

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 des sciences
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 l'effet des phytohormones d'origine microbienne sur la production du paramètre inflammatoire (NO) produit par les PBMCs des patients atteints de lupus érythémateux

Présenté par :

DOUMI imene Oulkhiari Imane

Soutenu le 20/07/2023 devant le jury composé de :

Mme. BOUKERCHA

MCB-UMBB

Présidente

Mme. YASMAIL Dahlouk

MCB -UMBB

Examinatrice

Mme. GHOZALI. N

MAB -UMBB

Promoteur

Mr. MESSAOUDENE. D

MCB -UMBB

Co-promoteur

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

*Nous souhaitons tout d'abord exprimer notre profonde gratitude envers notre chère promoteur, le **Dr Ghozali Nour El Houda**, pour son soutien inestimable et le temps précieux qu'elle a consacré à la réalisation de notre mémoire de fin d'études. Nous sommes profondément touchées par l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant cette tâche. Votre sérieux, votre sympathie, votre modestie et même votre sens de l'humour en temps de stress ont véritablement impressionné et continueront à nous inspirer. Nous ne saurons jamais vous remercier suffisamment. Nous espérons sincèrement avoir été à la hauteur de votre confiance. Veuillez agréer l'expression de nos sentiments les plus reconnaissants.*

*Nous tenons également à remercier chaleureusement notre enseignante préférée tout au long du cycle master, le **Dr Yesmail Dahlouk Lamia** Son dévouement à son travail est admirable et nous a profondément marquées. Votre personnalité unique, alliant professionnalisme et chaleur humaine, restera à jamais gravée dans nos cœurs. Malgré votre rigueur, vous avez toujours su être bienveillante et encourageante envers vos étudiants. Veuillez accepter l'expression de nos sentiments les plus respectueux*

*Enfin, nous souhaitons exprimer notre gratitude à la présidente de notre jury, le **Dr Boukercha Aziza** ainsi qu'à notre co-promoteur et chef de département de biologie, le **Dr Messaouden Djamel** Leur contribution précieuse et leurs conseils éclairés ont grandement enrichi notre travail.*

*Nous tenons également à remercier madame **Hajdouti Rima** Leur contribution pour réalisation de notre pratique*

En fin, Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de notre mémoire. Nous leur sommes infiniment reconnaissantes.

Dédicace

Du profond de mon cœur je dédie ce modeste travail à tous ce qui me sont chers, Mes parents ; mon très cher père ALI et A l'être le plus cher de ma vie, ma mère FATIMA ,

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer le profondeur des sentiments, d'estime et de respect qui je vous porte, pour l'amour que vous m'avez toujours comblé, pour votre soutien et le sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études,

Vous me donne toujours l'espoir de vivre et vous n'a jamais cassé de prier pour moi , merci pour tout ,que dieu vous garde en bonne santé.

MERCI A LA VIE !

A mes frères et chers sœurs HAMIDA ,DJAMILA et HANAN qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager et tout ma famille

Sans oublier les enfant WAIL, MALEK ,DJAWAD ,DJABER ,AYA et les jumeaux CILIA ;CIDRA

A Toutes personnes avec qui je partage des moments de ma vie au fil du temps, tous mes amis de promotion 2eme année master BPM à qui je souhaite plus de succès

A tout mes amies et surtout
CHAIMA ;FATIMA ;MERIEME,IMENE

Merci pour votre soutien moral et encouragements.

En fin, je remercie ma binôme de travail IMENE d'avoir eu le courage d'achever ce travail, merci de m'avoir apporté tant d'aide. Rien ne pourra me faire oublier les bons moments qu'on a vécu ensemble.

D. Imene

Dédicaces

*Du profond de mon cœur je dédie ce
travail à tous ceux qui me sont chers,*

*A mes parents **MOKHTAR et OUAHIBA** à qui je dois la réussite, pour
l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix
de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard. Vous êtes
l'origine de qui je suis et de ce que je deviens.
MERCI ALAVIE!*

*A mes frères et sœur **AMINE, KHALED, YUCEF** et
ma petite **SARAH** qui ont été toujours à mes côtés pour
me soutenir et m'encourager.*

*A mon adorable et chère grand-mère **AZOUZOU** qui ne m'a
jamais oubliée dans ces prières.
A toute ma famille, en particulier, à mon cher
oncle **FAYCAL** qui a toujours été disponible pour m'aider.*

*A ma tendre amie et compagne de chambre, **MELISSA**, dont la
présence et le soutien infaillibles n'ont jamais fait défaut.*

*A **IMENE**, mon acolyte et amie formidable, qui m'a soutenue tout au
long de cette année pour mener à bien ce travail.*

*A Toutes ces personnes avec qui je partage des moments
de ma vie au fil du
temps, Merci pour votre soutien moral et encouragements.*

Imane . ©

Table des matières

Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : recherche bibliographique	
1. le lupus érythémateux systémique	
I.1.Définition.....	2
I.2.ÉpidémiologieduLES.....	2
I.3.ManifestationscliniquesduLES.....	4
I.4.EtiopathologieduLES.....	5
I.4.1.Les facteurs environnementaux et leur influence.....	6
I.4.2.Les facteurs génétiques.....	8
I.4.3.Les facteurs immunologiques.....	9
I.5.Immunopathologie du LES.....	10
I.5.1.La source d'autoantigène.....	10
I.5.2.Implication de immunité innée et adaptative dans le LES.....	12
I.5.3.Principaux acteurs moléculaires du lupus systémique.....	15
I.6.DiagnosticduLES.....	17
I.7.Traitements du LES.....	18
II. les phytohormones	
II.1.définition	21
II.2.Phytohormones d'origine microbienne.....	21
II.3.Mode action des phytohormones chez les plantes.....	22
II.4.Le rôle des phytohormones chez les plantes.....	22
II.5.Activité biologique des phytohormones sur la physiologie humaine.....	23
Chapitre II : matériel et méthodes	
II .1. Matériels et réactifs	27
II.1.1. Matériels non biologique	27
II.1.2. Réactifs.....	28
II 2. Méthode.....	29
II.2.1. Échantillons et prélèvement sanguin	29
II.2.2. Cultures de lymphocytes mononucléaires du sang périphérique (PBMC).....	30
II.2.3. Mesure de l'oxyde nitrique.....	32
II.2.3.1. principe	32

II.2.3.2. Méthodes.....	33
-------------------------	----

Chapitre III: résultats et discussions

III.1.Résultats.....	34
III.1. 1.Description de la population.....	34
III.1.2. Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production de NO chez les témoins sains et les patients atteints du lupus.....	35
III.1.3. Effet du traitement à l'Acide gibbérellique et les Phytohormones d'origine bactériennes sur les femmes et les hommes.....	36
III.1.4. La production in-vitro du NO après le traitement par l'Acide gibbérellique au cours de stade actif et de rémission du lupus.....	40
III.1.5. La production in-vitro du NO après le traitement par phytohormones origine bactériennes au cours de stade actif et de rémission du lupus.....	41
III.1.6. étude de corrélation entre les doses Effet de l'acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production de NO chez les patients atteints du lupus.....	42
III.2. discussions	43

Chapitre IV : Conclusion et perspectives

IV.1.Conclusion.....	46
IV.2. Perspectives.....	46
Références bibliographiques	47
Annexes	
Résumé	

Liste des figures

Figure 1 : incidence du lupus érythémateux disséminé pour l'ensemble de la population par pays.....	03
Figure 2 : prévalence du lupus érythémateux disséminé pour l'ensemble de la population par pays.....	04
Figure 3 : les étapes d'apparition du lupus.....	09
Figure 4 : Le cercle vicieux du LED	11
Figure 5 : implication des récepteurs de reconnaissance des formes dans l'immunité innée du lupus.....	13
Figure 6 : les combinaisons extrêmement complexes associées à des anomalies phénotypiques et fonctionnelles du système immunitaire, inné et adaptatif, participent en synergie au développement du LED.....	17
Figure7 : Les hormones végétales permettent à la santé végétale et humaine d'être interconnectées.....	25
Figure 8: mécanisme moléculaire du MeJA sur l'inflammation.....	26
Figure 9: L'activité du SL dans les cellules humaines et leur potentiel en médecine.....	27
Figure 10: Protocole de séparation du sang par gradient de Ficoll.....	30
Figure 11 : Culture des PBMCs.....	31
Figure 12 : Présentation de protocole de séparation des PBMC.....	32
Figure 13 : Courbe étalon des nitrites résiduels NO ₂	33
Figure 14: Répartition des patients selon le sexe.....	34
Figure15 : Répartition des patients selon la phase de la maladie.....	34
Figure16 : Effet de l'Acide gibbérélique et les phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des témoins sains.....	35
Figure 17: Effet de l'Acide gibbérélique et les phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des patients atteints de LES.....	36
Figure 18: Effet de l'Acide gibbérélique et des phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des patients de sexe masculin (A) et féminin (B) atteints de LES.....	38
Figure 19: Effet de l'Acide gibbérélique (A) et les phytohormones 'B) sur la production de NO par les PBMCs des hommes et des femmes.....	39
Figure 20: Effet de l'Acide gibbérélique sur la production de NO par les PBMCs des patients en phase active et en rémission.....	40
Figure 21: Effet de phytohormones origine bactériennes sur la production de NO par les PBMCs des patients en phase active et en rémission.....	41
Figure 22: Effet de diverses concentrations de l'acide gibbérélique (A) et les phytohormones d'origine bactériennes (B) sur la production du NO par les PBMC des patients atteints du lupus	42

Liste des abréviations

Ac : Anti-corps

ACR : *American College of Rheumatology*

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

ARN : Acide ribonucléique

BLYs : *B lymphocyte stimulateur facteur*

C1q : Complément 1q

CD : Cellule Dendritique

CD40L : Ligant CD40

CI : complexes immuns

CMH : Complexes majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

EBV : Epstein Barr Virus

GC : Glucocorticoïdes

IFN- γ : *Interféron gamma*

LPS : Lipopolysaccharides

IL-1 : Interleukine-1

IL-10 : Interleukine-10

IL-4 : Interleukine-4

IL-6 : Interleukine-6

JAK3 : Janus kinase3

JAK2 : Janus kinase2

LB : Lymphocyte B

L T: Lymphocyte T

LE : Lupus Erythémateux

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LES : Lupus érythémateux systémique

MAI : Maladie Auto-Immune

NETs : *Neutrophile extracellulaire traps*

NF-KB : *Nuclear factor-kappaB*

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Monoxyde d'azote synthase

STAT : *Signal transducer and activator of transcription 8*

TGF- β : Facteur de croissance transformant beta

Th : Lymphocyte T Helper

Th17: Lymphocyte helper 17

Th17: Lymphocyte helper 17

Th2: Lymphocyte helper 2

Th2: Lymphocyte helper 2

TNF- α : Les facteurs de nécrose tumorale

Treg : Cellule régulatrice T

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cells*

NLR (*NOD-like receptors*) : protéines de répétition riches en leucine (NLR)

RLR : *RIG-I like receptor*

TLR : *TOLL likereceptor*

OX-40 : *tumornecrosis factor (TNF) receptor*

OX40L :OX40 ligand

HLA :antigène de leucocyte humain

mDC : cellule dendritique myéloïde

pDC: cellule dendritique plasmacytoïde

AIA Acide indole 3-acétique

A. Gibbé : acide gibbérellique

PhytoH : phytohormones

PGPR :*Plant-Growth-PromotingRhizobacteria*

AN :antigène

IRF7 :Le facteur de régulation de l'interféron 7

ACR :*American College of Radiology*

SLICC :*Systemic Lupus International Clinics*

MAPK :*Mitogen-activatedprotein kinase*

LPS :lipopolysaccharides

GA-13315 :*Gibberellinderivative*

Introduction

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune d'envergure mondiale, considérée comme un paradigme de l'immunopathologie et une représentation typique des maladies auto-immunes chroniques où le système immunitaire attaque et détruit les cellules de l'organisme, classée parmi les maladies du tissu conjonctif et caractérisée par une production excessive d'auto-anticorps et de complexes immuns pouvant se déposer dans divers organes cibles. Ces dépôts de complexes immuns entraînent une inflammation et des lésions tissulaires responsables de la variabilité clinique de la maladie.

Cette polymorphie clinique rend nécessaire une exploration biologique pour établir de nouveaux traitements. Les investigations immunologiques sont d'une grande utilité car elles permettent la détection et la quantification des marqueurs inflammatoires associés à cette maladie, dans le sérum, le monoxyde d'azote (NO), relie les différentes formes cliniques de cette maladie, ce qui nécessite une escalade thérapeutique avec l'introduction de traitements anti-inflammatoires de préférence d'origine biologique et non synthétique pour éviter tout effet secondaire non désiré.

Plusieurs études récentes ont montré le rôle des phytohormones pour réduire les complications de nombreuses maladies, par leurs propriétés bioactives et constitue donc une voie de recherche importante, cela nous a encouragés à tester son efficacité.

Notre étude vise à explorer et évaluer l'effet d'un complexe de phytohormones d'origine bactérienne et leur potentiel pouvoir modulateur/réducteur des niveaux de production de NO par les PBMCs chez les patients atteints de LES, ainsi qu'à comparer leur effet avec celui des phytohormones (Acide Gibbérellique) issues des plantes.

Chapitre 1
Recherche bibliographique

1. Le lupus érythémateux systémique

1.1. Définition

Le lupus érythémateux systémique (LES) appelé aussi lupus érythémateux disséminé (LED), c'est une maladie inflammatoire du tissu conjonctif, et auto-immune chronique extrêmement variées et une pathogénie complexe caractérisée par la production d'auto-anticorps et de dépôt de complexes immuns, Causée par une perte de tolérance aux antigènes nucléaires endogènes déclenchant une réponse auto-immune aberrante ciblant divers tissu. (Briggs *et al.*, 2017).

Le LED affecte principalement les femmes en âge de procréer et présente un large éventail de manifestations cliniques qui affectent plusieurs organes et notamment la peau, les reins, les articulations, les poumons et le système nerveux, Environ 50 % des cas de LED auront des complications graves et potentiellement mortelles telles que néphrite, vascularite, hypertension pulmonaire, trouble pulmonaire interstitiel et accident vasculaire cérébral.

Le mot lupus (terme latin pour le loup) a été utilisé indistinctement depuis le Moyen Âge pour plusieurs types de maladies caractérisées par des lésions ulcéreuses, principalement dans les membres inférieurs. Au milieu du 18ème siècle en 1833, le dermatologue français Cazenave a mentionné pour la première fois le terme « lupus érythémateux », En 1872 Kaposi subdivisa le lupus en formes discoïde et systémique et introduisit le concept de maladie systémique avec une issue potentiellement fatale en 1957 la découverte de l'existence des anticorps anti ADN natif par SELEGMAN (Pan *et al.*., 2018).

Il existe quatre principaux types de lupus: le lupus néonatal et pédiatrique, le lupus érythémateux discoïde, le lupus induit par les médicaments et le lupus érythémateux disséminé (LED,).

La néphrite lupique (LN) est la manifestation la plus grave du LES et se caractérise par une inflammation des reins (Mathian *et al.*, 2014).

1.2. Épidémiologie du LES

Le lupus affecterait plus de 5 millions de personnes dans le monde et entre 15 000 à 20 000 en Algérie, 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 (Moncan *et al.*., 2019 ;

raimbou *et al.* ,2019) la maladie est plus fréquente chez les femmes adultes pendant la période de reproduction, environ 10:1 par rapport aux hommes. L'âge de début se situe entre 16 et 45 ans. Le lupus pédiatrique dans 10 à 15 % des cas et est plus sévère avec des atteintes rénales fréquentes (**Afrashteh et al., 2023**).

l'incidence globale du LES varie en fonctions des ethnies de 1,5 à 11 pour 100 000 personnes-années, et la prévalence mondiale varie de 13 à 7713,5 pour 100000 individus Semblable aux études précédentes étude épidémiologiques. L'augmentation de la prévalence peut être liée à une augmentation des facteurs de risques du LES (**Arnaud et al., 2021**).

L'incidence du LES différait grandement d'un pays à l'autre. En ce qui concerne la population générale, les quatre premiers pays avec les estimations les plus élevées de l'incidence du LES étaient la Pologne (81,84, 80,33 à 83,51 pour 100 000 personnes-années), les États-Unis (12.13, 11.94 pour 12h35 par 100 000 années-personnes), Barbade (10.37, 2.01 à36,46 pour 100 000 années-personnes) et la Chine (8.57,8,37 à 8,77 pour 100 000 années-personnes). En revanche, le Kazakhstan était le pays avec l'incidence la plus faible au monde (0,57, 0,17 à 1,24 pour 100 000 personnes-années).

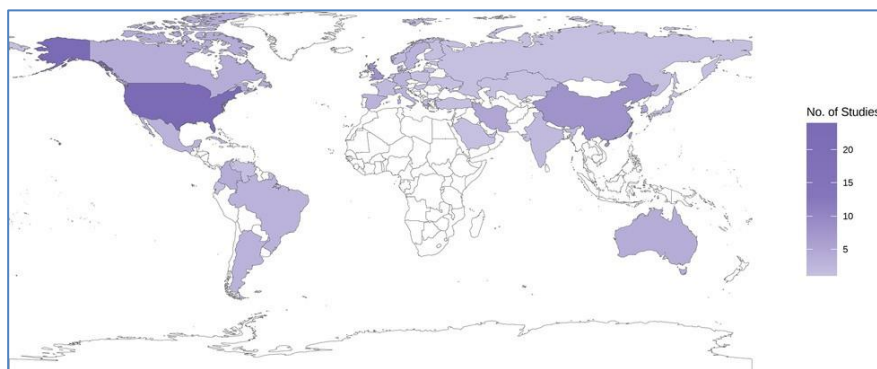


Figure 1 : incidence du lupus érythémateux disséminé pour l'ensemble de la population par pays. (**Arnaud et al., 2021**)

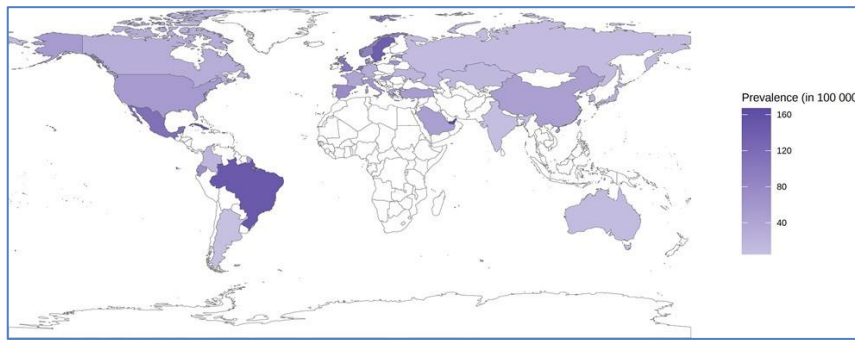


Figure 2 : prévalence du lupus érythémateux disséminé pour l'ensemble de la population par pays. (Arnaud *et al.*, 2021)

1.3 .Manifestations cliniques du LES

Le lupus érythémateux disséminé (LES) est une maladie auto-immune hétérogène avec un large éventail de manifestations cliniques et sérologiques qui peuvent affecter pratiquement n'importe quel organe. L'évolution de la maladie est souvent marquée par des rémissions et des rechutes et peut varier de légère à sévère.

Les symptômes constitutionnels du lupus érythémateux disséminé (LED) comprennent en général la fatigue, la fièvre, les douleurs musculaires et les changements de poids.

I.3.1. Arthrite et arthralgies

L'arthrite et les arthralgies surviennent chez plus de 90 % des patients atteints de LED et sont souvent l'une des premières manifestations. L'arthrite, avec une inflammation démontrable, survient chez 65 à 70 % des patients et a tendance à être migratrice, polyarticulaire et symétrique (Mahmoud *et al.* ,2017)

I.3.2. Atteinte cutanéomuqueuse

Il existe une énorme variabilité dans le type d'atteinte cutanée dans le LES. La lésion la plus fréquente est une éruption faciale (appelé aussi "l'éruption du papillon") qui se répartit sur les joues et le nez et apparaît après une exposition au soleil (Achtman *et al.* , 2015).

De nombreux patients développent des ulcères buccaux et/ou nasaux, et même des alopecies

I.3.3. Atteinte cardiaque

La maladie cardiaque est fréquente chez ces patients et peut se manifester par des inflammation, de plus, des problèmes vasculaires tels que la vascularite et les maladies

thromboemboliques peuvent compliquer le LED, en particulier en présence d'anticorps antiphospholipides (**Gu et al., 2019**)

I.3.4. Atteinte rénale

L'atteinte rénale est cliniquement apparente chez environ 50 % des patients atteints de LES et constitue une cause importante de morbidité et de mortalité (**Anders et al .,2020**)

Ainsi, le dépistage périodique de la présence d'une néphrite lupique avec des analyses d'urine, la quantification de la protéinurie et l'estimation du taux de filtration glomérulaire est un élément important de la prise en charge continue des patients atteints de LED . , La néphrite interstitielle est parmi les manifestations rénales qui peuvent être attribuées à une augmentation des profils de cytokines inflammatoires, par exemple, les interleukines (IL-1, IL-6, IL-17, IL-18), le facteur nécrotique tumoral, Th1 et les cytokines Th2 (**Aringer et al., 2005**).

I.3.5. Atteinte gastro-intestinale

Survenant chez jusqu'à 40 % des patients. La majorité des symptômes gastro-intestinaux sont causés par des réactions indésirables aux médicaments et des infections virales ou bactériennes (**Fawzy et al., 2016**).

I.3.6. Atteinte neurologique et neuropsychiatrique

L'atteinte neuropsychiatrique du LES consiste en un large éventail de manifestations neurologiques et psychiatriques, y compris les accidents vasculaires cérébraux, les convulsions, les dysfonctionnements cognitifs, le délire et la psychose D'autres problèmes moins courants sont les troubles du mouvement, et la méningite. (**Schwartz et al .,2019**).

I.3.7. Atteinte ophtalmologique

Toute structure de l'œil peut être impliquée dans le LED, la kératoconjonctivite sèche étant la manifestation la plus fréquente . L'état pathologique suivant le plus courant est la vasculopathie rétinienne sous la forme de taches de coton .

1.4. Etiopathologie du LES

L'étiologie du lupus est multifactorielles et pas toujours claires, L'association de l'incidence du LES avec l'exposition à multiple facteurs été bien établie par des études épidémiologiques les mécanismes biologiques potentiels de ces associations comprennent l'augmentation de la régulation positive des cytokines inflammatoires, l'inflammation systémique et les modifications épigénétiques

1.4.1. Les facteurs environnementaux et leur influence

-Exposition aux particules

Des études expérimentales suggèrent que la silice cristalline induit l'apoptose cellulaire et la libération d'antigènes intracellulaires. D'autres mécanismes pathologiques comprennent une activité accrue des cytokines pro-inflammatoires, un stress oxydatif et une diminution de l'activité des lymphocytes T régulateurs. Dans les modèles murins, l'exposition à la silice est liée à des auto-anticorps sériques plus élevés et à des complexes immuns (**Brown et al ., 2003**).

-Le tabagisme

Les études sur le lien entre le tabagisme et le risque de lupus érythémateux disséminé (LED) révèlent que les fumeurs présentent un risque accru de développer cette maladie par rapport aux non-fumeurs. L'exposition aux substances toxiques présentes dans la fumée de cigarette peut entraîner un stress oxydatif qui endommage directement les protéines endogènes et l'ADN. Ces dommages génétiques peuvent favoriser le développement d'une réaction auto-immune et entraîner une augmentation de la production de cytokines inflammatoires (**Monteiro et al., 2022**).

-Exposition aux ultraviolets B

L'exposition aux UVB (ultra violeté B) induit des espèces réactives de l'oxygène et régule à la hausse l'expression des cytokines pro-inflammatoires et régulent également les molécules d'adhésion. . De plus, l'exposition aux UVB entraîne une altération de la clairance des cellules apoptotiques (**Achtman et al .,2015**).

-Infection par le virus Epstein-Barr

Les patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) présentent des taux significativement plus élevés de séropositivité à l'EBV par rapport à leurs témoins appariés selon l'âge (**Yu et al., 2013**) Plusieurs mécanismes potentiels expliquent cette observation, notamment des déficiences génétiques qui entraînent un contrôle insuffisant de l'infection et une réactivation latente plus fréquente de l'EBV. Des charges virales élevées, des niveaux élevés d'anticorps IgA dirigés contre l'EBV et des lymphocytes T spécifiques à l'EBV défectueux chez les patients atteints de LED indiquent un manque de contrôle adéquat de

l'infection., Certains facteurs génétiques prédisposants comprennent des déficiences dans la voie du complément, des composants des voies de l'IFN et des allèles spécifiques du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC). De plus, en raison de la présence généralisée d'une infection latente et de réactivations, un plus grand nombre de cellules infectées par l'EBV lors de l'apoptose entraînera une réponse immunitaire innée et adaptative contre les antigènes cellulaires et les antigènes de l'EBV libérés. Ainsi, un contrôle insuffisant de l'infection à l'EBV peut contribuer au développement du LED. Un autre mécanisme par lequel l'EBV peut contribuer au développement du LED est le mimétisme moléculaire. Les anticorps dirigés contre l'antigène nucléaire de l'EBV (EBNA-1) peuvent réagir de manière croisée avec les auto-antigènes associés au LED. Chez les personnes sensibles, cette réponse immunitaire contre EBNA-1 peut entraîner la production d'anticorps à réaction croisée, puis la propagation d'épitopes, aboutissant finalement au développement du LED (Su *et al* .,2020)

-Exposition aux médicaments

Certains mécanismes proposés du lupus induit par les médicaments sont la prédisposition génétique, la biotransformation des médicaments et les modifications épigénétiques des cellules immunitaires. (Vaglio *et al* .,2018)

Les médicaments impliqués dans le développement du LES sont l'hydralazine, le procainamide, l'isoniazide, la minocycline et les inhibiteurs du TNF- α . Le procainamide et l'hydralazine.

-Influences hormonales

Les hormones sexuelles sont connues pour affecter le fonctionnement du système immunitaire des études montre que les hormones féminines jouent un rôle de déclencheurs dans le développement du LED tandis que les hormones masculin jouent un rôle protecteurs. Cela explique la susceptibilité féminines de développer un lupus De plus, l'influence des hormones sexuelles sur l'activité de la maladie est évidente lors de périodes telles que la puberté, la grossesse et les phases post-partum, où l'on observe des exacerbations de la maladie. L'activité des œstrogènes peut contribuer au développement du LED en augmentant la production d'interféron de type 1 (IFN), la survie des cellules B auto-réactives et la production d'anticorps anti-dsDNA, la dérégulation des cellules T-reg, la modulation des voies TLR et développement de cellulaire dendritique.

Il existe de multiples mécanismes impliquant les œstrogènes dans la réponse auto-immune. à travers la stimulation du récepteur ostrogénique α présent à la surface des cellules dendritiques ce qui entraîne une augmentation de la production d'IL-12 et d'IL-6, lesquelles sont pro-inflammatoires, ainsi que au niveau thymus la stimulation des récepteurs nucléaires ostrogénique induit des effets et des modification épigénétique de l'expression de gène AIRE et le bloqué par antagoniste ace qui entraîne une augmentation du nombre de clones de lymphocytes auto réactifs dans le thymus (**Dragin et al.,2017**)

1 .4.2.Les facteurs génétiques

La majorité des études génétiques confirme que le lupus systémique est une maladies à une origine polygénique, Le plus souvent des mutations auront des conséquences qui débiteront dans l'enfance mais n'auront de réelles répercussions que plus tard au cours de la vie, Plus de 40 polymorphismes de nucléotides sont impliqués dans la pathogénie du LED parmi eux on cite : les gènes de régulation de l'immunité, tels des polymorphismes HLA:(HLA-II : DR3, DR2 et DR8), des gènes liés à l'interféron alpha (INF- α), des gènes de protéines du complément 1q (C1q), C2 et C4, des récepteurs d'immunoglobulines ou des récepteurs Toll-like TCR, les molécules impliquées dans l'activation lymphocytaire, les gènes responsables de la clairance des corps apoptotiques T ,récepteurs de la fraction Fc des immunoglobulines (Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA) Donc cela explique que LES demeure une maladie polygénique (**Avinani et al.,2019**).

On retrouve des gènes impliqués dans la dégradation des acides nucléiques dans l'espace extracellulaire (DNASE1, DNASE1L3) ainsi que l'opsonisation des débris cellulaires (C1QA, C1QB, C1QC, C4, C2).

Les gènes associés au LES sont listés dans le TABLEAU 1. (voire annexe1) l'implication des mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codants qui régulent l'expression des gènes peuvent être impliqués dans la pathogenèse du LED ; certains polymorphismes des gènes de la signalisation de TLR7 et TLR9 ont été associés au lupus, notamment IRF5 et IRF77 (**Avinani et al.,2019**).

1.4.3. Les facteurs immunologiques

Le lupus systémique résulte de profondes par des facteurs immunologiques, tels que induction d'une inflammation chronique ou bien la perte de la régulation du système immunitaire principalement due à des anomalies dans différents processus comme l'apoptose avec un déficit de clairance des corps apoptotiques. L'activation excessive des cellules immunitaires, en particulier des cellules dendritiques plasmacytoïdes, ainsi que la production inappropriée d'interféron-alpha. Hyperactivation polyclonale des lymphocytes B (LB) responsable a la production des autoanticorps antinucléaires. De plus, des perturbations dans la signalisation intracellulaire des lymphocytes T conduisant à une activation de délétère pour l'organisme et une résistance à l'anergie et à l'apoptose. Le réseau de cytokines est également altéré, se qui traduisant par une surexpression de l'interféron de type I et une diminution de la production d'interleukine 2. (Mathian *et al.*,2014).

En résumer ; La progression du lupus érythémateux disséminé (LES) peut être divisée en étapes . Des facteurs environnementaux et génétiques contribuent au développement de la maladie. Des déclencheurs tels que l'infection peuvent provoquer une auto-immunité, et entraînent une perte durable de tolérance et la propagation de l'auto-immunité des changements épigénétiques, dépôts de complexes immuns et des lésions tissulaires à médiation par les auto-anticorps peuvent entraîner une inflammation chronique et des dommages irréversibles dans les organes terminaux. (Barbhaiya *et al.*, 2016).

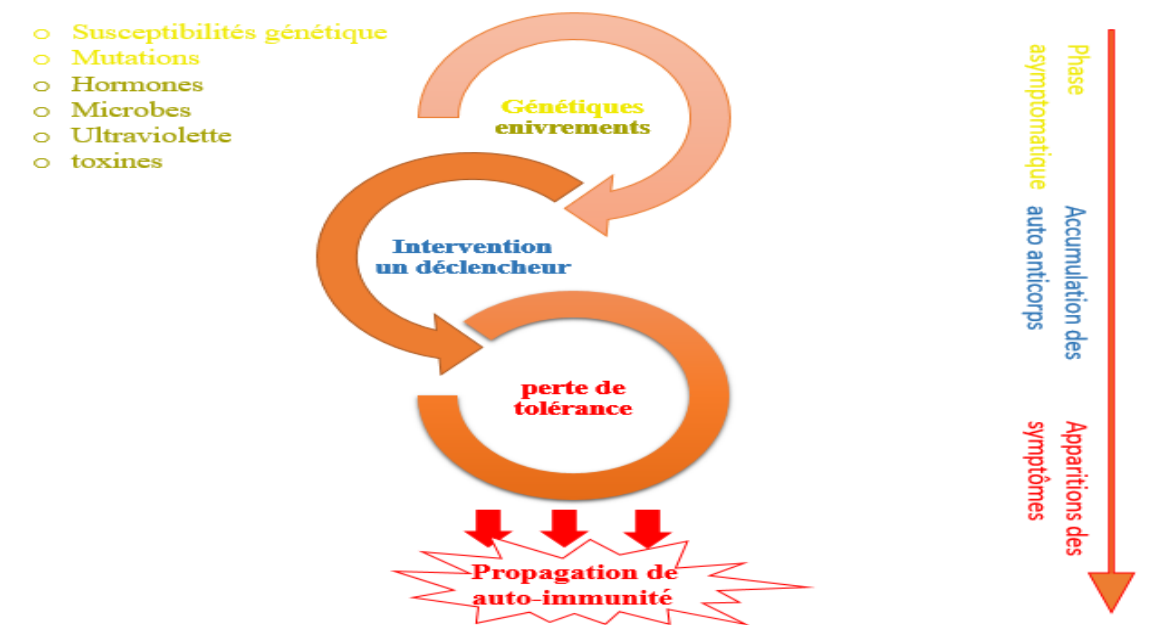


Figure 3: les étapes d'apparition du lupus inspiré de (Tsokos *et al.*, 2016).

1.5. Immunopathologie du lupus

La rupture de l'autotolérance est la principale cause de l'apparition et le développement du LED. Les réseaux immunitaires innés et adaptatifs sont liés les uns aux autres par les cytokines, les compléments, les complexes immunitaires et les kinases de la machinerie intracellulaire tout sont impliqués dans la pathogénèse du LED.

1.5.1. La source d'autoantigène

Dans le LES l'élimination insuffisante des cellules mortes induit l'accumulation des débris cellulaires et le déclenchement d'une inflammation chronique et une auto-immunité ce qui cause la fuite d'auto-antigènes cytoplasmiques et nucléaires tels que l'ADN, les histones, les nucléosomes, sous-unité élémentaire de la Chromatine constituée d'ADN, ainsi que de certaines ribonucléoprotéines et phospholipides. Parmi les nombreux types de mort cellulaire, l'apoptose « suicidaire », la nécrose « passive » et NETos, sont les Sources d'auto-antigènes nucléaires qui jouent un rôle important dans la pathologie du LED (**Malgorzata J et al., 2015**).

L'apoptose est un processus physiologique hautement contrôlé, les cellules en apoptose sont éliminées directement par les macrophages qui les reconnaissent directement par leurs récepteurs ainsi par différents signes sécrétés par les macrophages et les cellules apoptotiques qui permettent l'élimination des cellules mourantes sans déclencher de réponse inflammatoire. Ce silence immunologique pendant la mort cellulaire apoptotique est obtenu par le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire et la sécrétion subséquente de cytokines anti-inflammatoires par les phagocytes englobant. empêchent la progression des cellules apoptotiques vers le stade de la nécrose secondaire (voire annexes 1) qui accompagnée d'une rupture de la membrane cellulaire et la libération subséquente du contenu intracellulaire nocif, y compris les molécules associées aux dommages.

Dans le cas du lupus, cette voie immunitaire silencieuse se transforme en une source nocive d'autoantigènes et de signaux immunostimulants susceptibles d'entretenir des réponses auto-immunes et inflammation chronique.

La production d'auto-anticorps et l'opsonisation consécutive d'auto-anticorps intracellulaires favorisent l'absorption par les phagocytes du matériel dérivé des cellules nécrotiques secondaires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-8, IFN α , le TNF- β , l'IL-18, et IL-1 β alimentent l'inflammation (**Chunyan et al., 2019**); La formation

de dépôts de complexe immuns intra-tissulaire en raison du développement d'auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes tissulaires(la peau, les articulations , les reins) induire l'activation de la voie classique du système du complément qui attire les cellules immunitaires innées ce qui favorise l'inflammation locale (Malgorzata *et al* .,2015).

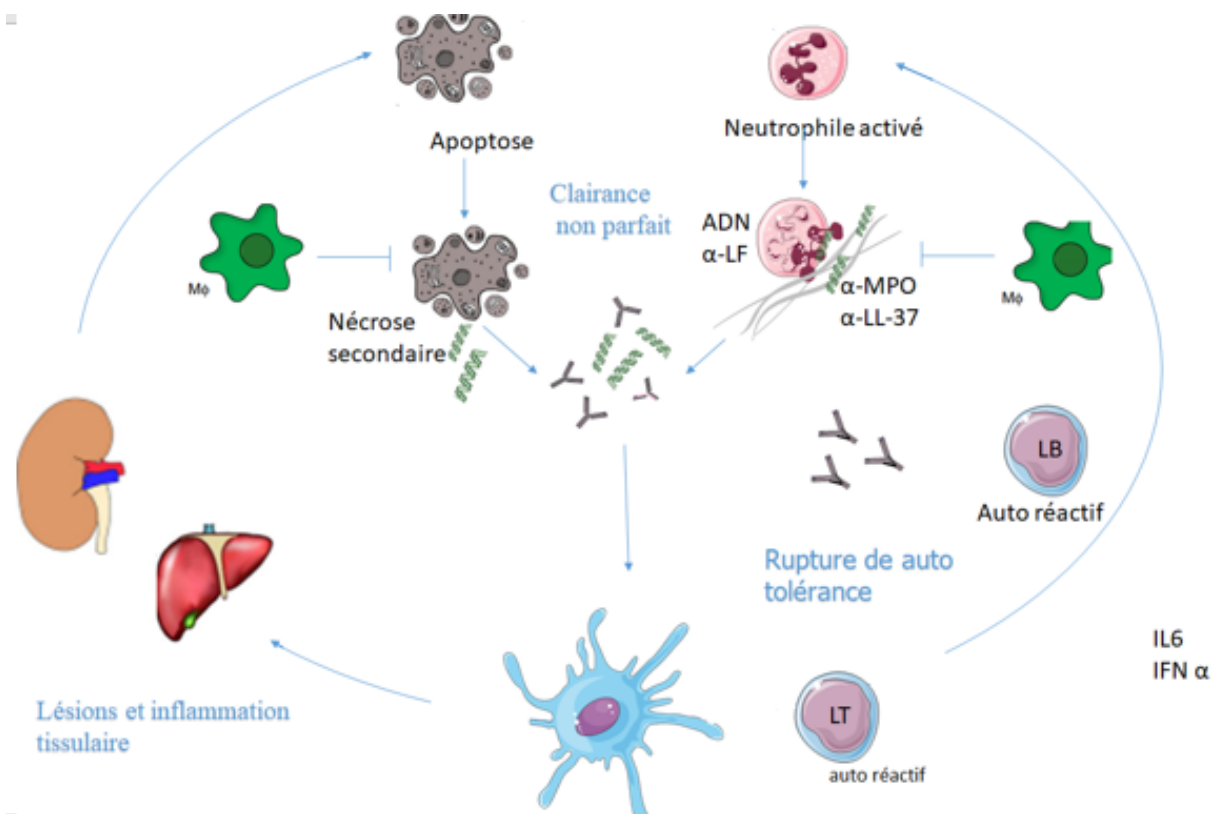


Figure 4 : Le cercle vicieux du LED adopté (Malgorzata *et al* ., 2015)

L'activation des cellules dendritiques plasmocytaires (pDC) par les complexes immunitaires via les récepteurs de haute affinité FcγR entraîne la sécrétion d'IFN-α, établissant ce que l'on appelle la « signature IFN-α » l'origine de graves lésions organiques se produisent, qui alimentent à leur tour le cercle vicieux du LED.

Une autre source d'auto-Ag c'est les Pièges extracellulaires des neutrophiles(NETs) secrètes lors de la mortes des polynucléaire qui sont des réseaux fibreux assemblés à partir de composants nucléaires et de granules recouvertes d' Myeloperoxidase (α-MPO) ou d'α-IL-37 et de protéines pro-inflammatoires et cytotoxiques., une production aberrante de ces TNE et/ou une clairance le déséquilibre de la dégradation des NETs externalisent les auto-antigènes, qui induisent une synthèse IFN de type I et des dommages endothéliaux (figure4) (Delgado-Rizo *et al*.,2017)

1.5.2. Implication de immunité innée et adaptative dans le LES

1.5.2.1. 1.Implication de l'immunité innée

Dans le système immunitaire inné, les Basculer la table des matières Récepteur de reconnaissance de motif PRR jouent un rôle essentiel reconnaissent les débris cellulaires apoptotiques ou les cellules endommagée, La clairance est généralement silencieuse, mais lorsque la charge de cellules apoptotiques dépasse celle qui peut être éliminée, les débris apoptotiques peuvent déclencher des réponses immunitaires en activent les cellules immunitaire, l'accumulation des débris apoptotiques qui peuvent déclencher des récepteurs de type Toll (TLR)et des capteurs d'acide nucléique (**Lu Pan et al., (2018).**

Une activation inadéquate des voies de ces récepteurs par des mutations, une localisation erronée ou une présence d'antigène (AN) du soi non dégradés peuvent tous induire une forte expression d'IFN I et de cytokines pro-inflammatoires par les pDC qui aboutiront au développement du LES ou d'autres maladies auto-immunes et inflammatoires.

Les principaux détecteurs des AN reliés au LES sont les TLR, chez les patients atteints de LED ; Une suractivation ou une surexpression de TLR9 et TLR 7 peut induire une inflammation chronique par activation de la voie de facteur nucléaire-kappa B(NFκB) et Le facteur de régulation de l'interféron 7(IRF7) conduit à la production d'IFN-α et d'autres produits pro-inflammatoires ce qui permet de maintenir et d'amplifier la réponse immunitaire en favorisant l'auto-réactivité plutôt que la tolérance De façon analogue, TLR7 reconnaît les ARNsb et capable d'induire la production d'IFN/I, l'expression de l'IL-1β et de l'IL-23 favorisant la différenciation des Th17 (**Barton et al ., 2006**) ; (facteur de nécrose tumorale TNF, IL-1, IL-12), molécules d'adhésion endothéliale, molécules costimulatrices (CD80 et CD86) et cytokines antivirales (IFN-α) (en favorisant les réponses auto-immune (**Sturfelt et al ., 2005**).

le ligand des protéines de répétition riches en leucine (NLR) a activé les kératinocytes et les CD, différentes formes de ligands inflammatoires sont formées et combinées avec les inflammasomes correspondants. Ensuite, la caspase-1 et la caspase-5 sont activées, respectivement, pour promouvoir la production d'IL-1βet d'IL-18 (**Lu Pan et al (2018).**

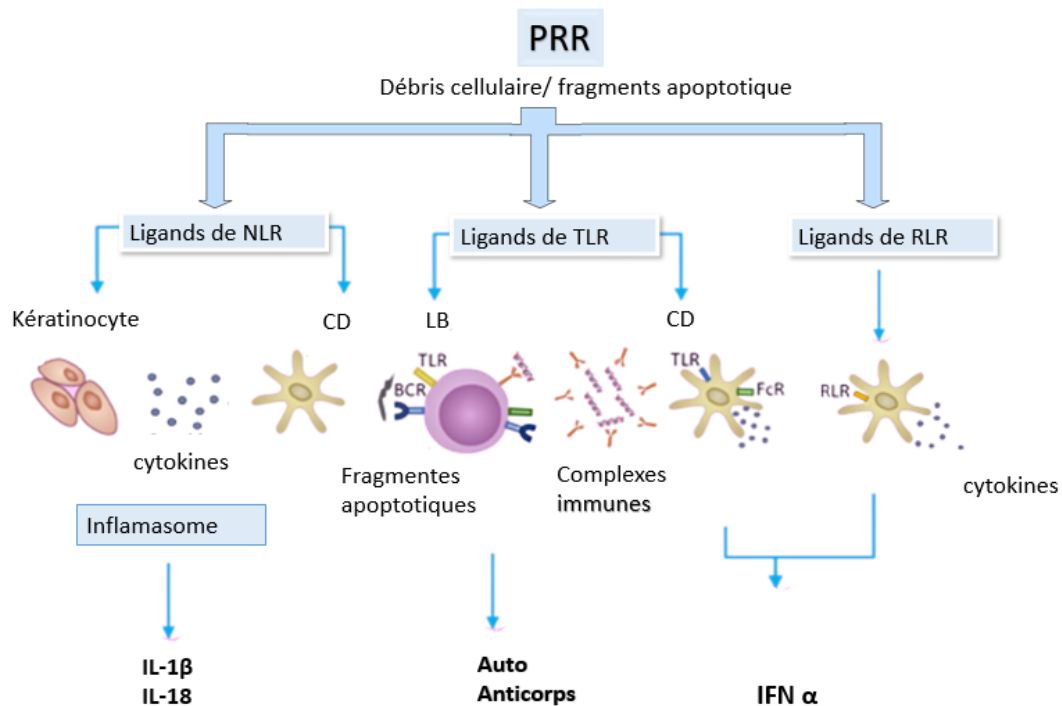


Figure 5: implication des récepteurs de reconnaissance des formes dans l'immunité innée du lupus (adopté) (Lu Pan *et al.*, 2018).

Les capteurs d'acide nucléique cytosolique sont des nucléases, qui dégradent les acides nucléiques agissent dans le cytoplasme pour compléter la fonction des TLR endosomaux. Les voies de signalisation de ces capteurs activent à la fois la production d'IFN et de cytokines inflammatoires (An *et al.*, 2017).

-Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont un groupe hétérogène de cellules disséminées dans tout le corps, où elles jouent le rôle de sentinelles (pDC) et de piègeurs (mDC) pour les agents pathogènes traitent et présentent les antigènes phagocytés aux cellules T naïves de manière à stimuler le système immunitaire ou à induire une tolérance ; les cellules dendritiques folliculaires (fDC) sont un autre type de cellule complètement différent présentent des antigènes liés à la surface dans des complexes immunitaires aux cellules B folliculaires pour assurer la maturation des cellules LB auto réactifs (Lu Pan *et al.*, 2018)

-les anomalies du complément dans le LED

Les protéines du complément jouent un double rôle dans la pathogenèse du LED. D'une part, la carence en composants du complément prédispose au lupus d'autre part, l'activation

excessive du complément joue un rôle dans les dommages aux organes (Madhubala Sharma *et al.*, 2020)

-Anomalies dans Les macrophages

une élimination phagocytaire défectueuse des débris apoptotiques entraîne l'accumulation d'acides nucléiques endogènes, déclenchant la production de cytokines / chimiokines inflammatoires et prolifération des lymphocytes dans le LED (Maa *et al.*, 2019)

1.5.2.2. Implication de l'immunité adaptative

Dans le LES La rupture de la tolérance immunitaire est critique dans le développement de la maladie et les cellules T jouent un rôle important dans ce processus. Outre une sécrétion anormale de cytokines et une transduction anormale du signal cellulaire, elle peut également entraîner un recrutement et une activation inappropriés des CD et des lymphocytes B dans les sites d'inflammation permettant la production d'auto-anticorps (Lu Pan *et al.*, 2018)

les différentes sous-populations jouent un rôle dans la pathophysiologie du lupus . Ainsi on retrouve une plus forte proportion de LT double négatifs (LTDN) CD4- /CD8- chez les patients lupiques. Cette augmentation des LT DN provient en partie des LT CD8+ Cette modification d'expression change également le profil cytokinique de ces cellules qui expriment alors plus fortement IL1, IL8 et IL17. Ce profil cytokinique permet non seulement de provoquer une réponse pro-inflammatoire, mais également d'apporter un soutien au développement des LB et à leur production d'auto-anticorps par l'action d'IL17, qui promeut le changement de classe des anticorps (Apostolidis *et al.*, 2011), les patients LES présentent un taux d'IL17 qui corrèle avec la gravité de la maladie. (Choi *et al.*, 2015)

-Les cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh)

Les LT folliculaires (LTfh) sont une sous population de cellules T auxiliaires assistant les cellules B dans les centres germinatifs (CG) peuvent produire de l'IL- 21, induire la prolifération et la différenciation des cellules B De nombreux études montrent que les cellules Tfh et les réponses des CG sont associées à l'apparition du LED (Choi *et al.*, 2015), l'augmentation du nombre de cellules Tfh était positivement corrélée avec l'activité de la maladie et les titres d'auto-anticorps sériques La forte émergence de LTFH est issue d'une surexpression des ligands des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (OX40L) sur les CPA , elle-même provoquée par une activation soutenue de TLR7. Cette surexpression envoie un

signal promouvant le changement des LT CD4+ naïfs et mémoires en TFH fonctionnels (George *et al.*, 2016).

-Déséquilibre des cellules Th1/Th2

l'apparition et le développement du LED est étroitement lié à dysfonctionnement des cellules **Th1/Th2**. Dans des circonstances normales, les deux types de cellules se régulent et s'inhibent mutuellement par le biais des cytokines afin de maintenir l'équilibre immunitaire, Dans le LED cet équilibre est rompu et caractérisé par une diminution de la fonction de Th1 et une hyperfonction de Th2, ce qui entraîne une activité excessive des cellules B, la production d'auto-anticorps et des lésions tissulaires (Mathian *et al.*, 2014).

-Déséquilibre des cellules Th17/Treg

Dans les conditions normales, les Th17 et les Tregs sont dans un état de dynamique. Qui est détruit dans le LED l'augmentation des cellules Th17 est accompagnée d'une diminution des Tregs. Les patients atteints de LED peuvent également avoir déséquilibré dans le profil des cytokines caractérisé par une diminution de l'IL-2 et augmentation des niveaux d'IL-17 (George *et al.*, 2016).

-la cellule LB et la production des autoanticorps

Les lymphocytes B contribuent au LES par leurs réponses à l'autoantigène, la régulation d'autres cellules et la production d'auto-anticorps en raison des défauts dans l'élimination des auto-antigènes le matériel nucléaire s'accumule sur les cellules dendritiques folliculaires du centre germinatif (FDC) et

1.5.2.3.Principaux acteurs moléculaires du lupus systémique

-Les cytokines

nombreuses cytokines sont impliquées dans la perte de tolérance et les effets sur les organes cibles dans le LES (comme le TNF, l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10) et leurs principaux effets sont la perte de tolérance la promotion de la production d'auto-anticorps et de l'inflammation (Mathian *et al.*, 2014).

Le facteur d'activation des cellules B (BAFF) est un facteur critique pour l'homéostasie des cellules B qui fonctionne particulièrement au stade transitionnel des cellules B. dans le LES l'activation des lymphocytes B et la production d'auto-anticorps sont favorisées par cette cytokine, la régulation à la hausse du facteur d'activation des cellules B permet la survie et la maturation des cellules B autoréactives à la périphérie et leur

participation à la réaction du centre germinal, deux autres cytokines, sont également augmentées dans le LED, IL-18 et IL38. L'IL18 est une puissante cytokine pro-inflammatoire produite par l'inflammasome, et l'IL-38 est considérée comme une cytokine anti-inflammatoire avec des fonctions régulatrice clé. **(A.Mathian et al.,2014).**

2- NO

les réactions médiées par les radicaux libres radicales ont été impliquées dans une série de maladies auto-immunes, y compris le LED , le monoxyde d'azote (NO) est l'une des molécules de radicaux libres les plus importantes et les plus étudiées. Il joue un rôle important dans la régulation des processus physiologiques, la défense de l'hôte et l'anti-inflammation dans des conditions physiologiques . Inversement, il sert de molécule effectrice cytotoxique ou un médiateur pathogène de la destruction des tissus lorsqu'elle est surexprimée **(koga et al .,2017).**

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) .**

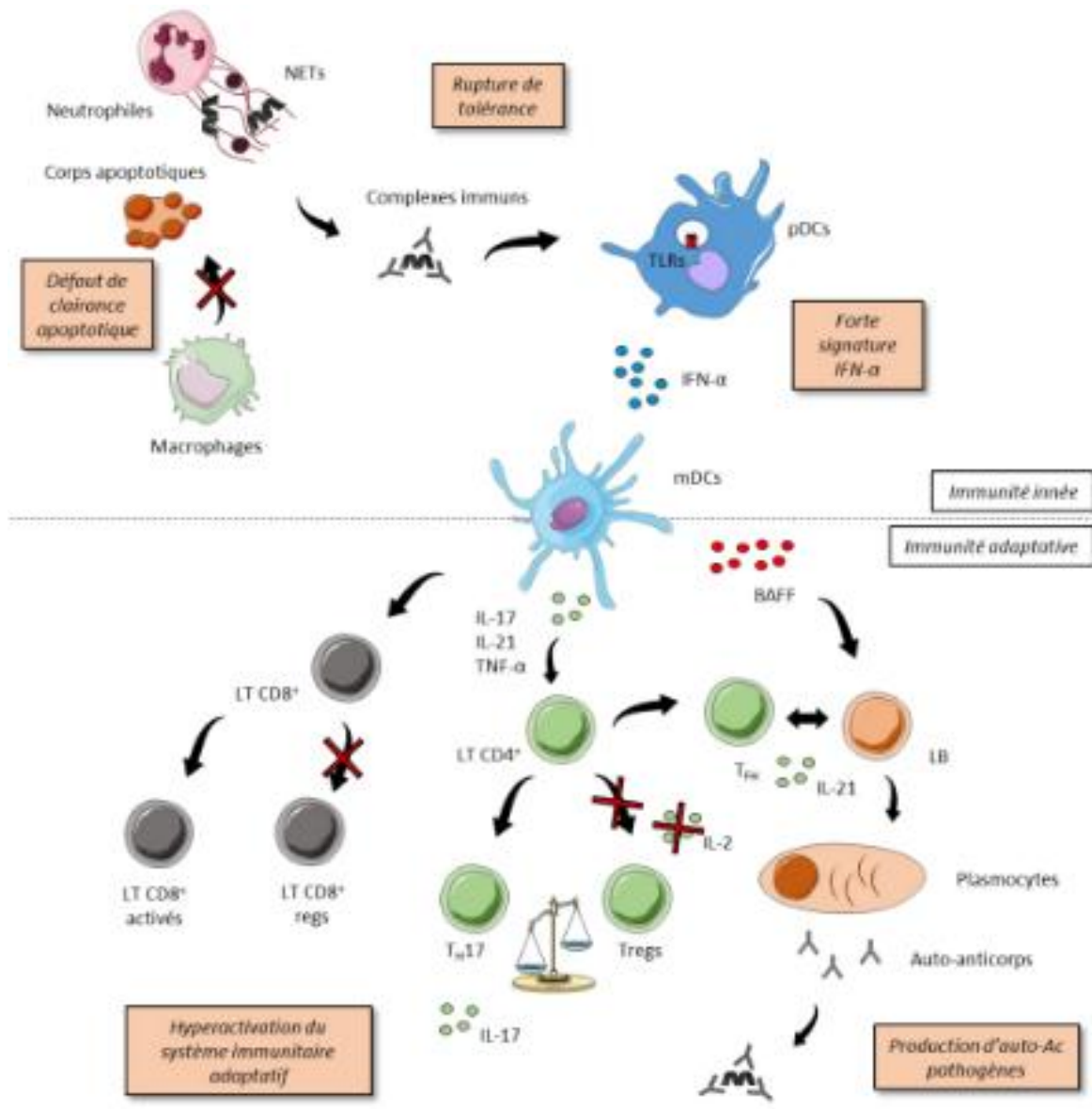


Figure 6: les combinaisons extrêmement complexes associées à des anomalies phénotypiques et fonctionnelles du système immunitaire, inné et adaptatif, participent en synergie au développement du LES

6. Diagnostic du LES

Le diagnostic peut être difficile dans :

- les premiers stades de la maladie, lorsqu'un nombre limité de caractéristiques peuvent être présentes
- les cas négatifs pour les anticorps antinucléaires (ANA) ou les formes à prédominance organique

-les présentations de maladies rares, qui peuvent néanmoins être graves et nécessiter un traitement rapide.

Un test des anticorps antinucléaire ANA négatif ne peut pas exclure le diagnostic de LES, car jusqu'à 20 % des patients peuvent être négatifs (vrais ou faux négatifs) à différents stades de la maladie, bien que le taux de lupus ANA négatif soit généralement beaucoup plus faible. **(Pisetsky et al., 2017)** Le diagnostic de LES est clinique, étayé par des examens de laboratoire indiquant une réactivité immunitaire ou une inflammation dans divers organes.

De nouveaux ensembles de critères de classification **(Hochberg et al., 1997 ; Petri et al., 2012 ; Aringer et al., 2019)** permettent une classification plus précoce du LES, la combinaison des trois ensembles (Collège américain de radiologie (ACR) 1997, groupe Systemic Lupus International (SLICC) 2012 et EULAR/ACR-2019) assurant la capture de groupes de patients non chevauchants. Les ANA ou une autre positivité immunologique sont nécessaires pour la classification du LES selon les critères SLICC-2012 et EULAR/ACR-2019, mais pas les critères ACR-1997. Le respect des critères de classification n'est pas nécessaire pour le diagnostic de LES. Chez les patients présentant une maladie précoce, le SLICC et l'EULAR/ACR sont plus sensibles que l'ACR, tandis que les critères EULAR/ACR ont une spécificité supérieure. **(Nikolopoulos et al., 2020)**

Malgré cette superbe performance, certains patients atteints d'une maladie potentiellement grave peuvent encore être manqués. La modification des critères de classification peut améliorer leur sensibilité, permettant un diagnostic et un traitement plus précoces d'un plus grand nombre de patients présentant une charge de morbidité élevée

7. Traitement du LES

Au fil des dernières décennies, d'importants progrès ont été accomplis dans le traitement du lupus érythémateux systémique (LES), ce qui a conduit à une amélioration de la survie des patients à travers le monde, on cite ;

-Antipaludéens

Les antipaludéens sont parmi les médicaments les plus anciens utilisés pour traiter le LED, mais ils sont toujours considérés à juste titre comme la pierre angulaire du traitement du LED. Ils sont particulièrement efficaces dans la prise en charge des manifestations cutanées et de l'arthrite mais doivent être inclus dans le schéma thérapeutique de chaque patient, sauf en cas de contre-indication claire. **(Silverman et al., 2011)**

-Glucocorticostéroïdes

L'efficacité des GC dans le contrôle aigu du LES est bien établie, et l'utilisation de GC à forte dose ou « pulsés » pour supprimer rapidement la réponse auto-immune dans les manifestations menaçant les organes est un élément important des schémas thérapeutiques du LES. Les GC ont été introduits dans les années 1950 pour traiter les maladies auto-immunes, avec un effet écrasant "médicament miracle", et ont contribué à une augmentation des taux de survie des patients atteints de LED (Borchers AT et al ,2004)

Cependant, peu de temps après leur introduction, il est devenu clair que des effets secondaires dose-dépendants pouvaient survenir chez les patients recevant un traitement par GC, et une série d'études a par la suite démontré que leur utilisation à long terme pouvait avoir des effets délétères. Gladman et al. ont constaté que jusqu'à 80 % des dommages accumulés étaient attribuables à l'utilisation de GC (**Gladman et al., 2003**)

-Agents immunosuppresseurs conventionnels

Les préoccupations croissantes concernant la toxicité et les effets secondaires graves des GC ont favorisé le développement de stratégies thérapeutiques alternatives. Les médicaments immunosuppresseurs (IS) conventionnels sont devenus un élément fondamental de l'arsenal thérapeutique pour le traitement du LED. Outre leurs propriétés immunomodulatrices , ils permettent également une diminution plus rapide et plus efficace de la dose de GC. Sauf qu'ils sont également accablés par leur association à des effets secondaires, tels que des infections graves, des tumeurs malignes et l'infertilité, pouvant entraîner des lésions organiques supplémentaires et la mortalité (**Basta et al., 2020**)

-Thérapies ciblées : agents biologiques

Ces dernières années, une meilleure compréhension de l'étiopathogénie du LED a conduit à l'introduction d'un certain nombre d'agents biologiques qui ciblent spécifiquement les voies pathologiques sous-jacentes au développement et à la progression du lupus. Certaines de ces thérapies, telles que le rituximab (RTX) et le belimumab, sont disponibles en pratique clinique

Le RTX est un Ac monoclonal chimère qui cible sélectivement la molécule de surface CD20 spécifique des cellules B. Deux grands essais de phase III, randomisés et contrôlés par placebo sur le lupus non rénal et le lupus rénal (**Rovin et al .,2012**)

Le seul agent biologique ciblé homologué pour le lupus à ce jour est le belimumab (Benlysta® ; GlaxoSmithKline), un anticorps monoclonal entièrement humanisé qui inhibe le stimulateur des lymphocytes B (BlyS), également connu sous le nom de facteur d'activation des cellules B (BAFF) (**Mackay *et al.*, 1999**)

-Traitements adjuvants :

Les immunoglobulines intraveineuses (IgIV), qui sont purifiées à partir du plasma de donneurs humains sains, représentent une option thérapeutique valable pour les patients atteints de LED avec des infections concomitantes ou pour ceux qui ont des contre-indications ou sont réfractaires aux thérapies conventionnelles. Dans certains cas, les IgIV peuvent être administrées en première intention (**Martínez *et al.*, 2019**) la thérapie IVIG est encore considérée comme expérimentale sans indications claires. Une revue systématique des études observationnelles a mis en évidence l'association de l'administration d'IgIV avec une amélioration significative des scores d'activité de la maladie et des niveaux de complément (**Sakthiswary *et al.*, 2014**)

2. les phytohormones

2.1. Définition

Les phytohormones sont des substances organiques sécrétées par les cellules végétales à faible dose, elles agissent comme des régulateurs de la croissance et le développement des plantes. Ce sont des molécules de signalisation endogènes impliquées dans une gamme extrêmement variée de processus physiologiques de la germination à la chute des feuilles et à la maturité des graines. Les P. interagissent avec des récepteurs spécifiques et induisent des chaînes de transduction du signal, qui sont impliquées dans divers processus de développement (par exemple, la croissance des feuilles, la floraison, l'abscission).

Les hormones végétales classiques comprennent les auxines, les gibbérellines (GA), l'acide abscissique (ABA), les cytokinines (CK) et l'éthylène (ET). Les hormones découvertes plus récemment comprennent les jasmonates (JA), les brassinostéroïdes (BR), l'acide salicylique et le strigolactone (**Mukherjee et al., 2022**).

Les P. sont largement utilisées en agriculture, et les produits d'origine végétale se retrouvent dans les chaînes alimentaires des êtres humains et des animaux. Actuellement, les études sur l'effet des hormones végétales et de leurs dérivés synthétiques sur les cellules animales et humaines sont axées sur la recherche de nouveaux médicaments (**Flesche., 2007 ; Li et al., 2011**).

Il est important de noter que ces "phytohormones" ne sont pas exclusives aux plantes. Il a même été démontré qu'elles sont produites de manière endogène chez l'homme ou dans des cultures de cellules humaines. Elles ne sont pas étrangères à la physiologie humaine, ce qui signifie qu'elles sont susceptibles d'être exploitées au cours de divers processus physiologiques. En outre, plusieurs phytohormones peuvent également être produites par des microbes. (**WooKim et al., 2020**).

2.2. Phytohormones d'origine microbienne

Plusieurs microbes favorisant la croissance des plantes sont désignés comme PGPR (*Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria*). Ces rhizobactéries favorisant la croissance des plantes sécrètent des composés chimiques comme des phytohormones (**Keswani et al., 2020**).

Les PGPR sont des micro-organismes importants qui peuvent induire la sécrétion de phytohormones, comme les auxines, l'acide gibbérellique, l'acide abscissique, les cytokinines

et l'éthylène, et jouent un rôle important dans la croissance des plantes. Ils comprennent une grande variété de souches bactériennes de différents groupes taxonomiques qui habitent les racines des plantes et leur rhizosphère (**Dilnashin et al., 2020**) ; La PGPR peut être classée en deux types principaux, à savoir les rhizobactéries procédant à la croissance extracellulaire des plantes (ePGPR) et les rhizobactéries intracellulaires favorisant la croissance des plantes (iPGPR) (**Viveros et al., 2010**). Les ePGPR habitent la rhizosphère (sur le rhizoplane) ou dans les espaces entre les cellules du cortex racinaire. Les genres bactériens inclus dans ePGPR sont *Azotobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* (**Keswani et al., 2020**).

2.3. Mode d'action des phytohormones chez les plantes

Les mécanismes d'action de phytohormones ont été étudiés par des essais biologiques et à l'aide de nombreux mutants naturels et générés artificiellement. La synthèse de phytohormone se fait dans une cellule, dans un organe, à un instant donné. Cette molécule peut être conjuguée, c'est-à-dire fixée à un acide aminé ou à un sucre. Cette conjugaison pourra rendre l'hormone active ou inactive. Ainsi la teneur de l'hormone va être régulée par sa synthèse, sa dégradation et ou sa conjugaison, L'hormone active va être transportée via des protéines de transports. Elle va ensuite se lier au récepteur membranaire ou intracellulaire. Une fois liée à son récepteur, la phytohormone induit une cascade de signalisation spécifique, par phosphorylation du récepteur ou formation d'un complexe avec un corécepteur, pour induire la transcription des différents gènes de réponse (**Pons, 2020**).

2.4. Le rôle des phytohormones chez les plantes

Les hormones végétales sont impliquées à toutes les étapes de la vie de la plante à différents niveaux du cycle végétal (**Lin et al., 2020**) affectent tous les aspects de la croissance et du développement des plantes en symbiose et sont classées en trois catégories principales : hormones assurant le contrôle du développement végétatif, hormones contrôlant la reproduction et hormones de réponse au stress (tableau annexe) (**Mukherjee et al., 2022**).

Les PTH sont importants pour la croissance normale, la floraison, la fructification et les mécanismes de défense (**WooKim et al., 2020**). La plupart des mécanismes cellulaires sont médiés par les phytohormones. Qui permettent de surmonter de multiples conditions

environnementales telles que la disponibilité de l'eau ou des nutriments, la lumière ultraviolette, les variations de température, les menaces parasitaires etc (**Baliño et al ., 2019**).

Par exemple, les auxines et les cytokinines sont des médiateurs de la division, de l'allongement et de la différenciation des cellules végétales. L'éthylène, qui est la seule hormone gazeuse des plantes, régule la maturation des fruits et l'abscission - ou le détachement des feuilles. Beaucoup de ces hormones sont largement utilisées dans les pratiques agricoles standard et sont devenues essentielles pour la propagation et la récolte des cultures. Par exemple, pour augmenter la durée de conservation, les fruits sont souvent cueillis dans un état vert et non mûr, puis traités à l'éthylène pour favoriser la maturation.. (ABA) est impliqué dans la régulation de l'entrée des plantes dans l'état de repos en réponse au stress abiotique et biotique par inhiber la germination de la graine induit une explosion du système de défense antioxydant de la plante (**Bruzzone et al., 2008 ; Li et al., 2011**) en revanche . L'acide gibbérellique (GA), stimule la croissance des plantes. induire la germination des graines et inhiber la dormance des graines le GA3 est la gibbérelline la plus fréquemment utilisée expérimentalement.

Le méthyl jasmonate (MeJA), un autre phytohormone de famille de jasmonat qui a fait l'objet d'études approfondies en raison de ses bénéfices cliniques potentiels, MeJA joue un rôle essentiel dans plusieurs étapes du développement des plantes et agit en tant que médiateur de signalisation intracellulaire dans le mécanisme de défense. dans la résistance contre les insectes/maladies et renforce le système immunitaire des plantes et agit comme un antioxydant endogène et compense les réponses de stress biotiques/abiotiques (**Tosan et al.,2023**).

2.5. Activité biologique des phytohormones sur la physiologie humaine

Il est bien établi que les phytohormones régissent non seulement des traits physiologiques importants chez les plantes, les phytohormones se sont avérées avoir une fonction sur les organismes d'autres règnes. Ainsi, les animaux, y compris les humains, ayant des impacts sur les processus physiologiques humains. Les phytohormones à activité thérapeutique peuvent être exploitées pour le traitement du cancer ainsi que pour leur activité anti-inflammatoire et antivirale principalement parce qu'elles sont biocompatibles et ont des fonctions bien caractérisées.

Certaines phytohormones ont des propriétés anti-inflammatoires et peuvent inhiber divers troubles inflammatoires. Par exemple l'ABA est apparue comme un modulateur clé de différents processus physiologiques humains dans le métabolisme du glucose, l'inflammation, stress oxydatif, la mémoire et la croissance tumorale, d'ABA présente des effets bénéfiques dans des maladies telles que la colite, l'athérosclérose, le cancer du sein et les maladies infectieuses ; Les salicylates sont utiles dans les maladies cardiovasculaires, le cancer du côlon et le diabète. Les cytokinines et leurs dérivés réduisent le stress oxydatif et la cytotoxicité dans les cellules cancéreuses. Certaines phytohormones exogènes peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires, comme les gibbérellines a la propriétés antioxydantes qui induisent la production de la protéine anti-inflammatoire offrant ainsi une protection contre l'asthme dans les cellules épithéliales pulmonaires (**WooKim et al., 2020**) l'acide indole-3-acétique (IAA) agissent comme un agent anti tumoral et anticancéreux, (**Mukherjee et al., 2022**).

Des traitements chez des souris et des humains ont montré que plusieurs de ces substances peuvent avoir un impact positif sur notre santé: une faible dose d'aspirine protège contre les maladies cardiovasculaires, la pré-éclampsie, certains cancers et aussi contre le diabète de type 2 (DT2). Enfin, l'auxine offre une protection contre la cirrhose du foie d'une part, mais d'autre part, elle affiche une influence négative potentielle sur les maladies cardiovasculaire (**Woo Kim et al .,2020**).

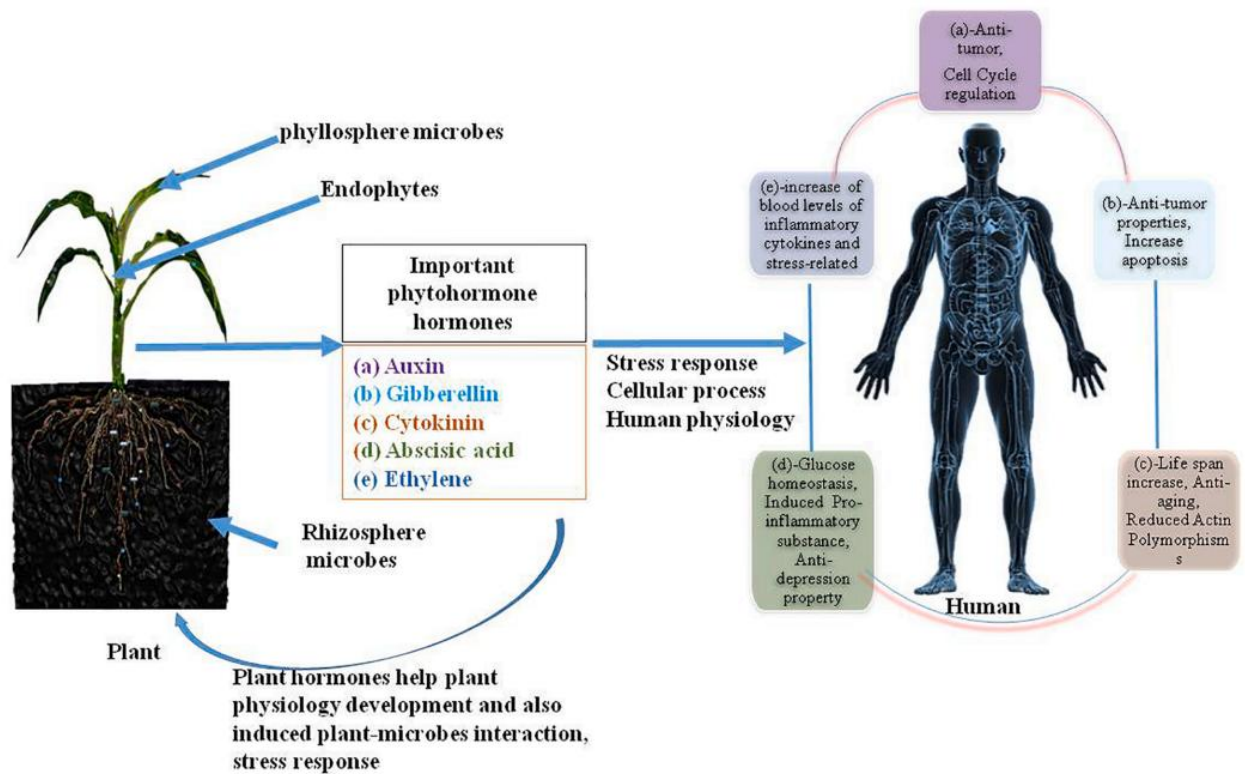


Figure 7 : Les hormones végétales permettent à la santé végétale et humaine d'être interconnectées. (Mukherjee *et al.*,2022).

-les jasmonates

Les avantages cliniques du jasmonat de méthyle MeJA sont liés à ses interactions marquantes avec les voies inflammatoires NF- κ B, à l'inhibition d'enzymes, à l'expression génique pour la synthèse de médiateurs inflammatoires, de molécules de signalisation, au stress oxydatif et à la modulation de la perception de la douleur et des réponses nociceptives ; MeJA atténue la libération de médiateurs pro-inflammatoires (oxyde nitrique et prostaglandine E2) et de cytokines (facteur de nécrose tumorale α , interleukine (IL)-1 β et IL-6) en supprimant l'activation de la signalisation MAPK par bloqué la phosphorylation (c-Jun N-terminal kinase JNK, ERK et p38) et NF- κ B en supprimant la dégradation de l'inhibiteur de κ B- α . Ce qui démontre que le jasmonate de méthyle exerce des activités anti-inflammatoires qui révèlent son potentiel en tant que candidat pour le traitement de diverses maladies associées à l'inflammation (figure) (Tosan *et al.*,2023).

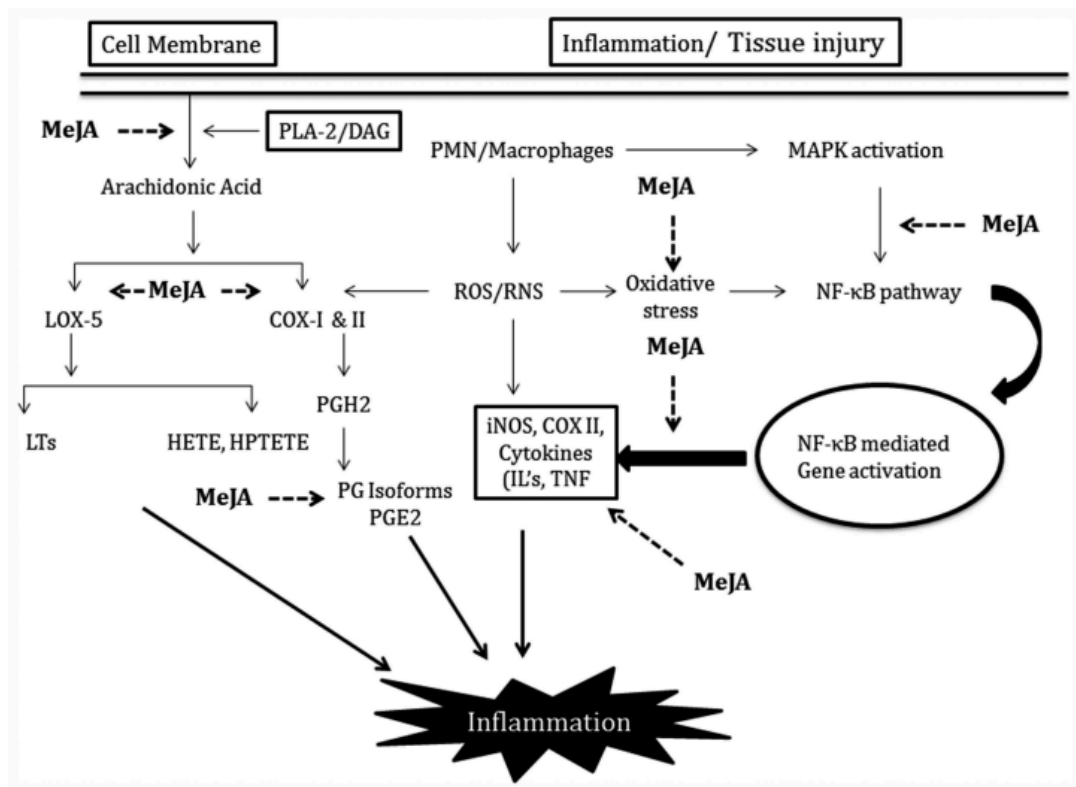


Figure 8 : mécanisme moléculaire du MeJA sur l'inflammation

-Les strigolactones (SL)

Sont des hormones végétales dérivées de caroténoïdes. Des études récentes ont rapporté une activité anti-inflammatoire intéressante pour le GR24 un analogue de SL, a été observés pour inhiber de manière significative la libération du NO dans les cellules stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) ainsi que les niveaux de TNF- α et IL-6, par rapport à la glucocorticoïde. De même, les niveaux de phosphorylation de NF- κ B p65, I κ B α , ERK1/2 et p38 MAPK ont diminué. En effet, Les analogues synthétiques des SL contrôlent plusieurs voies conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. L'apoptose. Ces propriétés confèrent aux SL une activité antimicrobienne ainsi qu'une activité antitumorale, Cela fait des SL des structures prometteuses pour le développement de nouveaux candidats anti-Alzheimer. (Figure), (Dell'Oste *et al*, 2021).

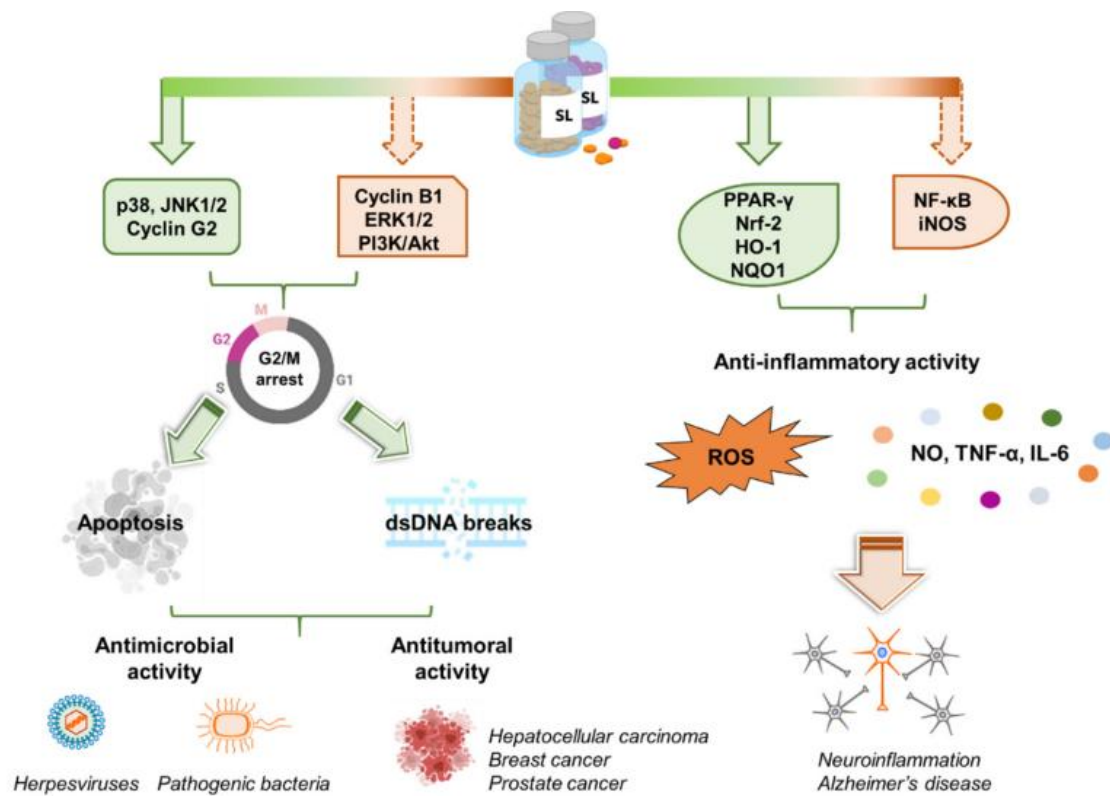


Figure 9: L'activité du SL dans les cellules humaines et leur potentiel en médecine. (Dell'Oste *et al.*, 2021).

Chapitre 2
Matérielle et méthodes

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique 2.40 du département de biologie, faculté des sciences, université M'hamed Bougara Boumerdes (UMBB) ; en collaboration avec le service de médecine interne du centre hospitalier universitaire (CHU) Lamine Debaghin (ex Maillot) Bab El Oued Alger, Algérie., Le travail a pris une durée de 3 mois (Mai – Juillet 2023).

L'étude a été portée sur 10 patients LES (07 femmes et 03 hommes) plus dix sujets sains qui ont été pris comme des témoins qui sont homogène en terme de sexe et d'âge avec les patients, afin d'évaluer l'effet in vitro des phytohormones issues des plantes et des bactéries sur la production du paramètre inflammatoire, le monoxyde d'azote (NO) produit par les PBMCs des patients atteints du LES.

Ce travail a été mené dans le respect des normes éthiques recommandées par la Déclaration d'Helsinki et approuvé par les consentements éclairés écrit et fourni par tous les patients inscrits et volontaires sains (voir annexe 02).

II .1. Matériels et réactifs

II.1.1. Matériels non biologique



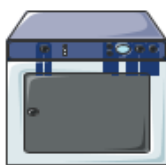
Hôte a flux lumineux



Tube conique de 15ml



Micropipette de 1000UL 200UL 20UL



Incubateur



Microplaque de culture et cuves
De 96 puits (TPP)



Spectrophotomètre et cuves



Microscope



agitateur vortex



centrifugeuse avec rotors à godets pivotants
(eppendorf, tubes)

II.1.2. Réactifs

II.1.2.1. Phosphate-Buffered Saline (PBS)

C'est un tampon phosphate salin dont la concentration des sels est identique à celle du corps humain. Il sert à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace du milieu..

II.1.2.2. Ficoll

C'est un milieu de centrifugation à gradient de densité utilisé pour séparer des cellules mononucléaires du sang périphérique.

II.1.2.3. Ammonium-Chlorure-Potassium (ACK)

C'est un tampon de lyse des globules rouges. Permet une lyse optimale des érythrocytes, avec un effet minimal sur les lymphocytes

II.1.2.4. Le bleu de trypan

C'est un colorant utilisé pour le test de viabilité cellulaire. Il permet de distinguer les cellules viables et non viables, en s'infiltrant dans les membranes plasmiques endommagées des cellules non viables les faisant apparaître en bleu.

II.1.2.5. Les réactifs de Griess :

Le Griess A : naphtyle éthylène diamine dihydrochloride, et le Griess B : le sulfanilamide, ont été utilisés pour le dosage des nitrites résiduels NO₂ - dans les plasmas et le surnageant de cultures des cellule mononucléaire périphérique (PBMCs) des patients et des contrôles. Les solutions de (Griess A 0.5%) et (Griess B 5%) ont été préparés dans le HCL à 20%.

II.1.2.6. Le nitrite de sodium (NaNO₂)

Utilisé pour la préparation de la gamme étalon des nitrites.

II.1.2.7. Le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)

Le RPMI est un milieu utilisé en culture cellulaire. Il est traditionnellement utilisé pour la culture de cellules humaines ou de tissus isolés. Le RPMI-1640 complété par 10% de sérum de veau foetal et 1% d'ATB (streptomycine et pénicilline).

II.1.2.8 .Acide gibbérellique (A . Gibbé) :

Acheté par Sigma Aldrich. Formule chimique : $C_{19}H_{22}O_6$ Poids moléculaire : 346.38 g/mol.

II.1.2.9. Phytohormones (Phyto.H) : issus des bactéries riches principalement en Acide indole 3-acétique(AIA)

II 2. Méthode

II.2.1. Échantillons et prélèvement sanguin :

les échantillons de sang des patients et des témoins sains ont été obtenus par le biais de ponctions veineuses, en utilisant des tubes contenant de l'anticoagulant , acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ensuite ont été centrifugés à 2800 tours par minute pendant 5 min, ce qui a permis de séparer le sang en deux phases distinctes. Le plasma qui a été prélevé et conservé à une température de $-20^{\circ}C$ jusqu'à son utilisation ultérieure. Les culots cellulaires issus de la centrifugation ont été utilisés pour isoler et cultiver les lymphocytes mononucléaires du sang périphérique (PBMC).

II.2.2. Cultures de lymphocytes mononucléaires du sang périphérique (PBMC)

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont principalement constituées de lymphocytes et de monocytes. Les PBMC purifiés sont utilisés in vitro pour évaluer l'effet de traitement par les phytohormones d'origine bactérienne et l'acide gibbérellique

a. Séparation des PBMC

Après avoir récupéré la phase sanguine, on passe à la centrifugation sur un gradient de Ficoll , on met 4 ml du sang dilué par le PBS (V/V) délicatement sur 2 ml de Ficoll dans un tube conique stérile de 15 ml qui va être centrifugé à 2800 rpm pendant 20 min.

Après la centrifugation on a obtenu un anneau très visible de PBMC sur le Ficoll et une précipitation (globules rouges, des granulocytes et des neutrophiles) sous le Ficoll. Puis, on a

recupéré l'anneau mono-lymphocytaire par des mouvements circulaires à l'aide de micropipette et on les a mis dans un tube de 15 ml. Ensuite on a fait une centrifugation de 5 min à 2800 rpm après avoir lavé le Ficollpar 2ml de PBS. Le culot cellulaire obtenu doit être lavé par solution d'Ammonium-Chlorure-Potassium l'ACK (2 à 3ml), suivi d'une centrifugation à 2800 rpm pendant 5 min s'il est contaminé par des hématies. puis lavés dans 3 mL de solution tampon phosphate (PBS), pH 7,2.

Enfin, et si le culot des PBMCs est pure et blanc, on effectue un dernier lavage par PBS suivi par test de viabilité à l'aide le bleu de Trypan (par prendre 500ul de suspensions et 500ul de bleu de trypan sous microscope si le Pourcentage de cellules viables > 90 % on passer à l'étape de la culture cellulaire.(voir annexe 03).

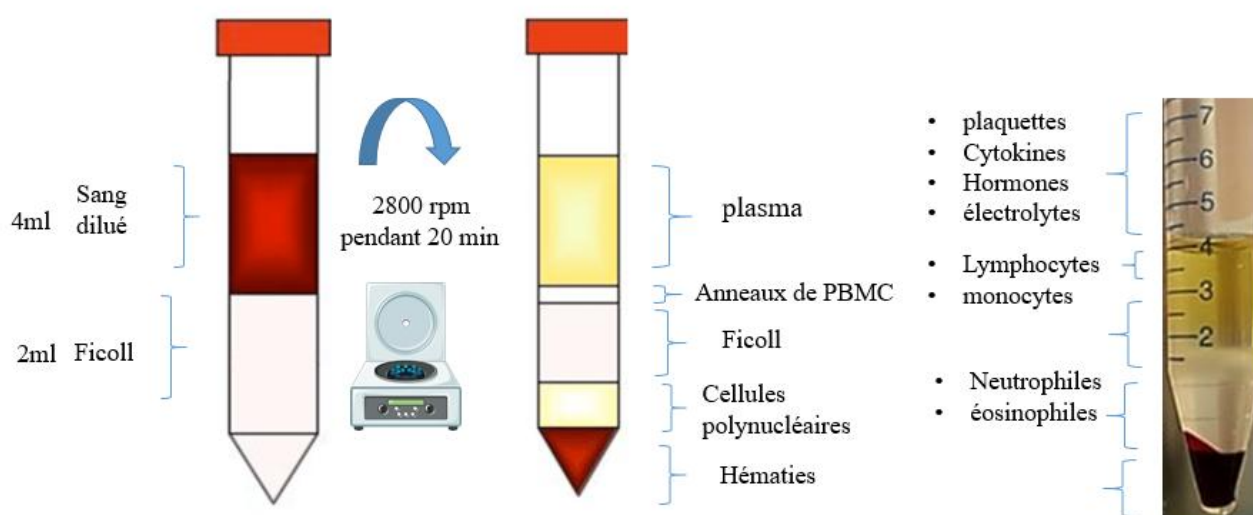


Figure 10: Protocole de séparation du sang par gradient de Ficoll.

b. La culture cellulaire.

La culture cellulaire a été effectuée en duplicate dans des microplaques à fond rond de 96 puits, et une capacité de 200 μ L par puits en ajoutant une concentration de 10^6 cellules/mL à partir de la suspension cellulaire et en complétant le volume à 200 μ L avec du RPMI. Les deux premiers puits contiennent des PBMC témoins sans traitement, Les autres

puits contiennent des concentrations croissantes de la molécule d'intérêt à savoir (acide gibbérellique : **A. Gibbé**) et des PBMCs des patients lupus ou des témoins sains et on complète le volume à 200 μ l par le milieu de culture RPMI .

-La culture est effectuée de la manière suivante :

- 2 puits témoins : PBMCs naïfs.
- 2 puits: PBMCs traités par 5 μ l /mL d'acide gibbérellique.
- 2 puits: PBMCs traités par 10 μ l /mL d'acide gibbérellique.
- 2 puits: PBMCs traités par 50 μ l /mL d'acide gibbérellique.
- 2 puits: PBMCs traités par 1 μ g /mL phytohormones d'origine bactériennes.
- 2 puits: PBMCs traités par 2 μ g /mL phytohormones d'origine bactériennes.
- 2 puits: PBMCs traités par 10 μ g /mL phytohormones d'origine bactériennes.

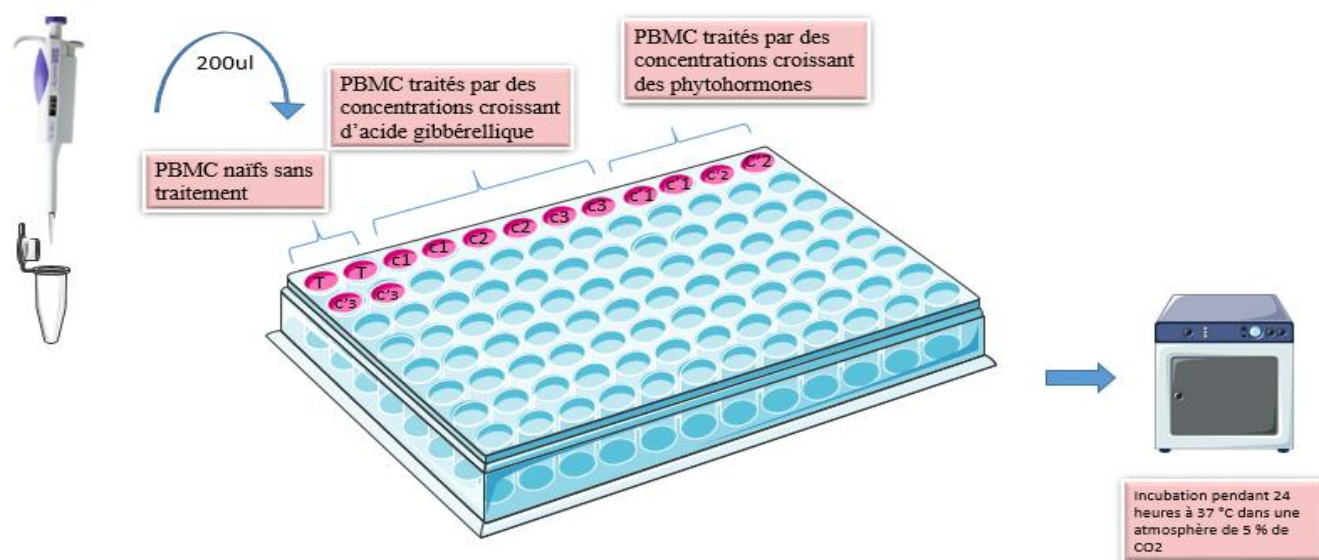


Figure 11 : Culture des PBMCs.

Les PBMC ont été ensuite incubés pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère de 5 % de CO₂, après la période d'incubation les suspensions cellulaires sont centrifugées et les surnageants des cultures seront utilisés pour le dosage du NO.

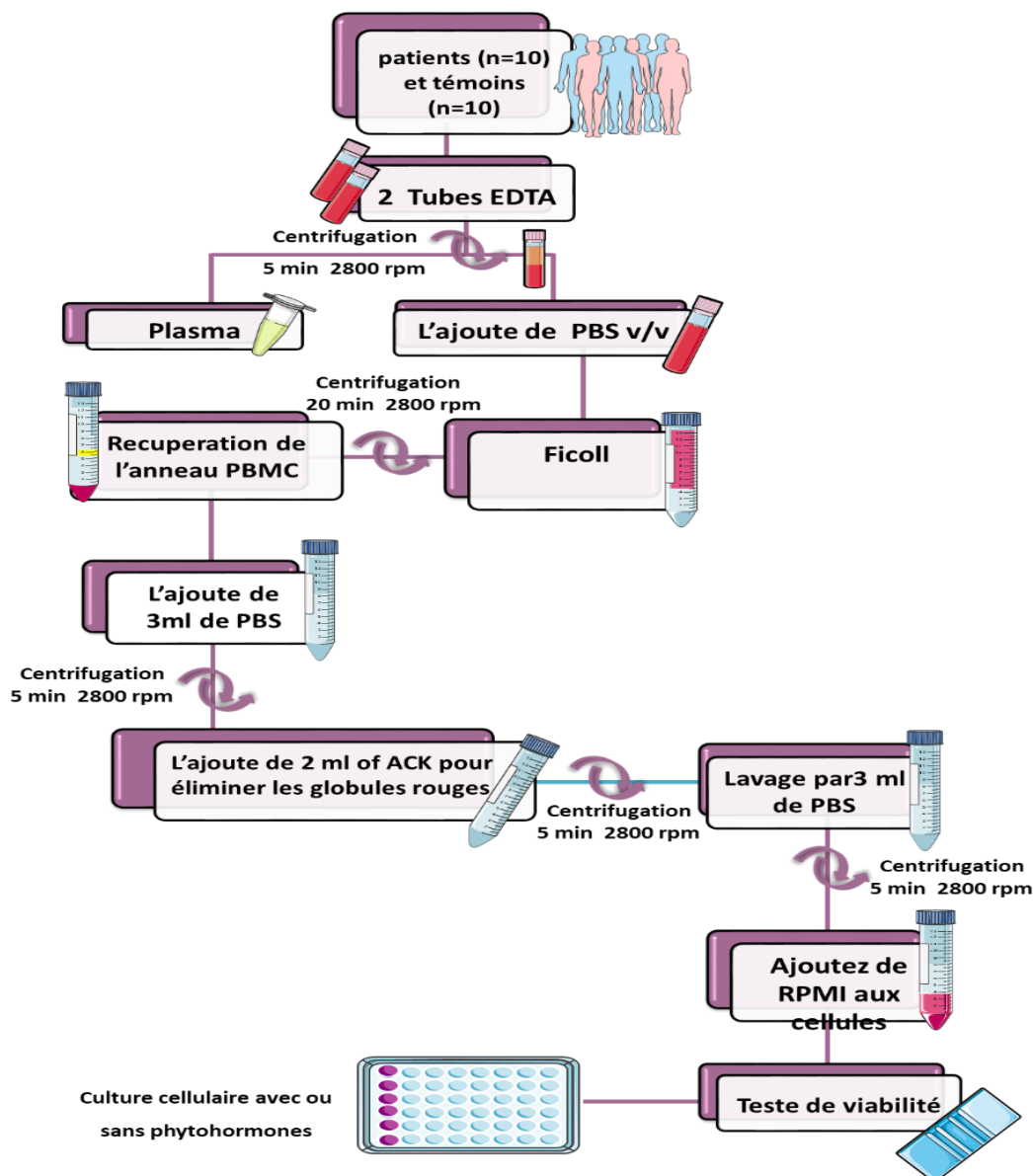


Figure 12 :Présentation de protocole de séparation des PBMC.

II.2.3. Mesure de l'oxyde nitrique (NO)

Les niveaux d'oxyde nitrique NO dans le surnageant de culture ont été quantifiés en prenant la concentration de nitrite comme mesure de la production de NO, selon la méthode de Griess modifiée comme décrit par Touil-Boukoffa et al (**Touil-Boukoffa, et al., 1998**) .

II.2.3.1. Principe

La détermination de la production de NO basée sur la mesure de taux des nitrites résiduels issus de dégradation oxydative de NO par la méthode de Griess modifiée (**Touil-**

Boukoffa, et al., 1998). Cette méthode consiste à coupler le nitrite avec la sulfanilamide du Griess B pour obtenir un sel diazonium. Ce dernier est ensuite couplé avec une amine « N-(1-naphtyl) éthylène diamine » (Griess A) pour former un produit azophique chromophore qui absorbe fortement la lumière à 543 nm et donne une coloration rose plus ou moins intense en fonction de la concentration de nitrite.

II.2.3.2. Méthode

Cette méthode consiste à mélanger 100 μL du surnageant avec 50 μL du réactif GRIESS B (5 % de sulfanilamide dans 20 % d'HCl) et 50 μL du réactif GRIESS A (0,5 % de N-1naphtyléthylènediamine dans 20 % d'HCl).

Le mélange obtenu a été homogénéisé par le vortex puis incubé à température ambiante pendant 15 minutes à l'abri de la lumière, L'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre d'une longueur d'onde de 543 nm.

Les concentrations de NO seront proportionnelles aux concentrations des nitrites résiduels qui ont été calculées en utilisant la courbe d'étalonnage de nitrite de sodium $[\text{NaNO}_2]$ (Figure 13).

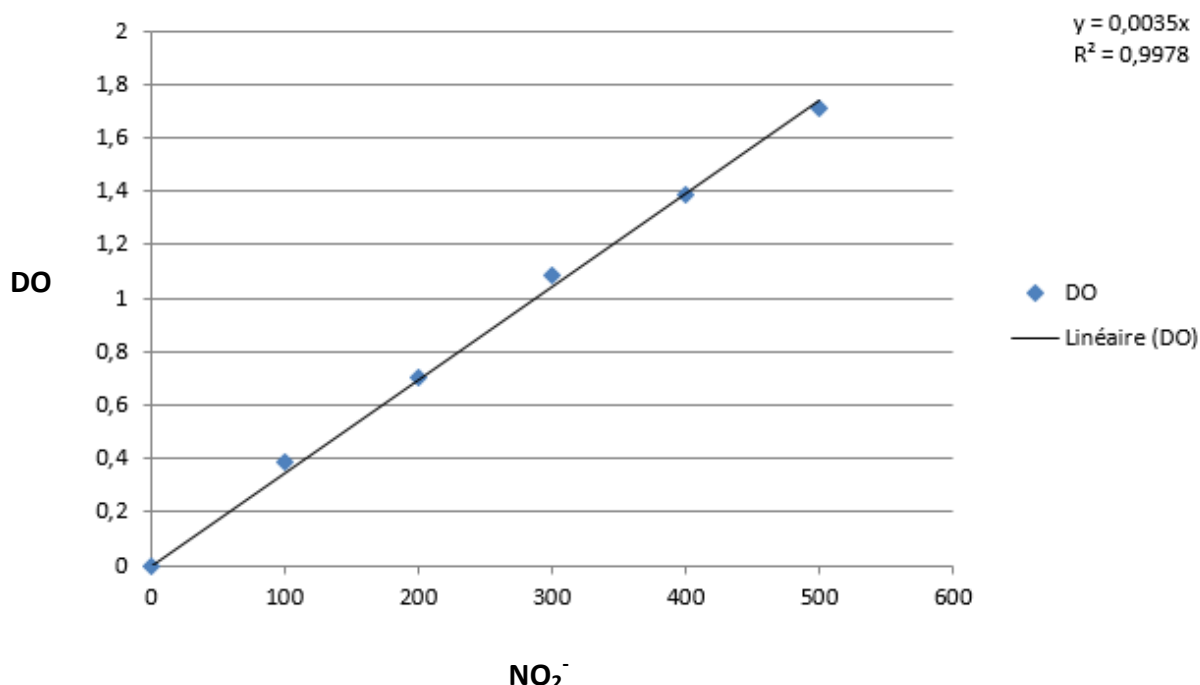


Figure 13 : Courbe étalon des nitrites résiduels NO_2 .

Chapitre 3
Résultats et discussions

III.1. Résultats

III.1. 1.Description de la population

III.1.1.1. Répartition selon le sexe

Notre série comporte sept femmes et trois hommes soit respectivement 70.00% et 30.00%. Avec un sexe ratio F/H proche à 2,33 ce qui indique une prédominance féminine dans notre population.

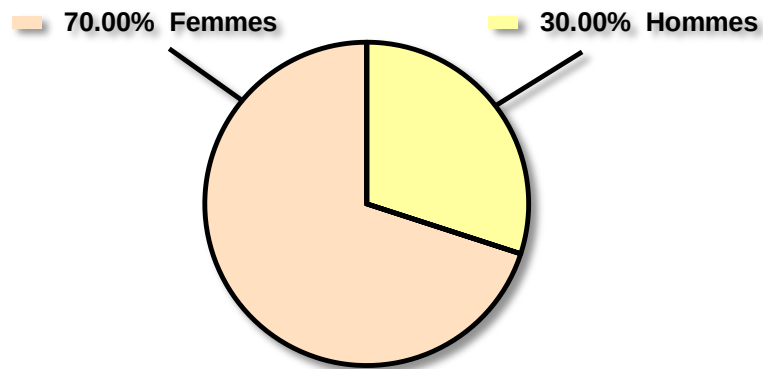


Figure 14: Répartition des patients selon le sexe.

III.1.1.2. Répartition selon l'âge

La tranche d'âge la plus touchée par le LES dans notre population d'étude est celle de 23 ans à 58 ans avec un écart-type de 12,36 et une moyenne de 40,375 ans.

III.1.1.2. Répartition selon l'activité et la rémission du LES

Les patients concernés dans notre étude sont repartie entre un pourcentage de 70.00% de patients en phase active et de 30 .00% de patients en phase de rémission.

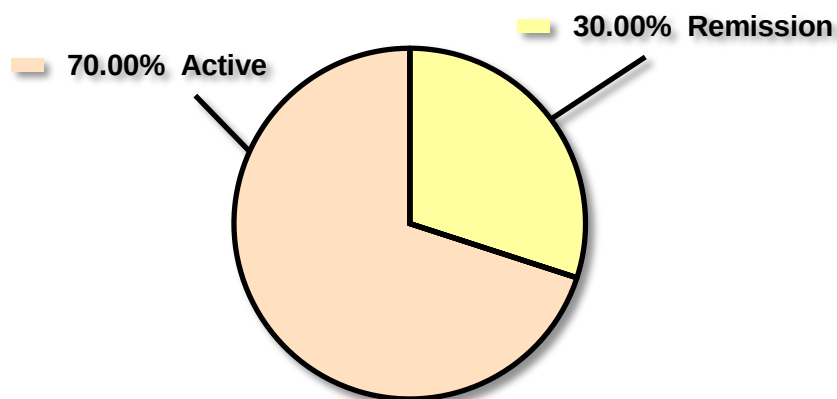


Figure15 : Répartition des patients selon la phase de la maladie.

III.2 Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production de NO chez les témoins sains et les patients atteints du lupus

III.2.1 Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production de NO chez les témoins sains

Dans notre étude, nous avons observé une diminution significative de la production du NO par les PBMCs traités par l'Acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes $P < 0.05$, Néanmoins aucune différence n'a été observé dans la production du NO entre les deux traitements.

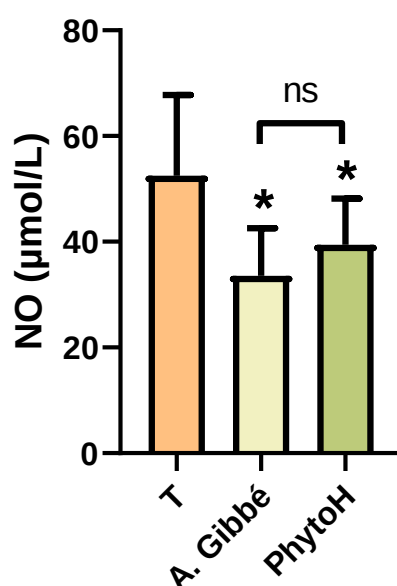


Figure 16 : Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des témoins sains, ns= no significant difference, * = $P < 0.05$. Données exprimées en moyenne et écart-type. [A. Gibbé]= 50 μg/mL, [PhytoH] = 25 μl/mL.

III.2.2 Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production du NO chez les patients atteints du lupus

A fin de déterminer si le traitement par l'acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes pouvait réduire la production du NO chez les patients atteints du LES, nous avons réalisé des cultures des PBMC en présence de différentes concentrations du l'**A. Gibbé** et des **PhytH** (05, 10 et 50 μg/mL) et (2.5 ,5 et 25 μl/ml), respectivement. La toxicité des concentrations choisies a été testée, aucune altération n'a été marquée, et la viabilité après culture était à 98% (**voir annexe**). Les niveaux du NO ont été mesurés par la méthode de Griess modifiée.

Le traitement avec 5 µg/mL de l'**A. Gibbé** n'a pas montré un effet sur la production du NO par les PBMCs alors que le traitement avec la concentration 10µg/ml et 50µg/ml montre une diminution hautement significative des niveaux du NO des PBMCs ($P<0.001$) et ($P<0.0001$) respectivement.

Nous avons observé également que le traitement avec 2.5 µl/mL de phytohormones n'a pas montré un effet sur la production du NO par les PBMCs, alors que le traitement avec la concentration 5 µl/mL et 25 µl/mL montre une diminution hautement significative des niveaux du NO des PBMCs ($P<0.01$) et ($P<0.0001$) respectivement (figure17).

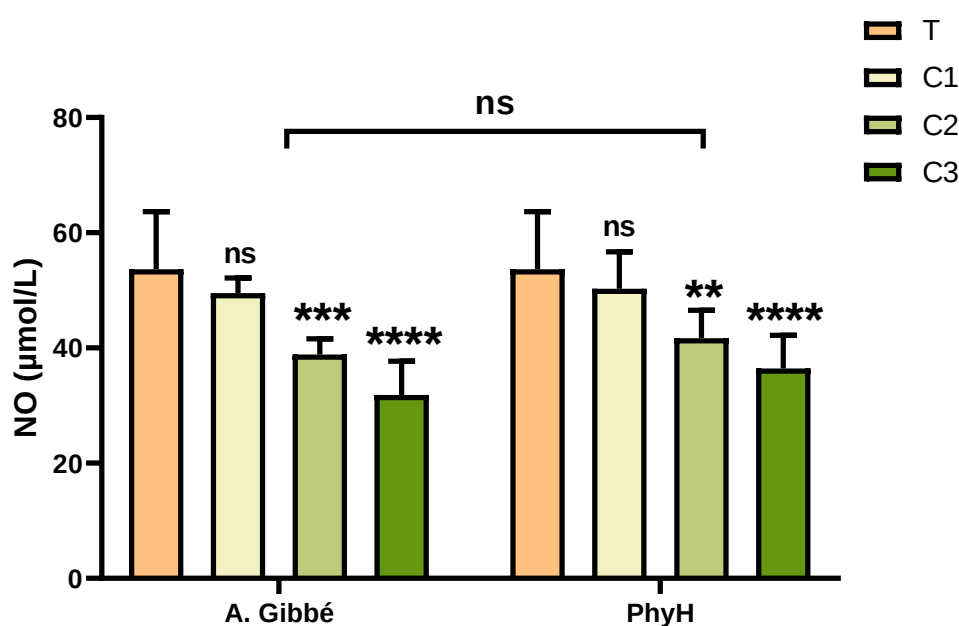


Figure 17: Effet de l'Acide gibbérellique et les phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des patients atteints de LES, ns= no significant difference, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$, ****= $P<0.0001$. Données exprimées en moyenne et écart-type. [**A. Gibbé**]: C1=5 µg/mL, C2=10 µg/mL, C3=50 µg/mL. [**PhytoH**]: C1=2.5 µl/mL, C2= 5 µl/mL, C3= 25 µl/mL.

III.3. Effet du traitement à l'Acide gibbérellique et les Phytohormones d'origine bactériennes sur les femmes et les hommes

Les différences physiologiques entre les hommes et les femmes jouent un rôle important dans le développement de la maladie et les stratégies de traitement (**Regitz-Zagrosek et al., 2012**). Dans ce contexte, nous avons trouvé intéressant de vérifier si les hommes et les femmes réagissent de la même façon au traitement à l'acide gibbérellique et les

phytohormones d'origine Bactériennes. Afin de distinguer l'effet du sexe sur les réponses des cellules.

On observe une diminution significative dans le niveau du NO après le traitement par les concentrations 10 µg/mL et 50 µg/mL avec un $P < 0.05$ de l'A.Gibbé, tant dit que la concentration 5 µg/mL n'a pas montrée de diminution significative, Alors que par le traitement au complexe de phytohormones la diminution était insignifiante dans les trois concentrations, Malgré ces observation, le test ANOVA a deux facteurs ne montre pas de différence significative entre les deux traitements (**figure 18-A**).

Quand aux patientes de sexe féminin traitées par l'A.Gibbé on distingue une diminution hautement significative dans le niveau du NO produit par les PBMCs traités par les concentrations 10 µg/mL et 50 µg/mL de l'A.Gibbé avec un ($P < 0.001$) et ($P < 0.0001$) respectivement, alors qu'aucune diminution significative n'a été montrée par la concentration 5 µg/mL, En outre, nous avons observé que le traitement de par les phytohormones a diminué significativement les niveaux de NO par les concentrations 5 µl/mL et 25 µl/mL avec un $P < 0.01$ et avec $P < 0.0001$ respectivement, tant dit que la concentration 2.5 µl/mL n'a pas montrée de différence significative,

L'analyse statistique par le test ANOVA de deux facteurs n'a montré aucune différence réelle entre les deux traitements concernant les niveaux du NO dans les surnageants de cultures (**figure 18-B**).

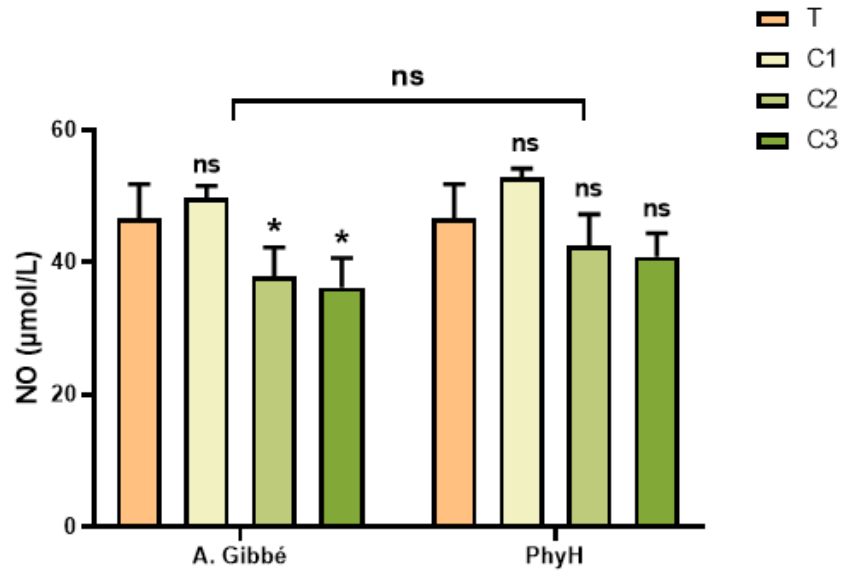
On observe une diminution significative des niveaux du NO après le traitement par la deuxième et la troisième concertation a l'AG pour les deux sexes avec un ($P < 0.05$ pour le sexe masculin) et $P < 0.001$ et < 0.0001 pour le sexe féminin).

Le teste ANOVA n'a montré aucune différence entre les femmes et les hommes en ce qui concerne la réponse au traitement (**figure 19- A**).

Pareil après le traitement par les phytohormones chez le sexe masculin, nous n'avons pas signalé de diminution significative dans la production du NO par les PBMCs traités par les trois concentrations, tandis que chez le sexe féminin y'avais une diminution significative que après la concentration 5 µl/mL et 25 µl/mL avec ($p < 0.001$) et ($p < 0.0001$) respectivement.

D'après l'analyse statistique du test ANOVA à deux facteurs aucune différence significative n'a été marquée entre les sexes concernant les niveaux du NO dans les surnageants de cultures (**figure 19- B**).

A



B

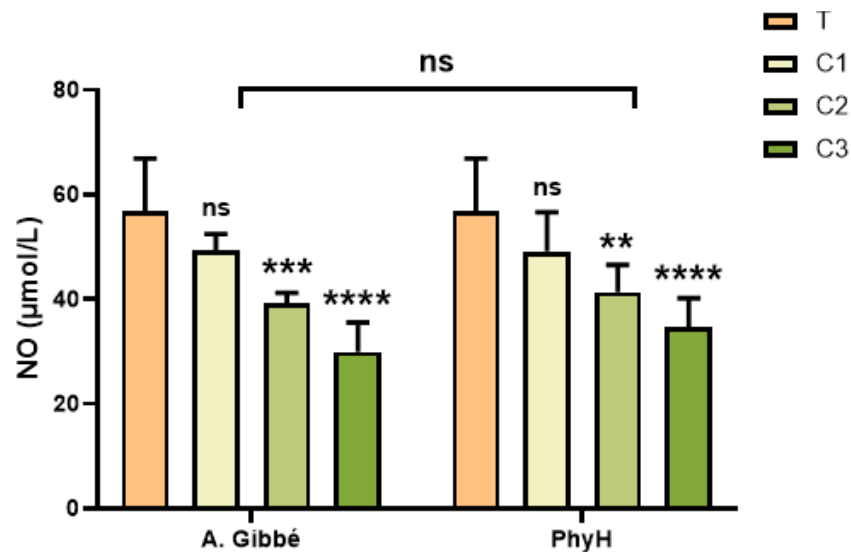
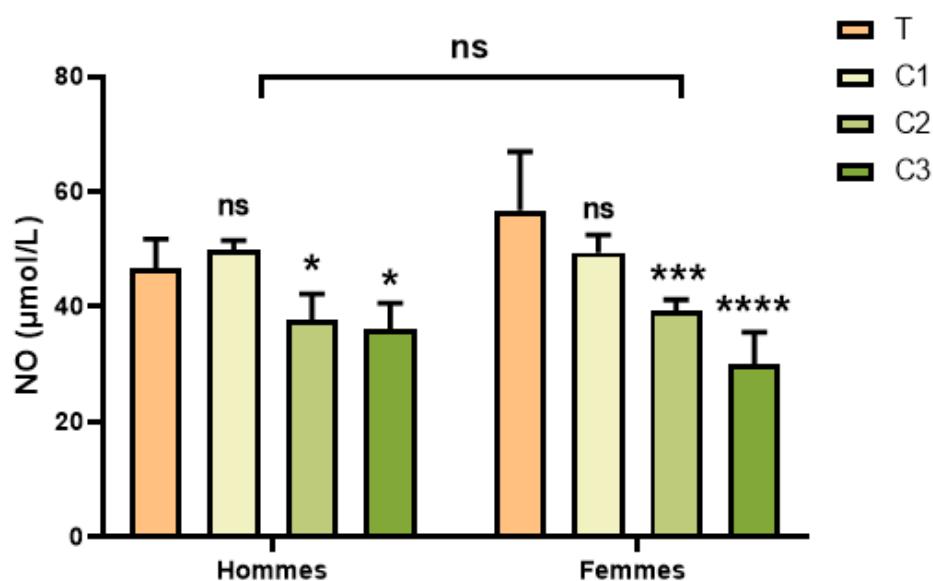


Figure 18: Effet de l'Acide gibbérellique et des phytohormones sur la production de NO par les PBMCs des patients de sexe masculin (A) et féminin (B) atteints de LES, **ns**= no significant difference, *= $P < 0.05$. Données exprimées en moyenne et écart-type. [**A. Gibbé**]: C1=5 $\mu\text{g/mL}$, C2=10 $\mu\text{g/mL}$, C3=50 $\mu\text{g/mL}$. [**PhytoH**]: C1=2.5 $\mu\text{l/mL}$, C2= 5 $\mu\text{l/mL}$, C3= 25 $\mu\text{l/mL}$.

A



B

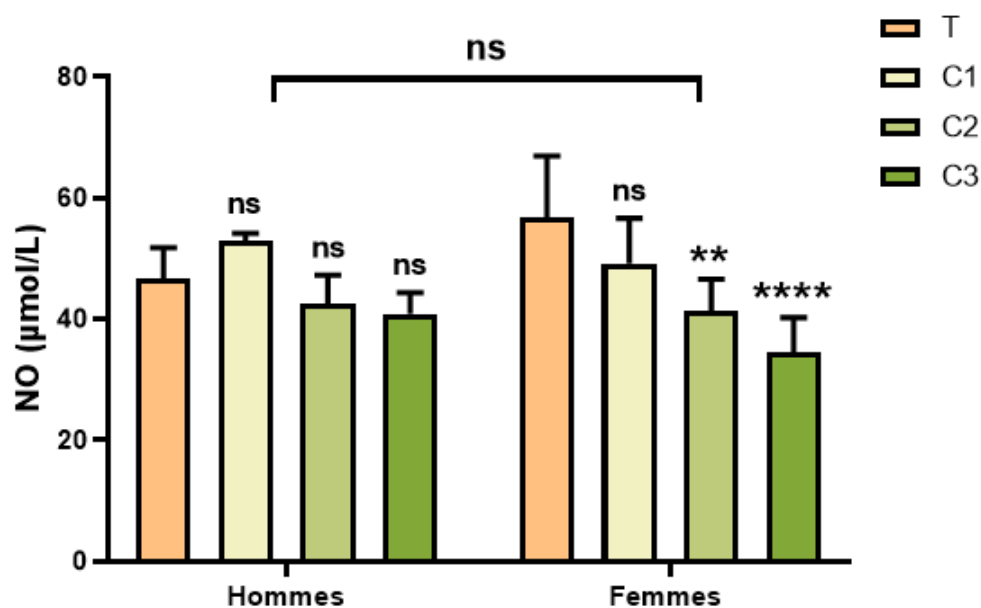


Figure 19: Effet de l'Acide gibbérellique (A) et les phytohormones (B) sur la production de NO par les PBMCs des hommes et des femmes, **ns**= no significant difference, *= P<0.05, ***= P<0.001, ****= P<0.0001. Données exprimées en moyenne et écart-type. **[A. Gibbé]**: C1=5 $\mu\text{g/mL}$, C2=10 $\mu\text{g/mL}$, C3=50 $\mu\text{g/mL}$, **[PhytoH]**: C1=2.5 $\mu\text{l/mL}$, C2= 5 $\mu\text{l/mL}$, C3= 25 $\mu\text{l/mL}$.

III.4. La production *in-vitro* du NO après le traitement par l'Acide gibbérannique au cours de stade actif et de rémission du lupus

Nous avons cherché à déterminer si l'acide gibbérannique a la même efficacité dans les deux phases de la maladie. Les résultats obtenus ont montré une diminution significative des concentrations du NO chez les patients en phase active après la concentration 10 μ g/mL, et 50 μ g/m, cet effet était d'une manière proportionnelle à la dose, alors qu'une différence significative n'a été observée qu'avec la concentration 50 μ g/mL ,pour les patients en phase de remissions une légère diminution non significative pour la première et la deuxième concentration AG mais le traitement par la troisième concentration a montré une diminution significative avec $P<0.001$.

Malgré ces observations, le test ANOVA à deux facteurs a montré l'absence de différence réelle entre les patients en phase active et les patients en rémission pour la diminution de NO (**figure 20**).

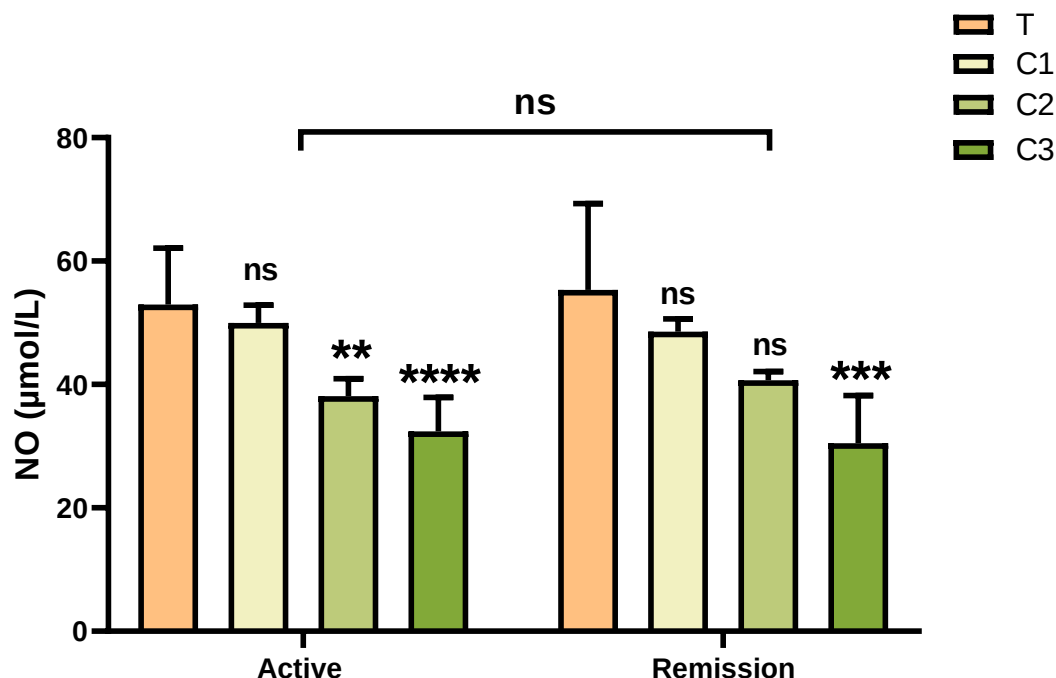


Figure 20: Effet de l'Acide gibbérannique sur la production de NO par les PBMCs des patients en phase active et en rémission, **ns**= no significant difference, * = $P<0.05$ ** = $P<0.01$, *** = $P<0.001$,

****= $P < 0.0001$ Données exprimées en moyenne et écart-type. [A. Gibbé]: C1=5 $\mu\text{g/mL}$, C2=10 $\mu\text{g/mL}$, C3=50 $\mu\text{g/mL}$.

III.5. La production in-vitro du NO après le traitement par phytohormones origine bactériennes au cours de stade actif et de rémission du lupus

Les résultats obtenus ont montré une légère diminution non significative de la production du NO par les PBMCs traités avec les concentrations 2.5 et 5 $\mu\text{l/mL}$, alors qu'une diminution significative n'a été observée qu'avec la concentration de 25 $\mu\text{l/mL}$ chez les patients en phase active et même pour les patients en phase en rémissions.

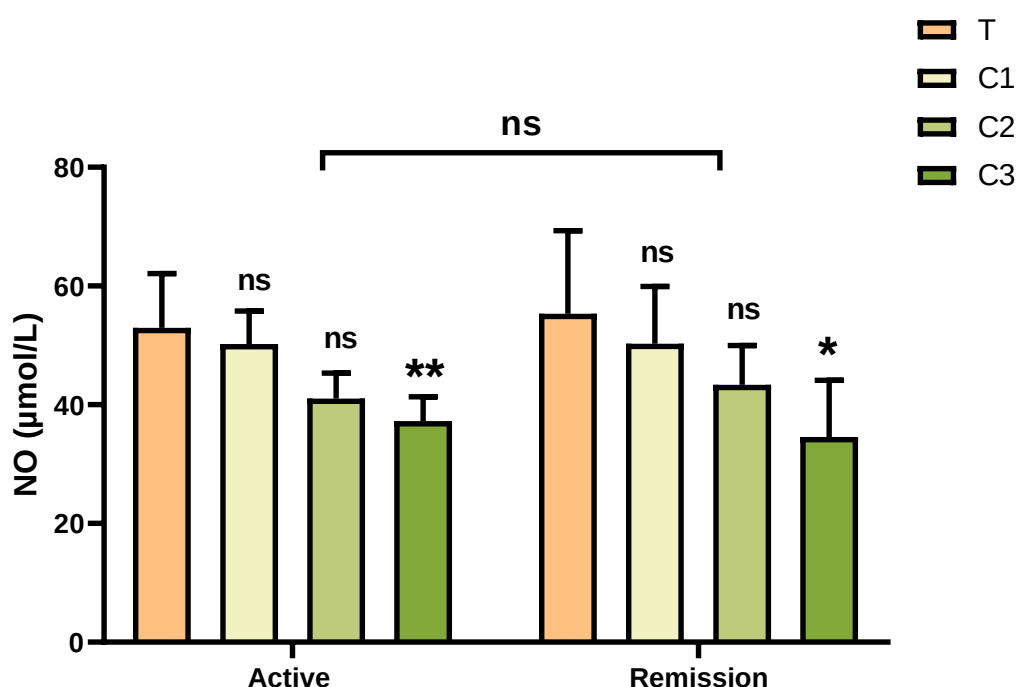


Figure 21: Effet de phytohormones origine bactériennes sur la production de NO par les PBMCs des patients en phase active et en rémission, ns= no significant différence, *= $P < 0.05$ **= $P < 0.01$. Données exprimées en moyenne et écart-type. [PhytoH]: C1=2.5 $\mu\text{l/mL}$, C2= 5 $\mu\text{l/mL}$, C3= 25 $\mu\text{l/mL}$. [A. Gibbé]: C1=5 $\mu\text{g/mL}$, C2=10 $\mu\text{g/mL}$, C3=50 $\mu\text{g/mL}$.

III.6. étude de corrélation entre les doses Effet de l'acide gibbérellique et les phytohormones d'origine bactériennes sur la production de NO chez les patients atteints du lupus

III.6.1 Effet de l'acide gibbérellique

Dans notre étude, nous avons observé que le traitement par l'acide gibbérellique a diminué significativement les niveaux de NO chez les patients atteints du lupus en fonction de la concentration de l'acide gibbérellique ($P < 0.05$) (**figure 22-A**).

III.6.2 Effet des Phytohormones d'origine bactériennes

D'autre part, nous avons également constaté une diminution significative les niveaux de NO chez les patients atteints du lupus traités avec des phytohormones en fonction de la concentration (**figure 22-B**).

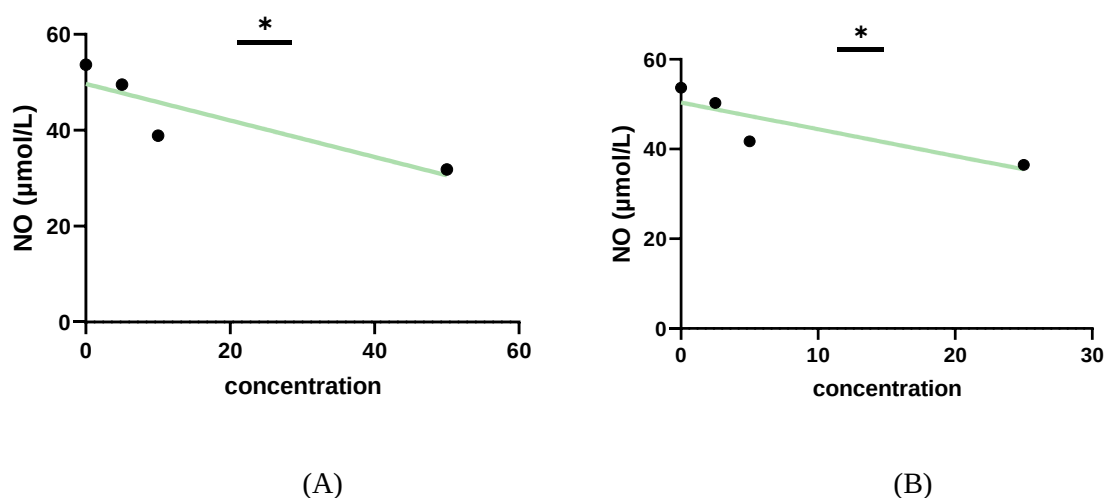


Figure 22: Effet de diverses concentrations de l'acide gibbérellique (A) et les phytohormones d'origine bactériennes (B) sur la production du NO par les PBMC des patients atteints du lupus * : $p < 0.05$.

III.2. Discussion

Le lupus érythémateux disséminé 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.

L'objectif principal du traitement consiste à atténuer les symptômes, à limiter les dommages tissulaires, à réduire la fréquence et la gravité des récives, ainsi qu'à prévenir les complications potentiellement mortelles (**Kasturi et al., 2016**). Toutefois, les traitements conventionnels présentent des effets indésirables importants lorsqu'ils sont utilisés à long terme. Actuellement, des alternatives biologiques, telles que les extraits de plantes, sont proposés. Cependant, la collecte excessive et incontrôlée de ces plantes peut poser un véritable dilemme environnemental, ce qui pourrait limiter le rendement et la production de ces nouveaux traitements biologiques potentiels. Afin de préserver le patrimoine végétal, il est nécessaire de mener d'autres études pour explorer les molécules bioactives produites par d'autres règnes biologiques, tels que les bactéries.

Les phytohormones sont des régulateurs végétaux essentiels dans une myriade de processus physiologiques, y compris la résistance au stress. Cependant, ces molécules présentent également des activités biologiques sur les cellules humaines. De plus, des études ont été menées sur les effets des phytohormones, démontrant leur effet anti-inflammatoire qui inhibent plusieurs troubles liés à l'inflammation. Par exemple, le traitement à l'ABA chez l'homme et les modèles animaux montre des effets bénéfiques contre un large éventail de maladies liées à l'inflammation, telles que le diabète de type 2 (T2D), la colite (**Woo Kim et al., 2020**). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet de l'acide indole-3-acétique (IAA ; l'auxine la plus connue) d'origine bactérienne et de l'acide gibbérellique issu des plantes sur la production de monoxyde d'azote (NO) produit par les PBMCs dans le contexte de la maladie lupus.

La voie NF- κ B participe à l'activation de l'iNOS conduisant à la production d'oxyde nitrique (NO). La fonction du NO a été décrite dans une variété de processus inflammatoires. Il a été démontré que le NO impliquée dans la physiopathologie de la maladie lupique par le pouvoir pathogène qui repose sur la génération des espèces réactives de l'azote

qui sont majoritairement présents chez les patients au cours de la phase active de la maladie **(Pan et al., 2020)**

Le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) est un facteur de transcription hétérodimérique qui régule les réponses inflammatoires via la promotion de l'expression de divers gènes inflammatoires et la production de certains marqueurs pro-inflammatoires tels que les cytokines. En ce qui concerne ce fait, NF- κ B, en tant que médiateur crucial de l'inflammation, sert de cible principale pour la prévention et le traitement de l'inflammation **(Roshanravan et al., 2021)**.

A notre connaissance, Aucune étude n'a été faite afin de montrer l'effet des phytohormones origine bactériennes sur les PBMCs et sur la production de NO au cours de la maladie Lupus, Notre étude a été menée dans cette optique. Dans notre étude, les résultats ont montré une diminution significative dans la production de NO chez les patients et les témoins d'après le traitement par (10- 50 μ g/ml) et (5 - 25 μ l/ml) d'Acide gibbéréllique et les phytohormones respectivement ; De plus, nous avons observé que le traitement aux phytohormones issus des plantes réduisait significativement les niveaux de NO chez les patients d'une manière dose dépendante. Comparant avec l'effet d'acide gibbéréllique les deux extraits donnent des résultats similaires.

D'une part, ces résultats suggèrent que l'acide gibbéréllique peut avoir des propriétés anti-inflammatoires. D'autre part les phytohormones issues des bactéries prouvent également leur capacité à réduire les niveaux de production de NO par les cellules immunitaires, Effectivement, il a été rapporté que ces deux molécules possèdent une puissante activité anti-inflammatoire par inhibition des voies de signalisation inflammatoires. Aussi, Des études récentes ont rapporté une activité anti-inflammatoire intéressante pour les phytohormones principalement GR24 un analogue de SL, par leur capacité d'inhibition de manière significative la libération du NO par diminution des phosphorylation de NF- κ B et (protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) dans les cellules stimulées par le lipopolysaccharides LPS, ainsi que les niveaux de TNF- α et IL-6, par rapport à la glucocorticoïde. **(Dell'Oste et al., 2021)**. De même, des preuves plus récentes ont révélé que le GA-13315 inhibait la croissance et la prolifération des cellules tumorales buccales, mammaires et leucémiques en exerçant une activité anti-angiogénique **(Zhang et al., 2012; Shen et Tang, 2017)**

On suggère que le traitement par acide gibbérellique diminue les taux de monoxyde d'azote au cours de la maladie lupique par deux mécanismes ; soit par l'inhibition de la voie de signalisation NFκB au niveau transrationnel et donc l'absence de l'enzyme iNOS, ou par le blocage de l'action catalytique d'iNOS, ainsi que l'acide indole-3-acétique (IAA) module activité iNOS par inhibition de la voie NFκB.

De plus, notre étude a traité l'effet de l'acide gibbérellique et phytohormones d'origine bactériennes en fonction du stade de la maladie, les résultats ont montré une diminution de taux de NO à la fois en phase active et en rémission, ce qui indique une efficacité importante des deux extraits vu leur capacité à diminuer l'inflammation même au cours des phases actives caractérisées par une tempête cytokines.

Un autre critère a été étudié dont l'influence de sexe sur l'effet de l'acide gibbérellique et des Phytohormones , notre analyse ANOVA de deux facteurs n'a montrée aucune différence significative entre les deux sexes malgré Les résultats n'a pas montré une diminution significative dans le niveau de NO chez les patients de sexe masculin après le traitement par les phytoH tandis que chez le sexe féminine la diminution était hautement significative , cela explique par la prédominance féminine dans notre population , suggérant que le traitement par l'acide gibbérellique et les phytoH d'origine bactériennes peut affecter la production de NO chez les hommes et les femmes. Les deux sexes répondent positivement au deux traitements.

En vue générale des résultats on suggère que les phytohormones d'origine bactériennes pourraient être des molécules thérapeutiques potentielles et alternatives pour la modulation de l'inflammation au cours de la maladie lupus.

Chapitre 4

Conclusion et perspectives

IV.1. Conclusion

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des phytohormones issues des bactéries sur les patients atteints de la maladie lupus. Notre étude nous a permis de démontrer pour la première fois que les phytohormones issues des bactéries donnent une diminution dans la production du marqueur inflammatoire NO par les PBMCs d'une manière dose dépendante. L'effet de la molécule était efficace chez les patients en phase active ainsi qu'en phase de rémission. De plus, on n'a pas marqué d'effet différentiel de sexe sur l'effet de la molécule.

L'ensemble de ces résultats nous amènent à suggérer que les phytohormones ont une activité anti-inflammatoire qui peut représenter une nouvelle approche dans le traitement des maladies auto-immunes chroniques, notamment le lupus érythémateux systémique, sachant que les phytohormones issues des bactéries pourraient représenter une source peu coûteuse et plus bénéfique dans les nouvelles thérapies. Cependant, Notre étude a été limitée par le manque d'échantillons en raison de contraintes de temps et manque de réactifs, d'autres études devraient être effectuées afin de mieux comprendre le mécanisme d'effet de cette molécule sur les cellules immunitaires.

IV.2. Perspectives

- ✓ Elargir l'échantillonnage pour confirmer les résultats obtenus.
- ✓ Dosage des cytokines afin de confirmer l'effet anti-inflammatoire de la molécule.
- ✓ Tester l'acide gibbérellique origine bactérienne *in-vivo* sur un modèle expérimentale de la maladie de lupus.

Références bibliographique

A

- Achtman JC., Werth,VP.**(2015). Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 10,17(1):182.
- Adedayo, A.A.; Babalola, O.O.**(2023). Fungi That Promote Plant Growth in the RhizosphereBoostCropGrowth. *J. Fungi* .
- Afrashteh,N.M., Ghorbaninezhad,F., Asadzadeh,Z., Baghbanzadeh,A., et al.,**(2023). The emergingrole of noncodingRNAs in systemic lupus erythematosus: new insights into the master regulators of diseasepathogenesis. *TherAdvChronic* .
- AgeraDilnashin, HareramBirla, Trinh, X. H.,et al.,**(2020).Chapter 32 - Applications of agriculturally important microorganisms for sustainablecropproduction.*AcademicPress*.
- An, J., Briggs ,TA., Dumax-Vorzet ,A., Alarcón-Riquelme ,ME., Belot, A., Beresford ,M., Bruce, IN et al.,** (2017). Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Deficiency in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *ArthritisRheumatol*, 69,1,131-142.
- Anders HJ, Saxena R, Zhao MH, Parodis I, Salmon JE, Mohan C** (2020). Lupus nephritis. *Nat Rev Dis Primers* ,6,1,7.
- Apostolidis, S. A., Crispin, J. C.,Tsokos, G. C.** (2011). IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus*, 20, 120-124.
- Aringer M, Smolen JS** (2005) Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus*,4,1,13-8 .
- Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al.** (2019). European League against Rheumatism/American College of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*.
- Avinani, A., Ashraf-Ganjouei, A., Aslani, S., et al.** (2019) .Exploring the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: agenetic perspective. *Immunogenetics*, **71**, 283–297.

B

- Baliño, P., Gómez,Cadenas.A., López-Malo ,D., Romero ,FJ., Muriach,M.(2019).Is There A Role for Absciscic Acid, A Proven Anti-Inflammatory Agent.in the Treatment of IschemicRetinopathiesAntioxidants (Basel), 17;8(4):104.

Barbhaiya, M., Costenbader, K. H. (2016). Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* ,28, 497-505.

Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* ,7, 49-56.

Basta F, Fasola F, Triantafyllis K, Schwarting A (2020) Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Therapy: The Old and the New. *Rheumatol Ther*.

Bertsias GK, Pamfil C, Fanouriakis A, et al . (2013) Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the time come? *Nat Rev Rheumatol* .

Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. (2004) Survivre au papillon et au loup : tendances de la mortalité dans le lupus érythémateux disséminé. *Autoimmun Rev*.

Brown JM, Archer AJ, Pfau JC, Holian A (2003) Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. *Clin Exp Immunol*.

C

Choi, J. Y., et al., (2015). Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol* .

Chunyan, Ma., Yu, Xia., Qingrui, Yang., Yueran, Zhao. (2019). The contribution of macrophages to systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 207, 1-9

D

Delgado-Rizo, V., Martínez Guzmán, MA., Iñiguez-Gutierrez, L., García-Orozco, A., Alvarado, Navarro. A ., Fafutis-Morris. M . (2017). Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front. Immunol*, 8(81), 1-20.

Dell'Oste., V., Spyridakis, F., Prandi, C. (2021). Strigolactones, from Plants to Human Health: Achievements and Challenges. *Molecules*, 26, 4579.

F

Fawzy M, Edrees A, Okasha H, El Ashmaui A, Ragab G (2016) Gastrointestinal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Lupus*.

G

George,C. Tsokos., Mindy,S. Lo.,Costa.Reis.P., Sullivan, K. E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*,12 ,716-730.

Gladman DD, Urowitz MB, Rahman P, Ibañez D, Tam LS. (2003) . Accumulation de lésions organiques au fil du temps chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé. *J Rhumatol*.

Gu MM, Wang XP, Cheng QY, Zhao YL, Zhang TP, Li BZ, Ye DQ (2019). A meta-analysis of cardiovascular events in systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest*.

H

Hochberg MC. (1997) Updating the American College of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* .

J

Justiz Vaillant AA, Goyal A, Varacallo M; (2022).Systemic Lupus Erythematosus. StatPearls Publishing, Treasure Island.

K

Kasturi, S., Sammaritano,LR.(2015). Corticosteroids in Lupus. *Rheum Dis Clin North Am*,42(1),47-62.

Keswani,C., Singh, SP., Cueto,L., García-Estrada,C., Mezaache-Aichour,S., Glare,TR., Borriss, R., Blázquez MA., Sansinenea,E.(2020).Auxins of microbialorigin and their use in agriculture. *ApplMicrobiol Biotechnol*.

koga, T., Ichinose, K., Tsokos,GC.(2017). T cells and IL-17 in lupus nephritis. *Clin Immunol*, 185,95-99.

L

L,Arnaud. (2022).Épidémiologie du lupus systémique : des approches traditionnelles aux méga-données.Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine,Volume 206(1), 17-22.

Lee SJ, Silverman E, Bargman JM. (2011) Le rôle des agents antipaludiques dans le traitement du LED et de la néphrite lupique. *Nat Rev Nephrol*.

M

Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al (1999). Les souris transgéniques pour BAFF développent des troubles lymphocytaires ainsi que des manifestations auto-immunes.

Madhubala,Sharma.,Pandiarajan,Vignesh.,Karalanglin,Tiewsoh.,AmitRawat .(2020).Revisiting the complement system in systemic lupus erythematosus. Expert Review of ClinicalImmunology.

Malgorzata J Podolska ,Mona HC Biermann., Christian Maueröder ,Jonas Hahn.,MartinHerrmann.(2015).Inflammatoryetiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update.Journal of Inflammation Research.

Martínez T, Garcia-Robledo JE, Plata I, et al.(2019) Mécanismes d'action et faits historiques sur l'utilisation des immunoglobulines intraveineuses dans le lupus érythémateux disséminé. Autoimmun.

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

Monteiro BG, Pizarro CB (2022). Environmental and occupational exposures in the development of systemic lupus erythematosus in adults: a narrative review. Rheumatology.

Mukherjee ,A., Gaurav, AK., Singh, S., Yadav ,S., Bhowmick ,S., Abeysinghe ,S., Verma,JP.(2022). The bioactive potential of phytohormones: A review. BiotechnolRep .

N

Nadine,Dragin., Rozen,Le.Panse., Sonia,Berrih-Aknin.(2017). Prédiposition aux pathologies auto-immunes Les hommes ne manquent pas « d'Aire ». médecine/sciences, 33,169-75.

P

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.

Pan,L., Lu,MP., Wang,JH., Xu,M., Yang,SR.(2020).Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr*,16(1),19-30.

Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, et al. (2012) Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.

Pisetsky DS, Spencer DM, Lipsky PE, et al. Assay variation in the detection of antinuclear antibodies in the sera of patients with established SLE. *Ann Rheum Dis* 2018;77:911–3.doi:10.1136/annrheumdis-2017-

R

Roshanravan, N., Shabestari, A. N., Alamdari, N. M., Ostadrahimi, A.,et al. (2021). A novel inflammatory signaling pathway in patients with slow coronary flow: NF-κB/IL-1β/nitric oxide. *Cytokine*, 143, 155511

Rovin BH, Furie R, Latinis K, et al. (2012) Efficacité et innocuité du rituximab chez les patients atteints de néphrite lupique proliférative active : l'étude d'évaluation de la néphrite lupique avec le rituximab. *Arthrite Rheum*.

S

Sakthiswary R, D'Cruz D. (2014) Immunoglobuline intraveineuse dans l'arsenal thérapeutique du lupus érythémateux disséminé : revue systématique et méta-analyse. *Médecine (Baltimore)* .

Schwartz N, Stock AD, Putterman C (2019) . Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat Rev Rheumatol*.

Seo,WooKim., Alain,Goossens., Claude,Libert., FilipVan,Immerseel., Jens ,Staala., Rudi,Beyaert.(2020).Biochemical Pharmacology,175, 113866

Su R, Li Z, Wang Y, et al. (2020) Imbalance between Th17 and regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus combined EBV/CMV viraemia. Clin Exp Rheumatol.

T

Thien, M.,et al., (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cellsfromperipheraldeletion and allowsthem to enter for biddenfollicular and marginal zone niches. Immunity ,20, 785-798.

Tosan,P.,Omayone.,Faizah,T.,Salami.,etal.,.(2023).Neuroprotectiveeffectsofmethyljasmonate in male Wistar rats exposed to delayedaceticacid-inducedulcerativecolitis: involvement of antioxidantstatus, GFAP, and IBA-1 immunoreactivities. *Metabolic Brain Disease* ,38(2), 671-

V

Vaglio A, Grayson PC, Fenaroli P, Gianfreda D, Boccaletti V, Ghiggeri GM, Moroni G(2018)Drug-induced lupus: traditional and new concepts. Autoimmun Rev.

Y

Yu C, Chang C, Zhang J: (2013)Immunologic and genetic considerations of cutaneous lupus erythematosus: a comprehensive review. J Autoimmun.

Z

Zheng, J. X., Han, Y. S., Wang, J. C., Yang, H., Kong, H., Liu, K. J., Chen, S. Y., Chen, Y. R., Chang, Y. Q., Chen, W. M., Guo, J. L., & Sun, P. H. (2018). Strigolactones: A plant phytohormone as novel anti-inflammatory agents. MedChemComm, 9(1), 181–188.

Annexes

Annexe 01

Les gènes associés au LES

Tableau 1 | Gènes de susceptibilité SLE identifiés par GWAS

Voie(s)	Locus impliqués dans le LES et d'autres maladies auto-immunes	Locus impliqués uniquement dans le LES
Lymphocyte Activation	<i>PTPN22, TNFSF4, IL10, SPRED2, STAT4, PXX, AFF1, IL12A, BANK1, TCF7, SKP1</i> , gènes MHC, <i>IKZF1</i> et <i>IKZF3</i> , <i>BLK, ARID5B, CD44, LYN, ETS1, FLI1, SH2B3, CSK, ELF1, CIITA, ITGAM, TYK2</i>	<i>IKZF2</i>
IFN ou Toll-like récepteurs	<i>IFIH1, PRDM1, UHRF1BP1, TNFAIP3, IRF5-TNPO3, IRF7et IRF8, SOCS1, PRKCB, UBE2L3, IRAK1</i>	Aucun
Inflammation	<i>TNIP1</i>	Aucun
Complexe immunitaire ou élimination des déchets	<i>FCGR2A, FCGR2B, FCGR3B, ATG5, CLEC16A</i>	<i>NCF2, LYST</i>
Inconnu	<i>ABHD6</i> (peut être lié à l'activation des lymphocytes), <i>RAD51B</i> (peut être lié aux voies IFN), <i>MECP2</i> (peut être lié aux voies IFN), <i>RASGRP3, TMEM39A, PITG1, TNXB, JAZF1, XKR6, FAM167A-AS1, WDFY4</i> , gènes inconnus : rs1167796, rs463128, rs7186852, rs7197475	<i>SMG7</i> (peut être lié aux voies de l'interféron), <i>DHCR7, NADSYN1, SLC15A4, PLD2, CXorf21</i>

GWAS, études d'association à l'échelle du génome ; IFN, interféron ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; LES, lupus systémique érythémateux.

Les facteurs environnementaux, génétique et épigénétique qui augmentent la susceptibilité du LES

Facteurs	Description	Voie affectée
<i>Facteurs environnementaux</i>		
Ultraviolets	▪ Apoptose des kératinocytes ²³	Auto-antigènes
Hormones	▪ Augmentation de la survie et de l'activation de B auto-réactifs ^{24,25}	Tolérance
Infections virales	▪ Virus Epstein-Barr : Réactivité croisée avec EBNA-1 ²⁶ ▪ Rétrovirus endogènes : Réactivité croisée avec p30 ^{gag} ²⁷ , diminution de l'expression de Fas ²⁸	Tolérance
<i>Facteurs génétiques</i>		
PTPN22	▪ Diminution du seuil d'activation nécessaire au récepteur des LT ^{29,30}	Tolérance
TYK2	▪ Augmentation de la signalisation IFN de type I ^{31,32}	Inflammation
ITGAM	▪ Diminution de la phagocytose des complexes immuns et des éléments reconnus par le complément ^{33,34}	Auto-antigènes
<i>Facteurs épigénétiques</i>		
Hypométhylation	▪ Augmentation de l'expression des gènes stimulés par IFN (ISG) ³⁵	Inflammation
Modifications post-traductionnelles d'histones	▪ Hyperacétylation : Augmentation de l'expression de gènes cibles d'IRF1 ³⁶	Inflammation
Hydroxyméthylation des cytosines	▪ Induit l'hypométhylation de gènes impliqués dans le LES ³⁷	Tolérance Inflammation
MicroARN	▪ Hyperactivation des LB ³⁸ ▪ Hyperactivation des LT ³⁹	Tolérance

Les molécules de signaux au cours de la processus de l'apoptose et l'éferocytose

Signal	Signaling molecules
"Find me"	Fractalkine (CX3CL1) Sphingosine-1-phosphate (S1P) Adenosine triphosphate (ATP) Lysophosphatidylcholine (LPC)
"Eat me"	Phosphatidylserine (PS)
"Stay away"	Lactoferrin (LF)
"Tolerate me"	Transforming growth factor beta (TGF-β) Interleukin 10 (IL-10)

Annexe 02

CONSENTEMENT

Relatif aux échantillons biologiques de patients pour la constitution d'une
Collection Biologique pour une recherche sur la Maladie de Behçet

Je soussigné(e),

Nom (Majuscules):..... Prénom:.....

Date de naissance:

Considérant disposer des informations qui me permettent de prendre ma
décision, donne mon accord pour:

**Point 1: de pouvoir utiliser pour des activités de recherche concernant ma
maladie des restes d'échantillons biologiques existants (sang, tissus, liquides
biologiques, etc...) concernant que les laboratoires pourraient déjà avoir dans
leurs congélateurs.**

**Point 2: de pouvoir conserver le volume restant des échantillons biologiques
qui seront recueillis dans le cadre de ma prise en charge habituelle (sang,
tissus, liquides biologiques, etc...), une fois les analyses prescrites par mon
médecin réalisées par le laboratoire.**

**Point 3: un prélèvement sanguin effectué hors de ma prise en charge habituelle
dans le cadre de la recherche.**

J'ai bien compris que des données personnelles, cliniques et biologiques,
seront associées aux échantillons conservés. J'accepte que les données
enregistrées à l'occasion des recherches puissent faire l'objet d'un traitement
informatisé codé sans mention du nom et du prénom.

Après avoir discuté librement et obtenu réponse à toutes mes questions,
j'accepte librement et volontairement de participer à cette collection
biologique, dans les conditions précisées selon les consentements donnés ci-
dessus.

Fait à, le ____/____/____

Signature

موافقة

متعلقة بجمع عينات بيولوجية من المرضى المصابين
بمرض بهجت لهدف القيام بأبحاث علمية

أنا الموقع (ة) أسفله،

اللقب: الاسم:

تاريخ الميلاد:

نظرا لحصولي على المعلومات اللازمة التي تسمح لي باتخاذ قرار، و بكامل قواي العقلية و إرادتي المنفردة أوافق موافقة تامة على:

النقطة 1: إمكانية استخدام بقايا العينات البيولوجية الموجودة بالفعل في ثلاجات المختبرات (الدم ، الأنسجة والسوائل البيولوجية ، إلخ ...) في الأنشطة البحثية المتعلقة بمرضي.

النقطة 2: إمكانية الاحتفاظ ببقايا العينات البيولوجية التي سيتم جمعها كجزء من علاجي المعتاد (الدم ، الأنسجة ، والسوائل البيولوجية ، وما إلى ذلك) ، بمجرد إجراء التحليلات التي وصفها طبيبي من قبل المختبر .

النقطة 3: إمكانية أخذ عينة من الدم خارج نطاق رعايتي المعتادة, وذلك في سياق البحث .

أفهم أن البيانات الشخصية والسريية والبيولوجية سترتبط بالعينات المخزنة , و أوافق على أن يتم تسجيلها دون ذكر الاسم و اللقب.

بعد أن ناقشت بحرية وحصلت على إجابات لجميع أسئلتي ، أوافق بحرية وطوعية على المشاركة في هذه المجموعة البيولوجية ، وفقاً للشروط المحددة الواردة أعلاه.

حُرر في ، بتاريخ / /

.....

التوقيع

Fiche de renseignement

N° d'identification :

Date :

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Adresse (Willaya d'origine) :

Sexe :

N° de téléphone :

Hospitalisé ☐Externe ☐

Service :

CHU :

Début de symptomatologie :

Signes cliniques majeurs :

.....

.....

Signes cliniques le jour de prélèvement :

.....

.....

Traitement : début de prise :

.....

Examen HLA :

COVID-19 : Oui ☐ Non ☐ test PCR ☐ test antigénique ☐ test sérologique ☐**Observations :**Fumeur : Oui ☐ Non ☐

Autres maladies :

.....

.....

.....

.....

Remarques

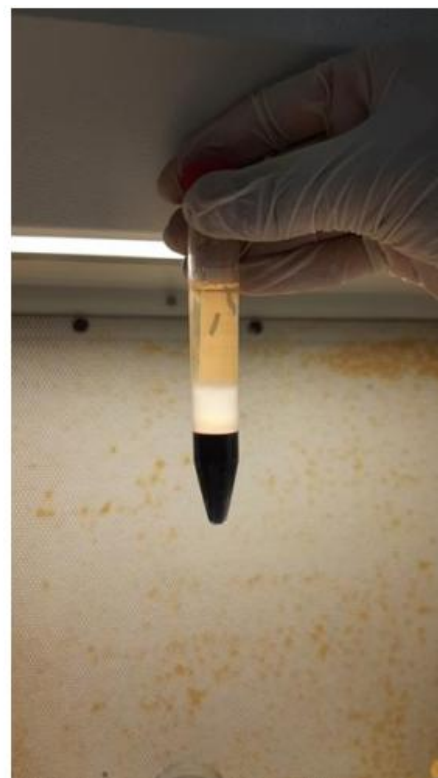
Annexe 03



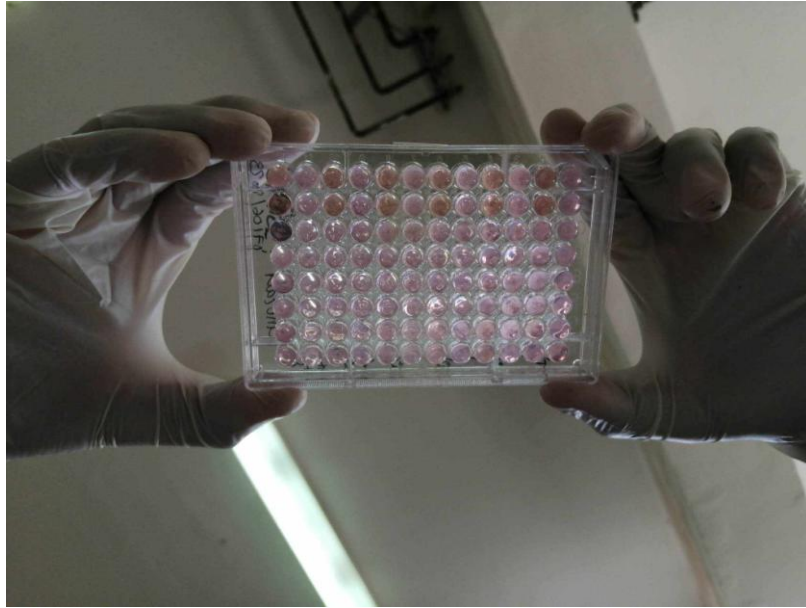
Prélèvement sanguin d'un sujet sain



Les deux solutions ; PBS et l'ACK

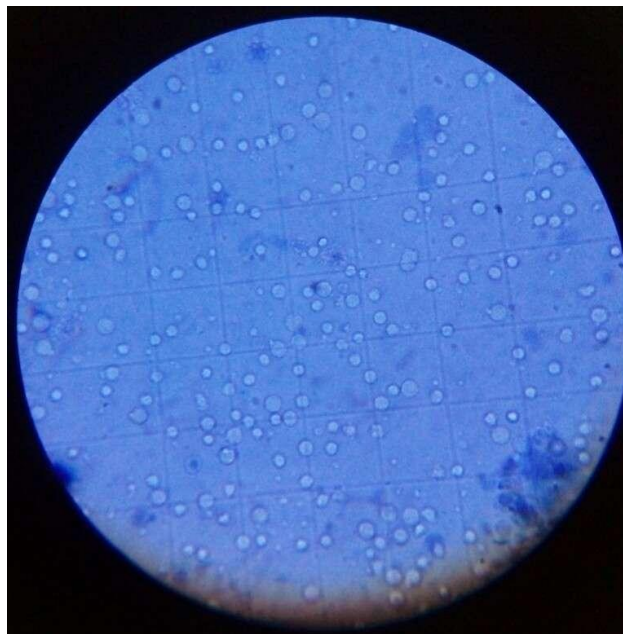


Les différents composants de sang après la centrifugation



Milieu de culture des PBMC Avec l'A.Gibée et les Phyt H .

Test de viabilité



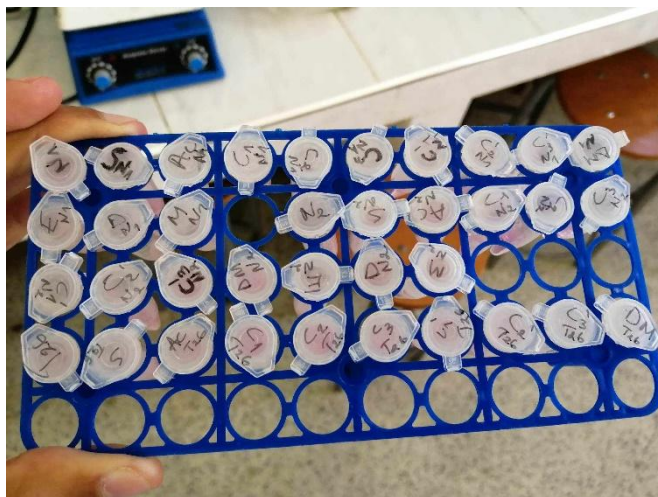
Vu microscopique des PBMC avant culture cellulaire



Incubation du milieu de culture



milieu de culture des PBMC



La suspension cellulaire obtenue d'après la période d'incubation des PBMC





Courbe étalant de dosage de NO

الذئبة الحمامية المنتشرة نظاميًا هي مرض مناعي ذاتي يتمتع بتنوع سريري واسع ويتميز بإنتاج مجموعة واسعة من الأجسام المضادة الذاتية، بعضها له دور مباشر في الإصابة بالمرض. واحدة من العلامات الالتهابية الرئيسية المرتبطة بهذا المرض هي أكسيد النيتريك. تم إجراء دراسات حول آثار الفيتوهورمونات، مما يثبت فعاليتها المضادة للالتهابات. تهدف دراستنا إلى استكشاف وتقييم تأثير مجمع الفيتوهورمونات المشتقة من البكتيريا وقوتها المحتملة في تعديل/تقليل مستويات إنتاج أكسيد النيتريك من قبل خلية الدم الطرفية البشرية أحادية النوية (PBMCs) في مرضى الذئبة الحمامية المنتشرة نظاميًا، وكذلك مقارنة تأثيرها بتأثير فيتوهورمونات (حمض الجبيريليك) المستمدة من النباتات، مع مراعاة الجنس (ذكر/أنثى) والمراحل النشطة والهدوء في المرض. يعد هذا دراسة توقعية تشمل 10 مرضى يعانون من الذئبة الحمامية المنتشرة نظاميًا. كانت متوسط أعمار مرضانا في الدراسة 40.375 عامًا، مع نسبة الجنس (أنثى/ذكر) تبلغ 2.33. كانت مستويات أكسيد النيتريك مرتفعة بشكل ملحوظ في 100% من الحالات. عند تحليل النتائج المحصل عليها، لاحظنا انخفاضًا كبيرًا في مستويات أكسيد النيتريك بفضل المعالجتين. في الختام، وفي حين تأكيد القدرة الخفضية للالتهابات للفيتوهورمونات المستمدة من النباتات، تسلط دراستنا الضوء أيضًا على التأثير المدهش للفيتوهورمونات المشتقة من البكتيريا في تقليل العلامات الالتهابية. تؤكد هذه البيانات أهمية البدائل البيولوجية في النهج العلاجي وإدارة الإنتاج، مما يؤدي إلى تحسين رعاية المرض.

الكلمات المفتاحية: الذئبة الحمامية المنتشرة نظاميًا، أكسيد النيتريك، الفيتوهورمونات، الالتهاب.

Résumé

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune dotée d'un grand polymorphisme clinique et caractérisée par la production d'une grande variété d'auto-anticorps, dont certains ont un rôle pathogène direct. L'un des marqueurs inflammatoires majeurs impliqués dans cette maladie est le monoxyde d'azote. Des études ont été menées sur les effets des phytohormones, démontrant leur effet anti-inflammatoire. Notre étude vise à explorer et évaluer l'effet d'un complexe de phytohormones d'origine bactérienne et leur potentiel pouvoir modulateur/réducteur des niveaux de production de NO par les PBMCs chez les patients atteints de LES, ainsi qu'à comparer leur effet avec celui des phytohormones (Acide Gibbérellique) issues des plantes, en tenant compte du sexe F/H et des deux phases de la maladie (activité et rémission). Il s'agit d'une étude prospective portant sur 10 patients atteints de LES. La moyenne d'âge des patients de notre étude était de 40,375 ans, avec un sex-ratio F/H de 2,33. Les niveaux de NO étaient significativement élevés chez 100% des cas. En analysant les résultats obtenus, nous avons constaté des diminutions importantes dans les niveaux de NO grâce aux deux traitements.

En conclusion, tout en confirmant le pouvoir réducteur de l'inflammation des phytohormones issues des plantes, notre étude met également en évidence l'effet spectaculaire des phytohormones d'origine bactérienne sur la réduction des marqueurs inflammatoires. Ces données soulignent l'importance des alternatives biologiques dans la démarche thérapeutique et dans la gestion de la production (rendement), permettant une meilleure prise en charge de la maladie.

Mots clés : lupus érythémateux systémique , Monoxyde d'azote, Phytohormones, Inflammation.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a wide clinical polymorphism and the production of a variety of autoantibodies, some of which have a direct pathogenic role. One of the major inflammatory markers involved in this disease is nitric oxide (NO). Studies have been conducted on the effects of phytohormones, demonstrating their anti-inflammatory effect. Our study aims to explore and evaluate the effect of a complex of bacterial-derived phytohormones and their potential modulatory/reducing power on NO production levels by PBMCs in patients with SLE. We also aim to compare their effect with that of phytohormones (Gibberellic Acid) derived from plants, taking into account the F/M sex ratio and the two phases of the disease (active and remission). This is a prospective study involving 10 patients with SLE. The average age of the patients in our study was 40.375 years, with an F/M sex ratio of 2.33. NO levels were significantly elevated in 100% of the cases. Upon analyzing the results obtained, we observed significant reductions in NO levels with both treatments.

In conclusion, while confirming the inflammation-reducing potential of plant-derived phytohormones, our study also highlights the remarkable effect of bacterial-derived phytohormones in reducing inflammatory markers. These findings underscore the importance of biological alternatives in the therapeutic approach and in managing production yields, leading to better disease management.

Keywords : systemic lupus erythematosus, Nitric oxide, Phytohormones, Inflammation .