

N d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENNE

Faculté des Sciences Biologiques



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : Sciences de la nature

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Par : **Mr Belkhelfa Mourad**

Thème :

Rôles des cytokines Th1 et de la NO Synthase (NOS2) dans les désordres immunitaires associés à la maladie d'Alzheimer et mise au point d'un biomarqueur pathogénique.

Soutenu publiquement le 01 / 07/2009 devant le jury composé de:

Pr F. LARABA-DJEBARI	FSB-USTHB	Présidente
Pr C. TOUIL-BOUKOFFA	FSB-USTHB	Directrice de thèse
Pr M. ABADA-BENDIB	Faculté de Médecine-Alger	Examinatrice
Dr T. BENHASSINE	FSB-USTHB	Examinatrice
Dr M. ZOUAMBIA	FSB-USTHB	Examineur
M^{me} D. MEZIOUG	FSB-USTHB	Invitée

Rôles des cytokines Th1 et de la NO Synthase (NOS2) dans les désordres immunitaires associés à la maladie d'Alzheimer et mise au point d'un biomarqueur pathogénique.

Résumé :

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative aux multiples facettes, entraînant la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. Elle se présente sous forme de troubles de la mémoire et du comportement, évoluant progressivement vers une démence. Elle se caractérise par trois phases selon l'évolution et la sévérité des symptômes. Cette pathologie est associée à un désordre immunitaire qui se manifeste par une élévation significative des cytokines pro inflammatoires et par la production accrue des radicaux libres tel que le monoxyde d'azote. Le monoxyde d'azote présente une neurotoxicité essentiellement due à sa capacité à réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxyde d'azote, responsable de la mort neuronale. L'activité cholinestérase sérique est impliquée dans le processus neurodégénératif vu son rôle dans le déficit cholinergique entraînant une perte irréversible de la mémoire.

Les objectifs de notre travail portent sur le rôle des cytokines Th1 et du monoxyde d'azote dans les désordres immunitaires associés à l'évolution de la pathologie en vue de cibler un biomarqueur de pathogénie. Cette étude est réalisée sur les patients Algériens atteints d'Alzheimer.

Nos résultats suggèrent que l'inflammation périphérique est une composante active au niveau cérébral se caractérisant notamment par une augmentation accrue de l'expression de l'IFN- γ , dont l'action est potentialisée par le TNF- α en particulier dans la phase précoce de la maladie. La phase intermédiaire caractérisée par un état pseudo-stationnaire caractérisée par une induction significative de l'IL13. Le processus inflammatoire est associé à un déficit cholinergique responsable des troubles de mémoire.

Les systèmes de régulation cytokinique sont en étroite relation avec la production substantielle du NO particulièrement à la phase initiale et finale. Ces mécanismes seraient engagés dans les effets délétères tissulaires et cellulaires occasionnés dans le système nerveux central caractérisant cette pathologie. Il apparaît selon nos résultats que la production du NO, sous l'action de NOS inductible (NOS2) par les cytokines Th1 est hautement impliquée dans les mécanismes de pathogénèse et l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

A travers ces résultats préliminaires, le monoxyde d'azote, l'IFN- γ et l'activité Butyrylcholinestérase apparaissent des candidats de choix comme bio marqueur dans le suivi et la surveillance des patients.

Mots clés: Alzheimer, Monoxyde d'azote, NOSynthase, Butyrylcholinestérase, Démence, Neurodégénérative, Autoimmune, Cytokines.

« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter, on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit, mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »

Ellen MacArthur (2002), Du vent dans les rêves, XO Editions, Paris

Remerciements

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à ma directrice de recherche, le Professeur Touil-Boukoffa, qui m'a confié ce projet de recherche très passionnant. Sa confiance et son soutien inconditionnel ont permis la concrétisation de ce travail. Mille mercis pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance inébranlable.

Je remercie vivement le Pr Laraba-Djebari qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Mes vifs remerciements s'adressent au Pr. Abada-Bendib pour m'avoir facilité le travail dans le service neurologie de l'hôpital Bab-El oued, et pour m'avoir permis de participer aux consultations. Je remercie également tout les membres du service.

Je remercie également le Dr. Zouambia qui a accepté d'examiner ce travail, et pour m'avoir fait profiter de ces connaissances.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Mme Benhassine qui a bien voulu faire partie du jury et examiner ce travail.

Je tiens également à remercier à Mme Mezioug pour sa présence aujourd'hui, pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour ces précieux conseils.

Je remercie tout les membres de l'équipe NO synthase pour les conseils et les échanges de connaissances et pour m'avoir fait profiter de leur savoir faire.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de physiologie végétale pour m'avoir soutenu pendant toute cette période, je remercie également tout le personnel de la FSB pour leur encouragements.

Je remercie le chef de service de neurologie de l'hôpital central de l'armée, le professeur Messaoudi et le docteur Azzouz pour leur aimable contribution.

Je souhaite sincèrement remercier mon épouse RADIA, pour son appui et ses encouragements.

Liste des abréviations

4-HNE: 4-hydroxynonanal.

AChE: Acetylcholinestérase.

AD: Alzheimer Disease.

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozol-4-Propionate.

ANAE: α -Naphtyl Acétate Estérase.

ApoE: Apolipoprotéine E.

APP: Amyloïd Protein Precursor.

A β : Amyloïde beta.

BChE : Butyrylcholinestérase.

BH4 : Tétrahydrobioptérine.

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique.

CaM : Calmoduline.

cNOS: NO Synthase constitutive.

CO: Cytochrome Oxydase.

CPA: Cellule presentatrice d'antigène.

CSF: Colony Stimulatory Factor.

DHEA: Déhydroépiandrostérone.

DNF: Dégénérescence Neurofibrillaire.

DTNB: 5-5'-Dithiobis-[2 Nitrobenzoate].

eNOS: NO Synthase endothelial.

Foxp3: Forkhead box protein P3.

IFN: Interféron.

Ig: Immunoglobuline.

IL: Interleukine.

Iso OMPA: Tétraisopropylpyrophosphamide.

LCR: Liquide Céphalorachidien.

MA: Maladie d'Alzheimer.

Liste des abréviations

NF κ B: Nuclear Factor κ B.

NKT: Natural Killer T.

NMDA: N-Methyl-D-Aspartate.

NMDAR: N-Methyl-D-Aspartate Receptor.

NO: Monoxyde d'azote.

NOHA: N- Hydroxy-L-Arginine.

NOS2/ iNOS: NO Synthase inductible (2).

PBMC:Peripheral Blood Mononuclear Cell (Les cellules mononuclées du sang périphérique).

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate).

PHF: Paired Helical Filaments (les paires de filaments appariés en hélice).

PS: Préséniline.

ROR: Retinoid-related Orphan Receptor.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium.

SDS: Sodium Dodécylsulfate.

SNC: Système Nerveux Central.

SVF: Sérum de Veau Fœtal.

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

T reg: Lymphocyte T régulateur.

Tau: Tubulin associated unit.

TCR: T Cell Receptor.

TGF: Tumor Growth Factor.

Th: Lymphocyte T helper.

TLR: Toll-Like Receptor.

TNF: Tumor Necrosis Factor.

UPS: Ubiquitine Protéasome System.

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : GENERALITES

I. La maladie d'Alzheimer.....	03
I.1.Introduction	03
I.2. Les formes existantes de la maladie d'Alzheimer	03
I.2.1.La forme familiale	03
I.2.2 La forme sporadique.....	03
I.3. Évolution de la maladie	04
I.3.1. Les différents stades de la maladie d'Alzheimer	04
I.3.2. L'échelle de détérioration globale (EDG)	04
I.4. Facteurs de risque	06
I.4.1. Les facteurs défavorables.....	06
I.4.2. Les facteurs favorables	06
I.5. Les Critères de diagnostic	06
I.5.1. Le diagnostic clinique	06
I.5.2. Le diagnostic neuropathologique.....	07
I.5.3. Le diagnostic génétique	07
I.5.4. Le diagnostic biochimique	07
I.5.5. Le diagnostic biologique.....	08
I.5.5.1.Les marqueurs sériques	08
I.5.5.2. Les marqueurs des tissus périphériques	09
I.5.5.3. Les marqueurs du liquide céphalorachidien.....	09
I.6. Les mécanismes physiopathologiques	10
I.6.1. L'Amyloïdogenèse	11
I.6.1.1. Action neurotoxique de l'Amyloïdeβ	12
I.6.1.2. Les différents processus engendrés par l'amyloïdogenèse	13
I.6.2. La dégénérescence neurofibrillaire	15
I.6.2.1. L'hyperphosphorylation de la protéine tau	15
I.6.2.2. Le système protéolytique ubiquitine-protéasome	16
I.6.3. L'atrophie corticale.....	17
I.7.Thérapies	17
I.7.1. Thérapies contre le déficit cholinergique	17
I.7.2.Thérapies utilisant les Antagonistes du Glutamate	18
I.7.3. Thérapies symptomatiques contre les troubles psycho-comportementaux	18
I.7.3. Vaccination.....	18
II. Cytokines et neuroinflammation.....	19
II.1. Les cytokines, médiateurs de l'immunité.....	19
II.1.1. Introduction.....	19
II.1.2. Caractéristiques générales	19
II.1.3. Mode d'action des cytokines	19
II.1.4. Structure des cytokines.....	19
II.1.5. Classification des cytokines.....	20
II.1.6. Récepteurs des cytokines	21

II.1.7. Cytokine et régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire	22
II.1.7.1. Les cytokines, protéines médiatrices de l'inflammation	22
II.1.7.2. Les cytokines (Th1, Th2, Treg et Th17) et l'immunorégulation.....	22
II.1.8. Cytokines et système nerveux central	24
II.1.9. Cytokines et pathologies	25
II.1.9.1. Cytokines et maladie auto-immunes	25
II.2. La neuroinflammation	25
II.2.1. Les cellules impliquées dans la neuroinflammation.....	26
II.2.1.1. Les neurones.....	26
II.2.1.2. Les cellules gliales.....	26
II.2.1.1. Les astrocytes	26
II.2.1.1. Les cellules microgliales	27
II.2.1. Les interactions entre le SNC et système immunitaire	27
III. Le Monoxyde d'Azote	28
III.1. Introduction	28
III.2. Mécanisme de biosynthèse du NO	28
III.3. Les NO synthases	29
III.4. Localisation des isoformes de NOS	31
III.5. Les dérivés du NO	31
III.6. Régulation des NOS	32
III.7. Hypothèse du mécanisme de régulation de la production du NO par cNOS/iNOS	33
III.8. Rôle physiologique du NO	34
III.8.1. Rôle du NO dans le système nerveux central	34
III.8.1.1. NO et La plasticité synaptique.....	35
III.8.1.2. NO et neurotransmission synaptique	35
III.8.2. Rôle du NO dans le système immunitaire	36
III.9. NO et physiopathologies.....	36

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériels biologiques utilisés	37
I.1. La sélection des patients	37
I.2. la classification des malades en groupes	37
I.3. Les prélèvements sanguins.....	38
I.4. Les prélèvements du liquide-céphalo-rachidien	38
I.5. Les cellules	39
I.6. Le milieu de culture	39
I.7. La souche <i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 8062	39
I.8. Les effecteurs inducteurs et immunomodulateurs	39
II. Méthodes.....	40
II.1. Les Méthodes utilisées <i>in vivo</i>	40
II.1.1. Dosage de l'albumine dans le plasma et le liquide céphalorachidien.....	40
II.1.2. Dosage des nitrites totaux dans le plasma, les surnageants de culture de PBMC dans les différentes phases de la pathologie	40

II.1.3. Dosage de TNF- α et TGF β dans le plasma et le liquide céphalorachidien des patients.....	40
II.1.4. Dosage de l'activité Butyrylcholinestérase dans le plasma des patients.....	40
II.1.5. Dosage de l'activité estérase non spécifique dans le LCR.....	43
II.2. Les Méthodes utilisées <i>in vitro</i>	44
II.2.1. Mise en culture des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et inductions	44
II.2.1.1. Préparation des PBMC.....	44
II.2.1.2. Etude de l'effet de différents effecteurs (TNF- α /anti TNF- α , IFN γ /anti IFN γ , IL-13/anti IL-13, IL6, IL17) sur la production du monoxyde d'azote dans les surnageants de culture de PBMC.....	44

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Intégrité fonctionnelle de la barrière hémato encéphalique (BHE).....	45
III.2. Dosage <i>in vivo</i> du monoxyde d'azote dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.....	46
III.2.1. Concentration plasmatique du NO dans les différentes phases	46
III.2.2. Concentration plasmatique du NO chez les patients utilisant la thérapie à la vitamine E dans les différentes phases de la pathologie.....	47
III.2.3. Concentration plasmatique du NO dans les différentes phases chez les patients présentant une hypertension artérielle	48
III.3. Dosage (<i>in vitro</i>) du monoxyde d'azote dans les différentes phases de la pathologie	49
III.3.1. Etude de l'Effet du TNF- α et l'anti-TNF- α sur la production des nitrites totaux.....	49
III.3.2. Etude de l'effet de l'IFN γ et de l'anti-IFN γ sur la production des nitrites totaux.....	50
III.3.3. Etude de l'effet de l'IL-13 et l'anti-IL-13 sur la production des nitrites totaux	51
III.3.4. Etude de l'effet de l'IL-6 sur la production des nitrites totaux	52
III.3.5. Etude de l'effet de l'IL17 sur la production des nitrites totaux	53
III.4. Implication de TNF- α dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer.....	54
III.5. Implication de TGF β dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer.....	55
IV. Autres biomarqueurs associés au processus neurodégénératif.....	56
IV.1. Dosage de la Butyrylcholinestérase dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.....	56
IV.2. Dosage de l'activité estérase non spécifique dans le LCR.....	58

Chapitre IV : DISCUSSION GENERALE

Discussion générale	59
Conclusion	67
Références bibliographiques	68
Annexe	
Résumé	

Introduction

Introduction:

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative entraînant la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. Elle se présente sous forme de troubles de la mémoire et du comportement, évoluant progressivement vers une démence. Elle se caractérise par trois phases selon l'évolution et la sévérité des symptômes. Si les lésions se développent assez tôt dans la vie, la maladie s'exprime tardivement.

Cette maladie, dont le facteur de risque majeur est l'âge, est très invalidante et son poids socio-économique va s'alourdir davantage. Au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, on portera un diagnostic de « maladie d'Alzheimer possible », puis « maladie d'Alzheimer probable » en fonction des examens cliniques bien spécifiques. Ces examens montrent qu'il y a environ 15 % d'erreurs de diagnostic clinique dans les meilleurs centres hospitalo-universitaires (**Delcourte, 2000**).

Le progrès accomplis depuis une quinzaine d'année ont radicalement modifié la perception de la maladie d'Alzheimer. Un des enjeux majeurs de la recherche sur la maladie d'Alzheimer concerne la découverte de biomarqueurs prédictifs de la survenue de la maladie fiables et permettant de faire le diagnostic le plus précoce possible, avant la perte d'autonomie qui définit le stade de démence.

La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. Une troisième lésion caractéristique est l'atrophie corticale (**Zékri, 1999**).

Le processus neurodégénératif est associé à une réponse inflammatoire caractérisée par la production des médiateurs: Cytokines, complément, radicaux libres en particulier, le monoxyde d'Azote. Tous ces éléments sont impliqués dans la mort neuronale (**Griffin et al, 1998 ; Griffin, 2000**).

Le monoxyde d'azote (NO) est un biomédiateur à la fois simple et complexe. Simple, puisque c'est un gaz qui à l'état dissous, peut aisément franchir les membranes biologiques et diffuser librement d'une cellule à l'autre. Il constitue ainsi le messager paracrine idéal. Complexe, le NO l'est sûrement puisque son électron célibataire en fait un radical extrêmement réactif (**Stamler, 2001, Touil-Boukoffa et al, 1998**). Il est aussi complexe par l'ubiquité de ses effets puisqu'il peut être impliqué dans différents processus tels que dans les réponses immuno-inflammatoires (**Dugas et al., 1995 ; Moncada et Higgs, 1995 ; Touil-Boukoffa et al, 1998**). La synthèse du NO est catalysé par une classe d'enzymes appelée les *NO synthases* qui existent sous divers isoformes dont la NOS I (neuronale) et III (endothéliale) qui sont constitutives et produisent de faibles quantités de NO, la NOS II qui est inductible par les cytokines, notamment par l'interféron gamma (IFN- γ) dont l'action sur le signal de l'induction de la synthèse du NO par le système monocytes/macrophages a été bien élucidée (**Dugas et al., 1995 ; Touil-Boukoffa et al ; 1998**). La NOS II une fois induite, génère de grandes quantités en NO (**Crépel et al., 1995**). La production chronique du NO associée à la production d'anions superoxydes conduit à la formation d'un anion hautement toxique : le peroxy-nitrite. Sa toxicité a été montrée dans plusieurs pathologies à caractère auto-immun. Nous pouvons citer la maladie de Behçet (**Guenane et al., 2006 ; Hartani et al., 2006 ; Belguendouz et al., 2008 ; Lahmar-Belguendouz et al., 2009**).

Les lésions de la maladie d'Alzheimer entraînent une diminution massive de taux de neurotransmetteurs principalement l'acétylcholine circulant dans le cerveau. Le déficit cholinergique est une conséquence directe d'une activité cholinestérasique importante au niveau de l'hippocampe ce qui entraîne la perte progressive de la mémoire (**Welch, 1998**).

Dans ce travail, nous avons tenté d'élucider le rôle de l'interaction système nerveux centrale / système immunitaire dans les mécanismes physiopathologiques liés aux stades évolutifs de la pathologie.

Les objectifs de notre travail portent sur le rôle des cytokines Th1 et du monoxyde d'azote dans les désordres immunitaires associés à l'évolution de la pathologie en vue de cibler un biomarqueur de pathogénie. Cette étude est réalisée sur les patients Algériens atteints d'Alzheimer.

Notre démarche portera sur deux volets:

Dans le premier volet nous avons exploré l'intégrité fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique en utilisant un indicateur métabolique; le ratio Albumine.

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons ciblé la modulation du monoxyde d'azote sur les cellules mononuclées du sang. Cette partie s'articule autour des points suivants:

❖ L'étude de la production *in vivo* du NO chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer selon la phase clinique (phase initiale, intermédiaire et avancée), la thérapie administrée (Vitamine E) et l'association avec l'hypertension artérielle.

❖ L'étude de la modulation de la NO Synthase inductible sur système de cultures de PBMC en présence de plusieurs effecteurs: les cytokines, les anti-cytokines et chez des patients à différentes phases évolutives.

❖ Nous avons également été amenés à suivre le profile de TNF- α et TGF β dans les différentes phases de la pathologie.

Une activité Butyrylcholinestérase et estérase non spécifique ont été recherchées et ce, en relation avec le processus neurodégénératif.

Chapitre I : GENERALITES

I. La maladie d'Alzheimer:

I.1. Introduction:

La maladie d'Alzheimer est une des pathologies neurodégénérative les plus fréquentes chez le sujet âgé. Elle serait responsable de plus de 50 à 70% des cas de démence diagnostiqués dans le monde. Cependant l'étiologie de cette maladie n'est que partiellement connue. Les principales caractéristiques histopathologiques ciblent l'installation des plaques séniles extracellulaires et la dégénérescence neurofibrillaire associées à une importante perte neuronale. (**Braak et al., 1998**)

I.2. Les formes existantes de la maladie d'Alzheimer:

Plusieurs chercheurs suggèrent que la maladie affecte deux catégories de patients: ceux qui sont nés avec un problème génétique (forme familiale) et ceux qui ont développé une mutation génétique à long terme, ayant été trop exposés à un facteur environnant encore non identifié (forme sporadique). La première, est héréditaire et beaucoup plus rare. Cette forme dite « familiale » se déclare plus précocement, en moyenne aux alentours de la quarantaine et au plus tôt vers les 30 ans. Sur l'ensemble des patients Alzheimer, les cas familiaux n'en représenteraient qu'à peine 5%. La seconde très largement majoritaire, touche au hasard, dans la population des personnes en général au-delà de leurs 70 ans. (**Schenk et al., 2004**)

I.2.1. La forme familiale:

Les membres de ces familles présentent de naissance une mutation du gène de l'APP, situé sur le chromosome 21. Cette mutation peut augmenter la production d'APP et/ou transformer la longueur et la forme de l'APP, conduisant dans les deux cas à son mauvais clivage. Les membres des familles présentant des mutations sur les gènes de la préséniline 1 et 2 (PS1 et PS2), sont les cas les plus nombreux de maladie d'Alzheimer transmise génétiquement, soit 70% des cas. Dans ces cas, le corps cellulaire (neuronale) synthétise l'APP et les envoie dans les vésicules jusqu'à la membrane, via le réticulum. Les vésicules sont composées de plusieurs protéines, entre autre les présénilines. Celles-ci aident à finaliser la fabrication et la maturation des molécules lors de leur transport. Chez les patients des familles ayant des mutations génétiques au niveau des PS1 et PS2, ces présénilines, transformeraient les APP lors de leur transport jusqu'à la membrane. Il s'agit en fait d'une toute petite transformation pour que le clivage par la suite soit mal effectué par les sécrétases. Celle-ci couperait donc d'une mauvaise manière l'APP, menant à son accumulation.

Il est très probable qu'il existe d'autres familles ayant des problèmes génétiques touchant d'autres éléments, comme par exemple une mutation sur le gène codant pour les protéases responsable du clivage de l'APP (**Couderc, 2000**).

I.2.2. La forme sporadique:

Certains chercheurs avancent que ces patients pourraient avoir été exposés pendant plusieurs années à un facteur environnant non identifié et qu'à long terme, conduirait à la mutation d'un gène encore inconnu qui engendre l'accumulation de amyloïde-beta. Ce type de patients fait donc partie du groupe où la maladie se présente sporadiquement. Plusieurs travaux rapportent l'implication de l'aluminium qui peut entraîner l'augmentation de l'expression de l'APP. (**Couderc, 2000 ; Ferreira et al., 2008**)

D'autres chercheurs ont tenté d'incriminer les traumatismes à la tête, car il semblerait qu'ils pourraient conduire à une augmentation d'APP. On est loin de savoir si la maladie est entièrement

d'origine génétique ou non et si elle est liée à la mutation d'un gène spécifique par la trop grande présence d'un facteur environnant (Couderc, 2000).

I.3. Évolution de la maladie:

L'évolution de la maladie d'Alzheimer suit généralement certaines étapes ou stades qui entraîneront des changements dans la vie des personnes atteintes et celle de leur famille. Parce que la maladie affecte chaque personne différemment, les symptômes, l'ordre de leur apparition et la durée de chacun des stades de la maladie varient selon les sujets. Dans la plupart des cas, la maladie d'Alzheimer progresse lentement. Les symptômes peuvent chevaucher plus d'un stade et en estomper les limites. La durée de la maladie est généralement de sept à dix ans mais peut être plus longue chez certaines personnes.

I.3.1. Les différents stades de la maladie d'Alzheimer:

Plusieurs stades qui déterminent l'évolution de la pathologie ont été décrits: Stades léger, modéré et avancé. Nous citons une brève description de chacun. (Société de Neurologie, Canada 2008)

Le stade léger

Le terme « stade léger » (aussi appelé stade initial ou stade précoce) s'applique aux personnes de tous âges qui présentent des déficits légers attribuables aux symptômes de la maladie d'Alzheimer. Au nombre des symptômes les plus courants, mentionnons les pertes de mémoire, les difficultés de communication et les changements d'humeur et de comportement. À ce stade, les personnes conservent la plupart de leurs capacités et ne requièrent qu'une aide minimale. Comme elles sont généralement conscientes des changements qui touchent leurs capacités, elles sont en mesure de renseigner leur entourage sur ce qu'elles vivent et d'aider à préparer et à orienter leurs soins futurs. À noter que le terme « stade précoce » désigne des personnes de tous âges qui présentent des déficits légers attribuables à la maladie d'Alzheimer. Il est toutefois important de ne pas confondre avec « maladie d'Alzheimer précoce » qui désigne des personnes chez qui on a diagnostiqué la maladie d'Alzheimer à un âge plus précoce que l'âge habituel.

Le stade modéré

À ce stade de la maladie, on observe un déclin accru des facultés cognitives et fonctionnelles de la personne atteinte. Même si, à cette étape, le patient peut encore avoir conscience de sa condition, sa mémoire et ses autres facultés cognitives continueront à se détériorer. Il aura aussi besoin d'assistance pour accomplir de nombreuses tâches quotidiennes.

Le stade avancé

À cette étape, la personne deviendra incapable de communiquer verbalement ou de prendre soin d'elle-même. L'objectif des soins à ce stade est de continuer à soutenir la personne atteinte pour lui assurer la plus grande qualité de vie possible.

La fin de vie

À mesure que la personne atteinte se rapproche de la mort, les soins viseront surtout à assurer son confort. Comme c'est le cas pour toute personne ayant une maladie fatale, il est important de tenir compte des besoins physiques de la personne mais aussi de ses besoins affectifs et spirituels et de voir à les combler. Le soutien fourni à ce stade visera la qualité de vie et le confort.

I.3.2. L'échelle de détérioration globale (EDG):

Outre les termes « léger, modéré et avancé » qui désignent les différents stades de la maladie d'Alzheimer, les professionnels de la santé utilisent aussi une terminologie plus clinique qui réfère à l'Échelle de détérioration globale ou échelle de Reisberg. Cette échelle est utilisée pour mesurer l'évolution de la maladie d'Alzheimer et divise celle-ci en sept stades. Elle est aussi utilisée pour le

diagnostic d'autres démences, bien que les stades et les symptômes diffèrent selon chaque cas. (Tableau 01) (Reisberg et al., 1982)

Tableau 01 : l'Échelle de détérioration globale. (Reisberg et al., 1982)

Stade	Symptômes typiques
Stade 1 : Aucun affaiblissement intellectuel (fonctionnement normal).	- Aucun trouble de mémoire.
Stade 2 : Affaiblissement intellectuel très léger (il peut s'agir de changements normaux associés à l'âge ou des signes les plus précoces de la maladie d'Alzheimer).	- Trous de mémoire. - La personne oublie où elle a placé des objets familiers. - Elle oublie des noms autrefois bien connus. - Ces oublis ne sont généralement pas apparents pour l'entourage.
Stade 3 : Affaiblissement intellectuel léger (ces symptômes peuvent permettre, dans certains cas mais pas dans tous, de diagnostiquer la phase initiale de la maladie d'Alzheimer).	- Légère perte de mémoire. - Difficulté à faire de nouveaux apprentissages. - Difficulté à se concentrer ou durée d'attention limitée. - Problèmes d'orientation, tendance à s'égarer. - Difficultés à communiquer, par exemple difficulté à trouver le bon mot. - Perd ou égare des objets de valeur. - Difficulté à faire face aux problèmes qui surviennent au travail. - Les problèmes sont évidents pour la famille, les amis ou les collègues de travail.
Stade 4 : Affaiblissement intellectuel modéré (stade léger, initial ou précoce de la maladie d'Alzheimer).	- Une certaine perte de mémoire liée aux souvenirs personnels. - Difficulté à accomplir des tâches plus complexes (s'occuper de ses finances, faire des emplettes, voyager). - Est moins au fait des événements actuels et récents. - Moindre capacité d'exécution d'opérations arithmétiques exigeantes (par exemple compter à rebours à partir de 75 par multiples de 7).
Stade 5 : Affaiblissement modérément grave (stade modéré ou intermédiaire de la maladie d'Alzheimer).	- Pertes de mémoire importantes (numéros de téléphone ou noms de proches parents). - A besoin d'aide pour les activités de la vie quotidienne.
Stade 6 : Affaiblissement intellectuel grave (stade modérément avancé ou stade intermédiaire de la maladie d'Alzheimer).	- Perte de mémoire soutenue (oublie parfois le nom de son conjoint ou de la personne qui en prend soin tous les jours). - Perte de conscience des expériences et événements récents. - Besoin d'aide pour les activités de la vie quotidienne (s'habiller, se laver). - Difficulté à compter. - Modifications de la personnalité et des émotions. La personne pourra manifester de la confusion, de l'anxiété, de la méfiance, de la colère, de la tristesse ou de la dépression, de l'hostilité, de l'appréhension, avoir des comportements délirants ou être agitée. - Symptômes obsessionnels, par exemple répéter constamment une activité simple. - Perturbations du cycle veille-sommeil. - Épisodes accrus d'incontinence.
Stade 7 : Affaiblissement intellectuel très grave (stade avancé ou sévère de la maladie d'Alzheimer).	- Graves déficiences cognitives. - Le vocabulaire est limité et les habiletés verbales finissent par disparaître complètement. - Perte des fonctions motrices de base (capacité de marcher sans aide, de s'asseoir sans soutien). - Besoin d'aide pour s'alimenter ou aller aux toilettes, incontinence.

I.4. Facteurs de risque:

La maladie d'Alzheimer est une véritable maladie. Cependant, cette pathologie ne s'exprime que lorsqu'un ensemble de facteurs défavorables l'emportent sur l'ensemble des facteurs favorables, et ceci avec le concours du temps et du vieillissement des cellules nerveuses. C'est à ce titre que la maladie d'Alzheimer pourrait être une maladie "statistique", résultat du différentiel entre les facteurs déclenchant et retardant. (Delacourte, 1998)

I.4.1. Les facteurs défavorables :

- 1- Le premier, le plus important, le facteur qui a lui seul, ou presque, peut déclencher la maladie d'Alzheimer correspond aux mutations pathologiques sur les gènes APP, PS1 et PS2. Ces mutations pathologiques provoquent inexorablement l'apparition de la maladie, au plus tôt vers l'âge de 30 ans, et en général vers 50 ans.
- 2- Le second facteur est l'âge.
- 3- La vulnérabilité de l'hippocampe pourrait être le troisième facteur. Il est clair que nous sommes très inégalement touchés par la dégénérescence neurofibrillaire au cours du vieillissement. Certains résistent très bien, d'autres moins bien.
- 4- Le quatrième facteur pourrait être le génotype de l'apolipoprotéine E. L'allèle epsilon4 est certainement un facteur de risque, alors que l'allèle epsilon2 est un facteur protecteur.
- 5- Les autres facteurs génétiques et environnementaux dont on parle dans la littérature, mais qui restent à identifier d'une manière certaine. (Delacourte, 1998)

I.4.2. Les facteurs favorables :

Ils sont génétiques et environnementaux également. Un bon métabolisme de l'APP, des cellules nerveuses résistantes à tous les stress sont des facteurs favorables, mais encore difficilement caractérisables.

- 1- L'allèle epsilon 2 de l'Apolipoprotéines semble être un facteur favorable, l'ApoE2 ayant certainement une meilleure efficacité pour réparer les neurones.
- 2- Une bonne alimentation, incorporant des substances anti-oxydantes (Vitamine E, C, les flavonoides), joue peut-être un rôle.
- 3- Le maintien de l'activité cérébrale ne peut être qu'un bon facteur.
- 4- Les taux de neurostéroïdes (DHEA, œstrogènes) pourraient stimuler favorablement les neurones.

Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, il est certain que l'on pourra maîtriser de mieux en mieux ces facteurs, pour ralentir l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Retarder cette pathologie de 5 ans diminuerait de 50 % le poids socio-économique de cette pathologie, poids supporté essentiellement par les familles de patients. (Delacourte, 1998)

I.5. Les critères de Diagnostic:

I.5.1. Le diagnostic clinique:

En l'absence de marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer, le diagnostic reste essentiellement clinique. Il pourra être ensuite validé par un examen neuropathologique. Le diagnostic clinique repose sur l'histoire de la maladie, l'interrogatoire de l'entourage, l'exploration neuropsychologique et comportementale, et sur l'examen clinique (Guériot-Milandre *et al.*, 1997). Les troubles de la mémoire sont les premiers symptômes et dominant le tableau clinique dans la plupart des cas. Ils portent d'abord sur les faits récents. C'est l'évolution de ces troubles qui fait

penser au diagnostic de la maladie d'Alzheimer, et leur association progressive avec d'autres troubles: Le langage, les troubles praxiques (perturbations gestuelles) et les troubles gnosiques (troubles de la reconnaissance).

Les critères de diagnostic utilisés en général sont ceux du NINCDS-ADRDA de Mc Khann *et al.* Ils distinguent les diagnostics de maladie d'Alzheimer probable, possible et certaine (Mc Khann *et al.*, 1984). Le diagnostic de certitude se renforce au fur et à mesure que l'on met en évidence une démence établie par des critères cliniques et des tests neuropsychologiques, que l'on élimine d'autres causes possibles de déclin cognitif et, enfin, par la démonstration des lésions cérébrales caractéristiques: les plaques séniles et les neurones en dégénérescence neurofibrillaire. L'évaluation neuropsychologique a deux objectifs : authentifier le déclin cognitif et caractériser les troubles. Ces données clé contribuent au diagnostic étiologique de la démence. Certains tests sont surtout destinés à l'évaluation de la sévérité de la démence comme le MMS (Mini Mental State Examination de Folstein). Certaines échelles comportementales permettent de faire le diagnostic différentiel, par rapport aux démences frontotemporales et aux démences vasculaires (Delacourte, 1998)

L'imagerie est un élément important du diagnostic: L'imagerie structurale (scanner, IRM) évalue l'atrophie régionale hippocampique par la mesure de l'épaisseur de la partie interne du lobe temporal droit, mais aussi lobaire, frontale ou temporo-pariétale. Elle évalue également la participation vasculaire et les anomalies de substance blanche et, bien sûr, elle élimine les classiques causes «neurochirurgicales».

La comparaison entre le diagnostic porté en fin d'évolution de la maladie et le diagnostic neuropathologique indique un taux d'erreur de 15 % environ, et cela dans les meilleurs instituts hospitalo-universitaires. Les erreurs de diagnostic portent également sur les pathologies associées, car 30 % des patients atteints de maladie d'Alzheimer ont également des corps de Lewy. De plus, la pathologie vasculaire se surajoute fréquemment aux maladies neurodégénératives (Pasquier et Leys., 1997).

I.5.2. Le diagnostic neuropathologique:

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine est établi lorsqu'il est démontré la présence de deux types de lésions en grande quantité dans les régions hippocampique et corticales associatives: il s'agit des plaques séniles et des neurones en dégénérescence neurofibrillaire.

Les critères de maladie d'Alzheimer se modifient, se peaufinent et deviennent de plus en plus précis. Cela veut dire également que rien n'est encore complètement établi, ni véritablement maîtrisé. Les explications de cette mise au point laborieuse semblent être liées à l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer, aussi bien du point de vue clinique que neuropathologique. (Scheltens *et al.*, 1993)

I.5.3. Le diagnostic génétique:

Le diagnostic génétique pour les formes familiales ne peut donc s'appliquer qu'à une infime portion de patients. De plus, l'hétérogénéité des mutations ne permet pas la systématisation de cette approche. Enfin, les problèmes éthiques liés au diagnostic génétique sont majeurs. Cette approche reste encore du domaine de la recherche, avec une priorité pour la découverte de tout gène impliqué directement ou indirectement dans les formes dites « sporadiques », ainsi que pour la découverte des gènes familiaux autres que l'APP, PS1 ou PS2. (Delacourte, 1998)

I.5.4. Le diagnostic biochimique:

Le diagnostic biochimique nous semble être l'étape indispensable avant d'aborder le diagnostic biologique. Par diagnostic biochimique, nous entendons un diagnostic établi à partir du tissu nerveux central (autopsique) en utilisant des marqueurs biochimiques. Récemment, il a été possible

de quantifier chimiquement les lésions de la maladie d'Alzheimer. D'une part, la substance amyloïde des plaques séniles peut être quantifiée par des techniques immuno-chimiques. Le principe consiste à doser l'élément de base, le peptide β insoluble, dans le tissu nerveux, en utilisant une technique de dot-blot. D'autre part, la dégénérescence neurofibrillaire est quantifiée en dosant son constituant protéique de base: les protéines Tau anormalement phosphorylées. En utilisant les deux marqueurs $A\beta$ et Tau, il est possible de faire un diagnostic biochimique dont la spécificité et la sensibilité sont proches de 100 %. (Delacourte, 1998)

I.5.5. Le diagnostic biologique:

Il repose sur la découverte d'un biomarqueur périphérique, dans le liquide céphalorachidien (LCR) ou, mieux, dans le sérum des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Son utilisation conforte le diagnostic clinique précoce.

La découverte d'un marqueur permettrait :

- de poser le diagnostic de certitude du vivant du patient, avec pour objectif final de faire un diagnostic le plus précocement possible.
- de déterminer d'éventuels sous-groupes de la maladie suivant la présence de un ou plusieurs de ces marqueurs.
- de faciliter les études épidémiologiques et thérapeutiques sur la population sélectionnée (caractérisation de nouveaux facteurs de risques, de facteurs protecteurs, essai de nouvelles molécules).
- de suivre l'évolution de la réponse thérapeutique chez le patient.
- de donner des indications sur l'évolution du processus physiopathologique.

Actuellement, de nombreuses équipes tentent de caractériser des marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer à partir du sérum et surtout du LCR. En effet, ce dernier est en relation étroite avec le parenchyme cérébral par l'intermédiaire de la barrière hémato-encéphalique. Le LCR est donc susceptible de contenir des antigènes issus des lésions spécifiques de la maladie, et de donner les informations précieuses. À l'heure actuelle, aucun kit de diagnostic n'est commercialisé. Cette approche est encore du domaine de la recherche médicale. Quelques pistes semblent prometteuses, mais attendent confirmation. (Delacourte, 1998)

I.5.5.1. Les marqueurs sériques:

Les recherches se concentrent sur le dosage du peptide $A\beta$ sous sa forme 1-40, par rapport à la forme longue 1-42, qui serait plus liée à la maladie d'Alzheimer.

Les antigènes liés à la dégénérescence neurofibrillaire sont également recherchés. Les protéines Tau normales ou pathologiques ainsi que l'ubiquitine ont été quantifiées dans le sérum, sans résultat probant.

Les marqueurs de l'inflammation et les auto-anticorps sont également une piste explorée. Il s'agit des auto-anticorps contre la GFAP (glial fibrillary acidic protein), protéine constitutive des filaments gliaux (McRae et al., 1996). La spécificité et la sensibilité des taux de ces anticorps semblent trop faibles pour être utilisées en vue d'un diagnostic *in vivo*. Ces auto-anticorps peuvent refléter un processus inflammatoire, visualisé par la quantification des cytokines et de l'antiprotéase alpha -1- antichymotrypsine (McGeer et McGeer., 1998)

De nombreuses autres protéines sériques ont été testées, sans résultat convaincant. Nous ne ferons qu'une énumération de celles qui ont été analysées en détail: les Apolipoprotéines E, l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, la Cu-Zn superoxyde dismutase.

Enfin, la piste la plus intéressante semble être celle de la protéine p97 (mélanotransferrine). Ce marqueur a défrayé la chronique en 1996 (**Kennard et al., 1996**). Les concentrations sériques de la p97, protéine impliquée dans le métabolisme du fer, augmenteraient de manière significative au cours de la maladie d'Alzheimer (15 patients) et en fonction de son évolution. Les témoins du même âge (8 sujets) ont des taux très bas de p97 sérique, ainsi que les patients affectés par d'autres maladies neurologiques (maladie de Parkinson, ataxie cérébelleuse, sclérose latérale amyotrophique, neuropathie périphérique). Ce marqueur paraît très intéressant, toutefois une confirmation par d'autres équipes de recherche est nécessaire. On peut noter que le nombre de patients étudiés est faible dans les trois catégories (maladie d'Alzheimer, témoins, autres maladies neurodégénératives) et qu'un an après la publication de l'étude de Kennard et al, aucune donnée complémentaire, ni aucune confirmation par une autre équipe n'est venue valider cette hypothèse. (**Delacourte, 1998**)

I.5.5.2. Les marqueurs des tissus périphériques:

Plusieurs travaux avaient fait état d'accumulations significatives du peptide A β ou d'autres constituants dans la peau, ou dans les cultures cellulaires de fibroblastes de la peau. Ces travaux n'ont pas été confirmés. (**Delacourte, 1998**)

I.5.5.3. Les marqueurs du liquide céphalorachidien:

Parmi les marqueurs liés aux antigènes des lésions cérébrales, on distingue ceux liés à la présence des plaques séniles (amyloïdogénèse) et ceux liés aux neurones en dégénérescence neurofibrillaire. La concentration du peptide A β 1-42 est augmentée dans le LCR des patients ayant une maladie d'Alzheimer familiale, avec une mutation sur le gène PS1 (**Scheuner et al., 1996**). En revanche, elle semble diminuée dans les formes sporadiques, mais le chevauchement avec les témoins est important (**Ida et al., 1996 ; Motter et al., 1995**). On explique cette diminution du peptide A β circulant par sa séquestration dans les plaques séniles. Ce résultat n'est pas confirmé par tous (**Southwick et al., 1996**). Le métabolisme de la protéine APP semble également affecté d'une manière significative dans les formes familiales (**Lannfelt et al., 1995**).

Les marqueurs liés à la dégénérescence neurofibrillaire (protéine Tau, ubiquitine) semblent donner des résultats intéressants. Une dizaine d'équipes ont observé une augmentation significative des protéines Tau dans le LCR des patients atteints de maladie d'Alzheimer, en utilisant l'approche développée par Vandenmeeren et al. (**Vandermeeren et al., 1993**). Ces protéines Tau ne sont pas phosphorylées et se présentent sous la forme de fragments cataboliques (**Johnson et al., 1997**). On note, comme pour l'amyloïde, un certain chevauchement entre témoins âgés et patients atteints de maladie d'Alzheimer.

Des kits de dosage sont actuellement commercialisés. Ils consistent à coupler le dosage du peptide A β 1-42 (qui diminue au cours de la maladie) et le dosage des protéines Tau (qui augmentent au cours de la maladie) pour améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic.

D'autres constituants ont été dosés dans le LCR. Certains sont augmentés d'une manière significative, mais tous ces marqueurs sont peu sensibles et peu spécifiques. Il s'agit de la GFAP, de l'Apolipoprotéine E, de la synaptotagmine, de l'alpha -1- antichymotrypsine. (**Delacourte, 1998**)

I.6. Les mécanismes physiopathologiques:

Dans la maladie d'Alzheimer, le processus neurodégénératif est associé à une réponse inflammatoire déclenchée suite à une interaction entre le système immunitaire périphérique et le système nerveux central, caractérisée par la production des médiateurs: Cytokines, compléments, radicaux libre et le monoxyde d'Azote. Tous ces éléments sont impliqués dans la mort neuronale. (Griffin *et al.*, 1998 ; Griffin, 2000) (Figure 01)

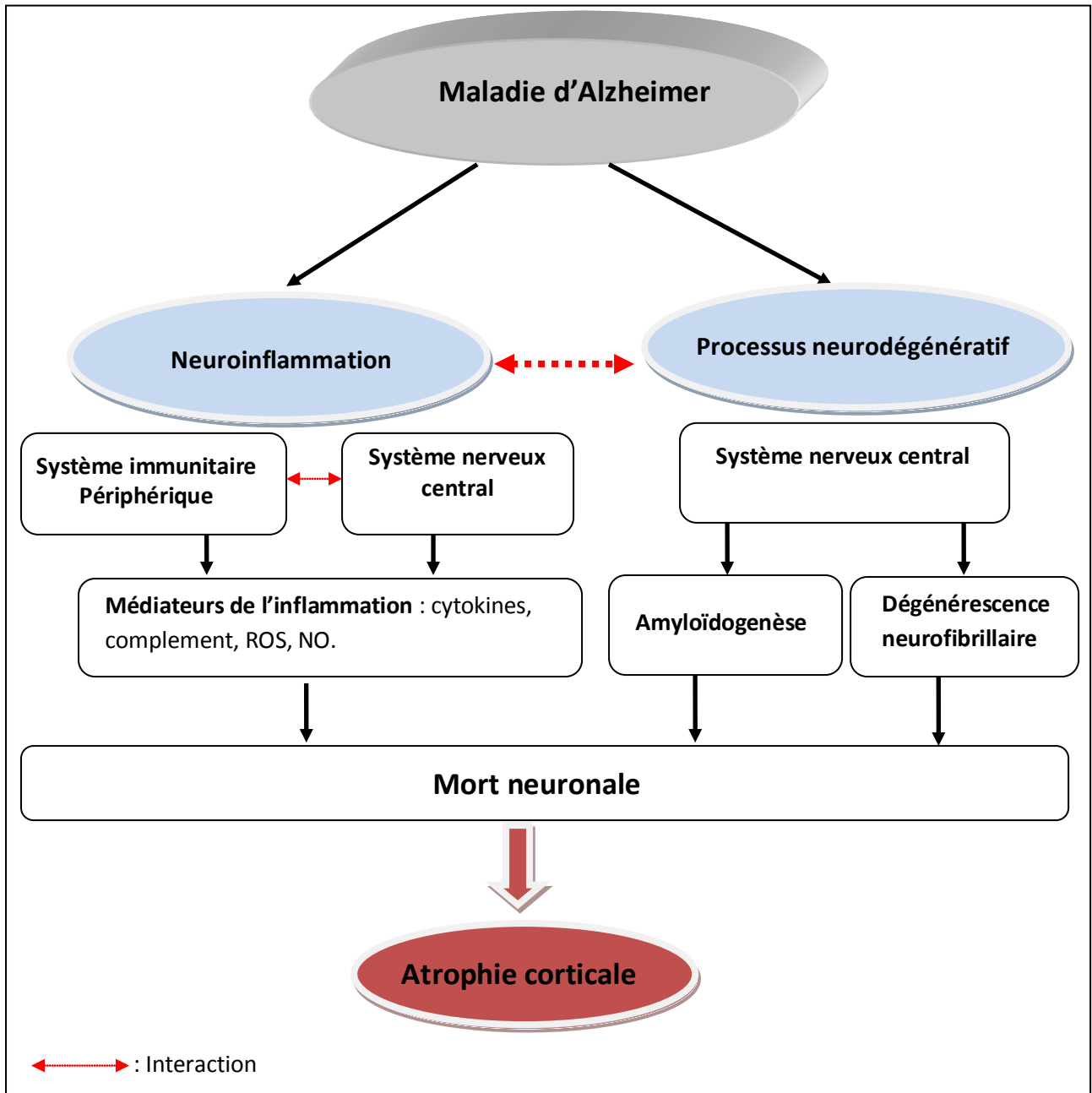


Figure 01 : Les mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer.

I.6.1. L'Amyloïdogénèse :

Aloïs Alzheimer fut le premier médecin à diagnostiquer la maladie d'Alzheimer. Lorsque sa patiente fut décédée, il pratiqua une autopsie sur son cerveau. Il y découvrit des dépôts d'une substance blanche qui ressemblait à de l'amidon, fut baptisée par Alzheimer "**amyloïde**".

Dans les années 1980, plusieurs chercheurs tentèrent de découvrir la nature de cette substance. On finit par découvrir que l'amyloïde était un fragment d'une protéine dissimulée un peu partout sur la membrane des neurones. On l'appela **Amyloid Protein Precursor (APP)**.

L'APP est une molécule d'interaction cellule-cellule, un récepteur de surface et un facteur de croissance (formation du cytosquelette, régulation du calcium intracellulaire, formation des synapses, modulation des cholinestérases). Elle est véhiculée dans l'axone vers l'extrémité nerveuse et la synapse où elle joue un rôle important dans la plasticité neuronale et la neurotransmission.

L'APP est une protéine transmembranaire sensible à la protéolyse par un ensemble de protéases appelées, α , β ou γ -secretases. (Couderc, 2000)

Les voies de clivage de l'APP engagées sont les suivantes:

- **la voie non amyloïdogénique (clivage normal):** L' α -secretase coupe l'APP avant la séquence d'A β produisant des fragments de peptide qui ne sont pas amyloïdogénique : un fragment soluble de N-terminal d'APP (sAPP α) et un fragment C-terminal (C83) ancrée dans la membrane. Par contre, la γ -secretase libère à l'intérieur de la cellule un fragment C-terminal de 3kD (p3).

- **la voie amyloïdogénique (clivage anormal):** L'action de la β -secretase forme un fragment N-terminal (sAPP β) et un fragment C-terminal (C99). Ce dernier subit un clivage sur le C-terminal par le γ -secretase produisant la forme amyloïdogénique appelé **beta-amyloïde (Figure 02, 03)**.

En fait l'A β existe sous une forme longue de 42 acides aminés (A β_{42}) et sous une forme courte de 40 acides aminés (A β_{40}). Dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer précoce, il y a une surproduction de forme A β_{42} qui est plus neurotoxique, probablement du fait de sa localisation intracellulaire et de sa plus grande capacité à s'agréger que l'A β_{40} (Couderc, 2000 ; Scheuner et al., 1996). L'accumulation de la beta-amyloïde va former des amas insolubles et neurotoxiques, appelés "plaques séniles."

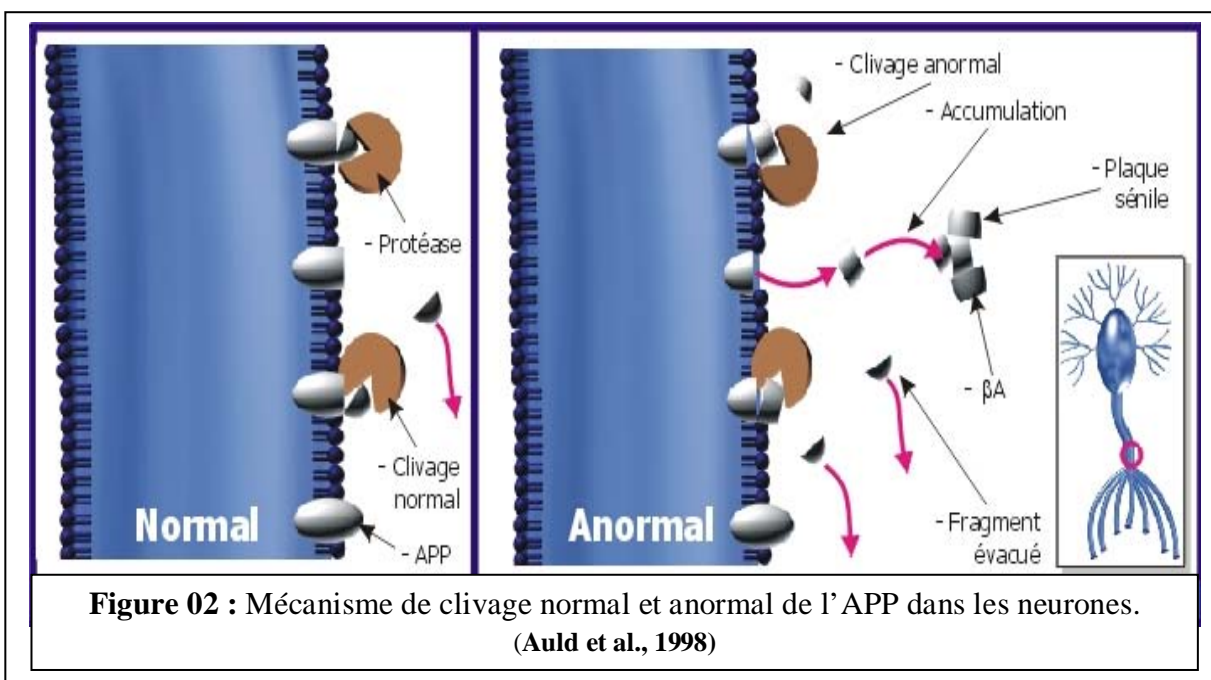


Figure 02 : Mécanisme de clivage normal et anormal de l'APP dans les neurones.
(Auld et al., 1998)

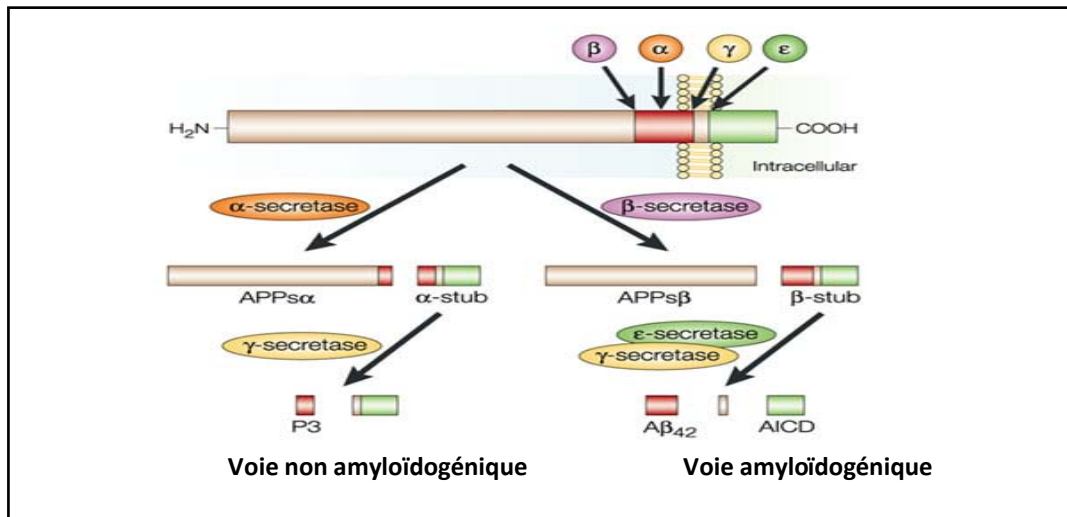


Figure 03: Processus protéolytique de l'APP (Frank, 2002).

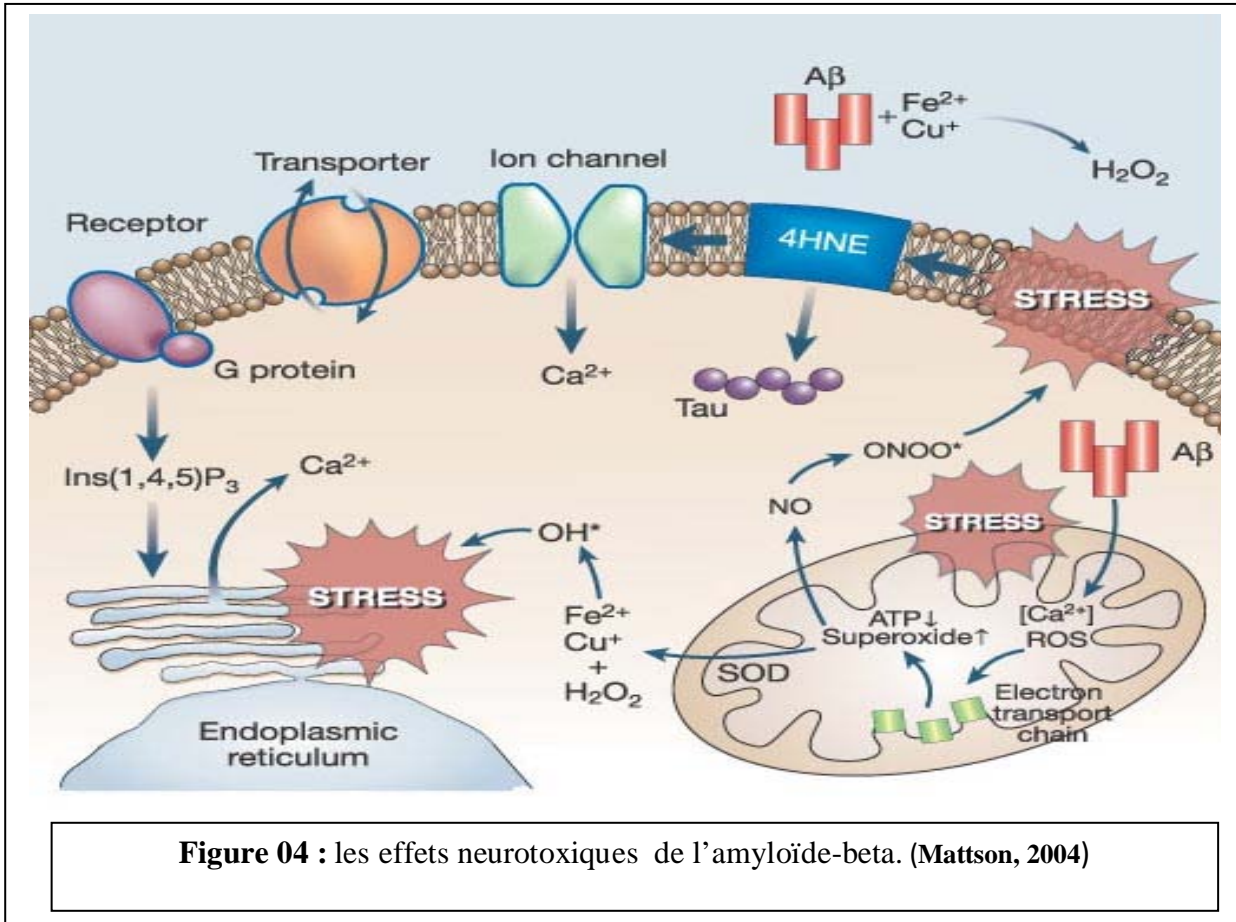
I.6.1.1. Action neurotoxique de l'Amyloïde β:

L'interaction des oligomères $A\beta$ avec le Fe^{2+} ou Cu^{+2} génèrent des radicaux H_2O_2 . Ces derniers vont induire une réaction oxydative en chaîne qui va entraîner une production excessive d'un aldehyde neurotoxique ; 4-hydroxynonanal (4-HNE).

Le 4-HNE a un effet délétère sur les protéines membranaires en agissant sur les acides aminés (cystéine, lysine et histidine). Les protéines affectées sont: des protéines de transport membranaire (transport du glucose, transport du glutamate, transport ionique), les canaux ioniques (VDCC; voltage-dependent chloride channel, NMDAR; *N*-methyl-d-aspartate receptor).

Le 4-HNE et les radicaux libres peuvent oxyder aussi la protéine Tau ce qui favorise son agrégation.

L' $A\beta$ pourra engendrer notamment un stress oxydatif mitochondrial et la dérégulation de l'homéostasie calcique ce qui altère la chaîne de respiration favorisant ainsi la production du radical superoxyde et la diminution de la production de l'ATP. Le superoxyde produit sera converti soit en H_2O_2 par le superoxyde dismutase ou il se combinera avec le monoxyde d'azote (NO) pour former le peroxynitrite ($ONOO^*$) responsable de la détérioration membranaire. L'interaction de H_2O_2 avec le Fe^{2+} ou Cu^+ libère le radical hydroxyle (OH^*), qui contribue au dysfonctionnement du réticulum endoplasmique. (Mattson, 2004) (Figure 04)



I.6.1.2. Les différents processus engendrés par l'amyloïdogenèse:

Des modifications du métabolisme du précurseur de la protéine beta-amyloïde (APP), de la régulation du calcium intracellulaire, du métabolisme oxydatif et des systèmes membranaires de transduction du signal ont été impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Il y a actuellement de nombreux arguments en faveur d'un rôle central de la protéine beta-amyloïde ($A\beta$) dans le déclenchement du processus physiopathologique. (Couderc, 2000)

La protéine bêta-amyloïde s'accumule dans le milieu extracellulaire puis s'agrège avec différentes substances (l'apolipoprotéine E, l' α -antichymotrypsine, l'acétylcholinestérase, la fibronectine, l'ubiquitine, des protéoglycannes, l'aluminium, le fer, la protéine tau ...). L'effet neurotoxique de ces dépôts amyloïdes serait à la fois direct et indirect, par induction d'une entrée massive de calcium dans la cellule (altération de la membrane cellulaire et la stimulation des aminoacides excitateurs comme le glutamate) et par activation de la microglie qui provoque une augmentation des radicaux libres et des réactions inflammatoires. Le résultat final de cette cascade est la mort neuronale par apoptose. (Beyreuther et Masters., 1997)

A- L'hypométabolisme:

Aux stades précoces de la maladie d'Alzheimer, des études par PET-Scan (Tomographie par Emission de Positron) ont montré une réduction de l'utilisation du glucose dans le cerveau des patients. Des auteurs ont montré que ce phénomène est dû, pour une large part, à une diminution de l'activité du signal de transduction des récepteurs à l'insuline.

Une mutation dans un gène mitochondrial codant pour le cytochrome oxydase semble être la cause à la fois d'une production de radicaux libres et d'un dysfonctionnement métabolique du neurone qui le fragilise face aux différents stress. (Mattson, 1997)

B- Le stress oxydatif:

Une corrélation entre des mutations héréditaires de l'ADN mitochondrial et de la maladie d'Alzheimer a été mise en évidence. Les gènes mis en cause sont ceux du cytochrome oxydases (CO) I et II qui font partie de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. Ces mutations ont pour conséquence une réduction de l'activité des CO et donc une accumulation des radicaux oxygénés actifs. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la baisse des taux des CO dans le cerveau des patients atteints de MA, les déficits du métabolisme énergétique et le rôle des radicaux libres dans cette pathologie. Le schéma physiopathologique serait le suivant: (**Mattson, 1997**)

Mutation de l'ADN mitochondriale ==> baisse des Cytochrome oxydases ==> augmentation des radicaux libres ==> augmentation de la peroxydation lipidique membranaire ==> diminution de l'entrée du glucose dans le neurone ==> baisse de l'activité des ATPases ==> augmentation de la vulnérabilité des neurones à l'excitotoxicité ==> l'apoptose.

C- L'inflammation:

L'A β joue un rôle principal dans la Pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (**Walsh et al., 2002; Walsh et Selkoe., 2004**). Des études ont montré que la charge de A β est mal corrélée avec la progression et la sévérité de la démence. Par contre, la dégénérescence neurofibrillaire est mieux corrélée avec la pathologie (**Walsh et al., 2002**).

En plus de ces effets toxiques directs, l'A β peut également favoriser la neurodégénération par les mécanismes parallèles comprenant l'activation des cellules microgliales et les astrocytes qui vont déclencher une réponse inflammatoire (**Akiyama et al., 2000 ; Tan et al., 1999**). Une fois activées, les cellules microgliales peuvent recruter les astrocytes et augmenter activement la réponse inflammatoire autour des dépôts extracellulaires d'A β . Les acteurs pivots neuroinflammatoires sont les cytokines, les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, la cascade de complément, les enzymes tels que la NOS synthase inductible (NOS2), la cyclooxygénase-2 (COX-2) et l'arginosuccinate synthetase. Tous ces facteurs contribuent au dysfonctionnement et à la mort neuronale. (**Abbas et al., 2002 ; Bezzi et al., 2001**)

D'autre part, les cellules gliales sont responsables de la synthèse des Apo E qui elles-mêmes jouent un rôle important dans l'amyloïdogenèse. En effet, l'isoforme la plus fréquente ApoE3, se lie à la forme alpha de l'APP soluble en masquant le(s) domaine(s) responsable(s) de l'activation de la microglie. De ce fait, la réaction inflammatoire n'a pas lieu. L'ApoE4 possède une affinité beaucoup plus faible pour la sAPP- α permettant ainsi l'inflammation. Ce processus inflammatoire peut enfin générer une augmentation locale des radicaux libres. (**Yan et al., 1998**)

D- Déficit en neurotransmetteurs :

Les lésions de la MA touchent principalement les voies cholinergiques mais d'autres régions sont atteintes également. Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit cholinergique peut atteindre jusqu'à 90 % dans les stades sévères de la maladie et concerne le néocortex, l'hippocampe, le noyau basal de Meynert, la bandelette diagonale de Broca, le septum, le striatum et le thalamus. Le déficit somatostatinergique touche le néocortex et l'hippocampe. La baisse des concentrations peut atteindre 60 %. (**Welch et Gambetti., 1998**)

I.6.2. La dégénérescence neurofibrillaire:

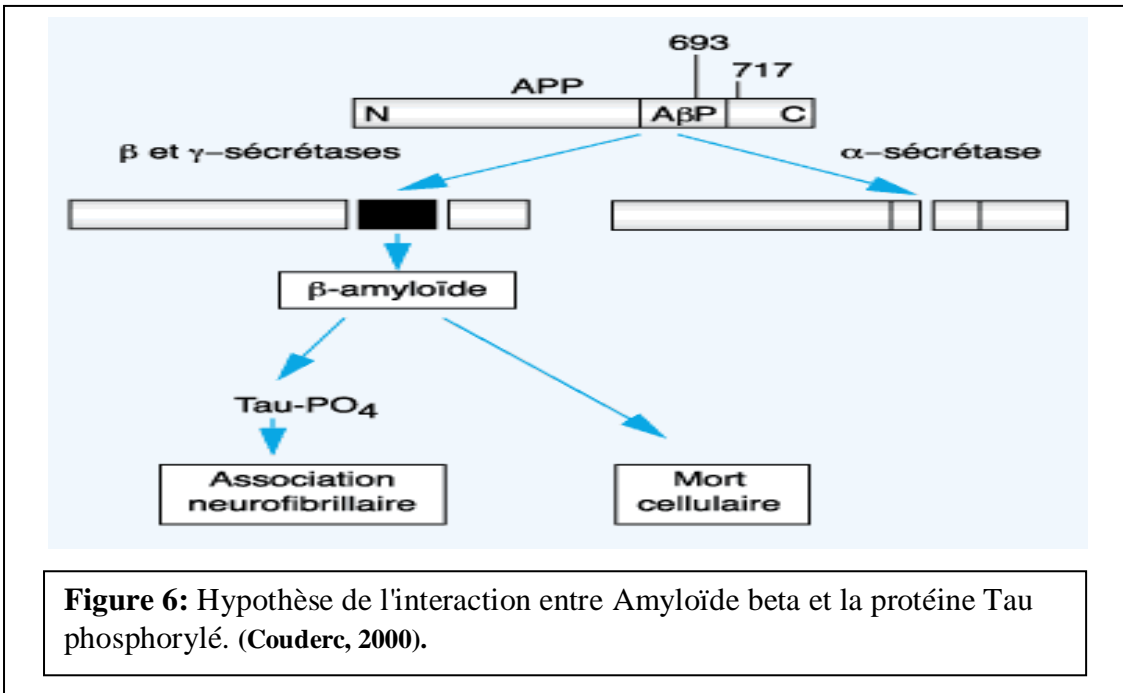
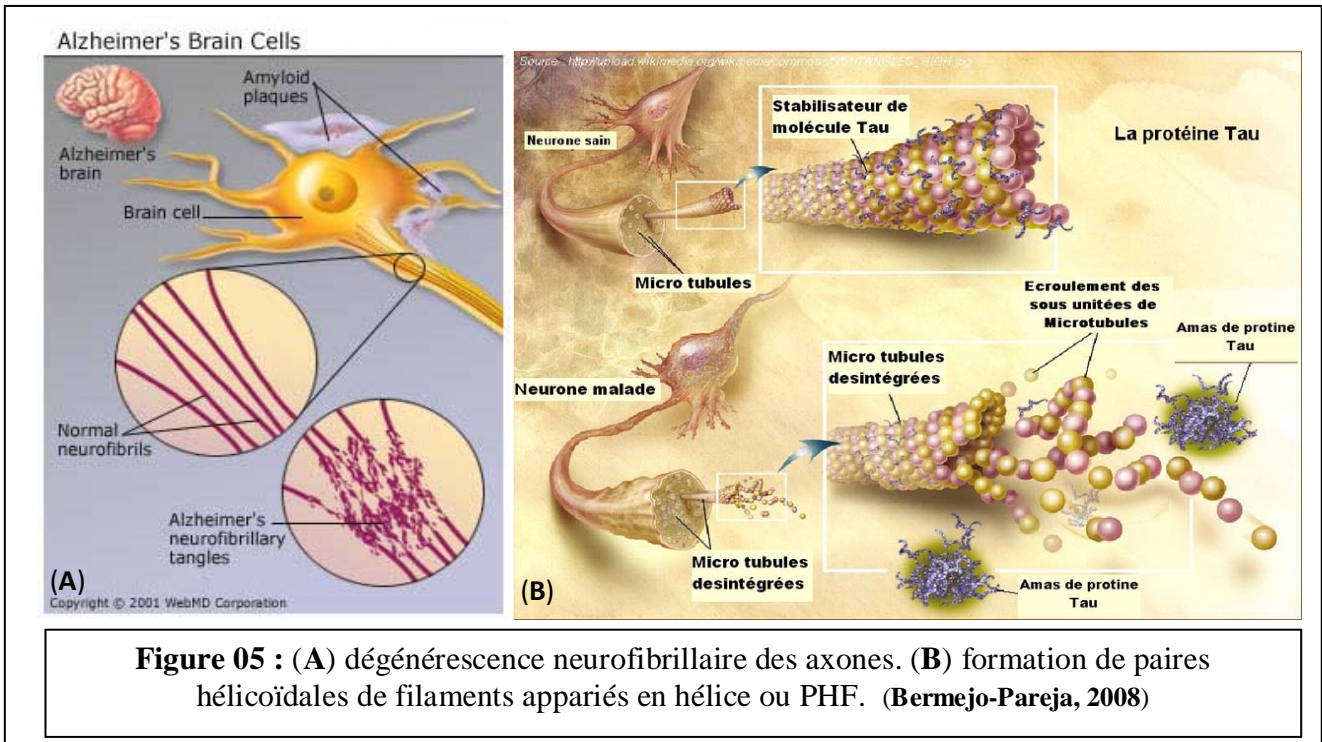
La dégénérescence neurofibrillaire correspond à une accumulation intraneuronale de fibrilles formées de filaments très caractéristiques, appelés les paires de filaments appariés en hélice ou PHF (*paired helical filaments*). Ces filaments pathologiques sont d'excellents marqueurs ultrastructuraux du processus dégénératif de type Alzheimer. Ils sont constitués essentiellement de protéines microtubulaires Tau. Dans le neurone normal, ces protéines stabilisent les microtubules (**figure 5A**). Il s'agit de filaments du cytosquelette jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes de transport intraneuronale. Au cours de la maladie d'Alzheimer, les protéines Tau s'agrègent sous forme de PHF. Elles sont nommées protéines Tau-PHF qui sont anormalement phosphorylés. Les conséquences de la dégénérescence sont catastrophiques pour les neurones, les privant de leur fonction la plus importante: la communication. La dégénérescence commence, comme l'amyloïdogénèse, à se manifester dans le cerveau des malades atteints d'Alzheimer, d'abord dans l'hippocampe: la zone de la mémoire. Les neurones de cette région sont donc tout d'abord privés d'acétylcholine puis meurent. Puisque les neurones ne se régénèrent pas, les autres zones du cerveau ne reçoivent plus d'acétylcholine pour mémoriser de nouvelles informations. C'est pourquoi la maladie d'Alzheimer débute toujours par une perte de la mémoire chez les sujets atteints. (**Delacourte, 2000**)

I.6.2.1. L'hyperphosphorylation de la protéine tau :

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules du cytosquelette. Son affinité pour ces structures est régulée par phosphorylation. Une hyperphosphorylation de la protéine tau empêche celle-ci d'exercer son rôle de polymérisation et de stabilisation des microtubules du cytosquelette neuronal. Il s'ensuit une perturbation du réseau microtubulaire et donc du transport axonal. L'atteinte de ce système vital entraînerait la dégénérescence du neurone (**figure 5B**). Il se forme 3 variant intracellulaires insolubles et pathologiques de la protéine tau (tau 60, tau 64, tau 69) qui s'agrègent par paires hélicoïdales de filaments et qui, après glycosylation, constituent les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). (**Delacourte, 2000**)

Les kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau sont essentiellement des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein). L'activation des ces MAP-kinases peut être due à différents facteurs : diffusion intraneuronale de substance amyloïde soluble et/ou stimulation du glutamate induisant une entrée calcique. (**Delacourte, 2000**)

L'interaction entre l'Amyloïde beta et les formes phosphorylées de la protéine tau (tau-PO4) pourrait favoriser la dégénérescence neurofibrillaire. (**Figure 06**) (**Couderc, 2000**).



I.6.2.2 Le système protéolytique Ubiquitine-Protéasome (UPS):

Les études récentes ont indiqué que l'UPS pourrait être liés à la phase initiale de la pathologie, qui est marquée par un dysfonctionnement synaptique, aussi bien qu'a la phase finale, caractérisées par une neurodégénération. Les agrégats insolubles de protéine dans le cerveau des patients pourraient résulter du défaut de fonctionnement ou de saturation de l'UPS, ou des changements structurels dans les protéines cible, qui empêchent leur identification et dégradation par l'UPS. La protéolyse défectueuse pourrait causer le dysfonctionnement synaptique observé dans la phase initiale puisque

l'UPS est connu pour jouer un rôle dans le fonctionnement normal des synapses. (Bermejo-Pareja F et al., 2008 ; Zouambia et al., 2008)

Cependant, l'A β inhibe le fonctionnement du protéasome conduisant ainsi à l'accumulation et à l'agrégation des protéines tau hyperphosphorylées dans les dégénérescences neurofibrillaires. (Welch et al, 1998)

I.2.3. L'atrophie corticale :

L'amyloïdogenèse et la dégénérescence neurofibrillaire provoquent une perte importante de neurones, responsable d'une atrophie corticale. Chez les malades d'Alzheimer, le cerveau peut perdre 8 à 10% de sa masse tous les dix ans, contrairement à seulement 2% pour une personne saine. Cette atrophie corticale touche, tout d'abord, le lobe temporal interne avec l'hippocampe. A un stade plus avancé ce sont les cortex associatifs frontaux et temporo-pariétaux (région du cerveau impliqués dans les processus cognitifs comme le langage, la mémoire ou l'intégration multi-sensorielle) qui sont touchés. (Zékri, 1999)

I.7. Thérapies:

Le traitement de la maladie d'Alzheimer repose sur deux volets : l'un largement démontré est symptomatiquement dominé par les anticholinestésiques, l'autre beaucoup plus prometteur mais encore au premier stade des essais cliniques est anti-dégénératif. (Laurent et al., 2007)

I.7.1. Thérapie contre le déficit cholinergique:

L'approche la plus efficace et admise de la maladie repose sur l'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer : le système cholinergique est impliqué dans le déficit cognitif des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, même s'il n'explique pas l'ensemble des anomalies cliniques, biochimiques et pathologiques observées. Pour augmenter la concentration en acétylcholine, trois stratégies ont été utilisées :

- l'apport de précurseurs de l'acétylcholine (Lécithine).
 - l'inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation normale du neurotransmetteur (Physostigmine, Tétrahydroaminoacridine, Donépézil, Rivastigmine).
 - la stimulation des récepteurs post-synaptiques par des agonistes muscariniques ou nicotiques.
- L'inhibition de l'acétylcholinestérase a été, à ce jour, la seule approche qui a conduit à la mise sur le marché de médicaments qui ont démontré statistiquement qu'ils améliorent sensiblement les performances cognitives et pas seulement la mémoire, qu'ils retardent la progression des symptômes en particulier ceux liés aux troubles comportementaux. (Laurent et al., 2007)

- Le Donépézil (**ARICEPT**[®]), c'est un inhibiteur pipéridinique avec absence de toxicité hépatique. Sa demi-vie plasmatique est de 70 heures ce qui permet une seule prise quotidienne. Les effets secondaires sont relativement limités, et principalement cholinergiques (nausées, vomissements, diarrhées, crampes musculaires, parfois cauchemars), et sont minimisés par une titration du produit avec un dosage initial de 5 mg par jour pendant 1 mois, avant d'atteindre la dose stable de 10 mg. (Laurent et al., 2007)
- La Rivastigmine (**EXELON**[®]), c'est un inhibiteur à la fois de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase. La tolérance est satisfaisante et les effets secondaires essentiellement gastro-intestinaux. La Rivastigmine nécessite la recherche de dose par paliers de 2 semaines, sous couvert de tolérance. La prise bi-quotidienne et l'ascension posologique en quatre paliers peuvent améliorer la tolérance digestive. (Laurent et al., 2007)
- La Galantamine (**REMINYL**[®]) est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui a également un rôle de modulation sur les récepteurs nicotiques et qui a été introduit en 2001 pour les

patients légers à modérés. Les effets secondaires sont identiques à ceux déjà observés avec les autres médicaments: nausées, anorexie, perte de poids chez environ 10 % des patients. (Laurent *et al.*, 2007)

I.7.2. Thérapies utilisant les Antagonistes du Glutamate:

Beaucoup d'arguments suggèrent que l'action excitotoxique du glutamate joue un rôle ou au moins aggrave les phénomènes de dégénérescence neuronale dans l'Alzheimer. Plus de 70 % des synapses excitatrices sont glutamatergiques. Parmi les 3 récepteurs glutamates (NMDA, AMPA et Kainate), des études précliniques ont montré que des antagonistes partiels du NMDA et de l'AMPA pouvaient avoir un effet bénéfique sur les symptômes cognitifs de l'Alzheimer. (Laurent *et al.*, 2007)

La Mémantine (**EBIXA**[®]) est un antagoniste NMDA avec une affinité modérée pour le récepteur qui peut diminuer la toxicité neuronale liée à une sécrétion prolongée de glutamate. Le produit est bien toléré conduisant parfois à des aggravations confusionnelles ou d'agitation. (Laurent *et al.*, 2007)

I.7.3. Thérapies symptomatiques contre les troubles psycho-comportementaux:

Ces traitements ne sont pas spécifiques et ne modifient favorablement ni le processus dégénératif, ni les troubles cognitifs, bien au contraire puisque la plupart des psychotropes ont dans ce domaine un effet négatif. Il est donc indispensable d'évaluer le bénéfice/risque pour chacun d'entre eux et savoir les interrompre dès que possible.

- **Anxiolytiques et hypnotiques:** Les anxiolytiques et hypnotiques sont largement et probablement excessivement prescrits chez ces patients très sensibles aux effets psychotropes.
- **Antidépresseurs:** Un traitement antidépresseur peut être proposé en cas de troubles dépressifs ou dans les perturbations émotionnelles sévères voire dans les troubles du sommeil, de sentiments de culpabilité, d'idées suicidaires, d'un ralentissement psychomoteur plus important que ne le voudrait le déficit cognitif.
- **Neuroleptiques:** Les neuroleptiques permettent le traitement des symptômes psychotiques, des états d'agitation, d'agressivité, les phénomènes hallucinatoires.
- **Régulateurs de l'humeur:** Certains régulateurs de l'humeur peuvent être efficaces dans les troubles du comportement avec agitation et agressivité. (Laurent *et al.*, 2007)

I.7.3. Vaccination:

Le vaccin expérimental AN-17792 contre la protéine A β 1-42 a été testé dans un large essai, chez 298 malades atteints de formes modérées à légères. Il s'agit d'une immunothérapie destinée à renforcer ou créer une réaction immunitaire intracérébrale contre les plaques amyloïdes produites en excès.

Une étude portant sur l'homme a montré que chez dix huit patients traités, 6 % ont développé un tableau de méningo-encéphalite auto-immune en moyenne après deux injections vaccinales (Orgogozo *et al.*, 2003). Le plus souvent, l'évolution a été favorable avec une réaction inflammatoire dans le LCR et la présence d'anticorps anti-amyloïde dans le sang et dans le LCR à un niveau proche des sujets vaccinés. Ces données suggèrent une médiation par des lymphocytes T et une activation microgliale d'autant que la contrôle anatomopathologique du sujet vacciné et décédé a montré un infiltrat inflammatoire et une résorption de plaques amyloïde avec des cellules géantes. L'étude a été interrompue dès la constatation de ces encéphalites. Les études futures devront donc tenir compte de cette complication. Toutefois, la présence d'un phénomène de résorption de l'A β par un biais d'immunité cellulaire s'avère optimiste pour ce type d'approche à travers l'utilisation de fragments d'A β moins immunogènes. (Laurent *et al.*, 2007)

II. Cytokines et neuroinflammation :

II.1. Les cytokines, médiateurs de l'immunité:

II.1.1. Introduction :

Les cytokines sont des médiateurs protéiques de faible masse moléculaire, produits par la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Elles jouent un rôle majeur dans la communication intercellulaire. De ce fait, ces biomolécules contribuent à l'homéostasie de l'organisme et sont impliquées dans la totalité des processus physiologiques et pathologiques.

Les cytokines agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, et constituent un vaste réseau qui régule les interactions cellulaires au sein du système immunitaire et assure ses relations avec les autres systèmes de l'organisme (**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat., 1996 ; Touil-boukoffa et al., 1998 ; Le Naour et al., 2000**).

II.1.2. Caractéristiques générales :

Les cytokines forment un ensemble hétérogène de molécules, à courte durée de vie, impliquées dans des fonctions diverses telles que l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, le contrôle de la prolifération cellulaire et des mécanismes de différenciation.

Les cytokines sont des petites protéines, le plus souvent glycosylées, dont la masse moléculaire est habituellement comprise entre 15 et 25 KDa à l'exception de la famille des chimiokines dont le PM moyen est de 8 KDa (**Combarnoux, 1996 ; Gentet, 1997**).

La majorité des cytokines sont sécrétées dès la fin de leur synthèse aboutissant à la libération de la forme soluble. L'IL-1 et le TNF- α présentent l'originalité de pouvoir être stockés dans la cellule, majoritairement sous la forme d'un précurseur, et exprimés sur la membrane (**Gentet, 1997**).

Les effets biologiques d'une cytokine ne peuvent donc être compris, étudiés et analysés qu'en prenant en compte le contexte physiopathologique dans lequel la cytokine exerce son activité. La production en cytokines est faible, elles sont actives à des concentrations de l'ordre du nanomoles ou du picomoles. Certaines cytokines, produites en abondance sous l'influence du système d'amplification (boucle de contrôle) peuvent agir à distance de façon endocrine, au sein du système immunitaire ou sur d'autres organes ou systèmes (système nerveux central ou endocrinien) (**Touil-boukoffa et al., 1998 ; Le Naour et al., 2000**).

II.1.3. Mode d'action des cytokines:

Les cytokines agissent rarement seules, mais de manière conjointe avec d'autres cytokines ou d'autres effecteurs (antigènes, agents mitogènes), créant tout un réseau de communication cellulaire. Afin de mieux étudier ces interactions, des définitions ont été données à leurs attributs:

- Pléiotropie: capacité pour une cytokine d'induire différents effets biologiques suivant leur cible ou d'activer plusieurs cibles différentes.
 - Redondance : différentes cytokines ont le même effet biologique.
 - Synergie : les effets combinés de deux cytokines sont supérieurs à leurs effets séparés.
 - Antagonisme : capacité d'une cytokine d'inhiber un effet biologique.
 - Induction de cascades: une chaîne de communication cellulaire s'établit.
- (**Arkin et al., 2003 ; Goldsby et al., 2003 ; Zdanov et al., 1996**)

II.1.4. Structure des cytokines:

La plupart des cytokines possèdent une structure hélicoïdale plus ou moins compacte, dont la conformation est maintenue par des ponts disulfure intracaténaux entre des résidus cystéine. De nombreuses cytokines présentent une structure riche en hélices : 4 hélices en position

antiparallèle formant le corps de la molécule, dont la structure indispensable à l'activité est maintenue par un ou des ponts disulfure. D'autres sont riches en feuillets β ; ou encore constituées, comme les chimiokines d'une hélice α et d'un feuillet β . Généralement, les cytokines agissent sous forme de monomères, quelques rares cytokines présentent une forme active dimérique ou trimérique (**Gentet, 1997**).

II.1.5. Classification des cytokines:

On distingue classiquement plusieurs familles de cytokines qui se caractérisent par leurs propriétés biologiques dominantes, ou du moins celles qui ont conduit à leur identification.

II.1.5.1. Les interleukines (IL):

Ce sont des cytokines produites principalement par des leucocytes. Elles peuvent être impliquées dans l'hématopoïèse, participer aux mécanismes de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires), ou être plus spécialisées dans les communications intercellulaires au cours de la réponse immunitaire innée ou adaptative. Plusieurs interleukines sont identifiées à ce jour. Elles sont identifiées par un numéro (IL-1, IL-2, . . .) selon une nomenclature internationale (**Gentet, 1997 ; Le Naour et al., 2000**).

II.1.5.2. Les interférons (IFN):

La famille des interférons (IFN) comprend plusieurs molécules, les IFN de type I (IFN $-\alpha, \beta, \omega, \tau$) et type II (IFN- γ). Les IFN ont en commun une activité antivirale et antiproliférative. L'IFN- γ n'a pas d'homologie évidente avec IFN- α et β . L'IFN- γ est une cytokine produite par les lymphocytes T (Th1), CD4 et CD8, et les cellules NK. Il induit l'expression des molécules de classe II du CMH, la différenciation des monocytes en macrophages et l'activation de leurs différentes propriétés de phagocytose et de production des dérivés oxygénés, de monoxyde d'azote, et d'autres mécanismes bactéricides (**Touil-boukoffa et al., 1998 ; Schroder et al., 2004 ; Stetson et Medzhitov, 2006**). Les IFN de type III, comprend l'IFN- λ_1, λ_2 et λ_3 ont été récemment identifiés (**Kotenko et al., 2003 ; Koyama et al., 2008**).

II.1.5.3. Les facteurs de nécrose des tumeurs (TNF):

La famille des facteurs nécrosant des tumeurs comprend deux membres : le TNF- α et le TNF- β . Ces deux molécules ont été découvertes pour la première fois en 1975 par Carswell et al à la base de leur activité cytotoxique sur les tumeurs d'où leur nomination (**Carswell et al., 1975**). Les deux molécules partagent 30% d'homologie de structure et se lient aux mêmes récepteurs. Quoique fonctionnellement très proches, elles sont produites par des types cellulaires différents. Les deux molécules sont douées d'activité immunomodulatrice et de pouvoir cytotoxique (**Abe et al., 2003**).

II.1.5.4. Les hématopoïétines:

Cette famille de facteurs inducteurs de la prolifération et de la différenciation hématopoïétique, inclut différents membres dont certains portent la dénomination de CSF (*colony stimulatory factor*). Les CSF, sont des facteurs de croissance hématopoïétiques, ils peuvent aussi jouer un rôle stimulant d'activateurs fonctionnels des cellules matures dont ils ont permis la différenciation. L'IL-13 agit sur des précurseurs très immatures et permet la formation de colonies de cellules différenciées de diverses lignées cellulaires (**Gentet, 1997**).

II.1.5.5. Les chémokines:

C'est une large famille de petites protéines (8-15 KDa) chémoattractantes qui contrôlent la circulation des subpopulations spécifiques de leucocytes dans les conditions physiologiques et dans les processus pathologiques. Elles sont classées à leur tour, selon l'arrangement des résidus cystéine du coté N terminal, en quatre familles : C, CC, CXC et CX3C. Les chémokines jouent un rôle dans le recrutement des leucocytes impliquant leur accumulation dans les sites inflammatoires, induisent leur activation et contrôlent la différenciation des lymphocytes ainsi que leur fonction effectrice (**Rollins, 1997 ; Loetscher et Clark-Lewis., 2001**).

II.1.6. Récepteurs des cytokines:

Les effets d'une cytokine sont conditionnés par les concentrations relatives disponibles au voisinage des cellules cibles, ainsi que par le nombre et la nature des récepteurs exprimés à leur surface. L'expression des effets biologiques des cytokines nécessite en effet leur interaction avec des récepteurs spécifiques exprimés à la surface cellulaire. La connaissance de la structure, des mécanismes d'expression et d'action de ces molécules représente un intérêt majeur en physiopathologie et dans la recherche d'effecteurs thérapeutiques. (**Tableau 02**)

On peut distinguer cinq familles de récepteurs de cytokines :

- Les récepteurs d'hématopoïéses : les membres de cette famille de récepteurs, dits de type I.
- Les récepteurs des interférons : les récepteurs de cette famille, ou récepteurs de type II.
- La superfamille des immunoglobulines : certains récepteurs sont constitués dans leur région extracellulaire exclusivement des domaines globulaires qui définissent la superfamille des immunoglobulines.
- La famille du récepteur du TNF : Plusieurs membres de cette famille sont caractérisés par la présence dans le domaine intracellulaire d'un sous domaine capable d'interagir avec les médiateurs de l'activation des caspases et dénommé "domaine de mort" ;
- Les récepteurs des chimiokines : ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires associés à une protéine G.

Récepteur	Principaux ligands associés	Principales cellules présentant ce type de récepteur
Récepteur de la superfamille des immunoglobulines	IL-1, M-CSF, C-kit	Lymphocytes T _H , B, NK Cellules endothéliales musculaires Macrophages et neutrophiles Hépatocytes
Récepteurs des cytokines de classe I	IL-2 à 9 et 11 à 13, 15 GM-CSF, G-CSF, OSM, LIF, CNTF Hormone de croissance, Prolactine	Lymphocytes T _H et T _C activés Certaines cellules NK et T _C au repos Mastocytes
Récepteurs des cytokines de classe II	IL-10, IFN- α, β, γ	Macrophages Cellules présentatrices de l'antigène Leucocytes et fibroblastes, lymphocytes T _H 1, T _C , cellules NK.
Récepteurs des TNF	TNF α et β, CD ₄₀ , Nerve Growth Factor	Cellules nerveuses Lymphocytes B
Récepteur des chémokines	IL-8	Neutrophiles

Tableau 02 : les familles de récepteurs de cytokines, leurs principaux ligands et principales cellules les exprimant. (**Assadullah, K et al., 2003 ; Boulanger, M. J et al., 2003 ; Goldsby R.A et al., 2003**)

Plusieurs récepteurs pour des cytokines différentes partagent une chaîne commune, comme par exemple la chaîne β des récepteurs de l'IL-2 et l'IL-15, ou la chaîne α des récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13. Ceci explique en partie les similarités des activités biologiques de certaines cytokines. Plusieurs récepteurs, ou fragments de ces récepteurs, peuvent se trouver sous forme soluble (par exemple : chaîne α du récepteur à l'IL-2, chaîne α du récepteur à l'IL-6, récepteurs solubles du TNF), et interfèrent avec les activités biologiques des cytokines (Le Naour *et al.*, 2000).

II.1.7. Cytokines et régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire :

II.1.7.1. Les cytokines, protéines médiatrices de l'inflammation :

L'inflammation est un processus physiologique qui apparaît en réponse à de nombreux stimuli qui peuvent être déclenchés. L'inflammation débute par une phase aiguë, d'installation rapide et de courte durée, généralement accompagnée d'une réponse systémique caractérisée par l'augmentation de nombreuses protéines sériques. Au cours de certaines pathologies, une activation immune persistante peut conduire à un état inflammatoire chronique responsable d'effets délétères. De nombreuses cytokines participent au développement de la réponse inflammatoire aiguë ou chronique. L'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α sont des cytokines à activité pro-inflammatoire dont les effets pléiotropes et redondants contribuent à l'installation d'une réponse inflammatoire. L'IL-1 et le TNF- α sont responsables d'une augmentation importante du niveau d'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Ceci contribue à une adhésion massive des polynucléaires neutrophiles circulants, des lymphocytes et des monocytes à la paroi vasculaire, facilitant ainsi le passage de la barrière endothéliale et la colonisation tissulaire.

En particulier, l'IL-1 et le TNF- α stimulent la production par les macrophages, de la chimiokine IL-8. L'IL-8 ainsi produite agit comme un facteur chémoattractant vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles qui adhèrent à la paroi vasculaire. Lors de la persistance de l'agent pathogène, une réponse inflammatoire chronique peut s'installer. Deux cytokines ont un rôle central dans le développement de cet état inflammatoire chronique, il s'agit du TNF- α et de l'IFN- γ . Le rôle majeur de l'IFN- γ au cours de la réponse inflammatoire est de participer à l'activation des macrophages. Cette activation a pour conséquence une augmentation de l'expression des molécules de classe II du CMH, une augmentation de la production de monokines, une induction de la NOS2 et une augmentation de l'activité microbicide (Cope, 1996 ; Galanau et Emilie., 1997 ; Le Naour *et al.*, 2000).

Les lymphocytes T CD4+ ont été subdivisés en différentes sous populations en fonction de leur « profil cytokinique ». Ces sous populations incluent Th1, Th2 et les T reg (Weaver *et al.*, 2006). Récemment, une autre population des T a été décrite, Th17. Ces cellules sont caractérisées par la production des cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IL-17. Plusieurs travaux ont montré l'implication de cette cytokine dans l'initiation et le développement de l'inflammation chronique (Weaver *et al.*, 2006 ; Furuzawa-Carballeda *et al.*, 2007 ; Piccirillo, 2008 ; Gaffen, 2008).

II.1.7.2. Les cytokines (Th1, Th2, Treg et Th17) et l'immunorégulation:

L'ensemble des interactions fonctionnelles mettant en jeu les cytokines définit la notion de réseau. Au sein de ce réseau, s'articulent des cytokines immunorégulatrices.

En effet c'est en 1986 que Mosmann *et al.* montrent dans un modèle murin que les lymphocytes T CD4+ peuvent être divisés sur la base de leur profil de sécrétion cytokinique en deux sous-populations, les lymphocytes Th1 et Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Ces deux types de lymphocytes Th dérivent d'un précurseur commun, sécrétant de l'IL-2 mais ne sécrétant ni IL-4, ni IFN- γ . La stimulation via son TCR conduit ce précurseur à se différencier en lymphocyte TH0 produisant à la fois des cytokines de type 1 et de type 2. La différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2 dépendra

ensuite de facteurs environnementaux comme les cytokines. L'IL-12 est essentielle au développement, à la prolifération et à l'expression génique des lymphocytes Th1, c'est une cytokine hétérodimérique de 75 kDa composée de deux sous-unités p35 et p40. Elle est typiquement sécrétée par des cellules dendritiques activées via leur TLR (*Toll Like Receptor*) qui ont été exposées à des ligands tels que du LPS ou des motifs CpG (**Reiner, 2007**). L'IL-12 peut-être également sécrétée par des cellules dendritiques et des macrophages en réponse à un parasitisme par des procaryotes ou des eucaryotes intracellulaires ainsi que par certains virus (**Hsieh et al., 1993**). Le rôle de l'IL-12 dans la polarisation et le développement de la réponse Th1 est renforcé par son action répressive sur l'expression du facteur de transcription Gata-3, régulateur clé du développement Th2 (**Ouyang et al., 1998**). L'IFN- γ est la cytokine Th1 par excellence. En effet, la signalisation induite en aval de son récepteur va permettre d'activer via STAT1 le facteur de transcription T-bet requis pour la polarisation Th1 (**Afkarian et al., 2002**) (**Figure 07**). L'IL-4 est, quant à elle, la cytokine qui va permettre l'orientation vers un phénotype TH2. La principale source d'IL-4 semble être les lymphocytes T CD4+ eux-mêmes, mais elle peut être également produite par les mastocytes, les basophiles et les cellules NKT (*Natural Killer T*) (**Le Gros et al., 1990; Noben-Trauth et al., 2000**). La signalisation induite par l'IL-4 promeut via STAT6 la transcription de gènes spécifiques Th2, dont le facteur de transcription clé dans la polarisation Th2 : Gata-3 (équivalent de T-bet pour les Th1) (**Figure 07**). En effet, des souris déficientes pour l'IL-4 ne développent pas de réponse Th2 (**Kuhn et al., 1991**).

Les lymphocytes Th sont appelés « *helpers* » ou auxiliaires car ils permettent d'aider au développement de la réponse lymphocytaire B notamment en participant à la commutation isotypique. Les Th1 vont, via la sécrétion d'IFN- γ permettre la commutation en immunoglobulines G2a (IgG2a), qui fixeront le complément. Les Th2 par leur sécrétion de cytokines favorisent la commutation en IgE et IgG1, ces Ig produites par les lymphocytes B vont être impliquées dans les réponses atopiques ainsi que dans les réponses allergiques.

Récemment, de nouvelles données ont suggéré que le choix de lignage pour les lymphocytes T CD4+ « *helpers* » n'était pas aussi binaire que celui décrit jusqu'à présent. Au grand débat sur les mécanismes de la différenciation Th1/Th2 s'ajoute un degré de complexité supplémentaire avec la découverte d'une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4+ « *helpers* » : les lymphocytes Th17 (**Dong, 2006; Weaver et al., 2007**).

Leur découverte est due à la mise en lumière de nouvelles cytokines comme l'IL-17 et l'IL-23, mais également due à l'attribution de nouveaux rôles joués par des cytokines pléiotropiques telles que le TGF- β ou l'IL-6. Dès 2005, des études ont suggéré que les Th17 ne seraient pas un variant des lignées Th1 ou Th2, mais bien un lignage à part entière. En effet, en absence d'IL-4, d'IFN- γ et indépendamment des facteurs de transcription STAT1 et STAT6, on a une différenciation de précurseurs naïfs en lymphocytes Th17 (**Harrington et al., 2005; Park et al., 2005**). D'autres équipes ont rapidement montré l'importance de l'IL-23 dans le maintien des réponses Th17 mais qui n'était pas critique pour l'induction du lignage Th17. Il apparaît plutôt que ce soit la combinaison d'IL-6 et de TGF- β qui soit cruciale dans le développement d'une réponse Th17 (**Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006**). De plus, l'identité cellulaire de cette population a été confirmée par la découverte d'un facteur de transcription spécifique : ROR γ dont l'expression est inductible par la combinaison d'IL-6 et de TGF- β (**Ivanov et al., 2006**). Les Th17 ont en plus de leur rôle dans la protection de l'hôte contre les pathogènes une importance fonctionnelle au niveau des manifestations d'autoimmunité.

En effet, une souris déficiente pour ROR γ ou bien pour l'IL-6 présente une absence de cellules Th17 infiltrant les tissus périphériques et une atténuation du développement de pathologies auto-immunes (**Ivanov et al., 2006**). Une notion intéressante mise en lumière par Bettelli *et al.* est qu'il y aurait, en fonction de la quantité de TGF- β et d'IL-6 présente dans le microenvironnement, une différenciation des précurseurs T CD4+ soit en Ti-Treg (*TGF- β induced Treg*, néo-conversion de lymphocytes T CD4+ CD25- Foxp3- en lymphocytes T CD4+ CD25+ Foxp3+ régulateurs) si la concentration en TGF- β est supérieure, soit en lymphocytes Th17 effecteurs si la concentration en

IL-6 est plus importante. Il y aurait un développement réciproque et une balance entre les lymphocytes T effecteurs et T régulateurs. En situation physiologique, le TGF- β prépondérant, favoriserait la génération de Treg afin d'assurer la tolérance périphérique au soi, alors que dans une situation physiopathologique et inflammatoire, l'IL-6 produit par les cellules de l'immunité innée favoriserait plutôt le développement d'effecteurs afin d'assurer une réponse optimale (**Betelli *et al.*, 2006**) (**Figure 07**). Récemment, Mucida *et al.* ont identifié un métabolite de la vitamine A, l'acide rétinoïque comme régulateur clé de la polarisation TGF- β dépendante des réponses immunes. L'acide rétinoïque serait en effet capable d'inhiber l'induction proinflammatoire via l'IL-6 de cellules effectrices Th17 et de promouvoir la différenciation en Treg des précurseurs T (**Mucida *et al.*, 2007**).

La compréhension du choix initial de lignage effecteur pour une cellule T CD4+ naïve a été rendue plus complexe avec la découverte du nouveau lignage Th17. Il est donc imaginable à l'heure actuelle que l'intégration de signaux pour l'engagement vers un lignage peut encore gagner en complexité et en plasticité, avec notamment la division asymétrique des cellules T précurseurs. En effet, suivant le type de pathogène et la qualité de l'interaction avec la CPA, une même cellule T pourrait alors répartir de manière asymétrique les protéines impliquées dans la signalisation, dans le choix des lignages assurant ainsi une modulation rapide et adaptée de la réponse immunitaire adaptative (**Chang *et al.*, 2007**).

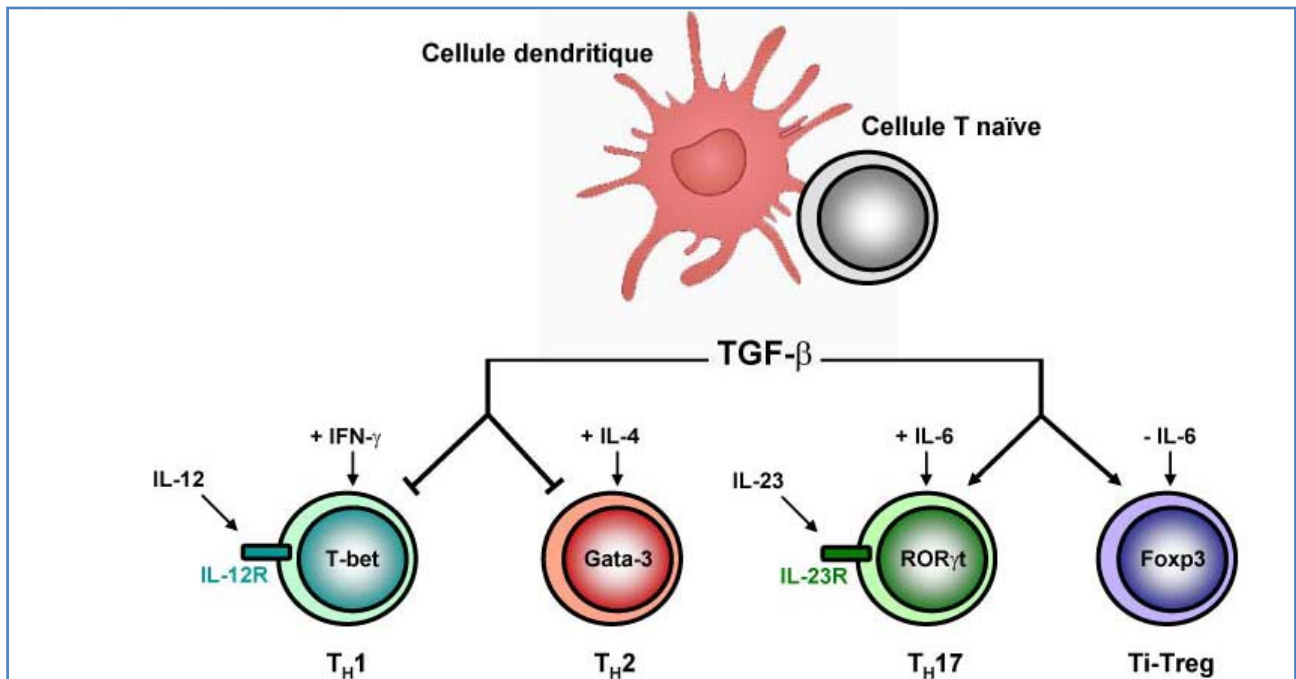


Figure 07: La différenciation des lymphocytes T « helpers ». (**Reiner, 2007**)

II.1.8. Cytokine et système nerveux centrales:

La présence de cytokines fonctionnelles et de leurs récepteurs dans le SNC a été mise en évidence pour la première fois par Breder et Plata-Salamon qui ont démontré dans le cerveau l'activité biologique et l'immunoréactivité des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α (**Breder *et al.*, 1988** ; **Plata-Salaman *et al.*, 1988**). Par la suite, des travaux ont montré que les cellules nerveuses (neurone, astrocyte, oligodendrocyte et microglie) étaient capables d'exprimer les messagers, les protéines, ou les récepteurs des cytokines à l'état basal.

Les cytokines sont impliquées dans le système immunitaire mais également dans divers processus physiologiques ou pathologiques dans les systèmes nerveux central et périphérique. Elles peuvent

activer des cellules résidentes du SNC (astrocyte et microglie) qui pourront sécréter à leur tour des cytokines (**Burger et Dayer., 1995**). Parallèlement, elles modulent la différenciation et la survie des cellules nerveuses. Cependant, les interactions entre système immunitaire et système nerveux peuvent être bidirectionnelles. En effet, la balance cytokinique (Th1 versus Th2) peut être à son tour modulée par l'action de neurotransmetteurs ou neuropeptides, produits par les neurones (**Szelenyi, 2001**). Ainsi, ces systèmes sont étroitement liés (**del Rey et al., 1981; Elenkov et al., 2000**).

Physiologiquement, l'expression des différentes cytokines dans le SNC est strictement régulée. Mais dans des conditions pathologiques, leur expression peut être temporellement et spatialement modifiée comme après une ischémie où l'on observe une augmentation de TGF- β 1 dans les neurones de l'hippocampe (**Zhu et al., 2000**).

II.1.9. Cytokines et pathologies:

Compte tenu de l'interaction du réseau des cytokines avec tous les systèmes de l'organisme, il est évident que des hyper ou hypo-expressions de cytokines, de leurs récepteurs ou des systèmes de transduction qui leur sont associés, sont impliqués dans le développement de processus pathologiques.

II.1.9.1. Cytokines et maladies auto-immunes :

Le rôle des cytokines dans les pathologies auto-immunes a été largement étudié. Certaines cytokines peuvent être impliquées dans l'initiation du processus auto-immun, d'autres sont des médiateurs de la phase effectrice de destruction des tissus et cellules cibles de la réponse auto-immune. Les cytokines jouent en effet un rôle majeur dans l'activation ou la régulation négative des cellules T auto-réactives. Le recours à des modèles expérimentaux animaux a largement contribué à la compréhension du rôle des cytokines dans l'établissement et les processus de progression des maladies auto-immunes. Sur la base de ces modèles expérimentaux, il a été proposé l'implication des cytokines Th-1 dans la pathogenèse de certaines maladies auto-immunes spécifiques d'organe, et le caractère inhibiteur des cytokines Th-2 dans le développement de ces mêmes pathologies. Cependant, cette simplification Th-1 /Th-2 reste relativement peu opérante dans la majorité des maladies auto-immunes systémiques pour lesquelles on retrouve des profils évolutifs de cytokines au niveau de la circulation et des organes cibles, en fonction du stade de la maladie (**Falcone et Sarvethick, 1999 ; Le Naour et al., 2000 ; Loannou et Isenberg., 2000 ; McInnes et Schett., 2007**).

II.2. La neuroinflammation:

Dans la plupart des atteintes neuroinflammatoires d'étiologie immune ou infectieuse, la réponse inflammatoire est caractérisée par une inflammation médiée par les lymphocytes T et les macrophages infiltrés, associée à une activation microgliale.

Les cellules de la Microglie représentent le système immunitaire inné de cerveau et par conséquent la première ligne de la défense contre les infections bactériennes, virale ou fongique. L'activation microgliale peut contribuer de manière significative aux dommages neuronaux. La microglie, les astrocytes et même les neurones contribuent directement à la neuroinflammation chronique. L'A β peut également favoriser la neurodégénération par les mécanismes parallèles comprenant l'activation des cellules microgliales et les astrocytes qui vont déclencher une réponse inflammatoire (**Tan et al., 1999 ; Akiyama et al., 2000**). Une fois activé, les cellules microgliales peuvent recruter les astrocytes qui augmentent activement la réponse inflammatoire autour des dépôts extracellulaires d'A β en produisant Les composants neuroinflammatoire telles que : les cytokines, les protéines de la phase aigue de l'inflammation, la cascade du complément, les enzymes inflammatoires (NO synthase inductible (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2)). Tous

ces facteurs peuvent contribuer au dysfonctionnement et la mort neuronal (**Bezzi et al., 2001 ; Abbas et al., 2002**).

II.2.1. Les cellules impliquées dans la neuroinflammation:

II.2.1.1. Les neurones:

Les neurones, responsables du stockage et de la transmission de l'information, sont désignés selon leur morphologie, leur localisation et leur fonction (neurone excitateur ou inhibiteur). Ils ont la capacité de générer un signal électrique transmissible d'un neurone à l'autre au niveau d'une synapse grâce à un neurotransmetteur (Exemple : glutamate, principal neurotransmetteur excitateur ou le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur).

Des travaux récents suggèrent que les neurones peuvent produire des médiateurs de l'inflammation. En effet, les neurones peuvent servir de source du complément, (**Rozemuller et al., 1989b ; Natarajan et al., 2002 ; Davis et La Roche., 2003; Pavlov et Tracey., 2005; Moore et al., 2005 ; Simard et al., 2006**), et plusieurs cytokines, comprenant IL-1 β , IL-6, et TNF- α (**Aloisi et al., 1992; Thery et al., 1992 ; Breder et al., 1993 ; Tchelingirian et al., 1994 ; Yan et al., 1995 ; Botchkina et al., 1997; Gong et al., 1998; Murphy et al., 1999; Orzylowska et al., 1999; Suzuki et al., 1999; Kim et al., 2001; Szczepanik et al., 2001b; Grammas et O'vase., 2001 Hoozemans et al., 2004;**) et M-CSF (**Du et al., 1997**).

Il est possible que les neurones soient impliqués dans l'exacerbation de la réaction inflammatoire locale et contribue ainsi à leur propre destruction ; par l'expression de l'iNOS (**Vodovotz et al., 1996 ; Lee et al., 1999 ; Heneka et al., 2001**), qui génèrent le monoxyde d'azote, qui une fois associé à l'anion superoxyde produit le peroxynitrite qui est à l'origine de la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer (**Boje et Arora, 1992 ; Smith et al., 1997; Heneka et al., 1998**). Par contre, le TNF- α et une faible concentration de NO confèrent une neuroprotection au système nerveux central contre une réaction inflammatoire locale. (**Heneka et O'banion., 2006**)

II.2.1.2. Les cellules gliales:

Les cellules gliales sont 10 fois plus nombreuses que les neurones. Ainsi, sont définis les astrocytes, les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les épendymocytes. Au-delà de leur rôle de soutien, les cellules gliales participent au maintien de l'intégrité du SNC; leur rôle est d'assurer le fonctionnement neuronal, que ce soit dans des situations physiologiques ou lors d'agressions du SNC (infection virale par exemple).

II.2.1.2.1. Les Astrocytes:

Ils représentent environ 50 % du nombre total des cellules du SNC. Ils sont à la fois présents dans la substance grise et la substance blanche (**Eng and Shiurba., 1988**). Le rôle essentiel des astrocytes est la régulation de la composition du milieu extracellulaire par capture des neurotransmetteurs et du glucose. Par ailleurs, leur capacité à métaboliser ces composés, les rend également des fournisseurs d'énergie pour les neurones. Les astrocytes participent à la dégradation et l'élimination de β -amyloïde et forment une barrière protectrice entre les dépôts et les neurones (**Wyss-Coray et al., 2003 ; Koistinaho et al., 2004**). La présence d'un nombre élevé d'astrocytes autour des plaques amyloïdes, suggère l'implication des chimiokines dans le recrutement des astrocytes. (**Nagele et al., 2003**). Le rôle des astrocytes dans le processus inflammation a été démontré par plusieurs chercheurs. En effet, ils expriment l'iNOS et l'arginosuccinate synthetase qui contribuent dans la production du NO. (**Heneka et al., 2001 ; Heneka et Feinstein., 2001**). L'activation des astrocytes est observée dans le stade précoce de la maladie d'Alzheimer. (**Heneka et O'banion., 2006**)

II.2.1.2.2. Les cellules microgliales:

Ce sont des cellules de petite taille avec de nombreux prolongements fortement ramifiés. Elles sont localisées en abondance dans la substance grise. Les cellules microgliales, de même que les astrocytes, participent aux processus immuno-inflammatoires dans le SNC : elles prolifèrent en cas de lésions, sont capables de phagocytose et sont présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T du système immunitaire. C'est pourquoi, elles sont encore appelées les "macrophages" du SNC.

Dans les conditions pathologiques, ces cellules activées, migrent et entourent les cellules endommagées ou mortes, pour éliminer les débris cellulaires. (Fetler et Amigorena., 2005). La microglie activée exprime une variété de récepteurs, principalement le complexe d'histocompatibilité et le récepteur du complément (Liu et Hong., 2003). Les cellules microgliales libèrent une variété de médiateurs proinflammatoires comprenant; les cytokines, les espèces réactives d'oxygène, les facteurs de complément, les espèces de radical libre et le monoxyde d'azote. Ce qui peut contribuer au dysfonctionnement et la mort des cellules neuronales, créant ainsi un cercle vicieux (Griffin et al., 1998).

II.2.2. Les interactions entre le SNC et système immunitaire:

De par la présence de la barrière hématoencéphalique, le SNC a été pendant longtemps considéré comme un organe isolé du reste de l'organisme. Par ailleurs, la faible expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II a conduit à le supposer immunologiquement privilégié. Ces concepts ont été abandonnés lorsqu'a été mise en évidence la présence de cellules immunes dans le LCR.

Parallèlement, le système immunitaire, qui n'affectait, ni n'était affecté par aucun autre système physiologique, était considéré comme un système autonome. Or, lors de l'infection d'un individu, celui-ci présente divers symptômes (fièvre, tremblements, anorexie, ...) mettant en jeu différents systèmes ou organes. Il apparaît donc que le système immunitaire est fortement lié à d'autres systèmes physiologiques comme les systèmes neuroendocriniens (Besedovsky et del Rey., 1992) ou digestifs (Uehara et al., 1992). Des interactions cellulaires entre le SNC et le système immunitaire ont été suggérées. En effet, au cours d'une inflammation du SNC, l'infiltration dans le parenchyme cérébral et le LCR de lymphocytes T, de lymphocytes B et de nombreux macrophages, est corrélée à la présence de cellules microgliales activées (Plata-Salaman, 1991 ; Engelhardt et al., 2001). Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence dans le SNC de cytokines, de chimiokines et de leurs récepteurs respectifs (Breder et al., 1988 ; Plata-Salaman et al., 1988).

III. Le Monoxyde d'Azote:

III.1. Introduction :

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz liposoluble capable de diffuser rapidement et librement à l'intérieur, comme à l'extérieur, des cellules. Le NO est un radical libre apparié particulièrement labile, dont la courte durée de vie (in vivo) de l'ordre de 6 à 10 secondes avant d'être transformé par l'oxygène et l'eau en nitrites et nitrates (Vergely et Rochette., 2002).

En effet, le NO joue un rôle essentiel dans la physiologie de nombreux systèmes : nerveux, cardiovasculaire, digestif, immunitaire (Crepel et Lemaire., 1995 ; Dugas et al., 1995). Ces actions pléiotropique fait de lui une cible pharmacologique pour le traitement d'une variété de désordres et de pathologies : Le choc septique (Fukoto et Chaudhui., 1995), l'Ischémie cérébrale (Crepel et Lemaire., 1995), les maladies neurodégénératrices et l'inflammation chronique.

III.2. Mécanisme Biosynthèse du NO :

Dans l'organisme, le NO est synthétisé à partir de l'arginine libre en deux étapes :

- 1) L'hydroxylation d'un des deux atomes d'azote terminaux du groupement guanidine de L-arginine entraînant la production d'un intermédiaire relativement stable la N- hydroxy-L-arginine (NOHA) (Alderton et al., 2001).
- 2) Le mécanisme d'oxydation de la NOHA catalysé par les NOS est mis en jeu, en effet, l'atome de fer hémunique est réduit par un électron provenant du NADPH avant de fixer une molécule d'oxygène. Le peroxyde de fer formé réagit avec la NOHA pour former un intermédiaire qui se décompose en NO, citrulline et atome de fer hémunique (Sennequier et Vadon-le Goff., 1998 ; Touil-Boukoffa et al., 1998 ; Alderton et al., 2001 ; Stuehr et al., 2004).

Le monoxyde d'azote est synthétisé par une famille d'enzymes appelées les NO synthases, différentes par leur localisation génomique et leur distribution cellulaire. Les NO synthases consomment du β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'oxygène moléculaire afin d'oxyder la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (Marletta, 1989 ; Moncada et al., 1989 ; Nathan et Hibbs., 1991 ; Nathan et Xie, 1994; Drapier et al., 1997 ; Touil-Boukoffa et al., 1998). (Figure 08)

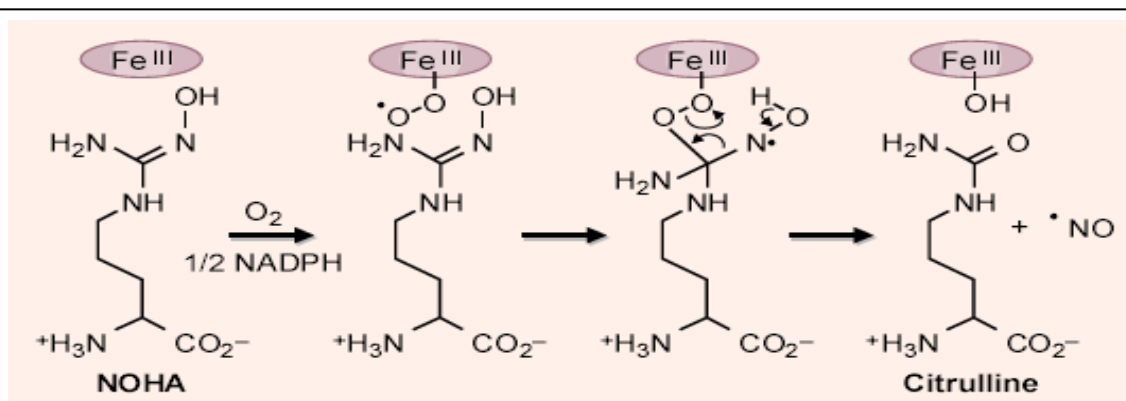


Figure 08: La réaction de synthèse du NO (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998).

III.3. Les NO synthases :

Chez les mammifères, le NO est essentiellement synthétisé par un groupe d'enzymes nommé NO Synthases (EC1.14.13.39). Ces dernières oxydent la L- Arginine en L- Citrulline avec formation de NO (Tuteja et al., 2004). Les NOS ont été classées en trois isoformes, qui sont les produits de trois gènes différents situés sur des chromosomes distincts ; il s'agit de : (Tableau 03)

- ❖ La NOS 1 (isoenzyme de type 1 ou NOS neuronale) constitutive.
- ❖ La NOS 2 (isoenzyme de type 2 ou iNOS) inducible.
- ❖ La NOS 3 (isoenzyme de type 3 ou NOS endothéliale) constitutive.

	NOS-1	NOS-2	NOS-3
Type	constitutive	inductible	constitutive
Localisation	cytosol	cytosol	cytosol, membranes, mitochondries
Modifications post-transcriptionnelles	phosphorylation par l'acide aminé 372	phosphorylation	myristoylation (G2) palmytoylation (C15 et C26) phosphorylation
Nombre d'acides aminés	1434	1 153	1 294
Masse moléculaire	160 kDa	130 kDa	133 kDa
Nombre de paires de bases du gène	> 15.10 ⁴	3,7.10 ⁴	2,1.10 ⁴
Localisation du gène humain	chromosome 12, région 12q24-qter	chromosome 17, région 17 cen-q11.2	chromosome 7 région 7q35-36
Nombre d'exons	29	26	26
Activation	Augmentation de la [Ca ²⁺] _i	Expression stimulée par cytokines et/ou endotoxines	Augmentation de la [Ca ²⁺] _i
Co-facteurs identifiés	NADPH, FAD, FMN, BH ₄ , hème		

Tableau 03: Caractéristiques des trois types de NO-synthase humaine. (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

Les différences majeures entre ces isoformes sont leur mode d'expression, (les NOS 1 et 3 sont constitutives (cNOS), la NOS2 est inductible) et la régulation des NOS 1 et 3, mais pas de la NOS 2, par la concentration en ions calcium. Ainsi, les cNOS produisent rapidement de faible quantité de NO en réponse à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (min) alors que l'iNOS produit 1000 fois la quantité de NO que celle produite par les cNOS après leur induction. L'activation des isoformes neuronales et endothéliales, se fait par la voie des inositols triphosphates (IP3), un dérivé du phosphatidylinositol. Son activation secondaire, déclenche une cascade d'événements, va permettre la libération du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique. La liaison du calcium à la calmoduline va entraîner un changement conformationnel déclenchant un flux d'électrons à partir du NADPH. La forme inductible (iNOS ou NOS de type II) est, quant à elle, principalement dépendante d'une régulation transcriptionnelle. La calmoduline étant liée constamment à cet isoforme, son activation ne nécessite pas d'augmentation du taux de calcium, mais a comme facteur limitant la présence de certain cofacteurs, comme le BH4. (Petros et al., 1994).

En revanche, les NOS possèdent la même structure générale. En effet, ces enzymes dimériques sont composées de 2 sous unités identiques de poids moléculaire compris entre 130 et 160 KDa. Elles possèdent 2 domaines catalytiques : un domaine N- terminal oxygénase et un domaine réductase C-terminal. Le domaine oxygénase contient les sites de liaison à la L- Arg, hème et BH4, alors que le domaine réductase possède les sites de liaisons aux FAD, FMN, et NADPH. Ces 2 sites catalytiques sont reliés par un site de liaison à la calmoduline. Les flavines médient le transfert des électrons à partir du NADPH au fer de l'Hème provoquant la production du NO via l'oxydation de la L-Arginine en L- Citrulline (Vergely et Rochette., 2002). (Figure 09)

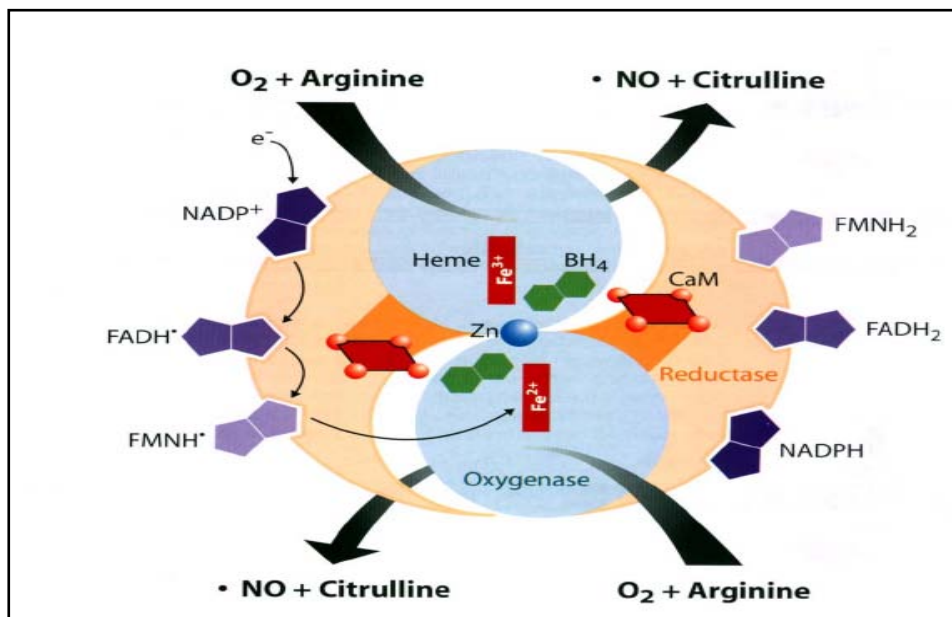


Figure 09 : Structure dimérique de la NOS et la voie de transfert des électrons. (Colasanti et al., 2000)

Les NOS sont des dioxygénases utilisant l'oxygène moléculaire et le β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) pour transformer la L- Arginine en L-Citrulline plus le NO. La BH4 est un cofacteur clé pour toutes les NOS (Stuher, 1997; Groves et Wang., 2000 ; Gorren et al., 2006 ; Amri et al., 2007) et en son absence, la NOS produit des superoxydes à la place du NO (Guzik et al., 2003).

III.4. Localisation des isoformes de NOS:

Les isoformes de la NOS sont exprimées dans de nombreux tissus. La NOS-2 en particulier a été exprimée par des types de cellules variés en réponse à des cytokines ou des endotoxines ; cette isoforme est également présente constitutivement dans certaines cellules : elle y serait donc constitutive. (Tableau 04) (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

Isoforme	Organe/tissu	Cellules
NOS-1	cerveau	neurones
	système nerveux périphérique	neurones
	rétine	cellules photoréceptrices
	muscle squelettique	
	poumon	cellules épithéliales
	pancréas	îlots de Langerhans
	rein	macula densa
	endomètre	épithélium colonnaire
	estomac antérieur	muqueuse gastrique
NOS-2 induite		macrophages
		lymphocytes, neutrophiles
	os	ostéoblastes
	foie	cellules de Kupffer, hépatocytes
	vaisseaux sanguins	cellules musculaires lisses
NOS-2 exprimée spontanément	cerveau	cellules macrogliales et microgliales
	sang	plaquettes
	poumon	cellules épithéliales
NOS-3	sang	plaquettes
	vaisseau sanguin cérébral au cours du développement du cerveau	
	vaisseau sanguin	endothélium
	cerveau	
	hippocampe, cervelet, bulbe olfactif	cellules pyramidales
	sang	plaquettes
	cœur	myocytes
	poumon (pendant 15 jours après la naissance)	cellules épithéliales alvéolaires
	rein	cellules épithéliales tubulaires

Tableau 04: Localisation des isoformes de NOS. (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

III.5. les dérivés du NO :

En fonction de sa forme réactive et de la NO synthase impliqué, le monoxyde d'azote agit, soit comme une molécule de signalisation régulant les fonctions d'enzyme intracellulaires, ou comme un médiateur affectant la fonction des cellules de son environnement et les fonctions immunes (Dugas et al., 1995 ; Belguendouz et al., 2008).

La production chronique du NO associée à une production d'anion superoxyde, conduit à une toxicité cellulaire associée à la formation du peroxynitrite (ONOO⁻). Ces processus seraient à l'origine de l'évolution d'un certain nombre de pathologies (**Sennequier et Vandon le Goff., 1998**). Le ONOO⁻ et son acide oxydent les résidus thiol en acide sulfonique, et peuvent nitrater les peptides et les protéines sur les résidus tyrosine et tryptophane. (**Drapier et al., 1997 ; Lamattina et al., 2003**).

III.6. Régulation des NOS :

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

1- Le couplage à la calmoduline (CaM): Les NOS-1 et 3 ne sont en effet actives qu'après couplage à la calmoduline, qui intervient comme un interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme (**Abu-Soud et al., 1994**). L'activité de ces deux isoformes est donc réglée par la concentration du milieu en ions calcium qui règle le couplage de la CaM (**Thiemermann, 1995**). L'activité de la NOS-2 est, en revanche, indépendante des ions calcium, car cette isoforme est fortement couplée à la calmoduline. De ce fait, la NOS2 produit de manière continue du NO. La non-régulation de la NOS2 par les ions calcium rend d'autant plus importante une expression adéquate de cette isoforme. La fixation de la calmoduline interviendrait aussi dans l'assemblage des monomères de la NOS3 (**Hellermann et Solomonson., 1997**).

2- La phosphorylation pourrait représenter un mécanisme de régulation supplémentaire pour l'ensemble des NOS, mais le rôle de cette modification post-transcriptionnelle n'est pas encore bien compris (**Michel et Feron., 1997**).

3- L-arginine lui-même joue un rôle dans la régulation de l'activité des NOS ; La saturation en L-arginine provoque une diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH d'un facteur 2 à 3 pour la NOS1, contre une augmentation d'un facteur 4 à 6 pour la NOS2. Pour la NOS1, cette diminution résulte probablement de la régulation par la concentration en calcium, ce qui suggère que, le substrat ne manquant pas dans des conditions normales de fonctionnement, le découplage se produit rarement. Pour la NOS2, la diminution de la consommation de NADPH lorsque le substrat vient à manquer pourrait être un mécanisme limitant la production d'espèces oxydantes si l'activité de cette isoforme devait être réglée par la concentration en L-arginine. En effet, l'apport en substrat pourrait régler l'activité des NOS. (**Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998**)

4- L'arginine disponible, et donc la production de NO, pourrait être modulée par l'arginase, enzyme qui transforme l'arginine en urée et ornithine, et est présente (entre autres) dans les cellules endothéliales et les macrophages. De plus, la NOHA s'est avérée récemment être l'un des meilleurs inhibiteurs d'arginase (**Boucher et al., 1994**). Il pourrait donc exister une régulation croisée des deux systèmes enzymatiques métabolisant l'arginine, NOS et arginase. (**Chang et al., 1998**) (**Figure 10**)

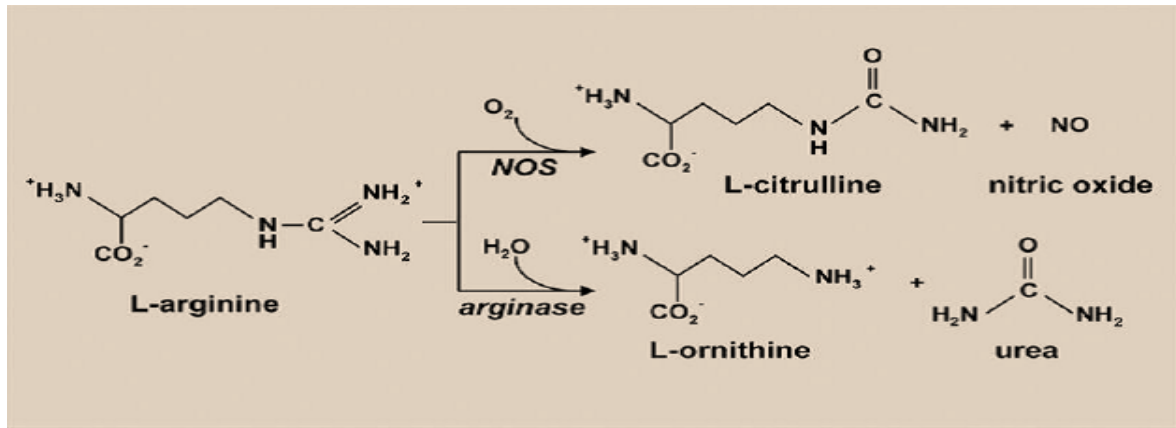


Figure 10: Métabolisme de la L-Arginine par la NO synthase et l'arginase.
(Durante *et al.*, 2007).

5- Le monoxyde d'azote lui-même inhibe les NOS : il peut en effet se fixer à l'atome de fer des NOS, avant même de quitter le site actif. Le complexe inactif résultant se forme transitoirement pendant la production de NO ; il représente 80 % de l'enzyme totale dans le cas de la NOS1. Il est instable en présence d' O_2 , dont la concentration module positivement l'activité de la NOS-1. (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

6- L'activation de CD23 (FcεRII) à la surface de monocytes/macrophages humains déclenchée par la liaison de certains anticorps monoclonaux spécifiques (ou d'IgE) stimule une nitric oxide synthase de type inducible, conduisant à la production de TNF- α qui agit alors comme facteur autocrine d'amplification. Cette voie exacerbée dans certaines maladies inflammatoires (Dugas *et al.*, 1995)

7- Cytokines régulateur positif: L'IFN- γ , et le TNF- α sont les plus importants inducteurs de la transcription de la NOS2. Ces deux cytokines agissent en général en synergie (Drapier *et al.*, 1988). Elles peuvent également être combinées aux LPS et à l'IL-1 pour un effet maximal (Nussler *et al.*, 1992). L'IL-4 peut avoir un effet inducteur indirect sur la production du NO par l'induction de l'expression du CD23 (Dugas *et al.*, 1998).

8- Cytokines régulateur négatif: TGF- β , l'IL-4 et l'IL-10 modulent directement la production du NO en inhibant l'expression de la NOS2 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Liew *et al.*, 1991 ; James, 1995).

III.7. Hypothèse du mécanisme de régulation de la production du NO par cNOS / iNOS:

Dans les conditions normales, la concentration du NO maintenue par les NO synthase constitutive (nNOS, eNOS) inhibe l'expression du gène iNOS par l'inactivation du facteur de transcription NF- κ B, ce qui limite la réponse immunitaire et inflammatoire (Figure 11a). L'activation de cNOS dépend de son état de (phosphorylation/déphosphorylation) sur les résidus tyrosine, ce qui maintient une concentration physiologique du NO.

Dans les conditions pathologiques (réponse immunitaire ou inflammatoire) et en présence des cytokines ou LPS (lipopolysaccharide), on observe un déséquilibre de phosphorylation de NO synthase constitutive. La cNOS inactive par phosphorylation va entraîner une diminution de la concentration du NO, ce qui va activer le NF- κ B par un mécanisme non défini via le levé de l'effet inhibiteur du NO suivie de l'induction de l'expression du gène de l'iNOS et par la production de taux élevés de NO (Figure 11b). (Colasanti *et al.*, 2000)

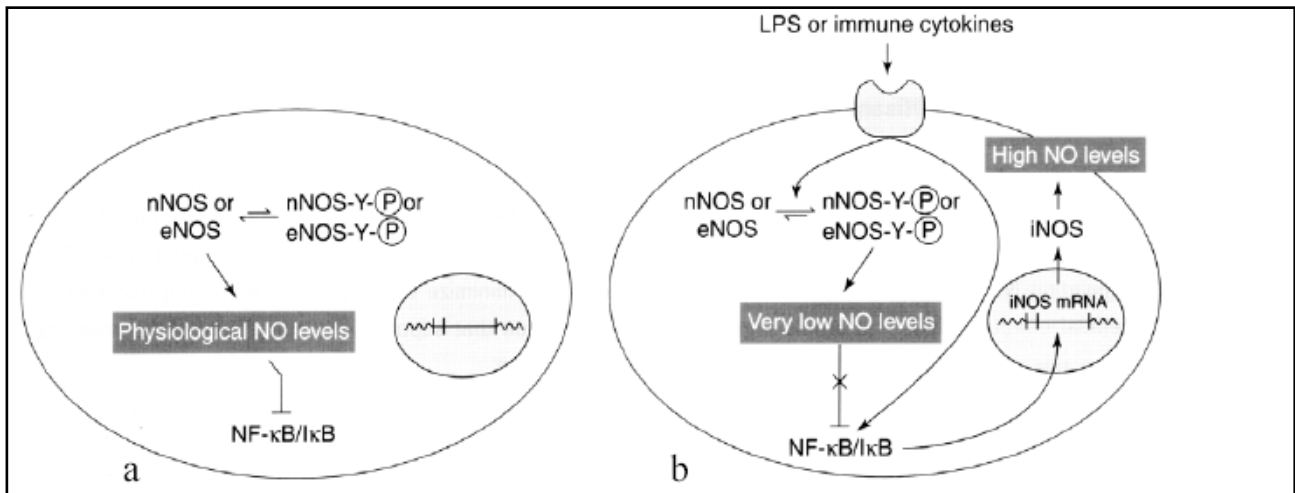


Figure 11: Le contrôle de la concentration de NO par les NO Synthase. (Colasanti, 2000)

III.8. Rôle physiologique du NO :

Le NO est reconnu aujourd'hui comme un messager cellulaire exerçant une multitude de rôles physiologiques à travers tout l'organisme. Du fait de sa réactivité et de sa faible taille, le NO atteint potentiellement toutes les cibles. L'impact de la biosynthèse de NO dépend d'une part, de la quantité produite et d'autre part, des cibles situées à proximité du lieu de synthèse. (Moncada *et al.*, 1991 ; Schmidt et Walter., 1994)

III.8.1. Rôle du NO dans le système nerveux central:

Dans le système nerveux central, le NO a été identifié pour la première fois comme un second messager en 1988, grâce aux travaux de Garthwaite et coll. (Garthwaite et Boulton., 1988). Ces auteurs ont en effet montré que le facteur libéré en réponse au glutamate et capable de stimuler la synthèse de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) dans les neurones de cervelet présentait toutes les caractéristiques biologiques du NO. Il est maintenant bien démontré que c'est en agissant sur le récepteur NMDA et en augmentant les concentrations intracellulaires de Ca²⁺, que le glutamate peut activer la NOS1 et induire la production du NO. (Figure 12)

Le glutamate libéré par les terminaisons nerveuses présynaptiques agit, entre autres, sur des récepteurs de type NMDA. Cet effet entraîne une entrée massive de Ca²⁺ dans le neurone postsynaptique, d'où une activation de la NOS via le complexe Ca²⁺/calmoduline et augmentation de la formation et de la libération de NO. Le NO produit diffuse jusqu'au neurone présynaptique, où il augmente l'activité de la guanylate cyclase et de la GMPc, ainsi que celle de l'ADP-RT, et par voie de conséquence, synthèse et la libération de glutamate (Uzabay et Oglesby., 2001). Ces effets pourraient être responsables des modifications de l'efficacité synaptique et serait impliqués dans les processus de "long term potentiation" (au niveau de l'hippocampe) et de "long term depression" (au niveau cervelet). (Piro, 2001)

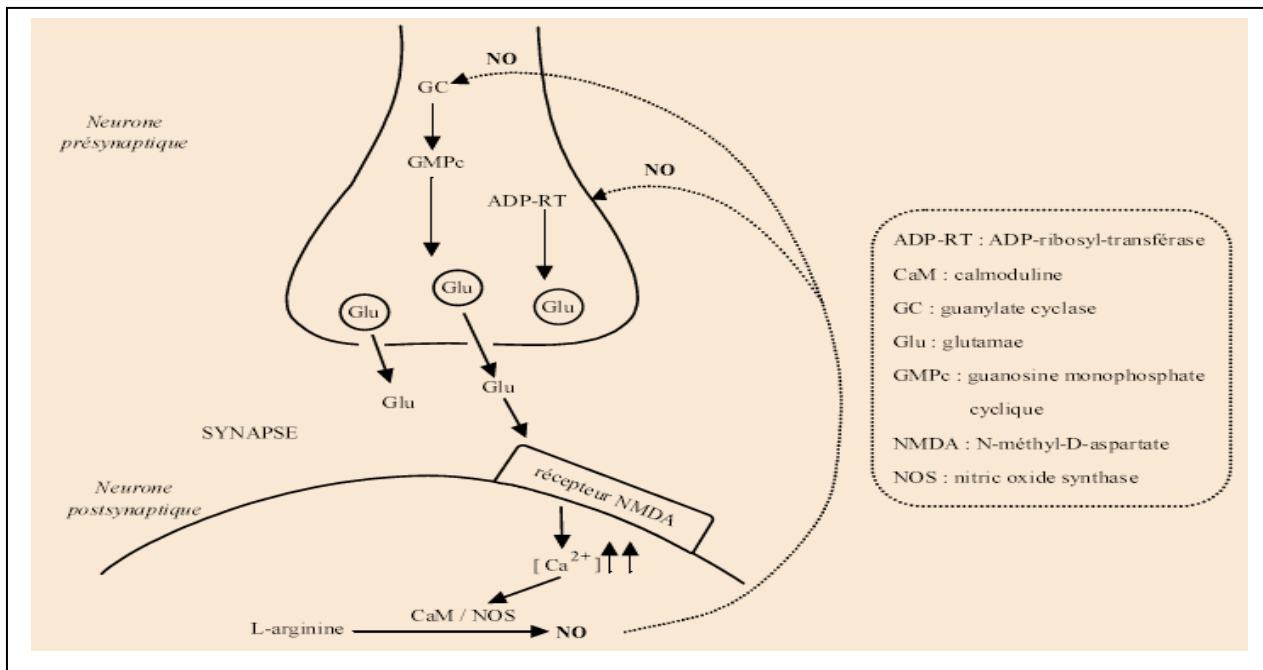


Figure 12: Action du NO sur le récepteur NMDA. (Pirot, 2001)

Depuis, de très nombreuses études ont démontré que le NO peut jouer un rôle de premier plan dans des fonctions aussi diverses que la synaptogénèse, la plasticité synaptique, la régulation du débit sanguin cérébral, ou la sécrétion neuroendocrine (Dawson et Snyder., 1994 ; Garthwaite et Boulton., 1995). Le NO semble également être impliqué dans la nociception, l'apprentissage et la mémoire, le comportement alimentaire et dyspique, ainsi que dans la régulation de la recapture et de la libération de nombreux neurotransmetteurs. (Pirot, 2001)

III.8.1.1. NO et plasticité synaptique:

Le NO joue un rôle dans la plasticité neuronale au niveau des neurones glutamatergiques qui sont eux même responsables de la potentialisation à long terme (PLT). La PLT joue un rôle primordial dans les mécanismes de mémorisation : elle permet à la suite des mécanismes moléculaires, de renforcer l'activité électrique d'un neurone et donc d'augmenter la capacité de ce dernier à stocker une information. (Pirot, 2001)

III.8.1.2. NO et neurotransmission synaptique:

NO en tant que neurotransmetteur, diffuse dans une microrégion pendant quelques secondes à travers la membrane postsynaptique et active la guanylate cyclase des cellules environnantes. La concentration du GMPc va augmenter dans le milieu cytosolique de ces neurones ce qui va activer les protéines contractiles du cytosquelette (via les protéines kinases) et par conséquent provoquer la libération, dans la fente synaptique, de vésicules contenant un neuromédiateur ou une neurohormone selon la nature et la localisation du neurone activé : ces événements favorisent la sécrétion de la dopamine du striatum, de l'aspartate du cervelet, de l'acétylcholine du cerveau antérieur. De même, au niveau de l'hypothalamus le NO stimule la sécrétion de la GH (Growth Hormon), la somatostatine, la LH (Luteinizing Hormon) et le GnRH (Gonadotropine Releasing Hormon). Ces mécanismes ont été constatés dans la thyroïde et la glande surrénale pour la sécrétion de la noradrénaline. (Pirot, 2001)

III.8.2. Rôle du NO dans le système immunitaire:

L'expression de la NOS inductible est généralement le résultat de réponses immuno-inflammatoires localisées ou diffuses, suite à une infection ou à d'autres stimuli. Le NO produit par les NOS2, joue par conséquent un rôle important dans la régulation, l'initiation et le développement des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte (Dugas et al., 1995 ; Moncada et al., 1995). L'activation des macrophages par des cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS2 (Lowenstein et Padalko., 2004). Le NO produit peut alors agir sur des cellules tumorales, des bactéries ou des parasites intracellulaires ou extracellulaires par son action cytotatique et cytotoxique (Nathan et Hibbs., 1991 ; Moncada, 1992 ; Amri et al., 2007).

Le NO est doué d'importantes propriétés immunorégulatrices, il agit directement comme une molécule immunorégulatrice autocrine ou paracrine régulant notamment la balance Th1/Th2. (Lowenstein et Padalko., 2004). Le NO joue un rôle soit pro-apoptotique, soit anti-apoptotique dans de nombreux types cellulaires. A faible concentrations, le NO protège les cellules de l'apoptose en activant la protéase CPP32 like, en augmentant l'expression de la protéine Bcl2. Les effets pro-apoptotiques de NO font intervenir sa possibilité de réagir avec l'anion superoxyde (O₂⁻) pour générer du peroxyde d'azote (ONOO⁻) (Kolb, 2001 ; Lowenstein et Padalko., 2004). Le NO est impliqué dans d'autres fonctions du système immunitaire tel que : le chimiotactisme, l'agrégation et l'apoptose des polynucléaires neutrophiles, elles mêmes productrices de NO (Saini et al., 2006).

III.9. NO et physiopathologies:

Le NO est impliqué dans diverses maladies par diminution ou excès de sa libération. Une faible concentration de NO par exemple engendre un dysfonctionnement endothéliale qui induit une diminution de la vasodilatation d'où une hypertension artérielle et un risque d'athérosclérose. Une forte quantité de NO, en revanche, entraîne l'inhibition d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire, comme la ribonucléotide réductase et certaines enzymes du transport électronique mitochondrial (via la destruction des clusters Fe-S des mitochondries), éventuellement après réaction de NO avec l'ion superoxyde pour former l'ion peroxyde d'azote. D'où l'implication de NO, après sa synthèse par des macrophages activés, dans la défense immunitaire comme instrument de destruction de cellules bactériennes et tumorales. Enfin, lorsque le NO est synthétisé en trop forte quantité ou dans un endroit inapproprié, diverses maladies peuvent survenir (Tableau 05). (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

Isoforme probablement impliquée	Production de NO	Maladies liées à NO
NOS-1	+ -	ischémie cérébrale impuissance sexuelle masculine
NOS-1 ou/et NOS-2	+	maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington, sclérose latérale amyotrophique...)
NOS-2	+ + + +	choc septique arthrite rhumatoïdale diabète certains cancers
NOS-3	- - - +	hypertension athérosclérose angine de poitrine migraines

Tableau 05: Quelques exemples de maladies dans lesquelles un dérèglement de la production de NO est vraisemblablement impliqué. (Sennequier et Vadon-Le Goff., 1998)

*Chapitre II : MATÉRIEL ET
MÉTHODES*

I. Matériels biologiques utilisés:

I.1. La sélection des patients:

La sélection et la classification des patients qui ont fait l'objet de cette étude est réalisé conjointement avec les neurologues de l'hôpital (Bab El Oued, HCA). Tous les patients ont subi une batterie de tests neurologiques pour évaluer le déclin cognitif puis classés en trois phases selon la sévérité de la pathologie (initiale, intermédiaire, avancée). (Tableau 06)

	Catégorie des sujets			
	Groupe des patients			Sujets sains
Phase de la maladie	Phase initiale	Phase intermédiaire	Phase avancée	—
Nombre de patients	n=13	n=11	n=11	n=9
Moyenne d'âge	[50-83] 74,27 ± 4.86	[68-81] 74.42 ± 4.85	[66-80] 73.8 ± 5.3	[53-78] 68.2 ± 6.7
Sexe	9F/4H	8F/3H	7F/4H	4F/5H

Tableau 06 : Classification des patients selon la phase évolutive.

I.2. la classification des malades en groupes:

Nous avons procédé à la classification des malades en sous groupe.

* Le groupe utilisant la thérapie à la vitamine E, un puissant scavenger lipophile de radicaux libres, pouvant éventuellement avoir une influence sur la production des nitrites totaux dans les différentes phases de la pathologie. (Tableau 07)

	Sous groupe de patient traité avec la vitamine E			Sujets sains
	Phase initiale	Phase intermédiaire	Phase avancée	—
Phase de la maladie	Phase initiale	Phase intermédiaire	Phase avancée	—
Nombre de patients	n =8	n =7	n=8	n=9
Moyenne d'âge	[53-73] 68,27 ± 4.36	[68-81] 73.42 ± 7.25	[66-83] 74.8 ± 6.32	[53-78] 68.2 ± 6.7
Sexe	3F/5H	4F/3H	3F/5H	4F/5H

Tableau 07: Classification des patients selon la thérapie administrée (Vitamine E).

* Le groupe qui présente en plus de la maladie d'Alzheimer, une hypertension artérielle.
(Tableau 08)

	Sous groupe de patient avec une hypertension artérielle			Sujets sains
Phase de la maladie	Phase initiale	Phase intermédiaire	Phase avancée	–
Nombre de patients	n=8	n=7	n=8	n=9
Moyenne d'âge	[53-73] 68,27 ± 4.36	[68-81] 73.42 ± 7.25	[66-83] 74.8 ± 6.32	[53-78] 68.2 ± 6.7
Sexe	3F/5H	4F/3H	3F/5H	4F/5H

Tableau 08: Classification des patients selon l'association à l'hypertension artérielle.

Ethique: Les familles des patients qui ont fait l'objet de cette étude, ont signé une lettre de consentement après entrevue avec le médecin traitant. (Annexe 01)

I.3. Les prélèvements sanguins:

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur des tubes héparinés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer suivis au niveau du service de neurologie de l'hôpital de Bab El Oued et de l'hôpital central de l'armée. D'autres prélèvements ont été réalisés chez des donneurs sains. Les plasma sont recueillis après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 mn puis aliquotés et conservés à (-45°C).

I.4. Les prélèvements du liquide-céphalo-rachidien:

Le liquide céphalorachidien (ou LCR) est le liquide dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière. Sa production est sous la dépendance de ses échanges avec le système nerveux et le sang, qui dépendent de trois barrières : hémato-encéphalique (**sang-système nerveux**), encéphalo-méningée (**système nerveux-LCR**) et hémato-méningée (**sang-LCR**).

Le LCR est prélevé par ponction lombaire au niveau de l'espace sous-arachnoïdien, un volume de 10 à 15 ml de LCR. Il est nécessaire d'écartier une contre-indication absolue, l'hypertension intracrânienne, suspectée devant des signes cliniques évocateurs (céphalées, nausées, vomissement, raideur de la nuque) et confirmée par le fond d'œil (œdème papillaire) et/ou l'imagerie cérébrale.

Le LCR a été prélevé sur des tubes secs chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer au niveau des services de neurologie de CHU Bab El Oued et l'hôpital central de l'armée. Le LCR collecté est fractionné dans trois tubes (un tube conservé dans le laboratoire central de l'hôpital à (-76°C) et un tube conservé à (-45°C) dans le laboratoire (LBCM) jusqu'au jour de l'utilisation. Le tube restant est conservé pour les études ultérieures. (Tableau 09)

Phase de la maladie	Catégorie des sujets					
	Phase initiale		Phase intermédiaire		Phase avancée	
Nombre de patients	n=2		n=2		n=2	
Moyenne d'âge	73	84	72	83	76	81
Sexe	2H		2H		2H	

Tableau 09: Répartition du LCR selon les phases de la maladie.

I.5. Les cellules:

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été préparées à partir du sang humain prélevé chez des donneurs sains et malades atteints de la maladie d'Alzheimer.

I.6. Le milieu de culture:

Le milieu utilisé est le RPMI 1640 enrichi par l'addition de 5% de Sérum de Veau Foetal préalablement décomplémenté à (+56°C) pendant 30mn et complété de 1mg/ml de L-Glutamine. Un ensemble d'antibiotiques est également ajouté à mesure de 1000UI/ml de Pénicilline et 10mg/ml de Streptomycine. Il est destiné à la culture des PBMC.

I.7. La souche *Pseudomonas oleovorans* ATCC 8062:

Elle est caractérisée par la propriété biochimique : nitrate réductase (+). Elle est utilisée afin de réduire les nitrates en nitrites lors de dosage du NO dans les échantillons. Elle nous a été aimablement fournie par le Dr Drapier, J.C Directeur de l'unité de recherche biosynthèse du NO et signalisation au CNRS, Gif-sur-Yvette, Paris, France.

I.8. Les effecteurs inducteurs et immunomodulateurs:

Les cytokines recombinantes (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL6, IL17) et les anti-cytokines (anti-IFN- γ , anti- TNF- α , anti-IL-13) nous ont été aimablement offert par le Dr Wietzerbin, J. Directeur de recherche à l'institut Curie de Paris et Pr Paula Pitha-Rowe (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA and the Sidney Kimmel Cancer Center, USA).

II. Méthodes:

II.1. Les Méthodes utilisées in vivo:

II.1.1. Dosage de l'albumine dans le plasma et le liquide céphalorachidien:

L'étude du rapport albumine du LCR/albumine du sérum (ratio albumine) permet d'évaluer l'état de la barrière hématoencéphalique selon le stade évolutif de la pathologie.

Le dosage de l'albumine est réalisé par la méthode colorimétrique en utilisant le vert de bromocresol. Le kit de dosage (spinreact) nous a été aimablement offert par le directeur de la boîte SPECTROL.

II.1.2. Dosage des nitrites totaux dans le plasma, les surnageants de culture de PBMC dans les différentes phases de la pathologie :

Le dosage de la production de NO est réalisé par la quantification de deux métabolites physiologiquement stables du NO, les nitrites et les nitrates. Après réduction des nitrates en nitrites par une souche de *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062) nitrate réductase (+), les nitrites totaux sont quantifiés par un dosage colorimétrique à 543 nm par l'addition du réactif de Griess modifié (Naphtyl-éthylène diamine dichloride à 0.5% dans du HCl à 20% + sulfanilamide à 5% dans du HCl à 20%). La concentration en nitrites totaux des échantillons est déterminée par extrapolation de la valeur des DO sur la courbe étalon $DO = f [NaNO_2]$ établie préalablement à partir d'une gamme étalon de $NaNO_2$ allant de 0 à 200 μM (Touilboukoffa *et al.*, 1998).

II.1.3. Dosage de $TNF\alpha$ et $TGF\beta$ dans le plasma et le liquide céphalorachidien des patients:

La quantification des cytokines dans le plasma et le liquide céphalorachidien de patients à différentes phases a été réalisée par un dosage immunoenzymatique selon les techniques préconisées par immunotech. Il s'agit d'un dosage de type sandwich. Dans les puits d'une plaque de microtitration recouverts d'un premier anticorps monoclonal anti-cytokine biotinylé, sont distribués les échantillons (plasma et LCR) à doser et le standard. Après incubation à température ambiante et lavage, un deuxième anticorps couplé à la peroxydase est distribués dans les puits. Après incubation, l'activité enzymatique est révélée par le substrat chromogène. La réaction se développe à l'obscurité et elle est arrêtée après ajout d'une solution d'acide sulfurique 2N. L'absorbance est lue par le lecteur de plaque. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en cytokines présentes dans l'échantillon.

II.1.4. Dosage de l'activité Butyrylcholinestérase dans le plasma des patients:

La cholinestérase est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique. En physiologie, cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation.

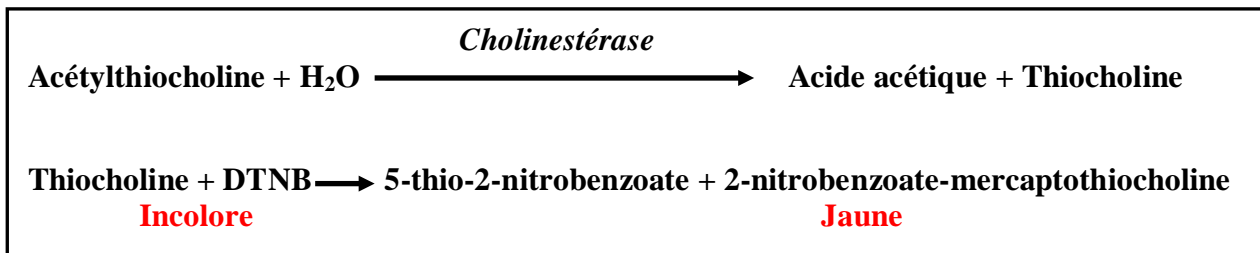
Il existe deux types de cholinestérases, distinguées par leur affinité pour l'acétylcholine et la butyrylcholine mais qui possède le même rôle:

1- L'Acétylcholinestérase (AChE).

2- La Butyrylcholinestérase ou pseusocholinestérase (BChE). (Cholinestérase plasmatique)

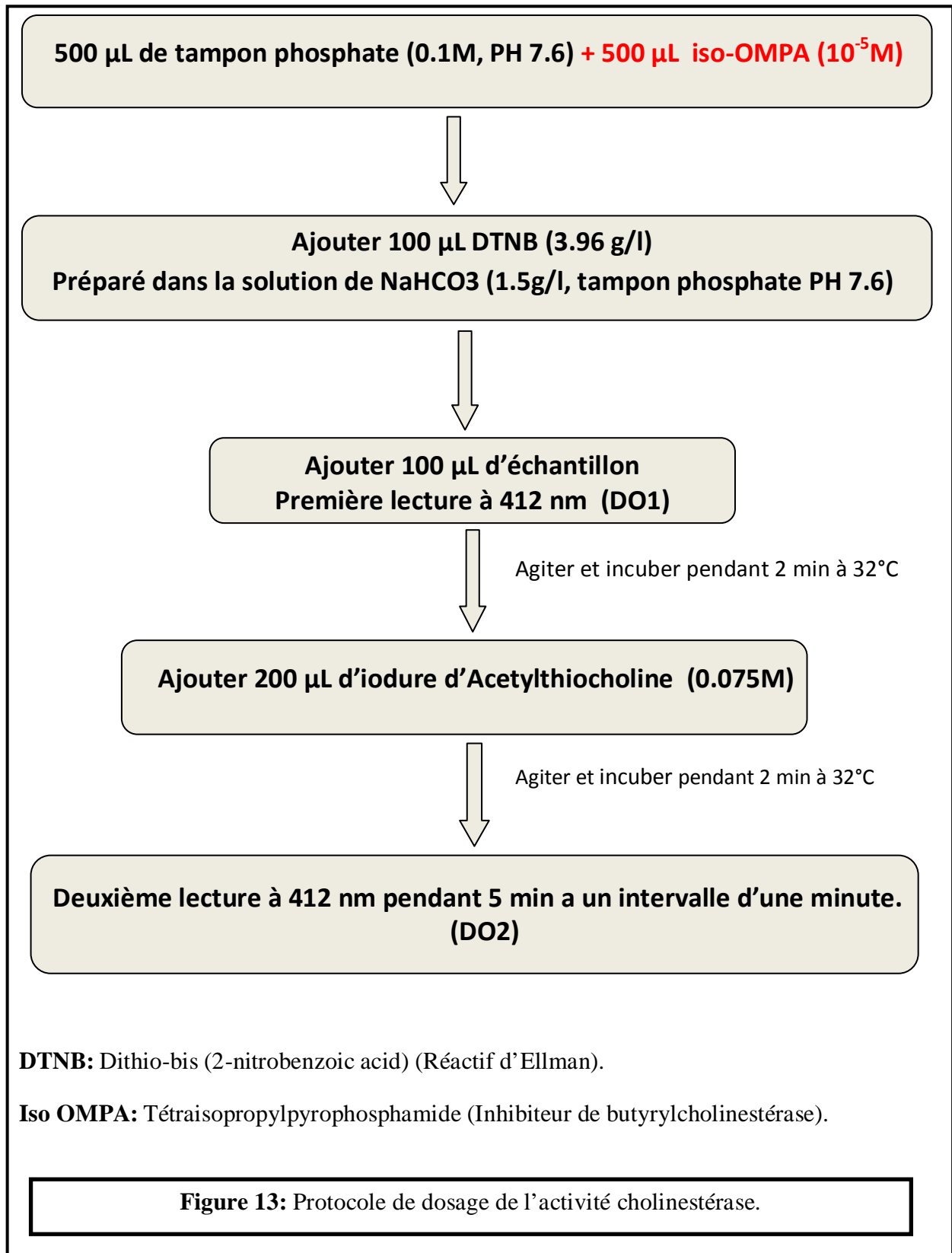
La Butyrylcholinestérase est une enzyme présente en concentrations élevées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'augmentation de l'expression est en étroite relation avec l'augmentation des plaques amyloïdes ainsi que la dégénérescence neurofibrillaire. Elle entraîne une diminution progressive de l'acétylcholine ce qui provoque en partie la perte de la mémoire. (Holmes et al., 2005)

La révélation de l'activité enzymatique est réalisée avec la méthode d'Ellman qui utilise un substrat artificiel, l'Acétylthiocholine, dont l'hydrolyse conduit à la formation de thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNB (5-5'-dithiobis-[2 nitrobenzoate]) selon la réaction suivante :



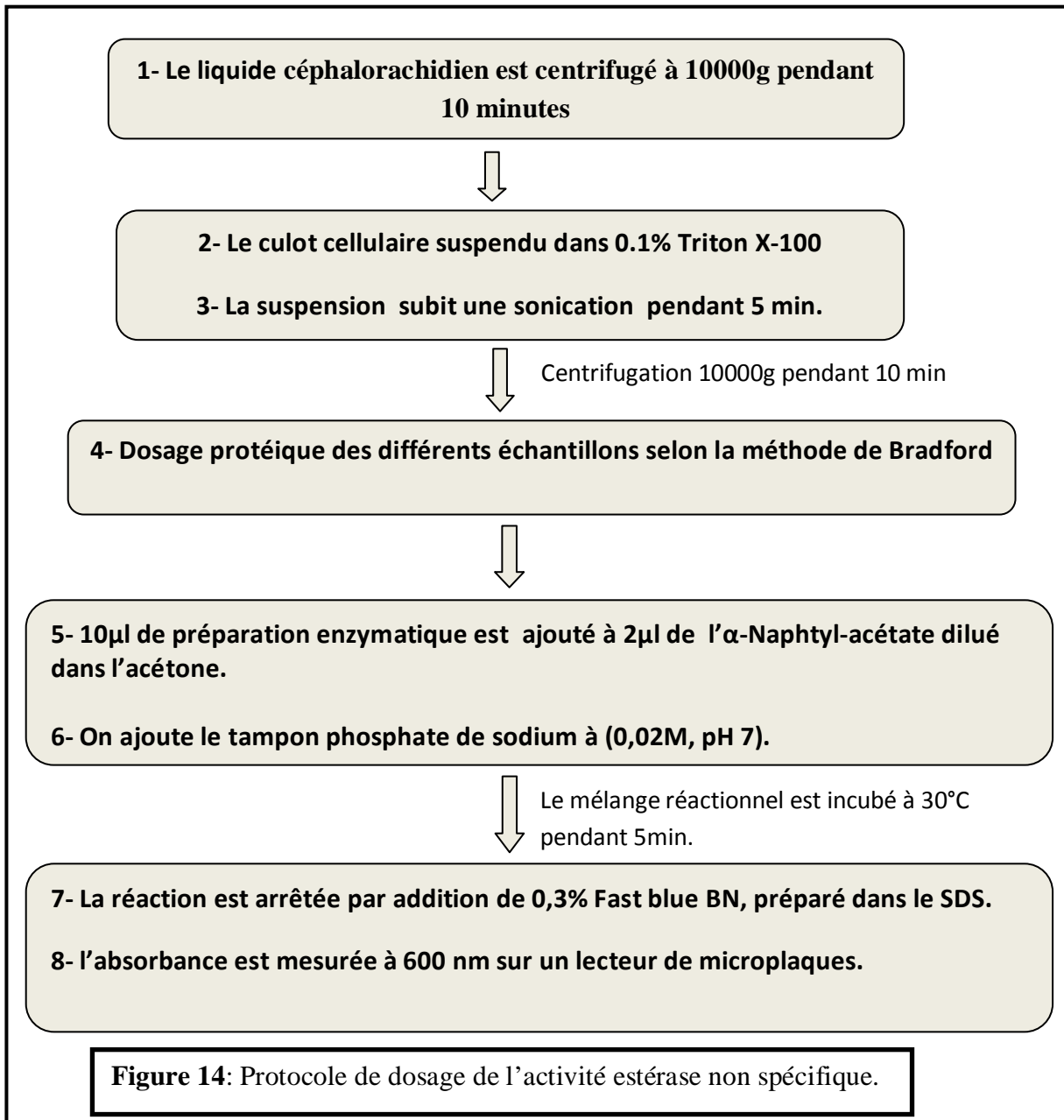
Nous avons modifié et adapté la méthode d'Ellman selon notre échantillonnage physiologique (liquide céphalorachidien et le plasma) pour le dosage de l'activité Butyrylcholinestérase (Ellman et al., 1961). (Figure 13)

La méthode de calcul de l'activité butyrylcholinestérase est détaillée dans la partie annexe. (Annexe 02)



II.1.5. Dosage de l'activité estérase non spécifique dans le LCR:

Des études antérieures ont établi l'intérêt de la détermination de l' α -Naphthyl acétate estérase (ANAE) pour définir les sous populations des lymphocytes et des monocytes du sang humain périphérique (Horwitz *et al.*, 1977). Le dosage de l'activité estérase non spécifique (alpha naphthyl acétate estérase) est réalisé dans le liquide céphalorachidien selon la méthode de (Gomori, 1955) et (Zhou *et al.*, 2003), modifié par notre équipe. (Figure14)



La courbe étalon est réalisé en utilisant α -naphthol comme étalon [0 -10 μ M].

Une étude cytologique est réalisée en parallèle afin de déterminé les différentes types cellulaires par coloration May Granwald Giemsa.

II.2. Les Méthodes utilisées in vitro:

II.2.1. Mise en culture des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et inductions:

II.2.1.1. Préparation des PBMC:

C'est une séparation sur gradient de densité utilisant le Ficoll hypaque d'une densité égale à 1.077. Après une centrifugation, les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles passent à travers le Ficoll et forment un agrégat au fond du tube, tandis que les PBMC restent à l'interface du milieu Ficoll. Les cellules mononuclées sont récupérées par aspiration de l'interface puis lavées 2 fois aux PBS 0.1M pH 7.2 stérile. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans un volume minimum de RPMI 1640 à 10% de SVF.

Un test de viabilité et une numération cellulaire sont réalisés systématiquement sur lame de Malassez avec du bleu de Trypan à 0.2%. La densité cellulaire est alors ajustée par dilution à 10^6 cellule/ml, concentration pour laquelle nous obtenons une induction optimale des cytokines et du monoxyde d'azote (Touil-boukoffa et al., 1998).

II.2.1.2. Etude de l'effet de différents effecteurs (TNF- α /anti TNF- α , IFN- γ /anti IFN- γ , IL13/anti IL13, IL6, IL17) sur la production du monoxyde d'azote dans les surnageants de culture de PBMC :

Les PBMC des sujets sains et des malades atteints de la maladie d'Alzheimer aux différents stades cliniques sont mise en culture dans du RPMI 1640 à 5% de SVF dans des microplaques de 96 puits à fond rond. En prenant soin de laisser un témoin (sans effecteur) pour chaque échantillon, les cellules sont stimulées avec les différents effecteurs (TNF- α /anti TNF- α , IFN- γ /anti IFN- γ , IL-13/anti IL-13, IL6, IL17). Elles sont alors incubées 48h sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂ à 37°C. Après centrifugation à 1200 rpm pendant 2 minutes, les surnageants récupérés sont conservés à (-45°C) en vue des dosages ultérieurs du monoxyde d'azote.

Une observation de l'état des cellules avant et après stimulation est réalisée au microscope inversé.

*Chapitre III : RESULTATS ET
DISCUSSION*

III. Résultats et discussions:

III.1. Intégrité fonctionnelle de la barrière hémato encéphalique (BHE):

L'étude du rapport albumine du LCR/albumine du sérum (ratio albumine) permet d'évaluer l'état de la barrière hémato-méningée selon le stade évolutif de la pathologie. Il est normalement inférieur à 6×10^{-3} chez l'adulte jeune et à 8×10^{-3} chez la personne âgée. (Meucci, 1993).

L'étude du ratio Albumine a permis de révéler une augmentation proportionnelle aux phases évolutives de la pathologie. En effet, dans la phase initiale le ratio albumine est de (0.12 ± 0.05) alors qu'il est supérieur dans la deuxième phase (0.182 ± 0.07) et la troisième phase (0.184 ± 0.09) (Figure 15). On note que le ratio Albumine est presque similaire entre les deux dernières phases.

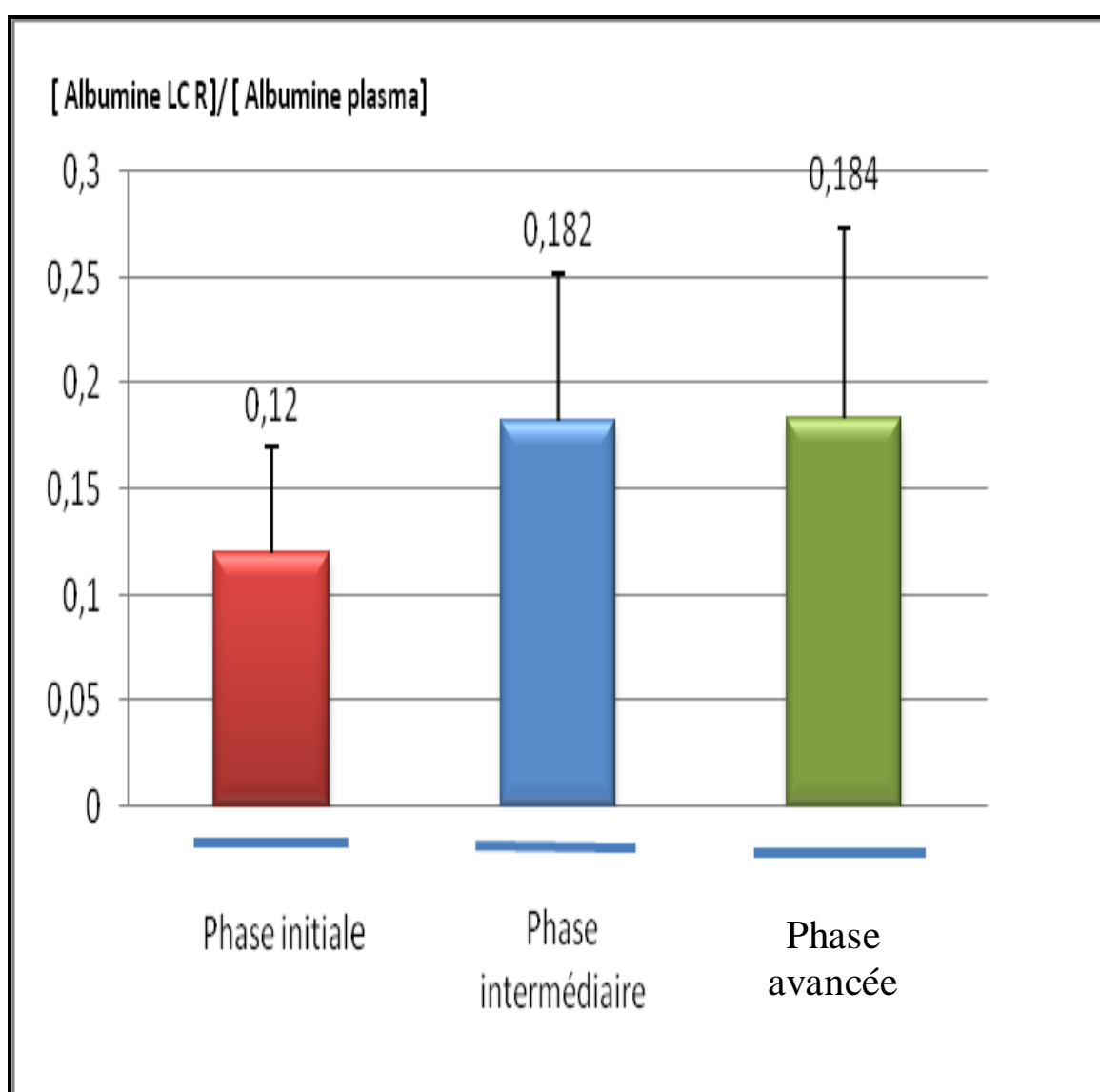


Figure 15 : Le ratio Albumine dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.

III.2. Dosage *in vivo* du monoxyde d'azote dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer:

Nous avons initié l'étude de la production de NO *in vivo* (plasma) et *in vitro* (les surnageants) en vue de situer son rôle dans les mécanismes physiopathologiques au cours des différentes phases évolutives de la pathologie.

III.2.1. Concentration plasmatique du NO dans les différentes phases:

L'étude de la production du NO *in vivo* chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer a permis de révéler une augmentation de taux chez les deux catégories de patients, comparés à ceux des sujets sains. Nos résultats ont montré que la production *in vivo* de NO est plus importante chez les patients se trouvant en phase initiale ($74 \pm 6 \mu\text{M}$) et phase avancée ($76 \pm 4 \mu\text{M}$). Les patients de la deuxième phase montrent des taux plus faibles ($56 \pm 6 \mu\text{M}$). (Figure 16)

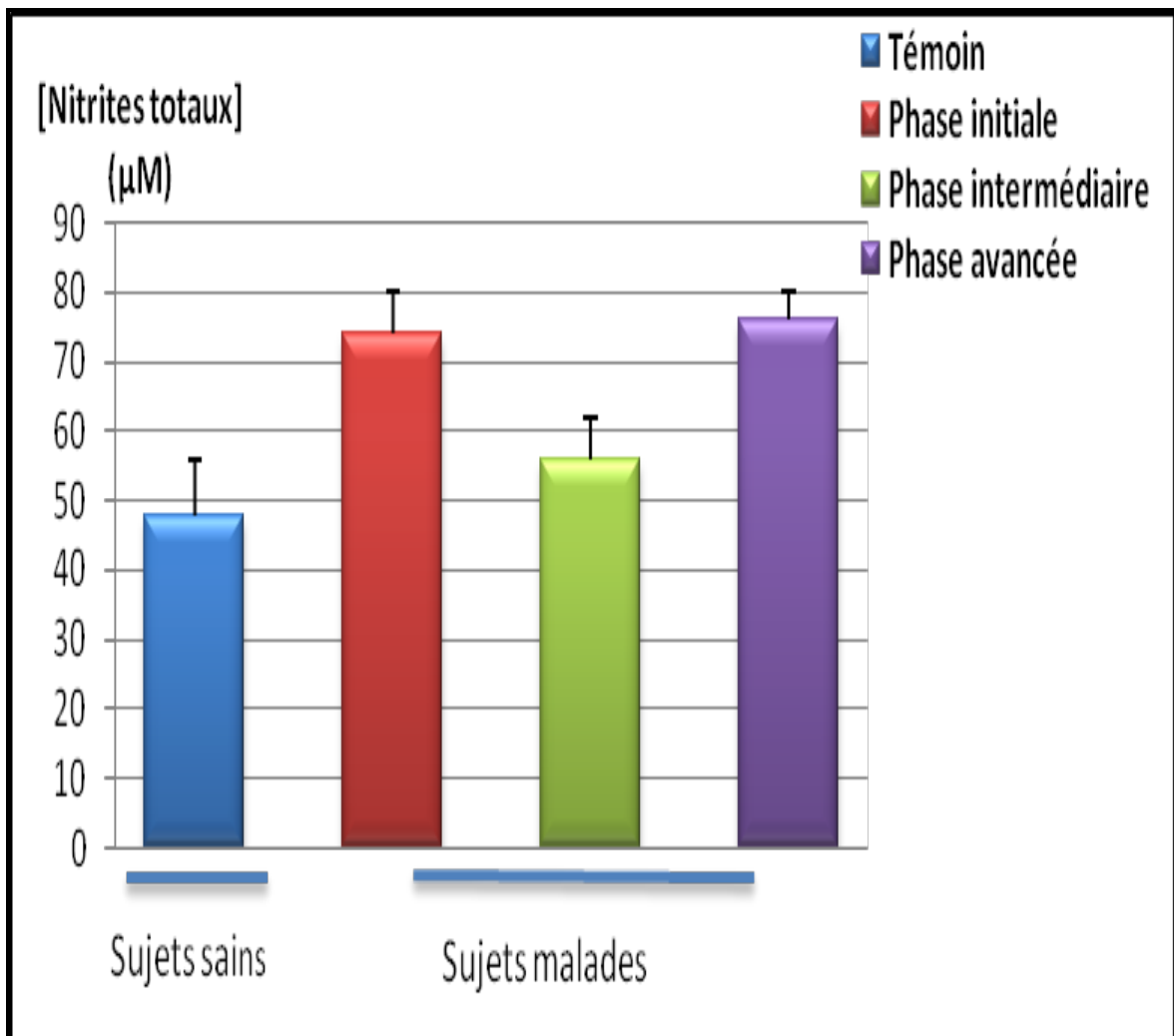


Figure 16: Concentration plasmatique du NO dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.

III.2.2. Concentration plasmatique du NO chez les patients utilisant la thérapie à la vitamine E dans les différentes phases de la pathologie:

Nous avons observé avec intérêt une diminution significative de la production du NO chez les patients se limitant en phase initiale de la pathologie ($51 \pm 6 \mu\text{M}$). (Figure 03)

La diminution de la concentration du NO est importante si elle est comparée avec celle obtenue précédemment dans la première phase (sans vitamine). (Figure 17)

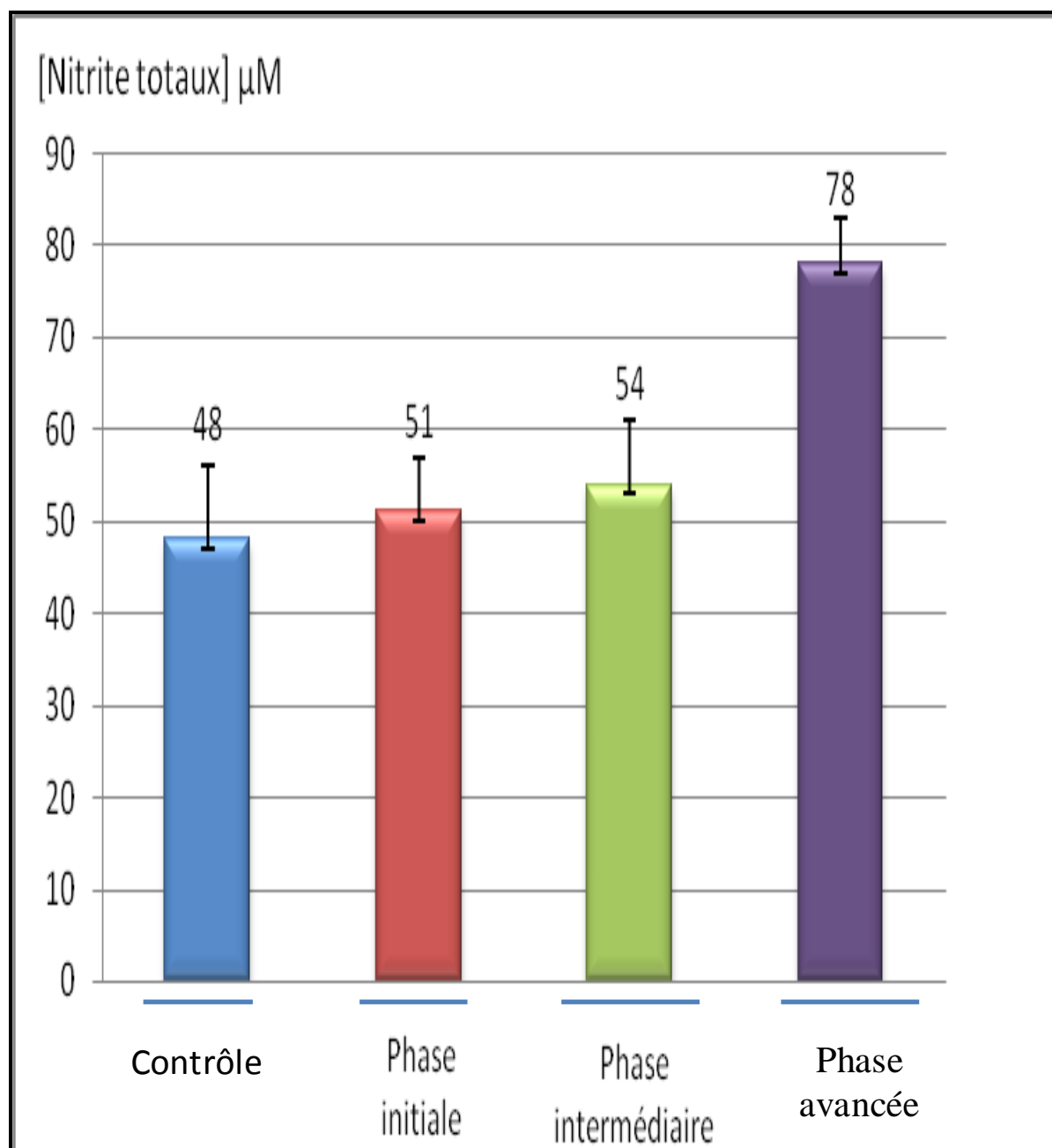


Figure 17 : effet de la vitamine E sur la concentration en nitrites totaux dans les différentes phases.

III.2.3. Concentration plasmatique du NO dans les différentes phases chez les patients présentant une hypertension artérielle:

Les taux de nitrites totaux (in vivo) chez des patients atteints de l'hypertension artérielle (HTA) en plus de la maladie d'Alzheimer sont nettement supérieurs à ceux observés chez les sujets sains. La teneur des nitrites totaux est de ($84 \pm 4 \mu\text{M}$) dans la première phase, alors qu'elle est légèrement supérieure dans la deuxième phase ($87 \pm 3 \mu\text{M}$) et la troisième phase ($87 \pm 6 \mu\text{M}$). Ces données suggèrent l'implication probable de l'hypertension artérielle dans l'apparition et l'aggravation de la maladie d'Alzheimer au cours du processus évolutif. Elle jouerait dans ce cas un rôle non négligeable dans la production du monoxyde d'azote. (**Figure 18**)

La NOS endothéliale (NOS3) serait également impliquée chez ces patients. Elle agirait de manière combinatoire et justifierait l'augmentation des taux de NO observés dans ces cas.

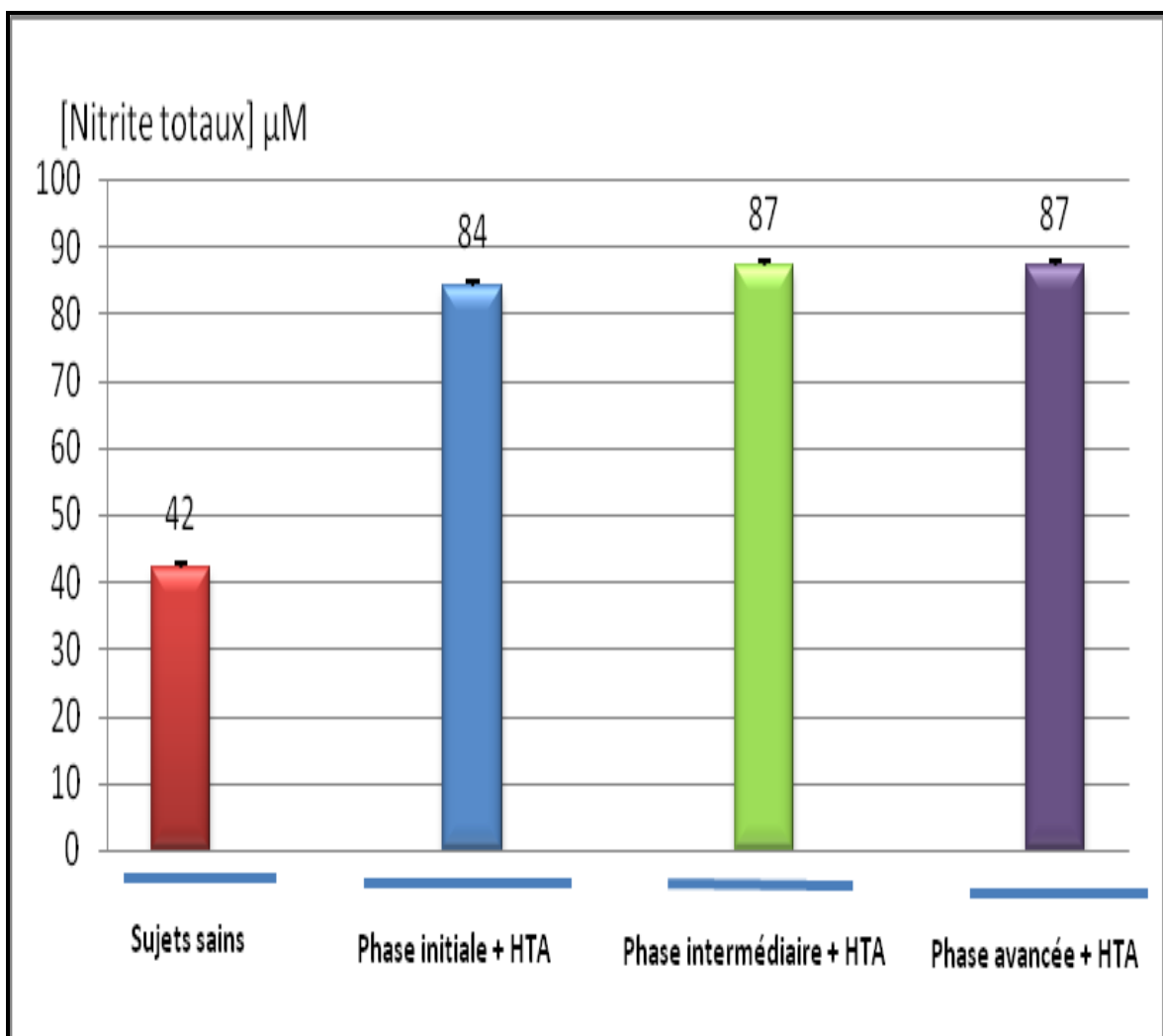


Figure 18 : Influence de l'hypertension artérielle sur la production des nitrites totaux dans les différentes phases de la pathologie.

III.3. Dosage (*in vitro*) du monoxyde d'azote dans les différentes phases de la pathologie:

Pour élucider le rôle immuno-modulateur des cytokines Th1 et Th2 dans la production de monoxyde d'azote dans les différentes phases de la pathologie nous avons procédé à l'établissement d'un système d'induction en utilisant différents effecteurs, cytokines et anti-cytokines.

III.3.1. Etude de l'Effet du $TNF\alpha$ et l'anti- $TNF\alpha$ sur la production des nitrites totaux:

L'action de $TNF-\alpha$ à 500 pg/ml sur les PBMC de patients a montré des taux importants de nitrites totaux dans la phase initiale ($54 \pm 3 \mu M$), la phase intermédiaire ($54 \pm 8 \mu M$) et la phase avancée ($56 \pm 1 \mu M$) par rapport au contrôle ($49 \pm 3 \mu M$). Cette augmentation serait associée à une régulation positive de la NOS2 par le $TNF-\alpha$.

Ces résultats indiquent que les monocytes des patients constituent la cible essentielle du $TNF\alpha$, en particulier pour les patients se trouvant en phase initiale et intermédiaire. A l'inverse, les PBMC des patients en phase avancée apparaissent moins sensibles à l'action du $TNF-\alpha$ exogène, probablement par une déficience fonctionnelle se traduisant par l'inhibition de l'expression des récepteurs au $TNF-\alpha$ sur les monocytes. (Figure 19)

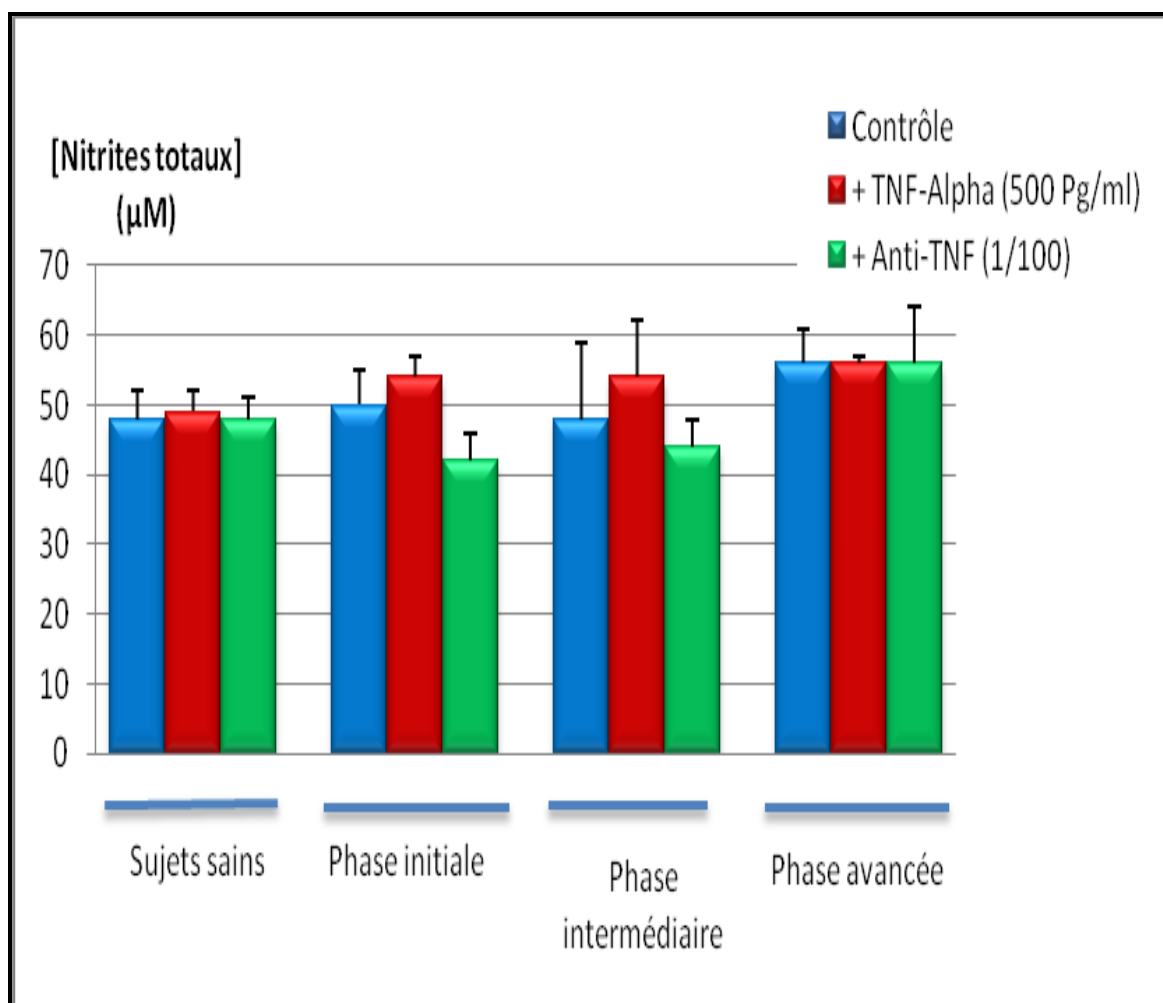


Figure 19 : Effet du $TNF-\alpha$ et l'anti- $TNF-\alpha$ sur la production des nitrites totaux.

III.3.2. Etude de l'effet de l'IFN γ et de l'anti IFN γ sur la production des nitrites totaux:

La stimulation des PBMC des patients par l'IFN- γ (100 UI/ml) a induit une augmentation des teneurs de nitrites totaux dans la phase initiale ($56 \pm 8 \mu\text{M}$), la phase intermédiaire ($52 \pm 2 \mu\text{M}$) et la dernière phase ($54 \pm 5 \mu\text{M}$). Toutefois ces teneurs sont supérieures à celles mesurées chez les témoins.

La neutralisation de l'IFN- γ par l'anti-IFN- γ montre une réduction des taux de nitrite totaux au niveau des surnageants des cultures des patients en phase initiale ($42 \pm 5 \mu\text{M}$) et intermédiaire ($40 \pm 8 \mu\text{M}$). A l'inverse, aucune influence n'est enregistrée dans la dernière phase ($54 \pm 2 \mu\text{M}$). Cependant, elle reste considérablement augmentée par rapport aux témoins. (Figure 20)

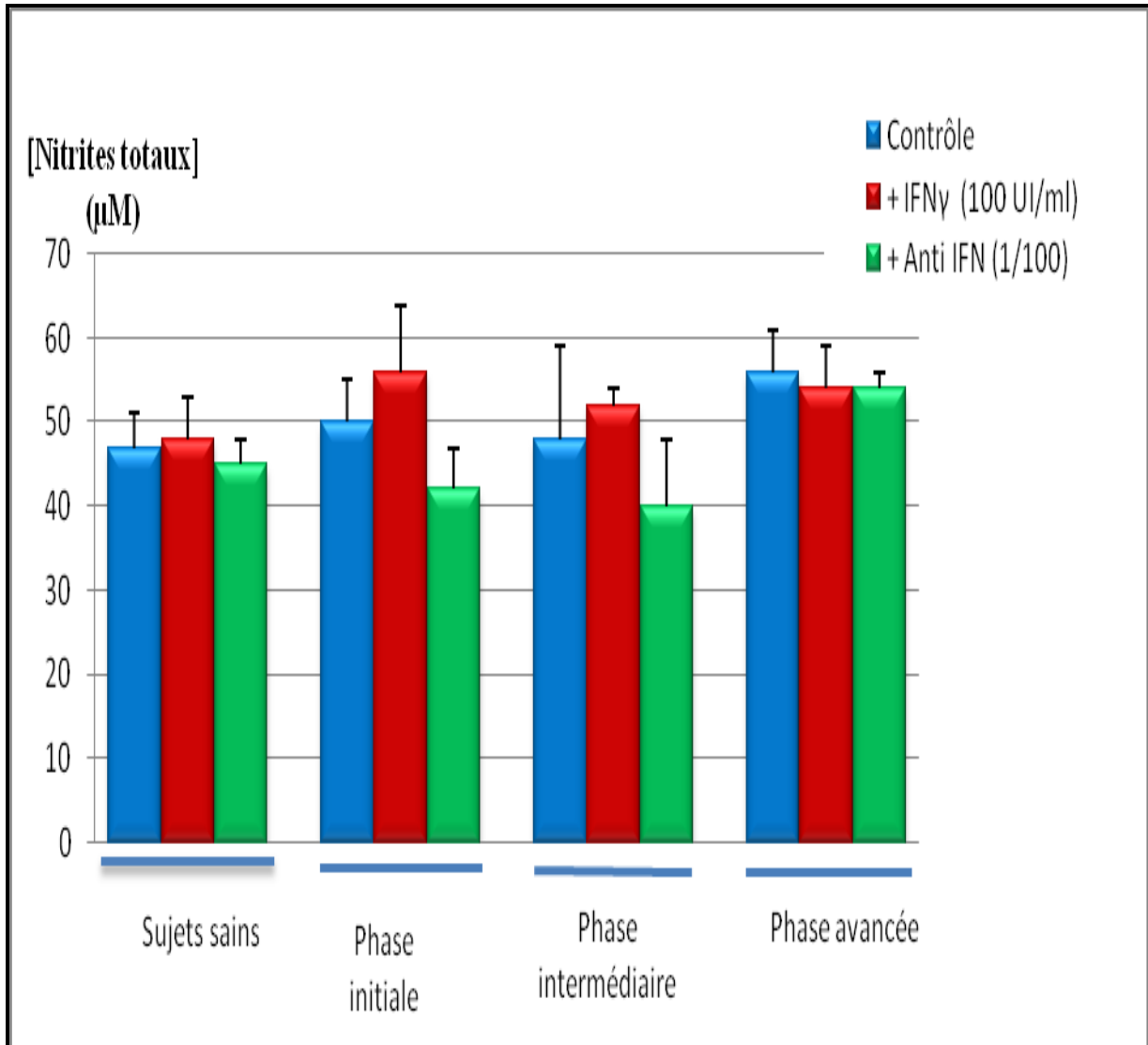


Figure 20: Effet de l'IFN γ et de l'anti IFN γ sur la production des nitrites totaux.

Ces données indiquent que les monocytes de ces patients aux phases considérées (initiale et intermédiaire) sont hautement sensibles à l'action de l'IFN- γ probablement par l'expression accrue du récepteur d'IFN- γ .

III.3.3. Etude de l'effet de l'IL-13 et l'anti-IL-13 sur la production des nitrites totaux:

La stimulation des PBMC des patients par l'IL-13 (500 pg/ml) a induit une sensible diminution de la production des nitrites totaux dans la phase intermédiaire ($40 \pm 7 \mu\text{M}$) et la phase initiale ($40 \pm 7 \mu\text{M}$), par contre elle est légèrement élevée dans la phase avancée ($52 \pm 0 \mu\text{M}$). Ces résultats pourraient être expliqués par l'effet modulateur négatif de l'IL-13 sur l'expression de NOS2 dans le cas des phases initiale et intermédiaire.

La neutralisation de l'IL-13 a induit une augmentation des taux des nitrites totaux au niveau des surnageants de culture des patients en phase intermédiaire ($48 \pm 7 \mu\text{M}$) par rapport à la phase initiale ($42 \pm 5 \mu\text{M}$) et avancée ($54 \pm 1 \mu\text{M}$). (**Figure 21**)

Les PBMC des patients en phase initiale et avancée apparaissent moins sensibles à l'IL-13. Ces observations seraient probablement liées à l'implication des mécanismes de régulation négative de la NOS2 ou à un taux plus élevé d'expression du récepteur d'IL-13 par le système monocyte.

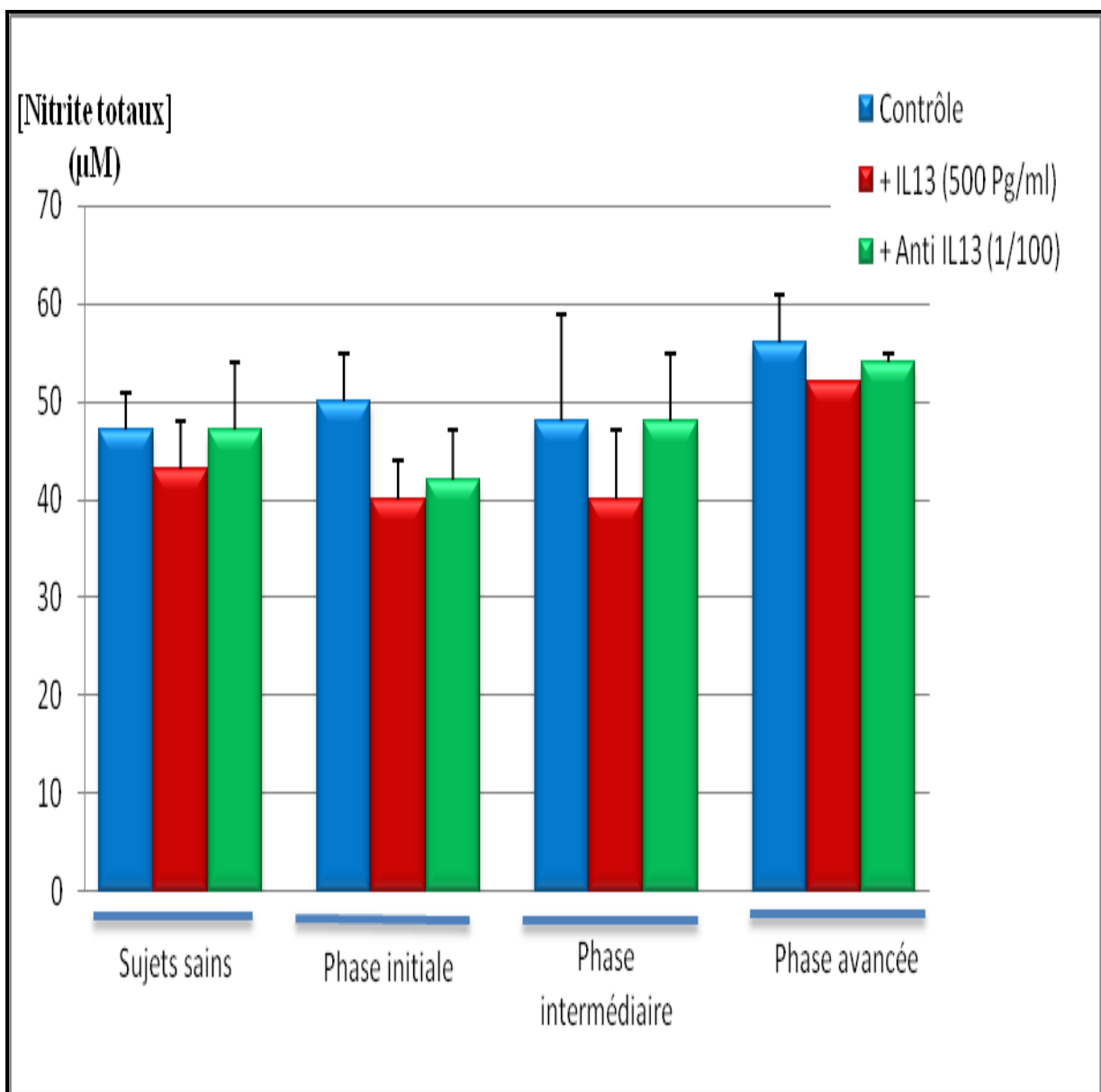


Figure 21: Effet d'IL13 et l'anti-IL13 sur la production des nitrites totaux.

III.3.4. Etude de l'effet de l'IL-6 sur la production des nitrites totaux:

La stimulation des PBMC des patients par l'IL6 (100 pg/ml) montre une augmentation du taux de NO uniquement dans la phase finale ($58 \pm 2 \mu\text{M}$). A l'inverse, aucune influence n'est enregistrée dans la première phase ($42 \pm 7 \mu\text{M}$) et la deuxième phase ($46 \pm 6 \mu\text{M}$). Ceci pourrait être expliqué par une implication exclusive d'IL-6 dans la dernière phase de la pathologie. Cette dernière étant connue pour moduler positivement la NOS2 sur le système monocyte/macrophage. (Figure 22) (Touil-Boukoffa et al, 1998).

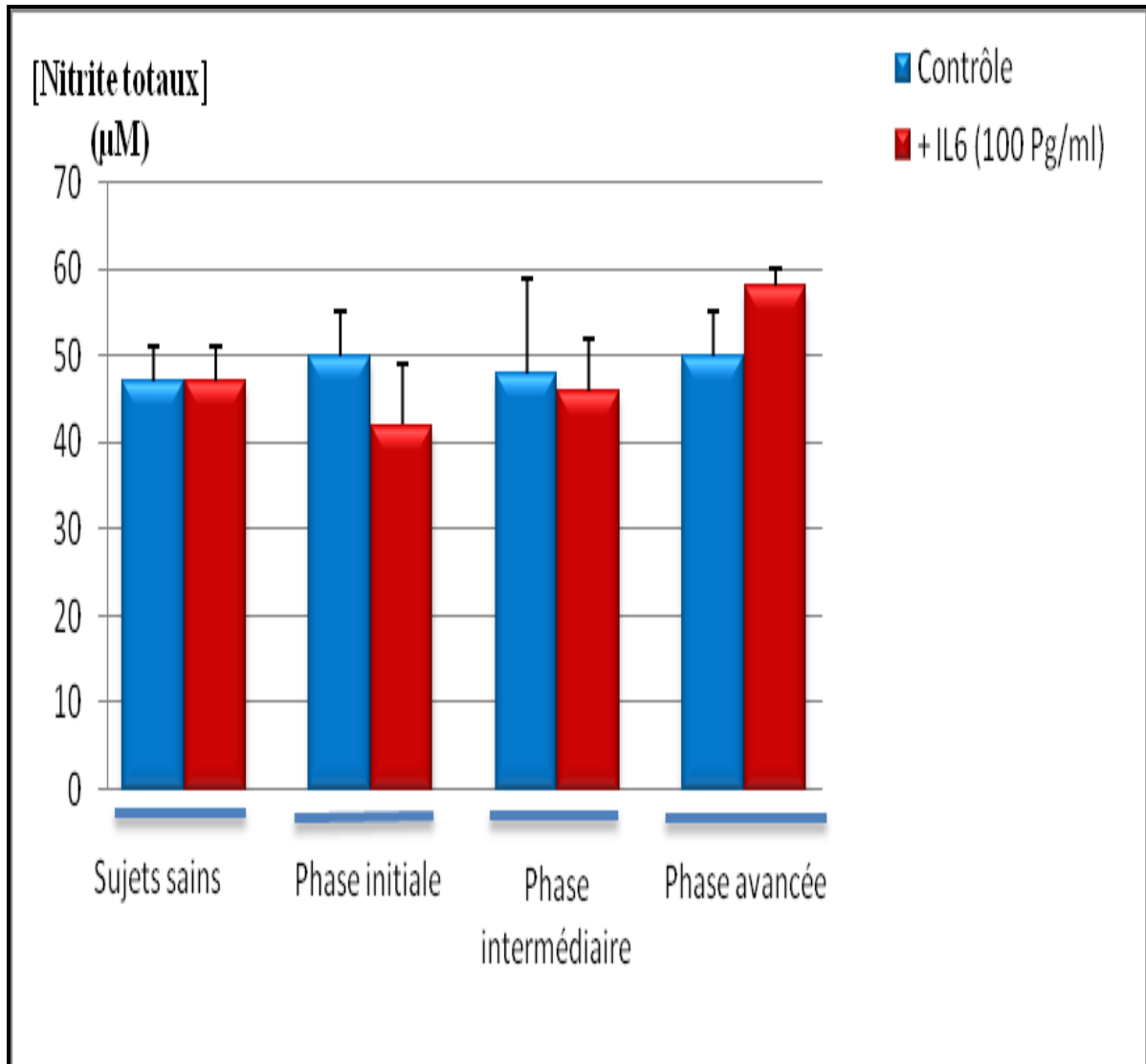


Figure 22: Effet de l'IL-6 sur la production des nitrites totaux.

III.3.5. Etude de l'effet de l'IL17 sur la production des nitrites totaux:

La stimulation des PBMC des patients par l'IL17 (100 pg/ml) augmente légèrement le taux de NO dans la phase initiale ($52 \pm 7 \mu\text{M}$) et la phase intermédiaire ($53 \pm 6 \mu\text{M}$). A l'inverse, une importante concentration du NO est enregistrée dans la dernière phase ($68 \pm 8 \mu\text{M}$). (Figure 23) Ceci pourrait être expliqué par l'implication de l'IL17 dans la chronicité de la pathologie. Cette dernière étant connue pour moduler positivement la production des cytokines de la voie Th1.

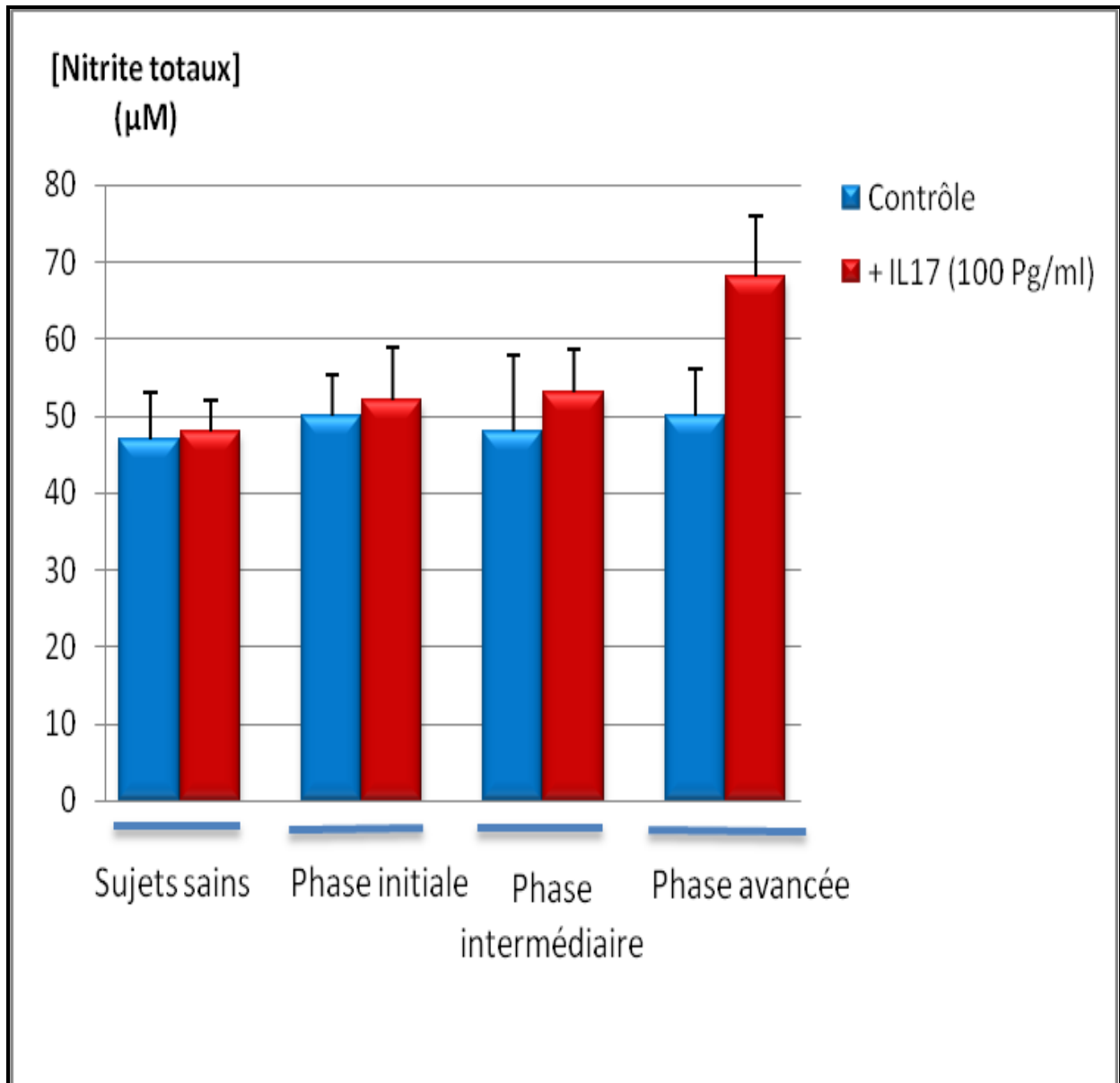


Figure 23: Effet de l'IL17 sur la production des nitrites totaux.

III.4. Implication de TNF- α dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer:

L'étude de la production du TNF- α dans le plasma des patients révèle une augmentation notable dans la deuxième phase (360.5 ± 4.12 pg/ml) et moindre dans la troisième phase ($316,0 \pm 81.68$ pg/ml). A l'inverse, la concentration de TNF- α est faible dans la première phase (< 5 pg/ml) (Figure 24).

L'étude de la production du TNF- α dans le LCR révèle un profil similaire à celui de TNF- α plasmatique mais à des proportions plus élevées. Les taux de production de nitrites totaux chez les patients de la deuxième phase sont de (470 ± 120 pg/ml) et dans la troisième phase de (460 ± 93 pg/ml). Nous avons noté avec intérêt que la concentration de TNF- α est faible dans la première phase (< 5 pg/ml) (Figure 25).

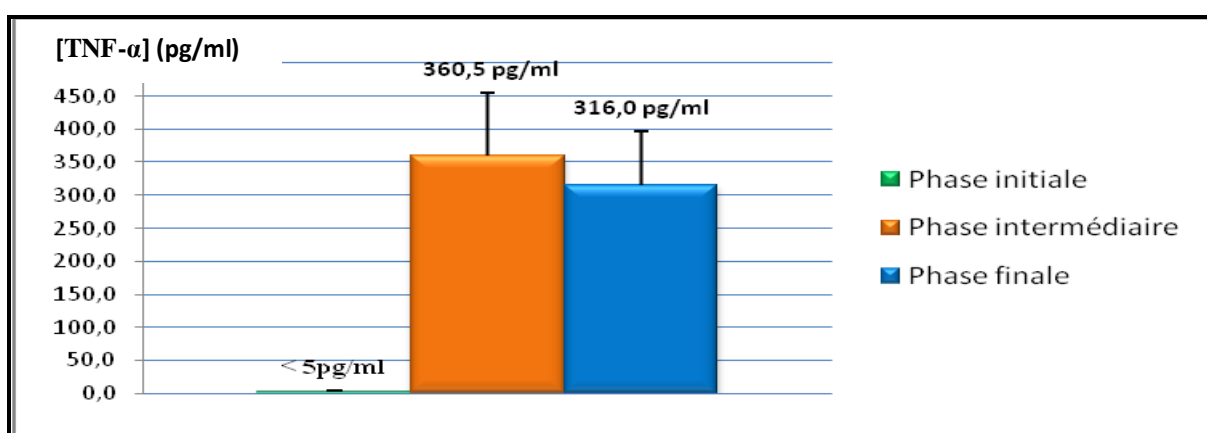


Figure 24: Dosage de TNF- α dans le plasma.

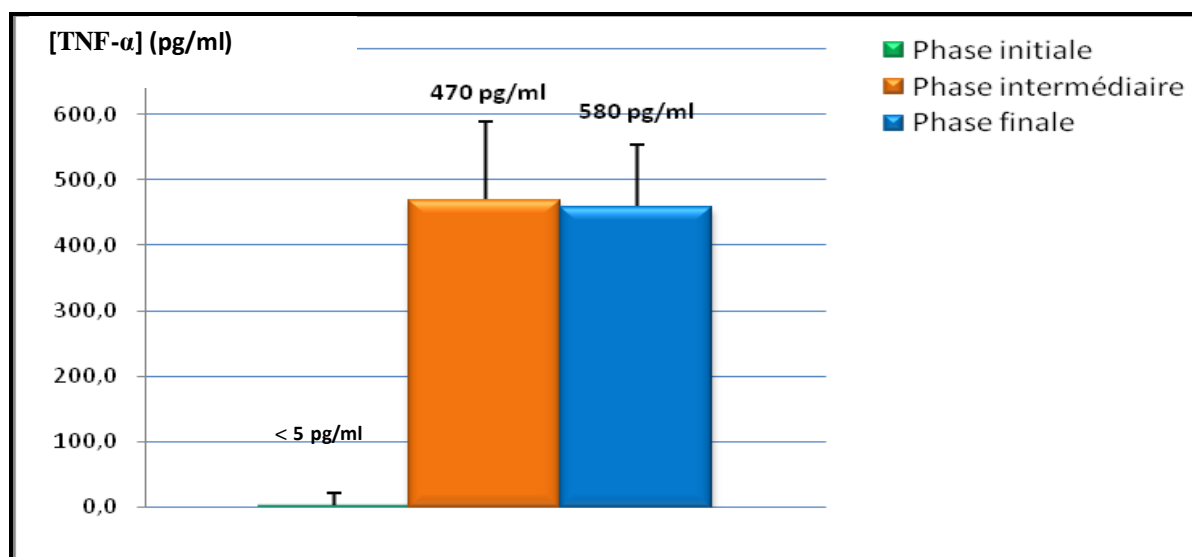


Figure 25: Dosage de TNF- α dans le LCR.

III.5. Implication de TGFβ dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer:

L'étude de la production du TGFβ dans le plasma des patients révèle une concentration élevée dans la deuxième phase (**5700 ± 40 pg/ml**) et moindre dans la troisième phase (**1800 ± 38 pg/ml**). A l'inverse, la concentration de TGFβ est faible dans la première phase (**840 ± 35pg/ml**). (Figure 26)

Ces observations seraient probablement liées à des mécanismes de régulation négative de l'expression des cytokines de la voie TH1 responsable de la production de monoxyde d'azote. Ces données justifient en partie la diminution de NO plasmatique dans la deuxième phase.

L'étude de la production du TGFβ dans le LCR des patients révèle le même profil que celui obtenu dans le plasma mais avec des concentrations plus faibles. En effet, on enregistre des teneurs de (**336 ± 36 pg/ml**) dans la deuxième phase et moindre dans la troisième phase (**128 ± 21 pg/ml**). A l'inverse, la concentration de TGFβ est faible dans la première phase (**65 ± 7 pg/ml**). (Figure 27)

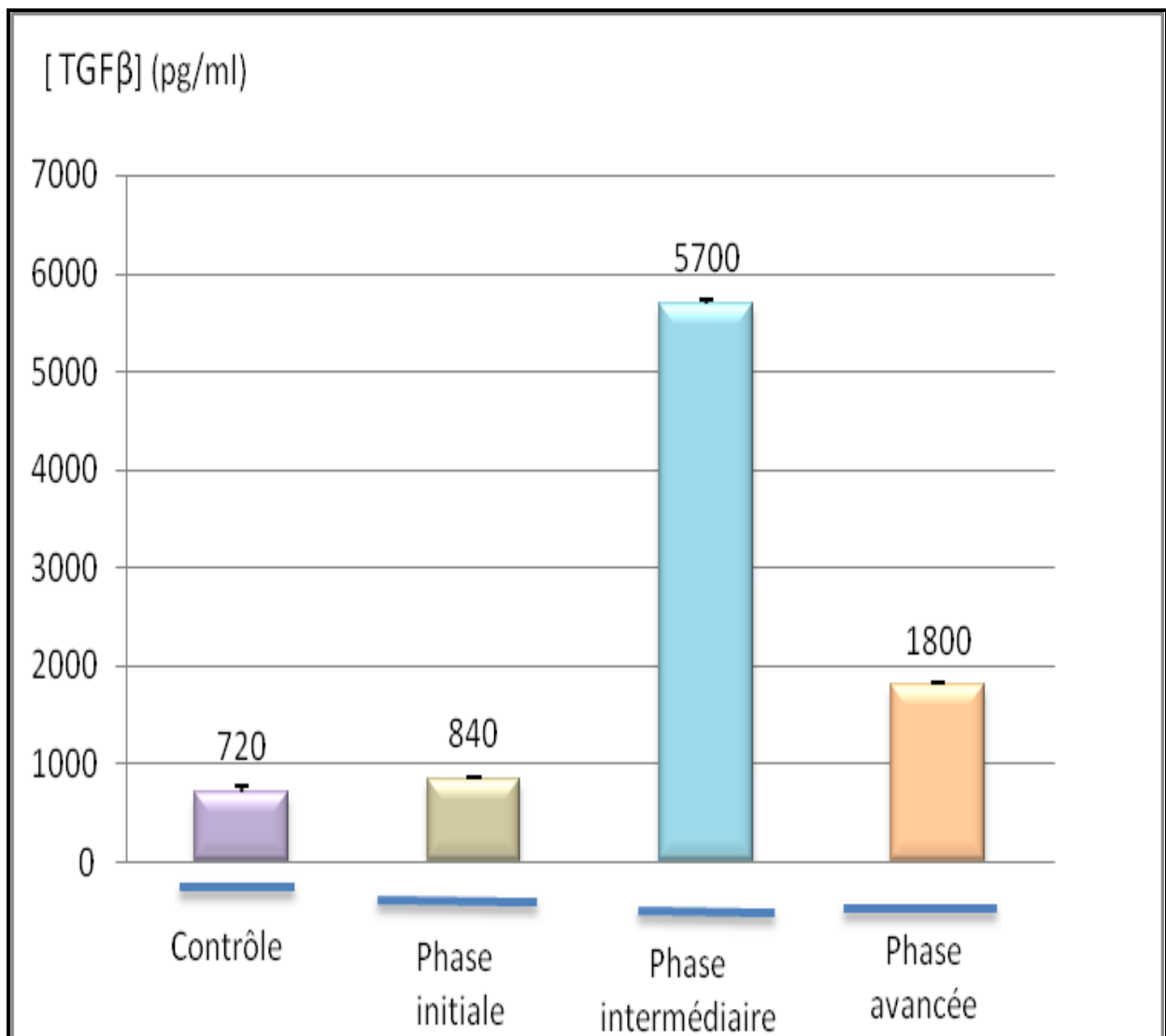


Figure 26: Dosage de TGFβ dans le plasma.

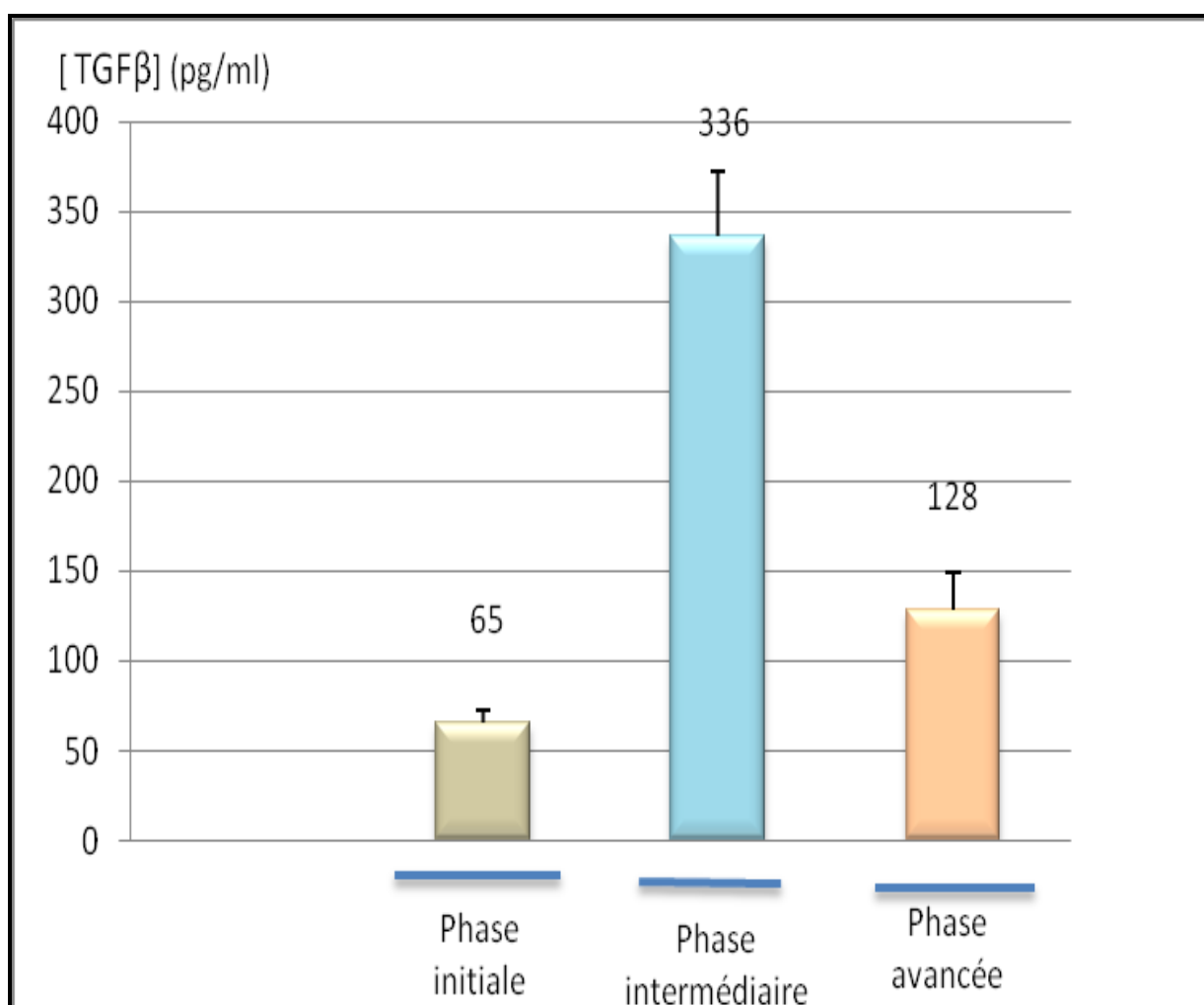


Figure 27: Dosage de TGFβ dans le LCR.

IV. Autres biomarqueurs associés au processus neurodégénératif :

IV.1. Dosage de la Butyrylcholinestérase dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer:

L'étude de l'activité Butyrylcholinestérase dans le plasma a révélé une variation importante de l'activité suivant la phase évolutive de la pathologie.

On peut noter une augmentation de BChE dans la première ($0,363 \pm 0,082$ mmole/g/min) et la deuxième phase ($0,430 \pm 0,050$ mmole/g/min) en comparaison au contrôle ($0,31 \pm 0,004$ mmole/g/min). A l'inverse, elle est nettement inférieure dans la troisième phase ($0,600 \pm 0,16$ mmole/g/min). (Figure 28) (Tableau 10)

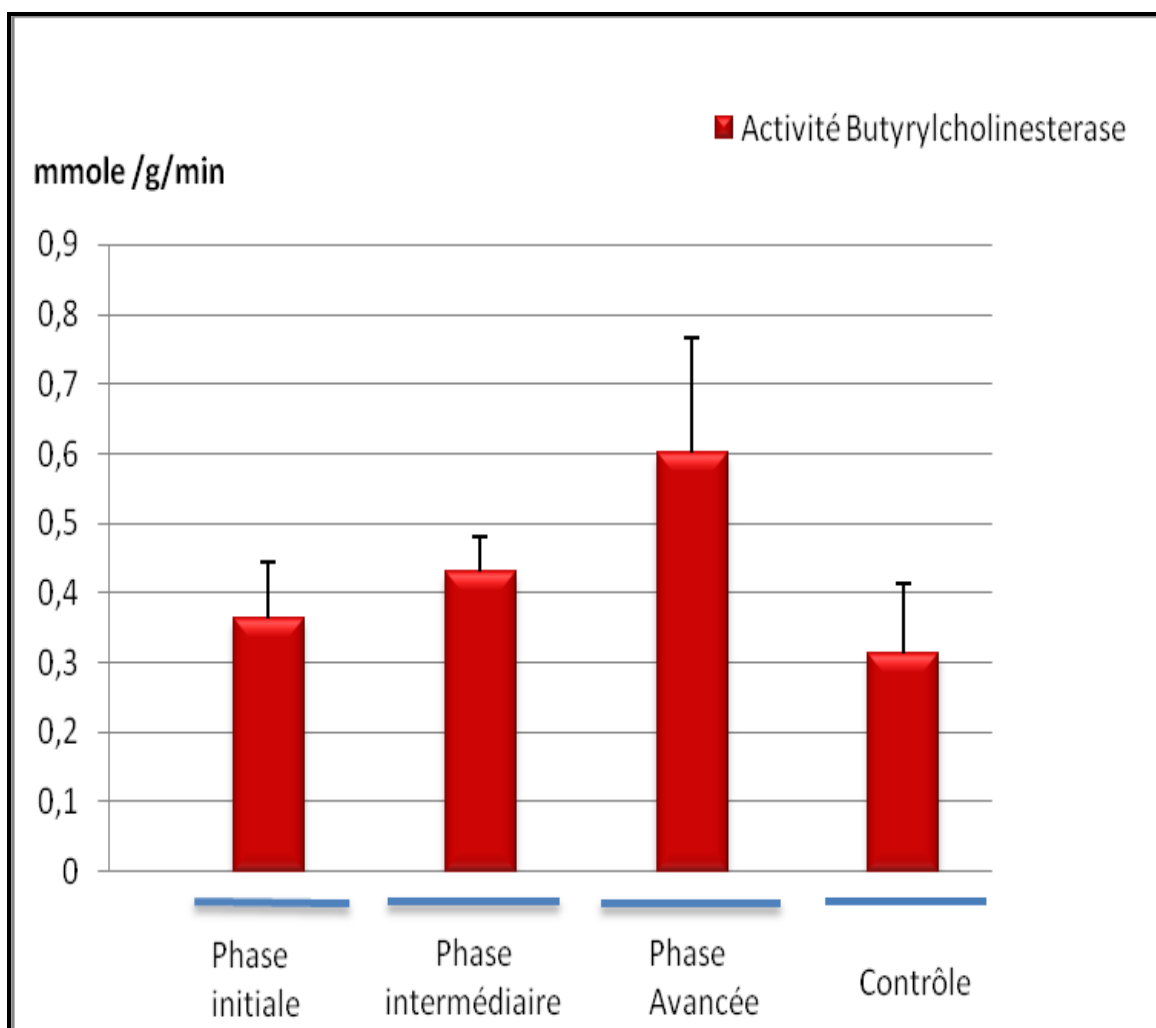


Figure 28 : Dosage de l'activité Butyrylcholinestérase dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.

	Catégories des sujets			
	Contrôle (n=09)	Patients		
		Phase initiale (n=13)	Phase intermédiaire (n=11)	Phase avancée (n=11)
Activité Butyrylcholinesterase (mmole /g/min)	0,013 ± 0,004	0,363 ± 0,082	0,430 ± 0,050	0,600 ± 0,16

Tableau 10: Etude de l'activité Butyrylcholinestérase dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer.

IV.2. Dosage de l'activité estérase non spécifique dans le LCR:

L'activité estérase non spécifique est réalisée dans le liquide céphalorachidien, ainsi qu'une numération cellulaire.

Nous avons noté avec intérêt une activité estérase importante dans la phase initiale et avancée. Ceci suggère une infiltration importante des lymphocytes T ainsi que les monocytes dans le système nerveux centrale.

Une numération cellulaire révèle une prédominance du système monocyte/macrophage. (Tableau 11)

Les phases évolutives	Patients	Estérase non spécifique μM/g de protéine	Numération Cellule/ml	Rapport lymphocyte/macrophage
Phase initiale	AD 01	0.16	165	32/133
	AD 02	0.18	172	41/131
Phase intermédiaire	AD 03	0.02	10	0/10
	AD 04	0.05	8	1/7
Phase avancée	AD 05	0.18	154	47/107
	AD 06	0.15	137	36/101

Tableau 11 : Etude cytologique du liquide céphalotrachidien.

*Chapitre IV : DISCUSSION
GENERALE*

IV. Discussion générale:

Les mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer sont caractérisés par un processus neurodégénératif progressif associé à une réponse immuno-inflammatoire caractérisée par la production accrue des médiateurs: Cytokines, complément, radicaux libres en particulier le monoxyde d'Azote. Tous ces éléments sont largement impliqués dans la mort neuronale. (Griffin et al, 1998 ; Griffin, 2000).

Influence de l'état de la barrière hémato encéphalique sur l'évolution de la maladie d'Alzheimer:

La barrière hémato-encéphalique, dont l'intégrité est essentielle à l'homéostasie cérébrale, constitue une barrière physiologique hautement régulée par des interactions paracrines avec les cellules du parenchyme cérébral, ainsi qu'avec les cellules et les effecteurs du système immunitaire (Plata-Salaman, 1991 ; Engelhardt et al., 2001).

Dans notre étude, nous avons procédé à l'évaluation de l'état de la barrière hémato-méningée, un paramètre important à considérer, vue son rôle dans les interactions entre le système immunitaire et le système nerveux central. Le rapport de l'albumine (albumine LCR/ albumine plasma) est l'un des paramètres utilisés pour l'évaluation de la perméabilité de la BHE sachant que l'albumine, d'origine exclusivement sérique qui diffuse dans le LCR à travers la BHE.

Les résultats obtenus montrent une augmentation proportionnelle du ratio albumine dans les différentes phases évolutives de la pathologie (Phase initiale, intermédiaire, avancée). Ces résultats indiquent une détérioration de la barrière hémato-encéphalique engendrant une augmentation des interactions entre le système immunitaire et le système nerveux central. Ces interactions sensiblement impliquées dans l'exacerbation du processus immuno-inflammatoire dirigé contre la protéine amyloïde beta chez les malades d'Alzheimer.

Etude de la production *in vivo* du monoxyde d'azote selon les phases cliniques :

L'étude de la production *in vivo* du NO chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer a révélé des teneurs élevées dans le plasma des patients. Les résultats de cette étude soulignent la haute implication de monoxyde d'azote dans les mécanismes associés à la genèse et à l'évolution de la pathologie. En effet, à fortes concentrations, le NO exerce un effet cytotoxique et délétère dans le système oculaire (Lahmar-Belguendouz et al., 2009).

L'étude comparative de la production *in vivo* du monoxyde d'azote en fonction de la phase clinique, indique que les taux les plus élevés sont retrouvés en phase initiale et avancée. Ces teneurs élevées seraient probablement dues à l'influence de la phase clinique sur l'induction de la NOS2. Des travaux antérieurs rapportent l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IFN- γ et TNF- α) au cours de l'évolution pathogénique de la maladie d'Alzheimer (Richartz-Salzbürger and Koehler, 2009).

Notre étude souligne encore une fois la relation étroite existante entre les cytokines pro inflammatoire et l'expression du gène de la NOS2.

Dans le cas précis de notre modèle. Nous devons considérer l'effet combinatoire de la NOS inductible (NOS2) et de la NOS constitutive neuronale (NOS1).

Plusieurs études suggèrent l'implication de la NO synthase neuronale (nNOS) dans l'augmentation de la production du NO qui s'ajoute au NO produit par la iNOS (au niveau du SNC et système immunitaire périphérique). L'activation des récepteurs NMDA par le

glutamate et la glycine est indispensable pour l'entrée en excès du calcium dans les neurones, qui va permettre l'activation de la nNOS. (Nakamura *et al.*, 2007). (Figure 29)

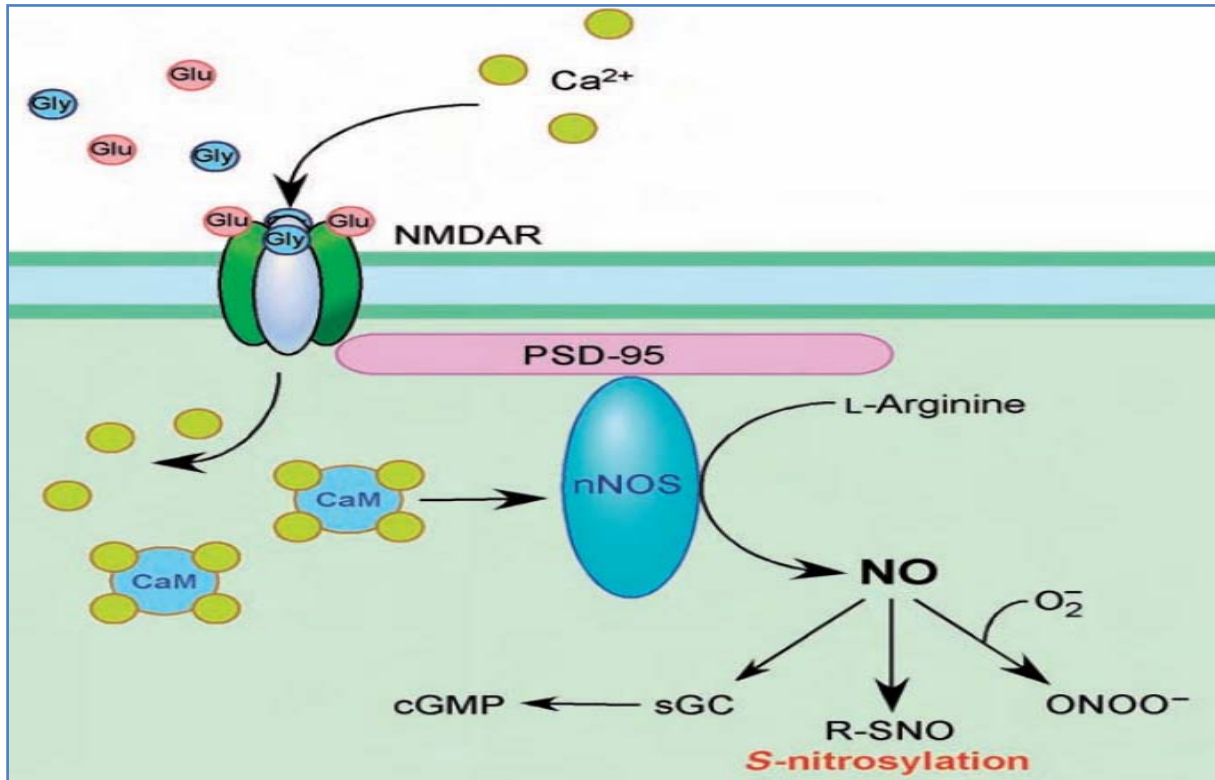


Figure 29: l'implication de la nNOS dans la mort neuronale. (Nakamura *et al.*, 2007)

Etude de l'effet de la vitamine E sur la production plasmatique des nitrites totaux chez les patients dans les différentes phases de la pathologie:

La vitamine E (alpha-tocophérol) est reconnue comme étant essentiellement un antioxydant qui limite la peroxydation lipidique. Elle est très utilisée dans les maladies neurologiques.

Les résultats obtenus montrent l'implication de la vitamine E dans la réduction de la production des nitrites totaux dans la phase initiale et intermédiaire. Ceci suggère le rôle de la vitamine E dans la prévention du stress oxydatif lié à la pathologie. L'effet de cette molécule reste tout de même limité car elle ne présente aucun effet sur la dernière phase.

Le mécanisme d'action de l' α -tocophérol réside dans l'inhibition de l'assemblage de la NADPH oxydase, le complexe enzymatique producteur de l'anion superoxyde, en inhibant la phosphorylation et la translocation membranaire d'un de ses éléments : la p47^{phox}. (Cachia et Leger, 1996). L'inhibition de la production de l'anion superoxyde limite et freine la production des peroxy-nitrites à partir de monoxyde d'azote.

Etude de corrélation sur l'effet de l'hypertension artérielle sur la production du NO dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer:

L'étude de la production *in vivo* du NO a révélé une production importante et semblable dans les différentes phases. Ces augmentations sont nettement supérieures à celles observées chez les malades atteints de la maladie d'Alzheimer (sans association avec d'autres pathologies).

Dans ces cas où une hypertension artérielle est observée, nous devons probablement prendre en considération l'action de la NOS3 (NO endothéliale). Des études moléculaires quantitatives plus approfondies portant sur le ratio (NOS inductible/NOS endothéliale) apporteraient de plus amples informations.

Des relations physiopathogéniques directes entre le processus dégénératif de type Alzheimer et l'HTA ont été signalés, basées sur le fait que l'apolipoprotéine E est à la fois facteur de risque vasculaire et de la maladie d'Alzheimer. Plus simplement, on peut penser que l'HTA pèse sur la bonne irrigation du tissu nerveux, ce qui ne peut qu'endommager plus rapidement les neurones en cours de dégénérescence. Toutefois, ce simple facteur de risque peut certainement ralentir l'apparition des manifestations cliniques de plusieurs années chez les sujets à risque, à condition qu'ils soient traités précocement. Il s'agit donc d'une cible thérapeutique simple d'accès et efficace (**Forette F, 1998**) (**Milicevic et Krzesinski, 2008**).

Etude de la production *in vitro* du monoxyde d'azote par les PBMC des patients atteints de la maladie d'Alzheimer au différent stade clinique :

L'étude de l'effet de TNF- α en concert avec son partenaire assidu, l'IFN- γ sur la production de NO a révélé une augmentation de la production de NO dans la première et la deuxième phase. Aucune augmentation n'est enregistrée dans la dernière phase. Cette teneur reste élevée par rapport au contrôle. Ces données indiquent l'implication d'autres cytokines dans la production du NO.

L'utilisation d'un anticorps spécifique de l'anti-TNF- α dans les cultures de PBMC a induit une diminution significative chez les deux catégories de patients. Cette diminution est attribuée à la neutralisation du TNF- α par sa contre-structure.

Ces données refléteraient une production accrue du TNF- α par notre système de culture. Notre étude suggère une forte implication de cette cytokine dans les mécanismes de l'inflammation. En effet, le TNF- α agit en synergie avec l'IFN- γ dans l'expression de la NOS2 au niveau des monocytes circulants (**Touil-Boukoffa et al, 1998**).

Le profil de la production du monoxyde d'azote après induction des PBMC par l'IFN- γ est similaire à celui de TNF- α . Nos résultats confortent l'implication de l'IFN- γ dans l'induction de la NOS 2 au cours de cette pathologie. Ces résultats peuvent également appuyer l'hypothèse de la prédominance d'un profil cytokinique Th1 au cours de maladie d'Alzheimer.

Il est tout à fait probable selon nos résultats que le TNF- α et l'IFN- γ puissent agir dans la surexpression de NOS2 au niveau des macrophages infiltrants et entraînent des lésions des neurones et autres cellules du SNC. L'IFN- γ seul n'alère pas la survie cellulaire mais rend ces cellules plus sensibles en présence de TNF (**Pouly, 2000**). De plus, l'IFN- γ et le TNF- α accélèrent la dégénérescence en relation avec l'administration intracérébrale d'un donneur de monoxyde d'azote. En revanche, une simple injection de TNF- α (avec ou sans IFN- γ) dans le cerveau de souris ou de rats provoque une forte réaction inflammatoire au niveau des cellules microgliales (**Nadeau et Rivest, 2000**).

L'induction des cultures de PBMC par une cytokine Th2 (IL-13) et antagoniste de l'IFN- γ chez les patients en deuxième phase a conduit à une diminution sensible de la production de NO. L'IL-13 possède une activité anti-inflammatoire qui peut inhiber la production d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α . Cette cytokine anti-inflammatoire est également capable de réprimer certaines des activités pro-inflammatoires de l'IL-1 et du TNF- α . L'effet inhibiteur de L'IL-13 peut être également expliqué par sa capacité d'induire la production d'IL-1Ra (**Vannier et al., 1996**). L'utilisation d'un anticorps spécifique de l'IL-13 dans les cultures de PBMC a induit une augmentation significative des taux de NO. Les résultats obtenus ont montré que l'IL-13 peut réguler négativement la production *in vitro* du NO chez les patients de la phase intermédiaire, ce qui explique en partie l'état stationnaire des malades de cette phase.

Le profil de la production du NO après induction des PBMC par l'IL6 révèle une production significative dans la phase avancée par rapport aux deux autres phases et au contrôle. Ces résultats corroborent avec les résultats obtenus *in vivo*. L'IL-6 est la cible de nombreuses études en tant qu'orchestrateur de la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, la résolution de tout phénomène inflammatoire aigu et des désordres de cette transition pourraient promouvoir le développement d'une inflammation chronique ou de l'autoimmunité. L'IL6 module différenciellement l'expression de chimiokines et l'apoptose des cellules immunes menant au remplacement de l'infiltrat neutrophilique par un infiltrat lympho-monocytaire. Par ailleurs, ce climat cytokinique particulier est propice au développement de lignées spécifiques de lymphocytes tels que les lymphocytes T CD4+ sécrétant de l'IL-17 (Th17). (**Ohshima et al., 1998 ; Kitamura et al., 2004 ; Gay et al., 2006**)

L'induction des PBMC par une cytokine de la voie Th17 (IL17) a induit une augmentation significative des taux de NO proportionnelle à l'évolution de la pathologie et particulièrement dans la phase avancée. Ceci suggère l'implication délétère de l'IL-17, favorisant les lésions inflammatoires. A l'inverse, La neutralisation de l'IL-17 réduit la sévérité des lésions du système nerveux central dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune. (**Cua et al., 2003; Komiyama et al., 2006**)

Etude du profil de TNF- α dans le LCR et le plasma:

Les résultats obtenus montrent que la teneur de TNF- α est considérablement élevée dans la deuxième et la troisième phase. Le TNF- α produit est probablement d'origine cérébral, libéré dans la circulation sanguine suite à la détérioration de la barrière hémato-encéphalique. Ces résultats sont confirmés par l'obtention du même profil dans le LCR. Les teneurs mesurées apparaissent substantielles. Toutefois, la validation des données nécessite celles du témoin. Nous n'avons pas pu disposer d'un témoin pour une meilleure interprétation de nos résultats.

Les effets délétères du TNF- α produit endommage l'intégrité de la BHE, induit le recrutement leucocytaire, et augmente la perméabilité vasculaire. Cette perméabilité se traduit par l'entrée passive des protéines sériques (Albumine) dans le LCR. (**de Vries et al., 1996**)

Etude du profil de TGFβ dans le LCR et le plasma:

Les résultats obtenus montrent que la teneur de TGFβ est considérablement élevée en phase intermédiaire dans le LCR et le plasma. Et en parallèle, nous avons enregistré une faible teneur du NO (*in vivo*). En présence des concentrations élevées de TGFβ, nous avons enregistré une polarisation de T CD4+ vers la voie Treg. Cette dernière est la source de TGFβ et l'IL10 qui sont responsables de la régulation négative de l'iNOS. A l'inverse, dans la phase avancée de la pathologie nous avons enregistré une teneur de TGFβ moins importante par rapport à la deuxième phase. La présence de TGFβ et l'implication de l'IL6 dans cette phase polarise les lymphocytes T CD4+ vers la voie Th17, marqueur d'une inflammation chronique.

Nous avons observé avec intérêt des concentrations élevées et maintenues de TGFβ chez une catégorie de patients de la deuxième phase. Des concentrations de TGFβ chez une autre catégorie de patients de la deuxième phase présentent des concentrations de TGFβ un peu plus faible après un deuxième dosage (une année après). Après étude des dossiers de malades et analyse des testes mémoire, nous avons constaté que les malades avec des concentrations élevées de TGFβ sont des déclineurs long dont la phase intermédiaire est plus longue, alors que les patients présentant une diminution de concentrations de TGFβ sont des déclineurs rapide dont le passage en phase avancée est rapide.

Etude de l'effet de Butyrylcholinestérase dans les différentes phases de la maladie d'Alzheimer:

L'étude du profil de butyrylcholinestérase révèle une augmentation proportionnelle à l'évolution de la pathologie. Cette augmentation est en étroite relation avec le déficit cholinergique caractérisé par les troubles de mémoire. Selon nos résultats, ce paramètre constitue un marqueur d'orientation de l'évolution de la pathologie. Son utilité apparaît selon notre étude complémentaire à l'analyse du NO et à l'IFN-γ dans le suivi des patients.

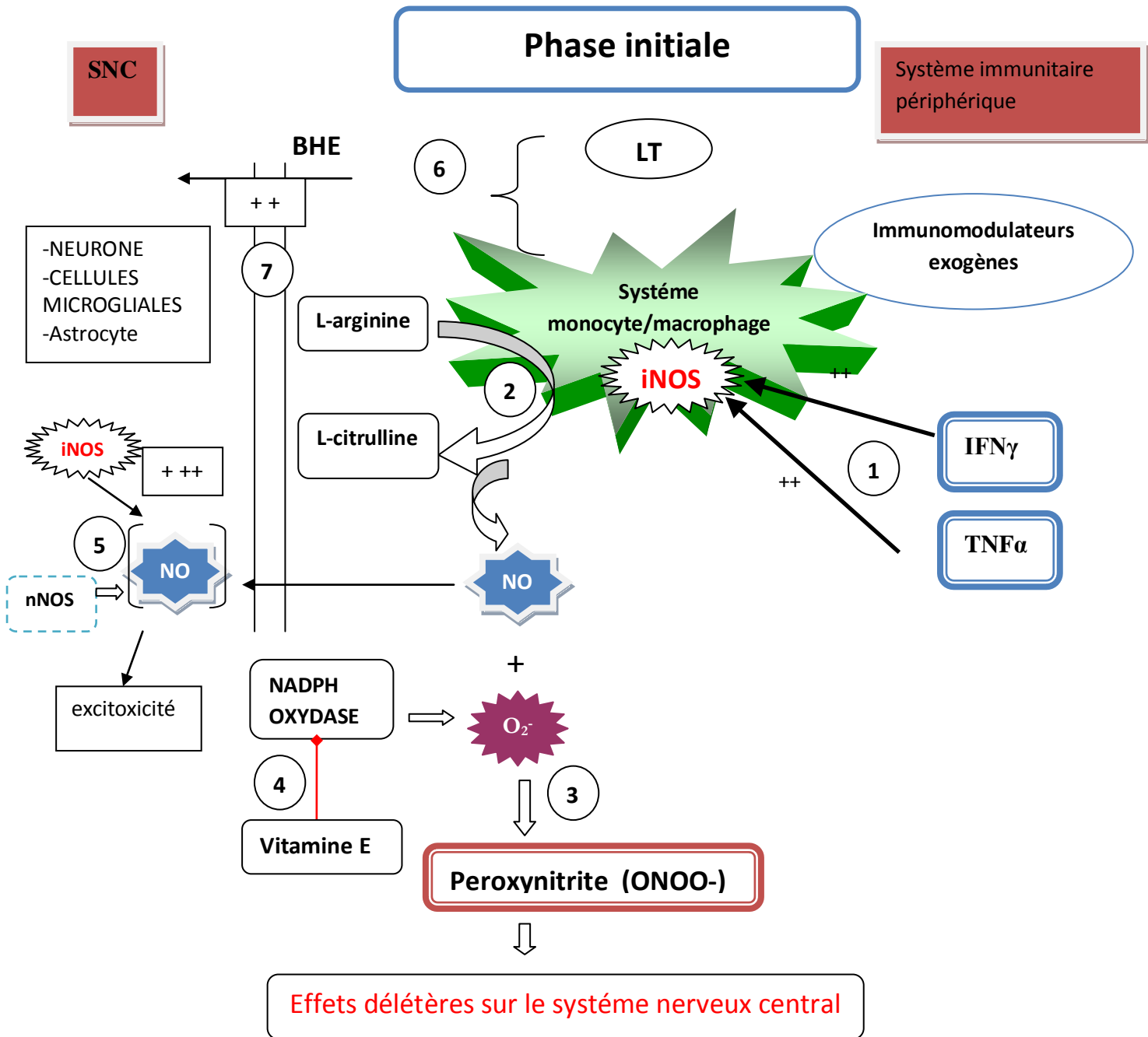
Etude de l'infiltration cellulaire dans le liquide céphalorachidien:

Le dosage de l'activité estérase non spécifique dans le LCR nous a permis de constater une forte activité dans la première et la dernière phase. Ces données confortent l'implication d'une inflammation importante dans les deux phases.

L'étude cytologique du LCR révèle une prédominance du système monocyte /macrophage. Cette observation indique encore une fois le rôle pivot de ce système dans la pathogenèse et l'évolution de la pathologie. Il sera intéressant d'inspecter le profil chemokinique pour situer leur rôle dans la pathologie.

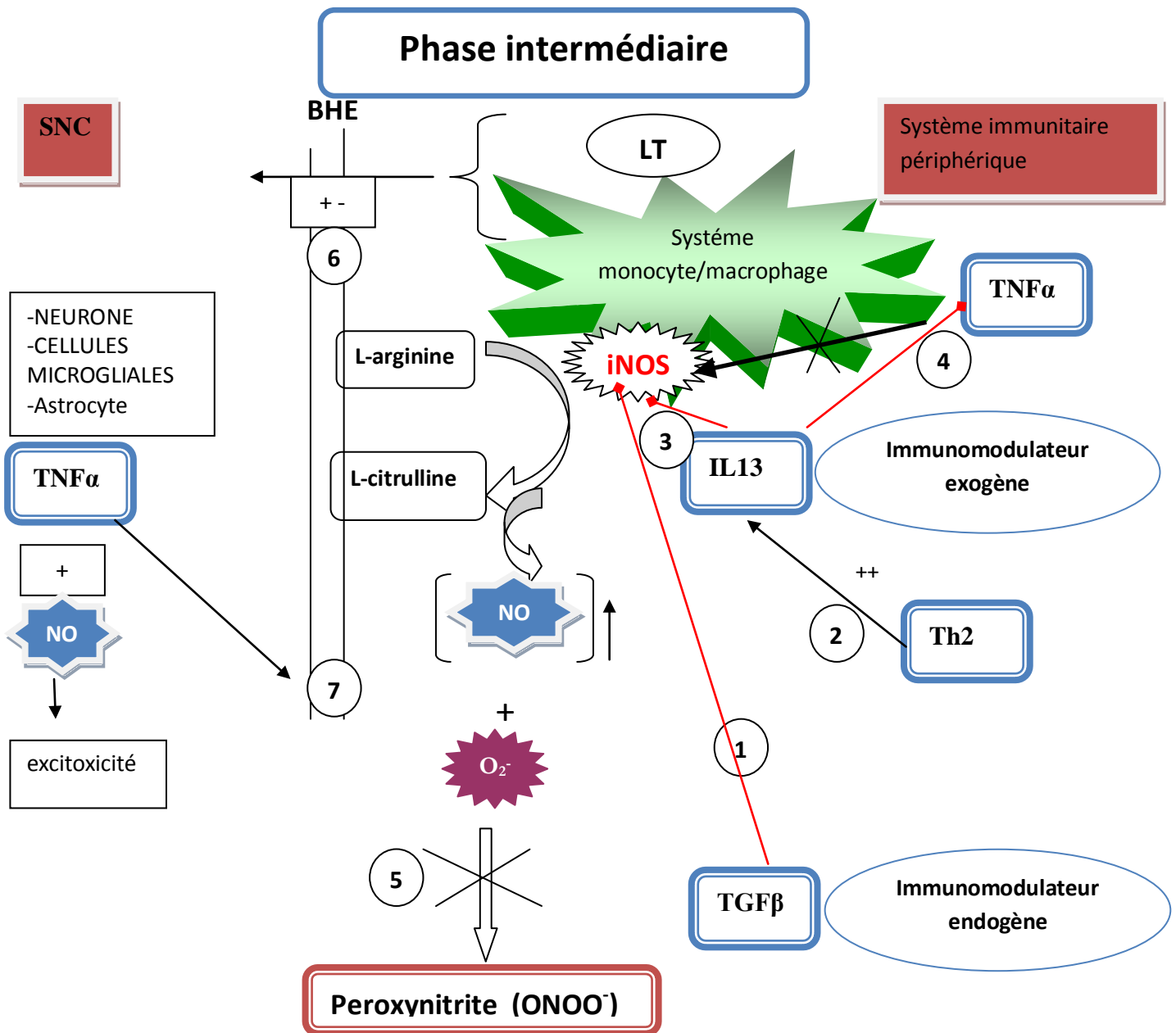
Au regard global de nos résultats, l'implication du système immunitaire est primordiale dans la pathogenèse et l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

La production des cytokines de la voie Th1 mais également de la voie Th17 agirait non seulement dans l'installation de la pathologie mais également dans son évolution. Leurs actions se situent *in situ* à deux niveaux cellulaires différents sur le système monocyte/macrophage infiltrant le système nerveux mais également sur les cellules support du système nerveux central (cellules gliales, astrocytes, et les cellules exprimant les récepteurs cytokiniques.....). Il est clair que le NO produit est sous la dépendance de l'IFNγ, du TNFα et de l'IL17. La question reste épineuse quand à l'identification du ou des agents signaux engagés dans les dysfonctionnements immunitaires et menant à la surexpression des cytokines Th1 (l'IFNγ et du TNF-α).

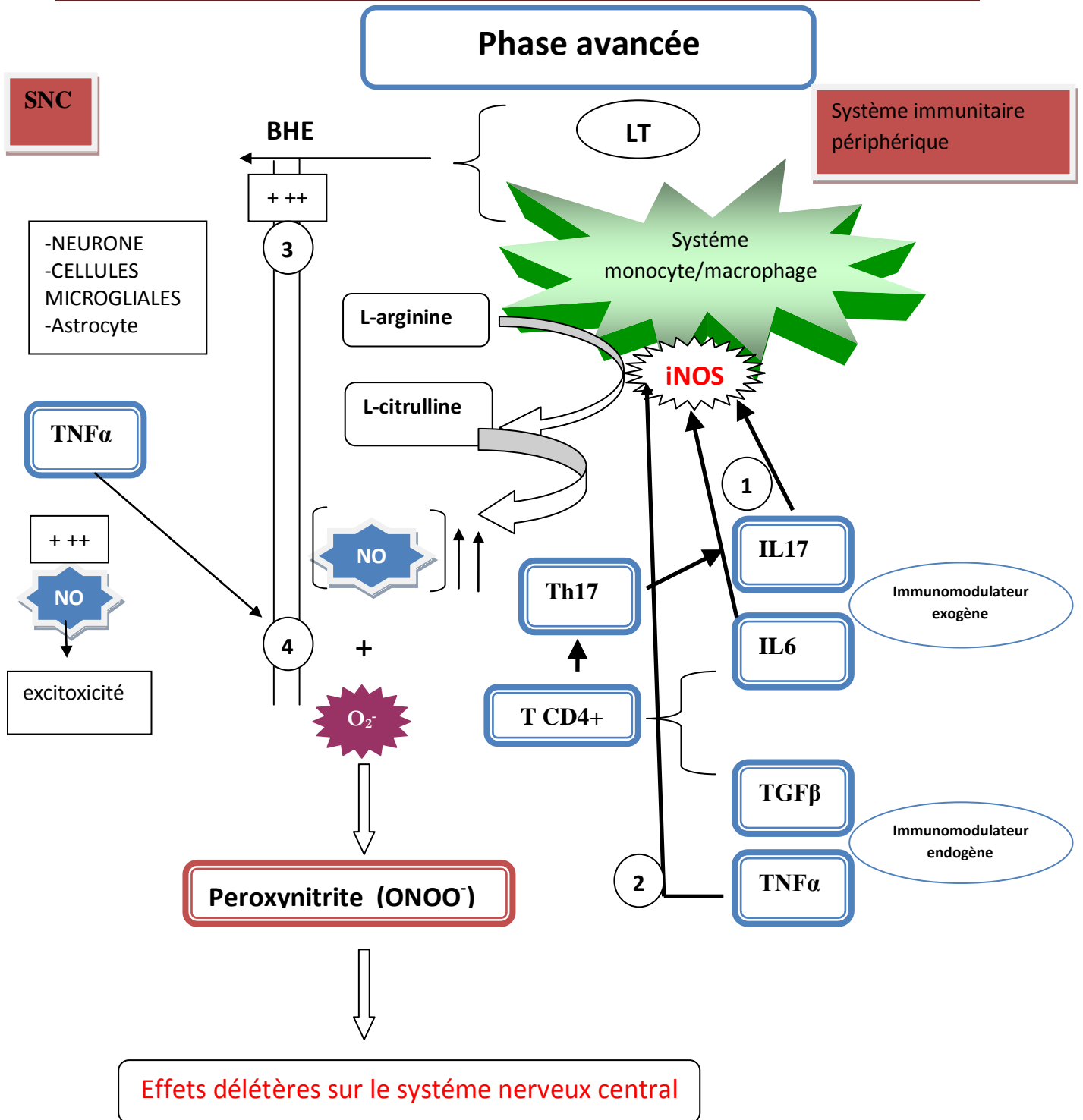


—◆— Inhibition —→— Activation

- 1 : Activation de l'iNOS dans le système monocyte /macrophage.
- 2 : Mécanisme de production du NO.
- 3 : Mécanisme de production du peroxy-nitrite.
- 4 : Action Inhibitrice de la vitamine E sur le NADPH oxydase.
- 5 : Implication du nNOS dans l'augmentation de la concentration du NO.
- 6 : infiltration cellulaire dans le SNC.
- 7 : augmentation de l'infiltration cellulaire.



- 1 : Activation de la voie Th2 par le TGF β .
- 2 : Production de l'IL13 par les Th2.
- 3 : Action Inhibitrice de l'iNOS par l'IL13.
- 4 : Inhibition de TNF α par l'IL13.
- 5 : Inhibition du mécanisme de production du ONOO $^-$.
- 6 : Diminution de l'infiltration cellulaire.
- 7 : Augmentation de la perméabilité de la BHE sous l'action de TNF α



- 1 : Induction de l'iNOS par l'IL6 et l'IL17.
- 2 : Induction de l'iNOS par TNFα
- 3 : Augmentation de l'infiltration cellulaire.
- 4 : Augmentation de la perméabilité de la BHE.

Conclusion

Conclusion :

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui apparaît tardivement, insidieusement, mais progressivement et irréversiblement. Elle va détruire petit à petit les neurones de l'hippocampe qui gèrent la mémoire épisodique, puis ceux qui sont impliqués dans toutes les autres fonctions cognitives.

Nos résultats suggèrent que l'inflammation périphérique est une composante active au niveau cérébral se caractérisant notamment par une augmentation de l'expression accrue de d'une cytokine marqueur de la voie Th1 (IFN- γ), dont l'action est potentialisée par le TNF- α en particulier dans la phase précoce de la maladie. La phase intermédiaire est caractérisée par un état pseudo stationnaire est caractérisée par une induction significative de l'IL13. La phase avancée est particulièrement distinguée par l'IL6 et une cytokine de la voie Th17 (IL17). Nous avons constaté, notamment, une association entre Le processus inflammatoire et le déficit cholinergique responsable des troubles de mémoire.

Les systèmes de régulation cytokinique sont en étroite relation avec la production substantielle du NO particulièrement à la phase initiale et finale. Ces mécanismes seraient engagés dans les effets délétères tissulaires et cellulaires occasionnés dans le système nerveux central caractérisant cette pathologie. Il apparaît selon nos résultats que la production du NO, sous l'action de NOS inductible (NOS2) par les cytokines Th1 est hautement impliquée dans les mécanismes de pathogenèse et l'évolution de la maladie d'Alzheimer. L'action de NOS constitutive(NOS1) serait également associée dans le mécanisme global.

A travers ces résultats préliminaires, le monoxyde d'azote, l'IFN- γ et l'activité butyrylcholinestérase apparaissent des candidats de choix comme bio marqueur dans le suivi et la surveillance des patients.

Ce travail pourrait ainsi contribuer dans le diagnostic et le suivi de l'évolution de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à l'identification de cibles moléculaires potentielles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer la qualité de vie des patients.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:**A**

Abbas, N., Bednar, I., Mix, E., Marie, S., Paterson, D., Ljungberg, A., Morris, C., Winblad, B., Nordberg, A., Zhu, J., (2002). Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APPSWE transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* 126, 50–57.

Abe, K., Yarovinsky, F.O., Murakami, T., Shakhov, A.N., Tumanov, A.V., Ito, D., Drutskaya, L.N., Pfeffer, K., Kuprash, D.V., Komschlies, K.L. & Nedospasov, S.A. (2003). Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. *Blood.* **101**(4): 1477-1483.

Abu-Soud, H.M., Yoho, LL., Stuehr, DJ. (1994). Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism – activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem*; 269: 32047-50.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.

Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells." *Nat Immunol* 3(6): 549-57.

Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G., Peschle, C. (1992). Production of hemolymphopoietic cytokines Il-6, Il-8, colony-stimulating factors by normal human

astrocytes in response to Il-1-beta and tumor-necrosis-factor-alpha. *J. Immunol.* 149, 2358–2366.

Amri, M., Ait Aissa, S., Belguendouz, H., Mezioug, D., Touil-Boukoffa, C. (2007), *In vitro* Antihydatic Action of IFN- γ Is Dependent on the Nitric Oxide Pathway. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **27**: 781-787.

Appleyard, M. E., Smith, A. D., Berman, P., Wilcock, G. K., Esiri M. M., Neary, D., Bowen D. M. (1987). Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type, vol. 110, n°5, pp. 1309-1322.

Arkin M. A., Randal M., Delano W. L., Hyde J., Luong T. N., Oslob J. D., Raphael D. R., Taylor, L., Wang J., Wells J. A., Mcdowell R. S., Wells J. A., Braisted A.C. (2003). Binding of Small Molecules to an Adaptive Protein-Protein Interface. *Proc.Nat.Acad. Sci.USA*, 100, pp. 1603.

Assadullah K., Sterry W., Volk H. D. (2003). Interleukin-10 Therapy - Review of a New Approach. *Pharmacological Review*, 55, 2, pp. 241-269.

Auld, D S., KAR S., Quirion, R. (1998). β -amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link ? Elsevier Trends Journals, Vol. 21, no. 1, pp. 43-49.

B

Barnes, P.J. (1995). Nitric oxid and Asthma. *Res. Immunol.*, 146: 698-702.

Belguendouz, H., Messaoudene, D., Hartani, D., Chachoua, L., Ahmedi, M.L., Lahmar-Belguendouz, K., Lahlou-Boukoffa, O.S & Touil- Boukoffa, C. (2008). Effet de la corticothérapie sur la production des interleukins 8, 12 et du monoxide d'azote au cours des uvéites Behçet et idiopathiques. *JFO.* **31**(4):387-395.

Bermejo-Pareja, F., Benito-León, J., Vega, S., Medrano, MJ., Román, GC.

- (2008). Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J. Neurol. Sci.* **264** (1–2): 63–72.
- Besedovsky, H. O.** and del Rey, A. (1992). Immune neuroendocrine circuits: Integrative role of cytokines. *Front Neuroendocrinol* **13**(1): 61-94.
- Bettelli, E.**, Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090): 235-8.
- Beyreuther, K.**, Masters, CL. (1997). The ins and outs of amyloid- β . *Nature*; 389 : 677-678.
- Bezzi, P.**, Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., Vescovi, A., Bagetta, G., Kollias, G., Meldolesi, J., Volterra, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4, 702–710.
- Boje, K.M.**, Arora, P.K. (1992). Microglial-produced nitric-oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell-death. *Brain Res.* 587, 250–256.
- Botchkina, G.I.**, Meistrell III, M.E., Botchkina, I.L., Tracey, K.J. (1997). Expression of TNF and TNF receptors p55 and p75 in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 3, 765–781.
- Boucher, J.L.**, Custot, J., Vadon, S., et al. (1994). N-omega-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun*; 203 : 1614-21.
- Boulanger, M. J.**, Chow, D. C., Brevnova, E. E., Garcia, K. C. (2003). Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 Alpha-Receptor/Gp130 Complex. *Science*, 300, p. 2101
- Braak, H.**, de Vos, R.A., Jansen, E.N., Bratzke, H., Braak, E. (1998). Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res.* 117:267-85.
- Breder, C. D.**, Dinarello, C. A. and Saper, C. B. (1988). Interleukin-1 Immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science* 240(4850): 321-4.
- Breder, C.D.**, Tsujimoto, M., Terano, Y., Scott, D.W., Saper, C.B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 337, 543–567.
- Burger, D.** and Dayer, J. M. (1995). Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. *Neurology* **45**: S39-43.

C

- Cachia, O.**, Leger, C.L. (1998). Effet inhibiteur de la vitamine E sur la production de l'anion superoxyde par le monocyte humain. Rôle des lipoprotéines de basse densité (LDL). Mise en évidence d'un mécanisme d'action à médiation cellulaire. Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat 1998 [Note(s) : [169 p.]] (bibl.: 281 ref (N°: 98 AIX3 0031).
- Carswell, E.A.**, Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**: 3666-70.
- Chang, C.I.**, Liao, J.C., Kuo, L. (1998). Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol*; 43: H342-8.
- Chang, J. T.**, Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A., Vinup, K. E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J. S., Russell, S. M., Weninger, W., Reiner, S. L., (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315(5819): 1687-91.
- Colasanti, M.**, Persichini, T., Venturini, G., Mazzone, V., Malatesta, M., Toscano, S., Musci, G. (2000). NO GROUP at the Department of Biology.
- Combarnoux, Y.** (1996). Biochimie des communications cellulaires. *EM Inter-Lavoisier Tec&Doc.*
- Cope, A.R.** (1996). Regulation of autoimmunity by pro-inflammatory

cytokines, *Curr Opin Immunol.* **10**: 696-676.

Couderc, R. (2000). A la recherche de marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer. *Annales de Biologie Clinique.* Volume 58, Numéro 5, 581-93, Revues générales.

Couraud, P. O. (2002). La barrière hématoencéphalique. Médecine thérapeutique. Volume 8, Numéro 5, 285-92, Biologie.

Crépel, F. & Lemaire, G. (1995). Le monoxyde d'azote. *Med/Sc*; **11**: 1639-1642.

Cua, DJ., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, CA., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, M., Lira, S.A., Gorman D, Kastelein, RA., Sedgwick, JD. 2003. Interleukin- 23 rather than interleukin- 12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*; 421:744-8.

D

Davis, S., Laroche, S., (2003). What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? *Mol. Neurobiol.* 27, 249–276.

Dawson T.M., Snyder S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci*; 14: 5147-5159.

Del Rey, A., Besedovsky, H. O., Sorkin, E., da Prada, M. and Arrenbrecht, S. (1981). Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. *Cell Immunol* **63**(2): 329-34.

Delacourte, A. (2000) Histoire naturelle et moléculaire de la maladie d'Alzheimer Annales de Biologie Clinique. Volume 58, Numéro 3, 350-5, Dossier : 9e réunion du comité d'interface Inserm-SFBC.

Delacourte, A. (2005) Modélisation de la maladie d'Alzheimer : un parcours semé d'embûches. *Psychol NeuroPsychiatr Vieil*; 3 (4): 261-70.

Del Rey, A., Besedovsky, H. O., Sorkin, E., da Prada, M. and Arrenbrecht, S. (1981). Immunoregulation mediated by the

sympathetic nervous system, II. *Cell Immunol* **63**(2):329-34.

Denis, M. (1994). Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J. Leukoc. Biol.*, **55**: 682–684.

Descamps-Latsha, B., Witko-Sarsat, V. (1996). Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Rev. fr. Allergol.*, **36** (3):310-314.

de Vries, HE et al., 1996. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*; 64: 37-43.

Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 6(4): 329-33.

Drapier, J.C., Wietzerbin, J. & Hibbs, Jr.J.B. (1988a). Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependant cytotoxic effector mechanism in murine macrophage effector cells. *Eur. J. Immunol.*, **18**: 1587-1592.

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

Du, Y.S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S.F., Roher, A., Tourtellotte, W.W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G.C., Stern, D., Schmidt, A.M. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5296–5301.

Dugas, B., Debré, P. & Monocada, S., (1995). Nitric oxide, a vital poison inside the immune response and inflammatory network, *Res. Immunol.*, 146: 664-70.

Durante, W., Johnson, F.K., Johnson, R.A. (2007). Arginase: a critical regulator of Nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 34(9): 906–911.

E

Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. and Vizi, E. S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two

supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52**(4): 595-638.

Ellman, G L., Courtney, K D., Andres, V., Featherstone, R M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**:88-95.,

Eng, L. F. and Shiurba, R. A. (1988). Glial fibrillary acidic protein: a review of structure, function and clinical applications. neuronal and glial proteins. New York, Academic Press: pp. 339-359.

Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H. (2001). Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech* **52**(1): 112-29.

F

Falcone, M.P., Servetrick, N. (1999). Cytokines that regulate autoimmune responses. *Cust. Opin. Immunol.* **11**:670-676.

Ferreira, PC., Piai Kde, A., Takayanagui, AM., Segura-Muñoz, SI. (2008). Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease dans Revista Latino-Americana de Enfermagem, vol. 16, p. 151-7 (ISSN 0104-1169)

Fetler, L., Amigorena, S. (2005). Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* **309**, 392-393.

Forette, F. (2001). Prévention du vieillissement et de la maladie d'Alzheimer. Fondation Nationale de Gérontologie Gérontologie et société. N° 97. ISSN 0151-0193. P 109 à 114

Frank, M., La Ferla, FM. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 862-872.

Fukuto, J.M., Chaudhuri, G. (1995). Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase : potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; **35**: 165-94.

Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M.I., Cabral, A.R. (2007). Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmunity Reviews*; **6**:169-175.

G

Gaffen, S.L (2008). An overview of IL-17 function and signaling, *Cytokine*; **43**: 402-407.

Galanaud, P., Emilie, D. (1997). Cytokines et médecine interne, Ed. Masson. Paris.

Garthwaite, J., Boulton, C.L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*; **57**: 683-706.

Garthwaite, J., Charles S.L., Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*; **336**: 385-388.

Gay, J., Kokkotou, E., O'Brien, M., Pothoulakis, C., Karalis, KP. 2006. Interleukin-6 genetic ablation protects from trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. Putative effect of antiinflammatory cytokines. *Neuroimmunomodulation*; **13**:114-21

Genetet, N. (1997). Immunité et transplantation. Médicales internationales ed. Biologie.. médicale. Immunologie 3e édition: 411-25.

Goldsby, R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. (2003). Les Cytokines. In: Immunologie: le Cours de Janis Kuby. Editions Dunod, Paris. ISBN: 2-10-007396-6.

Gong, C., Qin, Z., Betz, A.L., Liu, X.H., Yang, G.Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* **801**, 1-8.

Gorren, A.C.F., Marchal, S., Sørli, M., Andersson, K. K., Lange, R., Meyer, B. (2006). High-pressure studies of the reaction mechanism of nitric-oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta*; **1764** (3):578-585.

Grammas, P., Ovase, R. (2001). Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **22**, 837-842.

Griffin, W.S., Sheng, J.G., Royston, M.C., Gentleman, S.M., McKenzie, J.E., Graham, D.I., Roberts, G.W., Mrak, R.E. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine

cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* 8:65–72.

Griffin, W.S.T. (2000). IL-1 and the cytokine cycle in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 74, S52.

Groves, J.T., Wang, C.C.-Y. (2000). Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, 4:687-695.

Guenane, H., Hartani, D., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.S., Mazari, F et Touil-Boukoffa, C. (2006). Production of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in Behçet's uveitis and idiopathic uveitis, *J Fr Ophthalmol.* **29(2)**:146-52.

Guériot-Milandre, C., Semprez, C., Poncet, M. (1997). Aspects clinique et diagnostic de la maladie d'Alzheimer. *Médecine thérapeutique*; 3 : 343-52.

Guzik, T.J., Korb, R & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiological Pharmacology*; 54 : 469–487.

H

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* 6(11): 1123-32.

Hartani, D., Belguendouz, H., Guenane, H., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.S., & Touil-Boukoffa, C. (2006). Effet des nitrites et nitrates sur les rétines de Boeuf en culture. *JFO*, **29(1)**:32-36.

Hellermann, GR., Solomonson, LP. (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*; 272: 12030-4.

Heneka, M.T., Loschmann, P.A., Gleichmann, M., Weller, M., Schulz, J.B., Wullner, U., Klockgether, T. (1998). Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 71, 88–94.

Heneka, M.T., Feinstein, D.L. (2001). Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J. Neuroimmunol.* 114, 8–18.

Heneka, M.T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D.L., Klockgether, T., (2001). Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 906–916.

Holmes, C., Ballard, C., Lehmann, D., David Smith, A., Beaumont, H., Day, I N., Nadeem Khan, M., Lovestone, S., McCulley, M., Morris, C M., Munoz, D G., O'Brien, K., Russ, C., Del Ser, T., Warden, D. (2005). Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: effect of butyrylcholinesterase K gene variation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 76:640–643.

Hoozemans, J., Veerhuis, R., Rozemuller, A., Arendt, T., Eikelenboom, P. (2004). Neuronal immunoreactivity for COX-2 and phosphorylation of prb precede P38 MAPK activation and neurofibrillary changes in ad temporal cortex. *Neurobiol. Aging* 25, S416.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**(5107): 547-9.

Hunt, N.C.A., Goldin, R.D. (1992). Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *Hepatology*: 146-150.

I

Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., et al. (1996). Analysis of heterogeneous beta A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay. *J Biol Chem*; 271: 22908-14.

Ivanov, II., McKenzie, B. S., Zhou, L., Todorok, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua D. J., Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR gamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* 126(6): 1121-33.

J

James, L.S. (1995). Role of Nitric Oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews.*, **59** (4): 533-547.

Johnson, G.V.W., Seubert, P., Cox, T.M., Motter, R., Brown, J.P., Galasko, D.(1997) The Tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments. *J Neurochem*; **68**: 430-3.

K

Kennard, M.L., Feldman, H., Yamada, T., Jefferies, W.A. (1996). Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nature Med*; **2**: 1230-5.

Kenney, E.F., O'Neill, L.A.J. (2008). Signalling adaptators used by Toll-like receptor: An update. *Cytokine*; **43**: 342-394.

Kilbourn, R.G. & Bellone, I. (1990). Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **82**: 772-776.

Kilbourn, R.G., Griffith, O.W. (1992). Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst*; **84**(11):827-831.

Kim, S.U., Nagai, A., Nakagawa, E., Hatori, K., Choi, H.B., Lee, M.A., (2001). Beta-amyloid up-regulates expression of cytokines and chemokines in human microglia and human microglia cell line. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 546.

Kitamura, K., Nakamoto, Y., Kaneko, S., Mukaida, N. 2004. Pivotal roles of interleukin-6 in transmural inflammation in murine T cell transfer colitis. *J Leuk Biol.* **76**:1111-7.

Koistinaho, M., Lin, S.Z., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R., Paul, S.M., (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat. Med.* **10**, 719-726.

Kolb, J.P. (2001). Rôle pro- et anti-apoptotique du monoxyde d'azote, NO. *Life Sciences*; **324**: 413-424.

Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C. T., Robertson, D. A. F., Westwick, J. (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T-lymphocyte derived cytokines. *Gut* **43**:56-63.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune

encephalomyelitis. *J Immunol*; **177**:566-73

Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., et al. (2003). IFN-lambda mediates antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*; **4**:69-77.

Koyama, S., Ishii, K.J., Coban, C., Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*; **43**:336-341.

Kuhn, R., K. Rajewsky and W. Muller (1991). "Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice." *Science* **254**(5032): 707-10.

L

Lahmar-Belguendouz. K., Belguendouz. H., Hartani. D., Lahlou-Boukoffa. O.S., Djeraba. Z., Lammali. A., Touil-Boukoffa. C. (2009) Effets délétères des dérivés stables du monoxyde d'azote, marqueur inflammatoire des uvéites, sur les différentes tuniques de l'œil de bœuf en culture. *Journal Français d'ophtalmologie.* Vol 32 - N°4 -P. e1-307. Elsevier Masson SAS.

Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L.O., Rowe, B.A., Wagner, S.L. (1995). Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nature Med*; **1** : 829-32.

Laurent, B., Thomas Antérion, C. (1997). Le traitement de la maladie d'Alzheimer Médecine thérapeutique. Volume 10, Numéro 1, 14-21, Janvier-Février, Revue

- Lee, S.C.**, Zhao, M.L., Hirano, A., Dickson, D.W. (1999). Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1163–1169.
- Lee, J.**, Horuk, R., Ricc, G. C. Bennett, G. L., Camerato, T. & Wood, W. T. (1992). Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.*, 267: 16283-16287.
- Le Gros, G.**, S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman and W. E. Paul (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172(3): 921-9.
- Le Naour, R.**, Gangloff, S., Guenounou, M. (2000). Le réseau des cytokines en situation normale et pathologique. *Revue Française des Laboratoires* décembre, No 328.
- Liew, F.Y.**, Li, Y., Moss, D., Parkinson, C., Rogers, M.V. Moncada, S. (1991). Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 21: 3009-3014.
- Liu, B.**, **Hong, J.S.** (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1–7.
- Loannou, Y.**, Isanberg, D.A. (2000). Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum.* 43 (7): 1431-1442.
- Loetscher, P.** et Clark-Lewis, I. (2001). Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 69: 881–884.
- Lowenstein, C.J.**, Padalko, E. (2004). iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of Cell Science* 117:2865-2867.
- M**
- Mangan, P. R.**, Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441(7090): 231-4.
- Marletta, M.A.** (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.*, 14: 488-492.
- Mattson, MP.** (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease *Nature* 430, 631-639
- Mattson, MP.** (1997). Mother's legacy: mitochondrial DNA mutations and Alzheimer's disease. *TINS*; 20: 373-375.
- McGeer, Edith G** and **McGeer, Patrick L.** (1998). The importance of inflammatory mechanisms in alzheimer disease. doi:10.1016/S0531-5565(98)00013-8 . Elsevier Science Inc.
- Mc Innes, I.B.**, Leung, B.P., Field, M., Wei, X.Q., Huang, F.P., Sturrock, R.D., Kinninmonth, A., Weidner, J., Mumford, R. & Liew, F.Y. (1996). Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.* 184:1519.
- Mc Khann, GM.**, Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, EM. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*; 34: 939-44.
- McRae, A.**, Ling, EA., Wigander, A., Dahlstrom, A. (1996) Microglial cerebrospinal fluid antibodies - Significance for Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol*; 28: 89-95.
- Meucci, G.**, Rossi, J., Bettini, R et al. (1993). Laser nephelometric evaluation of albumin, IgG and beta2-macroglobulin: applications to the study of alterations of the blood-brain barrier. *J Neurol Sci*; 118: 73-8.
- Michael, T.**, Heneka, M and Kerry O'Banion. (2007). Inflammatory processes

in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* 184; 69 – 91.

Michel, T., Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*; 100: 2146-52.

Milicevic, M., Krzesinski J.M. (2008) Hypertension and the brain. *Revue Médicale de Liège*. p269-279.ISSN 0370-629X. Belgique.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. & Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, **38**:1709-1715.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142.

Moncada, S. (1992). The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta. Physiol. Scand.*, 145: 201-227.

Moncada, S et Higgs, A. (1995). Molecular mechanisms and strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*, 9: 1319-1330.

Moncada, S., Higgs, E.A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Hand Exp Pharmacol*; **176**: 213–254.

Moore, A.H., Olschowka, J.A., Williams, J.P., Okunieff, P., O'Banion, M.K., (2005). Regulation of prostaglandin E-2 synthesis after brain irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62, 267–272.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**(7): 2348-57.

Motter, R., Vigopelfrey, C., Kholodenko, D., *et al.* (1995). Reduction of beta-amyloid peptide (42), in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; 38: 643-8.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317(5835): 256-60.

Murphy, P.G., Borthwick, L.S., Johnston, R.S., Kuchel, G., Richardson, P.M. (1999). Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J. Neurosci.* 19, 3791–3800.

N

Nadeau, S et Rivest, S. (2000). Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor κ B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 20: 3456-68.

Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.Y. (2003). Astrocytes accumulate Abeta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* 971, 197–209.

Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2007). Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*

Natarajan, C., Bright, J.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun.* 3, 59–70.

Nathan, C. & Hibbs JB. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**: 65-70.

Nathan, C.F., Xie, Q.W. (1994). Nitric oxide synthases roles. Tolls, and controls, *Cell*; **78**: 915-918.

Noben-Trauth, N., Hu-Li, J., Paul, W. E. (2000). Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol* 165(7): 3620-5.

Nüssler, A.K., Renia, L., Pasquetto, V., Miltgen, F., Matile, H. & Mazier, D. (1993) *In vivo* induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 882-887.

O

Ohshima, S., Saeki, Y., Mima, T., Sasai, M., Nishioka, K., Nomura, S., Kopf, M., Katada, Y., Tanaka, T., Suemura, M., Kishimoto, T. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8222-6

Orgogozo, JM., Gilman, G., Dartigues, JF., Laurent, B., Puel, M., Kirby, LC., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, BF., Boada, M., Frank, A., Hock, C. (2003). Subacute meningo-encephalitis in a subset of patients with AD after A-beta-42 immunization. *Neurology*, in press.

Orzyłowska, O., Oderfeld-Nowak, B., Zaremba, M., Januszewski, S., Mossakowski, M., (1999). Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci. Lett.* 263, 72–76.

Ouyang, W., S. H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, W. C. Sha and K. M. Murphy (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9(5): 745-55.

P

Pardoux, C., Chouaib, S. (2000). Les cytokines: modulateurs physiologiques de l'immunité et outils de l'immuno-intervention. *Revue Française des laboratoires*; 328: 31-36.

Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6(11): 1133-41.

Pasquier, F., Leys, D. (1997). Why are stroke patients prone to develop dementia ? *J Neurol* ; 244 : 135-42.

Pasquier, F. (1995). Early diagnosis of dementia: neuropsychology. *J Neurol* (sous presse). Mcgeer PL, Mcgeer EG. The inflammatory response system of brain:

implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*; 21: 195-218.

Paul-Eugene-Dugas, N., Ouaz, F., Mossalayi, D. M., Follezou, J.-Y., Debre, P., Kolb, J.-P., Dugas, B. (1995). Rôle du CD23 dans la production de monoxyde d'azote par les monocytes humains = Functional role of the CD23 molecule in the generation of nitric oxide by human monocytes MS. *Médecine sciences* ISSN0767974, vol. 11, n°12, pp. 1653-1659.

Pavlov, V.A., Tracey, K.J., (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav. Immun.* 19, 493–499.

Petros, A., Lamb, G., Leone, A., Moncada, S., Benett, D., Vallance, P. (1994) Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 28(1): 34-39.

Piccirillo, C.A. (2008). Regulatory T cells in health and disease, *Cytokine*; 43: 395-401.

Pirot, S. (2001). Rôle du monoxyde d'azote dans l'addiction Neuropsychiatrie : Tendances et Débats; 15 : 47-51

Plata-Salaman, C. R., Oomura, Y., Kai, Y. (1988). Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 448(1): 106-14.

Plata-Salaman, C. R. (1991). Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 15(2): 185-215.

Pouly, S., Becher, B., Blain, M., Antel, JP. (2000). Interferon-γ modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 280-6.

R

Reiner, S. L., (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129(1): 33-6.

Reisberg, B., Ferris, SH., De Leon, MJ., Crook, T. The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 1982 ; 139 : 1136-9.

Richartz-Salzbunger Elke and Koehler Niklas. (2009). Decline of Immune Responsiveness: A Pathogenetic Factor in Alzheimer's Disease? T. Fulop et al. (eds.), *Handbook on Immunosenescence*.

Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood*, **90** (3): 909-928.

Rozemuller, J.M., Eikelenboom, P., Pals, S.T., Stam, F.C. (1989a). Microglial cells around amyloid plaques in Alzheimer's disease express leukocyte adhesion molecules of the Lfa-1 family. *Neurosci. Lett.* 101, 288-292.

S

Saini, R., Patel, S., Saluja, R., Sahasrabudhe, A.A., Singh, M.P., Habib, S., Bajpai, V. K., Dikshit, M. (2006). Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J. Leukoc. Biol.* 79: 519-528.

Scheltens, P., Vermersch, P., Leys, D. (1993). Heterogeneity of Alzheimer's disease. *Rev Neurol*; 149: 14-25.

Schenk, Leuba et Büla. (2004). Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer. Editions De Boeck Université, ISBN : 2-8041-4595-6

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med*; 2: 864-70.

Schmidt, H.H.H.W., Walter, U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81:741-66.

Schroder, H., Campbell, D.E.S. (1972). Absorption, metabolism, and excretion of salicylazosulfapyridine in man. *Clin Pharmacol Ther*; 13: 539-551.

Sennequier N & Vadon Le Goff S (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/sciences* 14: 1185-95.

Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P., Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49, 489-502.

Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., Perry, G. (1997). Wide spread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17, 2653-2657.

Southwick, P.C., Yamagata, SK., Echols, CL., et al. (1996). Assessment of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 66 : 259-65.

Stamler, J S., Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Rev.*, **81** (1): 209-237.,

Stetson, B.D., Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense *Immunity*; **25**: 373-81.

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

Suzuki, S., Tanaka, K., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., Fukuuchi, Y. (1999). Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 262, 117-120.

Szczepanik, A.M., Rampe, D., Ringheim, G.E. (2001b). Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.* 77, 304-317.

Szelenyi, J. (2001). Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* **54** (4):329-38.

T

Tan, J., Town, T., Paris, D., Mori, T., Suo, Z., Crawford, F., Mattson, M.P., Flavell, R.A., Mullan, M., (1999). Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286, 2352-2355.

Tchelingirian, J.L., Vignais, L., Jacque, C. (1994). TNF alpha gene expression is

induced in neurones after a hippocampal lesion. *Neuroreport* 5, 585–588.

Thery, C., Stanley, E.R., Mallat, M., (1992). Interleukin-1 and tumor-necrosisfactor- alpha stimulate the production of colony-stimulating factor-I by murine astrocytes. *J. Neurochem.* 59, 1183–1186.

Thiemermann, C. (1995). Inhibition des synthèses de monoxyde d'azote dans la défaillance circulatoire : effet bénéfique ou délétère ? *Med Sci* ; 11 : 1643-51.

Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sanceau, J., Hamrioui, B., Wietzerbin, J. (1998). Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: Relationship between nitrite production and interferon- γ levels. *Biochimie* 80: 739-744.

Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., et Misra, M. K. (2004). Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of biomedicine and biotechnology* . 2004: 4(2004) 227- 234.

U

Uehara, A., Okumura, T., Kitamori, S., Shibata, Y., Harada, K., Okamura, K., Takasugi, Y. and Namiki, M. (1992). Gastric antisecretory and antiulcer actions Of interleukin-1. Evidence for the presence of an "immune-brain-gut" axis. *J Clin Gastroenterol* 14 (Suppl 1): S149-55.

Uzby I.T., Oglesby M.W. (2001). Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav Rev*; 25: 43-52.

V

Vandermeeren, M., Mercken, M., Vanmechelen, E., *et al.* (1993). Detection of Tau proteins in normal and alzheimers disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich Enzyme-Linked immunosorbent assay. *J Neurochem*; 61: 1828-34.

Vannier, E., Malefyt, R., Salazar-Montes, A., Vries, J.E., Dinarello, C.A. (1996). Interleukin-13 (IL-13) Induces IL-1 Receptor Antagonist Gene Expression and Protein Synthesis in Peripheral Blood

Mononuclear Cells: Inhibition by an IL-4 Mutant Protein. *Blood*; 87: 3307-3315.

Vergely, C., Rochette, L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique : Nitric oxide synthases and peripheral cardiovascular system. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* ; 51 :109-116.

Vodovotz, Y., Lucia, M.S., Flanders, K.C., Chesler, L., Xie, Q.W., Smith, T.W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A.B., Lippa, C.F., Sporn, M.B., (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184, 1425–1433.

W

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. (2002a). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

Walsh, D.M., Selkoe, D.J., (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181–193.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., Murphy, K.M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*; 24: 677–688.

Weaver, C. T., R. D. Hatton, P. R. Mangan and L. E. Harrington (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-52.

Welch, WJ., Gambetti, P. (1998). Chaperoning brain diseases. *Nature*; 392: 23-24.

Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Wachter, H. (1990). Tetrahydrobiopterin-dependent Formation of Nitrite and Nitrate in Murine Fibroblasts. *J. Exp. Med.* 172 :1599-1607.

Williams K.C., Hickey, W.F. (1995). Traffic of hematogenous cells through the

central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 202 : 221-24.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J., (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457.

Y

Yan, S.D., Yan, S.F., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Kuppusamy, P., Smith, M.A., Perry, G., Godman, G.C., Nawroth, P., et al. (1995). Nonenzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat. Med.* 1, 693–699.

Yan SD et al. (1997). An intracellular protein that binds amyloid-b peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*; 389: 689-695

Yan, S.D., Stern, D., Kane, M.D., Kuo, Y.M., Lampert, H.C., Roher, A.E., (1998). RAGE-A beta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Restor. Neurol. Neurosci.* 12, 167–173.

Z

Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Wlodawer, A. (1996). Crystal Structure of Human Interleukin-10 at 1.6 Å Resolution and a Model of a Complex with its Soluble Receptor Protein *Sci.* 5pp. 1955

Zékri, O. (1997). The ins and outs of amyloid-b. *Nature* 1997; 389: 677-678

Zhu, Y., Roth-Eichhorn, S., Braun, N., Culmsee, C., Rami, A. and Krieglstein, J. (2000). The expression of transforming growth factor-beta1 (*TGF-beta1*) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient focal brain ischemia in the rat. *Brain Res* 866(1-2): 286-98.

Zouambia, M., Fischer, DF., Hobo, B., De Vos, RA., Hol, EM., Varndell, IM., Sheppard, PW., Van Leeuwen, FW. Proteasome subunit proteins and neuropathology in tauopathies and synucleinopathies: Consequences for

proteomic analyses. PMID: 18283660 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Annexe

Annexe 01 :

Centre Hospitalier universitaire de Bab El Oued
Service de Neurologie
Professeur A. Masmoudi

Attestation de consentement éclairé

Je, soussigné, après les explications qui m'ont été fournies par le professeur Abada-Bendib, travaillant dans le service de Neurologie de C.H.U de Bab El Oued, consentir pleinement à participer aux recherches immunologiques qui seront effectuées sur un échantillon :

- De sang
- De LCR

Ces recherches ne seront menées que dans un but scientifique après accord du professeur Masmoudi ou bien d'une autre personne qu'il aura dument autorisée.

Signature

Hopital central de l'armée d'Ain Naadja
Service de Neurologie
Professeur F. Messaoudi

Attestation de consentement éclairé

Je, soussigné, après les explications qui m'ont été fournies par le professeur Messaoudi, chef du service de Neurologie de HCA, consentir pleinement à participer aux recherches immunologiques qui seront effectuées sur un échantillon :

- De sang
- De LCR

Ces recherches ne seront menées que dans un but scientifique après accord du professeur Messaoudi ou bien d'une autre personne qu'il aura dument autorisée.

Signature

Annexe 02 :**Méthode de calcul de l'activité Butyrylcholinérase**

Pour le dosage de Butyrylcholinérase, nous procédons d'abord par le dosage de l'activité Acetylcholinérase.

- 1- Pour le dosage de l'Acetylcholinérase nous avons utilisé un inhibiteur spécifique à la butyrylcholinérase (iso OMPA).
Pour le calcul en utilise l'équation suivante :

$$U01 = \frac{\Delta DO}{\varepsilon} \times \frac{1400}{100} \times \frac{1}{[P]} \times 60$$

U01 : l'activité Acetylcholinérase (mole/g/h)

ΔDO : DO2 – DO1

[P]: Concentration protéique (g/l)

ε : Coefficient d'extinction molaire de 2-nitrobenzoate-mercaptothiocholine ; **1.36x10⁴** (mole⁻¹. L .cm⁻¹).

- 2- Pour le dosage de Butyrylcholinérase en mesure d'abord l'activité cholinérase totale. Pour le calcul en utilise l'équation suivante:

$$Ut = \frac{\Delta DO}{\varepsilon} \times \frac{900}{100} \times \frac{1}{[P]}$$

Ut : Activité cholinérase totale (Acetylcholinérase + Butyrylcholinérase)

L'activité Butyrylcholinérase = Ut - U01 (mole/g/min).

Roles of the cytokines Th1 and NO Synthase (NOS2) in the immunizing disorders associated with the Alzheimer's disease and focusing of a pathogenic biomarquer.

Abstract:

Alzheimer disease is a neurodegenerative disease leading to a progressive and irreversible loss of mental functions. It usually manifest as comporment and memory impairment evolving into dementia. It is characterized by three phases according to the evolution and the severity of the symptoms. This pathology is associated with an immunity disorder which appears with significant rise in the inflammatory cytokines and increased production of the free radicals such as nitric oxide. The nitric oxide presents neurotoxicity primarily due to its capacity to be reacted with the anion superoxide to form the peroxyntirite, responsible of neuronal death.

The serum cholinestérase activity is implied in the neurodegenerative process considering its role in the cholinergic deficit involving an irreversible loss of the memory.

The objectives of our work concern the role of the cytokines Th1 and nitric oxide in the immunity disorders associated with the evolution of pathology in order to target a hallmark of pathogenesis. This study is carried out on the Algerian patients reached by Alzheimer disease. Our study aims to investigate the implication of Th1 cytokines and NO in immune disorders associated to pathology evolution in order to highlight a pathogenic hallmark. This study was performed on Algerian patients with Alzheimer disease.

Our results suggest that peripheral inflammation is an active component at cerebral level characterized by increase IFN γ expression. IFN γ effects are potentiated by TNF- α particularly in early phase of the disease. The intermediate phase, a pseudo stationary phase, is characterized by IL-13 significant induction. The inflammatory process is associated with a cholinergic deficit leading to memory impairment.

The cytokine regulation systems are strongly related to high NO production, particularly in early and late phases. These mechanisms seem to play a role in tissular and cellular deleterious effects during the pathology. Furthermore, our results have shown that NO production by Th1 cytokines stimulate iNOS is highly implicated in the pathogenicity and evolution of Alzheimer disease.

Taken together, our finding show that NO, IFN γ and butyrylcholinesterase activity seem to be useful tools for better monitoring of Alzheimer disease.

Key words: Alzheimer, Oxide nitric, NOSynthase, Butyrylcholinesterase, dementia, Neurodegenerative, Autoimmune, Cytokines.

دور السيتوكينات الـTh1 و الـNO سينتاز في الإختلالات المناعية المرتبطة بمرض الزهايمر و الإبراز عن راسم حيوي كاشف للمرض

ملخص:

مرض الزهايمر هو داء إضمحلال عصبي متعدد الأوجه، يؤدي إلى فقدان تدريجي و نهائي للقدرات الذهنية. و يظهر هذا المرض في شكل خلل في الذاكرة و السلوك الذي يتطور تدريجيا نحو الهلوسة. حيث يتميز بثلاث مراحل حسب تطور و شدة الأعراض. هذا الداء مرتبط بخلل مناعي ينتج عنه إرتفاع معتبر للسيتوكينات المحفزة للإلتهاب، والإفراز المفرط للراديكالات الحرة مثل أحادي أكسيد اللآزوت (NO). أحادي أكسيد اللآزوت يبدي تسمم عصبي راجع أساسا إلى قدرته على التفاعل مع أيون فائق الأكسدة (anion superoxide) ليشكل البيروكسي نترت المسؤول على الموت العصبي. نشاط الكولين إستراز المصلي يدخل في عملية الإضمحلال العصبي نظرا لدوره في القصور الكولينيرجي الذي يؤدي إلي فقدان النهائي للذاكرة.

هذا العمل يهدف إلى إبراز دور سيتوكينات الـTh1 و أحادي أكسيد اللآزوت في الإختلالات المناعية المرتبطة بتطور المرض بهدف إبراز راسم حيوي كاشف للمرض.

توحي نتائجنا بأن الإلتهاب المحيطي يعتبر مركب نشط على المستوى الدماغي، يتميز خاصة بارتفاع الـIFN γ . نشاط هذا الأخير محفز بـ TNF α خاصة في المرحلة الإبتدائية للمرض. المرحلة البينية المتميزة بحالة شبه مستقرة تتميز بنحثيث معتبر للـIL13. العملية الإلتهابية مرتبطة بقصور كولينيرجي مسؤول عن إختلالات الذاكرة. آليات التنظيم السيتوكيني وثيقة الإرتباط مع الإنتاج المعتبر للـNO خاصة في المرحلتين الإبتدائية والنهائية. يمكن لهذه الآليات أن تتدخل في التأثيرات النسيجية و الخلوية الضارة الحادثة في الجهاز العصبي المركزي و المميزة لهذا المرض. حسب نتائجنا يبدو أن إنتاج الـNO بفعل الـNOS2 المحفز بسيتوكينات الـTh1 يتدخل بكثافة في الآليات المسببة لمرض الزهايمر و تطوره.

من خلال هذه النتائج الإبتدائية يبدو أحادي أكسيد اللآزوت،IFN γ ، ونشاط البوتيريل كولين إستراز كمرشحين بامتياز للعب دور راسم حيوي في مراقبة المرضى.

المفاتيح : الزهايمر،أكسيد الازوت،NO سينتاز،خرف، الإضمحلال عصبي، المناعة الذاتية.