

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
« HOUARI BOUMEDIENE »
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES (FSB)



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**
En sciences de la nature

Spécialité : Ecole doctorale en biotechnologie et santé

Par : Mme ARROUL-LAMMALI Amina

Sujet :

Etude de l'évolution du rapport immunité/pathogénie chez un modèle expérimental d'Uvéite « Behçet » induite par l'IRBP : Mise au point d'un biomarqueur.

Soutenu publiquement le 05/01/2010 devant le jury composé de :

Mme F. LARABA-DJEBARI	Professeur, USTHB	Présidente
Mme C. TOUIL-BOUKOFFA	Professeur, USTHB	Directrice de thèse
Mme D. HAMMOUDI-TRIKI	Maitre de conférences, USTHB	Examinatrice
Mme T. BENHASSINE	Maitre de conférences, USTHB	Examinatrice
Mme M. TIAR	Professeur en médecine, CHU Bab El oued	Invitée d'honneur



﴿ وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا ﴾

[سورة طه الآية 114]

RESUME

L'uvéite est une inflammation de l'uvée qui s'étend aussi à toutes les structures intraoculaires adjacentes. Elle forme l'une des manifestations cliniques les plus sévères de la « maladie de Behçet ». Cette pathologie inflammatoire auto-immune d'étiologie à ce jour incertaine, est largement répandue le long du bassin méditerranéen et très endémique en Algérie. L'IRBP, auto-antigène rétinien, a été impliqué de près dans la physiopathologie de cette affection. D'autre part, plusieurs travaux réalisés sur le système périphérique de patients atteints d'uvéite « Behçet » ont démontré l'implication du monoxyde d'azote (NO) au cours de l'évolution de la pathologie. Nous avons donc été amenés à la mise au point d'un modèle expérimental, en vue de vérifier de près l'implication de cette bio-molécule.

A cet effet, nous avons induit l'uvéite auto-immune expérimentale (UAE) chez le rat *Wistar* d'une part, par l'extrait brut rétinien (témoin positif) et d'autre part, par l'auto-antigène l'IRBP. Nous avons déterminé la cinétique d'apparition de l'inflammation intraoculaire « uvéite » ainsi que celle des désordres histopathologiques des rétines chez les deux modèles expérimentaux. La production du monoxyde d'azote (NO) *in vivo*, dans les plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut et par l'IRBP, *in vitro* au niveau des surnageants de culture des splénocytes et *in situ*, au niveau des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP a également fait l'objet de notre étude.

Nos résultats montrent que la souche *Wistar* utilisée dans les expérimentations est sensible à l'induction de l'UAE et ce, aussi bien par l'extrait brut rétinien que par l'IRBP isolé. En effet, une inflammation intraoculaire ainsi qu'une désorganisation de l'architecture de la rétine ont été clairement observées. Par ailleurs, la production du NO plasmatique *in vivo*, chez les deux modèles expérimentaux, *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes et *in situ*, dans les homogénats des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP a montré une augmentation significative en comparaison avec les rats « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS). De plus, le pic de production du NO précède celui de l'apparition de l'uvéite et des désordres histopathologiques au niveau des rétines.

Ces résultats sont en faveur d'une implication de la rate en tant qu'organe lymphoïde secondaire dans l'instauration de la réponse immunitaire auto-destructive au cours de l'UAE induite par l'IRBP. Ils suggèrent également l'implication du monoxyde d'azote durant les phases précoce et aigüe de l'UAE induite chez le rat *Wistar* et le situent en tant que marqueur clé de mauvais pronostic dans le suivi des manifestations inflammatoires observées lors de l'atteinte oculaire associée à la maladie de Behçet.

Mots clés : Uvéite auto-immune expérimentale, rat *Wistar*, IRBP, extrait brut rétinien, inflammation intraoculaire, rétine, monoxyde d'azote, splénocytes.

Abréviations : UAE : Uvéite Auto-immune Expérimentale, NO : monoxyde d'azote, CFA : adjuvant complet de Freund, IRBP : Interphotoreceptor Retinoïd-Binding Protein, EB : extrait brut.

Dédicaces



“الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على إمام المرسلين وعلى آله وصحبه والتابعين،”

Je dédie ce modeste travail à celui qui nous a tant appris et nous a montré le droit chemin, à celui dont l'humanité ne connaîtra pareil homme jusqu'à la fin des temps, à notre prophète Mohamed (QSSSL) que Dieu nous réunisse avec lui dans son vaste paradis.

A mes parents, en faible témoignage de mon océan d'amour pour vous. Tout ce que je suis aujourd'hui et tout ce que j'ai pu accomplir dans ma vie je vous le dois. Vous êtes la clé de ma réussite, que Dieu vous garde pour moi.

A mon mari qui est venu illuminer ma vie. Ton aide précieuse, ton soutien moral et tes encouragements m'ont guidée tout au long de mes recherches. Merci d'avoir toujours cru en moi.

A mon frère et sa femme ainsi qu'à ma petite sœur adorée qui ont toujours été à mes côtés. Merci de m'avoir soutenue toutes ces années.

A ma belle-mère, en faible témoignage de mon amour et ma reconnaissance pour tout ce que tu fais pour moi. L'intérêt que tu as porté à mon travail ainsi que ton aide inestimable m'ont profondément touchée.

A toute ma famille et ma belle-famille.

A ma meilleure amie et sœur Zineb et sa famille ainsi qu'à toutes mes amies.

A tous mes professeurs, avec toute ma gratitude. ✍

❧ Remerciements ❧

Le présent travail a été réalisé au sein de l'équipe « Cytokines et NO Synthases » au niveau du laboratoire de Biologie Cellulaire & Moléculaire de la faculté des sciences biologiques – USTHB, sous la direction du Pr. Touil-Boukoffa Chafia.



«...وَإِذْ تَأَذَّنَ رَبُّكُمْ لَئِنْ شَكَرْتُمْ لَأَزِيدَنَّكُمْ...» [سورة إبراهيم الآية (7)]

Louanges à Dieu le tout puissant à qui je dois tout, et sans l'aide de qui ce présent travail n'aurait jamais pu voir le jour. A chaque obstacle que je rencontrais et dans les moments les plus difficiles je me rappelais ce verset : [سورة الشرح الآية (6)] « إن مع العسر يسرى... ». Je le remercie pour tout et pour m'avoir aidée à réaliser mon rêve et franchir un pas vers le chemin du savoir.

Notre prophète [QSSSL] a dit : « *Celui qui ne remercie pas les gens ne remercie pas Dieu* ».

Je tiens à exprimer mon plus profond respect et mes plus vifs remerciements à :

◆ **Mme Touil-Boukoffa. C.** Professeur au niveau de la faculté des sciences biologiques et directrice de l'équipe « Cytokines et NO Synthases ». J'ai eu l'honneur, le plaisir et l'immense privilège d'avoir compté parmi vos nombreux étudiants en graduation et d'avoir ensuite fait partie de votre équipe. Vous avez su nous transmettre à tous avec beaucoup de patience, de générosité et d'indulgence, toute la passion de la recherche qui vous habite. Votre simplicité et votre modestie sont à la dimension de votre envergure scientifique. Travailler sous vos directives a été pour moi une expérience des plus enrichissantes. Que tout le bien que vous faites autour de vous, vous soit équitablement rendu ainsi qu'à votre famille. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance sera sans bornes.

◆ **Mme Laraba-Djebbari. F.** Professeur et doyenne au niveau de la faculté des sciences biologiques et directrice de l'équipe « Venins et immunothérapie », pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury et ce en dépit de ses nombreuses tâches et obligations. Je tiens aussi à la remercier pour la qualité de l'enseignement qu'elle nous a prodigué tout au long de notre formation en graduation ainsi qu'en post-graduation. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

◆ **Mme Hammoudi-Triki. D.** Maître de conférences et vice-doyenne chargée de la scolarité et de la pédagogie au niveau de la faculté des sciences biologiques, pour avoir eu l'obligeance d'accepter de faire partie de ce jury et d'examiner mon travail. Je la remercie vivement pour sa gentillesse, sa disponibilité ainsi que pour toutes les connaissances qu'elle m'a prodiguées durant mon cursus universitaire et surtout au courant de l'année théorique où j'ai pleinement profité de sa rigueur scientifique et de ses qualités pédagogiques. Je tiens aussi à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir donné ma chance et aidée à réaliser un de mes rêves ; enseigner aux autres ce qu'on m'a appris.

◆ **Mme Hamadouche-Benhassine. T.** Maître de conférences au niveau de la faculté des sciences biologiques. J'ai eu l'immense privilège de débiter ma carrière d'enseignante aux cotés d'un grand professeur comme vous. Votre sympathie, modestie, gentillesse ainsi que

vos qualités pédagogiques m'ont profondément marquée. Vous m'avez beaucoup appris et vous étiez pour moi une véritable sœur. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail malgré vos nombreuses occupations m'a profondément touchée. Recevez ici, toute ma gratitude et toute ma reconnaissance.

◆ **Mme Tiar. M.** Professeur en médecine et chef de service de la clinique ophtalmologique du CHU de Bab El Oued. Pour avoir eu l'amabilité d'accepter mon invitation pour faire partie de ce jury et examiner mon travail. Les remarques d'un spécialiste me seront des plus enrichissantes. Je lui réitère mes remerciements les plus sincères.

Je tiens également à remercier tout particulièrement :

◆ Mr Bakour. R. Professeur à la faculté des sciences biologiques. Le simple fait de vous avoir connu et d'avoir fait partie de vos étudiants a été pour moi un immense privilège. Je ne pouvais pas achever d'écrire ma thèse sans remercier l'un des professeurs qui m'a le plus marquée durant mon cursus universitaire. Vos qualités pédagogiques hors normes m'ont fait découvrir ma passion pour la biologie et ont contribué à forger mon esprit scientifique. Toute ma reconnaissance.

◆ Mme Boudraham-Addour. N. Pour les moments agréables que j'ai passés avec elle à enseigner le module de biologie moléculaire et pour ses conseils laborieux.

◆ Mme Barka et toute son équipe. Pour l'accueil chaleureux et l'aide inestimable qu'ils m'ont procurée en m'ouvrant grandes les portes de leur laboratoire et en me permettant de réaliser l'étude histologique.

◆ Mr Boufersaoui. Pour m'avoir si aimablement autorisée à accéder à son laboratoire et réaliser une partie de l'étude histologique. Merci de m'avoir appris les astuces pour réaliser de belles coupes !

◆ Mr Ahmedi. ML. Pour ses conseils et son soutien moral tout au long de mon travail au laboratoire, et pour avoir partagé avec moi son savoir et son matériel. Vous êtes comme un père pour moi.

◆ Mme Mezioug. D. Votre sympathie, attention et générosité m'ont profondément touchée. Vous êtes comme une grande sœur qui a tout partagé avec moi et qui a su m'écouter et me conseiller. Vous m'avez simplifié des techniques qui paraissaient à mes yeux des plus compliquées. Merci du fond du cœur.

◆ Mme Raache et Melle Farah. pour votre aide inestimable en me procurant l'adjuvant.

Je ne remercierai jamais assez mes parents et mon mari pour leur aide inestimable et leur soutien moral. Vous avez contribué à la réalisation de ma thèse. Je peux affirmer sans risque de me tromper que c'est grâce à vous que tout cela a été possible. Merci pour tout.

Mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance la plus sincère s'adressent tout particulièrement à ma meilleure amie, ma jumelle et celle avec qui j'ai tout partagé : Zineb. Merci d'avoir été ma confidente, toujours à mes côtés. Je remercie Dieu de m'avoir donné une amie comme toi avec qui j'ai partagé l'une des plus belles expériences de ma vie.

Je remercie chaleureusement les ingénieurs de laboratoire qui ont participé de près à l'élaboration de mon travail. Je cite : Mme et Mr. Belkhelfa, Radia, Djamilia, Leila et Soukaina. Je leur souhaite une bonne continuation.

Je ne remercierai jamais assez Melle Remana Soumeiya, sans l'aide de qui rien n'aurait été possible. Elle a toujours su être là pour moi, elle m'a donné de son temps et n'a jamais

ménagé ses efforts pour m'aider. Je lui dois toute ma reconnaissance et lui souhaite un avenir prometteur.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « Cytokines & NO Synthases ». A commencer par l'ingénieur de laboratoire : Mr. Bouanane. R pour son aide inestimable, les doctorants : Melle Belguendouz Houda, Melle Amri Manel, Mme Zekri-Ariba Hadjira et Mr Messaoudène.D pour leurs conseils précieux et soutien moral. Et enfin les Post-graduants : Melle Rafa Hayet, Melle Bouaziz Samia, Melle Abdelouaheb Katia, Mr. Medjeber. O et Mr. Belkhelfa. M, sans qui lourde aurait été la tâche. Vous avez su créer au laboratoire une bonne ambiance et des relations basées sur le partage, la confiance et l'entraide. Je vous remercie pour tous ces moments agréables et vous souhaite à tous une bonne continuité dans votre carrière de chercheurs.

Je remercie également tous mes collègues et camarades en post-graduation pour leur aide et leur soutien. Je vous souhaite une bonne continuité et beaucoup de réussite.

Un grand merci pour le personnel de l'animalerie de l'USTHB pour m'avoir procuré le matériel de base dans mes recherches.

Mes remerciements s'adressent aussi à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acides aminés
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
BH₄	Tétrahydrobioptérine
CD	Classe de différenciation
CFA	Adjuvant complet de Freund
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
EB	Extrait brut rétinien
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
EPR	Epithélium pigmentaire rétinien
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FasI	Fas ligand
FMN	Flavine mononucléotide
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HLA	Human leukocyte antigen
HSP	Heat shock protein
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IRBP	Interphotoreceptor retinoid-binding protein
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MB	Maladie de Behçet
MEEI	Matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs
MIC	MHC class I chain related gene
μM	Micromolaire
MØ	Macrophage
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NO	Monoxyde d'azote
NO₂⁻	Nitrites
NO₃⁻	Nitrates
NOS	NO synthase
PDE	Phosphodiesterase
PM	Poids moléculaire
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
PN	Polynucléaire neutrophile

RBP	Rétinoid-binding protein
RPE	Epithelium pigmentaire
TGF-β	Transforming growth factor
Th	Lymphocyte T helper (auxiliaire)
TNF	Tumor necrosis factor
UAE	Uvéite auto-immune expérimentale

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

Chapitre I: Rappels bibliographiques

I Uvéites et maladie de Behçet.....	3
I.1 Les uvéites.....	3
I.1.1 Définition.....	3
I.1.2 Classification.....	3
I.1.3 Physiopathologie des uvéites.....	4
I.1.4 Traitements actuels.....	6
I.2 La maladie de Behçet.....	7
I.2.1 Définition et historique.....	7
I.2.2 Epidémiologie.....	7
I.2.3 Critères de diagnostic.....	8
I.2.4 Etiologie et physiopathologie de la MB.....	9
I.2.5 Uvéite associée à la maladie de Behçet.....	14
I.2.6 Thérapie.....	14
II Œil, rétine et auto-antigène « l'IRBP ».....	15
II.1 L'œil.....	15
II.1.1 Anatomie.....	15
II.1.2 Histologie.....	15
II.2 La rétine.....	17
II.2.1 Origine embryologique.....	17
II.2.2 Anatomie de la rétine.....	17
II.3 Les auto-antigènes rétiens.....	21
II.3.1 L'Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein «IRBP».....	21
II.3.2 L'antigène S «arrestine visuelle».....	27
III L'uvéite auto-immune expérimentale (UAE).....	28
III.1 Définition.....	28
III.2 Mécanismes physiopathologiques.....	28
III.2.1 Modulation du système immunitaire au cours de l'UAE.....	29
III.2.2 Aspect histopathologique de l'UAE.....	30
III.3 Mécanisme d'action de l'adjuvant complet de Freund (CFA) au cours de l'UAE.....	30
III.4 Du modèle expérimental aux applications cliniques.....	31
IV Le monoxyde d'azote (NO).....	33
IV.1 Propriétés physico-chimiques.....	33
IV.2 Biosynthèse du NO.....	33
IV.2.1 Les NO synthases (NOS).....	34
IV.3 Fonctions biologiques du NO.....	37
IV.3.1 NO en physiologie.....	37
IV.3.2 NO en physiopathologie.....	37
IV.4 Monoxyde d'azote et UAE.....	38
V Rate & auto-immunité.....	40
V.1 Organisation histologique de la rate.....	40
V.1.1 La pulpe rouge.....	40
V.1.2 La pulpe blanche.....	40

V.1.3 La zone marginale.....	40
V.2 Fonctions de la rate	41
V.2.1 Fonction d'épuration.....	41
V.2.2 Fonction hématopoïétique.....	41
V.2.3 Développement des réponses immunitaires.....	41
V.3 Implication de la rate dans la physiopathologie de l'UAE.	41

Chapitre II: Matériel & Méthodes

I Matériel.....	43
II Méthodes.....	44
II.1 Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines.....	44
II.1.1 Préparation des extraits bruts A & B	44
II.1.2 Isolement de l'IRBP par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A- Sephadex.....	44
II.1.3 Dosage des protéines des extraits bruts et des différentes fractions par la méthode de Bradford.....	45
II.1.4 Caractérisation biochimique des extraits bruts par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	45
II.2 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i>	45
II.2.1 Induction de l'UAE par l'extrait brut total	45
II.2.2 Induction de l'UAE par l'IRBP	46
II.2.3 Dosage des nitrites résiduels et des nitrites totaux <i>in vivo</i> , dans les plasma et <i>in vitro</i> , dans les surnageants de culture des splénocytes, par la méthode de Griess modifiée.....	47
II.2.4 Evaluation de la production de NO (nitrites résiduels) <i>in situ</i> par milligramme de protéines dans les surnageants des homogénats des yeux de rats <i>Wistar</i>	47
II.2.5 Etude de l'aspect histologique des rétines au cours de l'UAE	48

Chapitre III: Résultats & Discussion

I Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines	50
I.1 Préparation et caractérisation des extraits bruts A et B	50
I.2 Isolement de l'IRBP à partir de l'extrait brut B par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A-Sephadex	51
II Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i>	54
II.1 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i> par l'extrait brut total « EB.A »	54
II.1.1 Cinétique de l'inflammation intraoculaire au cours de l'UAE induite chez le rat <i>Wistar</i> par l'extrait brut.....	54
II.1.2 Etude de la production du NO <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	56
II.1.3 Etude de l'aspect histologique des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	60
II.2 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i> par l'IRBP.....	63

II.2.1	Cinétique de l'inflammation intraoculaire au cours de l'UAE induite chez le rat <i>Wistar</i> par l'IRBP.....	63
II.2.2	Etude de la production du NO <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	63
II.2.3	Etude de la production du NO <i>in vitro</i> dans les surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin ».....	68
II.2.4	Etude de la production de NO (nitrites résiduels) <i>in situ</i> dans les surnageants des homogénats des yeux de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin ».....	72
II.2.5	Etude de l'aspect histologique des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	74
Chapitre IV : Discussion générale		
I	Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines	77
II	Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i> par l'extrait brut total « EB.A ».....	78
II.1	Etude de la production du NO <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	78
II.2	Etude de l'aspect histologique des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	79
III	Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat <i>Wistar</i> par l'IRBP.....	80
III.1	Etude de la production du NO <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS).....	80
III.2	Etude de la production du NO <i>in vitro</i> au niveau des surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin ».....	81
III.3	Etude de la production de NO (nitrites résiduels) <i>in situ</i> dans les surnageants des homogénats des yeux de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats <i>Wistar</i> « témoin ».....	81
III.4	Etude de l'aspect histologique des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP et de rats « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)	82
CONCLUSION.....		85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		86

SOMMAIRE DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre	Page
01	Coupe sagittale du globe oculaire et classification schématique des uvéites selon la zone touchée	5
02	Classification générale des uvéites	5
03 & 04	Physiopathologie de la maladie de Behçet	13
05	Anatomie de l'œil	20
06	Structure de la rétine	20
07	Séquence amino-acide complète de l'IRBP bovin et alignement des quatre domaines homologues	22
08	Structure tridimensionnelle du deuxième domaine de l'IRBP de <i>Xenopus laevis</i> et superposition des quatre domaines de l'IRBP de <i>Xenopus laevis</i>	22
09	Localisation de l'IRBP au niveau de la rétine de <i>Xenopus laevis</i> .	24
10	Structure du gène codant l'IRBP bovin	24
11	Processus de phototransduction	26
12	Rôle de l'IRBP dans le transport des rétinoides	26
13	Etapes clés du développement de l'UAE pouvant servir de cible à différentes stratégies thérapeutiques	32
14	Etapes de la biosynthèse du NO par les NO-synthase	35
15	Schéma de la structure dimérique des NOS incluant les domaines oxygénases et réductases ainsi que les sites de liaison des cofacteurs et du substrat	35
16	Régulation de l'expression de la iNOS au niveau transcriptionnel via le NF- κ B, positivement par les cytokines clés du processus inflammatoire (TNF- α , IFN- γ et IL-1 β). Et négativement par les glucocorticoïdes	35
17	Schéma récapitulatif des rôles du monoxyde d'azote au cours des différentes phases de l'UAE	39
18	Organisation histologique de la rate	42
19	Démarche expérimentale	49
20	Caractérisation de la composition protéique des extraits bruts rétinien par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13%) en présence de SDS en conditions non réductrices.	52
21	Profil de l'élution de l'extrait brut « EB.B » par chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A-Sepharose	53
22	Observation des modifications intraoculaires au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'extrait brut total	55
23	Concentrations des nitrites résiduels <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	58
24	Concentrations des nitrites totaux <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	58
25	Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS) aux différents stades post-immunisation, après coloration à l'hématoxyline - éosine (G $\times$ 400).	61
26	Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut (100 μ g) aux trois stades post-immunisation, après coloration à l'hématoxyline - éosine (G $\times$ 400).	62
27	Observation des modifications intraoculaires au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'IRBP	64
28	Concentrations des nitrites résiduels <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	66
29	Concentrations des nitrites totaux <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	66

30	Concentrations des nitrites résiduels <i>in vitro</i> dans les surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	70
31	Concentrations des nitrites totaux <i>in vitro</i> dans les surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	70
32	Taux de nitrites résiduels par milligramme de protéines dans les surnageants des homogénats des yeux de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	73
33	Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS) aux différents stades post-immunisation, après coloration à l'hémaréine - éosine (G × 400).	75
34	Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP (13µg) aux trois stades post-immunisation, après coloration à l'hémaréine - éosine (G × 400).	76
35	Mécanismes physiopathologiques au cours de l'UAE induite par l'IRBP chez le rat <i>Wistar</i>	84

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Numéro du tableau	Titre	Page
01	Critères de diagnostic de la MB	8
02	Classification de la MB	8
03	Caractéristiques des trois isoformes de NOS humaines	36
04	Concentrations des nitrites résiduels et des nitrites totaux <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'extrait brut (100 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	59
05	Concentrations des nitrites résiduels et des nitrites totaux <i>in vivo</i> au niveau de plasma de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats <i>Wistar</i> « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)	67
06	Concentrations des nitrites résiduels <i>in vitro</i> dans les surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	71
07	Concentrations des nitrites totaux <i>in vitro</i> dans les surnageants de culture des splénocytes de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	71
08	Tableau récapitulatif des taux moyens de nitrites résiduels par milligramme de protéines dans les surnageants des homogénats des yeux de rats <i>Wistar</i> immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats <i>Wistar</i> « témoin »	73

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'uvéite est par définition l'inflammation du tractus uvéal qui peut atteindre également toutes les structures oculaires adjacentes. Elle peut être d'origine infectieuse ou associée à une pathologie systémique. Elle forme l'un des critères majeurs du diagnostic de la maladie de Behçet (Brezin, 1999). Cette pathologie inflammatoire auto-immune, est largement répandue le long du bassin méditerranéen et très endémique en Algérie (Zouboulis, 1999). Elle est caractérisée par une vascularite multisystémique chronique, une étiologie à ce jour incertaine et une thérapie visant uniquement à atténuer la fréquence des poussées (Binisti, 1999). Une composante auto-immune est souvent associée à sa physiopathologie. En effet, Plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'une réponse auto-immune dirigée contre l'IRBP « Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein » chez des patients atteints d'uvéite idiopathique (Matsuo *et al.*, 1986) et d'uvéite behçet (Hamzaoui *et al.*, 1998). Cet auto-antigène rétinien, localisé au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace interphotorécepteurs est considéré comme l'une des molécules les plus uvéitogènes, capable d'induire une uvéite auto-immune expérimentale une fois injecté au modèle animal (Wildner *et al.*, 2008).

L'uvéite auto-immune expérimentale (UAE) est un modèle bien établi d'uvéite endogène postérieure qui ressemble à certaines pathologies observées chez l'Homme comme la maladie de Behçet. Elle est induite chez différents animaux de laboratoire : cobaye, rat, souris, singe par immunisation avec des auto-antigènes purifiés de la rétine en présence d'adjuvants. La sensibilité à développer l'UAE varie selon le modèle utilisé. En effet, le rat *Lewis* est le plus sensible (De kozak, 2000 ; Caspi, 2006(a)). Cependant, très peu d'études ont été consacrées à l'induction de l'UAE chez le rat *Wistar*. L'UAE constitue par ailleurs un outil important contribuant efficacement à élucider et à décortiquer le mécanisme de l'inflammation oculaire à caractère auto-immun chez l'Homme (Agarwal and Caspi, 2004).

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule radicalaire, qui en milieu aqueux et en présence d'oxygène réagit rapidement avec ce dernier pour générer des métabolites stables : les nitrites et les nitrates constituant les effecteurs de son action toxique (Vanhoutte, 2003). Le NO intervient dans la phase effectrice des réponses immunitaires cellulaires. Une augmentation des concentrations de NO a été rapportée au cours de nombreuses pathologies inflammatoires auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies neuro-dégénératives, la rétocholite hémorragique et le lupus (Farrel *et al.*, 1992 ; Schulz *et al.*, 1995 ; Grabowski *et al.*, 1996 ; Silverman, 2009, Rafa, 2009). Le NO constitue également un médiateur important impliqué dans l'inflammation de l'uvéie (Parks *et al.*, 1994 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009). Une augmentation des concentrations de NO a été rapportée au cours de la maladie de Behçet, dans le sérum (Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008), les érythrocytes (Evereklioglu *et al.*, 2003), le liquide synovial (Duygulu *et al.*, 2005) et l'humeur aqueuse (Yilmaz *et al.*, 2002). Cette augmentation est corrélée avec l'activité de la maladie.

Notre étude a pour objectif de mettre au point un modèle expérimental d'uvéite Behçet induite par l'IRBP chez le rat *Wistar* afin d'étudier l'évolution de la pathologie en parallèle avec la réponse immunitaire (production de monoxyde d'azote).

Notre travail a donc porté sur les points suivants :

- L'extraction et l'isolement de l'auto-antigène l'IRBP à partir de rétines bovines.
- L'induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat *Wistar* par injection de l'IRBP et de l'extrait brut rétinien.
- Le suivi de l'évolution de l'inflammation intraoculaire et des désordres histopathologiques au niveau des rétines au cours de l'UAE.
- L'étude de la production du NO *in vivo*, au niveau des plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut et par l'IRBP. *In vitro*, au niveau des surnageants de culture des splénocytes et localement, au niveau des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP.

Chapitre I

Rappels bibliographiques

I. Uvéïtes & maladie de Behçet

I Uvéites et maladie de Behçet

I.1 Les uvéites

I.1.1 Définition

L'uvéite est l'inflammation du tractus uvéal (uvée), tunique vasculaire de l'œil constituée de l'avant vers l'arrière par: l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Ce terme englobe également les atteintes inflammatoires des structures adjacentes à l'uvée: humeur aqueuse, vitré et rétine, d'où l'extension du terme uvéite à toute inflammation intraoculaire.

I.1.2 Classification

Plusieurs classifications des uvéites ont été proposées, les principaux critères admis sont la localisation anatomique, le type clinique et l'étiologie.

I.1.2.1/ Classification anatomique (Figure 01)

L'uvée est divisée en trois parties qui sont d'avant en arrière:

- ***L'uvée antérieure:*** elle correspond à l'iris baignant dans l'humeur aqueuse qui sépare la chambre antérieure de la chambre postérieure.
- ***L'uvée intermédiaire:*** elle correspond au corps ciliaire qui sécrète l'humeur aqueuse.
- ***L'uvée postérieure:*** englobant la choroïde en rapport avec la rétine et la sclère, elle constitue la membrane nourricière de l'œil par sa richesse vasculaire et nerveuse.

Ainsi, on définit:

- ***L'uvéite antérieure ou iritis ou iridocyclite,*** toute inflammation survenant au niveau de l'iris.
- ***L'uvéite intermédiaire,*** toute inflammation du corps ciliaire.
- ***L'uvéite postérieure,*** toute inflammation se localisant en arrière de la base du vitré autrement dit vitré, rétine et choroïde.
- ***La panuvéite*** qui associe l'uvéite antérieure et postérieure (Levecq *et al.*, 1999).

I.1.2.2/ Classification clinique

Deux types principaux d'uvéites peuvent être déterminés par l'examen clinique qui permet de départager les uvéites en non granulomateuses ou granulomateuses (Flament, 2002).

- ***L'uvéite non granulomateuse*** se caractérise par des précipités provenant de cellules inflammatoires présentes dans l'humeur aqueuse sur l'endothélium, sous forme de poussière avec dans certains cas un hypopion.
- ***L'uvéite granulomateuse*** se caractérise par des précipités de cellules inflammatoires de grandes tailles sur l'endothélium cornéen appelés "en graisse de mouton" (Flament, 2002).

D'autre part, le profil clinique de l'uvéite, son mode de survenue et sa durée permettent de subdiviser l'uvéite en:

- ***Uvéite aigue,*** de survenue brutale et qui persiste habituellement moins de six semaines.

- **Uvéite chronique**, inflammation qui dure plusieurs mois ou années, avec toutefois des épisodes aigus ou subaigus (Bodaghi *et al.*, 2004).

I.1.2.3/ Classification étiologique

L'uvéite peut s'inscrire dans le cadre d'une maladie générale, elle constitue également une affection oculaire isolée. La cause est purement inflammatoire ou infectieuse (Figure 02) (Brezin, 1999).

I.1.2.4/ Classification de l'INTERNATIONAL UVEITIS STUDY GROUP (IUSG)

En 1987, l'IUSG, a émis un consensus afin d'apporter une uniformité dans la description et la classification des uvéites. Cette dernière est basée essentiellement sur les critères anatomiques et évolutifs. Elle comporte plusieurs paramètres:

- La classification anatomique.
- La description de l'évolution de la maladie.
- L'évaluation des dommages visuels.
- La réponse à la corticothérapie.

Cette dernière classification est à l'heure actuelle la référence (Bloch-Michel and Nussenblatt, 1987).

I.1.3 Physiopathologie des uvéites

L'œil, tout comme le cerveau est un organe immunoprivilégié. Les échanges entre l'œil et la circulation générale se font à travers deux barrières: la barrière hématorétinienne interne, composée de capillaires rétiens et la barrière hématorétinienne externe, composée de l'épithélium pigmentaire. Les mécanismes exacts du déclenchement et de la régulation de l'inflammation de l'œil sont encore mal connus. Dans le cas des uvéites d'origine auto-immunes, des lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent un auto-antigène rétinien, et induisent le recrutement de leucocytes dans l'œil où le développement de la réaction inflammatoire conduit à la destruction des photorécepteurs et des cellules neuronales. Cette inflammation entraîne une baisse de la vision et peut conduire à la cécité. Du fait de cet état d'immunoprivilège, l'œil présenterait une protection vis-à-vis des réactions immuno-inflammatoires locales conduisant à la destruction des zones intraoculaires. Il est donc supposé que l'initiation de la réponse immune soit extérieure à l'œil, et serait due à un mimétisme moléculaire de l'antigène avec des protéines oculaires (Wildner and Diedrichs-Mohring, 2004). Dans ces uvéites, le profil lymphocytaire est de type Th1 (Foxman *et al.*, 2002 ; Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008).

L'importance des cytokines a été mise en évidence dans la maladie. Les principales cytokines mises en cause dans l'uvéite sont le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1, et l'IFN- γ (Planck *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 2000 ; Guenane *et al.*, 2006). Une étude chez les patients atteints d'uvéite intermédiaire ou postérieure a mis en évidence le rôle prépondérant de l'IL-6 (Perez *et al.*, 2004). De ce fait, l'utilisation d'anti-cytokines ou de cytokines douées de propriétés anti-inflammatoires s'est révélée intéressante pour lutter contre l'uvéite. Ainsi, l'IL-1Ra injecté en intravitréal permet de réduire considérablement l'infiltration cellulaire dans l'humeur aqueuse et empêche la rupture de la barrière hématorétinienne. Toutefois il a été rapporté une persistance de l'inflammation (Rosenbaum and Boney, 1992). De même, le traitement systémique par l'IL-10 permet la réduction de l'infiltration cellulaire (Hayashi *et al.*, 1996).

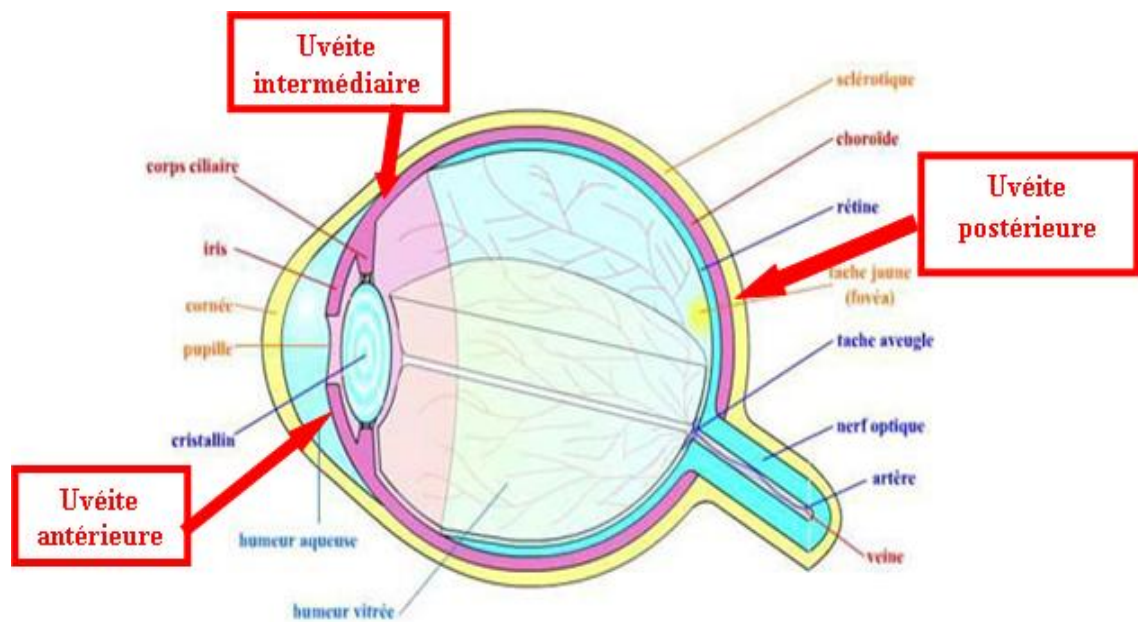


Figure 01: Coupe sagittale du globe oculaire et classification schématique des uvéites selon la zone touchée. (J.J. Kanski, 1995)

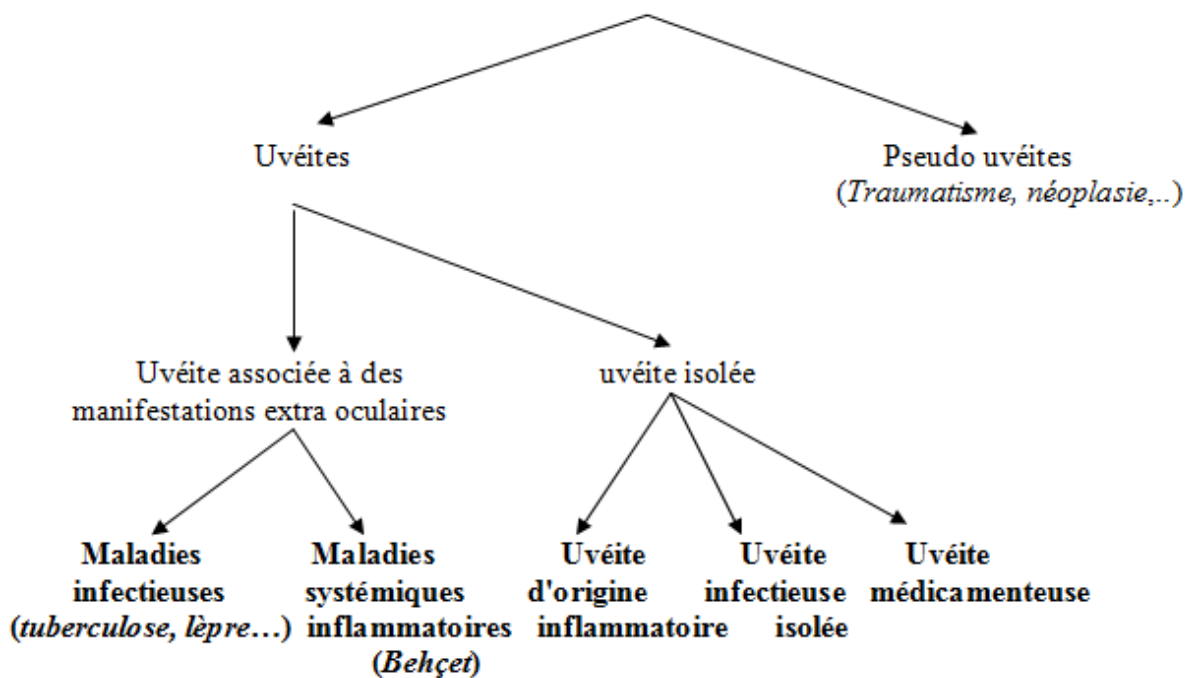


Figure 02: Classification générale des uvéites (Brezin, 1999)

D'autre part, il a également été rapporté qu'un des premiers signes de l'inflammation est la production de NO par la NOS inducible (Goureau *et al.*, 1995 ; Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008). Cette activation de la iNOS est ensuite maintenue par la libération de cytokines pro-inflammatoires par le système monocyte/macrophage, les neutrophiles et les cellules endothéliales. Le NO serait impliqué fortement dans les désordres lésionnels observés lors des uvéites (Hartani *et al.*, 2006 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

I.1.4 Traitements actuels

Les traitements actuels reposent sur une thérapie locale symptomatique à l'aide de corticoïdes, voire une corticothérapie générale si l'uvéite est sévère. Selon la cause de l'uvéite et si elle est très sévère, d'autres immunosuppresseurs (cyclosporine, cyclophosphamide) peuvent être employés.

Les possibilités de thérapies restent limitées du fait de la difficulté d'accès à l'œil. Ainsi, si l'instillation de collyres reste la méthode thérapeutique la plus employée, le développement de nouvelles technologies locales est en plein essor (Behar-Cohen, 2004), principalement afin d'éviter les effets secondaires liés à l'utilisation des corticoïdes.

A l'heure actuelle, plusieurs études cliniques sont en cours pour l'utilisation d'*infliximab* (anticorps anti-TNF- α) chez des patients atteints d'uvéite chronique antérieure et résistants aux immunomodulateurs classiques (El-Shabrawi *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2003). Ces études donnent des résultats encourageants et à long terme, sur plus de 6 mois.

Par ailleurs, 17 patients atteints d'uvéite postérieure ont été traités par injections intraveineuse d'une protéine fusionnée TNFR-I/IgG, permettant la rémission pour 12 d'entre eux (Murphy *et al.*, 2004). L'*etanercept* a été utilisé chez des enfants atteints d'uvéite chronique et résistants aux traitements classiques (Reiff *et al.*, 2001). Ce traitement a permis de réduire l'inflammation intraoculaire dans 63% des cas, et d'améliorer l'acuité visuelle dans 40% des cas. Les résultats obtenus requièrent bien sûr des études plus approfondies, mais sont plutôt encourageants.

I.2 La maladie de Behçet

I.2.1 Définition et historique

La maladie de Behçet (MB) est une maladie inflammatoire chronique, évoluant par poussées et caractérisée cliniquement par une aphtose buccale ou le plus souvent bucco-génitale associée à des manifestations systémiques dont les plus fréquentes sont cutanées, oculaires et articulaires et les plus graves sont neurologiques (neuro- Behçet), cardiovasculaires (angio- Behçet) et intestinales (entéro-Behçet). Le substratum anatomique commun à ces différentes atteintes est une vascularite capable de toucher tous les vaisseaux quel que soit leur nature et leur calibre, avec néanmoins une prédominance pour l'atteinte veineuse (O'Duffy, 1990 ; Lie, 1992 ; Binisti, 1999).

Hippocrate décrit une atteinte oculaire similaire dans le chapitre VII du livre III de l'épidémion. Adamantiades (ophtalmologiste grec) décrit pour la première fois en 1931 un cas d'iritis à hypopion accompagné d'ulcérations bucco-génitales, d'une phlébite et d'une hydarthrose bilatérale des genoux (Adamantiades, 1931). Mais c'est Hulusi Behçet, dermatologiste turc, qui a individualisé cette affection en 1936 comme entité clinique à part, après avoir observé chez trois patients l'association d'une aphtose bucco-génitale et d'une atteinte oculaire de type uvéite à hypopion. Partant de cette triade clinique, la maladie a vu son cadre s'élargir pour devenir maladie systémique à part entière au fur et à mesure que sont rapportées des observations émanant de différentes régions du globe et principalement chez des patients originaires du bassin méditerranéen et du Japon (Filaly-Ansary *et al.*, 1999).

I.2.2 Epidémiologie

I.2.2.1/ Age et sexe

La MB est une affection de l'adulte jeune avec un pic de fréquence entre 20 et 40 ans (Hamza, 2000). L'âge moyen d'installation des premiers symptômes est de 25,6 ans en Turquie (Gurler *et al.*, 1997), de 28,8 ans en Corée (Bang, 1997) et de 27,5 ans en Tunisie (Hamza, 2000). Les âges extrêmes d'installation de la maladie vont des premiers mois de la vie jusqu'à l'âge de 54 ans dans le pourtour du bassin méditerranéen, en Europe et dans les pays arabes (Hamza, 2000; Zouboulis, 1999; Gurler *et al.*, 1997; Ghayad and Tohme, 1995; Wechsler *et al.*, 1988; Chajek *et al.*, 1975; Whallett *et al.*, 1999). Ils peuvent arriver jusqu'à 72 ans selon les études menées dans les pays asiatiques (Bang, 1997; Huang *et al.*, 1983), tout en sachant que l'installation après 60 ans est excessivement rare. L'âge intervient dans l'expression clinique et la sévérité de la maladie. En effet, les formes des sujets relativement jeunes (avant 25 ans) sont plus sévères que les formes plus tardives (supérieur à 25 ans). L'activité de la maladie diminue avec l'âge et surtout pendant la ménopause chez la femme (Yazici *et al.*, 1984). Le sexe masculin est nettement plus touché que le sexe féminin. Cependant, la prédominance masculine est de degré variable selon les pays. Dans les pays méditerranéens, aussi bien au nord qu'au sud, on compte en moyenne 8 cas masculins pour 2 cas féminins (Nazzaro, 1966). Au Japon, pendant longtemps, il y avait une prédominance masculine moins nette avec 6 hommes pour 4 femmes. Ces derniers temps il semble que ce rapport soit en train de s'inverser en faveur d'une prédominance féminine de la maladie (Nakae *et al.*, 1993).

I.2.2.2/ Répartition géographique

La MB est une maladie ubiquitaire touchant avec prédilection les populations d'Asie centrale et de l'Est et du pourtour méditerranéen selon une distribution géographique rappelant les itinéraires de «la route de la soie» (Zouboulis, 1999).

La prévalence de cette affection est de 80 à 370 pour 100000 habitants en Turquie, de 2 à 30 pour 100000 habitants en Asie, de 0.1 à 7.5 pour 100000 habitants en Europe et aux états unis (Zouboulis, 1999). Au Maghreb, elle est de 110 pour 100000 habitants en Tunisie (Hamza, 2000), elle est très fréquente au Maroc (plus de 900 cas entre 1977 et 23002) (Bennouna-Biaz *et al.*, 1995; Benamour *et al.*, 1998).

I.2.3 Critères de diagnostic

Le diagnostic de la MB repose uniquement sur des critères cliniques car il n'y a pas de signes spécifiques permettant de la reconnaître.

Deux classifications de la MB coexistent à l'heure actuelle. En 1990, l'« International Study Group for Behçet's disease » a proposé une première classification. Celle-ci se base sur des critères majeurs et mineurs représentés au niveau du Tableau 01 :

<i>Critères majeurs</i>	<i>Critères mineurs</i>
Ulcérations buccales Ulcérations génitales Lésions cutanées Lésions oculaires	Signes neurologiques Signes articulaires Signes cardio-vasculaires Autres signes viscéraux Antécédents familiaux

Tableau 01: Critères de diagnostic de la MB (International Study Group for Behçet's Disease, 1990)

Le syndrome de Behçet est dit « complet » lorsque trois critères majeurs ou deux critères majeurs associés à deux critères mineurs sont retrouvés. Par ailleurs, le syndrome de Behçet est dit « incomplet » quand seulement deux critères majeurs sont retrouvés.

Une deuxième classification a été introduite par BenEzra, en 1999 (BenEzra, 1999). Cette dernière propose de subdiviser la MB en 4 sous groupes en fonction des signes cliniques principaux (voir Tableau 02).

<i>Type</i>	<i>Signes cliniques principaux</i>
<i>Type 1: "Behçet oculaire"</i>	- Uvéite - Vasculite rétinienne - Hypopion
<i>Type 2: "Behçet systémique"</i>	- Ulcères oraux - Thrombophlébite - Arthrite
<i>Type 3: "Neuro-Behçet"</i>	- Vasculite cérébrale - Paralysie des nerfs crâniens
<i>Type 4: "Behçet combiné"</i>	- Uvéite - Syndrome de la veine cave - Manifestations au niveau du système nerveux central

Tableau 02: Classification de la MB (BenEzra, 1999)

I.2.4 Etiologie et physiopathologie de la MB

Bien que la description princeps de la MB remonte à 1936, son étiologie et sa physiopathologie restent toujours largement incomprises. Des données expérimentales nouvelles permettent toutefois de mieux comprendre les mécanismes qui président à l'émergence de la maladie. Plusieurs éléments interviennent dans l'apparition des lésions organiques: une susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux (infections virales et/ou bactériennes), des anomalies de la réponse inflammatoire (protéines du choc thermique, dérégulation de la production du NO) et un dysfonctionnement du système immunitaire (Amoura *et al.*, 2006 ; Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008).

I.2.4.1/ Prédilection génétique

L'existence de formes familiales et la prépondérance de la maladie dans le bassin méditerranéen ont suggéré l'existence d'une susceptibilité génétique.

I.2.4.1.1/ Gènes HLA et gènes proches du locus HLA

a)- Maladie de Behçet et HLA- B51

Les gènes HLA du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisés sur le bras court du chromosome 6 codent un ensemble de molécules jouant un rôle crucial dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T (LT). La caractéristique essentielle des molécules HLA est leur extrême polymorphisme qui leur permet de présenter une multitude de peptides différents aux LT. Le haut degré de polymorphisme des molécules HLA explique comment des individus différents s'adaptent et répondent différemment aux antigènes qu'ils rencontrent. Le polymorphisme HLA influence également la sélection du répertoire des LT au cours de leur différenciation thymique. Cet ensemble de caractéristiques fait des gènes HLA d'excellents candidats dans la prédisposition génétique à la MB (Amoura *et al.*, 2006).

L'association génétique entre la MB et HLA-B51 a été décrite, pour la première fois en 1982 par Ohno (Ohno *et al.*, 1982) dans la population japonaise. L'antigène HLA-B51 était présent chez 57% des patients alors qu'il n'était retrouvé que dans 16% de la population générale. Cette association a été confirmée depuis dans de nombreuses autres populations d'origines géographique et ethnique différentes (française, anglaise, turque, tunisienne, chinoise) (Verity *et al.*, 1999). Le rôle exact joué par la présence du HLA-B51 dans la MB n'est toujours pas connu. Les neutrophiles des patients HLA-B51 et des souris transgéniques HLA-B51 ont une production accrue d'ions superoxydes (Takeno *et al.*, 1995). Cette observation rappelle le rôle potentiel joué par HLA-B51 dans le dysfonctionnement des neutrophiles observé au cours de la maladie mais souligne le fait que sa présence est un facteur insuffisant pour expliquer la prédisposition à la MB (Amoura *et al.*, 2006).

b)- Maladie de Behçet et gènes proches de HLA-B

L'absence de rôle fonctionnel précis de HLA-B51 dans la physiopathologie de la MB a fait évoquer la possibilité qu'il soit un marqueur génétique lié à un autre gène proche qui serait lui-même le gène impliqué dans la physiopathologie de la MB (Amoura *et al.*, 2006).

➤ Gènes MIC

En 1994, une nouvelle famille de gènes nommés MIC pour "MHC class I chain related gene" a été identifiée (Bahram *et al.*, 1994) parmi les cinq gènes MIC (MICA à MICE), deux sont bien caractérisés : les gènes MICA et MICB.

Le ligand de MICA est le récepteur NKG2D (Baver *et al.*, 1999) appartenant à la famille NKG2 qui constitue l'une des deux grandes familles de récepteurs NK.

L'interaction de MICA avec NKG2D conduit à l'activation des LT cytotoxiques et NK (Groh *et al.*, 2001) certains polymorphismes de MICA pourraient donc jouer un rôle dans son affinité pour NKG2D et influenceraient ainsi l'activation des lymphocytes TCD8 ou des NK (Groh *et al.*, 2001). En revanche, le gène MICB ne semble pas être associé à la MB (Hughes *et al.*, 2005).

➤ **Gènes du TNF**

Le TNF est l'une des cytokines majeures de la MB. Le gène du TNF est proche du locus HLA-B. Dans une étude britannique portant sur 133 patients caucasiens comparés à 354 contrôle sains, l'allèle 1031C était fortement associé avec la MB (Ahmed *et al.*, 2003). Le polymorphisme du gène du TNF pourrait influencer la production de cette molécule qui est augmentée au cours de la MB (Turan *et al.*, 1997).

I.2.4.2/ Facteurs environnementaux

a)- Infections virales

Dès 1937, Behçet avait mis en évidence des inclusions intra- et extranucléaires dans des frottis d'aphtes et d'hypopion suggérant une origine virale. Plusieurs virus de la famille Herpes ont été incriminés dans la genèse des lésions muqueuses de la MB: *Herpes simplex virus I* (Lee *et al.*, 1996; Tojo *et al.*, 2003), *cytomégalo virus* (Sun *et al.*, 1996), virus d'*Epstein-Barr* (Sun *et al.*, 1998) et le virus de la varicelle (Akdeniz *et al.*, 2003). Cette hypothèse était fondée sur une séroprévalence anti herpes virus accrue chez les malades, sur la mise en évidence de l'ADN des virus par amplification génomique dans les lésions muqueuses des patients et sur un modèle murin de la MB induite par une infection par *HSV* (Sohn *et al.*, 2001). Ces données n'ont toutefois pas été confirmées et l'absence d'efficacité des thérapeutiques anti herpes sur l'évolution de la maladie rend cette hypothèse peu plausible (Amoura *et al.*, 2006).

b)- Infections streptococciques

La présence constante des aphtes buccaux au cours de la MB a suggéré que la flore microbienne orale, notamment streptococcique, pouvait être impliquée dans la pathogénie de la maladie. Plusieurs observations ont rapporté l'exacerbation de la maladie après des tests d'hypersensibilité par injection intradermique d'extraits de streptocoques (Mizushima *et al.*, 1988). Une amélioration de l'état des patients après un traitement antistreptococcique a également été rapporté (Calguneri *et al.*, 1996). KTH-1, antigène de *Streptococcus sanguis*, peut activer les LT des malades, notamment les LT $\gamma\delta$ qui produisent des cytokines comme le TNF α , l'IFN γ , l'IL-6 et l'IL-8 (Hirohata *et al.*, 1992; Mochizucki *et al.*, 1994). Cette réponse cytokinique n'apparaît cependant pas spécifique des streptocoques. Un profil analogue est obtenu après une stimulation par des extraits d'*E.coli* ou de *Staphylococcus aureus*. Ces données suggèrent, que les LT des patients présentant la MB auraient une hyperréactivité aux antigènes bactériens plutôt qu'une susceptibilité à une espèce bactérienne en particulier (Amoura *et al.*, 2006).

I.2.4.3/ Anomalies de la réponse inflammatoire

a)- Rôle des protéines du choc thermique

Les protéines du choc thermique (HSP), spécialement celles de 60 et 65 kDa, sont des antigènes candidats potentiels comme initiateurs de l'apparition de la MB (Amoura *et al.*, 2006). La protéine HSP-60 est surexprimée dans les lésions cutanées de la MB (Ergun *et al.*, 2001) et également par les leucocytes des patients. L'homologie de séquence (60%) qui existe entre HSP-60 humaine et HSP-65 d'origine microbienne (notamment streptococcique), pourrait expliquer cette lymphoprolifération. La réponse des LT vis à vis des HSP bactériennes pourrait entraîner secondairement, par réactivité croisée, la prolifération des cellules T autoréactives vis à vis des HSP humaines (Direskenli *et al.*, 2000). Des IgG et des IgA anti HSP-65 sont détectés chez les patients atteints de la MB (Lehner *et al.*, 1991), de même l'injection de peptides de HSP-65 à des rats Lewis induit la production d'IgG et d'IgA et l'apparition d'une uvéite (Uchio *et al.*, 1998).

Des anticorps monoclonaux anti HSP-60 sont capables de lier des extraits rétinien, suggérant une parenté antigénique entre HSP-60 et un antigène rétinien (Tanaka *et al.*, 1996). L'hypothèse du rôle des HSP dans la physiopathologie de la MB pose cependant un problème qui est celui de la sélectivité des tissus. En effet, les molécules HSP sont exprimées par tous les tissus dans des conditions de stress, alors que la MB ne touche qu'un nombre limité de tissus. Cette sélectivité pourrait s'expliquer par des différences de l'expression locale des protéines HSP, comme par exemple une expression préférentielle au niveau de la rétine ou de la peau (Amoura *et al.*, 2006).

b)- Stress et radicaux libres

Au cours de la MB une production excessive d'anion superoxyde (O_2^-) et d'eau oxygénée (H_2O_2) a été observée, provoquant ainsi une augmentation des radicaux libres et du stress oxydant (Chambers *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'activité des enzymes, chargées de lutter contre le stress oxydatif, telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase est diminuée (Erkilick *et al.*, 2003).

I.2.4.4/ Anomalies de l'immunité

a)- Hyperréactivité des monocytes et polynucléaires neutrophiles

Une étude turque (Eksioglu-Demiralp *et al.*, 2001) a montré, en analysant les marqueurs d'activation à la surface des polynucléaires qu'il existe *in vivo* chez les patients atteints de la MB, un état de préactivation de ces cellules qui pourrait expliquer la rapidité avec laquelle s'installent les lésions. Les neutrophiles de patients atteints de la MB expriment des récepteurs d'activation, des protéines d'adhésion, des récepteurs de chimiokines (CXCR2). Ils produisent des radicaux libres en excès et ont une activité phagocytaire accrue (Amoura *et al.*, 2006).

La présence de HLA-B51 prédisposerait les patients à l'hyperréactivité des polynucléaires par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé. Les patients porteurs de HLA-B51 et les souris exprimant le transgène HLA-B51 ont une hyperréactivité des polynucléaires neutrophiles (Takeno *et al.*, 1995). Le rôle fondamental des polynucléaires neutrophiles au sein des lésions de la MB a poussé certains auteurs à traiter les patients par leukaphérèse pour les déléter en neutrophiles et en monocytes (Kanekura *et al.*, 2004).

b)- Rôle des lymphocytes T

Au cours de la MB, les LT expriment des marqueurs d'activation tels que le CD29 et le CD69. Et ce au niveau du sang périphérique et des tissus (Amoura *et al.*, 2006). Comme pour

beaucoup d'autres maladies auto-immunes, le profil Th1 semble être prédominant au cours de la MB. En effet, plusieurs travaux rapportent l'augmentation du nombre de LT de type Th1 dans le sang périphérique et la prédominance des cytokines Th1 telles que l'IL-12 et l'IFN γ , ceci en corrélation avec l'activité de la maladie (Amoura *et al.*, 2006; Frassanito *et al.*, 1999; Houman *et al.*, 2004; Ilhan *et al.*, 2008). De même, au sein des tissus lésés, on retrouve une infiltration massive et persistante de LT de type Th1 (Imamura *et al.*, 2005).

D'autre part, les LT de type Th2 ainsi que le taux de production des cytokines Th2 sont généralement retrouvés à des niveaux bas (Frassanito *et al.*, 1999; Mantas *et al.*, 1999). Cependant certains travaux ont rapporté l'élévation *in vitro* du taux de production de certaines cytokines de type Th2: l'IL-4 et l'IL-13, suggérant l'existence d'un profil mixte Th1/Th2 au cours de la MB (Raziuddin *et al.*, 1998; Guenane *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'activité cytotoxique des LT et des NK est augmentée au cours de la MB. Le pourcentage de LT CD8⁺ est élevé dans le sang et l'humeur aqueuse des patients (Yu *et al.*, 2004). De même, le taux de granzyme A est élevé dans le plasma de patients ayant une MB active (Accardo-Palumbo *et al.*, 2004).

La sous population lymphocytaire T $\gamma\delta$ semble, elle aussi, jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la MB (Hasan *et al.*, 1996). Les LT $\gamma\delta$ expriment des marqueurs d'activation comme le CD25, CD69 et CD29 et produisent des cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α (Freysdottir *et al.*, 1999). Des LT $\gamma\delta$ ont été retrouvés dans l'humeur aqueuse des patients présentant une uvéite (Trioglio *et al.*, 2003).

c)- Immunité humorale

Bien que le nombre de lymphocytes B des patients atteints de MB soit normal, plusieurs arguments suggèrent que l'immunité humorale participe à la physiopathologie de la maladie. Les LB des patients atteints de la MB expriment des niveaux élevés de marqueurs d'activation tels que le CD13, CD33, CD80 et CD45RO (Eksioglu-Demiralp *et al.*, 1999). Des anticorps anti-cellules endothéliales ont été retrouvés au cours de la MB (Dinc *et al.*, 2003), leur présence est associée à l'existence d'une atteinte ophtalmologique ou de lésions de thrombose vasculaire aiguë (Lee *et al.*, 2003).

Sur la base des données expérimentales, un modèle physiopathologique a progressivement émergé (voir Figures 03 & 04) permettant de mieux comprendre les étapes successives qui président à l'apparition des lésions tissulaires de la MB. Ce schéma met en exergue le rôle effecteur majeur joué par les polynucléaires neutrophiles et les LT cytotoxiques. Ces cellules constituent les cibles cellulaires visées par les nouvelles thérapeutiques.

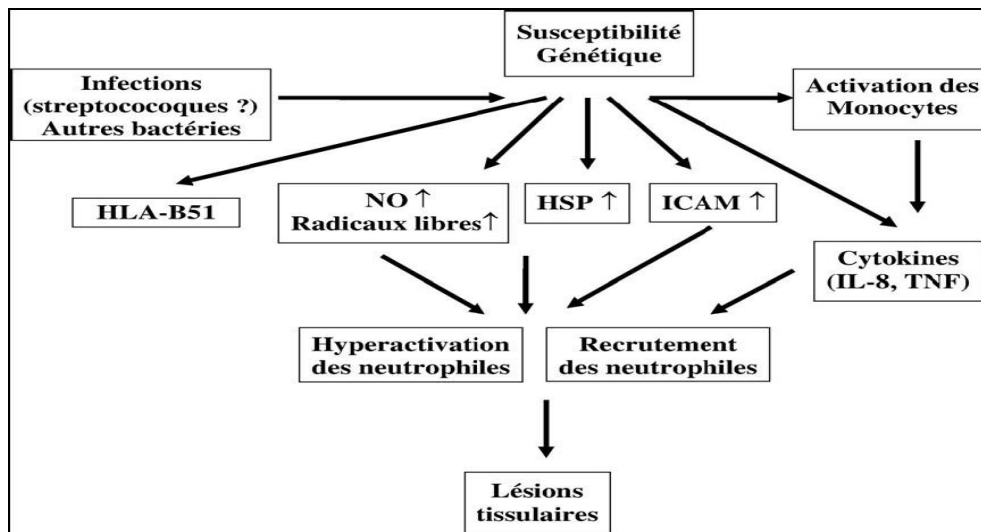


Figure 03: Physiopathologie de la maladie de Behçet. Première étape : les cellules effectrices sont les monocytes et les polynucléaires neutrophiles : a : infection par une bactérie (streptocoques) sur un terrain génétique particulier (HLA-B51, MICA) ; b : activation excessive des monocytes et stimulation de l'expression des HSP et de MICA par des cellules épithéliales et endothéliales (tube digestif, œil, peau, vaisseaux), sécrétion de cytokines par les monocytes, notamment l'IL-8 qui engendrerait un recrutement des polynucléaires neutrophiles intratissulaires ; c : hyperactivation des neutrophiles sous la dépendance notamment de la susceptibilité génétique (hyperexpression des protéines d'adhésion, ICAM, et production accrue de radicaux libres, production de NO) ; d : premières lésions tissulaires par les neutrophiles hyperactifs (Amoura *et al.*, 2006)

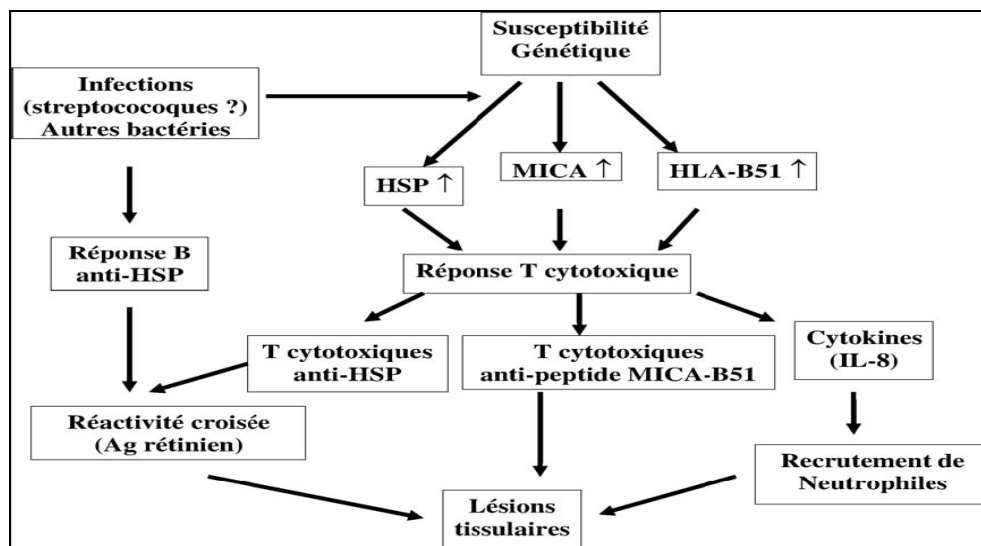


Figure 04: Physiopathologie de la maladie de Behçet. Seconde étape : les cellules effectrices sont les lymphocytes. a : développement d'une réponse T cytotoxique dirigée contre les cellules exprimant les HSP, le peptide formé par l'association HLA-B51-MICA (susceptibilité génétique) ou les Ag rétiniens ; b : lésions tissulaires liées à lyse dépendant des LT cytotoxiques dirigés contre les HSP, le peptide formé par l'association HLA-B51-MICA (susceptibilité génétique) ou les Ag rétiniens (réactivité croisée) ; c : recrutement des neutrophiles lié à la sécrétion de cytokines par les LT ; d : pérennisation et amplification de la réponse inflammatoire et immunitaire ; e : production d'auto-anticorps (Amoura *et al.*, 2006)

I.2.5 Uvéite associée à la maladie de Behçet

L'uvéite est l'une des manifestations les plus caractéristiques de la maladie de Behçet et on ne connaît pas de maladie systémique où elle soit plus fréquente. Elle fait aussi partie des critères majeurs de diagnostic de ce syndrome (Nussenblatt, 1997). Pas moins de six symposiums internationaux ont été consacrés à la maladie de Behçet, et le septième (*Tunis, 1996*) a choisi pour emblème une main dont les doigts représentaient les cinq critères de la maladie (*aphtose buccale, aphtose génitale, atteinte cutanée, atteinte oculaire et manifestations neurologiques*) et la paume était occupée par un œil qui est la principale préoccupation à cause du risque de cécité (Hamza, 2000).

Au cours de la maladie de Behçet, l'uvéite évolue par poussées au rythme moyen d'une crise par an. L'atteinte est souvent bilatérale (60%) et la plupart des patients ayant une atteinte unilatérale développent une uvéite sur l'œil adelphe dans les deux ans qui suivent.

L'uvéite postérieure est très fréquente (70%) et constitue un élément de gravité au cours de la maladie de Behçet. Elle peut être isolée ou concomitante d'une iridocyclite et on parle alors de panuvéite (37%) (Binisti, 1999).

I.2.6 Thérapie

La MB est à ce jour d'étiologie incertaine, de ce fait, il n'existe pas encore de traitement spécifique efficace. Cependant, plusieurs médicaments sont utilisés dans le but d'atténuer la réaction inflammatoire, de traiter les principaux symptômes de la maladie et de limiter les complications et l'altération des organes atteints. Le traitement repose donc essentiellement sur la corticothérapie et les immunosuppresseurs (Zgradić, 1996 ; Belguendouz *et al.*, 2008).

Les corticoïdes (Prédnisone, Prédnisolone, Solumédrol®) sont administrés en première intention en cas de complications graves (notamment oculaire ou neurologique) car ils s'avèrent être très rapidement efficaces par voie orale ou intraveineuse (Binisti, 1999). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Diclofénac, Ibuprofène®) sont généralement utilisés en cas de douleurs articulaires isolées. Dans le cas où le traitement par corticothérapie ne suffit pas, la prise d'un immunosuppresseur en association est nécessaire. Le cyclophosphamide, l'azathioprine et le Tacrolimus (FK 506) sont couramment utilisés en association à la cortisone dans les formes graves de la maladie (Vinet and Busque, 1997). D'autres immunosuppresseurs sont parfois utilisés: Chlorambucil, mycophénolate et cyclosporine.

Malgré l'efficacité prouvée de ces médicaments, leur utilisation fait l'objet d'une surveillance étroite du fait des multiples effets secondaires qu'ils engendrent. Les corticoïdes par exemple, peuvent provoquer une hypertension artérielle, des troubles hormonaux et digestifs et une ostéoporose. Le cyclophosphamide quant à lui augmente le risque d'infection et peut provoquer une cystite hémorragique.

Durant la dernière décennie, la MB a connu un énorme progrès thérapeutique grâce à une meilleure connaissance de l'effet de certaines molécules classiques telle que la Colchicine (Wechsler, 2002) et à la disponibilité de nouvelles thérapeutiques telles que l'Interféron α et les agents anti-TNF- α (Khoudri *et al.*, 2007). En effet, l'*Infliximab*, anticorps monoclonal anti-TNF α , a été utilisé ces dernières années avec succès dans le traitement de la MB. Etant donné l'implication de cette molécule dans l'évolution de la maladie, en traitant les patients atteints de MB avec ce médicament, on a constaté une nette amélioration de l'acuité visuelle avec une diminution rapide de l'inflammation et aucun effet secondaire n'a été noté (Sfikakis *et al.*, 2001; 2004 ; Sfikakis, 2002).

II. Œil, rétine & auto-antigène "l'IRBP"

II Œil, rétine et auto-antigène « l'IRBP »

II.1 L'œil

L'œil est l'organe de la vision. Il permet à un être vivant de voir, donc d'analyser la lumière visible pour interagir avec son environnement. C'est un organe pair (vision stéréoscopique), chargé de la formation et de la transduction de l'image (transformation du signal lumineux en signal électrique transmissible par voie nerveuse) (Lahmar-Belguendouz, 2007).

II.1.1 Anatomie (Figure 05)

La paroi du globe oculaire est formée de l'extérieur vers l'intérieur de trois tuniques:

- ♦ La tunique fibreuse (sclérotique et cornée).
- ♦ La tunique uvéale (iris, corps ciliaire et choroïde).
- ♦ La tunique nerveuse (rétine).

Ces tuniques enferment des milieux transparents:

- ♦ L'humeur aqueuse.
- ♦ Le cristallin.
- ♦ Le corps vitré.

II.1.2 Histologie

II.1.2.1/ La tunique fibreuse

Tunique externe, elle se compose de la sclérotique opaque en arrière et de la cornée transparente en avant.

a)- La sclérotique (ou sclère)

La sclérotique est une coque de tissu conjonctif fibreux, dense, opaque et vascularisé, ouverte en avant au niveau de la cornée, avec laquelle elle se continue, et prolongée en arrière par la dure-mère du nerf optique (Stevens and Lowe, 1997 ; Kierszenbaum, 2006 ; Poirier *et al.*, 2007).

b)- La cornée

La cornée est une lame de tissu conjonctif dense, transparente et avasculaire, revêtue sur chacune de ses faces par un épithélium. La cornée ne contient pas de vaisseaux sanguins. Sa nutrition est assurée par imbibition à partir de l'humeur aqueuse (Stevens and Lowe, 1997; Poirier *et al.*, 2007 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

II.1.2.2/ La tunique uvéale (uvéa)

Elle se compose de trois éléments; l'iris en avant, le corps ciliaire et la choroïde en arrière.

a)- L'iris

L'iris a une forme de disque perforé en son centre par la pupille. Sa face postérieure est revêtue par un épithélium bistratifié poursuivant l'épithélium des procès ciliaires. Le stroma irien, situé en avant de l'épithélium, est formé de tissu conjonctif dans lequel on trouve deux muscles lisses responsables des variations réflexes ou synergiques du diamètre de la pupille ainsi que de nombreuses cellules pigmentaires (Stevens and Lowe, 1997; Poirier *et al.*, 2007 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

b)- Le corps ciliaire

Le corps ciliaire est le prolongement antérieur, à la fois, de la choroïde et de la rétine. Il est constitué par de nombreux procès ciliaires, replis radiaires sécrétant l'humeur aqueuse et formant la couronne ciliaire à laquelle est fixé le ligament suspenseur du cristallin (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006 ; Poirier *et al.*, 2007 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

c)- La choroïde

La choroïde est une mince couche de tissu conjonctif lâche contenant de nombreux vaisseaux sanguins et des nerfs ainsi que des mélanocytes qui lui donnent sa couleur caractéristique. De la superficie vers la profondeur, on distingue 3 couches :

- **La couche des vaisseaux** qui contient de très nombreuses artères et veines tributaires du système des vaisseaux ciliaires.
- **La couche choriocapillaire** caractérisée par la présence d'un important réseau capillaire dépendant des vaisseaux de la couche précédente.
- **La membrane de Bruch** qui correspond à une mince couche de microfibrilles collagènes et élastiques recouverte d'un côté par la membrane basale des capillaires de la couche choriocapillaire et de l'autre par la membrane basale de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006 ; Poirier *et al.*, 2007 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

II.1.2.3/ La tunique nerveuse

Elle se compose de la rétine. Située contre la choroïde, c'est une membrane très mince d'environ 2 ou 3 dixièmes de millimètre. Cette épaisseur se réduisant à un dixième de millimètre au pôle postérieur du globe oculaire au niveau de la macula ou fovéa (Poirier *et al.*, 2007 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

II.1.2.4/ L'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est sécrétée par les procès ciliaires qui constituent la partie profonde du corps ciliaire. Elle est située dans la partie antérieure. C'est un liquide incolore qui occupe l'espace entre la cornée et la face antérieure du cristallin (Poirier *et al.*, 2007).

II.1.2.5/ Le cristallin

Le cristallin est un massif épithélial transparent, non vascularisé. Ses cellules se caractérisent principalement par trois points :

- 1) Elles ont la forme de longs prismes hexagonaux tassés les uns contre les autres.
- 2) Leur noyau a en général disparu.
- 3) Leur cytoplasme contient des protéines spécifiques (ou cristallines) synthétisées sur place pendant la différenciation et se présentant en microscopie électronique sous forme de nombreux microfilaments (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006 ; Poirier *et al.*, 2007).

II.1.2.6/ Le corps vitré

Le corps vitré est un milieu liquide transparent, fait d'eau, de glycosaminoglycanes et de collagène. En microscopie électronique, il apparaît constitué de fins filaments répartis au sein d'une matrice extracellulaire amorphe (Hogan *et al.*, 1971; Gartner et Hiatt, 1997).

II.2 La rétine

La rétine est une fine membrane tapissant la surface interne du globe oculaire. Tissu sensoriel, elle est capable de capter les rayons lumineux et de transmettre les informations visuelles au système nerveux central (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006 ; Poirier *et al.*, 2007).

II.2.1 Origine embryologique

Embryologiquement, la rétine est une expansion du cerveau et c'est le seul élément du globe oculaire à présenter une origine neurale. A la troisième semaine du développement embryonnaire, apparaissent au niveau du cerveau deux vésicules optiques primitives, évagination du tube neural auquel elles restent reliées par un pédoncule. A la cinquième semaine, cette vésicule s'invagine sur elle-même aboutissant à la constitution d'une calotte double paroi (deux feuillets: externe et interne); c'est la vésicule optique secondaire. Au cours du deuxième mois, apparaissent dans le feuillet interne les différents éléments de la rétine visuelle tandis que le feuillet externe se transforme en épithélium pigmentaire (Lavoie, 2007).

II.2.2 Anatomie de la rétine

II.2.2.1/ Organisation cellulaire

La rétine neurale est constituée de six types principaux de neurones: les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules interplexiformes et les cellules ganglionnaires (Fort, 2005).

a. Les photorécepteurs Il s'agit de cellules hautement spécialisées qui convertissent l'information lumineuse en information nerveuse par le phénomène de phototransduction. Il existe deux types de photorécepteurs possédant une morphologie et des fonctions relativement différentes : les bâtonnets et les cônes. Ils possèdent cependant tous deux une partie distale spécialement dédiée à la capture de la lumière composée des segments externes et internes, cette dernière étant connectée au corps cellulaire. La partie proximale, composée de l'axone et de la terminaison synaptique, permet de transmettre l'information nerveuse. Une autre caractéristique commune des photorécepteurs est qu'ils utilisent tous le glutamate comme neurotransmetteur (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006).

b. Les neurones secondaires Il s'agit des cellules neuronales traitant directement (les cellules bipolaires) ou indirectement (les cellules horizontales, amacrines et interplexiformes) l'information transmise par les photorécepteurs (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006).

b.1/ Les cellules bipolaires Elles sont responsables de la transmission de l'information nerveuse provenant des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires et amacrines.

b.2/ Les cellules horizontales Elles participeraient à la modulation de l'information lumineuse transmise par les photorécepteurs.

b.3/ Les cellules amacrines La plupart des cellules amacrines sont situées dans la partie proximale de la couche nucléaire interne. Cependant, certaines cellules appelées cellules

amacrines déplacées sont retrouvées dans la couche des cellules ganglionnaires. Bien qu'elles aient toutes la même fonction, moduler les signaux dans la couche plexiforme interne, leurs morphologies et leurs caractéristiques neurochimiques ont conduit à en différencier jusqu'à cinquante types différents (Kolb *et al.*, 2002).

b.4/ Les cellules interplexiformes Les corps cellulaires de ces cellules se situent au niveau de la couche nucléaire interne alors que leurs prolongements vont à la fois dans la couche plexiforme externe et la couche plexiforme interne. Elles sont responsables du transport d'un signal rétrograde entre la couche plexiforme interne et externe.

c. Les cellules ganglionnaires Les cellules ganglionnaires collectent les informations visuelles qui ont traversé toute la rétine et les transmettent au cerveau. Leurs corps cellulaires projettent leurs dendrites dans la couche plexiforme interne où elles forment des synapses avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines (Stevens and Lowe, 1997; Kierszenbaum, 2006).

Les neurones sont en contact étroit avec la glie radiaire qui les supporte appelée: cellule gliale de Müller. D'autres cellules gliales, principalement des astrocytes, sont présentes dans la rétine. Ces cellules gliales jouent un rôle prépondérant dans l'immunité rétinienne (Yang *et al.*, 2002).

II.2.2.2/ Organisation structurale (Figure 06)

La rétine visuelle est composée de deux feuillets, un feuillet externe pigmenté et un feuillet interne neuro-sensoriel (Stevens and Lowe, 1997).

a. Le feuillet externe ou "épithélium pigmentaire rétinien (EPR)"

Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales riches en mélanine, au contact des segments externes des photorécepteurs. Il est indispensable au maintien de l'intégrité de ces cellules, à leur survie et à la phototransduction. En effet, les cellules de l'EPR assurent la phagocytose et la dégradation des disques des segments externes des photorécepteurs tout au long de la vie. Elles participent à la phototransduction en assurant une partie du recyclage constant du trans-rétinal (un dérivé de la vitamine A) en 11-cis-rétinal, chromophore photosensible. Cette monocouche assure également un rôle de barrière hémato-rétinienne en contrôlant le flux de nutriments du sang vers la rétine. Outre le rôle d'écran que lui confère son caractère pigmenté, cet épithélium assure donc les apports métaboliques fondamentaux nécessaires au bon fonctionnement des cellules visuelles (Strauss, 2005).

b. Le feuillet interne ou rétine neuro-sensorielle

La structure réceptrice de la lumière est contenue dans le feuillet interne de la rétine. Ce feuillet est composé de neuf couches successives adossées à l'épithélium pigmentaire (Stevens and Lowe, 1997):

- **La couche des segments externes des photorécepteurs.**
- **La membrane limitante externe.**
- **La couche nucléaire externe**, composée par les corps cellulaires des photorécepteurs.

- **La couche plexiforme externe**, formée des synapses des photorécepteurs avec les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules interplexiformes.
- **La couche nucléaire interne**, composée des corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et interplexiformes ainsi que les noyaux des cellules gliales de Müller.
- **La couche plexiforme interne**, formée des synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires.
- **La couche des cellules ganglionnaires**, qui contient aussi les cellules amacrines déplacées.
- **Les fibres nerveuses**, correspondant aux axones des cellules ganglionnaires allant former le nerf optique.
- **La membrane limitante interne**, constituée des pieds des cellules gliales de Müller.

Les feuillets "externe" et "interne" sont séparés par la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs.

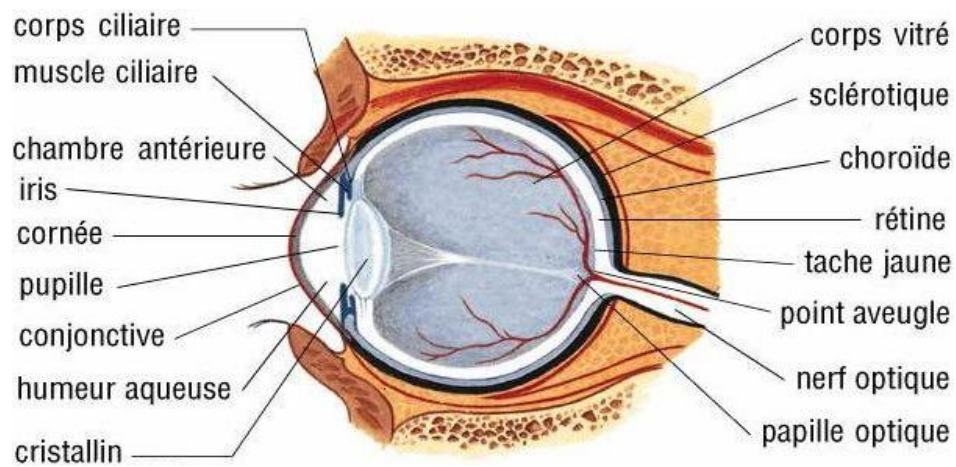


Figure 05: Anatomie de l'œil

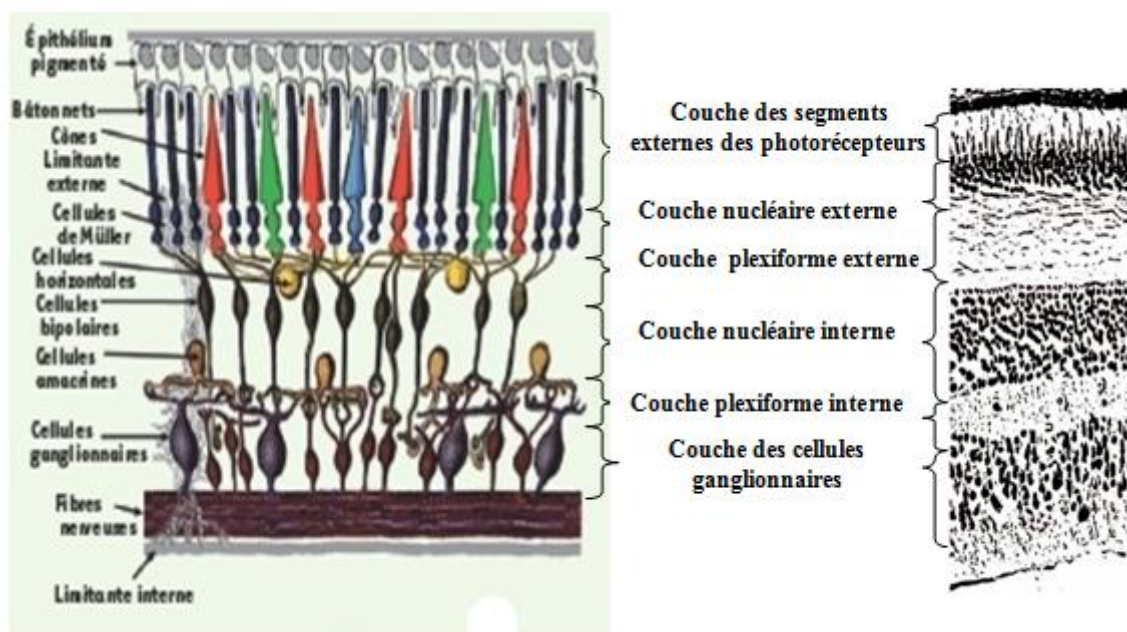


Figure 06: Structure de la rétine

II.3 Les auto-antigènes rétiniens

De nombreux travaux ont mis en évidence une réponse auto-immune dirigée contre certains constituants de la rétine dits «auto-antigènes», notamment au cours de l'uvéïte associée à la maladie de Behçet (Yamamoto *et al.*, 1993; Hamzaoui *et al.*, 1998). Ces auto-antigènes rétiniens sont essentiellement: l'**IRBP** et l'**antigène S**. Lorsque ces derniers sont injectés à des animaux de laboratoire, ils sont capables d'induire une inflammation intraoculaire dont les caractéristiques sont très proches de celles de l'uvéïte humaine (Gery *et al.*, 1986; Caspi, 2003; Wildner *et al.*, 2008; Caspi *et al.*, 2008). Par ailleurs, d'autres molécules obtenues à partir des segments externes des photorécepteurs sont capables elles aussi d'induire l'uvéïte auto-immune chez les modèles animaux, il s'agit de la rhodopsine, la recoverine et la phosducine (Adamus and Chan, 2002).

II.3.1 L'Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein «IRBP»

La protéine IRBP fut découverte par Wiggert et ses collaborateurs en 1977 (Wiggert *et al.*, 1977). Cette molécule fait partie des RBP «Rétinoids-binding proteins», chargées du transport des rétinoïdes (métabolites actifs de la vitamine A), parmi lesquelles on trouve: la «sérum retinol-binding protein (RBP)» au niveau de la circulation sanguine, la «Cellular retinol-binding protein (CRBP)», «Cellular retinoic acid-binding protein (CRABP)» et la «Cellular retinal-binding protein (CRALBP)» au niveau de différents types cellulaires et enfin l'«interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)» au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs (Noy, 2000).

II.3.1.1/ Structure (Figure 07 & Figure 08)

L'IRBP est une glycoprotéine soluble de haut poids moléculaire avoisinant les 140 kDa chez le bovin et le rat, et 135 kDa chez l'humain (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 1984 ; Saari *et al.*, 1985). Il s'agit d'une molécule asymétrique, de forme ellipsoïdale synthétisée et sécrétée par les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs (Gonzalez- Fernandez *et al.*, 1992; Hessler *et al.*, 1993).

La partie protéique de l'IRBP de mammifères est constituée d'environ 1230 acides aminés et est composée de quatre domaines homologues d'environ 300 résidus d'acides aminés chacun et dont les similitudes varient entre 33 et 38% (Fong and Bridges, 1988). Cette partie protéique enferme au moins trois sites de liaison aux rétinoïdes (Shaw and Noy, 2001) ainsi qu'un ou deux sites de liaison aux acides gras à longues chaînes polyinsaturées (Noy, 2000).

La partie glycosylée de l'IRBP bovin représente 7 à 8% (Fong *et al.*, 1984; Redmond *et al.*, 1985; Saari *et al.*, 1985). Elle est constituée essentiellement d'acide sialique, de N-acétylglucosamine, de galactose, mannose et fucose (Fong *et al.*, 1984; 1985).

La structure tridimensionnelle de l'IRBP native n'a à ce jour pas encore été élucidée en raison de la complexité structurale de la molécule. En revanche, la structure des quatre domaines homologues à part a été récemment établie (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2007) (figure 08).


```

1 FQ FSLML EM AQVLLDNYCFENLMGMQGAIEQAI KSQEILSISDPQTLAHVITAGVQSSLNDRLLVLSYE
2 RALAGVIOQLQEAALREYVTLVDRVRAALLSHLAAMDLSV VSEDDL VT KENAGLQAVSEDPRLQVQVVR
3 RSLGELVEG T GRLLAEHYARREVVGMGALLRAKLAQGAYRTAVDLES LASQTADDQEMSGDHLVLFHS
4 AKVPT SLQ TA GKLVADNYASRELGVKMAAELSG L QSRY ARRTSEAALAEELQADQLVLSGDHHEKTAHI

      CHO
1 PST LEAPPRAVATNLLEEIAGLDGLRHEIEGNVGYLRVDDIPGOE
2 PKEASSGPEEEAEPEAVPEVPEDEAVRRALVDSVFQVSVLPENVGYLRKDSFADAS
3 PGE MVAEEAPPPPV VPSPEELSYLJEAL FKTEVLPQOLGYLRDAMAELS
4 PEDAKDRI PGIVPMQIPSPREVFEDLKFS FHINVEGNVGYLRDFDMFGDCE

      CHO
1 VMSKLRSLVANYWRREYNTSAVLDERHCTGGHVGGIRYVISYLHPGSTVS HVDIVYVAPPSNTTIT
2 VLEVLPGYILHQWPEQDTEHIMDLRQPPGQSSAVRLLSYEQSPDASVVR PESTYDARTNITR CHO
3 TVKAVGPQEVOLVWQKMDIAAVVDERYMPGSSYSTAVPLCSYFEAE PRRHEYSVDFRATSRTV
4 LLTQVSELLVEHYVKEIMHDAIVDMRFNIGPTSSISALCSYFDEGPPILQDKINRPNNSVS

      CHO
1 EIWLPEALGEKYSADKDVVLTSSRTGGVAEDIAKYLKOMRRAIVVGERVGG
2 EHFQOTELLGRPYGTORGYYLTSHRTATAAEELAFMQSLGWATLVGEIAGSLLH
3 EVVTLPHVTGORYGSHKDLVVLVSHTSASAFAHTMQDLQRATIIIEPTAGG
4 ELVTLISOLEGERYGSKCSMVLTSTLTAGRAEFTYIMKRLGRALVIGEVES

1 ALNLQKLRYGQSDFFETVPVSRSLGPLGEGSQTWEGSQVLPVGTAEQALEKALAVLMRL
2 THTVSLLETPEGGLATVPVLTFFID NHGECALGGGVVPAIVLAEELADRAQEVLEFH
3 ALSVGIYQVGSSALYASMPQMAMASSTGEANDLAQVEPDITVMSVAESTARDITVLR
4 GGCQPPQTYHVDTDLYLTIPTARSVGAADGSSWEGGVVVDVAVPAEALTRQEMLQHTPL

4 RARRSPRLHGRRKGHHRQSQGRAGSLGRNQGVVRPEVLTAPSGQKRGLLQCG

```

Figure 07: Séquence amino-acide complète de l'IRBP bovin et alignement des quatre domaines homologues. (Zones hachurées représentent les résidus d'aa identiques entre les quatre segments, les sites d'attachement des résidus glucidiques sont encadrés et représentés par le terme "CHO", les sites de phosphorylation potentiels sont encadrés par des traits discontinus. (Chader, 1989)

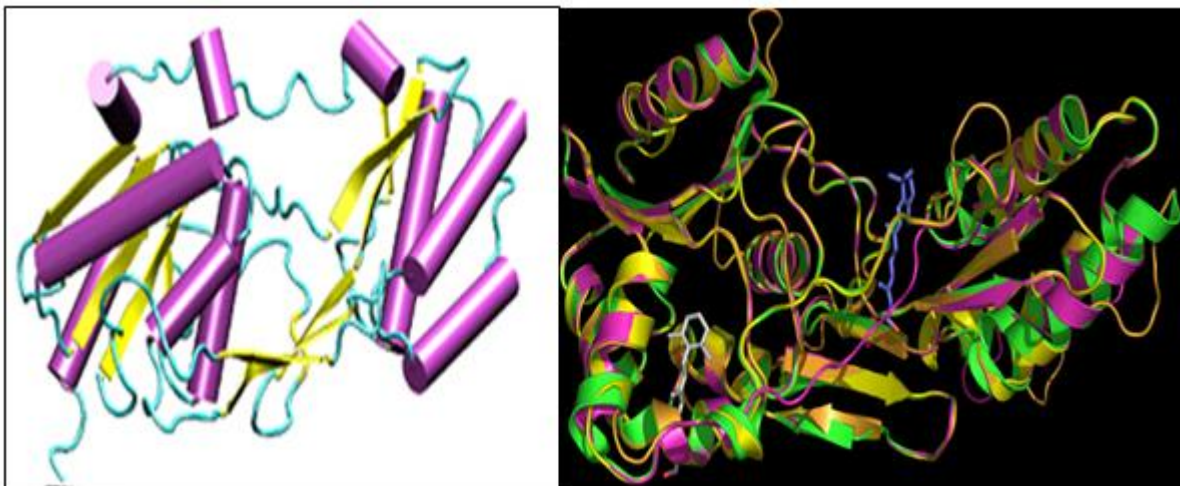


Figure 08: A gauche: Structure tridimensionnelle du deuxième domaine de l'IRBP de *Xenopus laevis*. A droite: superposition des quatre domaines de l'IRBP de *Xenopus laevis*. (Domaine 1: orange, Domaine 2: vert, Domaine 3: violet, Domaine 4: jaune). Ainsi que la position de deux sites de liaison aux rétinoïdes représentés en bleu et gris. (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2007)

II.3.1.2/ Localisation (Figure 09)

L'IRBP représente une des protéines majeures de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs (MEEI) qui sépare la rétine nerveuse de l'épithélium pigmentaire (Bok, 1993; Mieziowska, 1996). La MEEI est une structure complexe constituée essentiellement par l'IRBP, des facteurs de croissance (Hageman *et al.*, 1991; Hewitt *et al.*, 1990), des métalloprotéases (Plantner *et al.*, 1998) et des glycosaminoglycanes sulfatés (Kuehn and Hageman, 1999). La MEEI assure l'adhésion de la rétine neurosensorielle à l'épithélium pigmentaire, la phagocytose des segments externes des photorécepteurs ainsi que les échanges des nutriments (Gonzalez-Fernandez, 2003).

Pendant longtemps on pensait que l'IRBP était restreint uniquement à la MEEI mais dernièrement, l'IRBP a été retrouvé au niveau de l'humeur aqueuse de l'œil humain (Salvador-Silva *et al.*, 2005). En plus de l'œil, l'IRBP a également été détecté au niveau de la glande pinéale (Rodrigues *et al.*, 1986).

II.3.1.3/ Structure du gène codant l'IRBP (Figure 10)

Le gène codant l'IRBP bovin a une longueur de 11.6 kb, il est composé de quatre exons et de trois introns. Contrairement à la plupart des protéines où un exon code pour un domaine particulier, pour l'IRBP les trois premiers domaines de la protéine ainsi qu'une partie du quatrième sont codés par le premier exon. La partie restante du quatrième domaine est codée par l'exon 2, 3 et le début de l'exon 4 (Borst and Nickerson, 1988).

II.3.1.4/ Rôle physiologique

Le rôle physiologique de l'IRBP serait intimement lié à la fonction même de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs qui l'abrite. Cette dernière joue un rôle important dans le développement de la rétine nerveuse et dans le transport des nutriments et molécules nécessaires à la fonction de la rétine. L'IRBP participerait donc à ces deux fonctions (Gonzalez-Fernandez, 2003).

II.3.1.4.1/ *Rôle de l'IRBP dans le développement de la rétine nerveuse*

Plusieurs études ont démontré que le développement de la rétine des vertébrés dépend des interactions entre l'épithélium pigmentaire et la rétine nerveuse (Hollyfield and Witkowsky, 1974; Stiemke *et al.*, 1994). D'autre part, il a été démontré que l'IRBP est exprimé tôt au cours du développement de la rétine (Desjardin *et al.*, 1993; Gonzalez-Fernandez and Healy, 1990; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 1993; Liou *et al.*, 1994). De plus, une dégénérescence précoce des photorécepteurs est observée chez les souris Knock out pour l'IRBP (Liou *et al.*, 1998). Ce qui amène à dire que l'IRBP participerait au développement de la rétine nerveuse et ceci probablement en facilitant le transport des nutriments entre l'épithélium pigmentaire et la rétine (Gonzalez-Fernandez, 2003).

II.3.1.4.2/ *Rôle de l'IRBP dans le transport des rétinoïdes au cours de la phototransduction*

On désigne par le terme «rétinoïdes» tout métabolite actif de la vitamine A. Ce sont des molécules indispensables dans le règne animal puisqu'elles interviennent dans de nombreux processus biologiques comme l'embryogenèse, la reproduction et la vision (Noy, 2000).

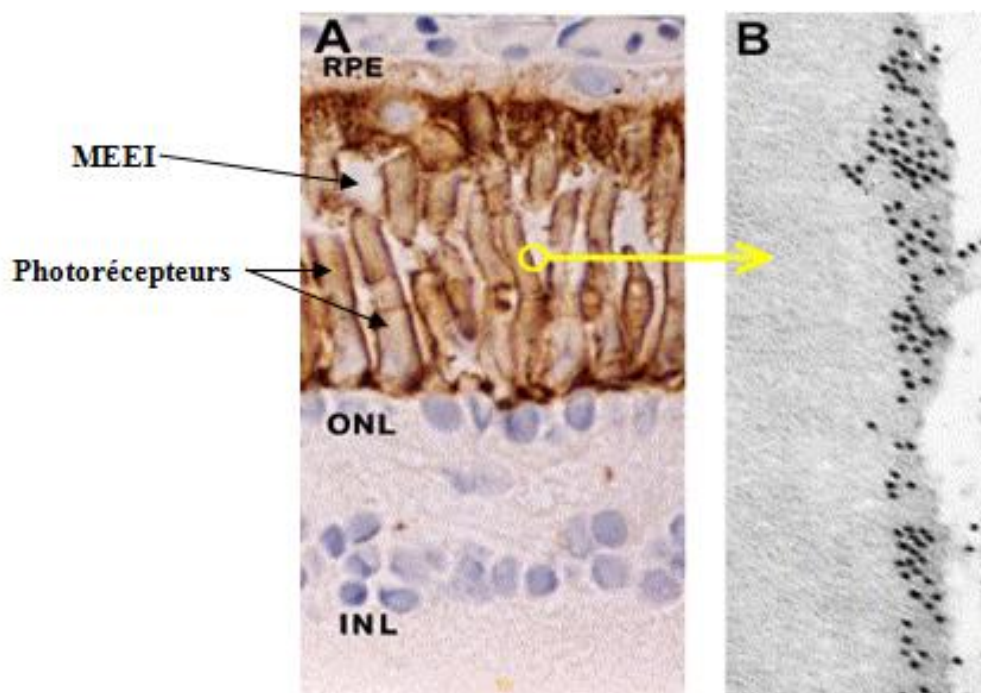


Figure 09: Localisation de l'IRBP au niveau de la rétine de *Xenopus laevis*.
 A: distribution de l'IRBP au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs.
 B: agrandissement d'une partie du segment externe d'un bâtonnet. L'IRBP apparaît sous forme de taches noires en contact avec la surface du segment externe du bâtonnet. (Hessler *et al.*, 1996)

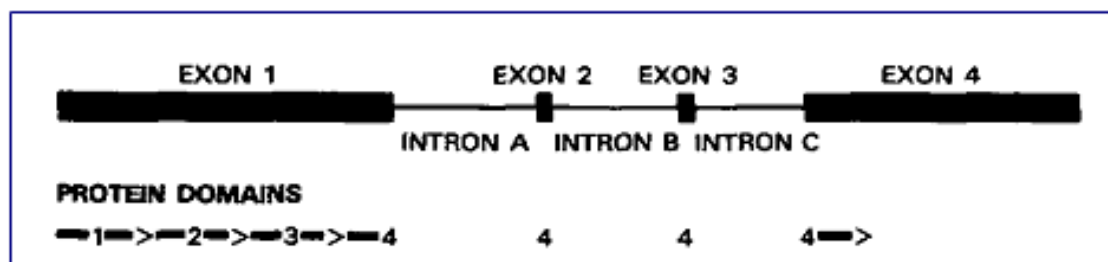


Figure 10: Structure du gène codant l'IRBP bovin (Borst and Nickerson, 1988)

A l'échelle moléculaire, les rétinoïdes sont constitués de la même structure de base qui correspond à un cycle non aromatique à longue chaîne polyène avec un groupement polaire pouvant prendre la forme d'un alcool (cas du rétinol), d'un aldéhyde (cas du rétinol) ou celle d'un acide (cas de l'acide rétinoïque) suivant les étapes de leur transformation (Dicken, 1984).

La phototransduction s'effectue en trois grandes étapes:

1. La lumière pénétrant l'œil, interagit avec la molécule de rhodopsine. Cette dernière est une glycoprotéine membranaire des disques des photorécepteurs (bâtonnets), composée d'une protéine transmembranaire couplée à une protéine G "opsine" et d'un groupement chromophore absorbant la lumière le "11-*cis* rétinol (fig I-11"A"). L'absorption des photons induit l'isomérisation du 11-*cis* rétinol en all-*trans* rétinol conduisant à un changement conformationnel de la rhodopsine qui sera nommée metarhodopsine II.
2. La metarhodopsine II active la phosphodiesterase (PDE) via une protéine G; la transducine. La PDE hydrolyse le GMPc.
3. La diminution de la concentration intracellulaire du GMPc conduit à la fermeture des canaux sodiques (Na⁺) provoquant ainsi une hyperpolarisation de la membrane plasmique des bâtonnets (Purves *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2001). (fig 11"B").

La régénération des différentes molécules est initiée par la phosphorylation de la rhodopsine par une rhodopsine kinase. Une fois phosphorylée, la rhodopsine se lie à l'arrestine visuelle qui empêche la fixation d'une autre transducine sur la metarhodopsine II phosphorylée et permet la libération du all-*trans* rétinol. Ce dernier est enzymatiquement réduit en all-*trans* rétinol qui sera transporté vers l'épithélium pigmentaire où il est isomérisé en 11-*cis* rétinol (Molday, 1998).

L'IRBP joue un rôle important dans le transport du all-*trans* rétinol des photorécepteurs vers l'épithélium pigmentaire et du 11-*cis* rétinol dans le sens inverse, ce qui permet la régénération de la rhodopsine (Bach, 2002) (figure 12).

L'IRBP permet de solubiliser les rétinoïdes (molécules hydrophobes) dans la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs et les protège de toute dégradation (Crouch *et al.*, 1992; Pepperberg *et al.*, 1993).

D'autre part, une étude menée par Ho et ces collaborateurs a démontré que l'IRBP n'est pas qu'une simple molécule servant à transporter les rétinoïdes, bien au contraire elle interviendrait dans le contrôle du débit de transport de ces métabolites. En effet, le transfert du all-*trans* rétinol des liposomes vers la membrane du segment externe des bâtonnets via une phase aqueuse (en l'absence d'IRBP) se fait d'une manière très rapide. Ce transfert est nettement retardé en présence d'IRBP (Ho *et al.*, 1989).

II.3.1.5/ Rôle physiopathologique

Plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'une réponse auto-immune dirigée contre l'IRBP (ou certains peptides dérivant de l'IRBP) chez des patients atteints d'uvéite idiopathique (Matsuo *et al.*, 1986) et d'uvéite behçet (De Smet *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1993; Hamzaoui *et al.*, 1998). En effet, Yamamoto et ces collaborateurs ont démontré que les lymphocytes T de patients atteints d'uvéite Behçet, mis en culture en présence d'IRBP répondent au stimulus induit par cet antigène et prolifèrent. Cette réponse étant par ailleurs bloquée par l'addition d'anticorps monoclonaux anti-CD4.

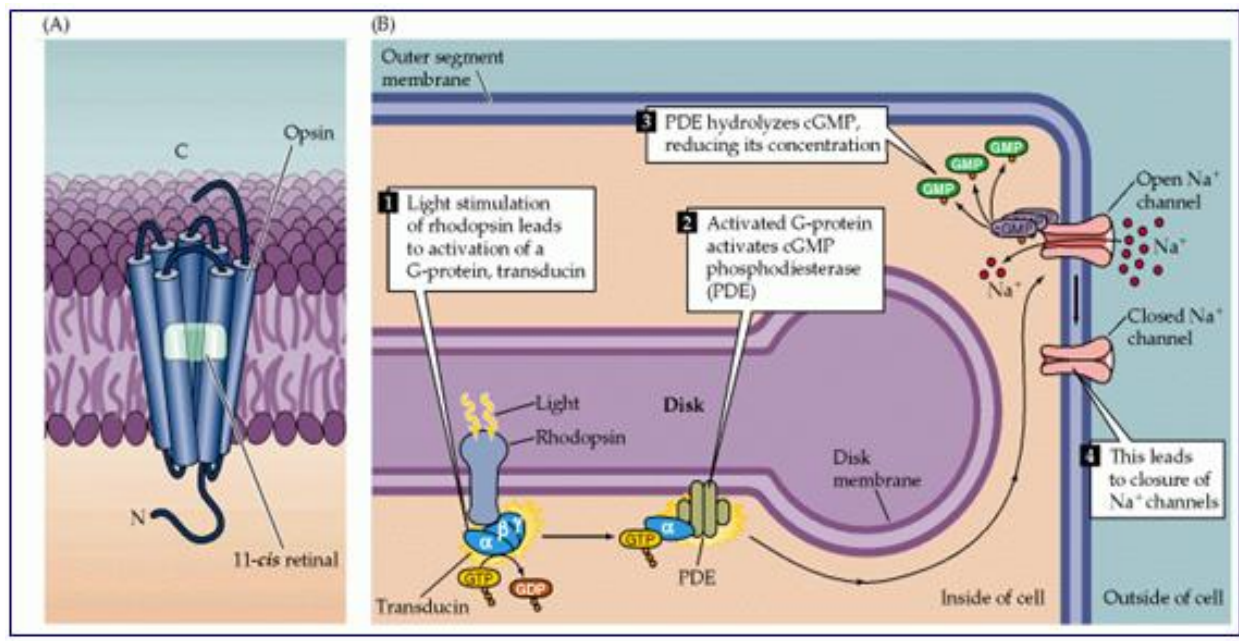


Figure 11: Processus de phototransduction. A: Structure de la rhodopsine.
B: Etapes de la phototransduction (Purves *et al.*, 2001)

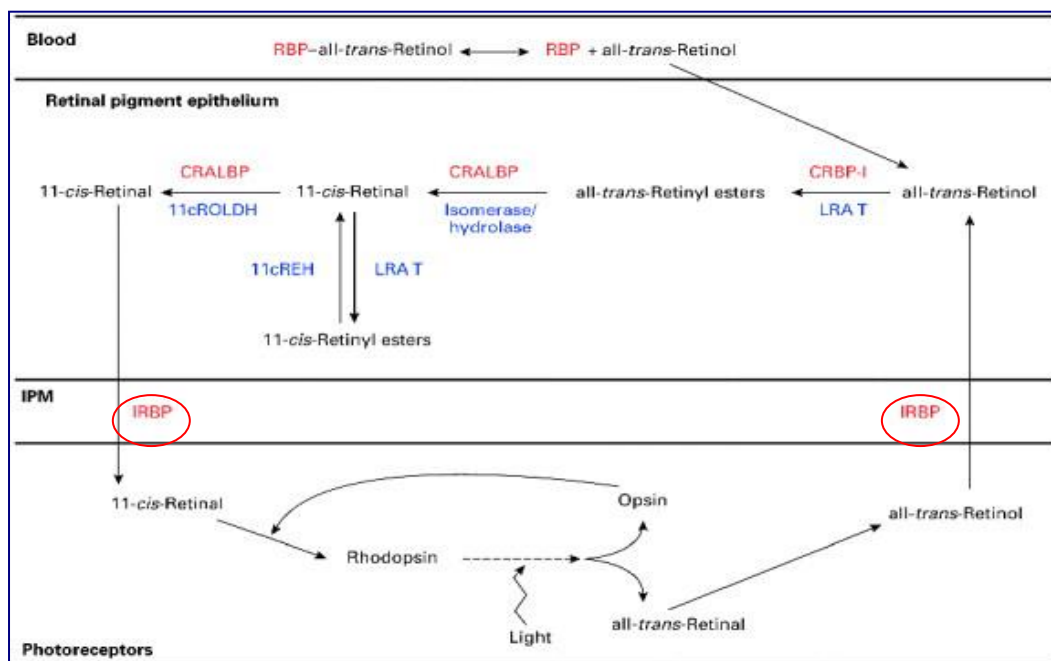


Figure 12: Rôle de l'IRBP dans le transport des rétinoïdes (11-cis rétinol et all-trans rétinol) au cours de la phototransduction (Noy, 2000).
(IPM : matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs)

Ces données impliquent fortement l'existence de lymphocytes T autoréactifs vis-à-vis de l'IRBP chez les patients atteints d'uvéïte Behçet.

Une autre étude réalisée sur l'humeur aqueuse de patients atteints d'uvéïte idiopathique, d'uvéïte associée à la maladie de Behçet, à la spondylarthrite ankylosante et à la Vogt-Koyanagi Harada, a mis en évidence une protéolyse de l'IRBP alors que chez les sujets sains l'IRBP était intact (Descamps *et al.*, 2008). Ces observations sont expliquées par le fait que l'IRBP, auto-antigène dominant au niveau de l'œil, est dégradé afin de libérer des épitopes spécifiques. Ces derniers seraient accessibles à travers la circulation sanguine aux lymphocytes T autoréactifs. Ils initieraient ou exacerberaient la réponse inflammatoire. L'IRBP est considéré donc comme un bio-marqueur dont la protéolyse témoigne de la présence d'inflammation oculaire associée aux maladies systémiques (Descamps *et al.*, 2008).

D'autre part, l'IRBP semble être impliqué dans certaines pathologies génétiques caractérisées par une dégénérescence de la rétine, telle que la rétinite pigmentaire. En effet, plusieurs études ont mis en évidence des taux faibles d'IRBP au niveau des yeux de patients atteints de cette pathologie. Ces données suggèrent une défaillance probable au niveau de la synthèse, de la sécrétion et/ou du métabolisme de l'IRBP (Bridges *et al.*, 1985; Rodrigues *et al.*, 1985). Par ailleurs, l'IRBP est considéré comme l'une des molécules les plus uvéitogènes de l'extrait soluble rétinien, capable d'induire une uvéïte auto-immune expérimentale ainsi qu'une pinéalite auto-immune expérimentale une fois injectée au modèle animal (rat, souris, lapin, singe) (Hirose *et al.*, 1986; Eisenfeld *et al.*, 1987; Caspi *et al.*, 2008).

II.3.2 L'antigène S « arrestine visuelle »

L'antigène S est une composante majeure des segments externes des photorécepteurs. C'est une protéine de 48 kDa composée d'une chaîne polypeptidique de 404 acides aminés et caractérisée par des degrés différents de glycosylation (Palczewski, 1994).

L'antigène S appartient à la famille des arrestines, ces protéines de petits PM sont impliquées dans la régulation des récepteurs couplés aux protéines G (Palczewski, 1994). En effet, l'antigène S est capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à la rhodopsine sous forme phosphorylée, empêchant ainsi la fixation de la transducine (krupnick *et al.*, 1997) et mettant fin à la cascade de signalisation lumineuse.

L'antigène S est par ailleurs doté d'un pouvoir auto-antigénique qui induit une réponse auto-immune à médiation humorale ou cellulaire (Uusitalo *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1993). L'auto-immunité contre cette molécule est observée au cours d'uvéïtes associées à des manifestations systémiques, qu'elles soient d'origine inflammatoire (maladie de Behçet) ou parasitaire (toxoplasmose) (Gregerson *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1993).

De plus, tout comme l'IRBP, l'antigène S est capable de provoquer une uvéïte auto-immune expérimentale une fois injecté au modèle animal (rat) (De kozak *et al.*, 1981).

III. L'uvéite auto-immune expérimentale (UAE)

III L'uvéite auto-immune expérimentale (UAE)

III.1 Définition

L'UAE est un modèle bien établi d'uvéite endogène postérieure qui ressemble à certaines pathologies observées chez l'homme comme la maladie de Behçet, la rétinopathie de Birdshot et l'ophtalmie sympathique. Ces dernières sont des uvéites non infectieuses. Elle est induite chez différents animaux de laboratoire: cobaye, rat, souris, singe par immunisation avec des auto-antigènes purifiés de la rétine en présence d'adjuvants. L'induction de l'UAE peut être aussi réalisée par le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques aux auto-antigènes rétiens, prélevés à partir d'animaux syngéniques ayant été au préalable immunisés avec ces auto-antigènes (Caspi *et al.*, 1986 ; Caspi, 2006 (a)).

La sensibilité à développer l'UAE varie selon le modèle utilisé. En effet, le rat *Lewis* est le plus sensible alors que le rat *Brown-Norway* est réfractaire (De kozak, 2000 ; Caspi, 2006 (a)). Les principaux auto-antigènes utilisés sont principalement l'antigène-S, l'IRBP, la rhodopsine, la recoverine et la phosducine. Ces antigènes sont phylogénétiquement très bien conservés (De kozak, 2000 ; Caspi, 2006 (a)).

III.2 Mécanismes physiopathologiques

L'œil est un organe immunoprivilégié, protégé contre tout phénomène risquant de compromettre la transmission du signal lumineux notamment les réponses immunes inflammatoires destructives (Renier, 2008). Il est bordé d'une barrière hémato-rétinienne (empêchant l'accès de plus de 99% des grandes protéines sériques : IgG, complément), il est dépourvu de système de drainage lymphatique, caractérisé par une faible expression des molécules du CMH et des molécules costimulatrices. Le milieu intraoculaire est caractérisé par l'expression intense du TGF- β ainsi que le Fas-ligand responsable de l'effet apoptotique exercé par le tissu oculaire sur les lymphocytes pénétrant l'œil et exprimant les molécules Fas. Ces caractéristiques n'excluent pas pour autant toute protection locale contre les agents infectieux, et ceci via un mécanisme particulier visant à contrôler la réponse immunitaire et à l'orienter vers un profil humoral au dépend de la réponse cellulaire. Ce phénomène est connu sous le nom d'ACAID « anterior chamber associated immune deviation » (Nussenblatt and Gery, 1996 ; Caspi, 2006 (b); Renier, 2008).

La tolérance au soi est assurée par des mécanismes centraux et périphériques. En effet, le thymus exprime de nombreux antigènes du soi qui contribuent à éliminer les lymphocytes T autoréactifs par le phénomène de sélection négative (Gallegos and Bevan, 2006). Dans le cas des auto-antigènes rétiens, de nombreuses études sur le modèle animal ont confirmé leur expression au niveau du thymus. Cependant, il apparaît que le niveau d'expression varie selon le modèle et serait étroitement lié à la sensibilité de ce dernier à développer l'UAE (Egwuagu *et al.*, 1997). Cette observation a par ailleurs été confirmée chez l'Homme (Takase *et al.*, 2005). Cette équipe a démontré qu'il existait une variabilité dans l'expression thymique des auto-antigènes oculaires et qu'une faible expression favoriserait l'apparition de clones de lymphocytes T autoréactifs spécifiques circulants.

D'autre part, les lymphocytes T autoréactifs non éliminés au niveau du thymus, peuvent toutefois être anergisés en périphérie en rencontrant leur antigène spécifique en absence de costimulation. Mais étant donné que les auto-antigènes rétiens sont séquestrés au niveau du pôle postérieur de l'œil, les mécanismes de tolérance périphérique échouent eux aussi et les lymphocytes T autoréactifs persistent (Caspi, 2006 (b) ; Renier, 2008).

Du fait de l'inefficacité des mécanismes de tolérance centrale et périphérique, les lymphocytes T autoréactifs spécifiques aux auto-antigènes oculaires sont présents en périphérie et peuvent être à tout moment activés dans des conditions appropriées. Celles-ci peuvent être soit la sortie des auto-antigènes en question vers la circulation sanguine où ils seront présentés à ces lymphocytes T, soit par le phénomène de mimétisme moléculaire exercé par un agent infectieux présentant des épitopes communs avec ces auto-antigènes (Wildner and Diedrichs-Mohring, 2004; Caspi, 2006 (b) ; Renier, 2008).

Le mécanisme d'induction de l'UAE repose sur l'immunisation d'un modèle expérimental sensible par un auto-antigène rétinien homologue ou hétérologue injecté dans un site éloigné du globe oculaire, afin qu'il soit présenté aux lymphocytes T autoréactifs spécifiques circulants. Ce phénomène déclenchera une cascade d'événements impliquant le système immunitaire et aboutissant à des désordres histophysiologiques touchant les différentes tuniques oculaires et se manifestant par une uvéite (Gery and Streilein, 1994; Nussenblatt and Gery, 1996).

III.2.1 Modulation du système immunitaire au cours de l'UAE (Figure 13)

De nombreux travaux ont démontré le rôle central des lymphocytes T CD4⁺ au cours de l'UAE (Chan *et al.*, 1985 ; Caspi, 1989 ; Caspi *et al.*, 1997). En effet, le transfert de lymphocytes T CD4⁺ activés spécifiques aux auto-antigènes rétiniens entre animaux syngéniques conduit au développement de l'UAE (Mochizuki *et al.*, 1985; Caspi *et al.*, 1986). De plus, il a été démontré que l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD4 bloque le développement de l'UAE chez le rat *lewis* immunisé par les auto-antigènes rétiniens (Atalla *et al.*, 1990).

Par ailleurs, d'autres travaux ont rapporté la prédominance du profil Th1 au cours de l'UAE (Caspi, 1994 (a) ; Caspi *et al.*, 1996), il apparaît même que la sensibilité à développer l'UAE chez le model animal est intimement liée à la capacité d'instaurer une réponse Th1 contre les auto-antigènes rétiniens. Il a également été démontré que suite à l'introduction de l'auto-antigène, les lymphocytes T spécifiques activés et polarisés en Th1 migrent en premier vers l'œil et traversent la barrière hémato-rétinienne pour induire la destruction de la rétine (Xu *et al.*, 2004; Crane *et al.*, 2006).

En plus du profil Th1, des travaux récents ont démontré l'implication de la voie Th17 dans la physiopathologie de l'UAE (Luger *et al.*, 2008). En effet, l'expression de l'IL-17 au niveau de la rétine et des ganglions lymphatiques a été détecté au cours des phases actives de l'UAE chez la souris B10.RIII (Amadi-Obi *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007). De plus, le traitement par les anticorps anti-IL-17 réduit considérablement l'intensité et la sévérité de la maladie (Jiang *et al.*, 2008). Cependant, l'UAE peut encore être induite chez la souris knock out pour le gène de l'IL-17, ce qui suggère l'implication et la combinaison des deux voies ; Th1 et Th17 dans la physiopathologie de l'UAE (Luger *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2008).

Les cytokines jouent un rôle important dans le développement de l'UAE et participent aux différentes phases de l'inflammation. Plusieurs travaux ont rapporté la production de l'IL-1, l'IL-2, IL-6, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-12, IL-17, l'IFN γ et le TNF α au cours des phases actives de l'UAE (Nussenblatt *et al.*, 1981 ; Rizzo, 1994 ; Luna *et al.*, 1997 ; Jones *et al.*, 1997 ; Tarrant *et al.*, 1998 ; Peng *et al.*, 2006 ; Luger *et al.*, 2008). D'autre part, les cytokines de type 2 (IL-5, IL-4, IL-13) ainsi que l'IL-10 et le TGF- β sont exprimées presque simultanément dans les tissus oculaires expliquant la résolution spontanée de la poussée inflammatoire. Elles seraient donc associées à l'amélioration des symptômes observés au cours de l'UAE (De kozak, 2000; Caspi, 2006 (b); Vallochi *et al.*, 2007). A coté des cytokines, d'autres médiateurs inflammatoires sont produits, les métabolites de l'acide arachidonique : thromboxane B2, prostaglandines E2 (PGE2) et leukotriène B4 (LTB4) (De kozak, 2000). La présence locale

des cytokines et des médiateurs de l'inflammation induit une rupture de la barrière hémato-rétinienne, l'expression locale oculaire de molécules d'adhésion (ELAM-1 et ICAM-1) et du CMH au niveau des cellules endothéliales vasculaires à proximité de la rétine ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ce qui conduit au recrutement vers le foyer inflammatoire d'autres lymphocytes T activés ainsi que des monocytes et des polynucléaires neutrophiles (De kozak, 2000).

Par ailleurs, une production accrue de NO et de peroxynitrite ainsi qu'une expression intense de la NO synthase inductible (NOS-II) au niveau de la rétine et de la choroïde ont été détectées au cours des phases actives de l'UAE (De kozak, 2000 ; Bae *et al.*, 2007). Au niveau de la rétine, les auto-antigènes seraient présentés aux lymphocytes T infiltrants par les cellules résidentes probablement par les cellules de l'épithélium pigmentaire douées de cette propriété. Le mécanisme conduisant à la destruction de la rétine impliquerait la destruction directe par les lymphocytes cytotoxiques, l'effet toxique des cytokines élaborées et l'induction de l'apoptose par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Nussenblatt and Gery, 1996).

III.2.2 Aspect histopathologique de l'UAE

Chez le rat lewis, l'UAE apparaît généralement au bout de 8 à 14 jours post-immunisation. Elle se manifeste par une uvéite bilatérale aigue qui affecte le segment postérieur du globe oculaire mais pouvant dans certains cas en affecter le segment antérieur (Caspi, 1994 (b)).

Le modèle histopathologique observé au cours de l'UAE varie d'une part, selon l'espèce utilisée et d'autre part, selon l'antigène et la quantité injectée. Cependant, dans tous les cas de figure le caractère dominant au niveau du segment postérieur de l'œil est l'infiltration massive de lymphocytes T et de polynucléaires neutrophiles au cours des premières phases de l'UAE (Gery *et al.*, 1986). Ce qui a pour conséquence la destruction de la rétine (contenant l'auto-antigène injecté) et la perte de la couche des photorécepteurs. On observe également une vasculite, une choroidite ainsi qu'un décollement et un repliement de la rétine. D'autre part, un nombre important de mastocytes a été observé au niveau de la choroïde (Mochizuki *et al.*, 1984), leur dégranulation s'effectuerait 1 à 2 jours avant l'apparition des signes cliniques de l'UAE (Li *et al.*, 1992). Ce qui suggère leur implication dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne aux lymphocytes T activés (Mochizuki *et al.*, 1984 ; Li *et al.*, 1992).

III.3 Mécanisme d'action de l'adjuvant complet de Freund (CFA) au cours de l'UAE

Le CFA est de loin l'adjuvant le plus couramment utilisé dans les protocoles d'induction de plusieurs modèles expérimentaux de maladies auto-immunes notamment l'UAE. Il s'agit d'une émulsion de mycobactéries tuées à la chaleur et d'huiles minérales auxquelles l'antigène est mélangé sous une vigoureuse agitation (Biliau and Matthys, 2001).

Le mécanisme d'action du CFA au cours de l'UAE n'est à ce jour pas totalement élucidé. Cependant, plusieurs auteurs attribuent au CFA les rôles majeurs suivants :

➤ ***Le CFA prolonge la présence de l'antigène au site d'injection et augmente sa phagocytose par les CPA :*** l'administration d'un antigène protéique dans une émulsion de CFA prolongerait sa demi-vie au niveau du site d'injection. Certains auteurs l'estiment même à trois mois. Ces données ont permis de suggérer que l'un des mécanismes d'action les plus importants du CFA est de permettre la libération lente et prolongée de l'antigène (Biliau and Matthys, 2001). De plus Tsuji et ces collaborateurs rapportent que le CFA pourrait

éventuellement promouvoir la maturation des cellules dendritiques en CPA et stimuler le processus de phagocytose de l'antigène (Tsuji *et al.*, 2000).

➤ **Le CFA induit la production de cytokines et stimule la voie Th1:** Peu d'informations concernant l'induction de cytokines par le CFA sont disponibles. Les seules que l'on possède sont relatives à l'induction de cytokines par les mycobactéries vivantes. Sachant que le CFA contient des mycobactéries tuées, on déduit par extrapolation le profil cytokinique induit par ce dernier (Biliau and Matthys, 2001). Les cytokines produites suite à l'exposition au CFA (ou aux mycobactéries) sont essentiellement le TNF α , l'IL-12, l'IL-6 et l'IFN γ ainsi que des chémokines telles que l'IL-8. Les composants protéiques des mycobactéries sont reconnus par les récepteurs Toll-like à la surface des cellules dendritiques et induisent la production de l'IL-12 et du TNF α . L'IL-12 stimule d'une part les cellules NK à produire de l'IFN γ et d'autre part, les lymphocytes T CD4 $^{+}$ et les oriente vers un profil Th1. Le TNF α jouerait quant à lui un rôle d'inducteur d'autres cytokines telles que l'IL-6 (Biliau and Matthys, 2001).

III.4 Du modèle expérimental aux applications cliniques (Figure 13)

Bien qu'aucun modèle expérimental développé à ce jour ne reproduit exactement la complexité des phénomènes mis en jeu lors de l'uvéite auto-immune humaine, ils restent néanmoins d'importants outils contribuant efficacement à élucider le mystère à l'origine de la rupture de la tolérance au soi et à décortiquer le mécanisme de l'inflammation oculaire à caractère auto-immun chez l'Homme (Agarwal and Caspi, 2004). D'autre part, ces modèles constituent un excellent moyen permettant de tester différentes molécules et stratégies thérapeutiques. En effet, chaque étape clé du développement de l'UAE est la cible d'une approche thérapeutique spécifique (voir figure 13) (Caspi, 2006(b)). Certaines stratégies sont déjà à l'usage clinique comme par exemple l'utilisation de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs : Rapamycine et FK-506 (inhibiteurs de la production et de la voie de signalisation de l'IL-2) (Nussenblatt and Whitcup, 2004), alors que d'autres sont encore au stade expérimental. D'une manière générale, les nouvelles approches testées actuellement sur le modèle animal visent, d'une part, à moduler la production de certaines cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'UAE dans le but de restaurer la balance physiologique (Vallochi *et al.*, 2007) et, d'autre part, à administrer des auto-antigènes rétiens (IRBP et antigène S) par voie orale ou nasale afin d'instaurer une tolérance vis-à-vis de ces antigènes et inhiber ainsi la réponse inflammatoire destructive (Lalietou *et al.*, 1996 ; Faria and Weiner, 2006).

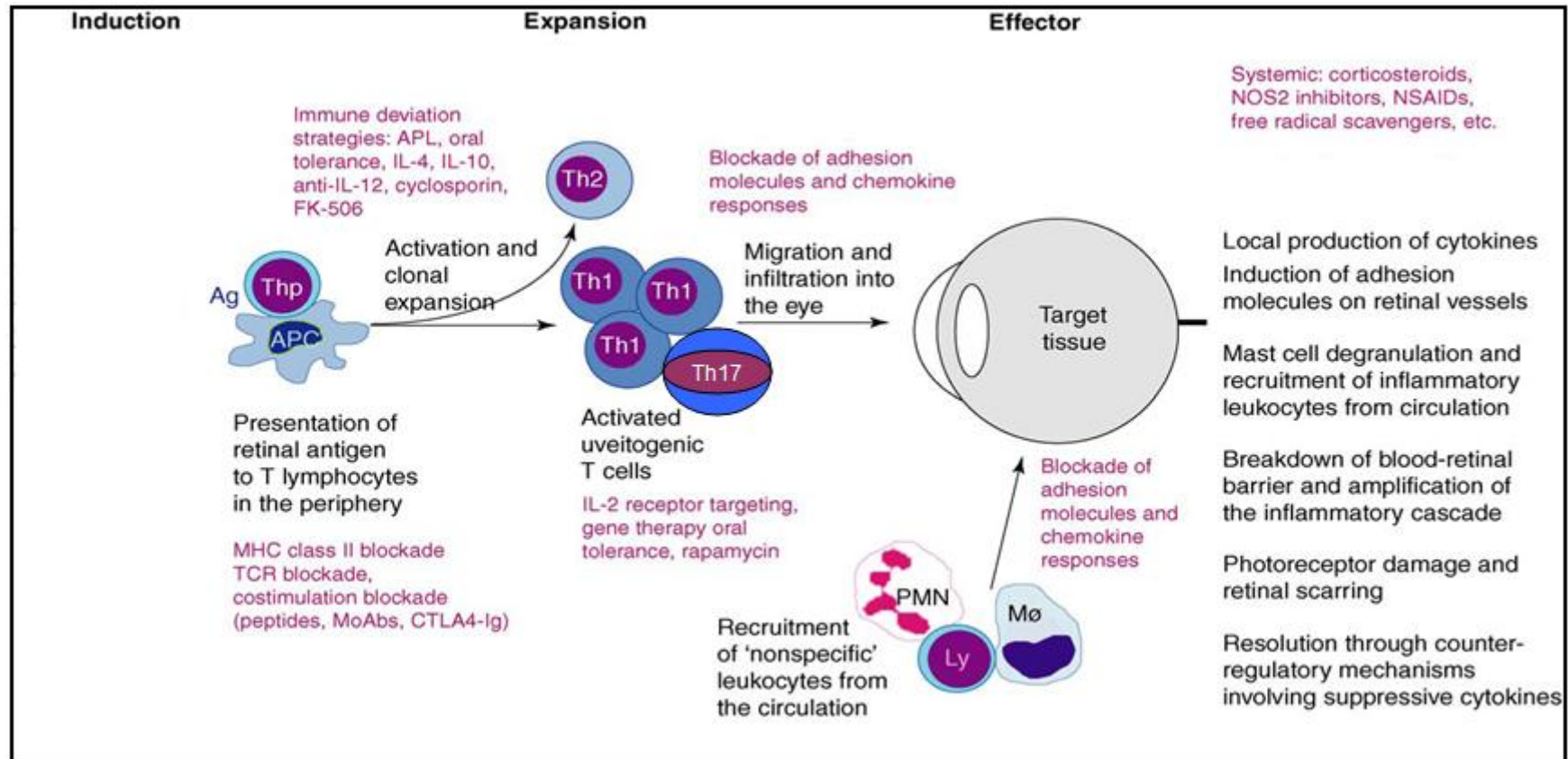


Figure 13: Etapes clés du développement de l'UAE pouvant servir de cible à différentes stratégies thérapeutiques.
 (■ Mécanismes du développement de l'UAE / ■ Stratégies thérapeutiques).
 (Caspi, 2006 (b)).

IV. Le monoxyde d'azote (NO)

IV Le monoxyde d'azote (NO)

Depuis la découverte en 1980 par Furchgott et Zawadski de *l'endothelium derived relaxing factor* (EDRF) (Furchgott and Zawadski, 1980) et son identification exacte sept ans plus tard par Palmer et al et Ignaro et al comme étant le NO (Palmer *et al.*, 1987 ; Ignaro *et al.*, 1987), l'intérêt suscité par cette molécule capable de réguler de multiples fonctions physiologiques n'a cessé de grandir. Parmi les différentes fonctions contrôlées par le NO, son rôle significatif a été reconnu dans le maintien de la pression artérielle, la neurotransmission, la défense immunitaire, la thrombose et l'homéostasie (Patel *et al.*, 1999 ; Therrien, 2005).

IV.1 Propriétés physico-chimiques

Même si le monoxyde d'azote a été considéré jusqu'en 1986 comme un simple gaz toxique, on ne doit finalement pas s'étonner de ses multiples propriétés biologiques, qui sont déterminées par sa réactivité chimique.

En effet, le NO est un composé diatomique labile à action paracrine (Shaul, 2002) qui se présente, dans les conditions normales de température et de pression, sous forme gazeuse. Sa solubilité dans l'eau est comparable à celle du monoxyde de carbone (CO) et de l'oxygène moléculaire (O₂). La charge nulle du NO le rend en outre soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires (Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998).

Il s'agit d'une molécule radicalaire possédant un électron non apparié qui lui confère un caractère hautement réactif à l'origine de sa très courte demi-vie (de l'ordre de quelques secondes) (Schroeder and Kuo, 1995). En effet, le NO est capable de réagir avec de nombreuses molécules :

*En présence de l'oxygène moléculaire, le NO s'auto-oxyde pour former divers oxydes d'azote, les plus stables étant les nitrites (NO₂⁻) et les nitrates (NO₃⁻) (Vanhoutte, 2003). Le NO interagit également avec l'anion superoxide (O₂⁻) et génère le peroxydinitrite (ONOO⁻), connu pour sa toxicité (Butler *et al.*, 1995 ; Hughes, 1999).

*Le NO peut aussi se lier à des métaux, en particulier aux groupements « hème » des protéines telles que l'hémoglobine et le cytochrome C. De même, il se fixe à l'hème de la guanylate cyclase soluble qui est l'une des ses principales cibles physiologiques (Balligand *et al.*, 2000).

*Le NO peut nitrosyler les sites SH libres de protéines qui pourraient ainsi servir de « réservoir à NO » (Stamler *et al.*, 2001 ; Andrews *et al.*, 2002 ; Hess *et al.*, 2005). Il peut également interagir avec les lipides et induire leur peroxydation (Pagliaro, 2003).

IV.2 Biosynthèse du NO

Le NO est synthétisé biologiquement par des enzymes appelées NO synthases (NOS, EC 1.14.13.39) qui utilisent l'acide aminé L-arginine, l'oxygène et le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) comme substrats pour synthétiser le NO de même qu'un coproduit, la L-citrulline (Figure 14). La biosynthèse du NO à partir de L-arginine par les NOS, passe toutefois par une étape intermédiaire qui est la formation de N^ω-hydroxy-L-arginine. Tétrahydrobioptérine (BH₄), protoporphyrine IX de fer, Ca²⁺/calmoduline, FAD (flavine-adénine dinucléotide) et FMN (flavine mononucléotide) sont des cofacteurs nécessaires au processus catalytique (Xia *et al.*, 1998).

IV.2.1 Les NO synthases (NOS)

IV.2.1.1/ Structure générale

La structure plane de l'enzyme NOS est représentée au niveau de la figure 15. L'enzyme est constituée de deux monomères (ou sous unités) identiques, lesquels fonctionnellement peuvent être divisés en deux domaines majeurs, le domaine oxydase en N-terminal et le domaine réductase en C-terminal. Le premier domaine comprend les sites de liaison pour le substrat L-arginine, le cofacteur BH₄ et le résidu hème, tandis que le second domaine contient les sites de liaison pour les cofacteurs NADPH, FAD et FMN. Le domaine de liaison à la calmoduline se situe entre ces deux régions et il joue un rôle structural et fonctionnel important pour l'enzyme (Andrew and Mayer, 1999).

IV.2.1.2/ Classification

Il existe trois isoformes de NOS incluant la forme neuronale (nNOS ou NOS-1), inductible (iNOS ou NOS-2) et endothéliale (eNOS ou NOS-3). Ces trois isoformes sont caractérisées par des régions de haute homologie (domaine réductase en carboxy-terminal et un domaine oxygénase en amino-terminal), des structures protéiques semblables, des mécanismes enzymatiques comparables et des sites de fixation aux mêmes cofacteurs (flavines, NADPH, protoporphyrine IX de fer, BH₄ et la calmoduline) et au substrat (L-arginine) (Ducrocq *et al.*, 2001). Cependant, elles diffèrent les unes des autres par leur localisation cellulaire, leur dépendance au Ca²⁺, leur mode d'expression ainsi que la quantité de NO synthétisée et la durée de sa production par les cellules spécialisés (Andrew and Mayer, 1999) (voir tableau 03).

Les isoformes constitutives, présentes principalement dans les neurones (NOS-1) et l'endothélium vasculaire (NOS-3), produisent rapidement de faibles quantités de NO en réponse à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette libération de NO est impliquée dans les phénomènes de neurotransmission et d'instauration du tonus vasculaire basal (Goureau and Courtois, 1996).

En revanche, l'isoforme inductible (NOS-2), présente principalement dans les macrophages et dont l'expression est induite par les cytokines et les endotoxines, libère des quantités de NO beaucoup plus importantes et pendant des durées beaucoup plus longues dans le but premier d'éliminer un agent délétère (Goureau and Courtois, 1996 ; Domenico, 2004).

IV.2.1.3/ Régulation de l'expression de la NOS-2

La NOS inductible ou NOS-2 est exprimée par différents types cellulaires incluant principalement le système monocytes/macrophages, mais aussi les chondrocytes, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses et hépatocytes (Crowell *et al.*, 2003). Son expression est régulée au niveau transcriptionnel. En effet, la transcription du gène codant pour la NOS inductible n'est possible que lorsque celui-ci est activé par des facteurs de transcription. Parmi ceux-ci le NF- κ B qui jouerait probablement un rôle majeur dans les mécanismes cellulaires relayant l'activation membranaire par un effecteur spécifique et la synthèse de novo de la NOS inductible en réponse au stimuli (Barnes and Karin, 1997). L'expression de la iNOS est régulée positivement par les LPS des bactéries gram négatives ainsi que par certaines cytokines clés du processus inflammatoires : l'IFN- γ , l'IL-1 β et le TNF- α ; et négativement par d'autres cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β ainsi que par les glucocorticoïdes (Domenico, 2004, Gauthier *et al.*, 2004) (Figure 16).

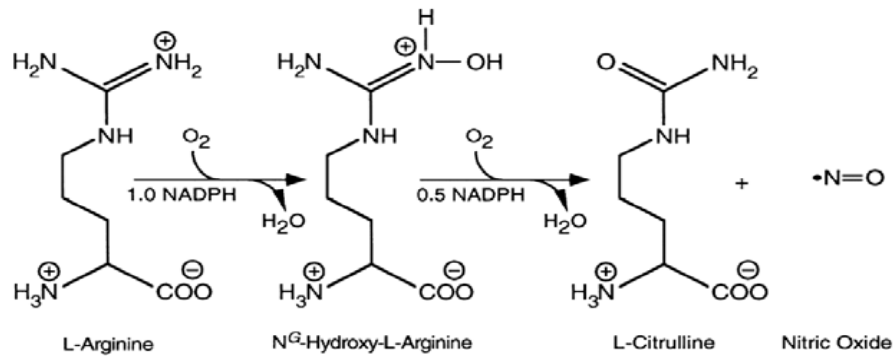


Figure 14: Etapes de la biosynthèse du NO par les NO-synthases

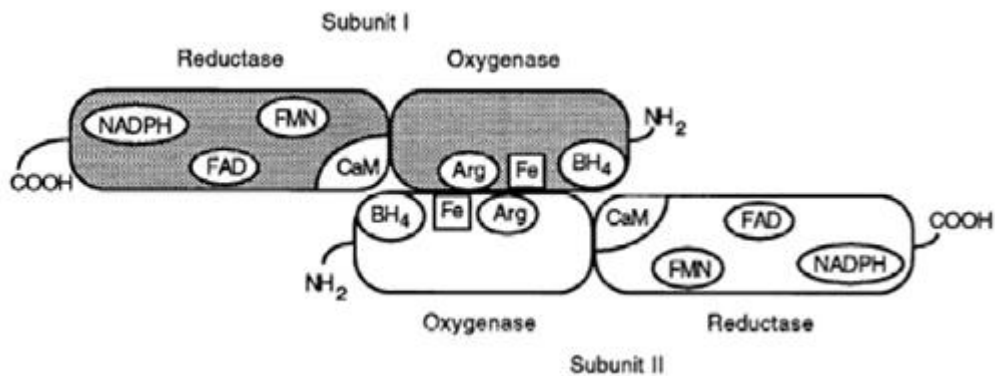


Figure 15: Schéma de la structure dimérique des NOS incluant les domaines oxygénases et réductases ainsi que les sites de liaison des cofacteurs et du substrat. (Andrew and Mayer, 1999)

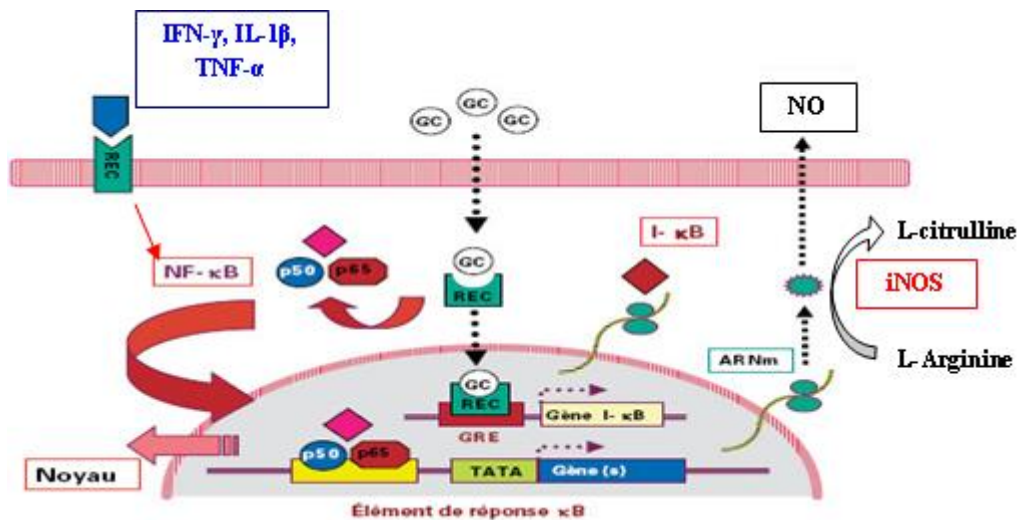


Figure 16: Régulation de l'expression de la iNOS au niveau transcriptionnel via le NF- κ B, positivement par les cytokines clés du processus inflammatoire (TNF- α , IFN- γ et IL-1 β). Et négativement par les glucocorticoïdes (GC). L'activation de NF- κ B (dimère p50-p65) passe par la phosphorylation d'I κ B et la dégradation de cette dernière. Le passage intranucléaire de NF- κ B et sa fixation sur l'ADN (élément de réponse κ B) induit la transcription du gène codant la iNOS. A l'inverse, la liaison des hormones GC à leurs récepteurs membranaires précède le passage intranucléaire du complexe hormone-récepteur et de la transcription du gène *I κ B*. La protéine I κ B ainsi nouvellement formée ira s'associer au dimère p50-p65 pour l'inactiver. (Dao *et al.*, 2006)

Isoformes Caractéristiques	Neuronale (nNOS) NOS-1	Inductible (iNOS) NOS-2	Endothéliale (eNOS) NOS-3
Expression	Constitutive (a)	Inductible (a)	Constitutive (a)
Localisation chromosomique du gène humain	Chromosome 12, Région 12q24-qter (a)	Chromosome 17, Région 17cen-q11.2 (a)	Chromosome 7, Région 7q35-36 (a)
Nombre d'exons	29 (a)	26 (a)	26 (a)
Masse moléculaire de la protéine	(160 kDa × 2) (b)	(130 kDa × 2) (b)	(133 kDa × 2) (b)
Nombre de résidus d'acides aminés	1434 (c)	1153 (c)	1203 (c)
Localisation intracellulaire	Cytosol (a)	Cytosol (a)	Cytosol, membranes, mitochondries (a)
Cofacteur Ca²⁺ / calmoduline	Dépendante (d)	Indépendante (d)	Dépendante (e)
Effecteurs membranaires	Acides aminés Neuroexcitateurs (glutamate) (a)	LPS, IL-1β, TNF-α, IFN-γ (a)&(e)	Acétylcholine, Bradykinine (a)&(f)
Fonction majeure du produit NO	Neurotransmission (messenger intercellulaire) (g)	Bactéricide, tumoricide (g) Parasiticide (h)	Vasodilatation (messenger intercellulaire) (g)
Quantité de NO synthétisée	Petites quantités de l'ordre du femtomole ou du picomole (i)	Grandes quantités de l'ordre du nanomole ou du micromole (i)	Petites quantités de l'ordre du femtomole ou du picomole (i)
Durée de production	Limitée (quelques secondes à quelques minutes) (i)	Longue durée (heures) (i)	Limitée (quelques secondes à quelques minutes) (i)
Localisation cellulaire principale	Neurones (g)	Macrophages (g)	Cellules endothéliales (g)

Tableau 03 : Caractéristiques des trois isoformes de NOS humaines

(a) : Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998 ; (b) : Hampl and Herget, 2000 ; (c) : Hayden and Tyagi, 2003 ;
 (d) : Andrew and Mayer, 1999 ; (e) : Domenico, 2004 ; (f) : Wheatcroft *et al.*, 2003 ; (g) : Assumpção *et al.*, 2008 ;
 (h) : Touil-Boukoffa *et al.*, 1998 ; Amri *et al.*, 2007 ; (i) : Ricciardolo *et al.*, 2004.

IV.3 Fonctions biologiques du NO

IV.3.1 NO en physiologie

Le NO joue un rôle essentiel dans de multiples fonctions physiologiques. En effet, selon sa source et sa cible cellulaire ainsi que sa concentration et sa durée de production par les cellules spécialisées, ses fonctions physiologiques diffèrent.

- **Dans le système vasculaire**, le NO produit à faibles concentrations par la NOS-3 des cellules endothéliales, représente un puissant vasodilatateur aidant à maintenir un tonus vasculaire nécessaire pour la régulation de la circulation sanguine et le contrôle de la pression artérielle. C'est aussi un inhibiteur de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire (Walford and Loscalzo, 2003 ; Liu and Huang, 2008).
- **Dans le système nerveux**, le NO produit par la NOS-1 agit comme un neuromédiateur impliqué dans diverses fonctions physiologiques telles que la formation de la mémoire, la coordination entre l'activité neuronale et le débit sanguin et la modulation de la douleur (Snyder, 1992 ; Knott and Bossy-Wetzel, 2009). Toutes ces actions physiologiques du NO sont médiées par l'activation de la guanylate cyclase soluble entraînant ainsi une augmentation de la concentration du GMP cyclique dans les cellules cibles (Knowles *et al.*, 1989).
- **Dans le système immunitaire**, le NO produit en grande quantité par la iNOS macrophagique, intervient d'une manière très active dans les phases effectrices de la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, Le NO est reconnu pour son action antibactérienne, anti-parasitaire, anti-virale et anti-fongique (Bogdan, 2000 ; Touil-Boukoffa *et al.*, 1998 ; Amri *et al.*, 2007). Cette action est dépendante de l'inhibition de la synthèse ou de la réparation de l'ADN et de l'altération des protéines ou de l'inhibition de leur production (Hickman-Davis *et al.*, 2001). La voie du NO peut aussi agir de façon indirecte, comme par exemple en métabolisant l'arginine dont nécessitent certains pathogènes comme *Trypanosoma cruzi* (Piacenza *et al.*, 2001). Outre son action contre les agents microbiens, on reconnaît au NO une activité anti-tumorale. En effet, il peut inhiber certaines enzymes essentielles à la croissance des cellules tumorales comme celles de la chaîne respiratoire. Son action peut aussi provoquer l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Gauthier *et al.*, 2004).

IV.3.2 NO en physiopathologie

Le NO est une molécule ubiquitaire, occupant une place importante en physiologie mais aussi en pathologie humaine. En effet, si sa production au cours d'une réponse inflammatoire adaptée à une infection est bénéfique, son excès est par contre délétère (Sabry and Dinh-Xuan, 1996 ; Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998). De nombreux travaux ont effectivement démontré une production élevée de NO au cours de nombreuses pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et les maladies neuro-dégénératives (Farrel *et al.*, 1992 ; Schulz *et al.*, 1995 ; Grabowski *et al.*, 1996 ; Silverman, 2009).

Le NO constitue aussi un médiateur important impliqué dans l'inflammation de l'uvéa (Parks *et al.*, 1994). Une augmentation des concentrations de NO a été rapportée au cours de la maladie de Behçet, dans le sérum (Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008), les érythrocytes (Evereklioglu *et al.*, 2003), le liquide synovial (Duygulu *et al.*, 2005) et l'humeur aqueuse (Yilmaz *et al.*, 2002). Cette augmentation est corrélée avec l'activité de la maladie. D'autres travaux ont par ailleurs prouvé l'effet délétère exercé par deux métabolites physiologiquement

stables du NO (nitrites et nitrates) sur les rétines de bœufs *in vitro* confirmant encore une fois l'implication du NO dans l'inflammation locale au niveau de la rétine (Hartani *et al.*, 2006 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

IV.4 Monoxyde d'azote et UAE

De nombreux travaux ont démontré l'implication du NO dans la physiopathologie de l'UAE. En effet, chez le rat *Lewis* immunisé par les auto-antigènes rétinien, une expression intense de la iNOS par les macrophages infiltrant l'œil a été observée durant les phases aiguës de l'affection (Hoey *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que l'incidence et la sévérité de l'UAE est plus faible chez les souris knock out pour le gène de la iNOS « souris KO-NOS-2 [-/-] » par comparaison aux souris témoins de type sauvage (Thillaye-Goldenberg *et al.*, 2000). D'autre part, il a également été rapporté une production accrue de NO et d'anion superoxyde par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles infiltrant l'œil au cours de l'UAE (Zhang *et al.*, 1993 ; Rodenas *et al.*, 1995). Le NO et l'anion superoxyde interagiraient afin de former un métabolite hautement toxique : le peroxynitrite (Shuang *et al.*, 1997 ; Wu *et al.*, 1998). Ce dernier semble intervenir dans la dégénérescence et l'apoptose des photorécepteurs observées lors de l'UAE (Shuang *et al.*, 1997 ; Rao and Wu, 2000 ; Liversidge *et al.*, 2002). Les photorécepteurs possèdent une structure particulière, leurs segments externes renferment un nombre important de disques membranaires accolés les uns aux autres. De plus, leurs phospholipides membranaires sont constitués essentiellement d'acides gras polyinsaturés et plus précisément de l'acide docosahexaénoïque (22:6). Ce qui les rend donc une cible idéale pour le peroxynitrite. Ce dernier initie la cascade de peroxydation lipidique conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire (Rao and Wu, 2000). Il a également été démontré que les hydroperoxydes générés interviendraient en tant que molécules chimioattractantes et stimulatrices des macrophages et polynucléaires neutrophiles, conduisant à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et donc de l'uvéite (Rao and Wu, 2000). De plus, le peroxynitrite provoquerait la nitrotyrosylation des résidus tyrosine de la rhodopsine ; composant majeur des photorécepteurs. Il génère également des cassures au niveau des brins d'ADN via le mécanisme de N-nitrosylation des désoxyribonucléotides (Kröncke *et al.*, 1997). Tout ces phénomènes : peroxydation lipidique des membranes, nitrotyrosylation de la rhodopsine et endommagement de l'ADN interviendraient dans le déclenchement de la cascade apoptotique mitochondriale conduisant à la dégénérescence des photorécepteurs (Rao and Wu, 2000 ; Liversidge *et al.*, 2002).

Des travaux récents ont mis en évidence une élévation significative de l'expression de la iNOS ainsi qu'une production accrue d'espèces réactives de l'azote au niveau des mitochondries des photorécepteurs rétinien et ceci avant même l'apparition des signes cliniques de l'UAE. Ces données suggèrent une forte implication du stress oxydatif durant les premières phases du développement de l'UAE (Rajendram *et al.*, 2007). Cette élévation de l'expression de la iNOS aurait pour stimulateur une hyperproduction de certaines cytokines dont l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1 α par les premiers lymphocytes T autoréactifs activés ayant pénétré l'œil. Ce stress oxydatif interviendrait d'une part, dans les dommages causés à l'ADN mitochondrial aboutissant à la dégénérescence des photorécepteurs (Khurana *et al.*, 2008) et d'autre part, dans le recrutement d'autres cellules inflammatoires, menant ainsi à une amplification du processus (Rajendram *et al.*, 2007).

Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré qu'en dépit du rôle délétère du NO ce dernier serait impliqué dans la résolution de l'UAE. En effet, le NO semble médier l'apoptose des lymphocytes T autoréactifs activés infiltrant l'œil par la voie Fas/ Fas-Ligand (Abe *et al.*, 2001 ; Liversidge *et al.*, 2002). Le NO serait donc une arme à double tranchant dans les processus auto-immuns (Nathan *et al.*, 1997 ; Bogdan *et al.*, 1998 ; Liversidge *et al.*, 2002).

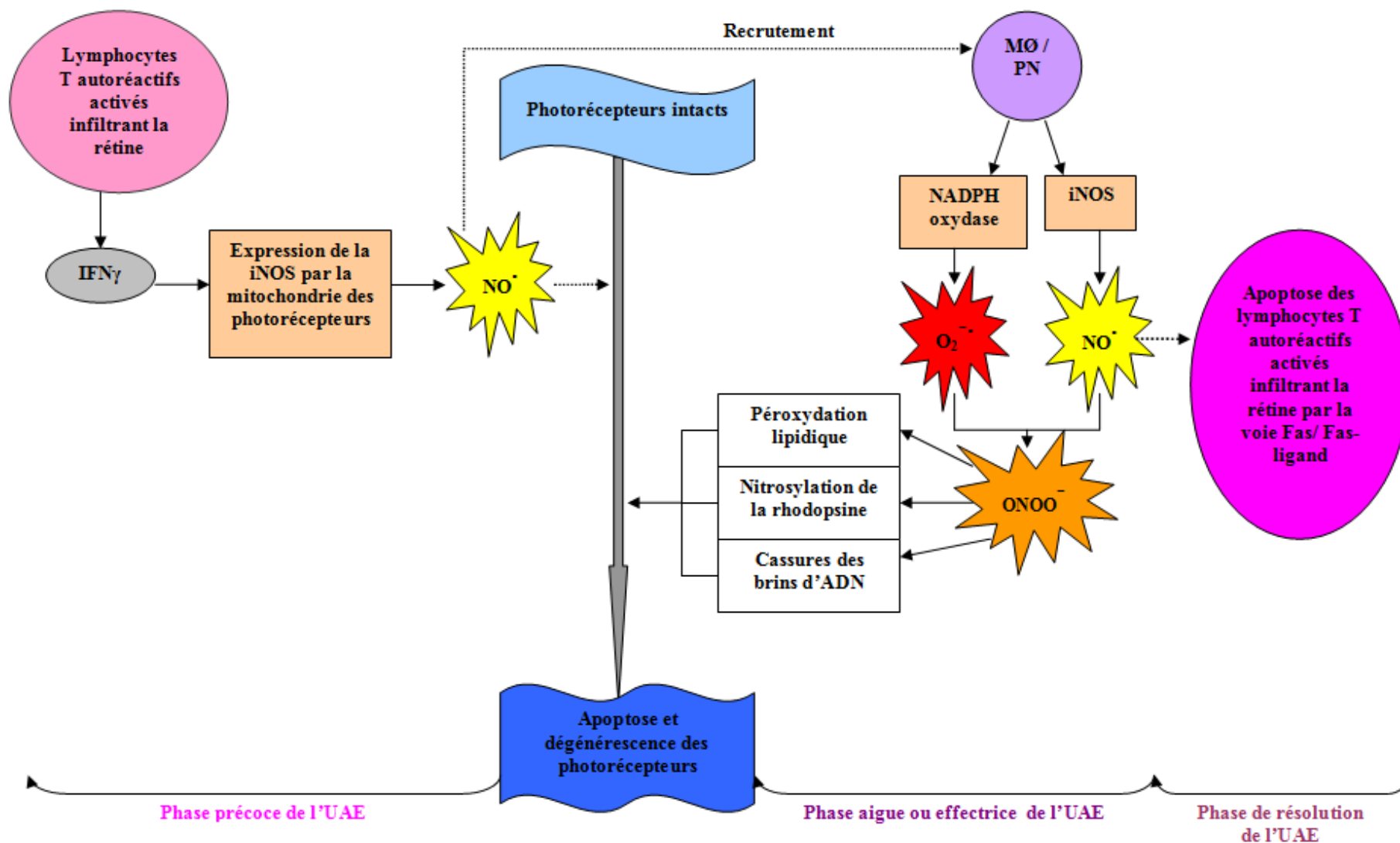


Figure 17: Schéma récapitulatif des rôles du monoxyde d'azote au cours des différentes phases de l'UAE.
(MØ : Macrophages/ PN : Polynucléaires neutrophiles)

V. Rate & auto-immunité

V Rate & auto-immunité

La rate est un organe de couleur rouge ou pourpre foncé et de forme allongée, logé dans le quart supérieur gauche de l'abdomen, derrière l'estomac (Genetet, 2002). Elle fait partie des organes lymphoïdes secondaires ou périphériques, au sein desquels les lymphocytes immunocompétents T et B provenant des organes lymphoïdes primaires subissent les phénomènes de stimulation antigénique et y répondent par une multiplication et une maturation en cellules effectrices de l'immunité et en cellules à mémoire. De ce fait, la rate est considérée comme le siège d'initiation des réponses immunitaires (Stevens and Lowe, 1997).

V.1 Organisation histologique de la rate (Figure 18)

La rate est une masse spongieuse, délimitée sur l'ensemble de sa surface par une capsule fibreuse relativement fragile d'où naissent des cloisons incomplètes qui délimitent des lobules partiellement fusionnés. Le parenchyme splénique contient deux régions clairement individualisées sur le plan histologique et fonctionnel : la pulpe rouge et la pulpe blanche (Genetet, 2002).

V.1.1 La pulpe rouge

La pulpe rouge occupe la majeure partie du parenchyme splénique. Elle est constituée de nombreux sinus veineux bordés d'un endothélium discontinu parmi des fibres de réticuline et de collagène. La pulpe rouge est un réservoir de cellules hématopoïétiques (lymphocytes, granulocytes, plaquettes et globules rouges). Elle contient en particulier des quantités importantes de plasmocytes et de macrophages. Entre les sinus, la pulpe rouge forme des cordons appelés : cordons de Billroth (Genetet, 2002 ; Mebius and Kraal, 2005 ; Cesta, 2006).

V.1.2 La pulpe blanche

La pulpe blanche est le lieu d'initiation des réponses immunitaires, elle consiste en une fine couche de tissu lymphoïde enveloppant les ramifications de l'artère splénique. A la gaine de tissu lymphoïde qui enveloppe ces petites artères, sont attachés des follicules lymphoïdes dont certains contiennent des centres germinatifs. Les cellules qui forment le manchon péri-artériolaire sont essentiellement des lymphocytes T, tandis que les follicules qui se développent à la périphérie sont constitués de lymphocytes B. L'ensemble qui constitue la pulpe blanche, est entouré d'une zone mal définie qui la sépare de la pulpe rouge, la zone marginale (Genetet, 2002 ; Cesta, 2006).

V.1.3 La zone marginale

La zone marginale, à la frontière entre la pulpe blanche et la pulpe rouge, occupe une position stratégique : c'est là que se déverse le sang apporté par les artéioles qui s'ouvrent dans des sinus vasculaires. Elle contient des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes, essentiellement des lymphocytes B, qui vont présenter une première ligne de défense contre les pathogènes véhiculés par le sang (Genetet, 2002 ; Kuper *et al.*, 2002 ; Mebius and Kraal, 2005 ; Cesta, 2006).

V.2 Fonctions de la rate

V.2.1 Fonction d'épuration

La rate est un filtre sanguin important qui va offrir une première ligne de défense contre des pathogènes transportés par le sang. En effet, les macrophages abrités dans la zone marginale débarrassent le sang des microorganismes et autres particules mais aussi participent dans la dégradation des hématies et leucocytes vieillissés ou altérés. C'est la fonction hématolytique de la rate (Genetet, 2002 ; Cesta, 2006).

V.2.2 Fonction hématopoïétique

Chez l'Homme, la rate représente un des sièges de l'hématopoïèse durant la vie fœtale. Cette activité hématopoïétique est par contre conservée toute la vie chez les rongeurs (Stevens and Lowe, 1997).

V.2.3 Développement des réponses immunitaires

L'organisation de la vascularisation de la rate fait que le tissu lymphoïde est exposé aux antigènes qui circulent par voie sanguine, sous forme soluble ou associés à des cellules présentatrices d'antigènes. Ils gagnent la zone périartériolaire en traversant la zone marginale, où ils seront reconnus par les lymphocytes T ou B spécifiques. Les interactions nécessaires au développement de la réaction immunitaire ont lieu dans la zone périartériolaire. Les lymphocytes T effecteurs activés peuvent ensuite quitter la rate par les sinus veineux bordant la zone marginale. Les lymphocytes B stimulés dans cette même zone périartériolaire, migreront vers la périphérie de la pulpe blanche pour donner naissance à des foyers de cellules en division, à l'origine des follicules secondaires qui produisent les précurseurs des plasmocytes migrant dans la pulpe rouge pour produire des anticorps (Genetet, 2002).

V.3 Implication de la rate dans la physiopathologie de l'UAE

Plusieurs travaux ont rapporté l'implication de la rate en tant qu'organe clé dans l'initiation des réponses immunitaires vis-à-vis des auto-antigènes au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale. En effet, il a été clairement démontré que le transfert de lymphocytes T spléniques, d'un animal préalablement immunisé par un auto-antigène rétinien vers un animal sain syngénique, conduisait au développement de l'UAE chez ce dernier (Caspi *et al.*, 1986 ; Shao *et al.*, 2005 ; Caspi, 2006 (a)). D'autre part, les macrophages spléniques obtenus à partir d'un animal (rat *lewis*) ayant développé l'UAE montrent une production accrue de monoxyde d'azote, comparée aux macrophages issus d'animaux contrôles (non immunisés) (Liversidge *et al.*, 2002). Ces observations indiquent que la rate est l'un des organes lymphoïdes où a lieu la présentation de l'auto-antigène rétinien aux lymphocytes T autoréactifs spécifiques conduisant à l'élaboration de la réponse immunitaire auto-détructive.

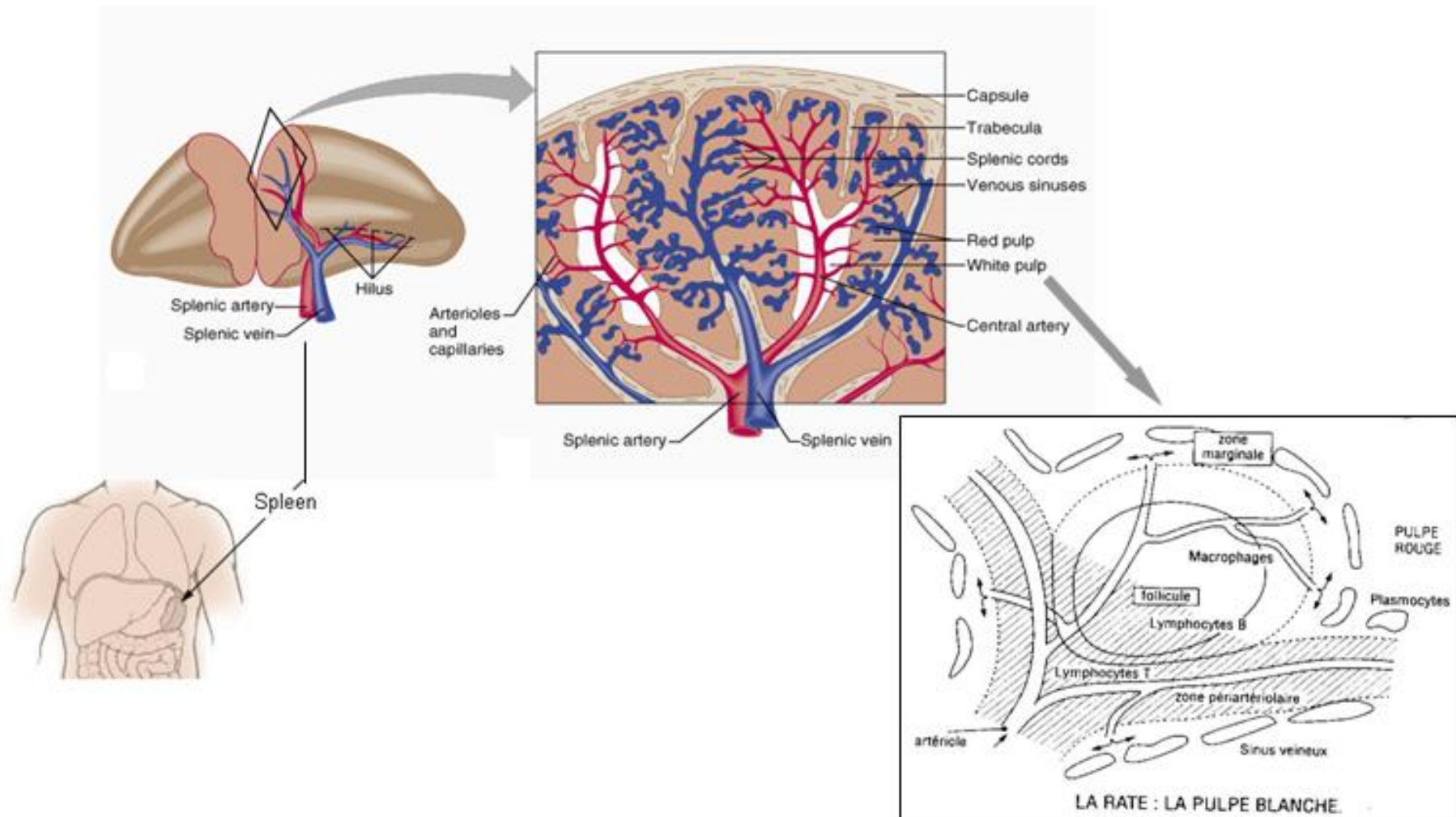


Figure 18: Organisation histologique de la rate

Chapitre II

Matériel & Méthodes

I Matériel

➤ Les yeux de bœuf :

Les yeux de bœufs (n=60) ont été récupérés à partir d'animaux sains après leur abattage au niveau de l'abattoir de la commune de Ruisseau. Ces yeux ont été transportés dans de la glace au laboratoire où ils ont été conservés à +4°C jusqu'à leur utilisation.

➤ La Concanavaline A- Sepharose :

La Concanavaline A-Sepharose, produit SIGMA, a été utilisée au cours des étapes de purification de l'IRBP pour la chromatographie d'affinité.

➤ L'adjuvant complet de Freund (CFA) :

Le CFA, contenant 2,5 mg/ml de la souche *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, nous a été gracieusement fourni par le service d'immunologie de l'institut Pasteur.

➤ Les rats Wistar :

Des rats *Wistar* femelles (n=40) âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés au cours des expérimentations. L'élevage des rats a été réalisé au sein de l'animalerie de l'université USTHB.

➤ La souche bactérienne ATCC 8062 :

La souche bactérienne *Pseudomonas oleovarens*, caractérisée par la propriété biochimique « nitrate réductase + », a été utilisée afin de réduire les nitrates en nitrites lors du dosage du monoxyde d'azote dans les échantillons. Elle nous a été fournie par le Dr J.C Drapier (Directeur unité CNRS : Biosynthèse du monoxyde d'azote : signalisation, Gif sur Yvette, Paris).

➤ Le RPMI-1640 :

Le RPMI-1640, a été utilisé en tant que milieu de culture pour les splénocytes, additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté à +56°C pendant 30 min et complété de 1mg/ml de L-Glutamine. Un ensemble d'antibiotiques a également été ajouté à mesure de 1000 UI/ml de pénicilline et 10mg/ml de streptomycine.

II Méthodes

II.1 Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines

La dissection des yeux de bœuf est réalisée dans des conditions de semi pénombre. Toutes les étapes d'extraction de l'auto-antigène en question sont effectuées dans de la glace afin de préserver au maximum l'intégrité des protéines de la rétine. Une incision est réalisée juste en dessous de la cornée, la partie antérieure et postérieure de l'œil sont alors séparées. Le vitré est ensuite délicatement écarté de la partie postérieure en évitant de provoquer tout détachement de la rétine. Cette dernière qui correspond en fait à la rétine nerveuse, ou neurosensorielle, est délicatement récupérée.

L'extraction et l'isolement de l'IRBP ont été réalisés selon le protocole *d'Adler & Evans, 1985*. Ce dernier est spécifique à cet auto-antigène, car il est basé sur sa localisation au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs située entre la rétine nerveuse et l'épithélium pigmentaire. Il consiste donc en un lavage des rétines nerveuses et de la face interne de la partie postérieure des yeux correspondant à l'épithélium pigmentaire.

II.1.1 Préparation des extraits bruts A & B

Après dissection, les rétines nerveuses sont délicatement extraites, elles sont mises dans le tampon PBS pH 7.4 à mesure d'une rétine/ml. Les rétines sont laissées dans le tampon à +4°C pendant 1 heure. D'autre part, la face interne de la partie postérieure des yeux est délicatement rincée par le tampon PBS qui est ajouté à la suspension. Une première centrifugation est réalisée à 1000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est récupéré et les rétines du culot sont resuspendues dans un même volume de tampon. Laissez à +4°C pendant 1 heure, cette suspension subira une deuxième et identique centrifugation. Les deux surnageants sont mélangés puis centrifugés à 14000 rpm pendant 1 heure. Le dernier surnageant obtenu est récupéré et représente l'« extrait brut A » ou « EB.A », il sera conservé à -45°C jusqu'à son utilisation.

L'« extrait brut B » ou « EB.B » est préparé de la même manière que précédemment, sauf que le tampon de lavage PBS est remplacé par un tampon d'extraction de pH 7.5 composé du mélange : tampon de Brooks et l'anti-protéase PMSF.

Remarques :

- Chaque extrait brut a été préparé à partir de « n=20 » œil de bœuf.
- L'EB.A est utilisé dans l'induction de l'UAE par l'extrait brut total chez le rat *Wistar*, alors que l'EB.B est utilisé dans l'isolement de l'auto-antigène rétinien : l'IRBP.

II.1.2 Isolement de l'IRBP par chromatographie d'affinité sur Concanavalline A-Sepharose

La chromatographie d'affinité est une chromatographie d'adsorption basée sur la liaison spécifique entre une protéine et son ligand. La Concanavalline A est une lectine d'origine végétale, capable de fixer spécifiquement les résidus α D mannopyranosyl et α D glucopyranosyl. Elle reconnaît donc et fixe spécifiquement les glycoprotéines comprenant dans leurs chaînes glucidiques des résidus α D mannose et α D glucose.

L'extrait brut B (1ml) est déposé sur le lit du gel. Après pénétration complète de l'échantillon dans le gel, un lavage est réalisé avec le tampon PB 0.02M pH 7.5. L'élution spécifique est réalisée avec le tampon PB 0.02M-Sucrose 0.1M pH 7.5 à un débit de 10 ml/h. Les éluats sont récupérés à mesure de 1ml/tube et les densités optiques sont lues à 280nm.

II.1.3 Dosage des protéines des extraits bruts et des différentes fractions par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines en solution par la méthode de Bradford est basé sur l'interaction en milieu acide, entre les protéines et le bleu de coomassie G250, aboutissant à la formation d'un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm.

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution de BSA à 0,1%. Un volume de 3ml de réactif de Bradford est ajouté dans chaque tube, la mesure de l'absorbance est effectuée à 595 nm. La concentration protéique des extraits bruts et des différentes fractions est déterminée par extrapolation de la densité optique sur la courbe étalon $DO=f[BSA]$.

II.1.4 Caractérisation biochimique des extraits bruts par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Cette technique repose sur la séparation des protéines, dénaturées et chargées négativement par le SDS, en fonction de leur masse moléculaire.

Les extraits bruts sont mélangés au tampon d'échantillon (V/V), contenant essentiellement du SDS (à 10%) et du bleu de bromophénol qui nous permet de suivre la migration. Ils sont chauffés à 100°C pendant 2 min, un volume de 20µl contenant 10 µg de l'échantillon est déposé dans chaque puits. La migration a lieu sur un gel à 13%. Après migration, le gel est mis dans une solution de coloration à 0.85% de bleu de coomassie R250 pendant 1 heure 30min à 2 heures sous agitation, puis dans une solution de décoloration à 50% de méthanol et 10% d'acide acétique pendant toute une nuit sous agitation également, afin de révéler les différentes bandes.

II.2 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat Wistar

L'UAE a été induite chez le rat *Wistar*, d'une part, par l'extrait brut total (EB.A) et d'autre part, par l'auto-antigène rétinien l'IRBP isolé à partir de l'extrait brut EB.B.

II.2.1 Induction de l'UAE par l'extrait brut total

Des rats *Wistar* femelles (n=9), âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés au cours des expérimentations. L'induction de l'UAE a été réalisée par injection sous-cutanée de 150µl par rat d'une émulsion composée de l'extrait brut A « EB.A » et de l'adjuvant complet de Freund « CFA » (V/V). Chaque rat a donc reçu l'équivalent de 100µg d'EB.A.

En parallèle, des rats *Wistar* femelles (n=9), âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés en tant que rats « contrôle ». Chaque rat a reçu 150 µl d'une émulsion composée de PBS et de CFA (V/V).

Après immunisation, les rats sont suivis de près quotidiennement. Des photos des yeux sont prises à l'aide d'une loupe. Et au bout du 7^{ème} (stade 1), 14^{ème} (stade 2) et 21^{ème} jour post immunisation (stade 3), des rats immunisés par l'EB.A et des rats « contrôle » (CFA+PBS) (n=3) sont sacrifiés. Le sang est collecté par ponction cardiaque dans des tubes contenant un anticoagulant : l'EDTA. Ces derniers subiront une centrifugation à 9000 rpm pendant 10 min, le plasma est récupéré puis congelé à -45°C jusqu'à son utilisation. D'autre part, les yeux de chaque rat sont délicatement prélevés et mis dans un fixateur histologique.

Par ailleurs, des rats *Wistar* femelles (n=7), âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés en tant que rats « témoin ». Le plasma et les yeux sont récupérés de la même manière que précédemment.

II.2.2 Induction de l'UAE par l'IRBP

Des rats *Wistar* femelles (n=12), âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés au cours des expérimentations. L'induction de l'UAE a été réalisée par injection sous cutanée de 200 µl par rat d'une émulsion composée de la fraction contenant l'IRBP et de l'adjuvant complet de Freund « CFA » (V/V). Chaque rat a donc reçu l'équivalent de 13 µg d'IRBP.

Après immunisation, les rats sont suivis de près quotidiennement. Des photos des yeux sont prises à l'aide d'une loupe. Et au bout du 7^{ème} (stade1), 14^{ème} (stade 2) et 21^{ème} jour post immunisation (stade 3), des rats immunisés par l'IRBP (n=4) sont sacrifiés. Le sang est collecté par ponction cardiaque dans des tubes contenant un anticoagulant : l'EDTA. Ces derniers subiront une centrifugation à 9000 rpm pendant 10 min, le plasma est récupéré puis congelé à -45°C jusqu'à son utilisation. D'autre part, les yeux et la rate sont délicatement prélevés. La rate va servir à la préparation des splénocytes, un œil est mis dans un fixateur histologique et l'autre œil sera broyé dans un tampon phosphate.

❖ Préparation et culture des splénocytes :

La rate, soigneusement rincée à l'eau physiologique est homogénéisée dans un tampon PBS pH 7.4, en la pressant délicatement contre les mailles d'un filtre qui nous permet de retenir les débris de la capsule splénique. La suspension obtenue est par la suite centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. Le culot récupéré subit d'abord des lavages alternés au PBS et au PBS-NH₄CL (0,83%), afin d'éliminer les globules rouges, avant d'être resuspendu dans un volume minimum de RPMI-1640.

Après avoir effectué un test d'exclusion au bleu de Trypan qui nous permet d'estimer le taux de viabilité des cellules, Les splénocytes sont mis en culture dans du RPMI-1640 à 10% de SVF dans des microplaques de 96 puits à fond plat. En prenant soin de laisser un témoin pour chaque échantillon, les cellules sont stimulées avec la fraction contenant l'IRBP à une concentration de 10 µg/ml. Elles sont alors incubées à 37°C pendant 20h en atmosphère humide et à 5% de CO₂. Les cultures sont par la suite centrifugées à 10000 rpm pendant 10 min et les surnageants sont récupérés et conservés à -45°C.

❖ Préparation d'un Homogénat des yeux de rats *Wistar* :

Les yeux de rats, soigneusement rincés à l'eau physiologique sont préalablement pesés, un volume de tampon phosphate pH 7,2 équivalent à neuf fois le poids retrouvé est alors rajouté. Les yeux sont par la suite homogénéisés dans de la glace. Une centrifugation à 9000 rpm

pendant 10 minutes est réalisée, le surnageant est récupéré puis conservé à -45°C jusqu'à son utilisation.

En parallèle, des rats *Wistar* femelles (n=3), âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés en tant que rats « témoin ». Le plasma et les organes (les yeux et la rate) sont récupérés de la même manière que précédemment.

II.2.3 Dosage des nitrites résiduels et des nitrites totaux *in vivo*, dans les plasma et *in vitro*, dans les surnageants de culture des splénocytes, par la méthode de Griess modifiée

Le dosage du NO dans les milieux biologiques passe impérativement par la quantification de ses deux métabolites stables : les nitrites et nitrates. La méthode la plus couramment employée est celle de Griess modifiée. Il s'agit d'une réaction de diazotation s'effectuant en deux étapes: les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 543 nm. Etant donné que les réactifs employés ne réagissent qu'avec les nitrites, une étape de réduction des nitrates en nitrites est donc nécessaire.

L'échantillon à analyser (plasma ou surnageant de culture des splénocytes) est incubé avec la souche bactérienne ATCC 8062 douée d'une activité nitrate réductase. Il sera par la suite mélangé avec les réactifs de Griess (Naphtyl-éthylène diamine dichloride à 0.5% dans du HCL à 20% + Sulfanilamide à 5% dans du HCL à 20%) en solution V/V. La densité optique est par la suite mesurée à 543nm, elle est proportionnelle à la concentration des nitrites totaux présents dans l'échantillon à analyser.

D'autre part, une gamme étalon $DO=f[NO_2^-]$ est réalisée.

Remarque :

Le dosage des nitrites résiduels dans les plasma et les surnageants de culture est réalisé de la même manière que pour le dosage des nitrites totaux sauf que l'étape de réduction des nitrates en nitrites n'est plus effectuée.

II.2.4 Evaluation de la production de NO (nitrites résiduels) par milligramme de protéines *in situ* dans les surnageants des homogénats des yeux de rats *Wistar*

Dans les surnageants des homogénats des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats *Wistar* « témoin », les nitrites résiduels ont été quantifiés par la méthode de Griess modifiée. D'autre part, les protéines ont également été dosées par la méthode de Bradford. Le rapport [nitrites résiduels] / [protéines] nous permet d'estimer la production locale de monoxyde d'azote dans les yeux de rats *Wistar* immunisés ou non.

II.2.5 Etude de l'aspect histologique des rétines au cours de l'UAE

Après dissection des rats, les yeux sont prélevés et mis dans un fixateur histologique le Bouin aqueux. L'organe est laissé dans le fixateur pendant au moins trois jours. Il subira par la suite une étape de déshydratation dans des bains d'éthanol de degrés croissants (70°, 95°, 100°), une étape d'éclaircissement dans un bain de butanol et une étape d'inclusion dans de la paraffine dans deux bains d'1 heure 30min chacun à l'étuve (56°C).

Les blocs de paraffine renfermant l'organe sont coulés à l'aide de barres de Leuckart, taillés puis coupés au microtome à 5µm d'épaisseur. Les lames sont par la suite colorées à l'hématoxyline-éosine puis observées au microscope photonique.

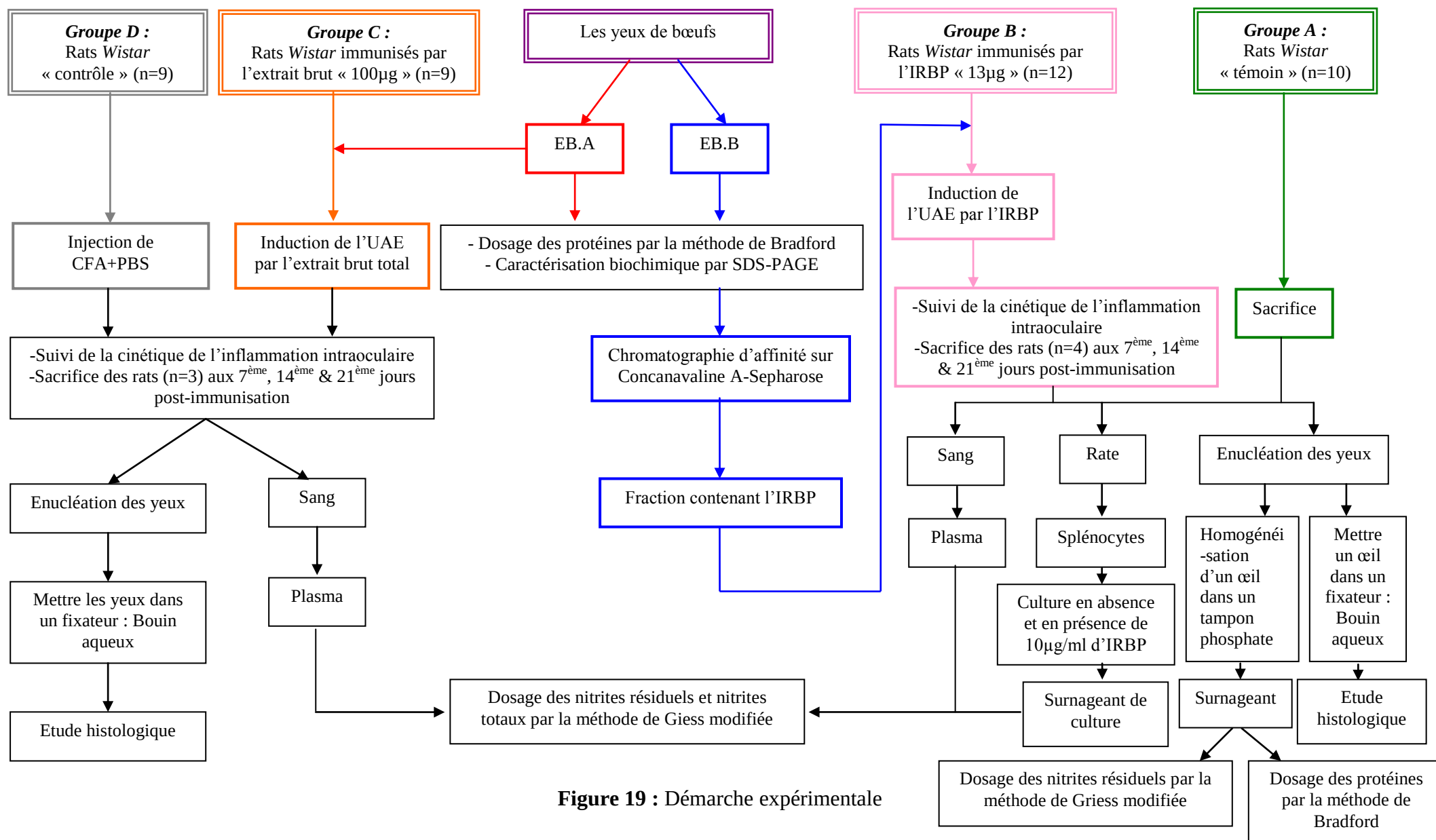


Figure 19 : Démarche expérimentale

Chapitre III

Résultats & Discussion

I Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines

L'IRBP est une protéine de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs. Pour son isolement nous avons opté pour un extrait brut obtenu par lavage des rétines nerveuses ainsi que la face interne de la partie postérieure des yeux correspondant à l'épithélium pigmentaire.

I.1 Préparation et caractérisation des extraits bruts A et B

Selon le protocole décrit ci-dessus, deux extraits bruts « A et B » ont été préparés par un lavage au tampon PBS et au tampon d'extraction (tampon de Brooks + anti-protéase « PMSF ») respectivement.

L'analyse de la composition des deux extraits bruts par SDS-PAGE a révélé la présence d'une mosaïque de bandes protéiques dont les poids moléculaires sont rapprochés et compris entre 20 et 225kDa (Figure 20). De plus, nous avons noté avec intérêt la présence d'une bande protéique majeure possédant un PM avoisinant les 140kDa dans les profils électrophorétiques des deux extraits rétinien. Cette dernière pourrait éventuellement correspondre à l'IRBP : protéine soluble majeure de l'espace inter-photorécepteurs. Une deuxième bande protéique majeure possédant un PM de 45kDa est également observée, elle correspondrait probablement à l'arrestine visuelle ou antigène S.

La comparaison des profils électrophorétiques des deux extraits bruts « A et B » a permis de constater que les bandes protéiques de 140 et 45kDa sont de grande intensité pour l'extrait brut B comparé à l'extrait brut A (Figure 20). Cette observation pourrait être expliquée par l'action anti-protéase du PMSF composant le tampon d'extraction.

D'autre part, le dosage protéique par la méthode de Bradford a révélé une concentration protéique pour l'EB.B plus élevée que celle de l'EB.A. Ces concentrations sont respectivement de 3mg/ml et de 1.37mg/ml.

Par ailleurs, l'isolement de l'IRBP peut être aussi réalisé par un autre protocole utilisant un extrait brut obtenu par lyse des rétines par des chocs thermiques afin de libérer un maximum de protéines. La comparaison du profil de ce dernier extrait brut avec ceux des extraits bruts « A et B » obtenus par un simple lavage des rétines nerveuses et de la face interne de la partie postérieure des yeux, a montré que les deux types d'extraits bruts contenaient la protéine d'intérêt : l'IRBP. Cependant, le nombre et l'intensité des autres bandes protéiques étaient plus importants au niveau de l'extrait obtenu par lyse des rétines (Figure 20). Cette différence serait probablement due à l'origine des extraits bruts. En effet, les extraits rétinien A et B contiennent essentiellement les protéines de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs ; en grande partie l'IRBP. Les autres bandes protéiques détectées dans les profils proviendraient probablement de la lyse accidentelle des cellules rétinien lors de l'étape de prélèvement des rétines nerveuses et d'extraction des protéines. Quant à l'extrait obtenu par des chocs thermiques des rétines, il contient les protéines libérées par la lyse des cellules rétinien en plus de celles constituant la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs mais à faible concentration.

La concentration protéique élevée de l'EB.B ainsi que sa richesse en protéines de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs et essentiellement l'IRBP, nous ont amené à l'utiliser au lieu de l'EB.A afin d'isoler cet auto-antigène rétinien par chromatographie d'affinité.

I.2 Isolement de l'IRBP à partir de l'extrait brut B par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A-Sepharose

L'IRBP est de nature glycoprotéique. Son isolement requiert l'utilisation de la concanavaline A, lectine végétale caractérisée par sa capacité à lier les glycoprotéines comprenant dans leurs chaînes glucidiques des résidus α D mannose et α D glucose. L'extrait brut B a donc été soumis à une chromatographie d'affinité sur Concanavaline A-Sepharose. Le profil obtenu (Figure 21) révèle la présence de deux fractions, la première (fraction I) dans la phase de lavage et la seconde (fraction II) dans la phase d'élution. Cette dernière contiendrait l'IRBP, car cette protéine est hautement glycosylée et renferme dans sa structure le mannose. Elle se lie donc à la concanavaline A et sera récupérée dans la phase d'élution.

Le dosage protéique par la méthode de Bradford a révélé une concentration de 0.474 mg/ml pour la fraction I et de 0.133mg/ml pour la fraction II.

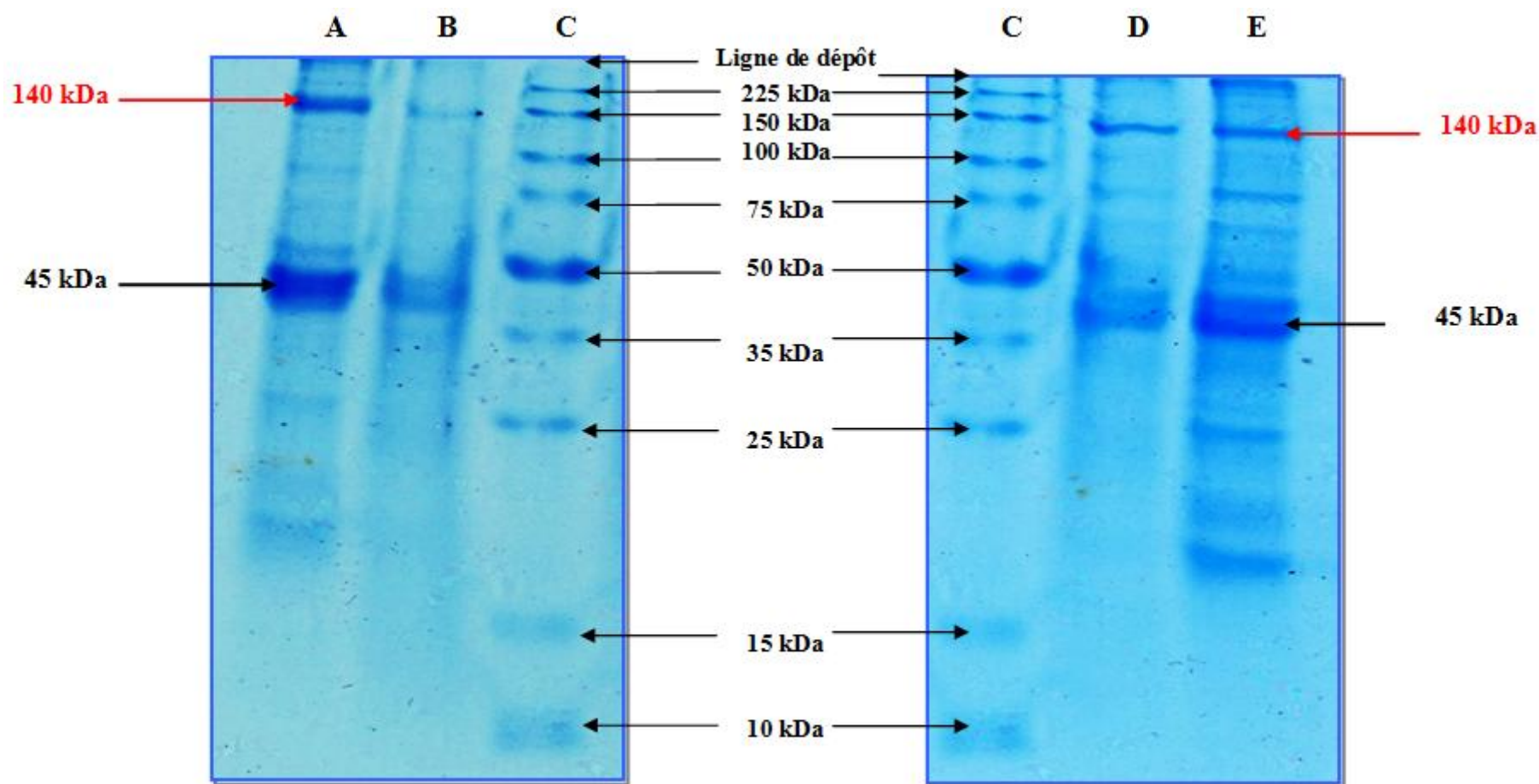


Figure 20 : Caractérisation de la composition protéique des extraits bruts rétiens par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13%) en présence de SDS en conditions non réductrices. Piste A : EB.B (10 µg/puits). Piste B : EB.B (5 µg/puits). Piste C : Marqueurs de poids moléculaire. Piste D : EB.A (10 µg/puits). Piste E : extrait brut obtenu par lyse des rétines par des chocs thermiques (10 µg/ puits). (—→ : Bande pouvant correspondre à l'IRBP)

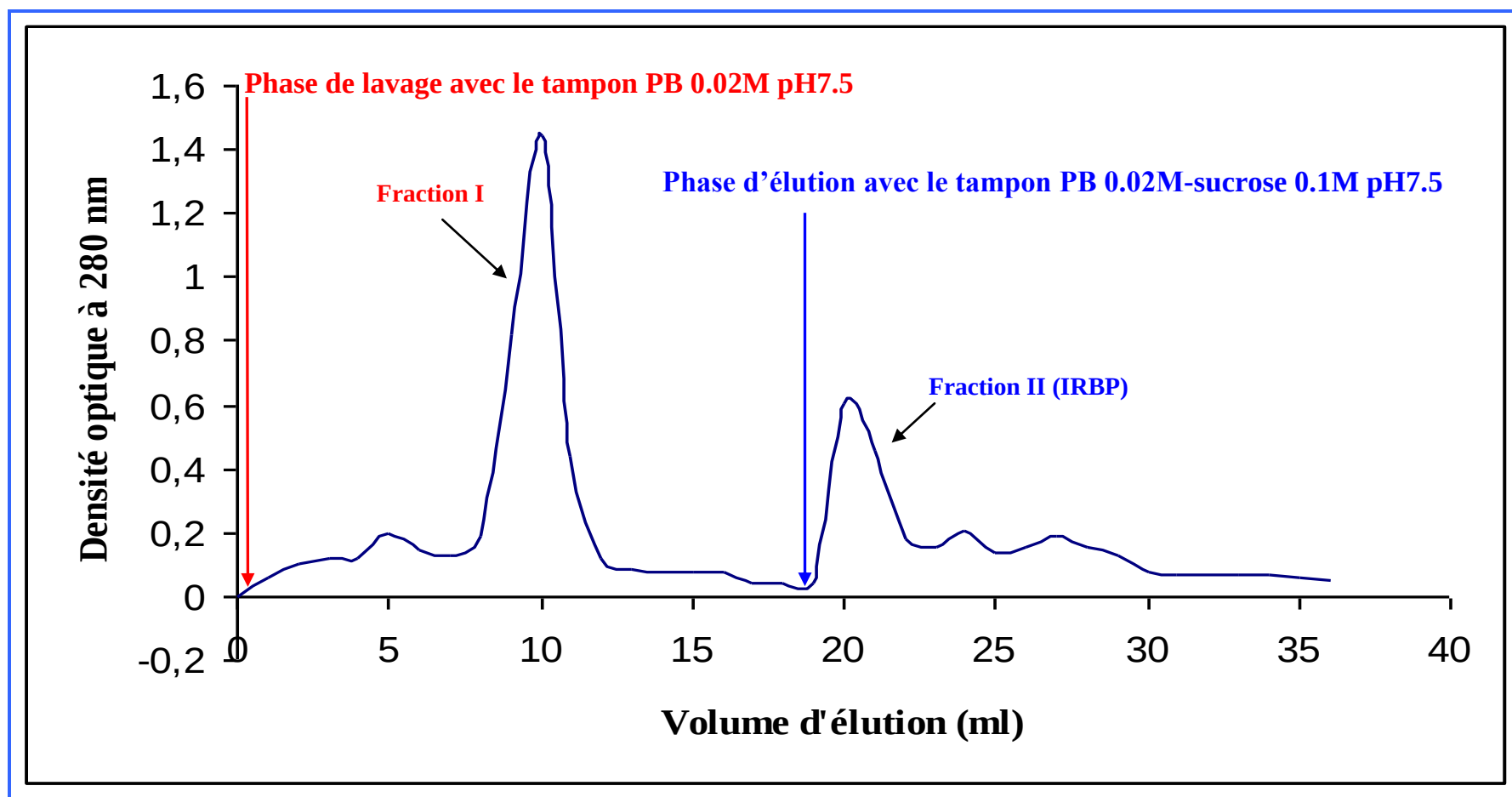


Figure 21 : Profil de l'élution de l'extrait brut « EB.B » par chromatographie d'affinité sur Concanavaline A-Sepharose : un pic est obtenu dans la phase de lavage et un pic dans la phase d'élution.

II Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat *Wistar*

L'UAE a été induite chez le rat *Wistar* d'une part, par l'extrait brut total (EB.A) et d'autre part, par l'auto-antigène rétinien l'IRBP isolé à partir de l'extrait brut EB.B.

II.1 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat *Wistar* par l'extrait brut total « EB.A »

L'uvéite auto-immune expérimentale a été induite chez des rats *Wistar* femelles (n= 9) âgés de 6 à 8 semaines, par injection sous cutanée de 150 µl par rat d'une émulsion composée de l'extrait brut A « EB.A » et de l'adjuvant complet de Freund « CFA » (V/V). Chaque rat a donc reçu l'équivalent de 100µg d'EB.A.

II.1.1 Cinétique de l'inflammation intraoculaire au cours de l'UAE induite chez le rat *Wistar* par l'extrait brut

Après immunisation, les rats sont suivis de près quotidiennement. Des photos des yeux sont prises à l'aide d'une loupe, elles sont par la suite comparées à celles de rats « témoin ».

Au niveau de l'œil d'un rat « témoin », l'iris présente un aspect translucide et une couleur claire rosâtre. Quant aux yeux des rats immunisés par l'extrait brut, on observe le début d'une inflammation intraoculaire « uvéite » bilatérale à partir du 7^{ème} jour post-immunisation qui s'accroît de plus en plus vers le 14^{ème} jour. En effet, on distingue clairement des modifications au niveau de l'iris qui adopte une couleur rougeâtre et un aspect opaque. Au bout du 21^{ème} jour post-immunisation, un retour à l'état physiologique a été noté (Figure 22).

Par ailleurs, afin de tester l'effet de l'adjuvant complet de Freund sur l'apparition de l'inflammation intraoculaire chez les rats immunisés par l'extrait brut, neuf autres rats *Wistar* femelles âgés de 6 à 8 semaines ont été utilisés en tant que rats « contrôle ». Ces derniers ont reçu une injection de 150 µl d'une émulsion composée de PBS, pH 7.4 et de l'adjuvant complet de Freund (V/V). Ce groupe de rats a également été suivi de près. Cependant, aucune inflammation intraoculaire n'a été détectée (Figure 22). Ces données suggèrent que le CFA ne serait pas impliqué dans l'inflammation intraoculaire observée chez les rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut.

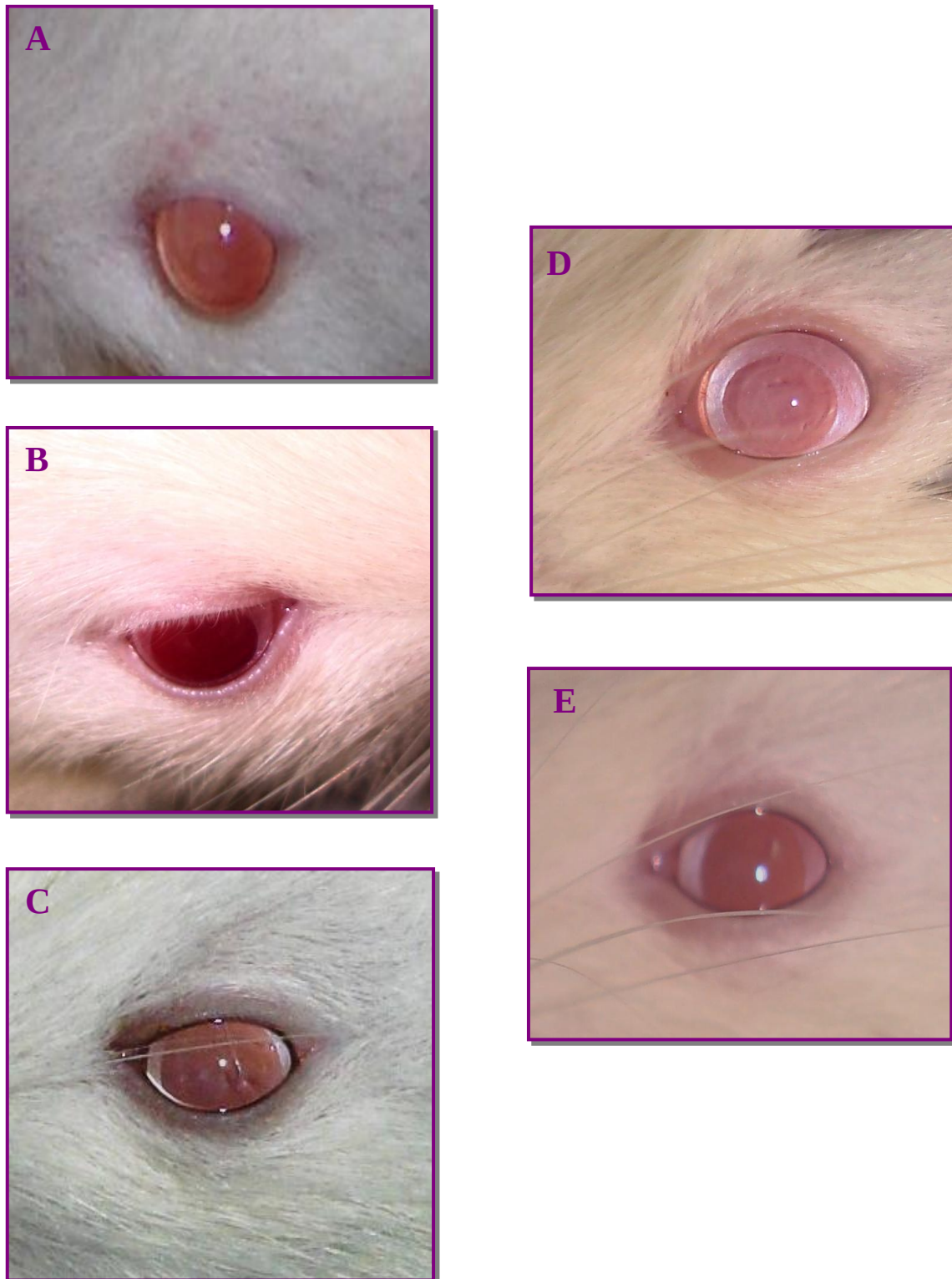


Figure 22 : Observation des modifications intraoculaires au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'extrait brut total (100 μ g).

A, B, C : Œil du rat *Wistar* immunisé par l'EB.A au 7^{ème} (stade 1), 14^{ème} (stade 2) et 21^{ème} jour post-immunisation (stade 3) respectivement.

D : Oeil du rat *Wistar* « témoin ». E : Oeil du rat *Wistar* « contrôle » (CFA+ PBS)

II.1.2 Etude de la production du NO *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'extrait brut et de rats Wistar « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

Aux trois stades définis par l'apparition et la disparition de l'inflammation intraoculaire, le 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour post-immunisation. Trois rats immunisés par l'extrait brut et trois autres rats « contrôle » (CFA+PBS) ont été sacrifiés. Le plasma a été récupéré pour le dosage *in vivo* des nitrites résiduels et des nitrites totaux (métabolites stables du NO). Les résultats sont représentés au niveau des Figures 23 et 24 respectivement, ainsi qu'au niveau du tableau 04.

II.1.2.1/ Production des nitrites résiduels *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'extrait brut et de rats Wistar « témoin » et « contrôle »

Pour le groupe de rats « témoin », la valeur moyenne du taux de nitrites résiduels au niveau du plasma est de $1.97 \pm 0.66 \mu\text{M}$.

Pour le groupe de rats « contrôle » (CFA+PBS), les taux plasmatiques de nitrites résiduels sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. En effet, ils atteignent les valeurs moyennes de $2.773 \pm 0.51 \mu\text{M}$, $2,83 \pm 0,7 \mu\text{M}$ et $2,495 \pm 0,23 \mu\text{M}$ aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation respectivement (Figure 23 & tableau 04).

Pour le groupe de rats immunisés par l'extrait brut, les taux plasmatiques de nitrites résiduels ont montré une augmentation importante et significative en comparaison avec les rats « témoin » et « contrôle ». Un pic de nitrites résiduels a été observé au niveau du 7^{ème} jour post-immunisation (stade 1), avec une valeur moyenne de $14.283 \pm 2.51 \mu\text{M}$. Une baisse des taux de nitrites résiduels a par la suite été notée au 14^{ème} jour (stade 2) et au 21^{ème} jour (stade 3) post-immunisation, pour atteindre les valeurs moyennes de $12.855 \pm 1.98 \mu\text{M}$ et de $8.57 \pm 1.64 \mu\text{M}$ respectivement. Les taux plasmatiques observés au 3^{ème} stade restent néanmoins supérieurs à ceux des rats « témoin » et « contrôle » (Figure 23 & tableau 04).

II.1.2.2/ Production des nitrites totaux *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'extrait brut et de rats Wistar « témoin » et « contrôle »

On remarque que les teneurs moyennes en nitrites totaux sont significativement plus élevées que celles des nitrites résiduels, et ce pour tous les groupes de rats et tous les stades.

Pour le groupe de rats « témoin », la valeur moyenne du taux de nitrites totaux au niveau du plasma est de $4.662 \pm 0.94 \mu\text{M}$.

Pour le groupe de rats « contrôle » (CFA+PBS), les taux plasmatiques de nitrites totaux sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. En effet, ils atteignent les valeurs moyennes de $4.495 \pm 0.23 \mu\text{M}$, $4,995 \pm 0,47 \mu\text{M}$ et $3,83 \pm 0,7 \mu\text{M}$ aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation respectivement (Figure 24 & tableau 04).

Pour le groupe de rats immunisés par l'extrait brut, le même profil que celui des taux plasmatiques de nitrites résiduels a été observé. En effet, une augmentation importante et significative des taux de nitrites totaux a été observée en comparaison avec les rats « témoin » et « contrôle ». De même, un pic de nitrites totaux a été noté au 7^{ème} jour post-immunisation

(stade 1) avec une valeur moyenne de $31.425 \pm 1.35 \mu\text{M}$. Une baisse importante et significative des taux de nitrites totaux a été observée au 2^{ème} et 3^{ème} stade post-immunisation, pour atteindre les valeurs moyennes de $16.189 \pm 2.52 \mu\text{M}$ et de $9.836 \pm 0.54 \mu\text{M}$ respectivement (Figure 24 & tableau 04).

D'autre part, les taux plasmatiques de NO chez les rats « contrôle » sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. Suggérant encore une fois que l'adjuvant complet de Freund ne serait pas impliqué dans l'élévation des taux plasmatiques de nitrites résiduels et totaux observés chez les rats immunisés par l'extrait brut.

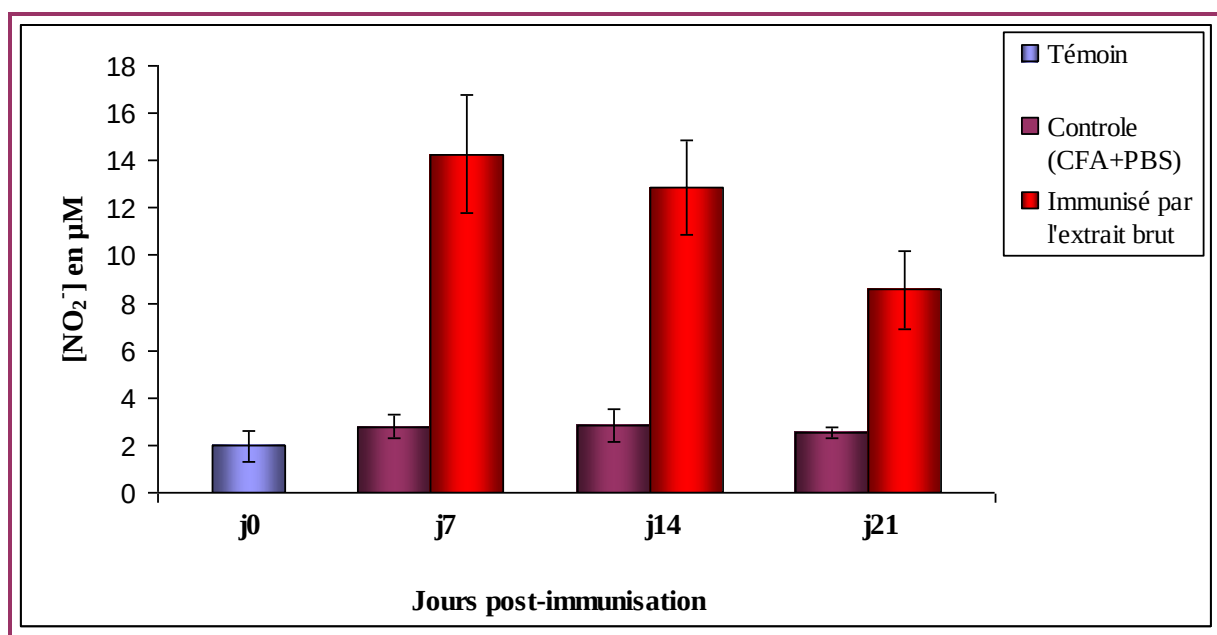


Figure 23 : Concentrations des nitrites résiduels *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut (100 μg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

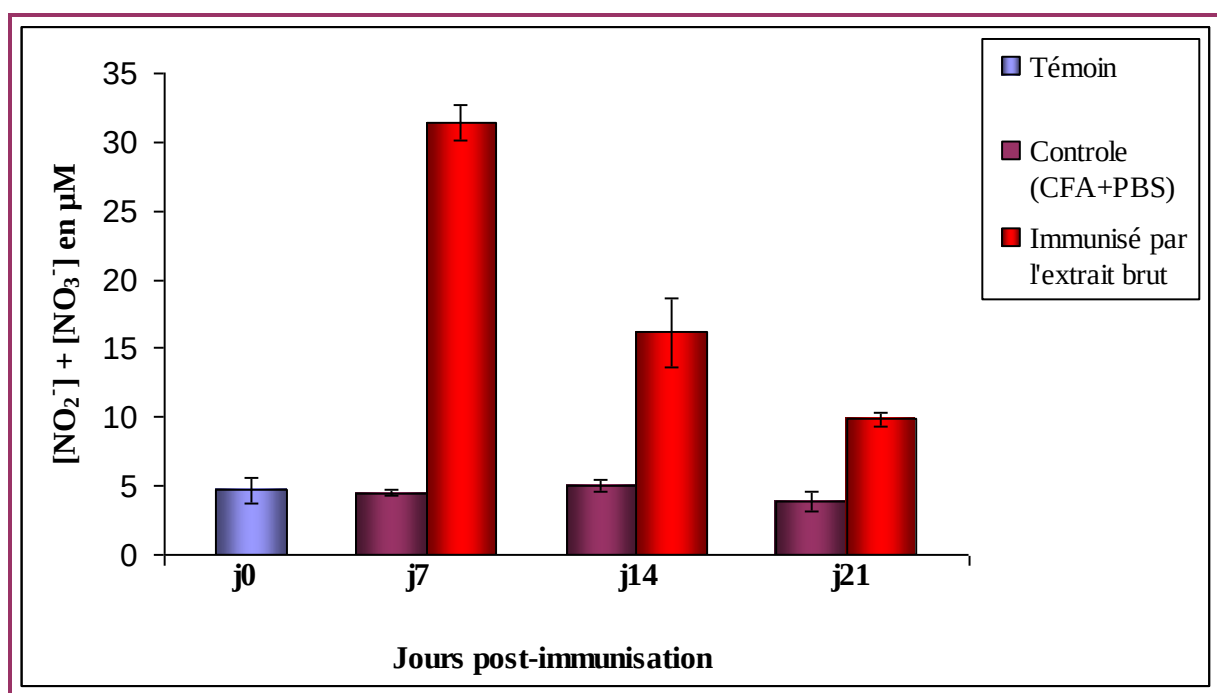


Figure 24 : Concentrations des nitrites totaux *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut (100 μg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

Groupe \ Concentration du NO en μM		Concentration des nitrites résiduels en μM	Concentration des nitrites totaux en μM
« Témoin »		1.97 ± 0.66	4.662 ± 0.94
« Immunisé par l'extrait brut (100 μg) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	14.283 ± 2.51	31.425 ± 1.35
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	12.855 ± 1.98	16.189 ± 2.52
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	8.57 ± 1.64	9.836 ± 0.54
« Contrôle (CFA+PBS) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	2.773 ± 0.51	4.495 ± 0.23
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	$2,83 \pm 0,7$	$4,995 \pm 0,47$
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	$2,495 \pm 0,23$	$3,83 \pm 0,7$

Tableau 04 : Concentrations des nitrites résiduels et des nitrites totaux *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut (100 μg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

II.1.3 Etude de l'aspect histologique des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

L'observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « témoin » montre un aspect stratifié et régulier. Les différentes couches sont disposées de manière ordonnée (Figure 25 A).

Au 7^{ème} jour post-immunisation, l'aspect histologique des rétines est similaire à celui des témoins. On observe un aspect stratifié où les différentes couches rétinienne sont disposées de manière ordonnée (Figure 26 E).

Au 14^{ème} jour post-immunisation, une désorganisation totale de l'architecture de la rétine est nettement observée en comparaison avec l'aspect des rétines de rats « témoin ». En effet, un repliement de la rétine ainsi qu'un décollement des couches, nucléaire et plexiforme externes sont notés (Figure 26 G & H). On observe également une atrophie de la couche des segments externes des photorécepteurs (Figure 26 F & H), ainsi qu'une désorganisation de la couche nucléaire interne avec la formation d'un granulome témoignant d'une infiltration massive de cellules inflammatoires (Figure 26 G). D'autre part, les noyaux des couches nucléaires externes et internes paraissent plus denses. On observe également une vasculite au niveau de la couche des cellules ganglionnaires (Figure 26 F).

Au 21^{ème} jour post-immunisation, on observe une altération de la structure de la rétine. En effet, on distingue clairement une destruction de la couche des photorécepteurs (couche nucléaire externe et couche des segments externes). Cependant, on n'observe plus de granulome ni d'infiltration de cellules inflammatoires (Figure 26 I).

Par ailleurs, l'observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « contrôle » est similaire à celle des rats « témoin » et ce aux trois stades post-immunisation. En effet un aspect stratifié et ordonné des rétines est noté (Figure 25 B, C & D).

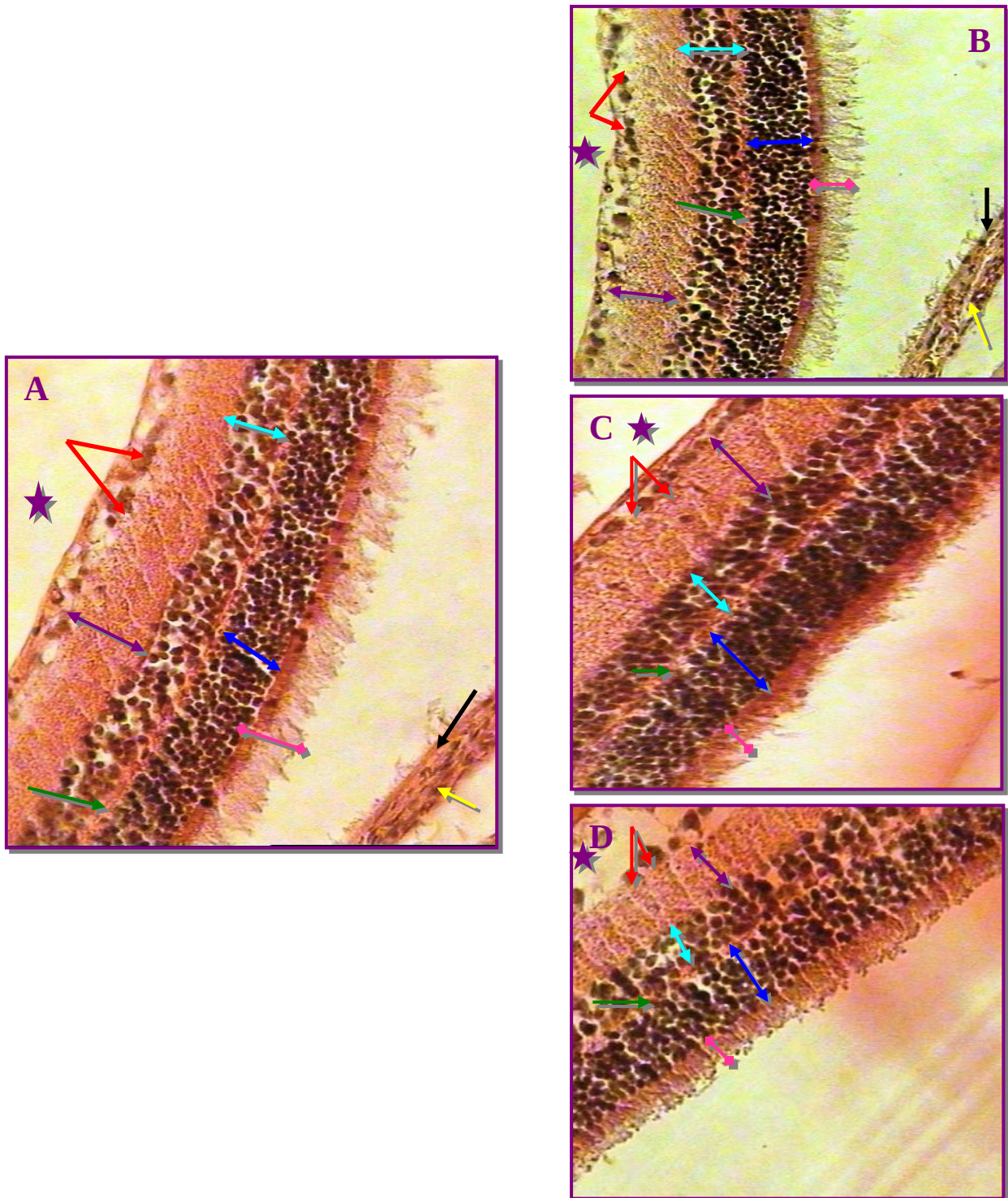


Figure 25 : Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS) aux différents stades post-immunisation, après coloration à l'hématoxyline - éosine (Grossissement $\times 400$).

A : « Témoin » ; B, C & D : « Contrôle » aux 7^{ème}, 14^{ème} & 21^{ème} jours post-immunisation.

→ Choroïde ; → Epithélium pigmentaire ; ↔ Couche des segments externes des photorécepteurs ; ↔ Couche nucléaire externe ; ↔ Couche plexiforme externe ; ↔ Couche nucléaire interne ; ↔ Couche plexiforme interne ; ↔ Noyaux des cellules ganglionnaires ; ★ Le corps vitré

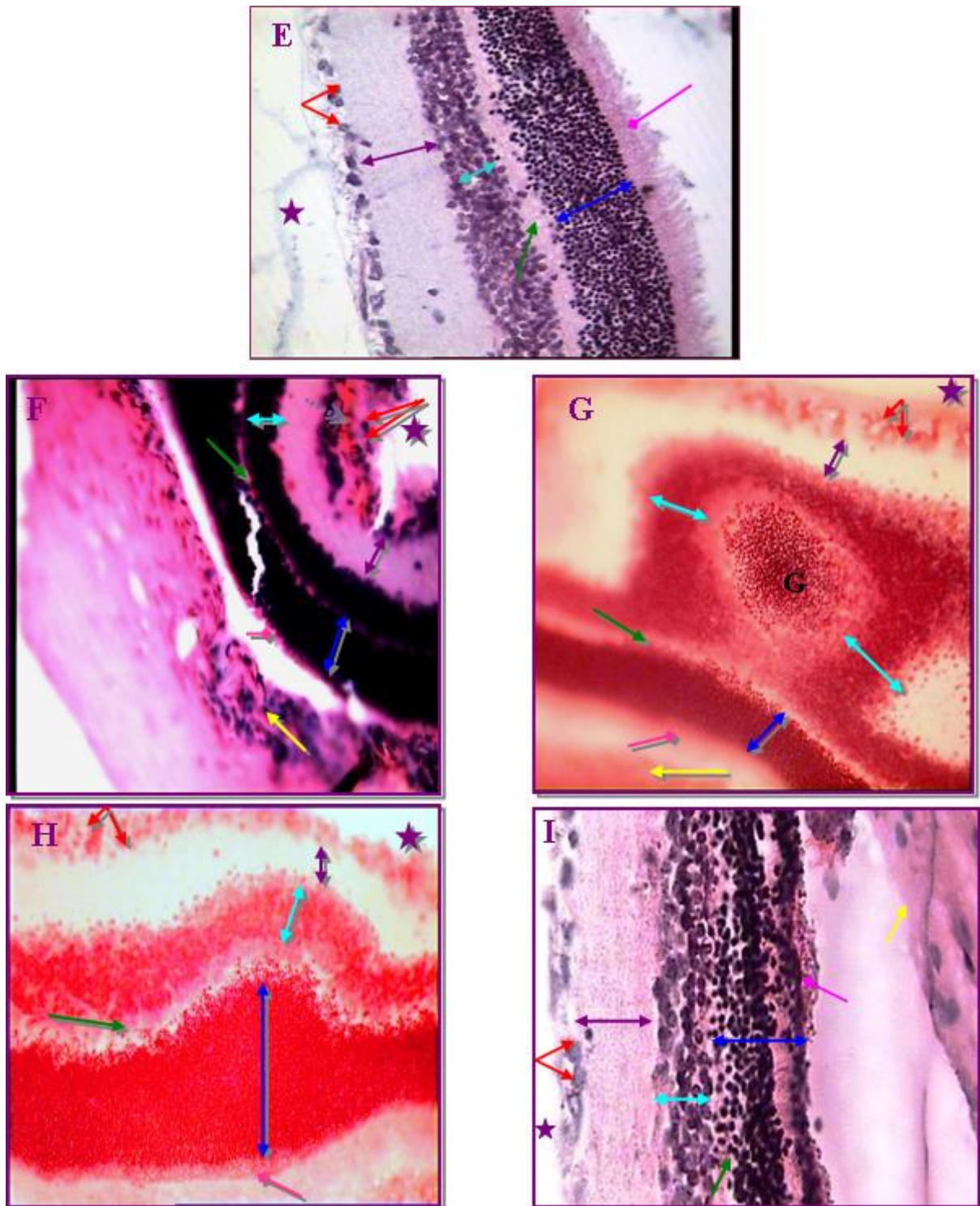


Figure 26 : Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut (100µg) aux trois stades post-immunisation, après coloration à l'hématoxyline - éosine (Grossissement $\times 400$).

E : Stade 1 (7^{ème} jour) ; F, G & H : Stade 2 (14^{ème} jour) ; I : Stade 3 (21^{ème} jour).

→ Choroïde ; → Epithélium pigmentaire ; → Couche des segments externes des photorécepteurs ; → Couche nucléaire externe ; → Couche plexiforme externe ;
 → Couche nucléaire interne ; → Couche plexiforme interne ;
 → Noyaux des cellules ganglionnaires ; ★ Corps vitré ; G : Granulome ; → Capillaire sanguin

II.2 Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat Wistar par l'IRBP

L'uvéite auto-immune expérimentale a été induite chez des rats *Wistar* femelles (n= 12) âgés de 6 à 8 semaines, par injection sous cutanée de 200 µl d'une émulsion composée de la fraction contenant l'IRBP (Fraction II au niveau du profil chromatographique) et de l'adjuvant complet de Freund (V/V). Chaque rat a donc reçu l'équivalent de 13 µg d'IRBP.

II.2.1 Cinétique de l'inflammation intraoculaire au cours de l'UAE induite chez le rat Wistar par l'IRBP

Après immunisation, les rats sont suivis de près quotidiennement. Des photos des yeux sont prises à l'aide d'une loupe, elles sont par la suite comparées à celles de rats « témoin ».

Au niveau de l'œil d'un rat « témoin », l'iris présente un aspect translucide et une couleur claire rosâtre.

Contrairement au profil de la cinétique de l'inflammation intraoculaire observée chez les rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut, les signes cliniques d'une uvéite chez les rats *Wistar* immunisés par l'IRBP ne sont vraiment détectés qu'au 14^{ème} jour. En effet, au 7^{ème} jour post-immunisation un aspect translucide et une couleur rosâtre de l'iris ont été observés. Au 14^{ème} jour post-immunisation, l'iris commence à adopter une couleur rougeâtre et un aspect opaque ; signe du début d'une inflammation intraoculaire « uvéite » touchant les deux yeux. Au 21^{ème} jour post-immunisation, les signes d'une uvéite s'accroissent encore plus (Figure 28).

Par ailleurs, les rats « contrôle » (CFA+PBS) n'ont montré aucun signe d'inflammation intraoculaire (Figure 27).

II.2.2 Etude de la production du NO *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

Aux trois stades de l'inflammation intraoculaire, le 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour post-immunisation. Quatre rats immunisés par l'IRBP et trois rats « contrôle » (CFA+PBS) ont été sacrifiés. Le plasma a été récupéré pour le dosage *in vivo* des nitrites résiduels et des nitrites totaux (métabolites stables du NO). Les résultats sont représentés au niveau des Figures 28 et 29 respectivement, ainsi qu'au niveau du tableau 05.

II.2.2.1/ Production des nitrites résiduels *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin » et « contrôle »

Pour le groupe de rats « témoin », la valeur moyenne du taux de nitrites résiduels au niveau du plasma est de 1.97 ± 0.66 µM.

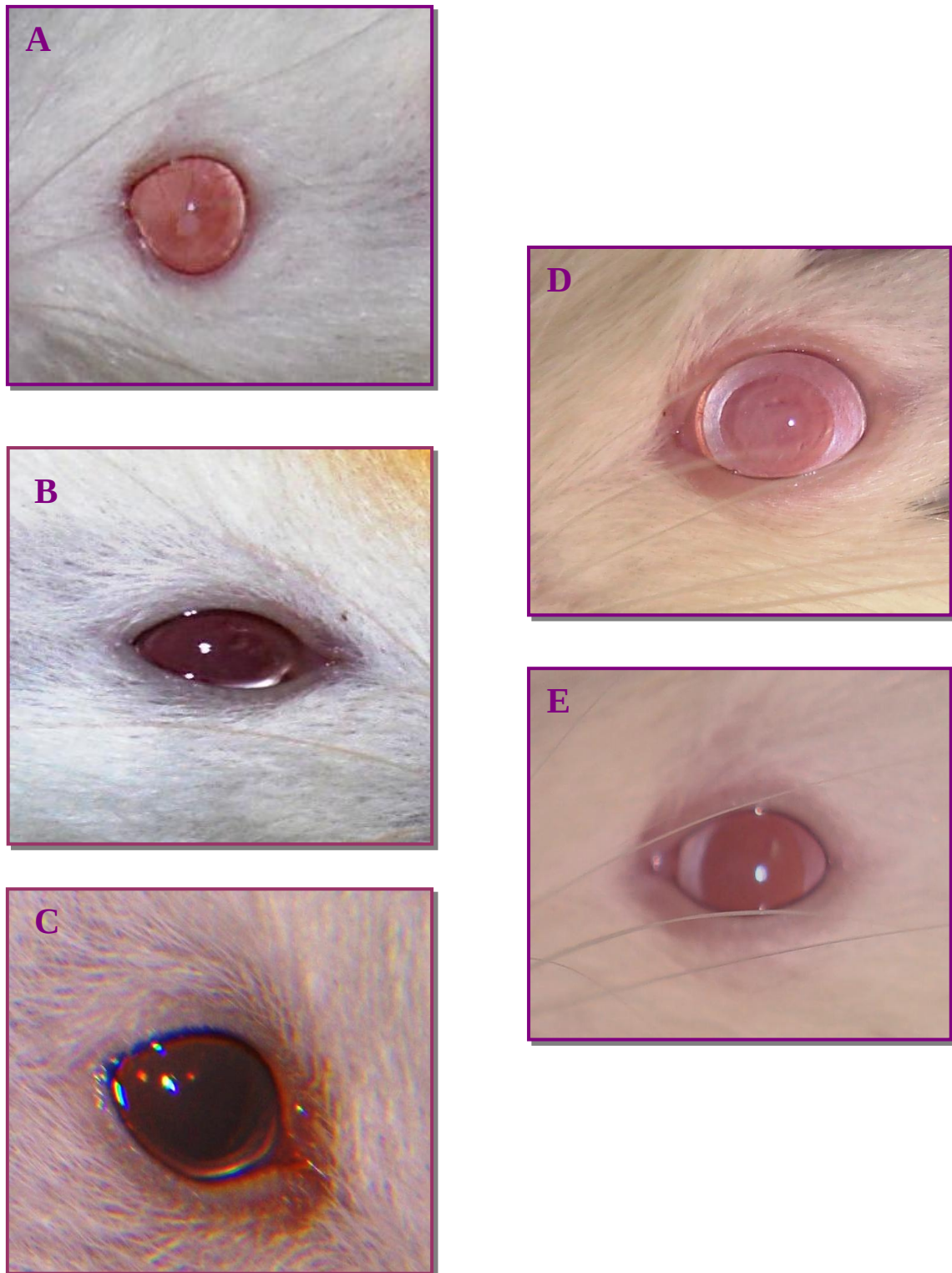


Figure 27 : Observation des modifications intraoculaires au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'IRBP (13 μ g).

A, B, C : Œil du rat *Wistar* immunisé par la fraction contenant l'IRBP aux 7^{ème} (stade 1), 14^{ème} (stade 2) et 21^{ème} jours post-immunisation (stade 3) respectivement.

D : Oeil du rat *Wistar* « témoin ». E : Oeil du rat *Wistar* « contrôle » (CFA+ PBS)

Pour le groupe de rats « contrôle » (CFA+PBS), les taux plasmatiques de nitrites résiduels sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. En effet, ils atteignent les valeurs moyennes de $2.773 \pm 0.51\mu\text{M}$, $2,83 \pm 0,7\mu\text{M}$ et $2,495 \pm 0,23\mu\text{M}$ aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation respectivement (Figure 28 & tableau 05).

Pour le groupe de rats immunisés par l'IRBP, les taux plasmatiques de nitrites résiduels ont montré une augmentation importante et significative en comparaison avec les rats « témoin » et « contrôle ». En effet, les concentrations plasmatiques au 7^{ème} jour post-immunisation s'élèvent et atteignent une valeur moyenne de $12.5 \pm 1.41\mu\text{M}$. Un pic de nitrites résiduels est ensuite observé au 14^{ème} jour post-immunisation avec une valeur moyenne de $22.75 \pm 0.35\mu\text{M}$. Au 21^{ème} jour post-immunisation, une baisse des taux de nitrites résiduels est notée atteignant une valeur moyenne de $19 \pm 0,7\mu\text{M}$. Cette teneur plasmatique reste néanmoins nettement plus élevée que celles des rats « témoin » et « contrôle » mais aussi plus élevée que celle du stade 1 (7^{ème} jour post-immunisation) (Figure 28 & tableau 05).

II.2.2.2/ Production des nitrites totaux in vivo au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin » et « contrôle »

On remarque que les teneurs moyennes en nitrites totaux sont significativement plus élevées que celles des nitrites résiduels, et ce pour tous les groupes de rats et tous les stades.

Pour le groupe de rats « témoin », la valeur moyenne du taux de nitrites totaux au niveau du plasma est de $4.662 \pm 0.94\mu\text{M}$.

Pour le groupe de rats « contrôle » (CFA+PBS), les taux plasmatiques de nitrites totaux sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. En effet, ils atteignent les valeurs moyennes de $4.495 \pm 0.23 \mu\text{M}$, $4,995 \pm 0,47\mu\text{M}$ et $3,83 \pm 0,7\mu\text{M}$ aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation respectivement (Figure 29 & tableau 05).

Pour le groupe de rats immunisés par l'IRBP, le même profil que celui des taux plasmatiques de nitrites résiduels a été observé. En effet, une augmentation importante et significative des taux de nitrites totaux a été notée en comparaison avec les rats « témoin » et « contrôle ». Cette augmentation est détectée au 7^{ème} jour post-immunisation, avec une valeur moyenne de $28.75 \pm 1.76\mu\text{M}$. Un pic est ensuite atteint au 14^{ème} jour avec une valeur moyenne de $34.25 \pm 0.35\mu\text{M}$. Et enfin une diminution des taux de nitrites totaux est détectée au 21^{ème} jour post-immunisation et atteint une valeur moyenne de $29,5 \pm 2,8\mu\text{M}$. Ces taux restent eux aussi nettement plus élevés que ceux des rats « témoin » et « contrôle » et légèrement plus élevés que ceux du stade 1 (7^{ème} jour post-immunisation) (Figure 29 & tableau 05).

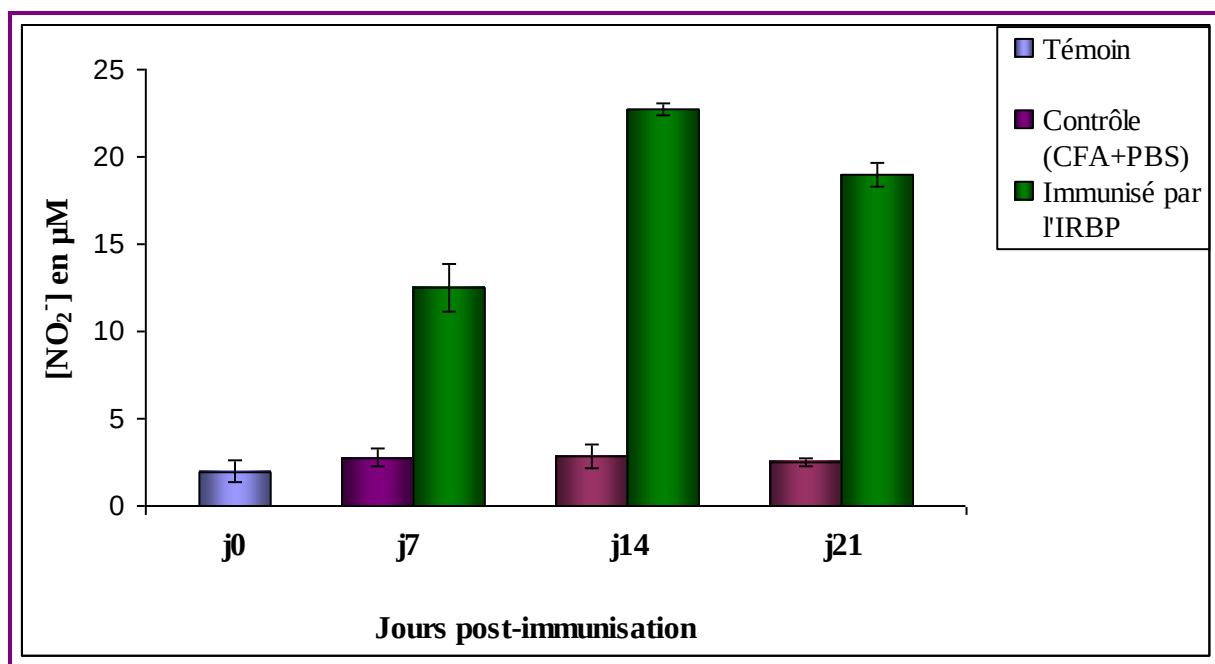


Figure 28 : Concentrations des nitrites résiduels *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 μ g) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

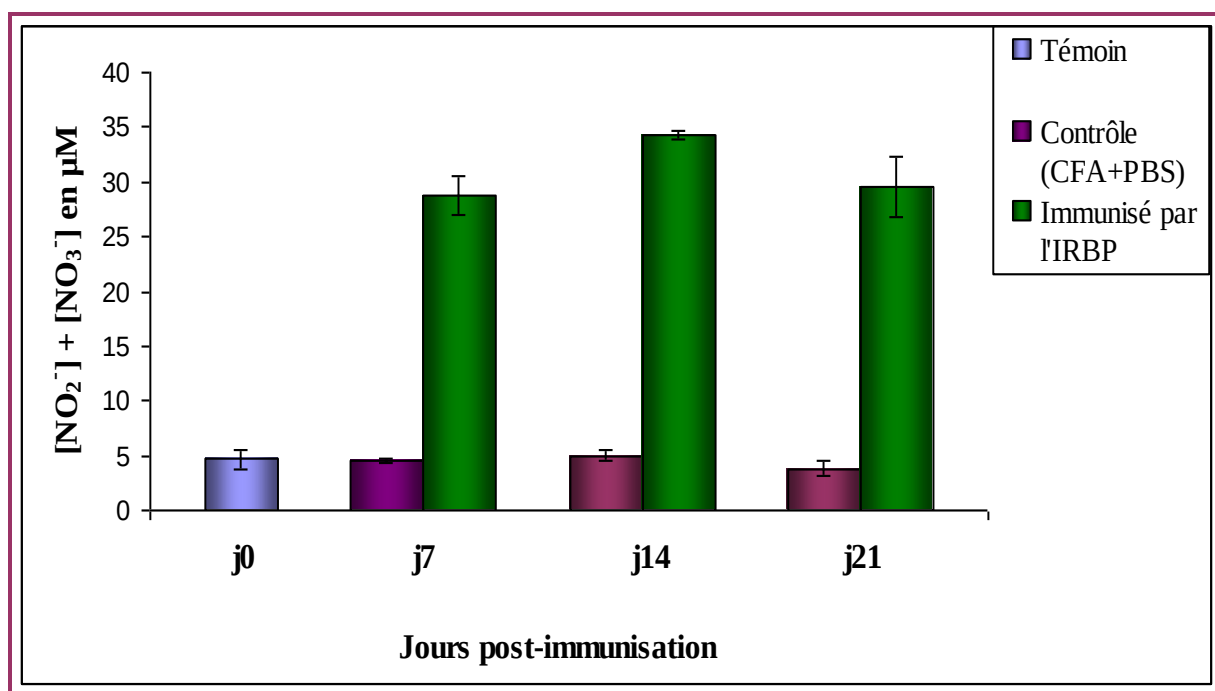


Figure 29 : Concentrations des nitrites totaux *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 μ g) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

Groupe \ Concentration du NO en μM		Concentration des nitrites résiduels en μM	Concentration des nitrites totaux en μM
« Témoin »		1.97 ± 0.66	4.6625 ± 0.94
« Immunisé par l'IRBP (13 μg) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	12.5 ± 1.41	28.75 ± 1.76
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	22.75 ± 0.35	34.25 ± 0.35
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	$19 \pm 0,7$	$29,5 \pm 2,8$
« Contrôle (CFA+PBS) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	2.773 ± 0.51	4.495 ± 0.23
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	$2,83 \pm 0,7$	$4,995 \pm 0,47$
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	$2,495 \pm 0,23$	$3,83 \pm 0,7$

Tableau 05 : Concentrations des nitrites résiduels et des nitrites totaux *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 μg) aux différents stades post-induction de l'UAE, et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+ PBS)

II.2.3 Etude de la production du NO *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin » :

Afin d'étudier la production du NO au niveau splénique au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'IRBP, quatre rats immunisés par cet auto-antigène rétinien ont été sacrifiés aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation. Les rates ont été prélevées afin de préparer les splénocytes. Ces derniers ont été cultivés *in vitro* en présence et en absence de 10 µg/ml d'IRBP. Les résultats de la production des nitrites résiduels et nitrites totaux dans les surnageants de culture sont représentés au niveau des Figures 30 et 31 ainsi qu'au niveau des tableaux 06 et 07.

II.2.3.1/ Production des nitrites résiduels *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin »

Pour le groupe de rats « témoin », le taux de nitrites résiduels dans les surnageants de culture des splénocytes sans induction (témoin de culture) présente une valeur moyenne de $5.75 \pm 0.35 \mu\text{M}$. La présence d'IRBP à 10 µg/ml induit une augmentation significative de la production de nitrites résiduels et atteint une valeur moyenne de $11.33 \pm 1.26 \mu\text{M}$ (Figure 30 & tableau 06).

Pour le groupe de rats immunisés par l'IRBP. Au 7^{ème} jour post-immunisation, la production de nitrites résiduels dans les surnageants de culture des splénocytes sans induction augmente légèrement par rapport à celle de rats « témoin » et atteint la valeur moyenne de $6.665 \pm 0.47 \mu\text{M}$. La présence de 10 µg/ml d'IRBP induit quant à elle une augmentation significative des taux de nitrites résiduels en comparaison avec le témoin de culture et atteint une valeur moyenne de $11.75 \pm 0.35 \mu\text{M}$. Cependant, on constate que la différence entre les teneurs moyennes de nitrites résiduels dans les surnageants de culture des splénocytes en présence d'IRBP de rats « témoin » et de rats immunisés par cet auto-antigène n'est pas très significative.

Au 14^{ème} jour post-immunisation, on observe une élévation importante et significative avec un pic de production de nitrites résiduels dans les surnageants de culture sans induction par rapport au premier stade et aux rats « témoin ». Ces taux atteignent une valeur moyenne de $119.5 \pm 1.41 \mu\text{M}$. En présence de 10 µg/ml d'IRBP, ces taux s'élèvent à $130.5 \pm 2.82 \mu\text{M}$.

Au 21^{ème} jour post-immunisation, les taux de nitrites résiduels dans les surnageants de culture sans induction diminuent de manière significative par rapport au 2^{ème} stade mais restent néanmoins plus élevés que ceux du stade 1, ils atteignent la valeur moyenne de $8,75 \pm 0,35 \mu\text{M}$. En présence de 10 µg/ml d'IRBP, la production de nitrites résiduels augmente de manière significative par rapport au témoin de culture et atteint la valeur moyenne de $17,5 \pm 1,24 \mu\text{M}$ (Figure 30 & tableau 06).

II.2.3.2/ Production des nitrites totaux *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin »

On remarque que les teneurs moyennes en nitrites totaux sont significativement plus élevées que celles des nitrites résiduels, et ce pour tous les groupes de rats et tous les stades.

Pour le groupe de rats « témoin », le taux de nitrites totaux dans les surnageants de culture des plénocytes sans induction (témoin de culture) présente une valeur moyenne de $25.5 \pm 1.26 \mu\text{M}$. La présence d'IRBP à $10 \mu\text{g/ml}$ induit une augmentation significative de la production de nitrites totaux et atteint une valeur moyenne de $28.5 \pm 1.27 \mu\text{M}$ (Figure 31 & tableau 07).

Pour le groupe de rats immunisés par l'IRBP, une élévation significative des taux de nitrites totaux dans les surnageants de culture des splénocytes sans induction est observée par rapport à ceux de rats « témoin » et ce aux trois stades post-immunisation. En effet, on note au 7^{ème} jour une augmentation de la teneur moyenne en nitrites totaux, qui atteint la valeur de $59.58 \pm 7.42 \mu\text{M}$. Cette teneur augmente encore plus au 14^{ème} jour post-immunisation et atteint un pic de production de nitrites totaux avec une valeur moyenne de $141.75 \pm 0.35 \mu\text{M}$. Au 21^{ème} jour, une diminution significative des taux de nitrites totaux est détectée et atteint la valeur moyenne de $39,75 \pm 0.35 \mu\text{M}$.

D'autre part, la présence de $10 \mu\text{g/ml}$ d'IRBP induit une augmentation significative des taux de nitrites totaux dans les surnageants de culture des splénocytes par rapport à ceux de rats « témoin » et par rapport aux témoins de culture et ce aux trois stades post-immunisation. En effet, au 7^{ème} jour on observe une augmentation des taux de nitrites totaux qui atteint une valeur moyenne de $75.83 \pm 2.83 \mu\text{M}$. Un pic de production de nitrites totaux est ensuite noté au 14^{ème} jour avec une valeur moyenne de $148 \pm 4.94 \mu\text{M}$. Au 21^{ème} jour post-immunisation, une diminution de la teneur moyenne en nitrites totaux est observée et atteint une valeur de $62 \pm 2,12 \mu\text{M}$ (Figure 31 & tableau 07).

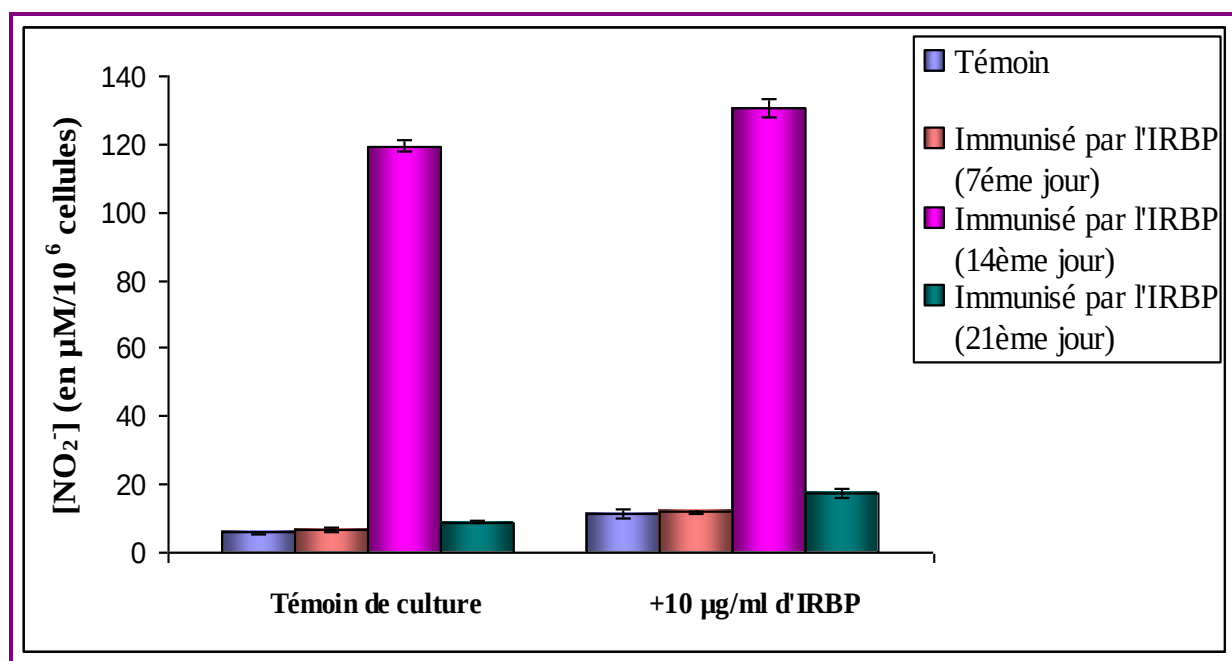


Figure 30 : Concentrations des nitrites résiduels *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP ($13 \mu\text{g}$) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

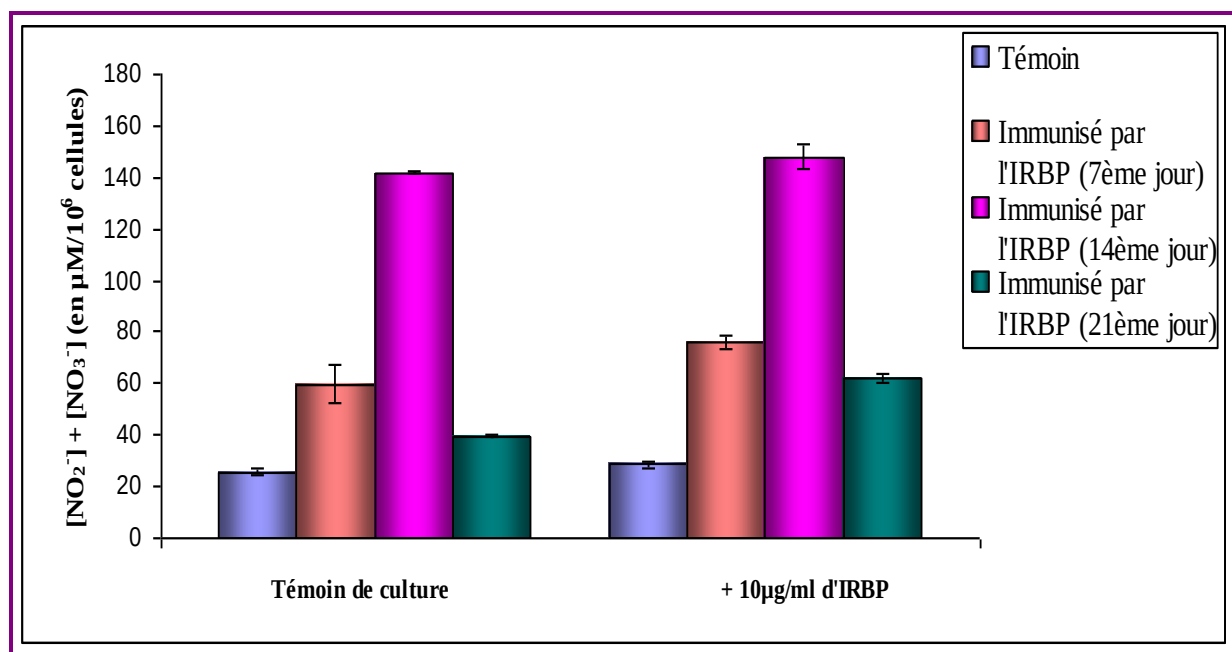


Figure 31 : Concentrations des nitrites totaux *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP ($13 \mu\text{g}$) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

Inducteur		Témoin de culture	+ 10 µg/ml d'IRBP
Groupe			
« Témoin »		5.75 ± 0.35	11.33 ± 1.26
« Immunisé par l'IRBP (13 µg) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	6.665 ± 0.47	11.75 ± 0.35
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	119.5 ± 1.41	130.5 ± 2.82
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	8,75 ± 0,35	17,5 ± 1,24

Tableau 06 : Concentrations des nitrites résiduels *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

Inducteur		Témoin de culture	+ 10 µg/ml d'IRBP
Groupe			
« Témoin »		25.5 ± 1.26	28.5 ± 1.27
« Immunisé par l'IRBP (13 µg) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	59.58 ± 7.42	75.83 ± 2.83
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	141.75 ± 0.35	148 ± 4.94
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	39,75 ± 0.35	62 ± 2,12

Tableau 07 : Concentrations des nitrites totaux *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

II.2.4 Etude de la production du NO (nitrites résiduels) *in situ* dans les surnageants des homogénats des yeux de rats Wistar immunisés par l'IRBP et de rats Wistar « témoin »

Dans le but d'étudier la production locale de NO au niveau des yeux au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'IRBP, quatre rats immunisés par cet auto-antigène rétinien ont été sacrifiés aux 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours post-immunisation. Les yeux ont été énucléés et homogénéisés dans un tampon phosphate. Les résultats de la production des nitrites résiduels dans les surnageants des homogénats par milligramme de protéines sont représentés au niveau de la Figure 32 ainsi qu'au niveau du tableau 08.

Pour le groupe de rats « témoin », le taux de production locale de nitrites résiduels dans le surnageant des homogénats des yeux présente une valeur moyenne de $0,0146 \pm 0,005$ $\mu\text{mole/mg}$ de protéines.

Pour le groupe de rats immunisés par l'IRBP, une augmentation significative du taux de nitrites résiduels par milligramme de protéines est notée par rapport aux rats « témoin » et ce à partir du 7^{ème} jour post-immunisation, atteignant la valeur moyenne de $0,032 \pm 0,018$ $\mu\text{mole/mg}$. Ce taux augmente encore de manière significative au 14^{ème} puis au 21^{ème} jour post-immunisation et atteint les valeurs moyennes de $0,08215 \pm 0,006$ et de $0,1136 \pm 0,013$ $\mu\text{mole/mg}$ respectivement.

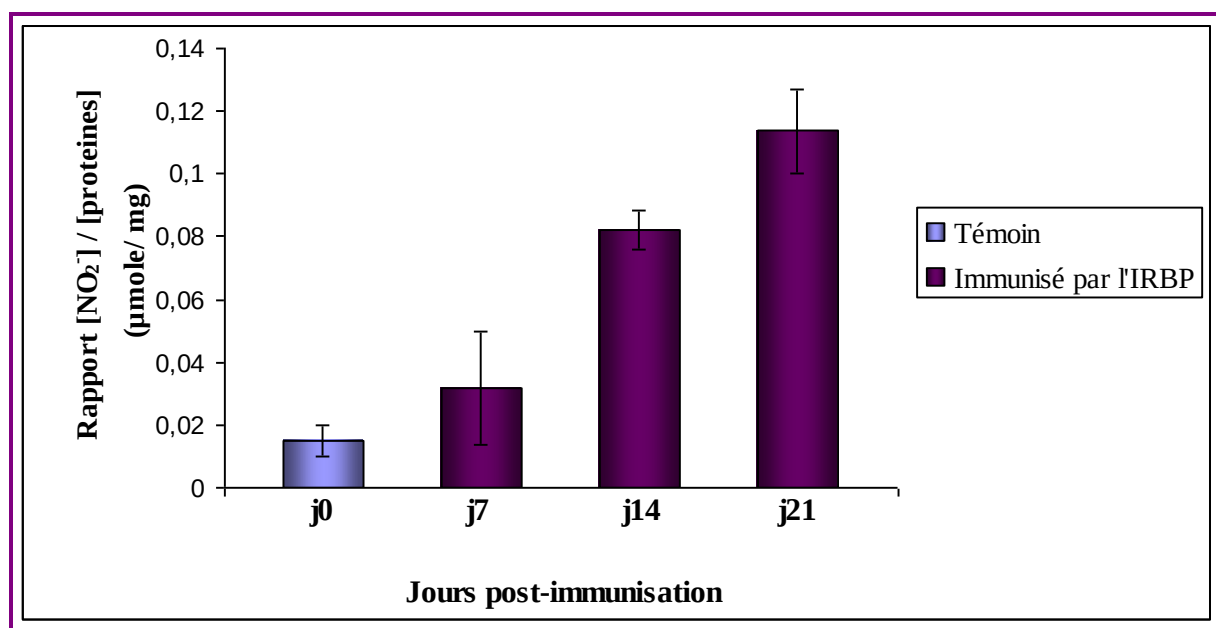


Figure 32 : Taux de nitrites résiduels par milligramme de protéines dans les surnageants des homogénats des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

Groupe		Rapport $[\text{NO}_2^-] / [\text{protéines}]$ (µmole/mg)
« Témoin »		$0,0146 \pm 0,005$
« Immunisé par l'IRBP (13 µg) »	Stade 1 (7 ^{ème} jour)	$0,032 \pm 0,018$
	Stade 2 (14 ^{ème} jour)	$0,08215 \pm 0,006$
	Stade 3 (21 ^{ème} jour)	$0,1136 \pm 0,013$

Tableau 08 : Tableau récapitulatif des taux moyens de nitrites résiduels par milligramme de protéines dans les surnageants des homogénats des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 µg) aux différents stades post-induction de l'UAE et de rats *Wistar* « témoin »

II.2.5 Etude de l'aspect histologique des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

L'observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « témoin » montre un aspect stratifié et régulier. Les différentes couches sont disposées de manière ordonnée (Figure 33 A).

Au 7^{ème} jour post-immunisation, l'aspect histologique des rétines est similaire à celui des témoins. On observe une architecture stratifiée où les différentes couches rétinienne sont disposées de manière ordonnée (Figure 34 E).

Au 14^{ème} jour post-immunisation, contrairement à ce qui a été observé au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'extrait brut, on ne détecte aucune modification dans la structure et l'architecture des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP. En effet, l'aspect histologique des rétines est similaire à celui des rats « témoin » (Figure 34 F).

Au 21^{ème} jour post-immunisation, une désorganisation de l'architecture de la rétine est observée. En effet, on distingue clairement une désorganisation et une destruction de la couche des photorécepteurs (couche nucléaire externe et couche des segments externes) ainsi que la couche nucléaire interne associée à une inflammation du corps vitré. En effet, on observe les noyaux de cellules inflammatoires infiltrantes (Figure 34 G & H).

Par ailleurs, l'observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « contrôle » est similaire à celle des rats « témoin » et ce aux trois stades post-immunisation. En effet un aspect stratifié et ordonné des rétines est noté (Figure 33 B, C & D).

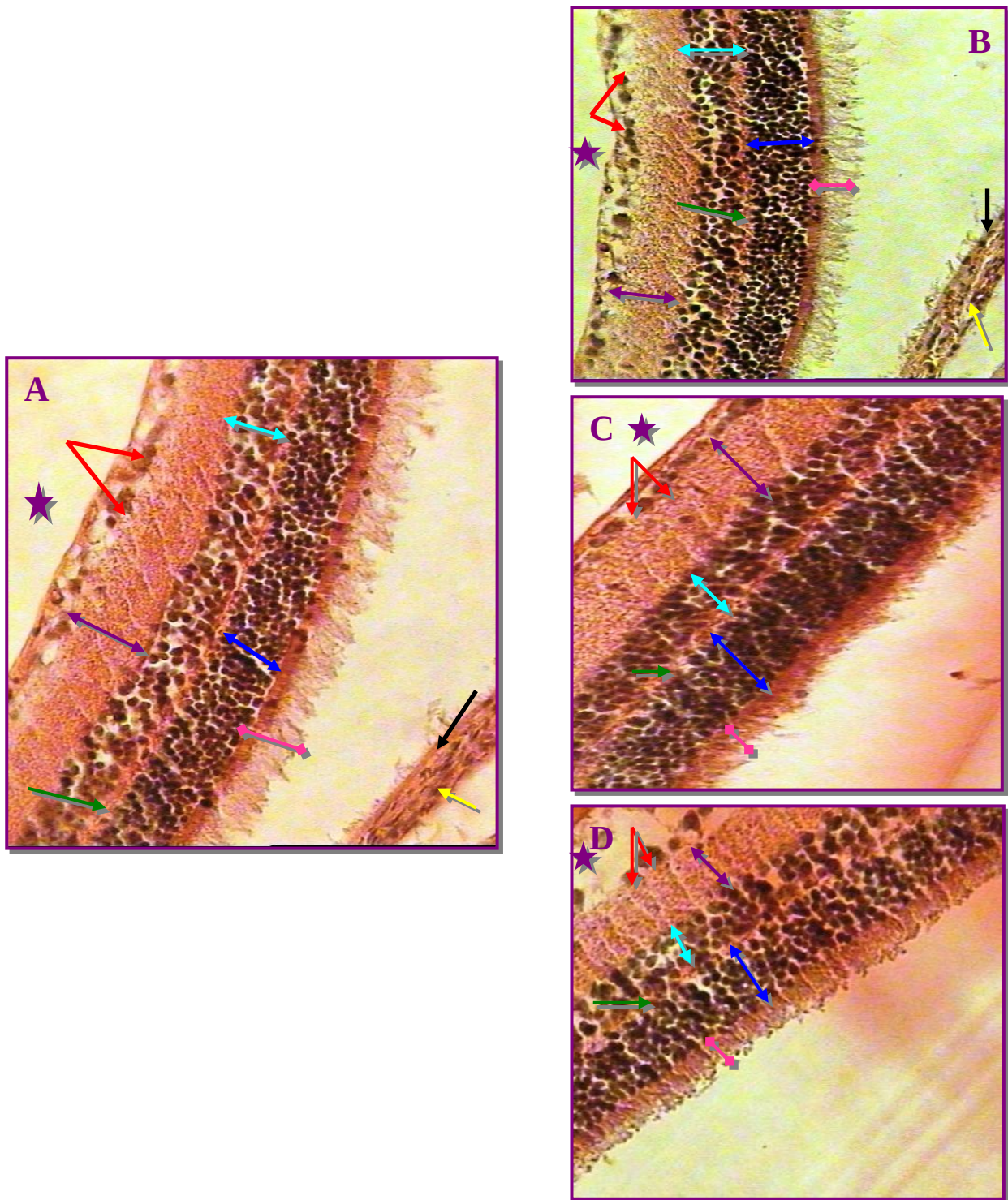


Figure 33 : Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS) aux différents stades post-immunisation, après coloration à l'hémaroxylène - éosine (Grossissement $\times 400$).

A : « Témoin » ; B, C & D : « Contrôle » aux 7^{ème}, 14^{ème} & 21^{ème} jours post-immunisation.

→ Choroïde ; → Epithélium pigmentaire ; → Couche des segments externes des photorécepteurs ; → Couche nucléaire externe ; → Couche plexiforme externe ;
 → Couche nucléaire interne ; → Couche plexiforme interne ;
 → Noyaux des cellules ganglionnaires ; ★ Le corps vitré

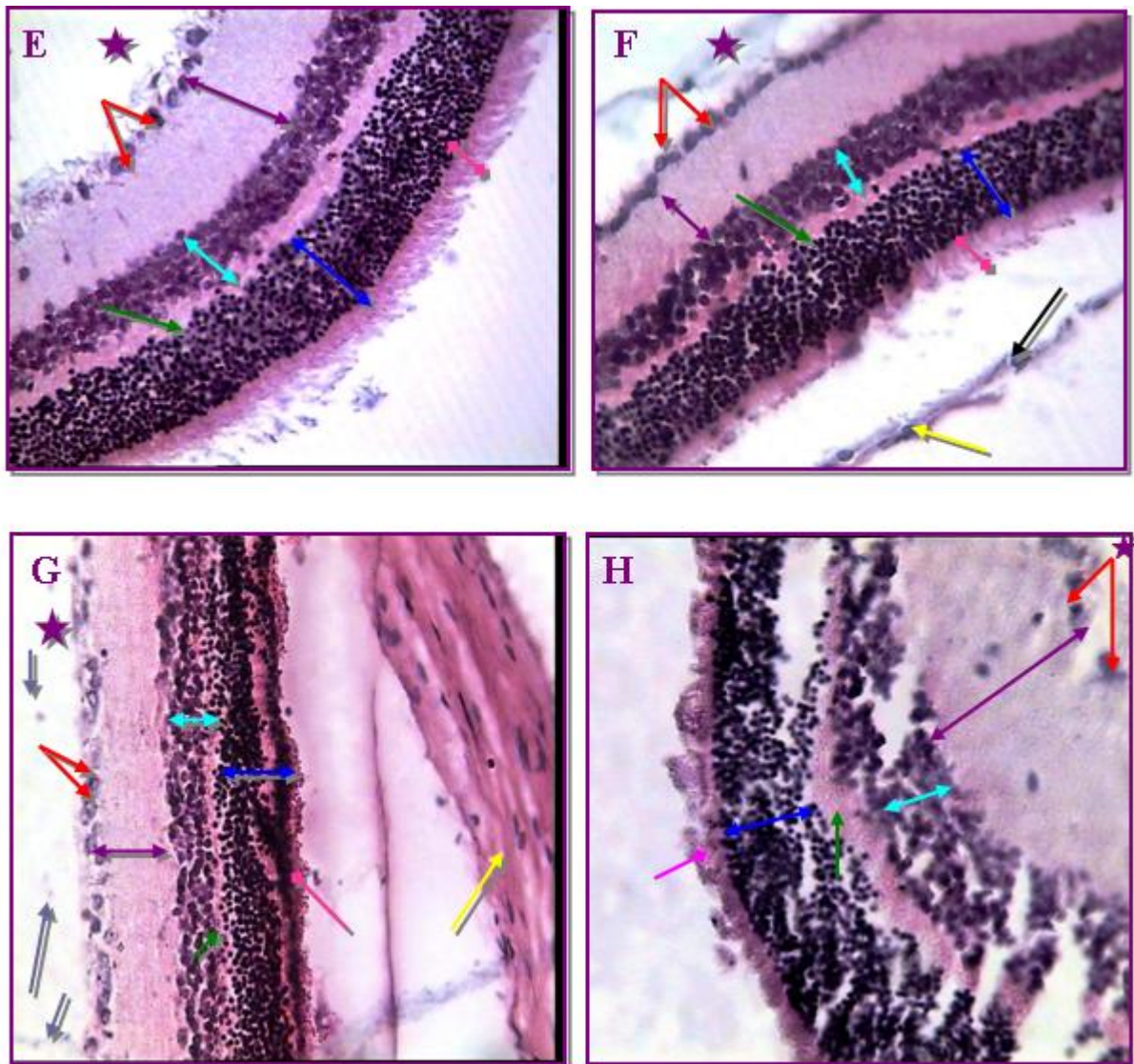


Figure 34 : Observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP (13 μ g) aux trois stades post-immunisation, après coloration à l'hématoxyline - éosine (Grossissement $\times 400$).

E : Stade 1 (7^{ème} jour) ; F : Stade 2 (14^{ème} jour) ; G & H: Stade 3 (21^{ème} jour).

→ Choroïde ; → Epithélium pigmentaire ; → Couche des segments externes des photorécepteurs ; → Couche nucléaire externe ; → Couche plexiforme externe ;
 → Couche nucléaire interne ; → Couche plexiforme interne ;
 → Noyaux des cellules ganglionnaires ; ★ Corps vitré ; → cellules inflammatoires au niveau du corps vitré

Chapitre IV : Discussion générale

I Extraction et isolement de l'auto-antigène rétinien l'IRBP à partir de rétines bovines

L'extraction et l'isolement de l'IRBP ont été effectués selon le protocole *d'Adler & Evans* (Adler and Evans, 1985). Ce dernier est spécifique à cet auto-antigène car il est basé sur sa localisation au niveau de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs, située entre la rétine nerveuse et l'épithélium pigmentaire. Il consiste donc en un lavage des rétines nerveuses et de la face interne de la partie postérieure des yeux correspondant à l'épithélium pigmentaire. Selon ce protocole deux extraits bruts ont été préparés, le premier (extrait brut A « EB.A ») avec le PBS comme tampon de lavage et le second (extrait brut B « EB.B ») avec le tampon d'extraction composé du mélange : tampon de Brooks et une anti-protéase ; le PMSF.

La caractérisation biochimique des deux extraits bruts par SDS-PAGE a révélé une mosaïque de protéines de PM rapprochés et compris entre 20 et 225kDa. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Adler & Evans (Adler and Evans, 1985), ainsi que ceux d'un membre de l'équipe (Belguendouz, 2005) qui rapportent des profils électrophorétiques similaires. Par ailleurs, la bande protéique majeure de PM avoisinant les 140kDa correspondrait probablement à l'IRBP. En effet, les données bibliographiques rapportent un PM approximatif de 140kDa pour l'IRBP bovin (Fong *et al.*, 1984 ; Saari *et al.*, 1985 ; Chader, 1989 ; Palczewski, 1994). De plus, cet auto-antigène rétinien représente la protéine soluble la plus abondante dans la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs (Bunt-Milam and Saari, 1983 ; Fong *et al.*, 1984 ; Bok, 1993; Mieziowska, 1996). Ce qui expliquerait l'intensité de la bande observée. Quant à la bande majeure de 45kDa, elle correspondrait à l'arrestine visuelle ou antigène S. Cette constatation est en accord avec les données bibliographiques qui rapportent un PM apparent d'environ 48kDa pour l'antigène S bovin (Shinohara *et al.*, 1987 ; Palczewski, 1994). L'antigène S, composant majeur des segments externes des photorécepteurs, ne fait pas partie des protéines composant la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs, sa présence dans le profil électrophorétique des deux extraits bruts serait donc probablement attribuée à la lyse accidentelle des cellules rétiniennes lors de l'étape de prélèvement des rétines nerveuses et d'extraction des protéines.

L'intensité des bandes protéiques de 140 et 45kDa observées dans le profil électrophorétique de l'EB.B en comparaison avec celui de l'EB.A, serait probablement due à l'action du PMSF composant le tampon d'extraction. En effet, ce dernier étant une anti-sérine protéases inhibe l'action destructive des protéases intracellulaires libérées éventuellement durant l'étape d'extraction de l'auto-antigène, nous permettant donc d'obtenir dès le départ une concentration protéique optimale. Ce résultat a par la suite été confirmé par le dosage protéique par la méthode de Bradford, qui a révélé une concentration protéique pour l'EB.B plus élevée que celle de l'EB.A. C'est pour cette raison que l'EB.B a été utilisé au lieu de l'EB.A afin d'isoler l'IRBP par chromatographie d'affinité.

Par ailleurs, la différence notée entre les profils des extraits bruts A et B et celui d'un autre extrait obtenu par des chocs thermiques des rétines, serait due à leur origine. En effet, les extraits rétiniens A et B obtenus par un simple lavage des rétines nerveuses et de l'épithélium pigmentaire contiennent essentiellement les protéines de la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs ; en grande partie l'IRBP. Les autres bandes protéiques détectées au

niveau des profils proviendraient probablement de la lyse accidentelle des cellules rétiniennes lors de l'étape de prélèvement des rétines nerveuses et d'extraction des protéines. Quant à l'extrait obtenu par des chocs thermiques des rétines, il contient les protéines libérées par la lyse des cellules rétiniennes en plus de celles constituant la matrice extracellulaire de l'espace inter-photorécepteurs mais à faible concentration. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par des membres de l'équipe (Belguendouz, 2005 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

D'autre part, l'isolement de l'IRBP à partir de l'EB.B par chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A- Sepharose a donné deux fractions. La première de concentration protéique élevée dans la phase de lavage et la seconde de concentration plus faible dans la phase d'élution. Cette dernière contiendrait l'IRBP, car cette protéine est hautement glycosylée. Elle se lie donc à la concanavaleine A et sera récupérée dans la phase d'élution. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes (Fong *et al.*, 1984 ; Adler and Evans, 1985).

II Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat Wistar par l'extrait brut total « EB.A »

L'injection sous cutanée de 100µg d'extrait brut rétinien émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund aux rats *Wistar* a permis d'induire une uvéite auto-immune expérimentale bilatérale. En effet, un début d'inflammation intraoculaire « uvéite » se manifestant par une opacité et une rougeur de l'iris a été observé à partir du 7^{ème} jour post-immunisation. Celle-ci s'est accentuée par la suite pour atteindre le pic au 14^{ème} jour. Au 21^{ème} jour post-immunisation, une résolution spontanée de la poussée inflammatoire a été notée. Des travaux réalisés sur le rat *Lewis* après injection sous cutanée de 100 µg d'extrait brut rétinien rapportent un profil similaire où le début de l'inflammation intraoculaire a été observé à partir du 11^{ème} jour post-immunisation, le pic a été atteint au bout du 17^{ème} jour. Un retour à l'état physiologique a été noté au 32^{ème} jour post-immunisation (Butler and McMenamin, 1996).

D'autre part, les rats immunisés par injection de PBS émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA) n'ont montré aucun signe d'uvéite ce qui suggère que le CFA ne serait pas impliqué dans l'inflammation intraoculaire observée chez les rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut. Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres travaux réalisés sur le rat *Lewis* (Butler and McMenamin, 1996).

II.1 Etude de la production du NO *in vivo* au niveau de plasma de rats Wistar immunisés par l'extrait brut et de rats Wistar « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

Les profils de production des nitrites résiduels et nitrites totaux (métabolites stables du NO) au niveau des plasma de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut, ont tout deux montré des taux de NO élevés en comparaison avec ceux des rats « témoin » et « contrôle », avec un pic au niveau du 7^{ème} jour post-immunisation puis une diminution significative aux 14^{ème} et 21^{ème} jours.

Le NO est une bio-molécule qui intervient aussi bien dans la phase effectrice que dans la régulation des réponses immunitaires cellulaires (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998 ; Bogdan *et al.*, 2000). Il est produit par la iNOS (NOS-2) au cours des réponses immunes. La iNOS est induite par de nombreuses cytokines produites durant les réponses inflammatoires telles que

l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-6 (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998 ; Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998 ; Hampl and Herget, 2000). Une augmentation des concentrations de NO au niveau sérique a été rapportée au cours de l'uvéïte associée à la maladie de Behçet et l'uvéïte idiopathique par deux membres de l'équipe (Guenane *et al.*, 2006 ; Belguendouz *et al.*, 2008). Cette augmentation est corrélée avec l'activité de la maladie. D'autre part, des taux élevés de NO ont également été notés dans d'autres pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies neuro-dégénératives, la rétocholite hémorragique et le lupus (Farrel *et al.*, 1992 ; Schulz *et al.*, 1995 ; Grabowski *et al.*, 1996 ; Silverman, 2009 ; Rafa, 2009).

Par ailleurs, en superposant le profil de production du NO au niveau plasmatique et la cinétique d'apparition de l'uvéïte chez le rat *Wistar* immunisé par l'extrait brut rétinien nous remarquons, que le pic de production de NO (au 7^{ème} jour post-immunisation) devance celui de l'inflammation intraoculaire « uvéïte » qui atteint son pic au 14^{ème} jour post-immunisation. Cette observation suggérerait une éventuelle implication des dérivés stables du NO durant les phases précoces de l'UAE. En effet, selon les données bibliographiques la première étape du développement de l'UAE est la reconnaissance des auto-antigènes injectés en périphérie par les CPA et leur présentation aux lymphocytes T auto-réactifs circulants menant à l'induction et l'expansion de la voie Th1. Cette dernière produisant des quantités élevées d'IFN- γ , stimulerait les macrophages ainsi que d'autres cellules effectrices et mènerait à la production élevée d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (Bogdan, 1998 ; Caspi, 2006 (b)).

D'autre part, les taux plasmatiques de NO chez les rats « contrôle » sont relativement stables aux trois stades post-immunisation et proches de ceux des témoins. Suggérant encore une fois que l'adjuvant complet de Freund ne serait pas impliqué dans l'élévation des taux plasmatiques de nitrites résiduels et totaux observés chez les rats immunisés par l'extrait brut.

II.2 Etude de l'aspect histologique des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

L'observation microscopique de l'histologie des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut montre, au 7^{ème} jour post-immunisation, une structure régulière et stratifiée similaire à celle des rats « témoin ». Au 14^{ème} jour post-immunisation, une désorganisation totale de l'architecture des rétines avec un repliement de la rétine ainsi qu'un décollement des couches, nucléaire et plexiforme externes sont notés. On observe également une atrophie de la couche des segments externes des photorécepteurs, ainsi qu'une désorganisation de la couche nucléaire interne avec la formation d'un granulome témoignant d'une infiltration massive de cellules inflammatoires. D'autre part, les noyaux des couches nucléaires externes et internes paraissent plus denses. On observe également une vasculite au niveau de la couche des cellules ganglionnaires. Une désorganisation de l'architecture de la rétine similaire a été observée au niveau des rétines de deux modèles expérimentaux d'UAE : le rats *Lewis* et la souris B10.RIII, tous deux immunisés par les auto-antigènes rétinien émulsifiés dans de l'adjuvant complet de Freund (Nussenblatt and Gery, 1996 ; Caspi, 2003 ; Caspi, 2006). Au 21^{ème} jour post-immunisation, la structure de la rétine est nettement altérée. On distingue même une destruction de la couche des photorécepteurs. Cependant, aucune organisation cellulaire en granulome n'est notée. Cette observation indiquerait qu'à ce stade post-immunisation, la réaction inflammatoire auto-destructive responsable de la désorganisation de l'architecture de la rétine est résolue. Cette hypothèse est confortée par l'observation faite antérieurement sur les yeux de rats immunisés par l'extrait brut. En effet, au 21^{ème} jour post-

immunisation l'iris présente un aspect translucide et une couleur claire rosâtre, signe de la résolution spontanée de la réaction inflammatoire.

L'altération de la structure des rétines serait en partie causée par l'action toxique des métabolites stables du NO. En effet, des travaux menés par les membres de notre équipe ont obtenus des résultats similaires à savoir une désorganisation totale de l'architecture de la rétine et des altérations affectant les différentes couches qui la composent. Et ce, en testant l'effet des nitrites et nitrates (métabolites stables du NO) sur les explants de rétines de bœufs en culture (Hartani *et al.*, 2006 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009). Le NO interagirait avec l'anion superoxyde afin de former un métabolite hautement toxique : le peroxy-nitrite (Shuang *et al.*, 1997 ; Wu *et al.*, 1998). Ce dernier semble intervenir dans la dégénérescence et l'apoptose des photorécepteurs observées lors de l'UAE (Shuang *et al.*, 1997 ; Rao and Wu, 2000 ; Liversidge *et al.*, 2002).

Par ailleurs, suite à l'observation périodique des yeux de rats et l'étude histologique de l'aspect des rétines nous remarquons que l'inflammation intraoculaire auto-destructive notée touche aussi bien le pôle antérieur que le pôle postérieur de l'œil formant donc une panuvéite. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rats *Lewis* (Caspi, 2003).

Les résultats obtenus démontrent clairement que la souche de rat *Wistar* est sensible à l'induction de l'UAE par l'extrait brut rétinien.

III Induction de l'uvéite auto-immune expérimentale chez le rat *Wistar* par l'IRBP

L'injection sous cutanée de 13µg d'IRBP émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund aux rats *Wistar* a permis d'induire une uvéite auto-immune expérimentale bilatérale. Mais contrairement au profil de la cinétique de l'inflammation intraoculaire observée chez les rats *Wistar* immunisés par l'extrait brut, les signes cliniques d'une uvéite chez les rats *Wistar* immunisés par l'IRBP ne sont vraiment détectés qu'au 14^{ème} jour. Au 21^{ème} jour post-immunisation, les signes d'une uvéite s'accroissent encore plus. Des travaux réalisés sur le rats *Lewis* immunisé par 30µg d'IRBP émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund ont révélé une cinétique d'inflammation intraoculaire plus accélérée. En effet, les signes cliniques d'une uvéite apparaissent à partir du 10^{ème} jour post-immunisation pour atteindre un pic au 14^{ème} jour. L'inflammation tend par la suite à disparaître au bout du 18^{ème} jour post-immunisation (Shao *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006). La différence entre les profils des cinétiques de ces deux modèles expérimentaux serait probablement due d'une part, à la souche de rat utilisée. En effet, le rat *Lewis* est connue pour sa très grande sensibilité à l'induction de l'UAE (De kozak, 2000 ; Caspi, 2006 (a)) et, d'autre part, à la quantité d'antigène injectée. Des travaux réalisés sur le rat *Lewis* ont démontré que plus la quantité d'IRBP injectée est faible plus la cinétique d'apparition de l'uvéite est lente (Fox *et al.*, 1987 ; de Smet and Chan, 2001).

III.1 Etude de la production du NO *in vivo* au niveau de plasma de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats *Wistar* « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

Les profils de production des nitrites résiduels et nitrites totaux (métabolites stables du NO), au niveau des plasma de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP, ont tous deux montré des taux de NO élevés en comparaison avec ceux de rats « témoin » et « contrôle ». Cette augmentation

est détectée au 7^{ème} jour post-immunisation, elle atteint son maximum au 14^{ème} jour puis diminue au 21^{ème} jour post-immunisation. Cette production élevée de NO témoignerait de sa probable implication dans la physiopathologie de l'UAE induite chez le rat *Wistar* par l'IRBP.

Par ailleurs, similairement à l'observation faite sur les rats immunisés par l'extrait brut, nous remarquons aussi pour ce groupe de rats que la production du NO plasmatique devance l'apparition des signes cliniques de l'uvéïte. Cette observation indiquerait encore une fois une probable implication du NO durant les phases précoces de l'UAE.

III.2 Etude de la production du NO *in vitro* au niveau des surnageants de culture des splénocytes de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats *Wistar* « témoin »

Les profils de production des nitrites résiduels et nitrites totaux, au niveau des surnageants de culture des splénocytes sans induction (témoin de culture) de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP, ont montré une élévation significative par rapport aux rats « témoin » et ce aux trois stades post-immunisation. Un pic de production du NO est observé au 14^{ème} jour. Des travaux réalisés sur le rat *Lewis* ont démontré que la production du NO par les macrophages spléniques de rats immunisés par les auto-antigènes rétinien est significativement plus élevée que celle de rats témoins non immunisés (Liversidge, 2002). Ces observations suggèrent que la rate est un organe lymphoïde clé où a lieu la présentation de l'auto-antigène rétinien aux lymphocytes T auto-réactifs spécifiques conduisant à l'élaboration de la réponse immunitaire auto-destructive.

D'autre part, la présence de 10µg/ml d'IRBP induit une augmentation significative des taux de nitrites résiduels et totaux dans les surnageants de culture des splénocytes par rapport à ceux de rats « témoin » et par rapport aux témoins de culture et ce, aux trois stades post-immunisation. Le pic de production du NO est observé au 14^{ème} jour. L'IRBP est un auto-antigène rétinien soluble hautement uvéïtogène. Des travaux antérieurs ont démontré son rôle dans la stimulation de la production du NO sur une lignée murine de macrophages ainsi que sur des macrophages péritonéaux de rats en culture (Sun & Yang Bae, 1999). D'autre part, les splénocytes sont connus pour leur richesse en macrophages (Mebius and Kraal, 2005), ce qui pourrait expliquer l'augmentation du taux de nitrites résiduels et totaux observée dans les surnageants de culture des splénocytes de rats immunisés par l'IRBP en comparaison avec le témoin de culture.

Par ailleurs, l'élévation du taux de nitrites résiduels et totaux dans les surnageants de culture des splénocytes de rats immunisés par l'IRBP, en présence de cet auto-antigène, en comparaison avec celui de rats « témoin » dans les mêmes conditions, pourrait être expliquée par l'état pré-activé dans lequel se trouvent les splénocytes de rats immunisés par l'IRBP.

III.3 Etude de la production de NO (nitrites résiduels) *in situ* dans les surnageants des homogénats des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats *Wistar* « témoin »

La production locale de NO (nitrites résiduels) au niveau des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP a montré une élévation significative par rapport aux rats « témoin » et ce dès le 7^{ème} jour post-immunisation. Cette production augmente par la suite au 14^{ème} puis au 21^{ème} jour. Ces résultats corroborent ceux obtenus chez le rat *Lewis*. En effet, plusieurs travaux ont démontré une production élevée de NO ainsi qu'une expression intense de la iNOS par les

macrophages infiltrant l'œil au cours de l'UAE (Zhang *et al.*, 1993 ; Rodenas *et al.*, 1995 ; Hoey *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999). Des taux élevés de NO ont également été détectés directement au niveau de la rétine et de la choroïde de rats *Lewis* immunisés par les auto-antigènes rétiens durant la phase aigüe de l'UAE (Bae *et al.*, 2007). Nos résultats ainsi que les données bibliographiques nous amènent à suggérer la forte implication du NO dans la genèse des lésions et dommages tissulaires au niveau des rétines au cours de l'UAE. En effet, de nombreux travaux ont démontré que le NO interviendrait dans la dégénérescence et l'apoptose des photorécepteurs observées lors de l'UAE via la formation d'un métabolite hautement toxique : le peroxynitrite (Shuang *et al.*, 1997 ; Rao and Wu, 2000 ; Liversidge *et al.*, 2002 ; Hartani *et al.*, 2006 ; Lahmar-Belguendouz *et al.*, 2009).

D'autre part, en superposant le profil de production locale de NO au niveau des yeux et la cinétique d'apparition de l'uvéite chez le rat *Wistar* immunisé par l'IRBP, nous remarquons que le taux local de NO augmente avant l'apparition des signes cliniques de l'inflammation intraoculaire. Cette observation suggère que le NO est impliqué durant les premières phases du développement de l'UAE. En effet, des travaux réalisés sur le rat *Lewis* ont mis en évidence une élévation significative de l'expression de la iNOS ainsi qu'une production accrue d'espèces réactives de l'azote, au niveau des mitochondries des photorécepteurs rétiens et ce, avant même l'apparition des signes cliniques de l'UAE (Rajendram *et al.*, 2007). Cette élévation de l'expression de la iNOS aurait pour stimulateur une hyperproduction de certaines cytokines dont l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1 α par les premiers lymphocytes T auto-réactifs activés ayant pénétré l'œil, ainsi que par le système monocyte/ macrophage sollicité dans le processus inflammatoire. Ce stress oxydatif interviendrait d'une part, dans les dommages causés à l'ADN mitochondrial aboutissant à la dégénérescence des photorécepteurs (Khurana *et al.*, 2008) et, d'autre part, dans le recrutement d'autres cellules inflammatoires, menant ainsi à une amplification du processus (Rajendram *et al.*, 2007).

III.4 Etude de l'aspect histologique des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP et de rats « témoin » et « contrôle » (CFA+PBS)

Contrairement à ce qui a été observé au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'extrait brut, les altérations de la structure et l'architecture des rétines de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP ne sont détectées qu'au 21^{ème} jour post-immunisation. En effet, on observe à ce stade une désorganisation de l'architecture de la rétine. On distingue clairement une destruction de la couche des photorécepteurs (couche nucléaire externe et couche des segments externes) ainsi que de la couche nucléaire interne, associée à une inflammation du corps vitré. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec le rat *Lewis* immunisé par l'IRBP émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (Nussenblatt and Gery, 1996 ; Laliotou *et al.*, 1997 ; Caspi, 2003 ; Shao *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006).

D'autre part, similairement à ce qui a été observé chez le rat *Wistar* immunisé par l'extrait brut, l'inflammation intraoculaire auto-destructive notée au cours de l'UAE induite par l'IRBP, touche elle aussi le pôle antérieur et le pôle postérieur de l'œil, formant donc une panuvéite. Cette observation corrobore celle effectuée sur le rat *Lewis* immunisé par l'IRBP (Caspi, 2003 ; Zhang *et al.*, 2006). De plus, nous remarquons qu'au 14^{ème} jour post-immunisation les signes d'une uvéite apparaissent au niveau des yeux des rats immunisés par l'IRBP tandis que l'architecture de la rétine n'a pas encore été altérée. Cette observation suggère donc que l'inflammation intraoculaire touche d'abord le pôle antérieur puis s'étend au pôle postérieur de l'œil. Une observation similaire a été faite sur le rat *Lewis* immunisé par l'IRBP (de Smet and Chan 2001).

Sur la base des résultats que nous avons obtenus et des données expérimentales bibliographiques, nous proposons un modèle physiopathologique (voir Figure 35), nous permettant de mieux comprendre et de mieux cibler les étapes successives qui président à l'apparition des lésions tissulaires des rétines au cours de l'uvéite auto-immune expérimentale induite par l'IRBP. Ce schéma met en exergue le rôle effecteur majeur joué par le monoxyde d'azote et ce, aussi bien durant les phases précoce et effectrice que durant la phase de résolution de l'UAE. Cette molécule clé constitue l'une des cibles majeures visées par les nouvelles stratégies thérapeutiques.

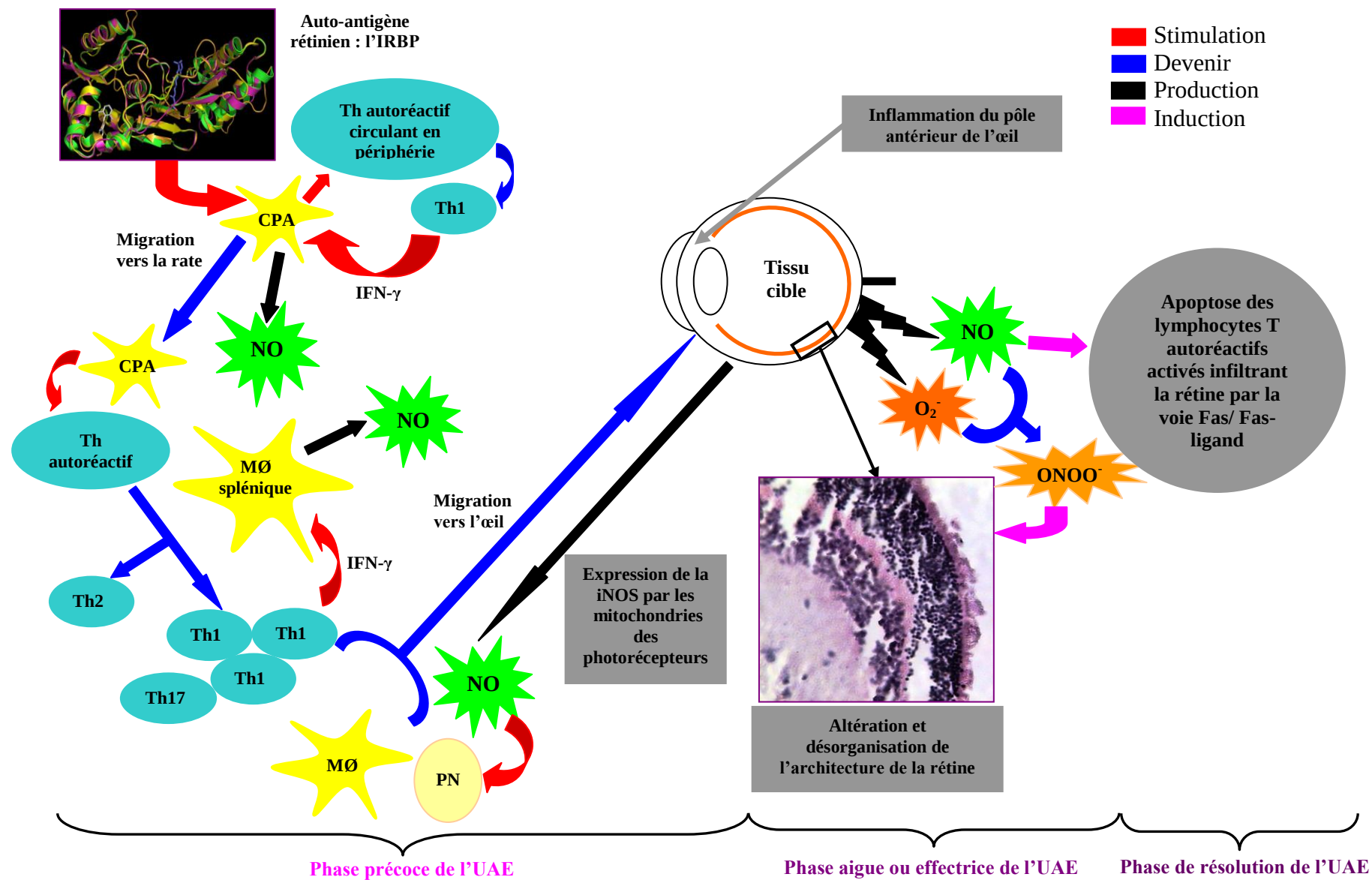


Figure 35: Mécanismes physiopathologiques au cours de l’UAE induite par l’IRBP chez le rat *Wistar*
MØ: macrophage/ PN: polynucléaire neutrophile/ Th: lymphocyte T helper

CONCLUSION

CONCLUSION

Notre étude a contribué à la mise en place d'un modèle expérimental d'uvéïte Behçet induite par l'auto-antigène rétinien l'IRBP chez le rat *Wistar*. Ce modèle présente un très grand intérêt dans le suivi de l'évolution du rapport immunité/pathogénie au cours de cette affection.

Au terme de notre étude, il en ressort en premier lieu que la souche *Wistar* utilisée est sensible à l'induction de l'uvéïte auto-immune et ce, aussi bien par l'extrait brut rétinien que par l'IRBP. En effet, une inflammation intraoculaire ainsi qu'une désorganisation de l'architecture de la rétine ont été clairement observées. Ce qui fait donc du rat *Wistar* un bon modèle expérimental dans l'étude des différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'uvéïte Behçet.

En deuxième lieu, l'étude de la production *in vivo* du monoxyde d'azote (marqueur clé des réponses inflammatoires), au cours de l'UAE induite par l'extrait brut et par l'IRBP, a démontré chez les deux modèles expérimentaux une augmentation significative en comparaison avec celle obtenue chez les rats « témoin » et « contrôle ». Le pic de production du NO précède celui de l'apparition de l'inflammation intraoculaire et des désordres histologiques touchant la rétine. Cette observation a suggéré l'implication du monoxyde d'azote produit en périphérie durant les phases précoces de l'UAE induite chez le rat *Wistar*.

D'autre part, l'étude de la production du monoxyde d'azote *in vitro* dans les surnageants de culture des splénocytes au cours de l'UAE induite par l'IRBP, a indiqué une production accrue de cette bio-molécule, suggérant l'intervention de la rate, organe cible, dans l'instauration de la réponse immunitaire auto-destructive.

De plus, l'étude de la production *in situ* de monoxyde d'azote au niveau des yeux de rats *Wistar* immunisés par l'IRBP a démontré des taux élevés par rapport aux rats « témoin » reflétant l'implication probable du NO dans la genèse des lésions tissulaires observées au niveau des rétines. Il apparaît même que cette production locale élevée devance l'apparition des signes cliniques de l'uvéïte et des lésions tissulaires, suggérant un rôle important du NO produit localement durant la phase précoce du développement de l'UAE.

Nos résultats soulignent l'action non négligeable du monoxyde d'azote dans la physiopathologie de l'UAE induite chez le rat *Wistar* par l'extrait brut rétinien et l'IRBP et le situent en tant que bio-marqueur clé de mauvais pronostic dans le suivi des manifestations inflammatoires observées lors de l'atteinte oculaire associée à la maladie de Behçet.

La mise au point d'un modèle expérimental d'uvéïte Behçet nous ouvre de larges perspectives dans l'étude des mécanismes conduisant au développement de l'uvéïte Behçet et constitue un précieux outil pour tester de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques.

Références bibliographiques

A

- Abe, T., Nakajima, A., Satoh, N. & Sakuragi, S.** (2001). Fas expression and apoptosis in rats with experimental autoimmune uveoretinitis. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **45**: 240-246.
- Accardo-Palumbo, A., Ferrante, A., Cadelo, M., Ciccia, F., Parrinello, G., Lipari, L. et al.** (2004). The level of soluble granzyme A is elevated in the plasma and in the V gamma 9/ V delta 2 T cell culture supernatants of patients with active Behçet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **22**: S45-9.
- Adamantiades, B.** (1931). Sur un cas d'iritis à hypopion récidivante. *Ann. Oculist*: 168-271.
- Adamus, G. & Chan, C.C.** (2002). Experimental autoimmune uveitis: multiple antigens, diverse diseases. *Int. Rev. Immunol.*, **21**(2- 3): 209-29.
- Adler, A.J. & Evans, C.D.** (1985). Some functional characteristics of purified bovine Interphotoreceptor Retinol-Binding Protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**: 273-282.
- Agarwal, R.K. & Caspi, R.R.** (2004). Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods. Mol. Med.*, **102**: 395-419.
- Ahmed, T., Wallace, G.R., James, T., Neville, M., Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K. et al.** (2003). Mapping the HLA association in Behçet's disease: a role for tumor necrosis factor polymorphisms? *Arthritis. Rheum.*, **48**: 807-13.
- Akdeniz, S., Haiman, M., Atmaca, S. & Akpolat, N.** (2003). The seroprevalence of varicella zoster antibodies in Behçet's and other skin diseases. *Eur. J. Epidemiol.*, **18**: 91-3.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S. & Egwuagu, C.E.** (2007). T(H)17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.*, **13**: 711-718.

- Amoura, Z., Guillaume, M., Caillat-Zucman, S., Wechsler, B. & Piette, J.C.** (2006). Pathophysiology of Behçet's disease. *La revue de médecine interne.*, **27**: 843-853.
- Amri, M., Ait Aissa, S., Belguendouz, H., Mezioug, D. & Touil-Boukoffa, C.** (2007). *In vitro* antihydatic action of IFN- γ is dependant on the nitric oxide pathway. *J. of interferon and cytokine research.*, **27**: 781-787.
- Andrew, P.J. & Mayer, B.** (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.*, **43**(3): 521-31.
- Andrews, K.L., Triggle, C.R. et al.** (2002). NO and the vasculature : where does it come from and what does it do ? *Heart. Fail. Rev.*, **7**: 423-45.
- Assumpção, C.R., Brunini, T.M.C., Matsuura, C., Resende, A.C., & Mendes-Ribeiro, A.C.** (2008). Impact of the L-arginine-Nitric Oxide pathway and oxidative stress on the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Open. Biochem. J.*, **2**: 108-115.
- Atalla, L., Linker-Israeli, M., Steinman, L. & Rao, N.A.** (1990). Inhibition of autoimmune uveitis by anti-CD4 antibody. *Invest. Ophthalmol & Vis. Sci.*, **31**: 1264-1270.

B

- Bach, J.F. & Chatenoud, L.** (2002). Immunologie 4ème Ed Flammarion - Médecine-Sciences.
- Bae, S.R., Wu, G.S., Sevanian, A., Schultz, B.E., Zamir, E. & Rao, N.A.** (2007). Direct Detection of Reactive Nitrogen Species in Experimental Autoimmune Uveitis. *Korean journal of ophthalmology.*, **21**(1): 21-27.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E. & Spies, T.** (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 6259-63.
- Balligand, J.L., Feron, O. & Kelly, R.A.** (2000). Role of nitric oxide in myocardial function. In: Ignarro, L.J. (Ed.), Nitric

- Oxide: Biology and Pathobiology. Academic. Press, San Diego (USA), pp. 585-632.
- Bang, D.** (1997). Treatment of Behçet's disease. *Yonsei. Med. J.*, **38**: 401-10.
- Barnes, P.J. & Karin, M.** (1997). Nuclear factor κ B- apivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, **336**: 1066-71.
- Baver, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L. et al.** (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, **285**: 727-9.
- Behar-Cohen, F.** (2004). Vectorisation intra-oculaire. *Médecine/Sciences*; **20**: 701-706.
- Belguendouz, H.** (2005). Implication des auto-antigènes rétiens dans la production, *in vivo* et *in vitro* des interleukines 8 et 12 et du monoxyde d'azote au cours des uvéites Behçet et des uvéites idiopathiques. Thèse de magister en Biochimie-Immunologie. Faculté des sciences biologiques USTHB, Alger, Algérie.
- Belguendouz, H., Messaoudene, D., Hartani, D., Chachoua, L., Ahmedi, M.L., Lahmar-Belguendouz, K., Lahlou-Boukoffa, O. & Touil-Boukoffa, C.** (2008). Effet de la corticothérapie sur la production des interleukines 8, 12 et du monoxyde d'azote au cours des uvéites Behçet et idiopathiques. *J. Fr. Ophtalmol.*, **31**(4): 387-395.
- Ben amour, S., Chaotic, L. & Zero, L.B.** (1998). Study of 673 cases of Behçet's disease. In: Olivier, I., Slaving, C., Cantini, F eds. 8th International congress on Behçet's disease. *Program and Abstracts Milano: Prex*: 232.
- Benezra, D.** (1999). Ocular inflammation. Basic and clinical concepts Chapter 21: Behçet's disease. Ed. M. Dunitz: 313-345.
- Bennouna-Biaz, F., AIJ Ourhouic, M., Senouci, K., Hassen, B., Hcid, E. & Lazrek, B.** (1995). Maladie de Behçet, profil épidémiologique. *Maghreb Medical*, **209**: 30-2.
- Biliau, A. & Matthys, P.** (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. of Leukocyte Biology.*, **70** : 849-860.
- Binisti, P.** (1999). Œil et maladie de Behçet. *Rev. Prat.*, **49**: 1999-2002.
- Bloch- Michel, E. & Nussenblatt, R.B.** (1987). International Uveitis Study Group. Recommendations for the evaluation of intraocular inflammation disease. *Am. J. Ophthalmol*: 103-234.
- Bodaghi, B., Wechsler, B., Du-Boutin, L.T.H., Cassoux, N., LeHoang, P. & Piette, J.-C.** (2004). Uvéites chroniques sévères: classification, démarche diagnostique et principes thérapeutiques. *La revue de médecine interne.*, **24** : 794-802.
- Bogdan, C.** (1998). The Multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto)immunity. *J. Exp. Med.*, **187**(9): 1361-1365.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. & Diefenbach, A.** (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol*, **12**: 64-76.
- Bok, D.** (1993). The retinal pigment epithelium : a versatile partner in vision. *J. Cell. Sci.*, **17**: 189-95.
- Borst, D.E. & Nickerson, J.M.** (1988). The isolation of a gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein. *Exp. Eye. Res.*, **47**: 825-838.
- Brezin, A.P.** (1999). Sémiologie et classification des uvéites. *Rev. Prat.*, **49**: 1982-86.
- Bridges, C., Fong, S-L., Liou, G., Alvarez, R. & Landers, R.** (1983). Transport, utilization and metabolism of visual cycle retinoids in the retina and pigment epithelium. *In Progress in Retinal Research.*, **2**: 137-162.
- Bridges, C., O'Gorman, S., Fong, S-L., Alvarze, R.A. & Berson, E.** (1985). Vitamin A and interstitial binding protein in an eye with recessive retinitis pigmentosa. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.*, **26**: 648.
- Bunt-Milam, A. & Saari, J. C.** (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J. Cell Bwl.*, **97**: 703-712.

Butler, A.R., Flitney, F.W. & Williams, D.L. (1995). NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends in Pharmacological Sciences.*, **16** (1):18-22.

Butler, T.L. & McMenamin, P.G. (1996). Resident and infiltrating immune cells in the uveal tract in the early and late stages of experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**: 2195-2210.

C

Calguneri, M., Kiraz, S., Ertenli, I., Benekli, M., Karaarslan, Y. & Celik, I. (1996). The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behçet's disease: a randomized clinical trial. *Arthritis. Rheum.*, **39**: 2062-5.

Caspi, R.R., Roberge, F.G., McAllister, C.G., el-Saied, M., Kuwabara, T., Gery, I., Hanna, E. & Nussenblatt, R.B. (1986). T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in rat. *J. Immunol.*, **136**: 928-933.

Caspi, R.R. (1989). Basic mechanisms in immune-mediated uveitic disease. In: Lightman, S. Ed. *Immunology of eye diseases*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 61-68.

(a) Caspi, R.R. (1994). Th1 and Th2 lymphocytes in experimental autoimmune uveoretinitis. In: Nussenblatt, R.B., Whitcup, S.M., Caspi, R.R. & Gery, I, eds. *Advances in Ocular Immunology.*, 55. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

(b) Caspi, R.R. (1994). Experimental autoimmune uveoretinitis- Rat and Mouse. In: *Autoimmune disease models: A guidebook*. Cohen, I. & Miller, A. eds. Academic Press. 57-81.

Caspi, R.R., Silver, P.B., Chan, C.C., Sun, B., Agarwal, R.K., Wells, J., Oddo, S., Fujino, Y., Najafian, F. & Wilder, R.L. (1996). Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. *J. Immunol.*, **157**: 2668-2675.

Caspi, R.R., Sun, B., Agarwal, R.K., Silver, P.B., Rizzo, L.V., Chan, C.C. et al. (1997). T cell mechanisms in experimental autoimmune uveoretinitis: susceptibility is a function of the cytokine response profile. *Eye.*, **11**: 209-212.

Caspi, R.R. (2003). Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr. Protoc. Immunol.*, **15**: 15.6.

(a) Caspi, R.R. (2006). Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. *Drug Discovery Today: Disease Models/ Immunological disorders and autoimmunity.*, **3**(1): 3-9.

(b) Caspi, R.R. (2006). Mechanisms Underlying Autoimmune Uveitis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms/ Immunological disorders and autoimmunity.*, **3**(2): 199-206.

Caspi, R.R., Silver, P.B., Luger, D., Tang, J., Cortes, L.M., Pennesi, G., Mattapallil, M.J. & Chan, C.C. (2008). Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic. Res.*, **40**(3-4): 169-74.

Cesta, M.F. (2006). Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology.*, **34**: 455- 465.

Chader, G.J. (1989). Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP): A Model Protein for Molecular Biological and Clinically Relevant Studies. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **30**(1): 7-22.

Chajek, T. & Fainaru, M. (1975). Behçet's disease. Report of 41 cases and a review of the literature. *Medecine.*, **54**: 179-96.

Chambers, J.C., Haskard, D.O. & Kooner, J.S. (2001). Vascular endothelial function and oxidative stress mechanisms in patients with Behçet's syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**: 517-20.

Chan, C.C., Mochizuki, M., Palestine, A., Ben Ezra, D., Gery, I. & Nussenblatt, R.B. (1985). Kinetics of T lymphocyte subsets in the eye of lewis rats with experimental autoimmune uveitis. *Cell. Immunol.*, **96**: 430-434.

Conner, E.M., Brand, S.J., Davis, J.M., Kang, D.Y. & Grisham, M.B. (1996). Role of reactive metabolites of oxygen and

nitrogen in inflammatory bowel disease : toxins, mediators and modulators of gene expression. *Inflamm. Bowel. Dis.*, **2**: 133-147.

Crane, I.J., Xu, H., Wallace, C., Manivannan, A., Mack, M., Liversidge, J., Marquez, G., Sharp, P.F. & Forrester, J.V. (2006). Involvement of CCR5 in the passage of Th1- type cell across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *J. of Leukocyt. Biology.*, **79**: 435-443.

Crouch, R.K., Hazard, S., Lind, T., Wiggert, B., Chader, G. & Corson, D.W. (1992). Interphotoreceptor retinoid binding-protein and α tocopherol preserve the isomeric and oxidation state of retinol. *Photochem. Photobiol.*, **56**: 251-255.

Crowell, J.A., Steele, V.E., Sigman, C.C., & Fay, J.R. (2003). Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention ? *Molecular Cancer Therapeutics.*, **2**: 815-823.

D

Dao, P., Montani, D., Duong-Quy, S., & Dinh-Xuan, A.T. (2006). Signalisation cellulaire et physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires.*, **23**: 75-83.

De Kozak, Y., Sakai, J., Thillaye, B. & Faure, J.P. (1981). S-antigen induced experimental uveo-retinitis in rats. *Curr. Eye. Res.*, **1**: 327.

De Kozak, Y. (2000). Mécanismes de l'inflammation oculaire et régulation de la réponse immune au cours des uvéites expérimentales inflammatoires et auto-immunes. *Atelier de formation.*, **133** : 13-15.

De Smet, M.D., Yamamoto, J.H., Mochizuki, M. et al. (1990). Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am. J. Ophthalmol.*, **110**: 135-142.

De Smet, M.D. & Chan, C.C. (2001). Regulation of Ocular Inflammation-What Experimental and Human Studies have Taught Us. *Progress in Retinal and Eye Research.*, **20(6)** : 761-797.

Descamps, F.J., Kangave, D., Cauwe, B., Martens, E., Geboes, K., Abu El-Assrar, A. & Opdenakker, G. (2008). Interphotoreceptor retinoid binding protein as biomarker in systemic autoimmunity with eye inflections. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.*, Post print.

DesJardin, L.E., Timmers, A.M. & Hauswirth, W.W. (1993). Transcription of photoreceptor genes during fetal retinal development. Evidence for positive and negative regulation. *Journal of Biological Chemistry.*, **268**: 6953-6960.

Dicken, C.H. (1984). Retinoids: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **11**: 541- 552.

Dinc, A., Takafuta, T., Jiang, D., Melikoglu, M., Saruhan-Direskenli, G. & Shapiro, S.S. (2003). Anti-endothelial cell antibodies in Behçet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **21**: S27-30.

Direskenli, H., Eksioğlu-Demiralp, E., Yavuz, S., Ergun, T., Shinnick, T., Lehner, T. et al. (2000). T cell responses to 60/65 kDa heat shock protein derived peptides in turkish patients with Behçet's disease. *J. Rheumatol.*, **27**: 708-13.

Domenico, R. (2004). Pharmacology of nitric oxide : molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.*, **10(14)** : 1667-76.

Ducrocq, C., Servy, C., Cudic, M., & Blanchard, E.B. (2001). Intervention by nitric oxide, NO, and its derivatives particularly in mammals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72(2)**: 95-102.

Duygulu, F., Evereklioglu, C., Calis, M., Borlu, M., Cekmen, M. & Ascioglu, O. (2005). Synovial nitric oxide concentrations are increased and correlated with serum levels in patients with active Behcet's disease: a pilot study. *Clin. Rheumatol.*, **24**: 324-30.

E

Egwaagu, C.E. et al. (1997). Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J. Immunol.*, **159**: 3109-3112.

Eisenfeld, A.J., Bunt- Milam, A.H. & Saari, J.C. (1987). Uveoretinitis in rabbits

following immunization with IRBP. *Exp. Eye. Res.*, **44**: 425.

Eksioglu-Demiralp, E., Kibaroglu, A., Direskenli, H., Yavuz, S., Karsli, F., Yurdakul, S. et al. (1999). Phenotypic characteristics of B cells in Behçet's disease: increased activity in B cells subsets. *J. Rheumatol.*, **26**: 826-32.

Eksioglu-Demiralp, E., Direskenli, H., Kibaroglu, A., Yavuz, S., Ergun, T. & Akoglu, T. (2001). Neutrophil activation in Behçet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **19**: S19-24.

El-Shabrawi, Y., Mangge, H. & Hermann, J. (2003). Anti-tumour necrosis factor alpha treatment in chronic recurrent inflammation of the anterior segment of the eye in patients resistant to standard immunomodulatory treatment. *Ann. Rheum. Dis.*, **62**: 1243-1244.

Ergun, T., Ince, U., Eksioglu-Demiralp, E., Direskenli, H., Gurbuz, O., Gurses, L. et al. (2001). HSP60 expression in mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **45**: 904-9.

Erkilic, K., Evereklioglu, C., Cekmen, M., Ozkiris, A., Duygulu, F. & Dogan, H. (2003). Adenosine desaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behçet's disease: Original contributions/ Clinical and laboratory investigations. *Mediators. Inflamm.*, **12**: 107-16.

Evereklioglu, C., Cekmen, M., Ozkiris, A., Karabas, L. & Calis, M. (2003). The pathophysiological significance of red blood cell nitric oxide concentrations in inflammatory Behçet's disease. *Mediators. Inflamm.*, **12**: 255-6.

F

Faria, A.M.C. & Weiner, H.L. (2006). Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin. Der. Immunol.*, **13**: 143-157.

Farrel, A.J., Blake, D.R., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1992). Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric

oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, **51**: 1219-22.

Filali-Ansary, N., Tazi-Mezalek, Z., Mohattane, A., Adnaoui, M., Aouni, M., Maaouni, A. & Berbich, A. (1999). La maladie de Behçet : 162 observations. *Ann. Med. Interne.*, **150**: 178-188.

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

Fong, S, Liou, G.I., Landers, R.A., Alvarez, R.A., & Bridges, D.C. (1984). Purification and Characterization of a Retinol-binding Glycoprotein Synthesized and Secreted by Bovine Neural Retina. *The journal of biological chemistry.*, **259(10)**: 6534-6542.

Fong, S.L. & Bridges, C.D. (1998). Internal quadruplication in the structure of human interstitial retinol-binding protein deduced from its cloned cDNA. *J. Biol. Chem.*, **263**: 15330-15334.

Fort, P. (2005). Rôle de la dystrophine Dp71 dans l'œil: Impacts phénotypiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur de Strasbourg. p. 53-58.

Fox, G.M., Kuwabara, T., Wiggert, B., Redmond, T.M., Hess, H.H., Chader, G.J., & Gery, I. (1987). Experimental Autoimmune Uveoretinitis (EAU) Induced by Retinal Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein (IRBP): Differences between EAU Induced by IRBP and by S-Antigen Clinical Immunology and Immunopathology., **43**: 256-264.

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

Frassanito, M.A., Dammacco, R., Cafforio, P. & Dammacco, F. (1999). Th1 polarization of the immune response in Behçet's disease : a putative pathogenic role of interleukin-12. *Arthritis. Rheum.*, **42**: 1967-74.

Freysdottir, J., Lau, S.H. & Fortune, F. (1999). Gamma delta + T cells in Behçet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clin. Exp. Immunol.*, **118**: 451-7.

Furchgott, R. F. & Zawadski, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*, **288**: 373-6.

G

Gallegos, A.M. & Bevan, M.J. (2006). Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev.*, **209**: 290-296.

Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (1997). Color textbook of histology. W.B. Saunders, Philadelphia.

Gauthier, N., Arnould, L., Chantome, A., Reisser, D., Bettaieb, A., Reveneau, S. & Jeannin, J.F. (2004). To stimulate or to inhibit nitric oxide production in mammary tumors ?. *Bulletin du Cancer.*, **91**: 705-12.

Genetet, N. (2002). Immunologie 4th Ed. Editions Medicales Internationales.

Gery, I., Mochizuki, M. & Nussenblatt, R.B. (1986). Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. In: Osborne, N., Chader, J. eds. Progress in retinal research. Oxford: Pergamon press., 75-109.

Gery, I. & Streilein, J.W. (1994). Autoimmunity in the eye and its regulation. *Curr. Opinion in Immunology.*, **6**: 938- 945.

Ghayad, E. & Tohme, A. (1995). Epidémiologie et répartition géographique de la maladie de Behçet. In : Ghayad, E, editor. La maladie de Behçet au liban. Lebanon : Librairie du Liban Ed. p. 171-5.

Gonzalez-Fernandez, F., Landers, R.A., Glazebrook, P.A., Fong, S.L., Liou, G. I., Lam, D. M. K. & Bridges, C. D. B. (1984). An Extracellular Retinol-binding Glycoprotein in the Eyes of Mutant Rats with Retinal Dystrophy: Development, Localization, and Biosynthesis. *J. Cell. Biol.*, **99**: 2092-2098.

Gonzalez-Fernandez, F. & Healy, J.I. (1990). Early expression of the gene for interphotoreceptor retinol-binding protein during photoreceptor differentiation suggests a critical role for the interphotoreceptor matrix in retinal

development. *J. Cell. Biol.*, **111**(6): 2775-2784.

Gonzalez-Fernandez, F., Lopes, B.M.S., Garcia-Fernandez, J.M., Foster, R.G., Degrip, W.J., Rosenberg, S., Newman, S.A. & Vandenberg, S.R. (1992). Expression of developmentally defined retinal phenotypes in the histogenesis of retinoblastomas. *Amer. J. Pathol.*, **141**: 363-375.

Gonzalez-Fernandez, E., Van Niel, C., Edmonds, H., Beaver, J.M., Nickerson, J.M., Garcia-Fernandez, P.A., Campohiaro & Foster, R.G. (1993). Differential expression of interphotoreceptor retinoid-binding protein, opsin, cellular retinaldehyde-binding protein, and basic fibroblastic growth factor. *Experimental Eye Research.*, **56**: 411-427.

Gonzalez-Fernandez, F. (2003). Interphotoreceptor retinoid binding protein- an old gene for new eyes. *Vis. Res.*, **43**(28): 3021-3036.

Gonzalez- Fernandez, F., Bear, C.A. & Ghosh, D. (2007). Module structure of interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) may provide bases for its complex role in the visual cycle – structure / function study of *Xenopus* IRBP. *BMC Biochemistry.*, **8**: 15.

Goureau, O., Bellot, J., Thillaye, B., Courtois, Y. & De Kozak, Y. (1995). Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Immunol*; **154**: 6518-6523.

Goureau, O. & Courtois, Y. (1996). Monoxyde d'azote et rénine : un médiateur aux deux visages. *Med/ Sci.*, **12**: 593-8.

Grabowski, P.S., England, A., Dijkhuisen, R., Copeland, M., Benjamin, N., Reid, D., et al. (1996). Detection of increased nitric oxide production in rheumatoid arthritis using the urinary nitrate/ creatinine ratio. *Arthritis. Rheum.*, **39**: 643-7.

Gregeron, D.S., Willard Abrahams, I. & Thirkill, C.E. (1981). Serum antibody levels of uveitis patients to bovine retinal

antigens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **21**: 669- 680.

Groh, V., Rhine hart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R. & Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.*, **2**: 255-60.

Guenane, H., Hartani, D., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.S., Mazari, F. & Touil-Bouhoffa, C. (2006). Production des cytokines Th1/Th2 et du monoxyde d'azote au cours de l'uvéite « Behçet » et de l'uvéite « idiopathique ». *J. Fr. Ophthalmol.*, **29**(2): 146-152.

Gurler, A., Boyvat, A. & Tursen, U. (1997). Clinical manifestations of Behçet's disease: an analysis of 2147 patients. *Yonsei. Med. J.*, **38**: 423-7.

H

Hageman, G.S., Kirchoff-Rempe, M.A., Lewis, G.P., Fisher, S.K. & Anderson, D.H. (1991). Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **88**: 6706- 6710.

Hampl, V. & Herget, J. (2000). Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev.*, **80** (4): 1337-1372.

Hamza, M. (2000). Maladie de Behçet. In : Kahn, M.F., Peltier, A.P., Meyer, O., Piette, J.C, editors. Les maladies et syndromes systémiques. 4th ed. Paris: Flammarion Medecine. p. 883-924.

Hamzaoui, K., Mili Boussem, E., Hamzaoui, A., Ouertani, A., Chabbou, A. & Ayed, K. (1998). Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in Behçet's disease. *Tunisie Medicale.*, **76**(4): 66-70.

Hartani, D., Belguendouz, H., Guenane, H., Chachoua, L., Lahlou-Boukoffa, O.Q. & Touil-Boukoffa, C. (2006). Effet des nitrites et des nitrates sur les rétines de bœuf *in vitro*. *J. Fr. Ophthalmol.*, **29**(1): 32-36.

Hasan, A., Fortune, F., Wilson, A., Warr, K., Shinnick, T., Mizushima, Y. et al. (1996). Role of gamma delta T cells in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. *Lancet.*, **23**(347): 789-94.

Hayashi, S. et al. (1996). Interleukin 10 inhibits inflammatory cells infiltration in endotoxin-induced uveitis. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **234**: 633-636.

Hayden, M.R. & Tyagi, S.C. (2003). Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO and redox stress. *Cardiovasc. Diabetol.*, **2**(1): 2.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. & Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **6**: 150-166.

Hessler, R.B., Wagenhorst, B., Baer, C. & Gonzalez-Fernandez, F. (1993). Expression of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in *Xenopus* and goldfish photoreceptors. *FASEB J.* **7**,A371 (Abstract).

Hessler, R.B., Baer, C.A., Bukelman, A., Kittredge, K.L. & Gonzalez-Fernandez, F. (1996). Interphotoreceptor retinoid-binding protein IRBP: expression in the adult and developing *Xenopus* retina. *Journal of Comparative Neurology.*, **367**: 329-341.

Hewitt, A.T., Lindsey, J.D., Carbott, D. & Adler, R. (1990). Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: characterization and partial purification. *Experimental Eye Research.*, **50**: 79-88.

Hickman-Davis, J.M., Fang, F.C., Nathan, C., Shepherd, V.L., Voelker, D.R. & Wright, J.R. (2001). Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host pathogen infections. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **281**: L517-L523.

Hirohata, S., Oka, H. & Mizushima, Y. (1992). Streptococcal-related antigens stimulate production of IL-6 and IFN γ by T cells from patients with Behçet's disease. *Cell. Immunol.*, **140**: 410-9.

- Hirose, S., Kuwabara, T., Nussenblatt, R.B., Wiggert, R., Redmond, T.M. & Gery, I.** (1986). Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid binding protein. *Arch. Ophthalmol.*, **104**: 1698.
- Ho, M.T., Massey, J.B., Pownall, H.J., Anderson, R.E. & Hollyfield, J.G.** (1989). Mechanism of vitamin A movement between rod outer segments, Interphotoreceptor retinoid binding protein and liposomes. *J. Bio. Chem.*, **264**: 928-935.
- Hoey, S., Grabowski, B.S., Ralston, S.H., Forrester, J.V. & Liversidge, J.** (1997). Nitric oxide accelerates the onset and increases the severity of experimental autoimmune uveoretinitis through an IFN-gamma-dependant mechanism. *The journal of immunology.*, **159**(10): 5132-5142.
- Hogan, M.J., Alvarado, J.A. & Weddell, J.E.** (1971). Histology of the human eye, an atlas and textbook. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Hollyfield, J.G. & Witkovsky, P.** (1974). Pigmented retinal epithelium involvement in photoreceptor development and function. *Journal of Experimental Zoology.*, **189**: 357-378.
- Houman, H., Hamzaoui, A., Ben ghorbal, I., Khanfir, M., Feki, M. & Hamzaoui, K.** (2004). Abnormal expression of chemokine receptors in Behçet's disease: relationship to intracellular Th1/Th2 cytokines and to clinical manifestations. *J. Autoimmun.*, **23**: 267-73.
- Huang, Z.J., Liao, K.H., Xu, L.Y., Yang, S.M., QIU, B.S. & Zhang, Y.T.** (1983). Study of 310 cases of Behçet's syndrome. *Chin. Med. J.*, **96**: 483-90.
- Hughes, M.N.** (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1411**(2-3): 263-272.
- Hughes, E.H., Collins, R.W., Kondeatis, E., Wallace, G.R., Graham, E.M., Vaughan, R.W. et al.** (2005). Association of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behçet's disease in Caucasian patients. *Tissue Antigens.*, **66**: 195-9.
- I**
- Ignaro, L.J., Buga, C.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. & Chaudhuri, G.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **84**: 9265-9269.
- Ilhan, F., Demir, T., Türkçüoğlu, P., Turgut, B., Demir, N. & Gödekmerdan, A.** (2008). Th1 polarization of the immune response in uveitis in Behçet's disease. *Ophthalmol.*, **43**: 105-8.
- Imamura, Y., Kurokawa, M.S., Yoshikawa, H., Nara, K., Takada, E., Masuda, C. et al.** (2005). Involvement of Th1 cells and heat shock protein 60 in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **139**: 371-8.
- INTERNATIONAL STUDY GROUP FOR BEHCET'S DISEASE:** Criteria for the diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*. 1990; 335(8687): 1078-1080.
- J**
- Jiang, G., Ke, Y., Sun, D., Han, G., Kaplan, H.J. & Shao, H.** (2008). Reactivation of uveitogenic T cells by retinal astrocytes derived from experimental autoimmune uveitis-prone B10RIII mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**: 282-289.
- Jones, L.S., Rizzo, L.V., Agarwal, R.K., Tarrant, T.K., Chan, C.C., Wiggert, B. et al.** (1997). IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J. Immunol.*, **158**: 5997.
- Joseph, A. et al.** (2003). Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology*; **110**: 1449-1453.
- K**
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M.** (2001). Principles of neural science. 4th Ed. McGraw-Hill USA.
- Kanekura, T., Gushi, A., Iwata, M., Fukumaru, S., Sakamoto, R., Kawahara, K. et al.** (2004). Treatment of Behçet's

disease with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **51**: S83-7.

Kanski, J.J. (1995). Clinical ophtalmology 3rd ed. Boston : Botterworth-Heinemann.

Khoudri, I., Koufane, J., Elkihal, N., Senouci, K., Afifi, Y. & Hassam, B. (2007). Quoi de neuf dans le traitement de la maladie de Behçet ?. *Le pharmacien d'Afrique.*, **205**: 3-7.

Khurana, R.N., Parikh, J.G., Saraswathy, S., Wu, G.S. & Rao, N.A. (2008). Mitochondrial oxidative DNA damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49** : 3299- 3304.

Kierszenbaum, A.L. (2006). Histologie et biologie cellulaire: une introduction à l'anatomie pathologique. Ed. De Boeck. p. 227-247.

Knott, A.B. & Bossy-Wetzel, E. (2009). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxydants & Redox signaling*; **11** (3): 1-13.

Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M. & Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **86**: 5159-5162.

Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L. & Cuenca, N. (2002). A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.*, **453**: 168-184.

Kröncke, K.D., Fehsel, K. & Kolb-Bachofen, V. (1997). Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection- how, Why, When and Where? *Nitric oxide.*, **1**: 107-120.

Krupnick, J.G., Gurevich, V.V. & Benovic, J.L. (1997). Mecanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, **272**(29): 18125-18131.

Kuehn, M.H. & Hageman, G.S. (1999). Expression and characterization of the IPM 150 gene (IMPG1) product, a novel human

photoreceptor cell-associated chondroitin-sulfate proteoglycan. *Matrix. Biology.*, **18**: 509-518.

Kuper, D.F., de Heer, E., Van Loveren, H. & Vos, J.G. (2002). In: Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. & Wallig, M.A. Eds. Immune System. *Handbook of Toxicologic. Pathology.*, **2**: 585- 646.

L

Lahmar-Belguendouz, K. (2007). Rôle des dérivés du Monoxyde d'azote et des auto-antigènes rétinien sur les différentes membranes de l'œil au cours des uvéites. Thèse de magister en Biochimie-Immunologie, Faculté des sciences biologiques. USTHB. Alger, Algérie.

Lahmar-Belguendouz, K., Belguendouz, H., Hartani, D., Lahlou-Boukoffa, O.S., Djeraba, Z., Lammali, A. & Touil-Boukoffa, C. (2009). Effets délétères des derives stables du monoxyde d'azote, marqueur inflammatoire des uvéites, sur les différentes tuniques de l'oeil de boeuf en culture. *J. Fr. Ophtalmol.*, **32**(4): 247-256.

Laliotou, B., Liversidge, J., Forrester, J.V. & Dick, A.D. (1997). Interphotoreceptor retinoid binding protein is a potent tolerogen in lewis rat: suppression of experimental autoimmune uveoretinitis is retinal antigen specific. *Br. J. Ophthalmol.*, **81**: 61-67.

Lavoie, M.P. (2007). Evaluation de la photosensibilité rétinienne dans le but d'élucider le dérèglement neurochimique à l'origine du trouble affectif saisonnier et les mécanismes biologiques de la lumbinothérapie. Thèse de doctorat en Médecine Expérimentale. Département d'ophtalmologie. Faculté de médecine. Université Laval. Québec. p. 20.

Lee, S., Bang, D., Chao, Y.H., Lee, E.S. & Sohn, S. (1996). Polymerase chain reaction reveals Herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behçet's disease. *Arch. Dermatol. Res.*, **288**: 179-83.

Lee, K.H., Chung, H.S., Kim, H.S., Oh, S.H., Ha, M.K., Baik, J.H. et al. (2003). Human α -enolase from endothelial cells as

a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease. *Arthritis. Rheum.*, **48**: 2025-35.

Lehner, T., Lavery, E., Smith, R., Van der zee, R., Mizushima, Y. & Shinnic, T. (1991). Association between the 65kDa-heat shock protein, *streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. *Infect. Immunol.*, **59**: 1434-41.

Levecq, L., Disneur, D., Dutrieux, C. & Snyers, B. (1999). Etiologies of intermediate, posterior, and panuveitis : a review of 201 cases. *Bull. Soc. Belge. Ophthalmol.*, **273** : 9-14.

Lie, J.T. (1992). Vascular involvement in Behçet's disease: arterial and venous and vessels of all sizes. *J. Rheumatol.*, **19**: 341-343.

Liou, G.I., Wang, M. & Matragoon, S. (1994). Timing of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) gene expression and hypomethylation in developing mouse retina. *Developmental Biology.*, **161**: 345-356.

Liou, G.I., Fei, Y., Peachey, N.S., Matragoon, S., Wei, S., Blaner, W.S., Wang, Y., Liu, C., Gottesman, M.E. & Ripps, H. (1998). Early onset photoreceptor abnormalities induced by targeted disruption of the interphotoreceptor retinoid binding protein gene. *Journal of Neuroscience.*, **18**: 4511-4520.

Liu, V.W.T. & Huang, P.L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovascular Research*; **77**(1): 19-29.

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

Luger, D., Silver, P.B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., Bowman, E.P., Sgambellone, N.M., Chan, C.C. & Caspi, R.R. (2008). Either a Th17 or a Th1 effectorresponse can drive autoimmunity:

conditions of disease induction affect dominant effector category. *J. Exp. Med.*, **205**: 799-810.

Luna, J.D., Chan, C.C., Derevjani, N.L., Mahlow, J., Chiu, C., Peng, B. et al. (1997). Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J. Neurosci. Res.*, **49**:268.

M

Maeda, K. & Nakae, K. (1977). Recent epidemiological review on Behçet's disease. *Asian. Med. J.*, **20**: 568.

Mantas, C., Direskenli, H., Eksioğlu-Demiralp, E. & Akoglu, T. (1999). Serum levels of Th2 cytokines IL-4 and IL-10 in Behçet's disease. *J. Rheumatol.*, **26**: 510-12.

Matsuo, T., Nakayama, T., Koyama, T., Fujimoto, S. & Matsuo, M. (1986). Immunological studies of uveitis. Cell-mediated immunity to IRBP. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **30**: 487-1986.

Mebius, R.E. & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**: 606- 16.

Miezewska, K. (1996). The interphotoreceptor matrix. A space in sight. *Microsc. Res. Tech.*, **35**: 463-71.

Mizushima, Y., Matsuda, T., Hoshi, K. & Ohno, S. (1988). Induction of Behçet's disease symptoms after dental treatment and Streptococcal antigen skin test. *J. Rheumatol.*, **15**: 1029-30.

Mochizuki, M., Kuwabara, T., Chan C.C., Nussenblatt, R.B., Metcalfe, D.D. & Gery, I. (1984). An association between susceptibility to experimental autoimmune uveitis and choroidal mast cell numbers. *J. Immunol.*, **133**: 1699-1701.

Mochizuki, M., Kuwabara, T., McAllister, C., Nussenblatt, R.B. & Gery, I. (1985). Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**: 1.

Mochizuki, M., Suzuki, N., Takeno, M., Nagafuchi, H., Harada, T., Kaneoka, H.

et al. (1994). Fine antigen specificity of human $\gamma\delta$ T all lines (V gamma 9+) established by repetitive stimulation with a serotype (KTH-1) of a gram positive bacterium, *streptococcus sanguis*. *Eur. J. Immunol.*, **2**: 1536-43.

Molday, R.S. (1998). Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**(13): 2491-513.

Murphy, C.C. et al. (2004). Neutralizing tumor necrosis factor activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch. Ophthalmol.*, **122**: 845-851.

N

Nakae, K., Masaki, F., Hashimoto, T., Inaba, G., Mochizuki, M. & Skane, T. (1993). Recent epidemiological features of Behçet's disease in Japan. In: Wechsler, B., Godeau, P, eds. Behçet's disease. International congress series 1037. Amsterdam: Excerpta Medica: 145-51.

Nathan, C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.*, **100**: 2417- 2423.

Nazzaro, P. (1966). Cutaneous manifestations of Behçet's disease. Clinical and histopathological findings. In: Monacelli, M., Nazzaro, P. Behçet's disease. Basel., New york, karger. P. 15.

Noy, N. (2000). Retinoid binding-proteins: mediators of retinoid action. *Biochem. J.*, **348**: 481- 495.

Nussenblatt, R.B., Rodrigues, M.M., Wacker, W.B., Cevario, S.J., Salinas-Carmona, M. & Gery, I. (1981). Cyclosporin A. Inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J. Clin. Invest.*, **67**:1228.

Nussenblatt, R.B. & Gery, I. (1996). Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J. of Autoimmunity.*, **9**: 575-585.

Nussenblatt, R.B. (1997). Uveitis in Behçet's disease. *Int. Rev. Immunol.*, **14**: 67-79.

Nussenblatt, R.B. & Whitcup, S.M. (2004). Uveitis: Fundamentals and Clinical Practice. 3rd Ed, Mosby/Elsevier.

O

O'Duffy, J.D. (1990). Vasculitis in Behçet's disease. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, **16**: 423-431.

Ohno, S., Ohguchi, M., Hirose, S., Matsuda, H., Wakisaka, A. & Aizawa, M. (1982). Close association of HLA-Bw51 with Behçet's disease. *Arch. Ophthalmol.*, **100**: 1455-8.

Ohta, K., et al. (2000). Analysis of immunomodulatory activities of aqueous humor from eyes of mice with experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.*, **164**: 1185-1192.

P

Pagliari, P. (2003). Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase : it is not enough to say no. *Life Sciences.*, **73**: 2137-2149.

Palczewski, K. (1994). Structure and functions of arrestins. *Protein. Science.*, **3**: 1355-1361.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.*, **327**: 524-6.

Parks, D.J., Cheung, M.K., Chan, C.C. & Roberge, F.G. (1994). The role of nitric oxide in uveitis. *Arch. Ophthalmol.*, **112**: 544-6.

Patel, R.P., Mc Andrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. & Darley Usmar, V.M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1411**: 385-400.

Peng, Y., Shao, H., Ke, Y., Zhang, P., Xiang, J., Kaplan, H.J. et al. (2006). In vitro activation of CD8 interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells requires not only antigenic stimulation but also exogenous growth factors. *J. Immunol.*, **176**: 5006.

Pepperberg, D.R., Okajima, T.L., Wiggert, B., Ripps, H., Crouch, R.K. & Chader, G.J. (1993). Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol. Neurobiol.*, **7**: 61-85.

- Perez, V.L. et al.** (2004). Elevated levels of interleukin 6 in the vitreous fluid of patients with pars planitis and posterior uveitis: the Massachusetts eye & ear experience and review of previous studies. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **12**: 193-201.
- Piacenza, L., Peluffo, G. & Radi, R.** (2001). L-arginine dependant suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98** : 7301-7306.
- Planck, S.R., Huang, X.N., Robertson, J.E. & Rosenbaum, J.T.** (1994). Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues after systemic endotoxin treatment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**: 924-930.
- Plantner, J.J., Smine, A. & Quinn, T.A.** (1998). Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous. *Current. Eye. Research.*, **17**: 132-140.
- Poirier, J., Catala, M., André, J.M. & Katsanis, G.** (2007). Histologie : organes, systèmes et appareils. Service d'histologie embryologie. Université Paris VI.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O. & Williams, S.M.** (2001). Neuroscience. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc. ISBN.
- R**
- Rafa. H.** (2009). Rôle des cytokines Th1 et de la NOSynthase 2 dans les désordres immunitaires associés à la rétinopathie hémorragique et la maladie de Crohn : Relation avec le lupus érythémateux. Thèse de magister en Biochimie-Immunologie. Faculté des sciences biologiques USTHB, Alger, Algérie.
- Rajendram, R., Saraswathy, S & Rao, N.A.** (2007). Photoreceptor mitochondrial oxidative stress in early experimental autoimmune uveoretinitis. *Br. J. Ophthalmol.*, **91**: 531-537.
- Rao, N.A. & Wu, G.S.** (2000). Free radical mediated photoreceptor damage in uveitis. *Progress in retinal and eye research.*, **19**(1): 41- 68.
- Raziuddin, S, Al-Dalaan, A., Bahabri, S., Siraj, A.K. & Al-Sedairy, S.** (1998). Divergent cytokine production profile in Behçet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern. *J. Rheumatol.*, **25**: 329-33.
- Redmond, T.M., Wiggert, B., Robey, F.A., Nguyen, N.Y., Lewis, M.S., Lee, L. & Chader, G.J.** (1985). Isolation and characterisation of monkey interphotoreceptor retinoid binding protein, a unique extracellular matrix component of the retina. *Biochemistry.*, **24**: 787.
- Reiff, A. et al.** (2001). Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis. Rheum.*, **44**: 1411-1415.
- Renier, G.V.** (2008). Immunologie de l'oeil. *Revue française d'allergologie et d'immunologie Clinique.*, **48** : 303-313.
- Ricciardolo, F.L.M., Sterk, P.J., Gaston, B. & Folkerts, G.** (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.*, **84**: 731-765.
- Rizzo, L.V., Miller-Rivero, N.E., Chan, C.C., Wiggert, B., Nussenblatt, R.B. & Caspi, R.R.** (1994). Interleukin-2 treatment potentiates induction of oral tolerance in a murine model of autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, **94**:1668.
- Robbins, R.A. & Grisham, M.B.** (1997). Molecules in focus: nitric oxide. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **29**: 857-860.
- Rodenas, J., Mitjavila, M.T. & Carbonell, T.** (1995). Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**: 869-875.
- Rodrigues, M.M., Wiggert, B., Hackett, J., Lee, L., Fletcher, R.T. & Chader, G.J.** (1985). Dominantly inherited retinitis pigmentosa: ultrastructure and biochemical analysis. *Ophthalmology.*, **92**: 1165.
- Rodrigues, M.M., Hackett, J., Gaskins, B., Wiggert, B., Lee, L., Redmond, T.M. & Chader, G.J.** (1986). Interphotoreceptor retinoid binding protein in retinal rod cells and pineal gland. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **27**: 844.
- Rosenbaum, J.T. & Boney, R.S.** (1992). Activity of an interleukin 1 receptor

antagonist in rabbit models of uveitis. *Arch. Ophthalmol.*, **110**: 547-549.

S

- Saari, J.C., Teller, D.C., Crabb, J.W. & Bredberg, L.** (1985). Properties of an interphotoreceptor retinoid-binding protein from bovine retina. *J. Biol. Chem.*, **260**: 195-201.
- Saari, J.C., Teller, D.C., Crabb, J.W. & Bredberg, L.** (1998). Properties of an interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein from bovine retina. *J. Biological Chemistry.*, **260**(1): 195-201.
- Sabry, S. & Dinh-Xuan, A.T.** (1996). Le monoxyde d'azote : un médiateur ubiquitaire. *Arch. Pediatr.*, **3**(1) : S275-S277.
- Salvador- Silva, M., Ghosh, S., Bertazolli- Filho, R., Boatright, J.H., Nickerson, J.M., Garwin, G.G., Saari, J.C. & Coca- Prados, M.** (2005). Retinoid processing proteins in the ocular ciliary epithelium. *Mol. Vis.*, **11**: 356-65.
- Schroeder, R.A. & Kuo, P.C.** (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth. Analg.*, **81**: 1052-9.
- Sennequier, N. & Vadon-Le Goff, S.** (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Med/sci.*, **14** : 1185-95.
- Sfikakis, P.P., Theodossiadis, P.G., Katsiari, C.G. & Kaklamanis, P.** (2001). Effect of Infliximab on sight-threatening panuveitis in Behçet's disease. *The lancet.*, **358**.
- Sfikakis, P.P.** (2002). Behçet's disease: a new target for anti-tumor necrosis factor treatment. *Ann. Rheum. Dis.*, **61**(Suppl II): ii51-ii53.
- Sfikakis, P.P., Kaklamanis, P.H., Elezoglou, A. & Katsilambros, N.** (2004). Infliximab for recurrent , sight-threatening ocular inflammation in adamantiades- Behçet disease. *Annals of Internal Medicine.*, **140**(5): 404-406.
- Shao, H., Shi, H., Kaplan, H.G. & Sun, D.** (2005). Chronic recurrent autoimmune uveitis with progressive photoreceptor damage induced in rats by transfer of IRBP specific T cells. *J. of Neuroimmunology.*, **163**(1): 102-109.
- Shaul, P.W.** (2002). Regulaion of endothelial nitric oxide synthase location, location, location. *Ann. Rev. Physiol.*, **64**: 749-74.
- Shaw, N.S., & Noy, N.** (2001). Interphotoreceptor retinoid-binding protein contains three retinoid binding sites. *Exp. Eye. Res.*, **72**: 183-90.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, M., Wistow, G., Early, J., Donoso, L.A., Horwitz, J & Tao, R.** (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 6975-6979.
- Shuang, G., Zhang, J. & Rao, N.A.** (1997). Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.*, **38**: 1333-1339.
- Shulz, J.B., Matthews, R.T. & Beal, M.F.** (1995). Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.*, **8**(6) : 480-6.
- Silverman, R.B.** (2009). Design of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. *Arc. Chem. Res.*, In press.
- Snyder, S.H.** (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science.*, **257**: 494-496.
- Sohn, S., Lee, E.S., Kwon, J.H., Lee, S.I., Bang, D. & Lee, S.** (2001). Expression of Th2 cytokines decreases the developpement of and improves Behçet's disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in mice. *J. Infect. Dis.*, **183**: 1180-6.
- Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C.** (2001). Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.*, **106** : 675-683.
- Stevens, A. & Lowe, J.** (1997). Histologie humaine. Ed. De Boeck. p. 383-394.
- Stiemke, M.M., Landers, R.A., al Ubaidi, M.R., Rayborn, M.E. & Hollyfield, J.G.** (1994). Photoreceptor outer segment development in *Xenopus laevis*: influence of the pigment

epithelium. *Developmental Biology.*, **162**: 169-180.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.*, **85**: 845-881.

Sun, A., Chang, J.G., Kao, C.L., Liu, B.Y., Wang, J.T., Chu, C.T. et al. (1996). Human cytomegalovirus as a potential etiologic agent in recurrent aphthous ulcers and Behçet's disease. *J. Oral. Pathol. Med.*, **25**: 112-8.

Sun, A., Chang, J.G., Chu, C.T., Liu, B.Y., Yang, J.H. & Chiang, C.P. (1998). Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behçet's disease. *J. Oral. Pathol. Med.*, **27**: 168-75.

Sun, R. & Yang Bae, M.D. (1999). Stimulation of macrophage function by Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein: Production of nitric oxide. *Korean J. Ophthalmol.*, **13**: 57-64.

T

Takase, H., Yu, C.R., Mahdi, R.M., Douek, D.C., DiRusso, G.B., Midgley, F.M., Dogra, R., Allende, G., Rosenkranz, E., Pugliese, A., Egwuagu, C.H. & Gery, I. (2005). Thymic expression of peripheral tissue antigens in humans: a remarkable variability among individuals. *International Immunology.*, **17**(8): 1131-1140.

Takeno, M., Kariyone, A., Yamashita, N., Takiguchi, M., Mizushima, YI, Kaneoka, H. et al. (1995). Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. *Arthritis. Rheum.*, **38**: 426-33.

Tanaka, T., Yamakawa, N., Yamaguchi, H., Okada, A.A., Konoeda, Y., Ogawa, T. et al. (1996). Common antigenicity between *Yersinia enterocolitica*-derived heat shock protein and the retina, and its role in uveitis. *Ophthalmic. Res.*, **28**: 284-8.

Tang, J., Zhu, W., Silver, P.B., Su, S.B., Chan, C.C. & Caspi, R.R. (2007). Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical

signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J. Immunol.*, **178**: 5578-5587.

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

Therrien, F. (2005). Effet de l'inhibition chronique de la synthèse du monoxyde d'azote sur la pression artérielle et l'apparition des dommages cardiovasculaires et rénaux chez le rat. Harlan Sprague-Dawley. Thèse de maîtrise en médecine expérimentale. Université LAVAL. Québec. Canada.

Thillaye- Goldenberg, B., Goureau, O., Naud, M.C. & De Kozak, Y. (2000). Delayed onset and decreased severity of experimental autoimmune uveoretinitis in mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J. of Neuroimmunology.*, **110**: 31-44.

Tojo, M., Zheng, X., Yanagihori, H., Dyama, N., Takahashi, K., Nakamura, K. et al. (2003). Detection of Herpes virus genomes in skins lesions from patients with Behçet's disease and other related inflammatory diseases. *Acta. Derm. Venereol.*, **83**: 124-7.

Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sancéau, 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.

Trioglu, G., Accardo-Palumbo, A., Dieli, F., Ciccia, F., Ferrante, A., Giardina, E. et al. (2003). V gamma 9/V delta 2 T lymphocytes in Italian patients with Behçet's disease : evidence for expansion, and tumor necrosis factor receptor II and IL-12 receptor beta 1 expression in active disease. *Arthritis. Res. Ther.*, **5**: R262-R268.

Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K. & Seya, T. (2000). Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette- Guérin*: Involvement of

Toll-like receptors. *Infect. Immun.*, **68**: 6883- 6890.

Turan, B., Gallati, H., Erdi, H., Gurler, A., Michel, B.A. & Villiger, P.M. (1997). Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behçet's disease: Soluble TNF-75 as a biological marker of disease activity. *J. Rheumatol.*, **24**: 128-32.

U

Uchio, E., Stanford, M., Hasan, A., Satoh, S., Ohno, S., Shinnick, T. et al. (1998). HSP-derived peptides inducing uveitis and IgG and IgA antibodies. *Exp. Eye. Res.*, **67**: 719-27.

Uusitalo, R.J., Stjernschantz, J., Mahlberg, K.A., Gregerson, D.S., Uusitalo, H., Tallberg, T. & Palkama, A. (1985). Serum antibody level to S-Antigen in children with chronic uveitis. *Br. J. of Ophthalmol.*, **69**: 212-216.

V

Vallochi, A.L., Commodaro, A.G., Schwartzman, J.P., Belfort, R.J. & Rizzo, L.V. (2007). The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokines & Growth factor Reviews.*, **18**: 135-141.

Vanhoutte, P. (2003). Vascular Nitric Oxide. *American Heart Association*.

Verity, D.H., Marr, J.E., Ohno, S., Wallace, G.R. & Stanford, M.R. (1999). Behçet's disease, the silk road and HLA-B51: Historical and geographical perspectives. *Tissue antigens.*, **54**: 213-20.

Verity, D.H., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Madanat, W., Zureikat, H., Fayyad, F. et al. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behçet's disease. *Eur. J. Immunogenet.*, **27**: 73-6.

Vinet, B. & Busque, S. (1997). Revue sur le tacrolimus (FK506): un immunosuppresseur en gain de popularité. *Ann. Broch. Clin. Qué.*, **36**: 1-4.

W

Walford, G. & Loscalzo, J. (2003). Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost.*, **1(10)**: 2112-8.

Wechsler, B., Lethi Huong, D., Masin, I., Ziza, J.M., Piette, J.C., Bletry, O., et al. (1988). Behçet's disease in France. A propos de 60 autochtonous subjects. *Ann. Med. Interne.*, **139**: 315-9.

Wechsler, B. (2002). Colchicine et maladie de Behçet: une efficacité enfin reconnue! *Rev. Med. Interne.*, **23(4)** : 355-356.

Whalett, A.J., Thuraijan, G., Hamburger, J., Palmer, R.G. & Murray, P.I. (1999). Behçet's syndrome: a multidisciplinary approach to critical care. *QJM.*, **92**: 727-40.

Wheatcroft, S.B. et al. (2003). Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet. Med.*, **20(4)**: 255-68.

Wiggert, B., Bergsma, D., Lewis, M. & Chader, G.J. (1977). Vitamin A receptors: retinol binding in neural retina and pigment epithelium. *J. Neurochem.*, **29**: 947.

Wildner, G. & Diedrichs-Mohring, M. (2004). Autoimmune uveitis and antigenic mimicry of environmental antigens. *Autoimmun. Rev.*, **3**: 383-387.

Wildner, G., Diedrichs- Mohring, M. & Thureau, S.R. (2008). Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic. Res.*, **40(3-4)**: 141-4.

Wu, G.S., Shimizu, K., Wang, X.P. & Rao, N.A. (1998). Peroxynitrite-mediated nitration of retinal proteins in experimental uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39(4)**: S44.

X

Xia, Y., Tsai, A.L., et al. (1998). Superoxide generation from endothelial nitric oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependant and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.*; **273**: 25804-8.

Xu, H., Manivannan, A., Jiang, H.R., Liversidge, J., Sharp, P.F., Forrester, J.V. & Crane, I.J. (2004). Recrutement

of IFN γ -producing (Th1-like) cells into the inflamed retina in vivo is preferentially regulated by PSGL-1: P/E selectin interactions. *J. Immunol.*, **172**: 3215-3224.

Y

Yamamoto, J.H., Minami, M., Inaba, G., Masuda, K., & Mochizuki, M. (1993). Cellular autoimmunity to retinal specific antigens in patients with Behcet's disease. *Br. J. Ophthalmol.*, **77**(9): 584-9.

Yang, P., Chen, L., Zwart, R. & Kijlstra, A. (2002). Immune cells in the porcine retina: distribution, characterization and morphological features. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**: 1488-1492.

Yazici, H., Tuzun, Y., Pazarly, H., Yurdakul, S., Ozyazgan, Y., Ozdogan, H. et al. (1984). Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behcet's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, **43**: 783-9.

Yilmaz, G., Sizmaz, S., Yilmaz, E.D., Duman, S. & Aydin, P. (2002). Aqueous humor nitric oxide levels in patients with Behcet disease. *Retina.*, **22**: 330-5.

Yoshimura, T., Sonoda, K.H., Miyazaki, Y., Iwakura, Y., Ishibashi, T., Yoshimura, A. & Yoshida, H. (2008). Differential roles for IFN- γ and IL-17 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Int. Immunol.*, **20**: 209-214.

Yu, H.G., Lee, D.S., Seo, J.M., Ahn, J.K., Yu, Y.S., Lee, W.J. et al. (2004). The number of CD8 $^{+}$ T cells and NKT cells increases in the aqueous humor of patients with Behcet's uveitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **137**: 437-43.

Z

Zgradić, I. (1996). Behcet's disease-clinical picture and treatment. *Med. Pregl.*, **49**(5-6): 233-6.

Zhang, J., Wu, G.S. & Rao, N.A. (1993). Role of nitric oxide in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**: 1000.

Zhang, J., Wu, L.Y., Wu, G.S. & Rao, N.A. (1999). Differential expression of nitric oxide synthase in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**: 1899-1905.

Zhang, R., Yang, P-Z., Wu, C-Y., Jin, H-L., Li, B., Huang, X-K., Zhou, H-Y., Gao, Y., Zhu, L-X. & Aize, K. (2006). Role of T-cell receptor V beta 8.3 peptide vaccine in the prevention of experimental autoimmune uveoretinitis. *Chin. Med. J.*, **119**(9): 740-748.

Zouboulis, C.HC. (1999). Epidemiology of Adamantiades-Behcet's disease. *Ann. Med. Interne.*, **150**: 488-98.



﴿فَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ﴾

[سورة يُوسُفُ الآية 76]

Study of the immunity/ pathogeny ratio evolution on an experimental model of Behçet uveitis induced by IRBP: Development of a biomarker

ABSTRACT

Uveitis is an intraocular inflammation which represents one of the most severe clinical manifestations of « Behçet disease ». This autoimmune pathology is widely spread along Mediterranean basin, especially in Algeria. IRBP, a retinal auto-antigen, has been strongly implicated in the physiopathology of this affection. Furthermore, several studies performed on Behçet patients with ocular inflammation implicated nitric oxide (NO) during the acute phase of this pathology. These data have led us to develop an experimental model of autoimmune uveitis (EAU) on *Wistar* rat using IRBP, in order to verify the implication of this bio-molecule. Our results have shown the sensibility of *Wistar* strain to IRBP-induced EAU. In fact, we have noticed with interest the development of ocular inflammation and histological disorders of retinal tissue during EAU. Also, an increased production of NO *in vivo* in the plasma, *in vitro* in the supernatants of splenocytes culture and *in situ* in the homogenate of eyes has also been observed. Moreover, we have noticed that maximal production of NO occurs before the alteration of retinal tissue. Taken together, these observations demonstrate the implication of the spleen in initiating the immune response during IRBP-induced EAU and suggest the probable implication of nitric oxide during the early and acute phases. This bio-molecule can be considered as a key marker in the physiopathology of ocular inflammation associated with Behçet disease.

Keywords: experimental autoimmune uveitis, *Wistar* rat, IRBP, ocular inflammation, nitric oxide, splenocytes.

دراسة تطور العلاقة «مناعة / مرض» عند نموذج تجريبي لداء التهاب العينية «بهجت» المحث عن طريق مولد الضد الذاتي IRBP: تطوير راسم بيولوجي

ملخص

داء «التهاب العينية»، هو التهاب الأغشية الباطنية للعين ويشكل أحد الأعراض السريرية الأكثر خطورة لمرض «بهجت». ه ذا المرض الالتهابي المناعي ال ذاتي ينتشر بكثرة على طول البحر الأبيض المتوسط و خاصة في الجزائر. يتدخل مولد الضد ال ذاتي للشبكية « IRBP » بشكل كبير في الأسباب المؤدية إلى اندلاع المرض. من جهة أخرى، عدة دراسات أجريت على المرضى المصابين بداء التهاب العينية « بهجت » أظهرت تدخل أحادي أكسيد الأزوت أثناء تطور المرض. مما أدى بنا إلى تطوير نموذج تجريبي بغية التحري عن قرب عن دور ه ذه الجزيئة البيولوجية. و لهذا قمنا بتحريض داء التهاب العينية المناعي ال ذاتي التجريبي (EAU) عند الجر ذ « ويستار » عن طريق مولد الضد الذاتي « IRBP ». أثبتت النتائج المتحصل عليها حساسية سلالة « ويستار » المستعملة في التجارب تجاه تحريض داء التهاب العينية المناعي ال ذاتي التجريبي عن طريق « IRBP ». بالفعل ، لقد لاحظنا ظهور لالتهاب العين مرفوقا بخلل نسيجي للشبكية خلال مراحل تطور الداء. زيادة على ذلك، أظهر إنتاج أحادي أكسيد الأزوت في «الحي» وفي «الأنابيب» عند أمصال و رائق الزراعة لخلايا الطحال على الترتيب ، و في جناسة العين ارتفاعا معتبرا مقارنة بالشواهد. ه ذا الأخير يسبق ظهور الخلل النسيجي الشبكي. النتائج المتحصل عليها تؤيد تدخل الطحال كعضو لمفاوي ثانوي في الاستجابة المناعية الذاتية المتلفة، و توحى بتدخل أحادي أكسيد الأزوت أثناء المراحل المبكرة و الحادة من داء التهاب العينية المناعي التجريبي عند الجر ذ « ويستار ». و ه ذا ما يجعله راسم أساسي في متابعة الأعراض الالتهابية الملاحظة عند إصابة العين بمرض « بهجت ».

المفاتيح : داء التهاب العينية المناعي الذاتي التجريبي، الجر ذ « ويستار » ، مولد الضد الذاتي للشبكية « IRBP » ، التهاب العين، أحادي أكسيد الأزوت، خلايا الطحال.