produced by iNOS, plays a central role in many processes, it becomes pathological when it is produced in large quantities, In this present thesis we have studied the rate of production of NO in patients with SLE and this according to several criteria, we observed female predominance with a sex ratio of 0.15 and a high frequency (47%) in people belonging to the age group of [30 - 45 years ]. The global comparison of the total nitrite levels measured showed a significant correlation ( $p = 0.0003$ ) of NO in male and female SLE patients in all age groups compared to the controls, with a correlation, Our results showed also that the patients in relapses had higher concentrations of NO than the patients in remission ( $p = 0.0012$ ) which confirms the relation between the activity of the disease and the production of NO, the patients suffering from the nephrological manifestations present the levels of the highest NO (around  $300 \mu\text{mol / l}$ ) indicating its involvement in the pathogenesis of SLE and its contribution to the appearance of certain manifestations.

**Keywords :** Systemic lupus erythematosus (SLE), Nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS)



# ***ANNEXES***

# FICHE D'EXPLOITATION

Date : ...../...../2021

N° d'identification : .....

Nom : .....

Prénom : .....

Sexe : ☐ Homme ☐ Femme

Age : .....

Willaya d'origine : .....

Num de tel: .....

CHU : .....

Service : .....

☐ Hospitalisé

☐ externe

Début de symptomatologie : .....

## I- Signes généraux

☐ Fièvre

☐ amaigrissement

☐ asthénie

☐ anorexie

**1- Manifestations cutané-muqueuses**----- ☐ oui ☐ non

☐ Lésions lupiques

☐ Lésions vasculaires

**Manifestations rhumatologiques**----- ☐ oui ☐ non

☐ Articulaires (arthralgies, arthrite)

☐ Musculaires (myalgie, myosite)

**2- Manifestations rénales**----- ☐ oui ☐ non

☐ Œdèmes

☐ signes neurosensoriels d'HTA

☐ hématurie

**3- Manifestations neurologiques**----- ☐ oui ☐ non

☐ Migraines

☐ Crises comitiales

☐ chorée

☐ désordres psychiques

☐ atteinte des nerfs crâniens

**4- Manifestations cardiaques**----- ☐ oui ☐ non

☐ Péricardite

☐ myocardite

☐ endocardite

☐ insuffisance coronarienne

**5- Manifestations respiratoires** ----- ☐ oui ☐ non

☐ Toux

☐ hémoptysie

☐ dyspnée

Autres : .....

**6- Autres manifestations**

☐ Vasculaires

☐ digestives

☐ ophtalmiques

☐ hépatiques

## II- Para-clinique

**1- Bilan inflammatoire**

- VS : ☐ normale

☐ augmentée

- CRP : ☐ normale

☐ augmentée

- Taux de fibrinogène :

☐ normal

☐ augmenté

☐ non précisé

- Complément :

☐ normal

☐ diminution C3

☐ diminution C4

**2- Bilan immunologique**

AAN : ☐ négatifs

☐ positifs

taux : .....

Aspect IF indirecte :

☐ homogène

☐ périphérique

☐ moucheté

Anti ADN natifs :

☐ négatifs

☐ positifs,

taux : .....

Autres AAN identifiés : .....

Ac antiphospholipides : ☐ négatifs ☐ présents ☐ non précisé

### III- Antécédents

1) Personnels : .....

Autre maladie auto-immunes associés : .....

2) familiaux : - antécédent de lupus : ☐ oui ☐ non

-Autre maladie auto immune : .....

### IV- Traitement :

- Traitement proposé : .....

- Début de prise : .....

- Résultats : ☐ Rémission complète ☐ Rémission partielle ☐ aggravation

### V- Activité de la maladie : .....

### VI- COVID19

- Présence des symptômes ou des signes de Coronavirus (COVID-19)

☐ Oui ☐ Non

- Lesquelles parmi ces symptômes

☐ Fièvre ☐ maux de tête ☐ courbatures ☐ la toux ☐ diarrhées

☐ douleurs au ventre ☐ maux de gorge ☐ nez qui coule ☐ la fatigue

☐ Une perte de l'odorat ou du goût

☐ insuffisances respiratoires (difficultés importantes à respirer, essoufflements)

- Combien de temps ont duré les symptômes ?

Approximativement.....

- Test sérologique : ☐ positif ☐ négative ☐ non précisé

- RT-PCR : ☐ positif ☐ négative ☐ non précisé

- Autres analyses : .....

- Avez-vous consulté un médecin ou été hospitalisé suite au COVID19 ?

Oui, j'ai consulté un médecin ☐ Oui, j'ai été hospitalisé(e) ☐ Non ☐

- Avez-vous encore aujourd'hui ces symptômes ou signes de la maladie ?

☐ Non ☐ Oui : .....

Autres observations

.....

## **Critères de classification ACR 1982, mis à jour en 1997**

### **Critères de classification du lupus érythémateux systémique (LES)**

**Proposés par l'American College of Rheumatology (ACR) en 1982 et mis à jour par l'ACR en 1997.**

1. Rash malaire
2. Lupus discoïde
3. Photosensibilité
4. Ulcérations orales ou nasopharyngées
5. Arthrites non érosives touchant au moins 2 articulations périphériques, caractérisées par une douleur, un gonflement ou un épanchement
6. Pleurésie ou péricardite
7. Protéinurie persistante > 0,5 g/jour ou cylindrurie
8. Convulsions ou psychose (en l'absence de cause médicamenteuse ou métabolique)
9. Atteinte hématologique :
  - Anémie hémolytique, ou
  - Leucopénie < 4 000/ $\mu$ l constatée à 2 reprises, ou
  - Lymphopénie < 1 500/ $\mu$ l constatée à 2 reprises, ou
  - Thrombopénie < 100 000/ $\mu$ l, en l'absence de drogues cytopéniantes
10. Titre anormal d'anticorps antinucléaires par immunofluorescence (en l'absence de drogues inductrices)
11. Perturbations immunologiques :
  - Titre anormal d'anticorps anti-ADN natif, anticorps anti-Sm, ou présence d'anticorps antiphospholipides : sérologie syphilitique dissociée constatée à 2 reprises en 6 mois ou anticoagulant circulant de type lupique ou titre anormal d'anticorps anticardioline en IgG ou IgM

La présence d'au moins 4 des 11 critères « de classification » proposés par l'ACR permet d'affirmer l'existence d'un LS avec une sensibilité et une spécificité de 96 %.

Ces critères, qui surreprésentent les items dermatologiques, sont des critères de classification et ne doivent pas être utilisés dans un but diagnostique à l'échelon individuel.