

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار-عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En Sciences
Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Rôle des cytokines et du monoxyde d'azote dans les
désordres immuno-inflammatoires associés à la
pathogénèse du ptérygion**

Présentée par : ZIDI SOUROUT

Directeur de thèse : Mme Touil-Boukoffa Chafia

Pr, USTHB-Alger

Co -Directeur de thèse : Mme Henchiri Cherifa

Pr, Univ Badji Mokhtar-Annaba

Membres de Jury:

Président : M. Ladjama Ali

Pr, Univ Badji Mokhtar- Annaba

Examineurs : Mme Berredjem Hajira

MCA, Univ Badji Mokhtar -Annaba

Mme Bendjeddou Dalila

Pr, Univ 08 Mai 1945- Guelma

M. Benouareth Djamel Eddine

Pr, Univ 08 Mai 1945- Guelma

Membre invité : Mme Boulaneb-Bediar Faouzia

MCA, Univ Badji Mokhtar-Annaba

Remerciements

Le présent travail a été essentiellement réalisé au sein de l'équipe « Cytokines et NO Synthases : Immunité et Pathogénie» au niveau du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques –USTHB- Alger, en collaboration avec la clinique d'ophtalmologie et le service d'anatomopathologie du CHU Ibn Rochd –Annaba.

Je tiens tout d'abord à exprimer mon profond respect, ma sincère gratitude et mes plus vifs remerciements à :

Mme **Touil-Boukoffa C.**, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB-Alger, directrice de l'équipe de recherche « Cytokines et NO Synthases : Immunité et Pathogénie» et membre de l'Académie Algérienne des Sciences et de la Technologie.

Je tiens à vous réexprimer ici, mon extrême reconnaissance et l'honneur de vous avoir eu comme directrice de thèse. Plus qu'une enseignante remarquable, vous avez été pour moi, comme une mère. Vous aviez toujours su me pousser à donner le meilleur de moi-même et à m'encourager pendant mes moments de faiblesses et de doute. Vous êtes pour moi le symbole de la rigueur scientifique rehaussée par votre humilité.

Mme **Henchiri C.**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar- Annaba. Disponible et d'une grande gentillesse, votre aide précieuse faite de conseils de grandes valeurs, m'a permis de mener à bien ce travail. C'est un immense honneur pour moi de vous avoir comme co-directrice de thèse.

M. **Ladjama A.**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar- Annaba, pour l'honneur et la gentillesse qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Mme **Berredjem H.**, Maître de conférences A, à l'Université Badji Mokhtar- Annaba, de m'avoir honoré de sa présence et dont les critiques et remarques avisées donneront sans aucun doute plus de valeur à ce travail.

Mme **Benjeddou D.**, Professeur à l'Université du 08 Mai 1945- Guelma, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. C'est un honneur et un gage de sérieux et de rigueur de l'avoir comme examinatrice.

M. **Benouareth D. E.**, Professeur et Doyen de la Faculté SNV-STU de l'Université du 08 Mai 1945- Guelma. Je lui reitère ma profonde gratitude de m'avoir fait l'honneur de participer à ce Jury.

Mme **Boulaneb-Bediar F.**, Maître de conférence A, à l'Université Badji Mokhtar-Annaba et Chef de Service de la clinique ophtalmologique du CHU Ibn Rochd –Annaba, de m'avoir honoré de sa présence et pour l'aide pratique précieuse et indispensable qu'elle m'a accordée.

Je tiens à remercier également :

- L'équipe de recherche Cytokines et No Synthases pour leur aide et soutien, spécialement Dr **Belguendouz H.**, Dr **Benkkhelfa M.**, M. **Medjdeber O.** et le Dr **Benchabane S.**

- Dr **Laouar O.**, Dr **Djebiane F** et toute l'équipe du service d'anatomopathologie du CHU Ibn Rochd-Annaba qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques et immunohistochimiques.

- M. **Bensouilah Mourad**, Professeur en science de la mer à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, qui m'a si gentiment permis l'accès libre à son laboratoire.

- Pr **Tahar A.**, Dr **Derbal N.**, Dr **Bousbia A.** et Dr **Athamnia F.**, pour leur aide dans la réalisation des tests statistiques.

- Tous les autres qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

Je tiens tout d'abord à dédier ce travail à la mémoire de ma grand-mère **Zidi Aicha** et mes deux tantes paternelle et maternelle : **Zidi Lynda** et **Boukoffa Hakima** qui nous ont quitté en 2014 et 2016, laissant derrière elles des cœurs blessés et meurtris et un vide que nul ne comblera. J'aurais aimé vous voir en ces moments de joie mais la vie en a voulu autrement. Puisse dieu le miséricordieux vous accueillir en son vaste paradis !

Je dédie mon travail également :

A l'être qui a été d'une grande patience et toujours présent pour moi dans et pour « le meilleur et le pire » ; mon merveilleux mari **Oualid**. Puisse dieu te garder pour moi !

Aux deux êtres les plus chers à mes yeux, qui m'ont vu naître, qui m'ont élevée dans le respect de l'autre, dans la générosité, la simplicité et l'amour : mes deux merveilleux parents. Aujourd'hui je ne suis plus à la maison mais mes souvenirs d'enfance et d'adolescence resteront gravés à tout jamais dans mon cœur. **Papa** et **Maman**, vous m'avez appris à écrire mes premiers mots ; aujourd'hui en retour je vous offre ma première thèse... Que dieu vous garde !

A mes très chers beaux parents : **Malika** et **Okba-Tahar** qui m'ont accueillie les bras ouverts et m'ont donné l'amour et l'affection d'une vraie maman et d'un vrai papa.

A mes deux petits frères et anges : **Ali** et **Hocine**. Je n'ai guère de mots pour vous exprimer toute mon affection.

A ma merveilleuse tante le Pr **Ouided Salima**, à son mari **tonton Mourad** et mes deux cousines **Rym** et **Ines** qui ont été toujours présents pour moi et que j'aime profondément.

A tonton **Lamine et Sylvie**, avec toute mon affection.

A tonton **Noureddine, Kaddour, Abdelkrim, Tahar, Messaoud, Hassan, Mamie Louise**, tata **Rebiha, Ghania, Lysiane** et **Bozena** qui n'ont jamais cessé de me gâter et à qui je souhaite une longue vie.

A mes merveilleuses cousines, que j'aime profondément : **Hanane, Anissa et Sana** avec qui j'ai passé une enfance et une adolescence inoubliables.

A mes chers cousins **Nassim, Kamel, Sofiane Nadir**, et **Ramzi**, ainsi que mes deux beaux frères **Ramy** et **Amir**, à qui je souhaite beaucoup de bonheur.

A mes amies que j'aime profondément : **Lynda, Amina, Imene, Manel, Rania, Rohiya, Sofia, Awatef, Karima, Chahira, Souad, Soraya, Leila, Messaouda, Nora, Mina, Rym, Affaf, Linda, Asma** et tous mes collègues de l'université du 08 Mai 1945 Guélma.

A tous mes professeurs qui m'ont prodigué un enseignement de qualité tout au long de mon cursus universitaire.

Sommaire

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Introduction Générale.....1

Partie Bibliographique

I. L'œil et le ptérygion

I.1 La vision.....4

I.2 Rappel anatomique de l'œil4

I.3 Concept de la surface oculaire5

I.3.1 Définition5

I.3.2 Anatomie de la surface oculaire5

I.3.2.1 La conjonctive.....5

I.3.2.2 La cornée7

I.3.2.3 Le limbe.....7

I.3.2.4 Le film lacrymal.....7

I.3.3 Histologie de la surface oculaire9

I.3.3.1 La conjonctive.....9

I.3.3.2 La cornée10

I.3.3.3 Le limbe12

I.3.4 Le ptérygion13

I.3.4.1 Définition.....13

I.3.4.2 Facteurs étiologiques.....13

I.3.4.3 Epidémiologie.....14

I.3.4.4 Hypothèses d'étiopathogénie14

I.3.4.5 Etude clinique et aspect macroscopique.....16

I.3.4.6 Classification17

I.3.4.7 Traitements utilisés18

II. Inflammation et spécificités immunologiques de la surface oculaire

II.1 Inflammation	20
II.1.1 Définition	20
II.1.2 Les phases de la réaction inflammatoire	20
II.2 Les cellules impliquées dans la défense de la surface oculaire	21
II.2.1 Les cellules de Langerhans (cellules dendritiques)	21
II.2.2 Les cellules épithéliales de la surface oculaire	21
II.2.3 Les macrophages	22
II.2.4 Les mastocytes	22
II.2.5 Les polynucléaires éosinophiles	22
II.2.6 Les polynucléaires neutrophiles	22
II.2.7 Les cellules de la lignée lymphoïde	23
II.2.7.1 Les cellules NK	23
II.2.7.2 Les lymphocytes B	23
II.2.7.3 Les lymphocytes T	23
II.3 Les médiateurs de l'inflammation	26
II.3.1 Les cytokines	26
II.3.1.1 Définition	26
II.3.1.2 Rôle	26
II.3.1.3 Classification	27
II.3.2 Le NO	31
II.3.2.1 Réactivité chimique du NO	322
II.3.2.2 Biosynthèse du NO	32
II.3.2.3 Les NOS	323
II.3.2.4 Les cellules productrices de NO	344
II.3.2.5 Régulation des NOS	34
II.3.2.6 Fonction du NO	35

Partie Expérimentale

I. Matériel et Méthodes

I. 1 Matériel	388
I.1.1 Matériel biologique	388
I.1.1.1 Patients	388
I.1.1.2 Les biopsies des ptérygions et des témoins	399

I.1.1.3 Les échantillons sanguins	399
I.1.1.4 Les larmes.....	40
I.1.1.5 La souche bactérienne ATCC 8062	40
I.1.1.6 Les anticorps utilisés	40
I.1.2 Les réactifs	40
I.2 Méthodes.....	411
I.2.1 Démarche expérimentale.....	411
I.2.2 Enquête épidémiologique.....	411
I.2.3 Etude histologique	411
I.2.4 Etude immunohistochimique.....	433
I.2.5 Dosage de la protéine C réactive (CRP)	444
I.2.6 Calcul de la vitesse de sédimentation (VS).....	466
I.2.7 Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM).....	466
I.2.8 Dosage des cytokines (IL-17A, IL-6, IL-10)	477
I.2.9 Dosage du monoxyde d'azote (NO)	488
I.2.10 Etude statistique.....	488
II. Résultats et Discussion	
II.1 Résultats.....	49
II.1.1 Enquête épidémiologique	49
II.1.1.1 La fréquence hospitalière	49
II.1.1.2 Répartition du ptérygion selon le sexe	49
II.1.1.3 Répartition du ptérygion selon l'âge	50
II.1.1.4 Répartition du ptérygion en fonction de la profession.....	51
II.1.2 Etude histologique	52
II.1.3 Etude immunohistochimique	54
II.1.3.1 Expression du CD3, CD68 et CD20	54
II.1.3.2 Expression du NF-κB et de la NOS2	56
II.1.3.3 Expression du Bcl-2	56
II.1.4 Dosage de la protéine C réactive (CRP)	58
II.1.5 La vitesse de sédimentation (VS).....	59
II.1.6 Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)	59
II.1.6.1 Dosage des IgG.....	59
II.1.6.2 Dosage des IgA.....	60

II.1.6.3 Dosage des IgM	61
II.1.7 Evaluation des cytokines (IL-17A, IL-6, IL-10)	62
II.1.7.1 Evaluation de l'IL-17A	62
II.1.7.2 Evaluation de l'IL-6	63
II.1.7.3 Evaluation de l'IL-10	64
II.1.8 Evaluation du monoxyde d'azote (NO)	65
II.2 Discussion	66
Conclusion et Perspectives	81
Références Bibliographiques	84
Annexes	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des Figures

Figure.01 : Anatomie de l'œil.	5
Figure.02 : Coupe histologique d'une conjonctive bulbaire.	10
Figure.03 : Coupe histologique d'une cornée.	11
Figure.04: Coupe histologique du limbe.	13
Figure.05 : Les différentes parties du ptérygion.	16
Figure.06 : Voie de signalisation de l'IL-6.	29
Figure.07 : Voies de transduction du signal de l'IL-17.	30
Figure.08 : Synthèse du NO par les NOS.	33
Figure.09 : Démarche expérimentale.	422
Figure.10 : Répartition du ptérygion selon le sexe.	49
Figure.11 : Répartition du ptérygion selon les classes d'âges.	50
Figure.12: Répartition du ptérygion chez les hommes en fonction de la profession.	51
Figure.13 : Répartition du ptérygion chez les femmes en fonction de la profession.	52
Figure.14 : Coupes histologiques d'une conjonctive normale (témoin) (A) et des biopsies de ptérygion (B, C et D).	53
Figure.15: Détermination de l'expression du : CD3 (A, B, C), CD68 (D, E, F) et CD20 (G, H, I) respectivement dans les biopsies de ptérygion, des conjonctives saines (Témoins négatifs) et des biopsies de conjonctivite (Témoins positifs).	55
Figure.16 : Détermination de l'expression du NF-κB (A, B et C), et de la NOS2 (D, E, F), respectivement, au niveau des biopsies de ptérygions, des conjonctives saines (Témoins négatifs), et au niveau des biopsies des glandes salivaires labiales du syndrome de Gougerot – Sjögren (Témoins positifs).	57
Figure.17 : Détermination de l'expression du Bcl-2 au niveau des biopsies de ptérygion (A), des conjonctives saines (B, Témoin négatif) et des biopsies de conjonctivites (C, Témoin positif).	58
Figure.18: Concentration de la protéine C réactive au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.	58
Figure.19: La vitesse de sédimentation.	59
Figure.20: Concentration des immunoglobulines G au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.	60

Figure.21 : Concentration des immunoglobulines A au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.....	60
Figure.22 : Concentration des immunoglobulines M au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.....	61
Figure.23 : Concentration de l'IL-17A dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.....	62
Figure.24 : Concentration de l'IL-6 dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.....	63
Figure.25 : Concentration de l'IL-10 dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.....	64
Figure.26 : Concentration des nitrites (équivalents en NO) dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.	65
Figure.27 : Implication probable de la voie Th17 et des voies NF- κ B /IL-6/ STAT3 dans la pathogénèse du ptérygion.	80

Liste des Tableaux

Tableau.01 : Classification du ptérygion	17
---	-----------

Liste des Abréviations

A

A : Acinus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dependante d'Anticorps

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

Akt : protéine kinase B

AP-1 : protéine activatrice 1

APRIL : A Proliferation Inducing Ligand

ATCC : American Type Culture Collection

ATRSS : Agence Thématique de la Recherche en Santé

B

BAFF: B cell activating Factor

BATF: Basic leucine zipper Transcription Factor

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor (Récepteur des lymphocytes B)

BH4 : Tétrahydrobiopétrine

C

C3a, C4a, C5a : protéines du complément

CALT: Conjunctiva-Associated Lymphoid

CAMPs: Commensal Associated Molecule Patterns

CCL: Chemokine (C-C motif) Ligand

CD: Cluster of Differentiation

CE : Canal Excréteur

c-Maf : c avian musculo aponeurotic fibrosarcoma oncogene

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CO : monoxyde de carbone

COX2 : Cyclooxygénase 2

CRP : la protéine C réactive

CPA : cellule présentatrice d'antigène

D

DAB : 3, 3' diaminobenzidine

DAMPs : Danger Associated Molecule Patterns (motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires)

E

E: Epithélium

EGF: Epidermal Growth Factor

ELAM-1: Endothelial Leucocyte AdhesionMolecule 01

ER: Oestrogènes

ERK: Extracellular signal Regulated Kinase

F

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

Fas: Apoptosis Stimulating Factor

FasL: Fas Ligand Receptor

FGF: Fibroblast Growth Factor

FMN: Flavine Mononucléotide

Foxp3: Forkhead box p3

G

GATA3: Guanine Adenine Thymine Adenine sequence-binding Protein 3

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GR : glycoprotéine

Gp130 : glycoprotéine 130

H

HCL : acide chlorhydrique

HPV : Papillomavirus Humain

I

ICAM-I : Intercellular Adhesion Molecule 01

Ig : Immunoglobulines

IgA : Immunoglobuline A

IgD : Immunoglobuline D

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL : Interleukines

IL-R : Récepteur de l'interleukine

INF- γ : Interferon Gamma

INOS: NO synthase inductible

IRF: Interferon Regulatory Factor

i Treg : lymphocytes T régulateurs induits

J

JAK: Janus Kinase

L

L: Lymphocytes

L B: Lymphocytes B

LPS : Lipopolysaccharides

L T : Lymphocytes T

M

MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MMP : Métalloprotéinases

N

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous forme réduite

NaNO₂: Nitrite de Sodium

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B

NK: Natural Killer

NO: monoxyde d'azote

NO₂: dioxyde d'azote

NOHA : N ω -hydroxy-L-arginine

NOS : NO synthase

NOS1 : NO synthase 1 (neuronale)

NOS2 : NO synthase inductible

NOS3: NO synthase (endothéliale)

n Treg : lymphocytes T régulateurs naturels

O

O₂⁻ : ion super oxide

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

ONOO⁻ : peroxynitrite

P

p38 : protéine kinase 38

p 53 : protéine ou gène supresseur des tumeurs 53

PAMP : Pathogen Associated Molecule Pattern (motifs moléculaires associés aux pathogènes)

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellule mononucléée Sanguine périphérique)

PBS: Phosphate Buffered Salline

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PEG: Polyéthylène Glycol

PGF: Plateled derived Growth Factor

PI3K: Phosphatidyl inositol 3 kinase

PLA2 : Phospholipases 2

PRR : Pattern Recognition Receptor (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

R

RA : acide rétinoïque

RBP-J κ : Recombination Binding Protein J Kappa

ROR γ T: Retinoid-related Orphan Receptor γ T

S

SH: groupement thiol

S-NO: thionitrites ou S-nitrosothiols

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

T

T-bet : T-box transcription factor

TC : Tissu Conjonctif

TCR : T Cell Receptor (récepteur des lymphocytes T)

TGF- β : Transforming Growth Factor bêta (Facteur de croissance transformant bêta)

Th: T helper

TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteinase

TLR : Toll-Like Receptor

TNF-(α - β) : Tumor Necrosis Factor (alpha/ beta) (Facteur de nécrose tumorale alpha ou bêta).

TRAF : Facteur associé au récepteur du TNF

Treg : lymphocyte T régulateur

U

UV : Ultraviolet

V

VCAM-I: Vascular Cell Adhesion Molecule 01

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VS : Vitesse de Sédimentation

Introduction Générale

Introduction Générale

Le ptérygion est une maladie humaine de la surface oculaire connue depuis l'antiquité (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Siak et al, 2011**). C'est une néoformation conjonctivo-élastique bénigne, de forme triangulaire située dans l'aire de la fente palpébrale et de manière préférentielle au niveau du secteur nasal (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Liu et al, 2013**).

Cette lésion peut apparaître dans un seul œil ou les deux yeux du malade (**Clearfield et al, 2016**). Elle se caractérise par une évolution imprévisible, progressive et envahissante du tissu fibrovasculaire provenant de la conjonctive en s'étendant vers la cornée, menaçant ainsi dans les cas avancés l'acuité visuelle (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Anderson et al, 2017**). De plus, le ptérygion pourrait provoquer cliniquement, une rougeur, une irritation et un astigmatisme (**Anderson et al, 2017**).

Histologiquement, il a été considéré comme étant une lésion dégénérative, caractérisée par le remodelage de la matrice extracellulaire, l'élastose, la néo-vascularisation ainsi que par la destruction de la couche de Bowman et des cellules épithéliales limbiques (**Chui et al, 2011**).

Il a été rapporté que les radiations UV constitueraient la cause principale initiant sa formation d'où sa grande fréquence dans les pays à fort ensoleillement (**Malek et al, 2013 ; Chen et al, 2018**). En effet, la surexposition à la lumière UV (essentiellement les UVB) altérerait les cellules souches limbiques. Dans ce contexte, elles agiraient comme une barrière anatomique empêchant l'invasion de l'épithélium cornéen par l'épithélium de la conjonctive. Les rayons induiraient également des mutations au niveau de l'épithélium conjonctival conduisant à sa prolifération et au développement du ptérygion (**Ang et al, 2007 ; Chen et al, 2018**). L'apparition de ce dernier est associée à d'autres facteurs secondaires tels que : les substances chimiques toxiques, la poussière, les fines projections, la chaleur et la sécheresse qui irritent la surface oculaire et conduisent à des microtraumatismes, à l'évaporation et à la discontinuité du film lacrymal (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Perra et al, 2002 ; Džunić et al, 2010**).

Le ptérygion est très répandu dans le monde. Sa prévalence varie entre 2% et 22,5%. Elle est très élevée dans les régions tropicales et subtropicales, à haute altitude, proches de l'équateur et au niveau des deux pôles terrestres (forte exposition aux ultraviolets réfléchis par la neige) (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Moukoury et al, 2009 ; Durkin et al, 2010 ; Eballé et al, 2018**).

Cette pathologie a été rapportée en Algérie. En effet, elle a suscité l'attention de plusieurs équipes de recherches nationales dont les travaux ont donné lieu à des présentations dans divers congrès nationaux et internationaux (**Aouiche, 1999 ; Ailem et al, 2007 ; Lehtihet et Ailem, 2007 ; Yaghoubi et al, 2007**). Dans ce sens, une seule étude réalisée à la clinique d'ophtalmologie du CHU Ibn Rochd (Annaba) et de ses annexes, traitant les aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques de cette affection a fait l'objet d'une thèse de doctorat en sciences médicales (**Boulaneb-Bediar, 2014**). Toutefois et à ce jour, aucune étude à caractère national sur le ptérygion n'a fait l'objet de publications tant sur le plan clinique que fondamental.

Le traitement du ptérygion est purement chirurgical. Dans ce contexte, plusieurs techniques ont été utilisées telles que : l'excision simple, l'excision avec traitement adjuvant : (mitomycine C ; 5-Fluoruracile), l'excision avec ménagement d'une zone de sclère nue, l'autogreffe conjonctivale, la greffe limbo-conjonctivale, l'autogreffe de cellules souches limbiques, la kératoplastie lamellaire et la greffe de la membrane amniotique (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Ang et al, 2007**). Les méthodes chirurgicales restituant la surface oculaire sont les plus prometteuses. Cependant, aucune de ces stratégies thérapeutiques n'a permis de mettre fin aux risques de récurrences (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Aslan et al, 2013**). Afin d'éviter la survenue et la réapparition du ptérygion, il est indispensable d'établir avec exactitude les mécanismes impliqués dans sa pathogénèse. A l'heure actuelle, ils ne sont pas entièrement élucidés (**Park et al, 2011 ; Petrayevsky et Trishkin, 2018**). Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'apparition de cette maladie telles que : la théorie de la mutation génétique, la théorie tumorale, virale, neurotrophique, biochimique, musculaire, pinguéculaire, des maladies du tissu élastique, du déficit en cellules immunologiques et enfin la théorie inflammatoire sur laquelle s'est basée essentiellement notre recherche (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012**). Celle-ci a été réalisée en étroite collaboration avec la clinique ophtalmologique et le service d'anatomopathologie du CHU Ibn Rochd- Annaba.

L'objectif de notre étude a ciblé l'implication du processus inflammatoire dans la pathogénèse du ptérygion.

Afin d'étayer cette hypothèse, notre thèse s'est articulée autour des points suivants :

- Nous avons été amenés à effectuer une étude épidémiologique sur le ptérygion, au niveau de la clinique ophtalmologique du CHU Ibn Rochd –Annaba (fréquence hospitalière, répartition de la maladie selon le sexe, l'âge et la profession) dans le but d'évaluer l'importance de cette maladie dans l'EST Algérien et d'en soulever les éventuelles hypothèses étiologiques (éventuels facteurs de risques de la maladie).

- Dans une seconde partie, nous avons réalisé une étude histologique et immuno-histochimique sur des biopsies de ptérygion (n=43), dans le but de situer la présence d'infiltrats inflammatoires, d'identifier leurs types de sous populations cellulaires impliquées et ce, à travers la mise en évidence de l'expression des marqueurs de surface spécifiques (CD3, CD20 et CD68).
- Dans un autre volet, nous avons été amenés à rechercher des changements structuraux et signes de l'inflammation, tels que : l'activation du facteur NF- κ B et l'expression de la NO synthase 2 «NOS2». Parallèlement nous avons recherché l'expression concomitante d'un marqueur de la prolifération cellulaire (Bcl-2).
- Nous avons également effectué le dosage de certains marqueurs immunologiques et inflammatoires au niveau du sang (n=16) des patients atteints de ptérygion (dosage des immunoglobulines IgG, IgM et IgA, de la protéine C réactive et l'évaluation de la vitesse de sédimentation VS).
- Le dernier volet de notre étude a porté sur la mesure de la concentration des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-17A), anti-inflammatoires (IL-10) et d'un médiateur de l'inflammation (le monoxyde d'azote «NO») au niveau des sérums et des larmes des malades (n=43).

Partie Bibliographique

I. L'œil et le ptérygion

I.1 La vision

La vision est l'une des fonctions sensorielles fondamentales qui renseigne sur la forme, sur la couleur, et sur la mobilité de l'environnement. Assurée par le système visuel (l'œil), la vision comporte deux phases d'élaborations successives :

- Des phénomènes optiques qui transforment la lumière en une image rétinienne. Ils sont intégralement assurés par le système réactif de l'œil.
- Des phénomènes nerveux qui débutent au niveau de la rétine, par le traitement de l'image optique en un message nerveux organisé, se poursuivent dans les voies visuelles par le transport de cet influx et se terminent dans le cortex visuel occipital par la reconstitution d'une image intégrée à l'ensemble des autres informations sensorielles et sensitives (**Flament, 2002**). Les muscles oculo-moteurs quant à eux, assurent les mouvements des deux yeux et leur parfait synchronisme indispensable à une fonction visuelle binoculaire de qualité (**Rougier et al, 1989**).

I.2 Rappel anatomique de l'œil

Situé dans la cavité orbitaire, l'œil appelé également globe oculaire, a la forme d'une sphère ou plutôt d'un ovoïde à grand axe sagittal de 24mm de diamètre, un axe transversal de 23,5 mm et d'un axe vertical de 23mm. Il a un volume de 6,5 cm³ et un poids de 7g (**Rougier et al, 1989**).

L'œil est formé de trois tuniques ou enveloppes :

- **Périphérique ou sclérotique** (le blanc de l'œil), se transformant en avant en une membrane transparente, la cornée.
- **Intermédiaire ou choroïde**, vasculaire, se prolongeant en avant par le corps ciliaire et par l'iris.
- **Profonde ou rétine**, sensorielle et nerveuse, formée d'un ensemble de fibres qui se rassemblent pour former le nerf optique (**Rougier et al, 1989**).

L'œil est formé de trois milieux transparents d'arrière en avant :

- **Le corps vitré**, le plus important en volume.
- **Le cristallin ou lentille cristallienne**.
- **L'humeur aqueuse**, contenue dans les chambres de l'œil, de part et d'autre de l'iris (**Figure.01**) (**Rougier et al, 1989**).

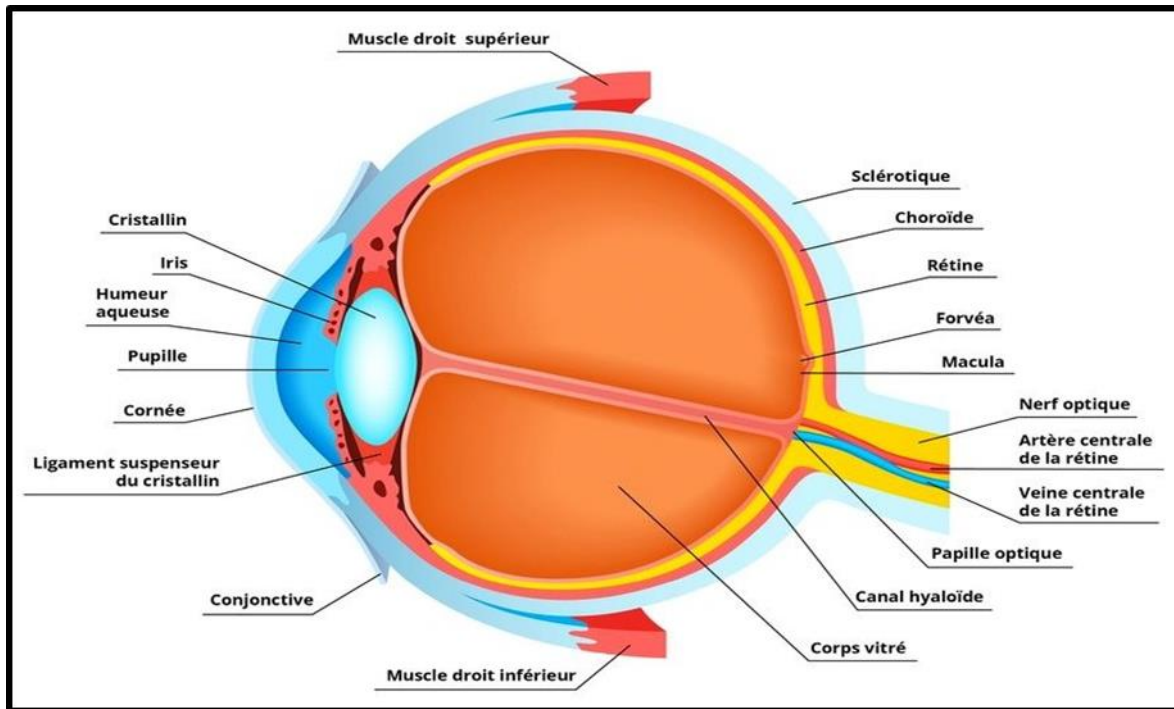


Figure.01 : Anatomie de l'œil (Stevens et Lowe, 1997).

I.3 Concept de la surface oculaire

I.3.1 Définition

La surface oculaire représente la région du globe oculaire en contact avec l'environnement extérieur. Elle comprend la conjonctive, le limbe, la cornée et le film lacrymal (Barry Lee et Mannis, 2013).

I.3.2 Anatomie de la surface oculaire

I.3.2.1 La conjonctive

La conjonctive est une membrane translucide, richement vascularisée qui couvre la surface interne des paupières supérieures et inférieures (**conjonctive palpébrale**) et se réfléchit sur la partie antérieure du globe oculaire (**conjonctive bulbaire**), pour recouvrir toute sa surface jusqu'à la limite cornéenne (**limbe**). Elle s'étend de ce dernier jusqu'au bord libre de la paupière en formant un cul de sac conjonctival (**ou fornix**) (Figure.01 de l'Annexe 01) (Stevens et Lowe, 1997 ; Flament, 2002 ; Pisella et al, 2015).

La conjonctive est responsable de la sécrétion du mucus, qui est essentiel pour la stabilité du film lacrymal et la transparence cornéenne. Elle contient des cellules immunocompétentes capables d'initier et de participer à la réaction inflammatoire (Pisella et al, 2015).

Elle est divisée en 03 régions :

- **La conjonctive palpébrale** : elle a une épaisseur de 0.30 mm. Elle est en continuité avec le revêtement cutané et comprend trois parties.
 - ✓ **La conjonctive marginale** : elle débute en arrière de la ligne des orifices de la glande de Meibomius et se termine au sillon tarsal. C'est la zone de transition entre l'épiderme (l'épithélium pavimenteux kératinisé et l'épithélium conjonctival non kératinisé).
 - ✓ **La conjonctive tarsale** : elle lui succède et est adhérente au tarse.
 - ✓ **La conjonctive orbitaire** : elle s'étend du tarse au cul de sac conjonctival (**Figure.01 de l'Annexe 01**).

- **Les culs de sac conjonctivaux ou Fornix** : ils représentent la zone de transition entre les conjonctives palpébrale et bulbaire. Au niveau de cet endroit, la conjonctive forme une sorte de rigole circulaire continue qui contient une mince couche de liquide sécrétée par les glandes lacrymales. Les culs de sacs permettent le mouvement du globe oculaire indépendamment des paupières (**Figure.01 de l'Annexe 01**).

On distingue quatre culs de sac :

 - ✓ **Le cul de sac supérieur** : le plus profond qui est situé au niveau de la marge orbitaire et à une distance de 8 à 10 mm du limbe.
 - ✓ **Le cul de sac inférieur** : il est distant de 8 mm du limbe.
 - ✓ **Le cul de sac externe ou temporal** : il est situé de 14 mm du limbe.
 - ✓ **Le cul de sac interne ou nasal** : il est occupé par la caroncule (petite saillie recouverte de poils rudimentaires) et le repli semi lunaire (rudiment d'une troisième paupière) (**Figure.02 de l'Annexe 01**) (**Rougier et al, 1989 ; Saraux et al, 2010 ; Pisella et al, 2015**).

- **La conjonctive bulbaire** : il s'agit d'une membrane fine et transparente qui tapisse la partie antérieure de l'œil (**Figure. 03 de l'Annexe 01**). Elle est divisée en deux parties :
 - ✓ **La partie sclérale** : elle s'étend du cul de sac conjonctival au limbe.
 - ✓ **La partie limbique** : elle réalise un anneau de 3 mm de large à la jonction entre les épithéliums conjonctival et cornéen (**Pisella et al, 2015**).

1.3.2.2 La cornée

C'est la structure la plus antérieure de la paroi du globe oculaire. C'est une calotte de sphère transparente, enchâssée dans l'ouverture antérieure de la sclérotique, comme un hublot. Cette lentille de forme convexe et asphérique mesure de 11 – 12 mm horizontalement et de 9-11mm verticalement, ce qui lui confère son pouvoir réfractif. La face antérieure de la cornée est recouverte par le film lacrymal, alors que sa face postérieure baigne dans l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil (**Figure.04 de l'Annexe 01**). La cornée est avasculaire (**Pisella et al, 2015**). Elle est richement innervée par les nerfs ciliaires et douée d'une grande sensibilité (**Rougier et al, 1989 ; Saraux et al, 2010 ; El Mélaoui, 2016**).

1.3.2.3 Le limbe

Il correspond à la jonction entre la cornée transparente et la sclérotique blanche et opaque (**Figure.02 de l'Annexe 01**). Il constitue un repère anatomique, clinique et chirurgical très important. Il a la forme d'un anneau elliptique, gris bleuté et translucide qui est plus large sur son axe vertical (1.5 mm) que sur son axe horizontal (1mm) et dont l'épaisseur est de 0.8mm. Sa face externe est recouverte par l'épithélium conjonctival qui se continue en avant par l'épithélium cornéen. Sa face interne est limitée par l'éperon scléral en arrière et la ligne de Schwalbe en avant. Elle possède des éléments du système excrétoire de l'humeur aqueuse ; le trabéculum et le canal de Schlemm (**Figure.05 de l'Annexe 01**) (**Flament, 2002 ; Oudanane, 2012**).

1.3.2.4 Le film lacrymal

Il constitue la deuxième ligne de défense de la surface oculaire après les paupières. Il maintient la surface cornéenne lisse avec un pouvoir réfractif optimal. L'épaisseur du film lacrymal est de 7 à 8µm avec une sécrétion basale de 1 à 2µl/min. Sa constitution dépend de trois éléments : la sécrétion des larmes, l'étalement correct de celles-ci à la surface oculaire et leur résorption en partie par les voies lacrymales et par l'évaporation de la surface oculaire (**Oudanane, 2012 ; Boulaneb-Bediar, 2014 ; Pisella et al, 2015**).

Le film lacrymal est composé de trois couches (**Figure.06 de l'Annexe 01**) :

- **La couche lipidique superficielle** : c'est une fine couche de lipides de 0.1 µm d'épaisseur qui est composée de : triglycérides, d'acides gras libres, de di-esters de cholestérol de cires et de cholestérol libre, produite en grande partie par les glandes sébacées de Meibomius et accessoirement par les glandes de Zeiss et de Moll localisées au niveau des

paupières (**Figure.06 et Figure.07 de l'Annexe 01**). Elle retarde l'évaporation de la couche aqueuse intermédiaire ce qui empêche la dessiccation cornéo-conjonctivale (**Butovich, 2009 ; Oudanane, 2012**).

- **La couche aqueuse intermédiaire :** elle a une épaisseur de 7 μm . Elle est constituée principalement d'eau (98%) mais contient également des gaz dissous, dont l'oxygène. Elle est riche en électrolytes (ions sodium, potassium, magnésium, calcium, chlorure, bicarbonate et phosphate), mucines libres, facteurs de croissance (EGF, TGF- β), hormones, cytokines, immunoglobulines (IgA sécrétoires), autres protéines (lysozymes, lactoferrine, cystatine, bêta-lysine) et cellules inflammatoires (lymphocytes B, T, macrophages et cellules dendritiques) et desquamées. Cette couche est sécrétée principalement par les glandes lacrymales principales pour sa composante réflexe et par les glandes lacrymales secondaires de Krause et Wolfring pour sa composante basale (**Figure.06 et Figure.07 de l'Annexe 01**). Elle a pour rôle d'apporter l'oxygène et les nutriments à la cornée, d'évacuer mécaniquement les débris exogènes et endogènes. Elle protège la surface oculaire des agents pathogènes et signaux de danger (**Zierhut et al, 2002 ; Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015**).
- **La couche muqueuse profonde :** elle est composée de mucines qui sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire de 600 kDa. Elle a une épaisseur de 0.02-0.05 μm . Elle est sécrétée par les cellules caliciformes de la conjonctive et par les cryptes de Henlé (**Figure.06 et Figure.07 de l'Annexe 01**). La couche muqueuse est en contact direct avec la surface hydrophobe des cellules épithéliales cornéo-conjonctivales et assure sa transformation en surface hydrophile. Elle maintient le film lacrymal stable entre chaque clignotement palpébral qui en outre permet son étalement harmonieux au niveau de l'ensemble de la surface oculaire (**Oudanane, 2012 ; Argueso, 2013 ; El Mélaoui, 2016**).

I.3.3 Histologie de la surface oculaire

I.3.3.1 La conjonctive

La conjonctive est une muqueuse formée d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif lâche (Chorion ou *substantia propria*). Ces deux structures étant séparées par une membrane basale (**Figure.02**) (**Pisella et al, 2015**).

- **L'épithélium** : est cylindrique pluristratifié non kératinisé contenant des cellules à mucus (cellules caliciformes ou globet cells). Il est constitué de deux à huit-dix couches cellulaires. Le nombre de cellules épithéliales et le nombre de cellules caliciformes varient selon la localisation de la conjonctive (**Figure.02**).

Outre les cellules épithéliales, l'épithélium conjonctival contient des mélanocytes. Ces derniers sont situés au sein des cellules basales de l'épithélium. De plus, des lymphocytes (essentiellement les lymphocytes T, de rares lymphocytes B, les cellules Natural killer (NK) et les lymphocytes T gamma/ delta – $T\gamma\delta$) sont dispersés dans les couches basales épithéliales et participent aux conjunctiva-associated lymphoid tissues (CALT). Enfin, des cellules de Langerhans (cellules dendritiques), sont dispersées dans les couches supra-basales, et particulièrement au niveau du limbe (**Pisella et al, 2015**).

- **Le chorion** : constitue la trame de soutien. Il contient des vaisseaux sanguins, des lymphatiques et des nerfs (**Figure.02**) (**Pisella et al, 2015**).

Il est constitué de deux couches :

- ✓ **Une couche superficielle adénoïde (ou lamina propria)** : elle est très lâche infiltrée de nombreuses cellules (lymphocytes (T et B), histiocytes (macrophage du tissu conjonctif), mastocytes, plasmocytes sécréteurs d'IgA, d'IgG et d'IgM, cellules dendritiques et les polynucléaires éosinophiles, expliquant son important potentiel immunologique (**Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015**).
- ✓ **Une couche profonde** : elle est constituée de faisceaux denses de fibres collagènes, entremêlées de fibres élastiques. Ces derniers sont synthétisés par des fibroblastes (**Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015**).

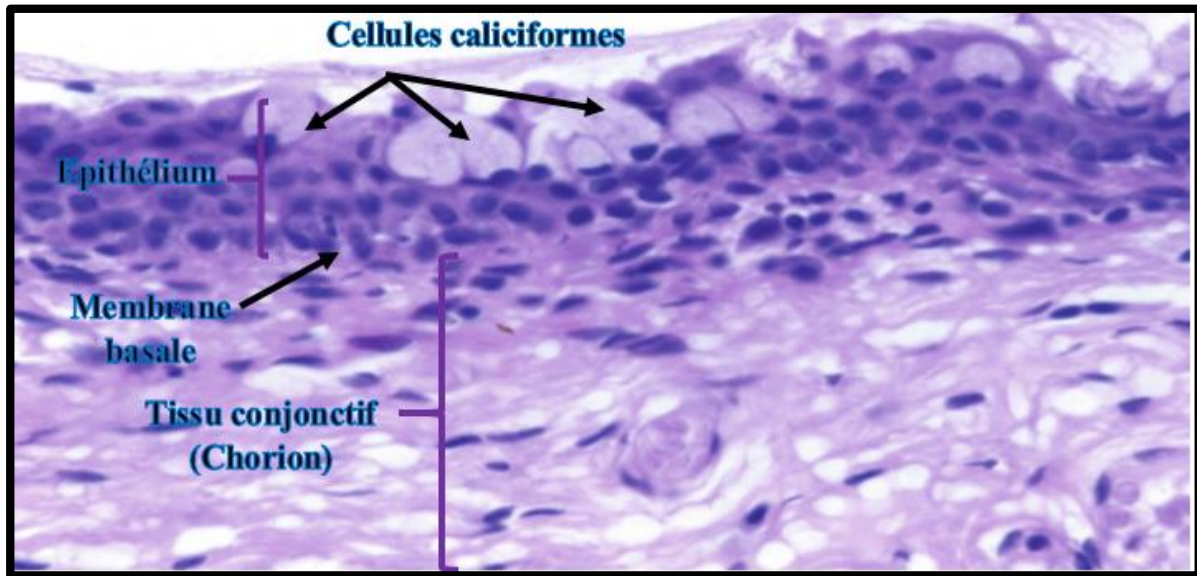


Figure.02 : Coupe histologique d'une conjonctive bulbaire (Hématoxyline-éosine x 400)
(Pisella et al, 2015).

1.3.3.2 La cornée

Elle comprend cinq couches qui sont de dehors en dedans : l'épithélium qui est en contact du film lacrymal et reposant sur une membrane basale ; la couche de Bowman qui correspond à une condensation du stroma antérieur ; le stroma cornéen ; la membrane de Descemet et l'endothélium. La membrane de Descemet correspond à la membrane basale des cellules endothéliales (**Figure.03**) (Pisella et al, 2015).

- **L'épithélium** : est de type malpighien pavimenteux stratifié, non kératinisé. Il comporte cinq à sept couches de cellules. Il mesure 50 μm d'épaisseur et représente 10 % de l'épaisseur totale cornéenne (Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015). Il est subdivisé en 3 assises cellulaires :
 - ✓ **L'assise basale** : il s'agit d'une seule couche de cellules de forme cylindrique, reposant sur une lame basale fine qui sépare l'épithélium de la couche de Bowman et du stroma. Ce sont les seules cellules de l'épithélium cornéen capables de mitoses (Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015).
 - ✓ **L'assise intermédiaire** : elle représente un état de transition entre les cellules basales et les cellules superficielles. Elle joue un rôle de protection mécanique et de barrière vis-à-vis des micro-organismes et de la diffusion de l'eau (Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015).

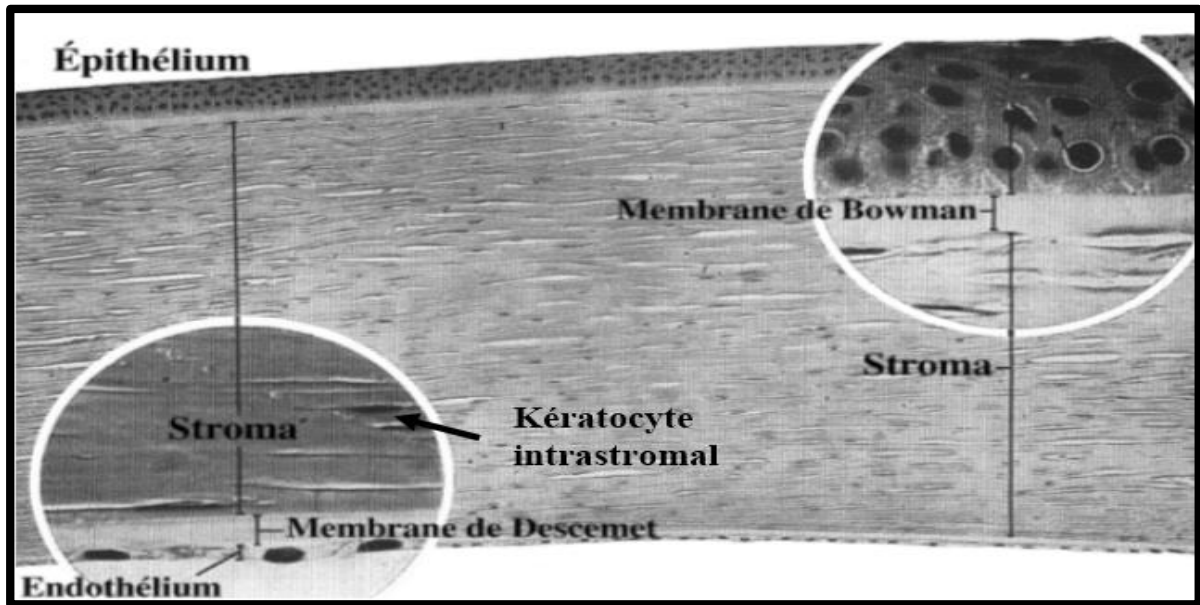


Figure.03 : Coupe histologique d'une cornée (Oudanane, 2012).

- ✓ **L'assise superficielle :** elle est constituée de deux à trois couches de cellules allongées et aplaties, les plus différenciées de l'épithélium cornéen. La membrane cytoplasmique de ces cellules est hérissée de microvillosités et de microplis qui entraînent l'augmentation de sa surface favorisant ainsi les échanges avec le film lacrymal et lui serve comme point d'ancrage (Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015).
- **La membrane de Bowman :** elle est située entre la lame basale épithéliale et le stroma. C'est une couche acellulaire de 8 à 14 μm d'épaisseur. Elle correspond à la condensation de fibres de collagènes et de protéoglycanes. Elle est probablement synthétisée par les cellules basales pendant la gestation qui perdent par la suite cette faculté (Oudanane, 2012).
- **Le stroma :** il représente la majeure partie de l'épaisseur cornéenne (90%) et mesure 400 μm d'épaisseur. Il est avasculaire et est formé de molécules de collagène qui sont organisées en fibrilles dont l'assemblage aboutit à des fibres de collagène. Celles-ci sont disposées en lamelles superposées dont la régularité de l'agencement est indispensable à la transparence cornéenne et donc à une bonne transmission de la lumière. Les lamelles de collagène sont entourées d'une substance fondamentale assurant la cohésion de la cornée. Cette substance est composée de glycoprotéines et de protéoglycanes sécrétées par les kératocytes (représentent 2 à 3% du volume stromal). Ces cellules sont retrouvées

dispersées entre les lamelles de collagène (**Stevens et Lowe, 1997 ; Oudanane, 2012 ; Pisella et al, 2015**).

- **La membrane de Descemet** : elle correspond à la membrane basale de l'endothélium qu'elle sépare du stroma. Cette couche hyaline et résistante a une épaisseur de 8 à 12 μm à l'âge adulte et de 3 μm à la naissance. Elle est sécrétée par l'endothélium vers le quatrième mois de gestation, puis devient incapable de se régénérer (**Oudanane, 2012 ; Abdelaoui, 2014**).
- **L'endothélium** : Il est constitué d'une couche unicellulaire qui tapisse la face interne de la cornée et qui est disposée à la face postérieure de la membrane de Descemet. Les cellules endothéliales sont hexagonales amitotiques et mesurent 5 μm d'épaisseur. Elles sont en contact direct avec l'humeur aqueuse. Elles pompent activement du liquide cornéen, et préviennent ainsi l'hyperhydratation des couches sus jacentes en particulier du stroma. Ainsi l'épaisseur et la transparence cornéennes sont parfaitement maintenues (**Stevens et Lowe, 1997 ; Oudanane, 2012**).

A l'état normal, la cornée comporte peu de cellules immunitaires présentatrices d'antigènes (les macrophages et les cellules dendritiques). Au sein de son épithélium et son stroma, ces cellules ont un phénotype immature (faible expression des molécules du CMH II) (**Pisella et al, 2015**).

1.3.3.3 Le limbe

Il constitue une zone de transition entre l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen. Il est revêtu par un épithélium pluristratifié pavimenteux qui s'épaissit progressivement, avec une disparition des cellules à mucus. L'épithélium limbique est organisé comme celui de la cornée centrale mais il est plus épais avec 10 à 15 couches cellulaires. Les cellules basales sont plus petites et plus compactes que leurs homologues cornéens (**Figure.04**) (**Pisella et al, 2015**).

L'épithélium limbique (la couche basale) abrite des cellules souches qui sont probablement à l'origine du renouvellement de l'épithélium cornéen. Le limbe est un élément clé pour la défense de la surface oculaire. Il est riche en vaisseaux et en lymphatiques pouvant transporter *in situ* des cellules impliquées dans le processus inflammatoire. Dans les couches basales et supra-basales de l'épithélium, outre les mélanocytes, on trouve des lymphocytes et des cellules de Langerhans. Le stroma conjonctival limbique contient des fibroblastes, des mélanocytes, des macrophages, des mastocytes, des lymphocytes, des plasmocytes et des

polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Toutes ces cellules font partie du système Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT). Le limbe est séparé de la sclère par la capsule de Tenon, lame de collagène dense, et de l'épisclère, tissu conjonctif serré et peu cellulaire (Pisella et al, 2015).

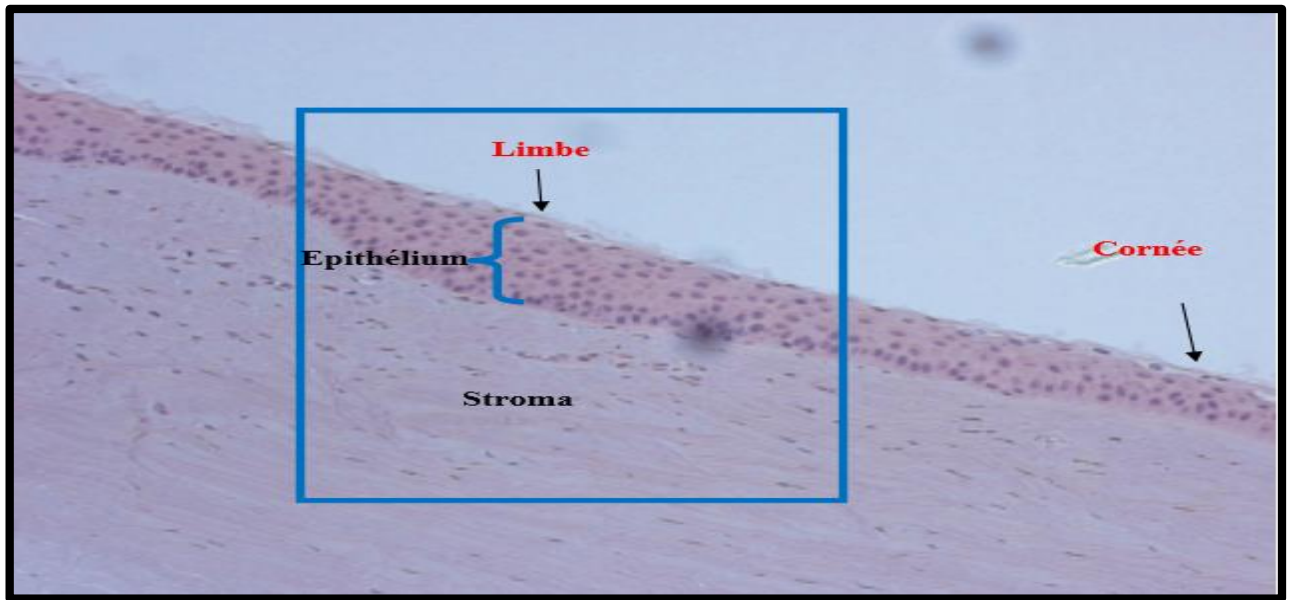


Figure.04: Coupe histologique du limbe (Hématoxyline-éosine x 250) (Pisella et al, 2015).

I.3.4 Le ptérygion

I.3.4.1 Définition

Le ptérygion est un mot tiré du grec «**ptérux**» qui signifie aile. Il s'agit d'une néoformation conjonctivo-élastique, décrite et traitée depuis l'antiquité. C'est une tumeur bénigne, de forme triangulaire située dans l'aire de la fente palpébrale et préférentiellement dans le secteur nasal. Il a comme particularité d'être évolutif et progresser vers les couches superficielles de la cornée, en direction de l'axe optique, ce qui peut menacer l'acuité visuelle. Sa vascularisation est riche et contribue à sa capacité d'extension (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Flament, 2002 ; Chui et al, 2008).

I.3.4.2 Facteurs étiologiques

Le facteur étiologique le plus important dans la survenue du ptérygion est l'exposition aux radiations solaires (essentiellement les UVB). C'est le facteur commun rencontré dans toutes les zones d'endémie ptérygiale. D'autres facteurs ont un rôle plus secondaire tels que la poussière, la chaleur, la sécheresse, les fines projections et les substances toxiques qui

favorisent l'évaporation des larmes et l'irritation de la surface oculaire. Le vent est un facteur peu déterminant, car de nombreux ptérygions sont observés dans des pays peu balayés par le vent (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Moukoury et al, 2009 ; Durkin et al, 2010 ; Eballé et al, 2018).

1.3.4.3 Epidémiologie

La prévalence du ptérygion est variable selon les régions. Elle est entre 2 % et 22,5 %. Elle est très élevée dans les régions tropicales et subtropicales, à haute altitude, proches de l'équateur et au niveau des deux pôles terrestres où il existe une forte exposition aux ultraviolets réfléchis par la neige. Elle est moins élevée dans les régions tempérées (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Moukoury et al, 2009 ; Durkin et al, 2010 ; Eballé et al, 2018).

1.3.4.4 Hypothèses d'étiopathogénie

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer la pathogénèse du ptérygion, telles que :

- **La théorie génétique et tumorale** : elle repose sur l'existence d'antécédents héréditaires dans 30% des cas. Cependant ce chiffre est biaisé par le fait que ces familles vivent dans un environnement géographique et socioéconomique prédisposant, exposant aux microtraumatismes de la surface oculaire et aux rayonnements solaires. Il est admis que certains gènes suppresseurs tumoraux sont sensibles aux rayons UV (tel que : le gène p53). Leur mutation peut jouer un rôle dans la pathogénie du ptérygion (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).
- **La théorie virale** : elle a été évoquée en raison de l'allure épidémique du ptérygion dans certaines régions du globe. Elle est controversée. Une équipe de recherche a vérifié la présence de l'ADN du papillomavirus (HPV), dans les biopsies de ptérygions et suggère que celui-ci pourrait jouer un rôle dans sa pathogénèse. Pour d'autres chercheurs, la formation du ptérygion ne serait pas influencée par cet agent infectieux (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).
- **La théorie de l'irrégularité du film lacrymal et la théorie biochimique** : l'irrégularité du film lacrymal, et le changement de la composition chimique du mucus du ptérygion (anomalie des mucines) en rapport avec une anomalie de certaines enzymes qui le synthétisent, va générer une réponse conjonctivale cicatricielle avec prolifération des

tissus conjonctivaux inflammatoires vers le centre cornéen. La discontinuité du film lacrymal à la jonction cornéo-limbique résultant de l'ablation chirurgicale du ptérygion, pourrait conduire à la récurrence (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012**).

- **La théorie des métalloprotéinases :** les métalloprotéinases sont des enzymes dépendant du zinc et du calcium, synthétisées par les fibroblastes. Elles dégradent la matrice extracellulaire et les connections intercellulaires. A l'état physiologique, elles sont faiblement exprimées au niveau de la conjonctive et du limbe et contribuent aux phénomènes de cicatrisation. A l'état pathologique, elles sont surexprimées (essentiellement dans les tumeurs). En effet, Il a été remarqué qu'elles étaient exprimées anormalement au niveau des biopsies, des cellules épithéliales en culture et des fibroblastes de ptérygion. Elles joueraient un rôle dans l'invasion de la cornée (avec dissolution de membrane de Bowman) par les cellules ptérygiales (**Oudanane, 2012**).
- **La théorie du déficit en cellules souches limbiques :** l'exposition chronique aux radiations UV constitue probablement le principal facteur d'altération des cellules souches limbiques. Il en résulterait une perte du rôle de ces cellules comme barrière anatomique et fonctionnelle contre l'invasion de l'épithélium cornéen par l'épithélium conjonctival (**Oudanane, 2012**).
- **La théorie de l'angiogénèse et du VEGF :** il a été démontré dans plusieurs études l'existence de l'angiogénèse au cours de la formation du ptérygion. Ce processus se caractérise par la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-vascularisation), à partir de vaisseaux préexistants. Physiologiquement, il joue un rôle dans la croissance, le développement et la cicatrisation des tissus. Dans les cas pathologiques, il favorise la croissance tumorale. Il existe plusieurs facteurs de croissance stimulant l'angiogénèse tels que : le FGF (fibroblast growth factor), le TGF- β (transforming growth factor-bêta), le TNF- α (tumor necrosis factor alpha) et le PDGF (platelet derived growth factor). Le VEGF (vascular endothelial growth factor) semble jouer le rôle le plus important dans le développement du ptérygion via la prolifération des cellules endothéliales en formant de nouveaux capillaires. En se liant à son récepteur, le VEGF stimule la production du NO, ce qui conduit à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (**Oudanane, 2012**).
- **La théorie inflammatoire :** l'augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires et de certains facteurs de croissance a été rapportée dans les ptérygions. Notamment, les interleukines et le facteur de nécrose -alpha (TNF- α) augmentent à la surface oculaire en cas de lésions par les radiations solaires. Tous ces médiateurs de l'inflammation sont

produits par les cellules épithéliales et / ou les fibroblastes du ptérygion. Ils ont un rôle dans de multiples stades de développement du ptérygion (développement, prolifération, migration cellulaire, invasion, chimiotactisme des cellules inflammatoires, angiogenèse et induction des métalloprotéinases) (Chui et al, 2008 ; Bouyaqba, 2014).

1.3.4.5 Etude clinique et aspect macroscopique

Le ptérygion se localise préférentiellement sur la conjonctive bulbaire, sur la fente palpébrale et en nasal dans 90 % des cas. Cependant, il peut également être nasotemporal (10 %) ou exceptionnellement temporal. Il peut apparaître dans un seul œil ou les deux yeux du patient (Clearfield et al, 2016).

Trois composantes forment le ptérygion (**Figure.05**) :

- **La tête** : elle est de forme arrondie ou pointue, aux contours plus ou moins réguliers, fortement adhérente à la cornée, non mobilisable, elle progresse vers l'aire pupillaire. Elle est responsable de la baisse de l'acuité visuelle par l'astigmatisme induit et / ou par l'envahissement du centre optique.
- **Le col** : il correspond à la partie limbique du ptérygion, entre la base bulbaire et le sommet cornéen. Il adhère fortement au limbe.
- **Le corps** : il est large et adhérent à la conjonctive, mais mobile et non adhérent par rapport aux plans profonds. C'est un tissu fibreux dense et solide. Il s'étend en éventail du limbe au repli semi-lunaire et à la caroncule dans les formes sévères (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).

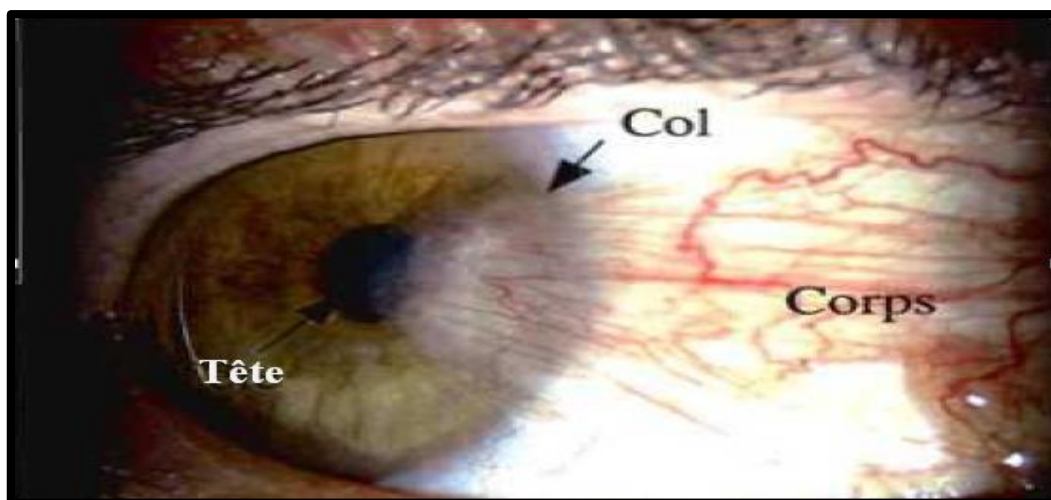


Figure.05 : Les différentes parties du ptérygion (Oudanane, 2012).

I.3.4.6 Classification

Il existe deux types de classification du ptérygion (**Tableau. 01**) (**Oudanane, 2012**).

Tableau.01 : Classification du ptérygion (**Oudanane, 2012**).

Types de classification	Critères de classification	Différentes classes de ptérygions
Classification morphologique	-Epaisseur du ptérygion. -Obstruction de la visibilité des vaisseaux épiscléraux sous-jacents par le ptérygion.	Grade 1 : atrophique, les vaisseaux épiscléraux sous le corps du ptérygion sont clairement distingués et non masqués. Grade 2 : intermédiaire, la visibilité des vaisseaux épiscléraux est partiellement obstruée par le ptérygion. Grade 3 : charnu, les vaisseaux épiscléraux sont complètement masqués par le corps du ptérygion.
Classification anatomique	-Empiètement du ptérygion sur la cornée.	Type I : l'envahissement de la cornée ne dépasse pas les 2 mm, le corps ptérygial n'a ni consistance, ni épaisseur (maladie au début). Type II : l'empiètement cornéen se situe entre 2 à 4 mm et atteint la zone para-centrale. L'épaisseur du corps du ptérygion est importante, les vaisseaux y sont nombreux et dilatés avec une zone progressive large (forme évolutive de la maladie). Type III : l'envahissement de la cornée est supérieur à 4 mm et atteint l'aire pupillaire (baisse de l'acuité visuelle). Les vaisseaux sont abondants et la zone de Fuchs (opacification sous épithéliale) est bien visible (forme très évoluée de la maladie).

I.3.4.7 Traitements utilisés

- **Traitement prophylactique :** il repose sur la protection des sujets, des facteurs étiologiques de la maladie par le port de lunettes teintées (protection contre les UV) et en évitant les métiers dans une atmosphère agressive pour les yeux (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012**).
- **Traitement médical :**
 - ✓ Des antiseptiques en collyres sont utilisés en pré et post opératoires pour éviter les infections.
 - ✓ Des corticoïdes et anti-inflammatoires non stéroïdiens sont utilisés en post opératoire sur une durée prolongée de plusieurs mois pour diminuer les phénomènes inflammatoires et la formation des néo-vaisseaux.
 - ✓ Des antimitotiques tels que : le triéthylène thiophosoramide (Thiotépa) et la mitomycine C (qui est également un antibiotique) sont utilisés généralement après la chirurgie pour inhiber la formation des néo- vaisseaux. Cependant, plusieurs effets secondaires leur ont été attribués.
 - ✓ Des molécules anti-angiogéniques telles que bévacizumab (Avastin) sont injectées sous la conjonctive pour diminuer la densité vasculaire dans le ptérygion et entraîner sa régression.
 - ✓ Le 5-Fluorouracile (anti cancéreux) a une action antiproliférante en bloquant la thymidylate synthase. Il est utilisé en injection sous conjonctivale, en post-opératoire pour réduire la récurrence. La doxorubicine (anticancéreux utilisé en chimiothérapie), la cyclosporine (immunosupresseur) ou encore l'acétonide de triamcinolone (glucocorticoïde) sont plus rarement utilisés dans la prévention des récurrences postopératoires.
 - ✓ Un antiallergique, le transilat, réduirait *in vitro* et de manière significative la prolifération des fibroblastes issus des ptérygions. Il pourrait éventuellement éviter la récurrence ou le développement du ptérygion *in vivo* (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012**).
- **Traitement par des moyens physiques :** plusieurs techniques ont été utilisées telles que : la cryothérapie, la photo-coagulation par le laser Argon, le laser Excimer, la bêta-thérapie (radiations ionisantes associées généralement à une résection simple du ptérygion) et d'autres types de radiothérapies (radiothérapie de contact ou plésiothérapie). Certaines de ces techniques sont responsables de plusieurs effets secondaires et sont peu

recommandables à cause du risque de récurrence (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).

- **Traitement chirurgical :** le traitement chirurgical est le meilleur moyen qui permet une éventuelle guérison du ptérygion. L'objectif du traitement idéal est de restituer, après ablation de la néoformation, un profil cornéo-limbo-conjonctival indemne de toute rupture de continuité, afin de diminuer au maximum le risque de récurrence. Le recours à un tissu de remplacement au niveau de la zone d'exérèse est fréquemment nécessaire (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).

Plusieurs techniques chirurgicales sont utilisées :

- ✓ **Des techniques d'excision sans greffe tissulaire :** telles que l'excision simple, l'excision et déviation, l'excision avec ménagement d'une zone de sclère nue, l'excision avec rapprochement conjonctival simple, l'excision avec glissement conjonctival pédiculé et les techniques d'Hervouet (excision et translation des lambeaux conjonctivaux) (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).
- ✓ **Des techniques d'excision avec greffe tissulaire :** telles que l'excision et remplacement du tissu conjonctival réséqué (autogreffe conjonctivale, greffes de muqueuses buccales, greffes de membranes amniotiques), l'excision et remplacement du tissu cornéen réséqué (l'homogreffe de cornée ou kératoplastie lamellaire), excision et auto-conjonctivokératoplastie (autogreffe cornéo-conjonctivale), excision et autogreffe limbo-conjonctivale, auto et allogreffes du limbe, autogreffes de cellules souches limbiques (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Oudanane, 2012).

II. Inflammation et spécificités immunologiques de la surface oculaire

Le système immunitaire oculaire fait l'objet de processus de régulation complexes permettant l'élimination de micro-organismes pathogènes tout en maintenant une tolérance vis-à-vis des antigènes de la flore endogène. Le privilège immunitaire oculaire est censé augmenter le seuil à partir duquel l'immunité innée et adaptative peut déclencher une inflammation oculaire locale dans le but de préserver l'intégrité de l'axe visuel et la fonction visuelle (Pisella et al, 2015).

II.1 Inflammation

II.1.1 Définition

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme et des tissus vivants vascularisés à une agression ayant pour origine des éléments physiques (traumatismes, chaleur, froid, radiations), des agents chimiques (caustiques, toxines, venin, piqûres d'insectes), des corps étrangers exogènes ou endogènes, des infections par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons) et des composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques et cytokines). Quel que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables. La réaction inflammatoire peut être aiguë et se manifester immédiatement après un contact avec l'agent agresseur et durer quelques heures (48h), jours ou quelques semaines. C'est la réponse typique du système immunitaire inné. Elle peut être également chronique et ainsi durer plusieurs semaines voire des années (**Rousselet et al, 2005 ; Zerbato, 2010**).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique. Son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, des anomalies de la régulation du processus inflammatoire, ou d'anomalies quantitatives ou qualitatives des cellules intervenant dans l'inflammation (**Weill et Batteux, 2003 ; Rousselet et al, 2005 ; Abbas et Lichtman, 2009**).

II.1.2 Les phases de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire se divise en trois phases principales : une phase initiale vasculaire, une phase d'amplification cellulaire et enfin une phase de réparation et de cicatrisation (**Weill et Batteux, 2003**).

Lors de la phase vasculaire, les cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et mastocytes) qui résident au niveau du tissu lésé vont tout d'abord reconnaître par leurs PRR (Pattern Recognition Receptor : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires), les motifs PAMP (Pathogen Associated Molecule Pattern) ou les DAMP (Danger Associated Molecule Pattern). Activées, ces cellules vont libérer des chimiokines et des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-6), des prostaglandines et de l'histamine. Ces facteurs ainsi que le monoxyde d'azote endothélial, les fragments du complément (C3a, C4a et C5a) et la bradykinine agissent sur les

cellules endothéliales vasculaires en augmentant leur perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule 1, ELAM-1 : Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1 et VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et des chimiokines comme l'IL-8 (Lydyard *et al*, 2002 ; Weill et Batteux, 2003 ; Owen *et al*, 2014).

La phase d'amplification cellulaire qui fait suite à la phase vasculaire est caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules circulantes de l'immunité innée (les neutrophiles, ensuite les monocytes / macrophages) vers les tissus enflammés dans le but d'éliminer par phagocytose (utilisation des métabolites toxiques de l'O₂, du NO, des élastases et collagénases) les pathogènes envahisseurs et les tissus endommagés. Si cela ne suffit pas il y'aura recrutement des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B). Si l'infection ou la lésion tissulaire n'est pas résolue cela peut conduire à un état inflammatoire chronique (Weill et Batteux, 2003 ; Owen *et al*, 2014).

La phase de réparation et de cicatrisation est mise en place lorsqu'il y'a des dégâts tissulaires causés par l'inflammation. Pour réparer ces tissus, les fibroblastes vont agir en synthétisant les protéines matricielles des tissus intercellulaires (le collagène) (Weill et Batteux, 2003).

II.2 Les cellules impliquées dans la défense de la surface oculaire

II.2.1 Les cellules de Langerhans (cellules dendritiques)

Issue de la moelle osseuse, la cellule de Langerhans est une cellule dendritique immature. Elle se trouve dans l'épiderme et les épithéliums des muqueuses. C'est une cellule présentatrice d'antigène exprimant essentiellement au niveau de sa membrane les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des récepteurs de type Toll-like (TLR : Toll Like receptor). La liaison de l'antigène à ce récepteur avec la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF : Tumor Necrosis Factor, IL-1 : Interleukine-1) conduit à leur maturation. Une fois mures, elles migrent au niveau des ganglions lymphatiques ou elles présentent l'antigène traité aux lymphocytes T-CD4 et induisent une réponse immunitaire de type cellulaire (Valladeau, 2006 ; Abbas et Lichtman, 2009).

II.2.2 Les cellules épithéliales de la surface oculaire

En plus des cellules dendritiques, des neutrophiles, des mastocytes et des monocytes /macrophages, les cellules épithéliales de la surface oculaire portent également des récepteurs TLR qui reconnaissent des motifs DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns), PAMPs

(Pathogen-Associated Molecular Patterns) et CAMP_s (Commensal-Associated Molecular Patterns). Liés à leurs ligands, les TLR déclenchent l'activation du facteur de transcription NF- κ B menant à l'expression des gènes des cytokines pro- inflammatoires , des chimiokines et des molécules d'adhérence ; ce qui conduit au déclenchement de la réponse immunitaire innée et adaptative (**Frenzel et Hermine, 2013 ; Pisella et al, 2015**).

II.2.3 Les macrophages

Ce sont des cellules phagocytaires tissulaires dérivées des monocytes sanguins. Elles jouent un rôle dans la présentation d'antigènes. Elles expriment les molécules de classe I et II du CMH. Au niveau oculaire, les macrophages jouent un rôle dans le maintien et la poursuite des cascades inflammatoires essentiellement conjonctivales. Par exemple, l'interaction de certaines molécules bactériennes (LPS) avec des macrophages, déclenche dans ces cellules la production de cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TNF- α) qui amplifient la réponse immunitaire et inflammatoire (**Chapel et al, 2004 ; Scull et al, 2010 ; Pisella et al, 2015**).

II.2.4 Les mastocytes

Ils jouent un rôle dans l'inflammation en synthétisant également des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6...). Ils peuvent induire un phénotype Th17 aux lymphocytes T et maintenir la réaction inflammatoire (**Abbas et Lichtman, 2009 ; Frenzel et Hermine, 2013 ; Owen et al, 2014**).

II.2.5 Les polynucléaires éosinophiles

Ils jouent un rôle dans la défense contre les parasites extracellulaires (helminthes) et sont impliqués dans les réactions allergiques. Ils interviennent également dans l'immunité anti-tumorale et la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-6) (**Driss, 2008 ; Owen et al, 2014**).

II.2.6 Les polynucléaires neutrophiles

Ce sont des phagocytes circulants qui ont la faculté de se déplacer vers les tissus (site d'infection) où ils produisent des dérivés oxygénés, enzymes protéolytiques responsables de la destruction de l'agent infectieux aussi bien que des tissus de l'organisme lui-même (activation prolongée). Leur durée de vie dans les tissus est de quelques jours (phagocytés après, par les macrophages). Ils participent également aux réponses inflammatoires en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines telles que l'IL-1 β , TNF- α et IL-8 (**Ali et al, 1997 ; Lapinet et al, 2000 ; Witko-Sarsat et al, 2000 ; Babior et al, 2001**).

II.2.7 Les cellules de la lignée lymphoïde

II.2.7.1 Les cellules NK

C'est un type de lymphocytes grands granuleux, non T non B (n'expriment pas les récepteurs T et B), participant à l'immunité innée. Présentes dans les tissus et la circulation sanguine où elles constituent 5 à 15 % des lymphocytes circulants. Les cellules NK (natural killer) exercent une activité cytotoxique à l'égard de cibles tumorales ou infectées par des pathogènes intracellulaires et des virus. Elles lysent des cibles qui échappent à la toxicité des lymphocytes T CD8⁺ (Lydyard et al, 2002 ; Brézin, 2010).

II.2.7.2 Les lymphocytes B

Ils jouent un rôle distinct dans la réponse immunitaire humorale en s'activant en cellules effectrices sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes. Les lymphocytes B matures expriment à leur surface le BCR (B cell receptor) qui est un anticorps de surface (IgM et IgD membranaires). Ils sont également des cellules présentatrices d'antigènes. Ils expriment les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Pour être activés, la reconnaissance de l'antigène (pathogène extracellulaire) uniquement par le BCR n'est dans certains cas, pas suffisante ; elle nécessite l'aide des lymphocytes auxiliaires (T CD4⁺). L'antigène sera phagocyté et présenté aux T CD4⁺ par les molécules du CMH. Plusieurs cytokines vont être alors synthétisées par ces derniers pour activer les cellules B en plasmocytes sécrétant plusieurs types d'anticorps : IgM, IgG, IgA et IgE. Au niveau des muqueuses le lymphocyte B sécrète l'IgA (première ligne de défense) indépendamment des lymphocytes T et nécessite des signaux BAFF (B-cell Activating Factor) et APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) produits par certaines sous populations de cellules dendritiques ou épithéliales. Ils peuvent également synthétiser des cytokines pro-inflammatoires : IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Jacquot et Boyer, 2006 ; Abbas et Lichtman, 2009 ; Hassane, 2016).

II.2.7.3 Les lymphocytes T

- **Les T CD8⁺ :** les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques est une population de cellules T, fondamentale dans la protection contre les tumeurs et les pathogènes intracellulaires comme les virus. La cellule infectée exprime à sa surface des complexes CMH de classe I-peptides viraux qui vont être reconnus par le TCR du lymphocyte T CD8⁺ qui va directement tuer la cellule infectée (par système perforine, granzyme ou Fas- FasL). Ils secrètent l'IFN γ , activant les macrophages à éliminer les cellules mortes par apoptose (Abbas et Lichtman, 2009).

- **Les T CD4+(Th0) :** les lymphocytes T CD4+ sont dits helper. Ils reconnaissent par leur TCR, le complexe CMH II-antigène porté par une cellule présentatrice d'antigène, ce qui leur permet de s'activer, de proliférer et de se différencier en l'une des sous populations de cellules T effectrices ou régulatrices. Elles ont un profil cytokinique intermédiaire entre Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4) (**Figure.01 de l'Annexe 02**) (Owen et al, 2014 ; Touil-Boukoffa et al, 2016).
- **Les lymphocytes Th1 :** Ils sont induits dans le contexte IL-12, IL-18 et IFN- γ . Cette différenciation fait intervenir les facteurs STAT1/STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 1 et 4). Les cellules Th1 expriment le facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T cells) qui est essentiel pour leur génération. Ils secrètent des cytokines pro-inflammatoires : IL-2, IFN γ , TNF- α et TNF- β (**Figure.01 de l'Annexe 02**). Ils jouent un rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. Ils agissent contre les pathogènes intracellulaires (Virus, bactéries...) et exercent leur action sur les CPA (cellules présentatrices d'antigènes) en augmentant leur capacité phagocytaire, de production de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que leur capacité de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs (Peck et Mellins, 2009 ; Rafa et al, 2010 ; Belguendouz et al, 2011 ; Touil-Boukoffa et al, 2016).
- **Les lymphocytes Th2 :** la différenciation des Th0 en Th2 est induite par l'IL-4, faisant intervenir le facteur de transcription STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) et GATA3 (Guanine Adenine Thymine Adenine sequence-binding protein 3). Ils produisent essentiellement les interleukines : IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (**Figure.01 de l'Annexe 02**). Cette sous population lymphocytaire intervient dans la réponse immunitaire humorale et dans la différenciation des lymphocytes B. Elle est impliquée dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires (parasites) et le développement des maladies allergiques. Plusieurs pathologies à caractère auto-immun et inflammatoire chronique sont caractérisées par un profil Th2 (Touil- Boukoffa et al, 2016).
- **Les lymphocytes Th17 :** Ils sont associés aux muqueuses et sont impliqués dans la réponse précoce à de nombreux agents pathogènes extracellulaires (bactéries et champignons). Ils ont été trouvés comme étant impliqués dans l'auto-immunité et l'inflammation chronique des tissus. Le TGF- β (Transforming Growth Factor β) ainsi que l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-21 et l'IL-23 sont impliqués dans la différenciation des lymphocytes auxiliaires naïfs (Th0) en lymphocytes Th17. Ces derniers expriment le facteur de

transcription ROR γ T (Retinoid-related Orphan Receptor γ T), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) et ROR α (RAR-related Orphan Receptor alpha) (**Figure.01 de l'Annexe 02**). Ils expriment également à leurs surfaces l'IL-23 R (récepteur de l'interleukine 23), le CCR6 (Chemokine receptor 6) et le récepteur à la chimiokine CCL20 (C-C motif ligand 20). Ils sont dotés d'une remarquable plasticité en se retransformant rapidement en Th1 ou Treg mais en passant tout d'abord par un état transitoire entre la population Th17 et ces deux populations. Les Th17 peuvent aussi être stabilisés par l'IL-23 qui leur confère des fonctions effectrices pathogéniques caractérisées par la production de l'IL-17A, l'IL-17 F et d'interféron gamma (IFN- γ). La sécrétion de l'IL-17 (A et F) induit la production de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et métalloprotéinases MMP), recrute les neutrophiles, notamment lors des réponses immunitaires contre les agents pathogènes extracellulaires et peut participer à l'induction de maladies auto-immunes spécifiques d'organes. Les Th17 produisent également l'IL-21 et l'IL-22. L'IL-21 est un facteur stimulant la différenciation en Th17 et sert ainsi de rétrocontrôle positif amplifiant cette différenciation (**Batteli et al, 2007 ; Chen et O'Shea, 2008 ; Reyes et Saban, 2014 ; Touil-Boukoffa et al, 2016**).

- **Les lymphocytes Treg** : comme leur nom l'indique, ce sont des régulateurs des réponses immunitaires, permettant de les diminuer voir de les supprimer. Ils interagissent avec les cellules T et les cellules présentatrices de l'antigène. Ils participent à la tolérance immunitaire via leur action immunosuppressive qui régule les lymphocytes T effecteurs. Ils jouent un rôle dans la tolérance des antigènes du soi. Il existe plusieurs types de lymphocytes T ayant une activité suppressive ou régulatrice mais les LTreg CD4⁺CD25⁺ exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box p3) à action suppressive sont les plus professionnels. Ils comprennent deux sous populations : les Treg naturels (nTreg), se trouvant dans le thymus et les Treg induits (iTreg) en périphérie (organes lymphoïdes secondaires), sous l'action de l'IL-2 et du TGF- β ou après contact antigénique (possèdent un TCR : T Cell Receptor). Au niveau des sites inflammatoires, les iTreg réduisent la stimulation des TCD4⁺ et atténuent la fonction effectrice des lymphocytes TCD8⁺ par la sécrétion des cytokines IL-10 et TGF- β . L'IL-2 et TGF- β jouent un grand rôle dans la différenciation des TCD4⁺ en Treg (**Figure.01 de l'Annexe 02**) (**Pisella et al, 2015 ; Touil-Boukoffa et al, 2016**).

- **Les lymphocytes T Gamma/Delta ($\gamma\delta$)**

Ils présentent un TCR (T Cell Receptor) de type $\gamma\delta$ différent de celui des cellules T alpha / bêta. Ces cellules sont moins nombreuses que ces dernières et sont trouvées essentiellement au niveau du sang, de la peau et des muqueuses. Ils ont une prédilection pour les sites épithéliaux. Dans cette forme, les cellules n'ont besoin ni que l'antigène soit procéssé ni qu'il leur soit présenté par une molécule du CMH. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont une action cytotoxique par l'intermédiaire des systèmes perforine /granzyme et Fas /FasL et jouent un rôle dans des inflammations oculaires sévères. Ils produisent l'IL-17, cytokine clé de la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire au niveau des muqueuses (**Bialasiewicz et al, 1996, Narita et al, 2010 ; Touil- Boukoffa et al, 2016**).

II.3 Les médiateurs de l'inflammation

II.3.1 Les cytokines

II.3.1.1 Définition

Les cytokines sont des médiateurs intercellulaires solubles induites par une variété de cellules de l'organisme en réponse à de nombreux stimuli. Ce sont des protéines ou glycoprotéines de faible poids moléculaire. Elles exercent leurs actions à des concentrations très faibles de l'ordre des pico-molaires et des femto-molaires. Elles agissent sur les récepteurs de leurs cellules cibles de façon autocrine, paracrine ou endocrine (**Cohen et Cohen, 1996 ; Touil-Boukoffa et al, 2016**). Les cytokines présentent des attributs de pléiotropie, de redondance, de synergie, d'antagonismes et d'induction de cascades. Ces propriétés permettent de réguler l'activité cellulaire de façon coordonnée et interactive (**Touil-Boukoffa et al, 2016**).

II.3.1.2 Rôle

Les cytokines ont plusieurs rôles. Elles interviennent dans le développement de la réponse immunitaire, cellulaire ou humorale. Elles régulent l'intensité et la durée de cette dernière en stimulant ou en inhibant l'hématopoïèse. Elles induisent la réponse inflammatoire et déclenchent la prolifération, la différenciation, le chimiotactisme, la régulation de la sécrétion d'autres cytokines, l'activation cellulaire et l'augmentation de la cytotoxicité et /ou la régulation de l'immunité. Elles contrôlent également la cicatrisation des plaies (**Lydyard et al, 2002 ; Touil-Boukoffa et al, 2016**).

II.3.1.3 Classification

- **Les cytokines pro-inflammatoires**

- ✓ **IL-1- β** : est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille des IL-1. Elle joue un rôle dans l'inflammation aiguë et chronique et les maladies auto-immunes. Elle joue également un rôle dans la différenciation des lymphocytes Th17. Ses effets biologiques sont dues à l'induction de gènes : de la NOS inductible (NO synthase inductible), de la cyclooxygénase de type 2 (COX2) et de la phospholipase de type 2 (PLA2). Elle est synthétisée par plusieurs cellules : mastocytes, macrophage, certains lymphocytes T, lymphocytes B, cellules de Langerhans, cellules endothéliales, kératinocytes, fibroblastes, cellules gliales, cellules épithéliales thymiques et les cellules musculaires lisses. (**Fenton et al, 1987 ; Dinarello et Moldawer, 1999 ; Dinarello, 2002 ; Ren et Torres, 2009 ; Dinarello, 2011**).
- ✓ **TNF- α** : c'est une cytokine ubiquitaire qui agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires sur la voie de signalisation NF- κ B. L'activation de cette voie conduit à la transcription de gènes de cytokines impliquées dans l'inflammation telles que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-8. En plus d'être pro-inflammatoire, le TNF- α a une action cytotoxique, anti-tumorale, antivirale et antiproliférative. Il est synthétisé principalement par les monocytes/macrophages, les cellules T, certaines cellules NK et les cellules dendritiques. Il peut être également synthétisé par des cellules non immunitaires telles que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes. (**Gruss et Dower, 1995; Rozieres et al, 2006; Calzascia et al, 2007**).
- ✓ **IL-6** : elle est caractérisée par la présence au niveau de son récepteur de la sous unité commune la gp130 (famille de l'IL-6). C'est une cytokine ubiquitaire synthétisée par plusieurs types de cellules immunitaires et non immunitaires tels que les monocytes / macrophages et les cellules épithéliales. Sa production est déclenchée par plusieurs signaux tels que : le rayonnement UVB et les lipopolysaccharides bactériens (LPS). En plus de son rôle pro-inflammatoire local, elle peut agir sur les cellules hépatiques en stimulant la sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (la protéine C réactive (CRP) (**Galanaud et al, 1989 ; Kamimura et al, 2003 ; Owen et al, 2014**).

Le gène codant pour l'IL-6 est situé sur le bras court du chromosome 7. En amont du gène de l'IL-6, se trouvent des sites régulant sa transcription tels que celui du facteur de transcription NF- κ B (régulation positive du promoteur du gène), le facteur RBP-J κ (Recombination Binding Protein J Kappa), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), des œstrogènes (ER) et les produits des gènes suppresseurs des tumeurs p53 (régulation négative) (**Santhanam et al, 1991 ; Vallières et Rivest , 2000**).

D'un point de vue cinétique, en plus de la sous-unité gp 130 (120 KD), possédant des domaines Janus Kinases (JAK), la cytokine IL-6 se lie dans un premier temps à une autre sous-unité α , IL-6Ra (gp80, 80 kDa) de son récepteur. Cette deuxième sous-unité pouvant être fixée à la membrane ou sous forme soluble. Le complexe tri-moléculaire résultant (IL-6/gp80/gp130) n'est pas capable d'induire une transduction de signal (**Chow et al, 2001 ; Heinrich et al, 2003**).

Il faut une interaction entre deux complexes tri-moléculaires pour former un super-complexe hexamérique comprenant deux molécules d'IL-6, de gp80 et de gp130 qui est alors pleinement fonctionnel (**Figure.06**) (**Ward et al, 1994**).

Le complexe hexamérique conduit à l'activation de 3 voies de signalisation : la voie des STAT (STAT1/STAT3), la voie des MAPK (Mitogen activated protein Kinases) et la voie de la PI3K/Akt (Phosphatidyl Inositol 3 kinase / protéine kinase B) (**Figure.06**). Le facteur STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) assurant l'essentiel de la signalisation de l'IL-6 est le facteur STAT3 (**Reich et Liu, 2006**).

Les différentes voies de signalisation activent la transcription de leurs gènes cibles après migration dans le noyau (**Vallières et Rivest, 2000**). Parmi ces gènes on distingue par exemple celui de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B cell lymphoma 2), du MMP9 (Métalloprotéinases 9) impliqué dans l'invasion tissulaire et du VEGF favorisant l'angiogenèse qui sont régulés par la voie STAT3 (**Bhattacharya et al, 2005 ; Chen et al, 2015**).

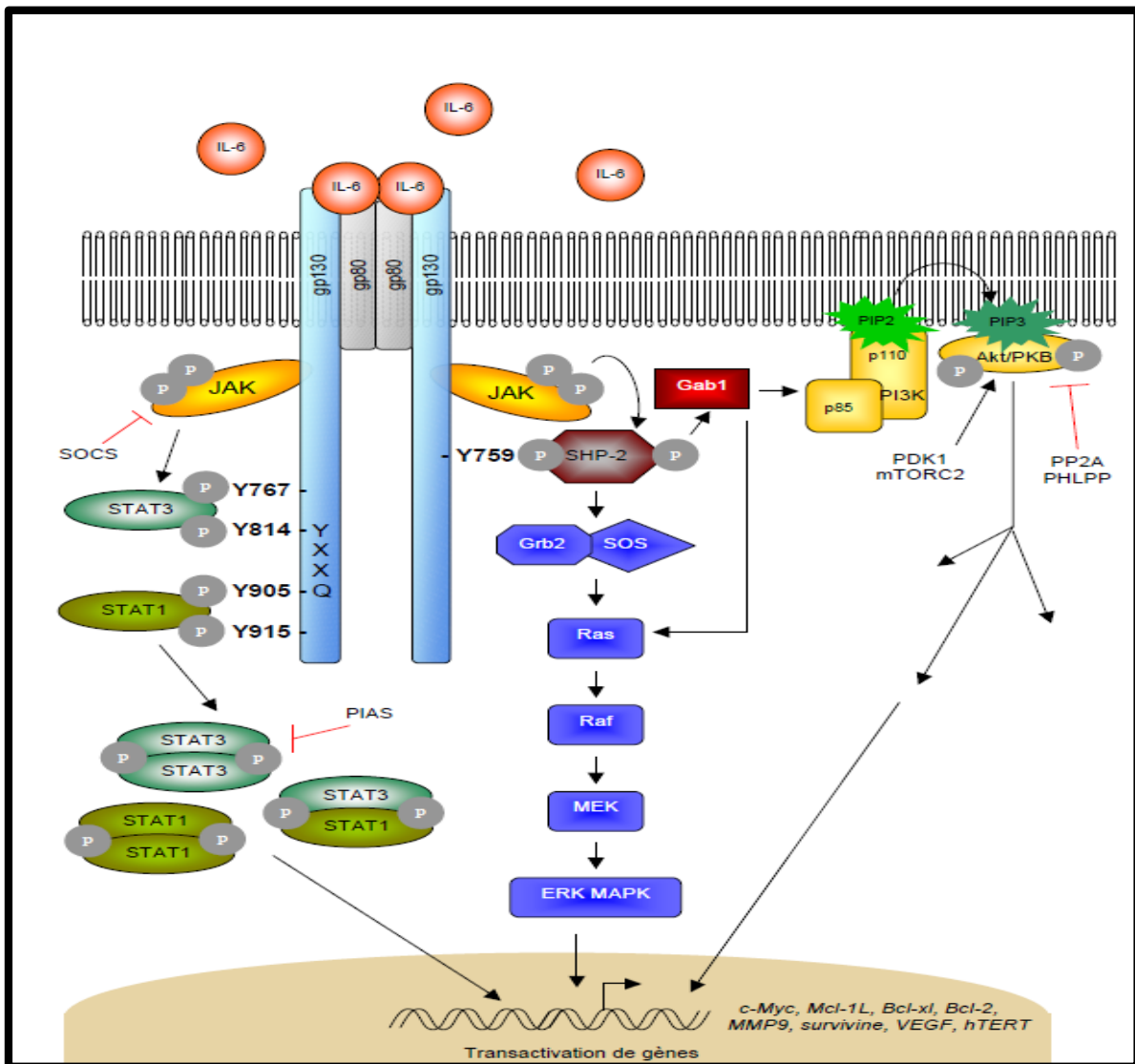


Figure.06 : Voie de signalisation de l'IL-6 (Nicholson et Anderson, 2002 ; Heinrich et al, 2003 ; Kamimura et al, 2003).

- IL-17-A :** c'est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée essentiellement par les Th17 et d'autres cellules telles que les lymphocytes $T\gamma\delta$. Elle appartient à la famille de l'IL-17 qui comprend 5 autres cytokines (IL-17 B, C, D, E, F) ayant un haut degré d'homologie structurale : l'extrémité C –terminale est la même et la région N-terminal est différente (Reynolds et al, 2010 ; Jin et Dong, 2013). Bien qu'étant toutes pro- inflammatoires, elles peuvent différer par leurs actions biologiques, leur origine cellulaire et le type de la réaction immunitaire induite. L'IL-17A est signe d'une réponse immunitaire T helper (Th) de type Th17 (Fort et al, 2001 ; Hurst et al, 2002 ; Kolios et Linden, 2004). Elle est impliquée fortement dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques, en amplifiant les réponses inflammatoires induites par le $TNF-\alpha$ et l'IL-1 β (Katz et al, 2001). L'IL-17 est une glycoprotéine homodimérique de 20-30 kDa. La liaison de l'IL-17 à son récepteur

(IL-17R) entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Cette activation permet principalement le recrutement des molécules TRAF6 (Facteur 6 associé au récepteur du TNF) et aboutit à l'activation du facteur NF- κ B et AP-1 (protéine activatrice 1) (**Figure.07**). Deux autres voies responsables de l'activation du facteur de transcription AP-1 peuvent être activées (p38, ERK : Extracellular signal Regulated Kinase) (**Figure.07**). La liaison de l'IL-17 à son récepteur peut activer également la voie JAK/STAT (JAK1, JAK2, STAT1) (**Figure.07**). L'IL-17A induit l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires tels que : l'IL-6 (**Katz et al, 2001**) et l'iNOS (NO synthase inducible) (**Miljkovic et Trajkovic, 2004 ; Reynolds et al, 2010 ; Jin et Dong, 2013 ; Rafa et al, 2013**).

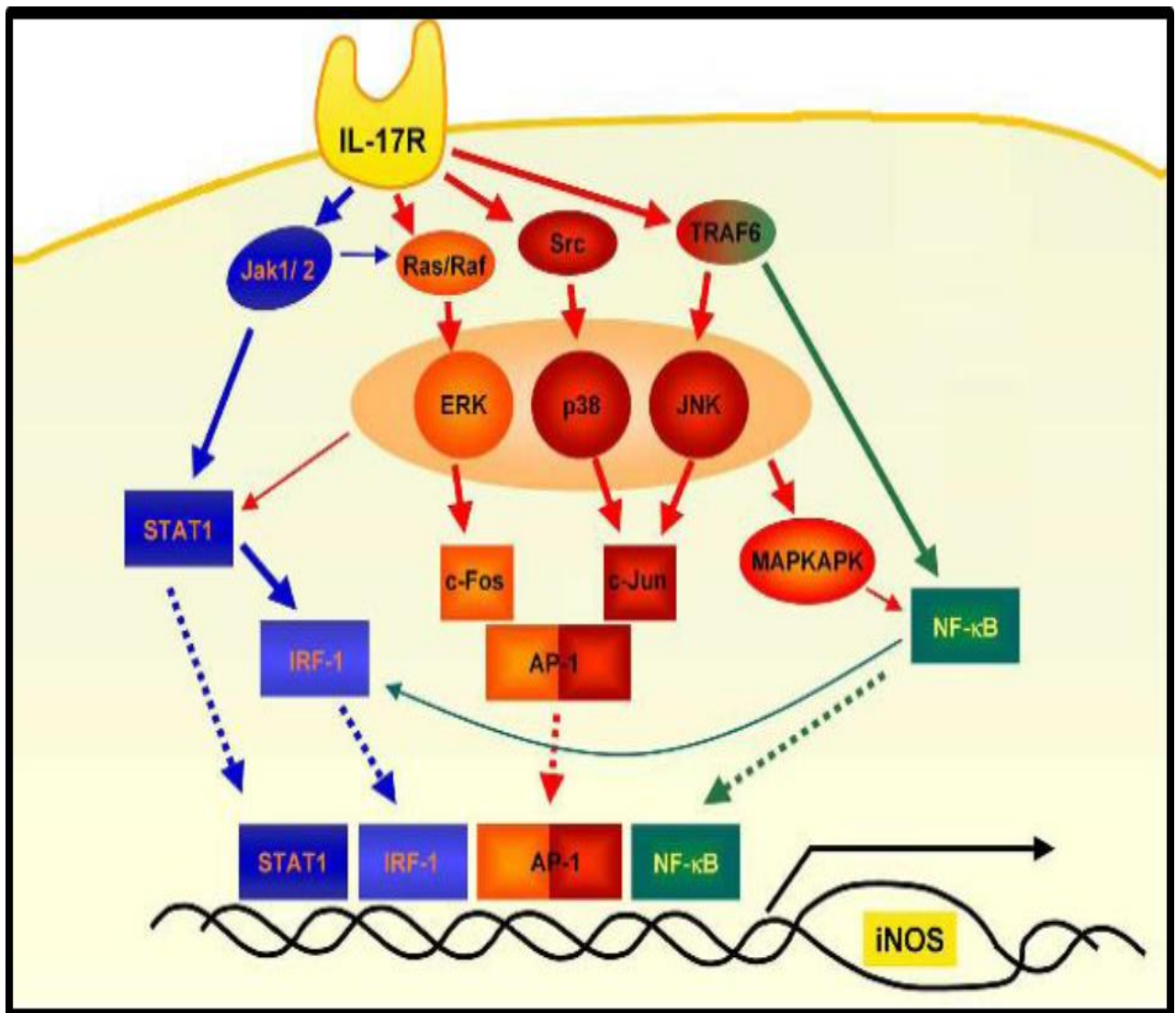


Figure.07 : Voies de transduction du signal de l'IL-17 (**Miljkovic et Trajkovic, 2004**).

- **Les cytokines immunorégulatrices (VoieTreg)**

- ✓ **IL-10** : elle est induite majoritairement par les cellules Treg. L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice sécrétée par plusieurs autres types cellulaires : les lymphocytes B, les monocytes/ macrophages, les keratinocytes et les cellules tumorales. Les propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires de cette cytokine sont liées essentiellement à ses effet sur les monocytes/macrophages en inhibant leur synthèse de cytokines proinflammatoires : IL-1 β , TNF- α et IL-6, de radicaux oxygénés et nitrates (le monoxyde d'azote (NO). L'inhibition de ce dernier radical se fait indirectement par l'inhibition de la transcription de la NO synthase inducible. L'IL-10 pourrait également inhiber l'expression des molécules de classe II du CMH. STAT3 est nécessaire pour les fonctions inhibitrices de cette cytokine (Gotlieb et al, 1992 ; Howard et O'Garra ; 1992 ; De Waal Malefyt et al, 1992 ; Mosser et Zhang, 2008).
- ✓ **TGF β** : le facteur bêta de croissance et de transformation est produit par les lymphocytes T activés, les phagocytes mononucléaires et de nombreux autres types de cellules. C'est, avant tout, une cytokine inhibitrice qui agit d'une manière autocrine et paracrine. Il inhibe la prolifération et la différenciation des cellules T auto-réactives (T CD4⁺ et T CD8⁺), l'activation des macrophages et bloque les effets des cytokines pro-inflammatoires. Il maintient la survie des lymphocytes Treg naturels (nTreg). En combinaison avec L'IL-2 et l'acide rétinoïque (RA), il induit la différenciation des Th0 en iTreg. Cependant, dans un environnement inflammatoire, en présence par exemple de l'IL-6, le TGF β induit la différenciation des Th0 en Th17. Il orchestre la différenciation des cellules Treg et Th17 d'une manière dépendante de la concentration (Clarck et Coker, 1998 ; Abbas et Lichtman, 2009 ; Sanjabi et al, 2009).

II.3.2 Le NO

A température ambiante, le NO est une molécule gazeuse biatomique et non chargée. Sa solubilité dans l'eau est de l'ordre de celle de l'oxygène et du monoxyde de carbone Co. Il est soluble dans les milieux polaires et apolaires ce qui lui confère un grand pouvoir de traverser les membranes biologiques et de se diffuser d'une cellule à une autre. Il constitue ainsi un messager paracrine idéal. C'est également un radical libre car une de ses orbitales externes contient un électron non apparié. Le monoxyde d'azote est la plus petite biomolécule

(30 Da). Il a une demi-vie très courte (6 s). Il est produit par une variété de cellules et a plusieurs cibles cellulaires. Il a une action pléiotropique. Il régule de nombreuses réponses physiologiques et physiopathologiques telles que : la vasodilatation, la neurotransmission et la modulation de la réponse immuno-inflammatoire (**Sennequier et Vadon Le Goff, 1998 ; Touil-Boukoffa et al, 1998 ; Coleman, 2001 ; Korhonen et al, 2005 ; Sharma et al, 2007**).

II.3.2.1 Réactivité chimique du NO

Le NO peut réagir avec plusieurs molécules. L'une de ses réactions les plus importantes est sa capacité d'interagir avec l'oxygène moléculaire ou ses dérivés (tels que l'anion superoxyde O_2^-). Les produits de ses réactions sont des molécules azotées très réactives et très hétérogènes telles que le peroxydinitrite $ONOO^-$ ou le dioxyde d'azote NO_2 qui induisent l'oxydation des lipides (peroxydation), des protéines et des acides nucléiques, ce qui résulterait en l'altération de l'ADN, l'apoptose et la nécrose cellulaire. Cette cytotoxicité serait à l'origine de l'évolution d'un certain nombre de pathologies. Le NO peut réagir également avec les groupements thiols (SH) portés par plusieurs protéines, pour former des groupements thionitrites ou S-nitrosothiols (S-NO). Ces nitrosylations modifient l'activité de plusieurs protéines impliquées dans des mécanismes de régulations cellulaires. Une autre caractéristique du NO est sa capacité de se fixer sur des métaux (tels que le fer, le cuivre et le zinc) présents au niveau des groupements prosthétiques de nombreuses enzymes et protéines. C'est par ce mécanisme que le NO régulerait l'activité de ces dernières (**Korhonen et al, 2005**).

II.3.2.2 Biosynthèse du NO

La plus importante voie de production du NO chez les organismes supérieurs, est la voie enzymatique par les NO synthases (NOS) qui se fait en deux étapes. Dans un premier temps, les NOS catalysent l'hydroxylation d'un atome d'azote du groupement guanidine de leur substrat (L-arginine), donnant naissance à la NOHA (N^G -hydroxy-L-arginine). La NOHA est alors à son tour oxydée en NO et L-citrulline (**Figure.02 de l'Annexe 02**). Ces réactions nécessitent la présence de co-substrats (l'oxygène moléculaire et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite : NADPH) et de co-facteurs tels que : la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la tétrahydrobiopérrine (BH_4) et l'hème (protoporphyrine IX de fer) (**Figure.02 de l'Annexe 02**). Lorsque l'apport en oxygène est limité, le NO peut également être produit par la réduction des nitrites et des nitrates sous l'action des nitrites et des nitrates réductases présentes à différents niveaux de

l'organisme (Sennequier et Vadon Le Goff, 1998 ; Lundberg et al, 2008 ; Förstermann et Sessa, 2012).

II.3.2.3 Les NOS

Les NOS (EC.1.14.13.39) est une protéine homodimérique comprenant deux domaines, un ayant une fonction réductase (en C- terminal) et un autre ayant une fonction oxygénase (en N-terminal) (**Figure.08**). Sur le plan moléculaire, il existe trois isoformes de la NOS qui exercent la même réaction catalytique mais diffèrent dans la localisation de leurs gènes, leur distribution cellulaire et leur mode de régulation (Marletta, 1993 ; Bogdan, 1998 ; Sennequier et Vadon Le Goff, 1998).

- **Les NOS neuronales (NOS1, NOSI ou nNOS)** qui sont majoritairement exprimées au niveau des neurones, du cerveau et du système nerveux périphérique.
- **Les NOS inductibles (NOS2, NOSII ou iNOS)** qui sont exprimés au niveau des tissus et des cellules inflammatoires telles que les monocytes / macrophages.
- **Les NOS endothéliales (NOS3, NOSIII ou eNOS)** qui sont principalement exprimées au niveau des cellules endothéliales (Korhonen et al, 2005).

Ces trois NOS sont codées par différents gènes localisés respectivement sur les chromosomes 12,17 et 7 (Tripathi et al, 2007).

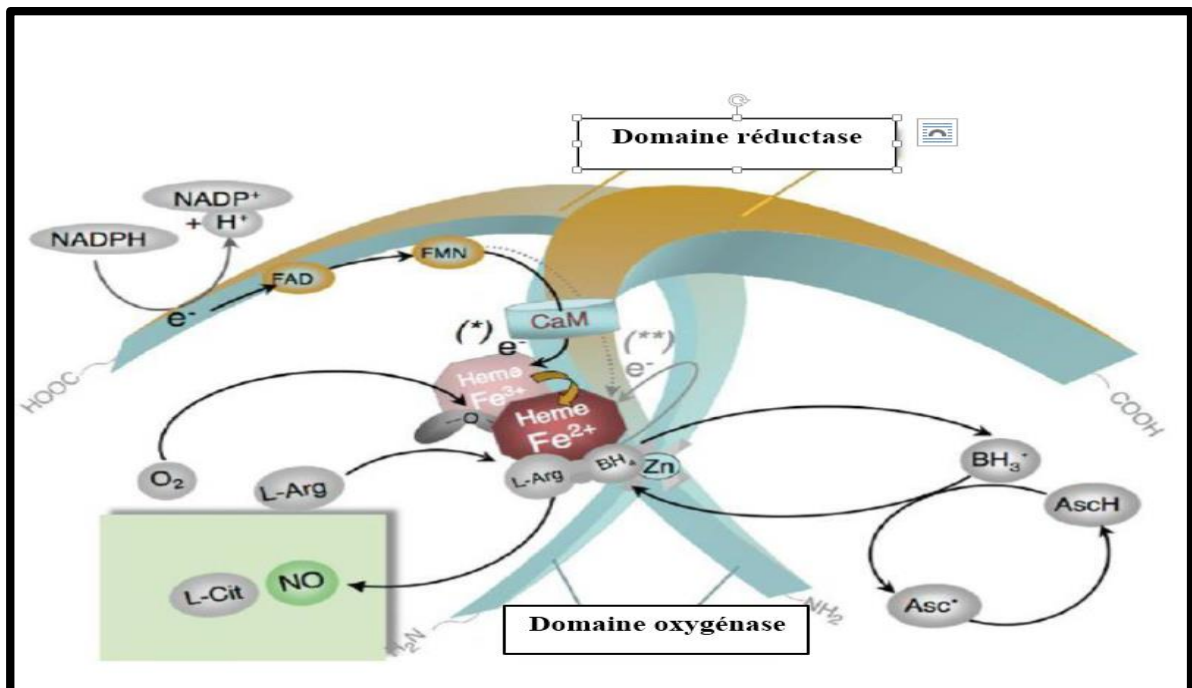


Figure.08 : Synthèse du NO par les NOS (Förstermann et Sessa, 2012).

II.3.2.4 Les cellules productrices de NO

Le NO est produit par de véritables cellules immunitaires telles que : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules tueuses naturelles (NK), les mastocytes, les microglies, les cellules de kupffer, les éosinophiles et les neutrophiles. Il est également produit par des cellules impliquées dans les réactions immunitaires mais n'appartenant pas au système immunitaire classique telles que : les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les fibroblastes, les kératinocytes, les chondrocytes, les hépatocytes, les cellules mésangiales et les cellules de Schwann (**Tripathi et al, 2007**).

II.3.2.5 Régulation des NOS

Des modifications post- traductionnelles modulent l'activité catalytique de la NOS constitutive (NOS1 et NOS3). La NOS inductible (NOS2) étant régulée au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel (**Pautz et al, 2010 ; Rafikov et al, 2011**).

- **Le substrat :** la L-arginine est le substrat des NOS. Sa biodisponibilité est donc indispensable à la synthèse du NO. L'apport en substrat pourrait influencer l'activité de la NOS. En absence ou en présence de faible concentration de L-arginine, les NOS peuvent produire des ions superoxyde O_2^- et du peroxyde d'hydrogène à la place du NO, par transfert d'électrons du NADPH à l' O_2 via l'hème (Découplage). En présence d'une concentration saturante de la L-arginine, la vitesse d'oxydation du NADPH diminue d'un facteur de 2 à 3 pour la NOS1 contre une augmentation d'un facteur de 4 à 6 pour la NOS2 (**Heinzel et al, 1992 ; Sennequier et Vadon Le Goff, 1998**).
- **L'autorégulation :** les NOS peuvent également être rétro-inhibées par leur produit, le NO. En effet, le NO se fixe sur l'hème de ces enzymes et bloque leurs différentes réactions catalytiques. La NOS peut subir simultanément la synthèse du NO et la formation du complexe ferreux- nitrosyl pendant la phase stable de la catalyse. La synthèse du NO requiert le fer sous forme ferrique, la formation du complexe ferreux-nitrosyl rend la NOS catalytiquement inactive. De plus, le NO inhibe la production de L'IL-1 par les macrophages, ce qui peut représenter une boucle d'autorégulation (**Chujor et al, 1996 ; Stuehr, 1997 ; Gautier et al, 2004**).
- **Le couplage à la calmoduline :** la NOS constitutive (NOS1 et 3) est en effet active qu'après couplage à la calmoduline, qui intervient comme interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme. L'activité de ces deux isoformes est donc régulée par la concentration du milieu en calcium qui règle le couplage de la calmoduline. L'activité de

la NOS2 est en revanche indépendante des ions calcium, car cette isoforme est fortement couplée à la calmoduline (**Sennequier et Vadon Le Goff, 1998**).

- **L'Arginase** : l'arginase 1 et 2 sont des enzymes impliquées dans le cycle de l'urée qui transforment la L-arginine en urée et L-ornithine. Cette dernière peut à son tour donner naissance à différents composants dont la L-citrulline qui est recyclée en L-arginine. La NOHA est un inhibiteur de l'arginase. Il pourrait donc exister une régulation croisée des deux systèmes métabolisant la L-arginine : la NOS et l'arginase (**Boucher et al, 1994 ; Durante et al, 2007 ; Morris, 2009**).
- **Les cytokines** : la NOS2 est régulée essentiellement au niveau de la transcription de son gène. Son expression et sa fonction sont en grande partie associées aux réponses immunitaires et inflammatoires. En effet, elle est induite par plusieurs cytokines et motifs bactériens qui agissent en synergie : LPS/ IFN γ , TNF α /IFN γ , IL-1/ TNF α ou IFN γ (**Drapier et al, 1988 ; Geller et Billiar 1998 ; Rafa, 2013, Soufli et al, 2016**).

Au niveau de certains types cellulaires, l'IL-17 a joué le rôle d'inducteur de la NOS2 (**Miljkovic et Trajkovic, 2004**). Cette dernière est inhibée par certaines cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-13), des cytokines immunorégulatrices (IL-10 et TGF- β) et des facteurs de croissances (PDGF : Platelet Derived Growth Factor) (**Bogdan et Nathan, 1993**).

Il a été admis que les facteurs de transcription NF- κ B, STAT1, STAT3 et IRF1-8 régulaient l'expression du gène de la NOS2 (**Faure et al, 1999 ; Xiong et al, 2003 ; Dawn et al, 2004 ; Ziesché et al, 2007**).

- **Le CD23** : il joue un rôle fonctionnel dans l'activation rapide des NOS inductibles dans les macrophages humains. Le complexe formé par la fixation des IgE sur le CD23 provoque la libération de médiateurs inflammatoires et essentiellement le NO. En effet, l'engagement du CD23 à la surface des macrophages par les complexes immuns à IgE, ou par des anticorps monoclonaux anti CD23 induit une destruction NO-dépendante des parasites intracellulaires. L'IL-4 inhibe cette voie de production *in vitro* et *in vivo* du NO (**Dugas et al, 1995 ; Eugène et al, 1995 ; Touil-Boukoffa et al, 1998**).

II.3.2.6 Fonction du NO

Le NO peut avoir plusieurs effets en fonction de sa concentration et de ses cibles moléculaires et /ou cellulaires (**Allione et al, 1999 ; Beltran et al, 2000**).

Ses différentes actions dépendent de sa concentration et de la durée de sa production. Physiologiquement, le NO est produit par les NOS constitutives à l'état de base tandis qu'il est produit en de larges quantités par les NOS inductibles (**Thomas et al, 2008**).

- **En physiologie** : le NO libéré à de faibles concentrations par les NOS constitutives, peut intervenir dans la signalisation intracellulaire (**Thomas et al, 2008**).

Le rôle du NO comme second messager a été observé dans de nombreux types cellulaires. Il stimule l'activité de la guanylate cyclase et augmente la production de la GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) qui est un médiateur important des fonctions physiologiques du NO (**Villanueva et Giulivi, 2010**). En effet, au niveau du système nerveux central et périphérique, le NO est impliqué dans le développement cérébral et l'acquisition de la mémoire en régulant la plasticité des synapses. Il intervient également dans la régulation de la libération des autres neurotransmetteurs tels que la dopamine, la noradrénaline et l'acétylcholine (**Almeida et al, 2001**).

Le NO intervient dans la régulation de l'homéostasie sanguine en agissant à la fois comme anticoagulant et comme vasodilatateur. Cette action s'exerce au niveau des plaquettes sanguines, des cellules endothéliales et musculaires. Au niveau des muscles cardiaques ou squelettiques, il intervient dans les processus d'activité (excitation-contraction), de respiration et de différenciation des myocytes (**Barouch et al, 2002 ; Ziolo et al, 2008**).

Le NO est également impliqué dans le maintien de l'intégrité de la barrière cutanée, la cicatrisation des plaies, la fonction rénale et la régulation du système de reproduction (**Stamler et Meissner, 2001 ; Cals-Grierson et Ormerod, 2004 ; Danson et al, 2005 ; Satriano et al, 2006**).

- **NO et système immunitaire** : le NO produit massivement par les NOS2 peut exercer indirectement ou directement des effets bactéricides, antiviraux, fongicides, antiparasitaires et antimoraux (apoptose). Une inhibition du NO conduit à l'exacerbation de nombreuses pathologies (**James, 1995 ; Fang, 1997 ; Rakhit et Marber, 2011**).
- **En physiopathologie** : le dérèglement de la production du NO a été observé dans de nombreuses pathologies. En effet, la diminution de sa concentration a été observée dans l'hypertension artérielle et le glaucome tandis que son augmentation a été observée dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et les

maladies neuro-dégénératives (**Barnes et al, 1998 ; Eliasson et al, 1999 ; Shareef et al, 1999 ; Ischiropoulos et Beckman, 2003 ; Warner et al, 2004 ; Szabo et al, 2007**).

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

Matériel

I. Matériel et Méthodes

I. 1 Matériel

I.1.1 Matériel biologique

I.1.1.1 Patients

Les patients faisant l'objet de notre étude ont été suivis au niveau de la clinique d'ophtalmologie du CHU Ibn Rochd-Annaba- Algérie.

Dans un premier volet, une enquête épidémiologique entreprise sur le ptérygion a été réalisée au sein de cet établissement pendant une période d'une année (du 1^{er} Janvier 2016 au 31 décembre 2016). Dans ce contexte, il a été inclus des patients (n=119) présentant un ptérygion unilatéral ou bilatéral de topographie généralement nasale, primitif, venant consulter pour une prise en charge chirurgicale.

Une autre partie de cette étude a consisté à l'évaluation *in vivo* de bio-médiateurs : le monoxyde d'azote (NO) et les cytokines (IL-17A, IL-6, IL-10), au niveau des sérums sanguins et des larmes de 43 patients (32 hommes et 11 femmes ayant une moyenne d'âge allant de 35 à 62 ans). Ces derniers manifestent pour la plupart des ptérygions unilatéraux. Cette étape a été réalisée parallèlement à une étude menée sur 43 sujets sains (témoins négatifs).

Des études histologiques et immuno-histochimiques portant sur le niveau d'expression des marqueurs suivants : CD3, CD20, CD68, Bcl-2, NOS2 et NF-κB ont été également réalisées sur les ptérygions et les conjonctives saines provenant respectivement de patients et de témoins opérés pour un strabisme. Il est à noter que les deux groupes considérés, ne présentent aucune maladie inflammatoire et /ou infectieuse. Des biopsies provenant de témoins positifs ont également fait l'objet de cette étude (patients atteints de conjonctivite et du syndrome de Gougerot– Sjögren). Les patients atteints de ptérygion et tous les témoins sont d'âges et de sexes identiques.

Nous avons été également amenés à doser d'autres paramètres sanguins (protéine C réactive ou CRP, la vitesse de sédimentation ou VS et les immunoglobulines : IgG, IgA et IgM) sur 16 patients et 16 sujets témoins sains. Ces derniers font partie de notre cohorte totale.

Il est très important de souligner que tous les sujets (patients et témoins) ayant participé à notre étude ont été consentants. Le consentement libre et éclairé obtenu est en conformité avec les lois de l'éthique établies par l'Agence Thématique de la Recherche en

Santé (ATRSS ex ANDRS). Ces dernières sont basées sur la déclaration universelle d'Helinski.

1.1.1.2 Les biopsies des ptérygions et des témoins

43 ptérygions et 43 conjonctives saines ont été obtenus chirurgicalement sous anesthésie locale.

En ce qui concerne les ptérygions, la technique opératoire utilisée s'est basée sur celle de **(Kenyon, et Tseng, 1989)**. L'intervention s'est déroulée sous microscope opératoire par excision des têtes et ensuite des corps des ptérygions, en passant par le repli semi lunaire. Il est à noter que les ptérygions envahissant la cornée et plus précisément la membrane de Bowman, ont été exclus de notre étude.

Concernant les biopsies de conjonctives normales (témoins négatifs), elles ont été obtenues lors d'interventions chirurgicales des yeux atteints de strabisme. Elles ont été prélevées au niveau de la conjonctive bulbaire **(Sami et al, 2007)**.

Concernant les témoins positifs, nous avons testé dans le même contexte, des pièces de tissus de conjonctivites avérées et de tissus de glandes salivaires labiales de patients atteints de syndrome de Gougerot– Sjögren, une pathologie auto-immune dont la thématique de recherche est développée au sein de notre équipe de recherche (Equipe Cytokines et NO Synthase, LBCM, USTHB) **(Benchabane et al, 2016 ; Benchabane et al, 2018)**.

Après excision, les biopsies ptérygiales, conjonctivales et de glandes salivaires ont été immédiatement fixées dans du formol à 10 % pour être utilisées ultérieurement dans le cadre de l'étude histologique et immunohistochimique.

1.1.1.3 Les échantillons sanguins

Deux types d'échantillons sanguins ont été obtenus à partir du sang des patients et des témoins sains (ayant uniquement un strabisme).

- **Les sérums**

Les sérums ont été collectés après centrifugation du sang total mis dans des tubes secs à 2000 tours /min pendant 10 min. Ils ont par la suite été conservés à -20°C, pour le dosage de la CRP, des immunoglobulines (IGA, IgG, IgM), du NO et des cytokines (IL-6, IL-17A, IL-10).

- **Les plasmas**

Le sang recueilli (2 ml pour chaque échantillon) pour l'évaluation de la VS a été mis dans des tubes en présence de citrate.

I.1.1.4 Les larmes

Les larmes reflexes ont été obtenues après avoir exposé l'œil malade (avec un ptérygion) et l'œil normal d'un témoin sain à une source lumineuse éblouissante. Les larmes ont été par la suite collectées grâce à l'utilisation de pipettes Pasteur, préalablement stérilisées. La vigilance est requise et ce, pour ne pas altérer la cornée et la conjonctive. Les larmes sont ensuite mises dans des tubes Eppendorf stériles. Elles ont été conservées à -70°C pour le dosage ultérieure des cytokines (IL-6, IL-17A, IL-10) et du NO (**Jones et al, 1997**).

I.1.1.5 La souche bactérienne ATCC 8062

Nous avons utilisé dans notre étude, la souche bactérienne *Pseudomonas oleovorans*. Elle est caractérisée par la propriété biochimique nitrate réductase (+). Elle réduit les nitrates en nitrites lors du dosage du NO dans les échantillons. Elle nous a été fournie par le **Dr J. C. Drapier** ; Directeur d'une unité CNRS : Biosynthèse du monoxyde d'azote : Signalisation, GIF sur Yvette- Paris.

I.1.1.6 Les anticorps utilisés

Anti-CD3, anti-CD20, anti-CD68, anti -Bcl-2, anti-NOS2, anti-NF-κB, anti-CRP, anti-IgA, anti-IgG et anti-IgM. La provenance de chaque anticorps a été évoquée dans les paragraphes ci-dessous.

I.1.2 Les réactifs

Les réactifs utilisés dans notre étude sont fournis par Sigma Aldrich, Dako, Santa Cruz (Biotechnologies), Life technologies (Invitrogen et Fisher Thermo Scientific) et Diagnostics Systems.

Méthodes

I.2 Méthodes

I.2.1 Démarche expérimentale

Notre démarche expérimentale a été synthétisée dans un schéma récapitulatif (**Figure.09**). Les détails de chaque étude réalisée ont été mentionnés dans les paragraphes ci-dessous.

I.2.2 Enquête épidémiologique

Une enquête épidémiologique sur le ptérygion a été menée sur une durée d'une année (du 1^{er} Janvier 2016 au 31 décembre 2016). Elle a porté sur tous les patients ayant consulté à la clinique d'ophtalmologie du CHU Ibn Rochd-Annaba-Algérie, pour être par la suite opérés (n=119).

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la fréquence de cette maladie et ce, par rapport aux autres pathologies ophtalmologiques (n'=3215) et à sa répartition selon les critères suivants : le sexe, l'âge et la profession du malade. Il est important de signaler que le service d'ophtalmologie du CHU Ibn Rochd, prend en charge, les pathologies ophtalmologiques médico-chirurgicales de la Wilaya d'Annaba ainsi que les Wilayas limitrophes de l'Est Algérien, en particulier Guelma, El Tarf, Souk Ahras, Skikda et Tébessa.

I.2.3 Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au service d'anatomopathologie de l'hôpital Ibn Rochd-Annaba-Algérie, par la méthode d'hématoxyline-éosine selon les étapes suivantes :

- **La fixation** : les biopsies ptérygiales et les conjonctives normales (témoins) ont été fixées dans du formol à 10%, pendant 24 h et à température ambiante. Le but de cette fixation est le maintien des différentes structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.
- **La déshydratation** : cette étape assure l'élimination de l'eau des tissus et les préparer à l'inclusion. Elle consiste au passage des biopsies dans différents bains d'alcool de concentrations croissantes 70°, 80°, 90° et 100°.
- **L'inclusion** : les tissus sont plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Ces tissus imbibés de paraffine sont alors mis dans un moule de paraffine fondue (Barre de Leuckart) qui se solidifie en blocs en se refroidissant (l'enrobage).

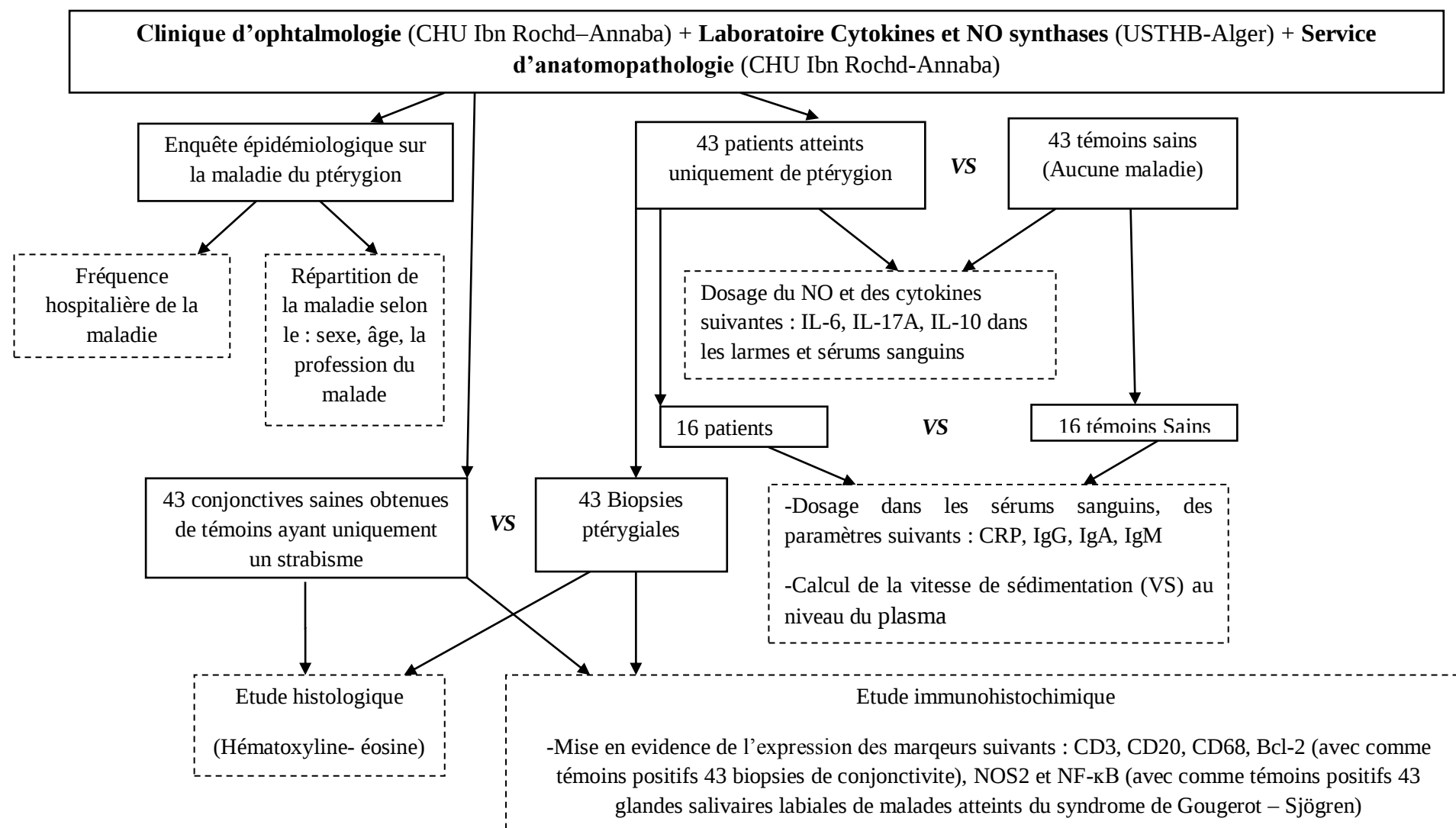


Figure.09 : Démarche expérimentale.

- **La confection des coupes** : à partir de ces blocs, sont réalisés à l'aide d'un microtome, des coupes fines de quelques micromètres de diamètres (3µm en moyenne). Ces coupes sont alors mises sur des lames porte-objet. Elles seront posées par la suite sur une plaque chauffante qui permettra leur étalement et leur fixation sur la lame.
- **La coloration** : les coupes seront colorées par l'hématoxyline de Mayer (le noyau sera coloré en bleu violacé) et l'éosine (le cytoplasme sera coloré en rouge ou rose).
- **Le montage** : le montage des tissus entre lame et lamelle est réalisé à l'aide de l'Eukitt (Houlot, 1984 ; Wheeler et al, 2001).
- **L'observation au microscope** : les images sont prises au moyen d'un microscope photonique (LEICA) avec un appareil photographique intégré. Les photos sont prises au grossissement X 100 et X 250.

I.2.4 Etude immunohistochimique

L'immunohistochimie est basée sur la reconnaissance au niveau du tissu étudié, d'un épitope, d'une protéine cible (antigène) par un anticorps très spécifique. Les sites de liaison de cet anticorps (dit anticorps primaire), sont ensuite révélés par un second anticorps (anticorps secondaire) marqué d'un substrat chromogène. Une enzyme conjuguée à ce dernier anticorps, clive le substrat pour produire un précipité de couleur à l'emplacement de l'épitope (Owen et al, 2014).

Notre étude immunohistochimique a été réalisée au service d'anatomopathologie de l'hôpital Ibn Rochd Annaba- Algérie et au niveau du Laboratoire Cytokines et NO Synthase- USTHB- Alger-Algérie. Elle a pour but de mettre en évidence l'expression des marqueurs suivants : CD3, CD20, CD68, Bcl-2, NOS2 et NF-κB, au niveau des coupes de ptérygion considérées, des conjonctives saines «témoins négatifs» ainsi que des témoins positifs (biopsies de conjonctivites pour les marqueurs suivants : CD3, CD20, CD68 et Bcl-2) et (biopsies de glandes salivaires labiales de malades atteints du syndrome de Gougerot – Sjögren pour la NOS2 et le NF-κB) fixées dans du formol à 10%. Les étapes 'clé' de cette étude sont les suivantes :

Après inclusion des ptérygions, des conjonctives saines (témoins négatifs) et des biopsies de conjonctivites et des glandes salivaires labiales de malades atteints du syndrome de Gougerot – Sjögren (témoins positifs) et la confection de blocs, des coupes fines de ces tissus ont été réalisées à l'aide d'un microtome (3µm d'épaisseur). Cette étape est succédée par le déparaffinage de ces coupes dans des bains de xylène. Ces dernières sont ensuite réhydratées en plongeant les lames dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes.

Le démasquage des antigènes a été effectué en plongeant les lames dans des bacs de solution de démasquage (DAKO). Le tout a été mis dans un bain marie pendant 40 min à 96°C. Après refroidissement et lavage au PBS- Tween (0,05%), une étape de blocage des peroxydases endogènes est entreprise par incubation des lames dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% pendant 20 min. Une incubation ultérieure pendant une nuit dans une solution contenant 3% de lait écrémé a été entreprise afin de bloquer les sites d'attache non spécifiques des anticorps primaires.

L'incubation des lames avec les anticorps primaires a été réalisée comme suit : L'anti-CD3 (anticorps monoclonal de dilution 1 : 25 - 1 : 50, DAKO), l'anti-CD20 (anticorps monoclonal de dilution 1 : 200, DAKO), l'anti-CD68 (anticorps monoclonal de dilution 1 : 50 - 1 : 100, DAKO) et l'anti-Bcl-2 (anticorps monoclonal de dilution 1 : 50 - 1 : 100, DAKO) ont été appliqués une heure à température ambiante.

En vue de mettre en évidence l'expression de la NOS2 et du NF-κB, les lames ont été incubées respectivement, avec l'anti-NOS2 (anticorps polyclonal de lapins de dilution 1 : 500, Santa Cruz, Biotechnologies, USA) et l'anti-NF-κB / p65 (anticorps polyclonal de lapins de dilution 1 : 100, Santa Cruz, Biotechnologies, USA) dans une chambre humide, pendant une nuit à 4°C. Cette étape d'incubation des lames en présence des anticorps primaires est suivie de leur incubation avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase de chevaux, DAKO) puis avec le DAB chromogène (3, 3' diaminobenzidine). Les coupes ont été contre colorées avec l'hématoxyline de Mayer. Le montage lames- lamelles a été effectué en imbibant les lames de faramount (DAKO) (**Labsi et al, 2016**). La visualisation des coupes a été réalisée grâce au microscope (LEICA) avec un appareil photo intégré et avec un grossissement de X 400.

En plus de l'étude épidémiologique, histologique et immunohistochimique, plusieurs autres paramètres ont été mesurés au niveau des sérums, des plasmas ainsi que des larmes des patients et des témoins sains. La majorité de ces paramètres ont été quantifiés au niveau du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, de l'équipe «Cytokines et NO Synthases» de l'USTHB- Alger.

1.2.5 Dosage de la protéine C réactive (CRP)

La CRP est une glycoprotéine de masse moléculaire de 120000 Da. Elle a la propriété de précipiter au contact du polysaccharide C du pneumocoque. C'est un marqueur très précoce de l'inflammation (marqueur de l'inflammation aigue) (**Ribeiro, 1997**). Elle est synthétisée par le foie (**Honsawek et al, 2011**). Elle s'élève dans les heures (2 à 4 heures) qui

suivent le processus inflammatoire (**Zimmermann et al, 2014**). L'IL6 joue un rôle déterminant dans sa synthèse et sa régulation (**Honsawek et al, 2011**). Il en est l'inducteur principal. Son action nécessite une synergie avec d'autres inducteurs tels que l'IL-1 β ou certaines fractions du complément. Le gène de la CRP est situé sur le chromosome 1. Dans le promoteur de ce gène on trouve des sites de liaisons de facteurs de transcriptions sensibles aux cytokines (NF- κ B.) (**Beaudeau et Durand 2008**). Son taux normal est < 6 mg/l (**Bakhoun, 2016**).

Dans notre étude, le dosage de la CRP a été réalisé sur un volume de 15 μ l de sérums (tubes secs) des patients (n=16) et des témoins sains (n=16) grâce à un automate le 'AU480', selon la méthode de l'immuno-turbidimétrie et suivant les recommandations de la firme Diagnostic Systems (France). Le principe de cette technique est basé sur la réaction anticorps-antigène spécifique (anticorps monoclonal (chèvre) anti-CRP humaine-CRP humaine) qui forme un précipité en milieu liquide (sérums sanguins). L'addition au préalable du PEG (Polyéthylène Glycol) permet d'accélérer, de stabiliser cette réaction et d'abaisser le seuil de détection. Un rayon lumineux émis par l'automate traverse les tubes contenant les éventuels complexes immuns précipités. Ces agrégats peuvent alors diffuser la lumière incidente suivant le même axe de propagation. Le turbidimètre AU480 mesure alors l'intensité de la lumière transmise qui est évidemment en fonction de la concentration en CRP contenue dans les échantillons. Les densités optiques sont mesurées à la longueur d'onde de 340 nm. La concentration de la CRP (mg/l) des échantillons à doser est calculée à partir d'une courbe de calibration réalisée à partir de différents niveaux de concentrations de Trulab-CRP (Diagnostic Systems). Le seuil de sensibilité de cette technique de dosage est de 2 mg /l.

I.2.6 Calcul de la vitesse de sédimentation (VS)

La VS est la vitesse à laquelle les globules rouges se séparent du plasma et se déposent au fond d'un tube à essai posé verticalement pendant un temps donné (1heure) (**Larousse, 2006**). La mesure de la VS constitue un examen biologique de routine. En dépit de son imprécision, il conserve un intérêt certain dans le diagnostic de nombreuses affections et dans la surveillance des maladies inflammatoires. Dans ce dernier cas en effet, elle reflète généralement assez bien, l'évolution de la maladie et l'intensité du processus inflammatoire (**Weill et Batteux, 2003 ; Larousse, 2006**). Cette mesure est complétée souvent par le dosage d'autres protéines de l'inflammation : La CRP, fibrine, α_2 globuline... (**Larousse, 2006**).

Dans notre étude, la VS a été mesurée selon la méthode de Westergren (**Rasolonjatovo et al, 2014**). Après collecte du sang veineux des patients et des témoins sains dans un tube avec anticoagulant (citrate trisodique à 3,8%), le sang recueilli (2ml), est ensuite déposé dans un tube de Westergren, rigoureusement standardisé, gradué de 0 à 200 mm avec un diamètre intérieur calibré à 2,5 mm et ouvert aux deux extrémités. Ce tube sera posé sur un dispositif spécial pour le maintenir en position verticale durant le temps de mesure. La lecture (mm) se fera seulement au bout de la première heure. Il est inutile de mesurer la VS à la deuxième heure car elle n'apporte aucune information supplémentaire. Cependant, elle peut permettre de rétablir une erreur de lecture de la première heure (**Rasolonjatovo et al, 2014**).

Les valeurs normales de la VS sont :

Homme jeune avant 50 ans : < 15 mm, Homme âgé après 50 ans : < 20 mm

Femme jeune avant 50 ans : < 20 mm, Femme âgée après 50 ans : < 25 mm (**Bakhoun, 2006**).

I.2.7 Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)

Les classes d'immunoglobulines humaines forment un groupe de glycoprotéines étroitement apparentées en fonction et structure. Elles sont constituées d'unités structurales monomériques comportant deux moitiés identiques composées chacune d'une chaîne légère (Kappa ou Lamda) et d'une chaîne lourde reliées par un ou plusieurs ponts disulfures. Selon la nature des chaînes lourdes, on distingue les classes suivantes : IgG (chaîne lourde gamma), IgA (chaîne lourde alpha), IgM (chaîne lourde Mu). Les monomères peuvent ensuite s'assembler en dimères, pentamères... (**Gaw et al, 2004**).

Dans notre étude le dosage des immunoglobulines (anti-IgG ou anti-IgA ou anti-IgM) a été réalisé par la méthode de l'immuno-turbidimétrie sur les sérums des patients ainsi que sur ceux des témoins sains (2µl). Comme il a été rapporté pour le dosage de la CRP, cette méthode repose sur la mesure photométrique selon la méthode décrite ci-dessus, utilisant l'automate AU 480 ; en suivant les recommandations de la firme Diagnostic-Systems, d'une réaction antigène-anticorps. Les densités optiques sont lues à une longueur d'onde de 570 nm (pour l'IgG et l'IgA) et à 415 ou 700 nm pour l'IgM (bichromatique). Les concentrations des immunoglobulines à doser sont calculées à partir d'une courbe étalon en utilisant différents niveaux de concentration d'un calibrant le «Trulab protein» de Diagnostic Systems. Elles sont exprimées en g/l. Le seuil de sensibilité de cette méthode est de 0.08 g/l pour l'IgG et l'IgA. Il est de 0,03 g/l pour l'IgM.

Les valeurs sériques normales chez l'adulte et l'adolescent sont les suivantes :

IgG : 7 à 16 g/l (700-1600 mg/dl ou 46,9-107 µmol/l).

IgA : 0.7 à 4 g/l (70 à 400 mg/dl ou 4,38-25 µmol/l).

IgM : 0,4 à 2,3 g/l (40 à 230 mg/dl ou 0,41-2,37 µmol/l) (Cebra, 2007 ; Samama, 2012).

I.2.8 Dosage des cytokines (IL-17A, IL-6, IL-10)

Le dosage des cytokines IL-17A, IL-6 et IL-10 a été effectué au niveau des sérums et des larmes des patients et des témoins sains selon les recommandations d'Invitrogen-Life Technologies. Brièvement, les concentrations de ces différentes cytokines ont été mesurées par la technique immunoenzymatique de l'ELISA sandwich (ELISA : Enzyme Immunosorbent assay). Cette technique est basée sur la double capture de l'antigène par deux anticorps spécifiques (Owen et al, 2014).

Dans les puits de plaques de microtitration, les échantillons à doser ou les standards ont été incubés avec un premier anticorps monoclonal anti-IL-17A ou anti-IL-6 ou anti-IL-10. Celui-ci va se fixer à un deuxième anticorps anti- immunoglobuline (IL-17A ou IL-6 ou IL-10) couplé à la peroxydase. L'activité enzymatique sera alors révélée par le substrat chromogène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en cytokines présentes dans les échantillons ou les standards.

Les densités optiques ont été mesurées à la longueur d'onde $\lambda = 450$ nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (LABSYSTEM). Les concentrations des cytokines (pg /ml) ont été déterminées par extrapolation sur les courbes standards établies au préalable. Les seuils de

sensibilité de cette méthode de dosage ont été de < 2 pg/ml pour l'IL-17A et < 1 pg/ml pour l'IL-6 et l'IL-10 (**Benchabane et al, 2016 ; Soufli et al, 2016**).

I.2.9 Dosage du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est une molécule très délicate à doser, du fait de sa demi-vie très courte. En effet, la détermination de ses concentrations dans un échantillon donné est effectuée par la méthode de Griess modifiée, par la quantification de ses métabolites stables (les nitrites et les nitrates) (**Touil-Boukoffa et al, 1998**).

Dans notre étude, nous avons mesuré les concentrations du NO dans les sérums et les larmes des patients en comparaison à des témoins sains. Selon la méthode préalablement citée, une souche *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062) nitrate réductase a été incubée avec les échantillons à doser. Les nitrates sont alors réduits en nitrites. Les concentrations en nitrites totaux (μM) correspondent alors aux concentrations du NO.

Pour mesurer ces dernières, il a été rajouté, à 100 μl de chaque échantillon à doser, le réactif de Griess modifié (Griess A + Griess B : Naphtyl-éthylène diamine dichloride à 0,5% dans HCl à 20% + Sulfamide à 5% dans du HCl à 20%). On incube le mélange dans l'obscurité pendant 20 min à température ambiante. On obtient alors, une coloration rose plus ou moins intense et ce, suivant la concentration en nitrites.

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 543 nm par spectrophotomètre (Pharmacia). Les concentrations sont obtenues à partir d'une courbe étalon établie préalablement avec une série de dilutions préparées à partir d'une solution mère de Na NO_2 à 0,1 mM (**Touil-Boukoffa et al, 1998**).

I.2.10 Etude statistique

La comparaison de deux moyennes a été évaluée par le Test T de Student. Pour cela, il a été utilisé le logiciel statistique Minitab16. Les différences entre les deux groupes (patients et témoins) ont été considérées comme significatives lorsque $p \leq 0,05$.

Résultats et Discussion

Résultats

II. Résultats et Discussion

II.1 Résultats

II.1.1 Enquête épidémiologique

II.1.1.1 La fréquence hospitalière

Sur 3215 patients hospitalisés à la clinique d'ophtalmologie d'Annaba, durant toute l'année 2016, 119 cas atteints de ptérygion ont été recensés. Il n'a pas été inventorié, les malades ayant un âge inférieur à 20 ans en raison de l'absence de cette maladie chez le sujet jeune (Szwarcberg et Flament, 2001).

La fréquence hospitalière = $(119 : 3215) \times 100 = 3,7\%$

II.1.1.2 Répartition du ptérygion selon le sexe

La **figure.10** montre une prédominance masculine très marquée de la maladie du ptérygion avec 77,3%.

Le sexe ratio = nombre d'hommes / nombre de femmes = $92/27=3,4$.

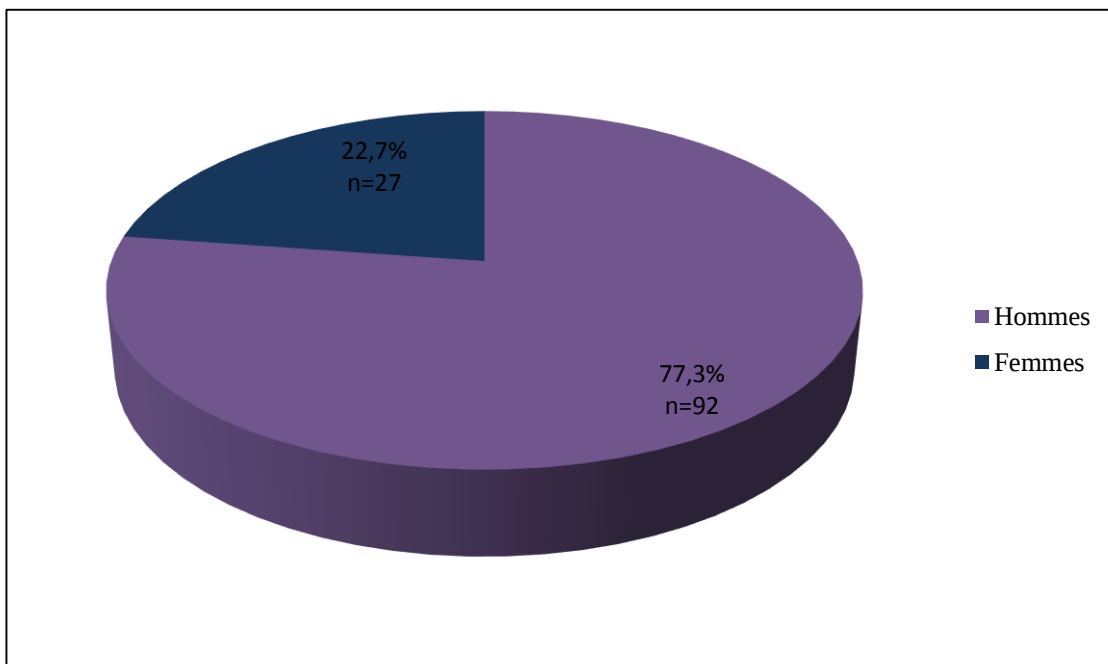


Figure.10 : Répartition du ptérygion selon le sexe.

II.1.1.3 Répartition du ptérygion selon l'âge

Après la classe d'âge de [10-20 ans[, l'effectif des patients atteints de ptérygion s'élève pour atteindre un maximum (n=37 soit 31,1%) pour la classe d'âge de [60-70 ans[(**Figure.11**).

L'âge moyen des patients atteints de ptérygion est de 58 ans $\pm$ 14ans avec des âges extrêmes de 26 à 93 ans.

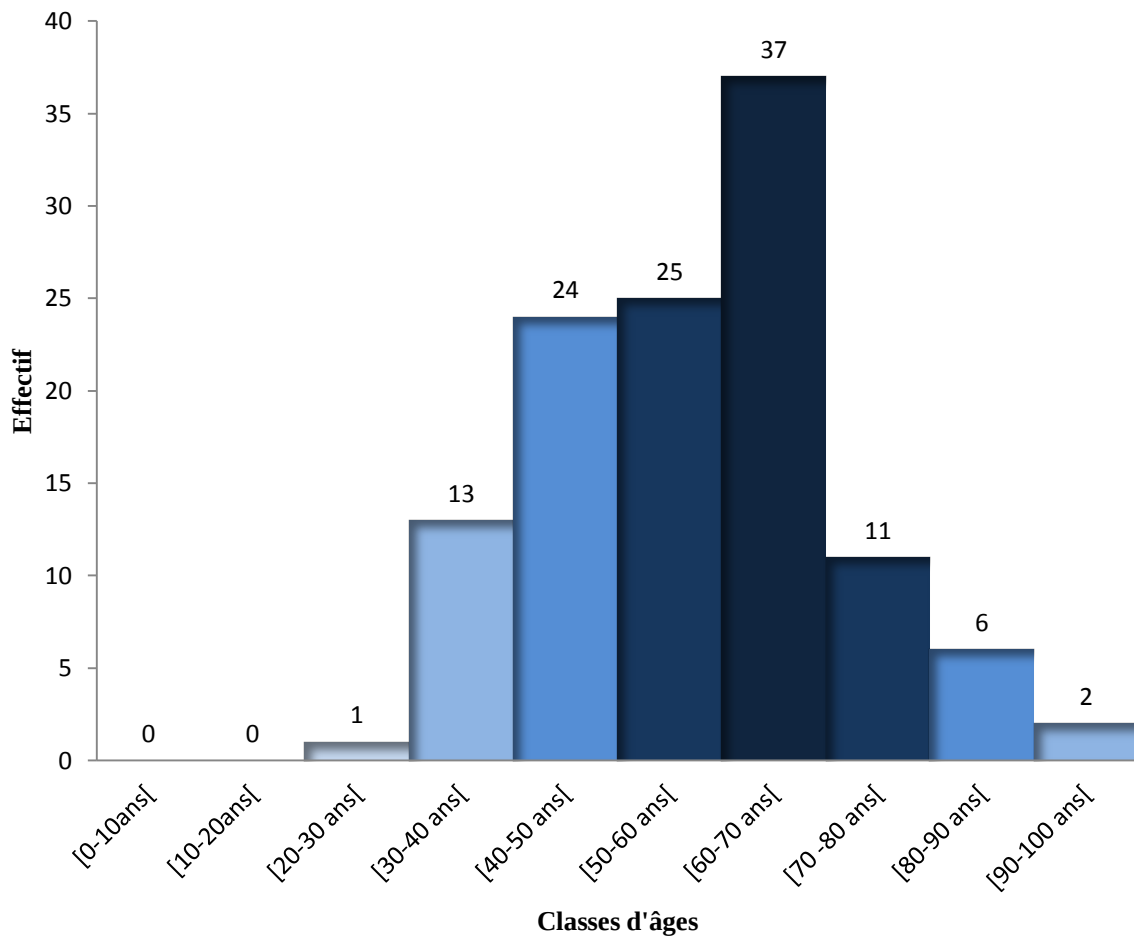


Figure.11 : Répartition du ptérygion selon les classes d'âges.

II.1.1.4 Répartition du ptérygion en fonction de la profession

Selon la **figure.12**, nous observons avec intérêt une prédominance de la maladie du ptérygion chez les maçons (19 hommes sur un total de 92 hommes soit 21%); s'en suit les agriculteurs , les militaires et les soudeurs avec un effectif de 12 hommes pour chaque catégorie , soit 13% chacune . Ce dernier chiffre est proche de celui des chauffeurs (11 hommes soit 12%). Par la suite, nous retrouvons les ouvriers d'usine dont l'effectif (n=7 soit 8%) est proche de celui des commerçants et des agents de sécurité (n=6 soit 6,5%). Les autres professions touchées sont: les fonctionnaires et les infirmiers (n=3 soit 3%) ainsi que les footbaleurs (n=1 soit 1%) qui sont les moins touchés par le ptérygion .

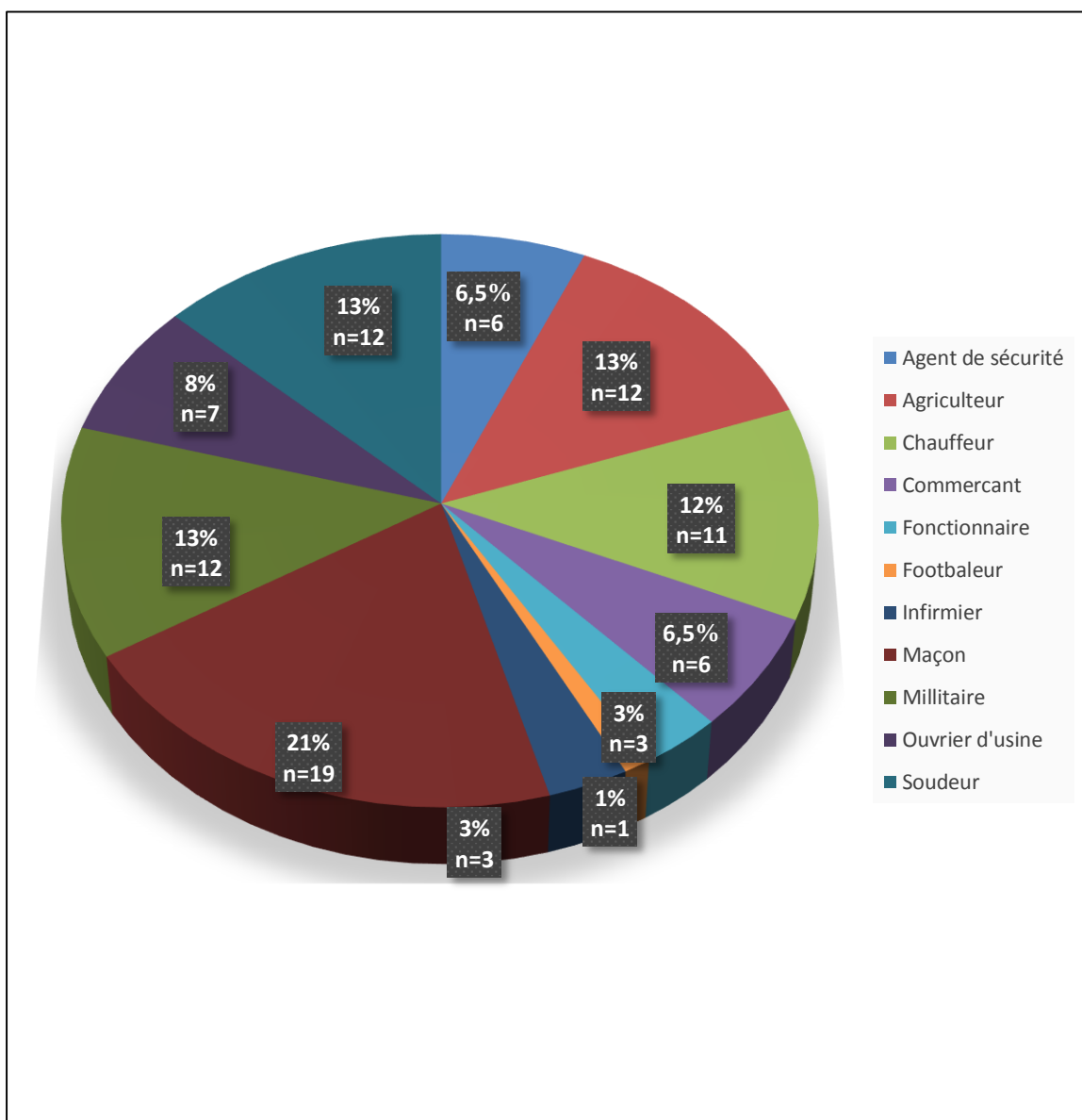


Figure.12: Répartition du ptérygion chez les hommes en fonction de la profession.

La **figure.13**, montre une prédominance de la maladie du ptérygion chez les femmes aux foyers avec un effectif de 19 sur un total de 27 femmes soit (70%), suivi des femmes de ménages (n=5 soit 19%) et enfin des fonctionnaires (n=3 soit 11%).

En comparant les **figures.12 et 13** , nous relevons d'une manière intéressante que le ptérygion ne touche qu'une catégorie de femmes exerçant surtout le métier de femme de ménage alors qu'il touche 11 métiers d'hommes.

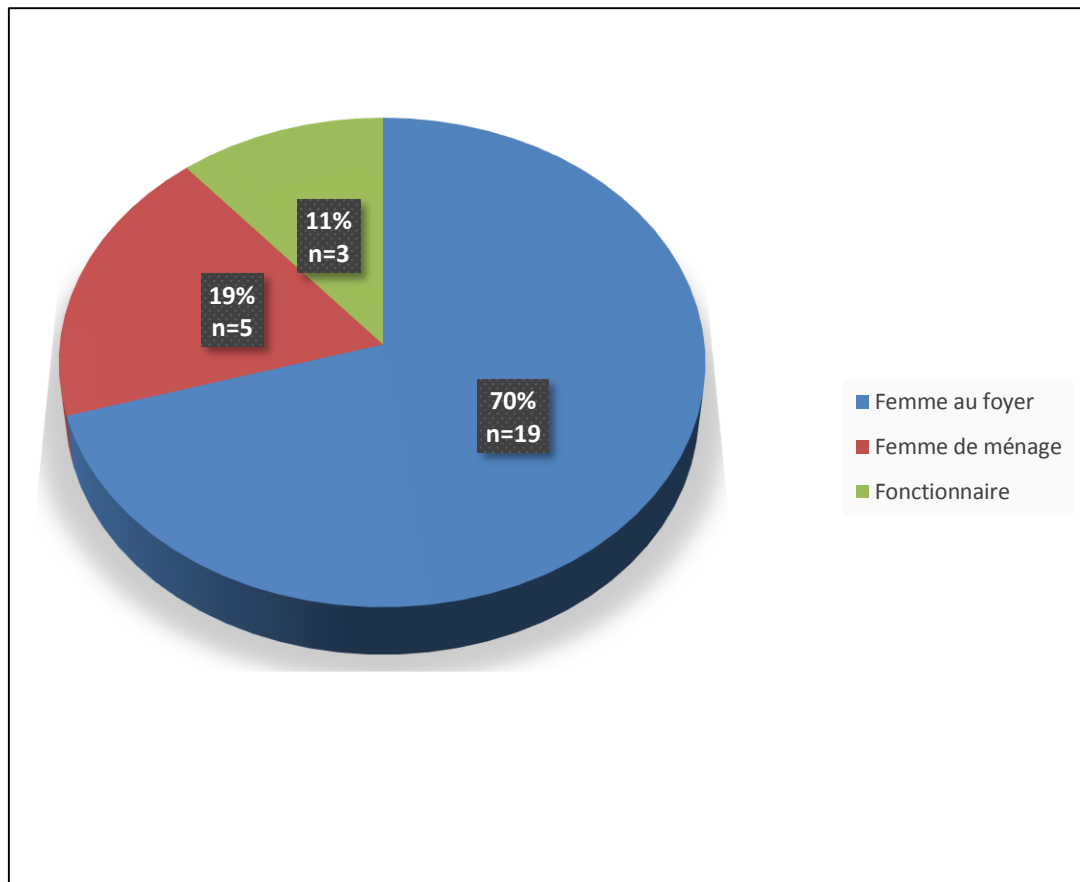


Figure.13 : Répartition du ptérygion chez les femmes en fonction de la profession.

II.1.2 Etude histologique

Les coupes histologiques ont montré que le ptérygion présentait un profil conjonctival (**Figure.14 B, C, D**). En effet, chez la plupart des patients, l'épithélium de revêtement semble être stratifié, squameux et sans kératinisation, surmonté de cellules caliciformes constituant une hyperplasie (**Figure.14 B, C**). A l'inverse, aucune preuve de la présence de ce type de cellules n'a été rapportée au niveau des sections de conjonctives normales (témoin négatif)

(Figure.14 A). Par comparaison avec la conjonctive témoin, le tissu conjonctif (chorion dit *Substantia Propria*) du ptérygion semble constituer un siège d'infiltrats de follicules inflammatoires denses et localement invasifs, touchant le bord inférieur de l'épithélium (Figure.14 B, C, D). Les biopsies ptérygiales se caractérisent souvent par une fibrose (Figure.14 D) et une néovascularisation (Figure.14 B, D) ; Un réseau de vaisseaux sanguins augmenté autour des infiltrats inflammatoires.

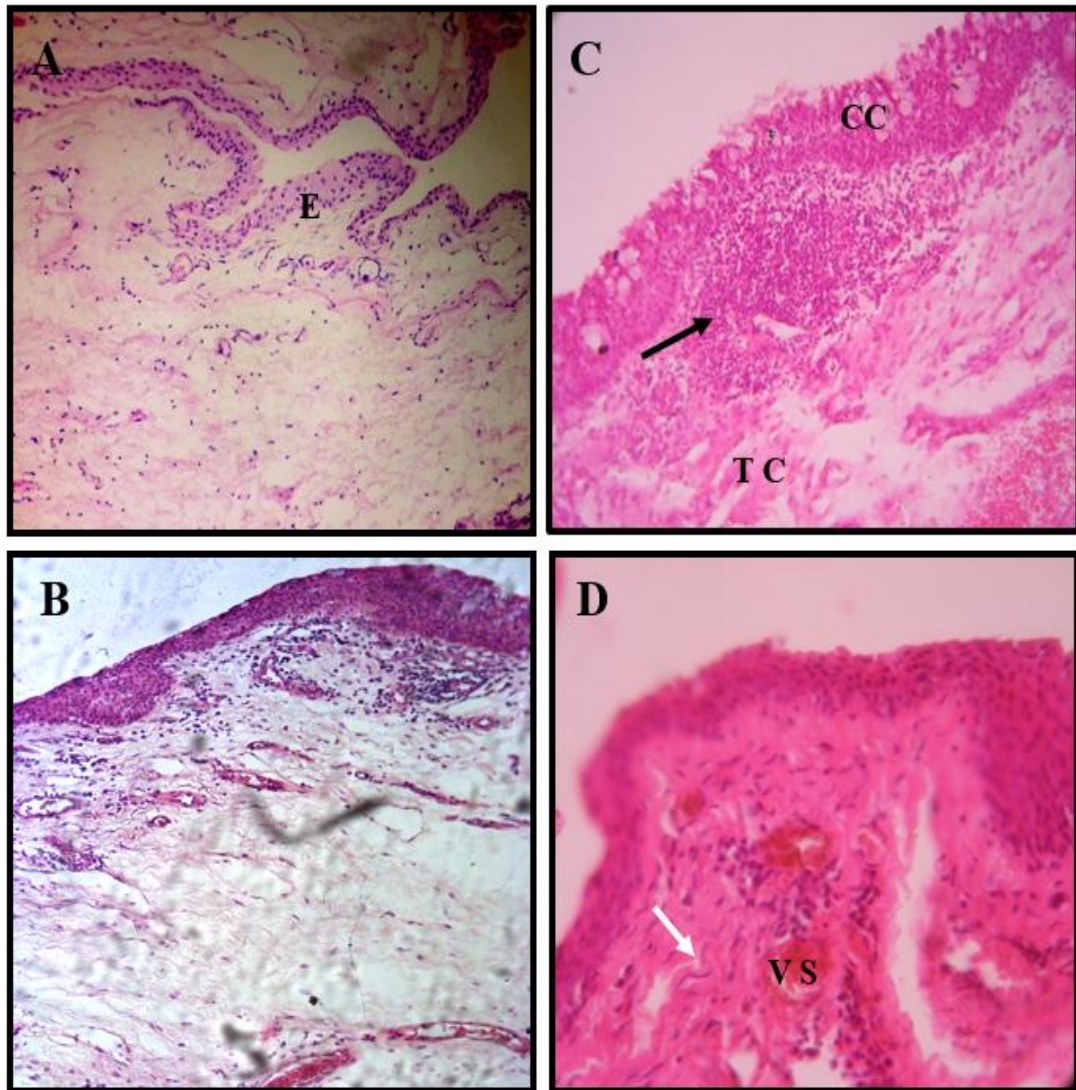


Figure.14 : Coupes histologiques d'une conjonctive normale (témoin) (A) et des biopsies de ptérygion (B, C et D).

CC : Cellules caliciformes, E : Epithelium, TC : Tissu Conjonctif, VS : Vaisseaux Sanguins. La flèche noire indique la présence d'infiltrat inflammatoire et la flèche blanche démontre la présence d'une fibrose.

(A et B : grossissement $\times 100$), (C et D : grossissement $\times 250$).

II.1.3 Etude immunohistochimique

II.1.3.1 Expression du CD3, CD68 et CD20

Les résultats de la méthode d'immunohistochimie ont révélés une surexpression des marqueurs suivants : CD3, CD20 et CD68 au niveau des biopsies ptérygiales par comparaison aux conjonctives saines (Témoins négatifs).

Ces données signifient que les lymphocytes T, B et les macrophages sont significativement plus présents dans les sections de ptérygions que les conjonctives normales (**Figure.15 A, B ; D, E ; G, H**).

En effet, Il a été relevé avec intérêt, que les lymphocytes T et les macrophages sont présents aussi bien, au niveau de l'épithélium que du tissu conjonctif (**Figure.15 A, D**). Les lymphocytes B quant à eux, se trouveraient uniquement au niveau de ce dernier (**Figure.15 G**).

Au niveau des biopsies témoins positifs (conjonctives touchées par une conjonctivite), les cellules marquées (lymphocytes T, B et macrophages) sont principalement présentes au niveau du tissu conjonctif (**Figure.15 C, F, I**).

De manière intéressante, par rapport aux macrophages et aux lymphocytes B, les lymphocytes T représentent la majorité des cellules immunitaires constituant l'infiltrat inflammatoire du ptérygion.

En comparant, les biopsies ptérygiales avec les témoins positifs, les marqueurs des lymphocytes T et des macrophages semblent être plus exprimées au niveau des biopsies de conjonctivite (**Figure.15 A, D, C, F**).

Il est intéressant de noter que la plupart des cellules T, B et des macrophages ont été trouvés autour des vaisseaux sanguins et couvraient inégalement des parties du tissu conjonctif du ptérygion (**Figure.15 A, D, G**).

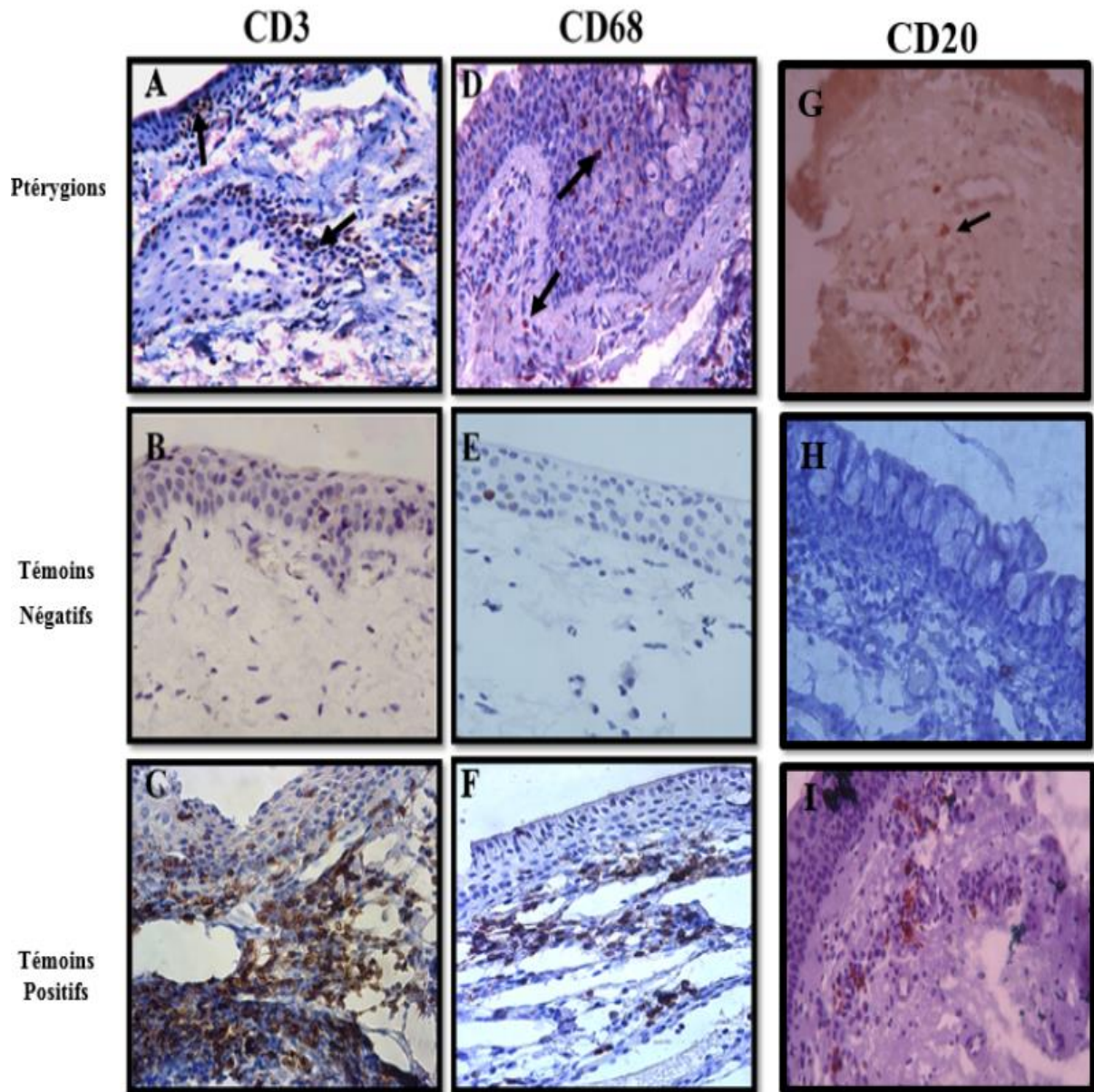


Figure.15: Détermination de l'expression du : CD3 (A, B, C), CD68 (D, E, F) et CD20 (G, H, I) respectivement dans les biopsies de ptérygion, des conjonctives saines (Témoins négatifs) et des biopsies de conjunctivite (Témoins positifs).

Toutes les lames ont été contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer. Les flèches indiquent l'expression des CD. Le grossissement est $\times 400$

II.1.3.2 Expression du NF- κ B et de la NOS2

L'examen microscopique nous a permis de noter une surexpression de la NOS2 (NO synthase inductible) au niveau de l'épithélium et du tissu conjonctif du ptérygion (**Figure.16 D**). En revanche, cela n'a pas été observé dans les sections conjonctivales normales (Témoins négatifs) (**Figure.16 E**).

En outre, au niveau de la même zone du ptérygion, nous avons noté une surexpression concomitante du NF- κ B. Cette dernière n'a pas été constatée au niveau des sections des témoins négatifs (**Figure.16 A, B**).

Il a été remarqué avec intérêt que l'épithélium des canaux excréteurs et des acini des glandes salivaires labiales, des patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren, ainsi que les tissus se trouvant entre ces formations ont également exprimé, les deux marqueurs (**Figure.16 C, F**).

II.1.3.3 Expression du Bcl-2

En comparaison avec les coupes conjonctivales normales (Témoins négatifs), nous avons remarqué avec intérêt une surexpression du Bcl-2, particulièrement au niveau de la couche basale des cellules épithéliales du ptérygion. Un marquage intense, a été également observé dans l'épaisseur de la couche épithéliale (**Figure.17 A, B**).

En outre, nos résultats ont montré une surexpression du Bcl-2, autour des vaisseaux sanguins et des zones avoisinantes, du tissu conjonctif du ptérygion (**Figure.17 A**).

Les témoins positifs (biopsies d'une conjonctive atteinte d'une conjonctivite) quant à eux, ont présenté une forte expression du Bcl-2 au niveau du tissu conjonctif ainsi que de la couche basale des cellules épithéliales (**Figure.17 C**).

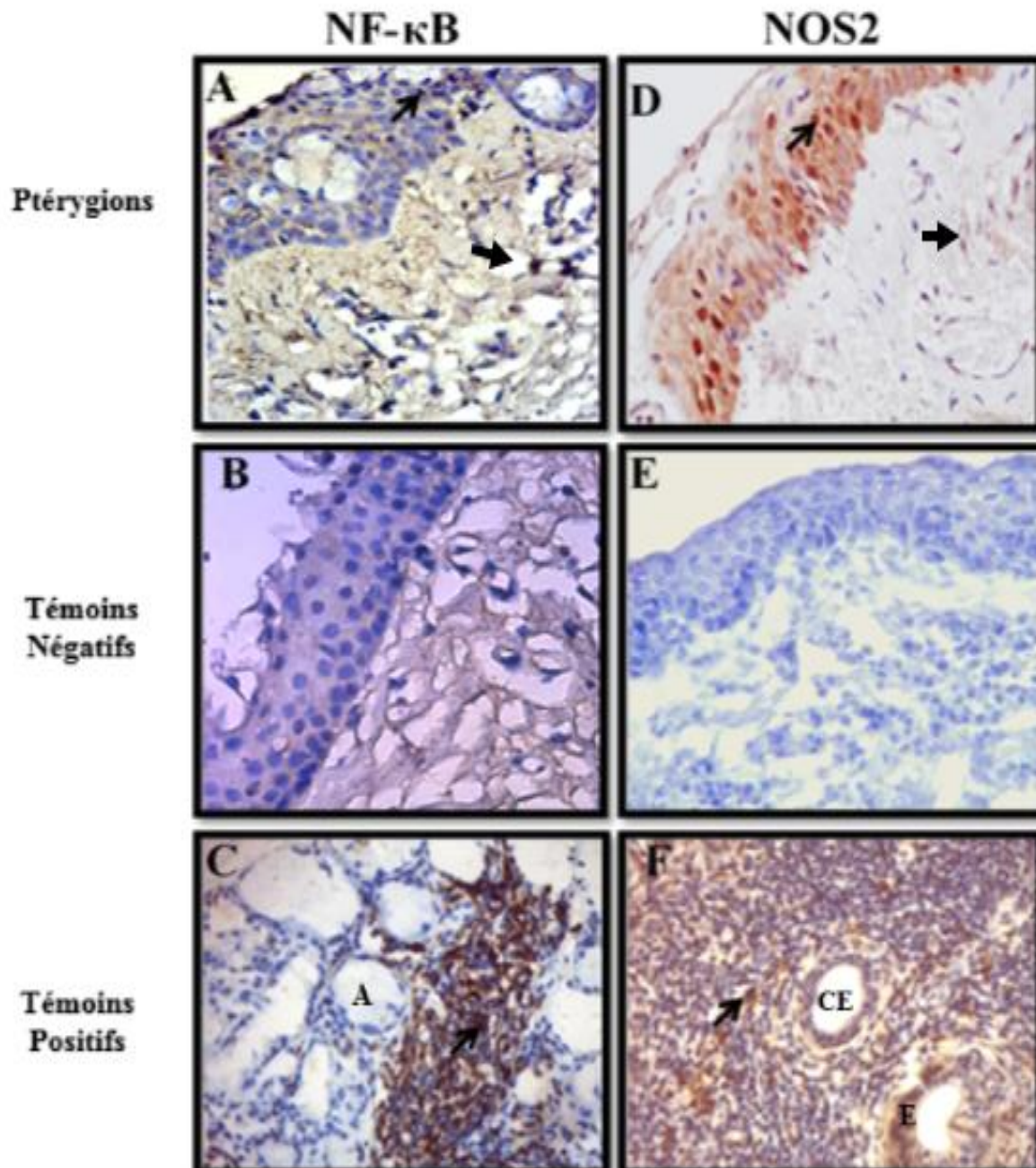


Figure.16 : Détermination de l'expression du **NF-κB** (A, B et C), et de la **NOS2** (D, E, F), respectivement, au niveau des biopsies de ptérygions, des conjonctives saines (Témoins négatifs), et au niveau des biopsies des glandes salivaires labiales du syndrome de Gougerot – Sjögren (Témoins positifs).

A : Acinus, CE : Canal Excreteur, E : Epithelium

Toutes les lames ont été contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer. Les flèches indiquent l'expression des marqueurs utilisés. Le grossissement est $\times 400$.

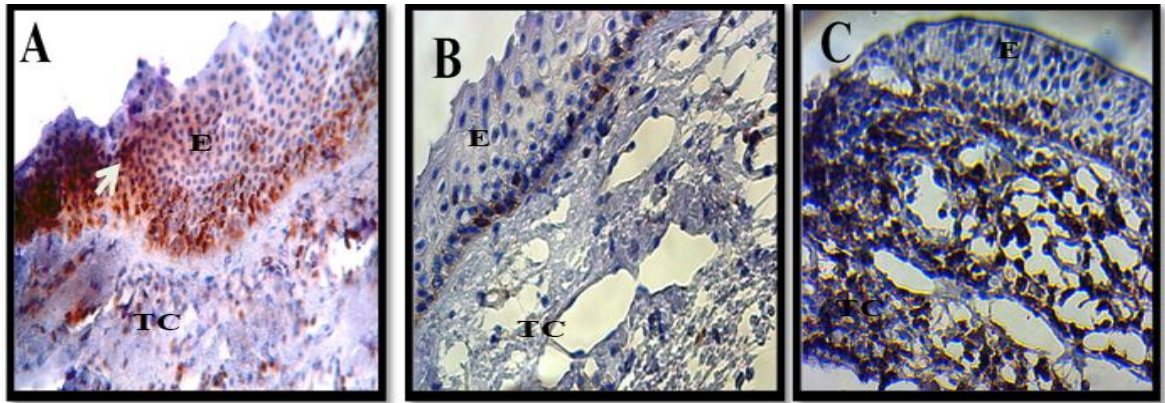


Figure.17 : Détermination de l'expression du Bcl-2 au niveau des biopsies de pterygion (A), des conjonctives saines (B, Témoin négatif) et des biopsies de conjonctivites (C, Témoin positif).

E : Epithélium, TC : Tissu Conjonctif

Toutes les lames ont été contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer. Les flèches indiquent l'expression du Bcl-2. Le grossissement est $\times 400$.

II.1.4 Dosage de la protéine C réactive (CRP)

Selon la **figure.18**, on remarque que la concentration de la protéine C réactive est légèrement supérieure au niveau des sérums sanguins des patients présentant des pterygions, en comparaison avec ceux des témoins sains (sujets normaux volontaires n'ayant aucun pterygion et ne présentant aucune maladie inflammatoire). Cependant, la différence de concentrations est statistiquement non significative ($p > 0.05$).

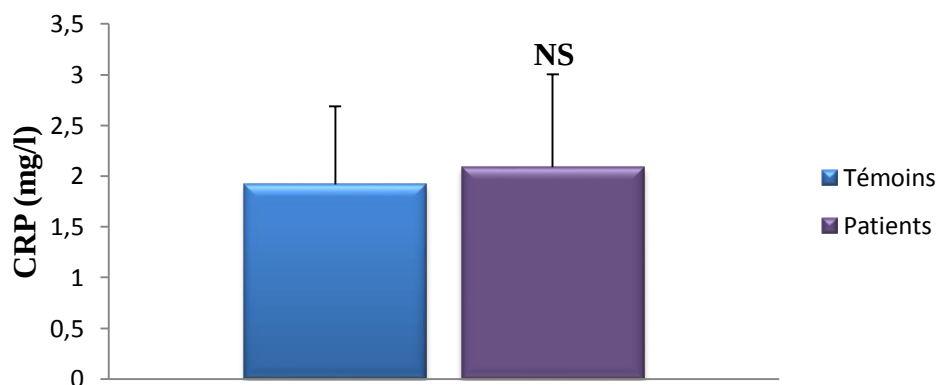


Figure.18: Concentration de la protéine C réactive au niveau des sérums sanguins des patients atteints de pterygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.5 La vitesse de sédimentation (VS)

La **figure.19** indique que la vitesse de sédimentation des globules rouges des patients présentant des ptérygions est supérieure à celle des témoins sains. La différence entre les deux vitesses est statistiquement significative ($*p \leq 0,05$).

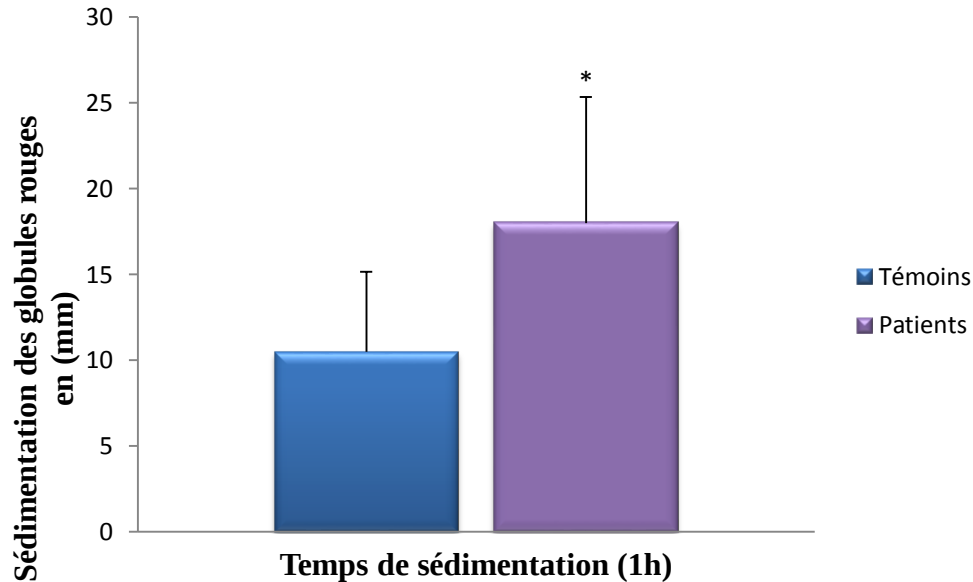


Figure.19: La vitesse de sédimentation.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.6 Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)

II.1.6.1 Dosage des IgG

Nous avons remarqué avec intérêt que la concentration des immunoglobulines G au niveau des sérums sanguins des patients présentant des ptérygions est supérieure à celle des sujets sains (témoins) (**Figure.20**). La différence de concentration entre les deux sujets est très hautement significative ($***p \leq 0,001$).

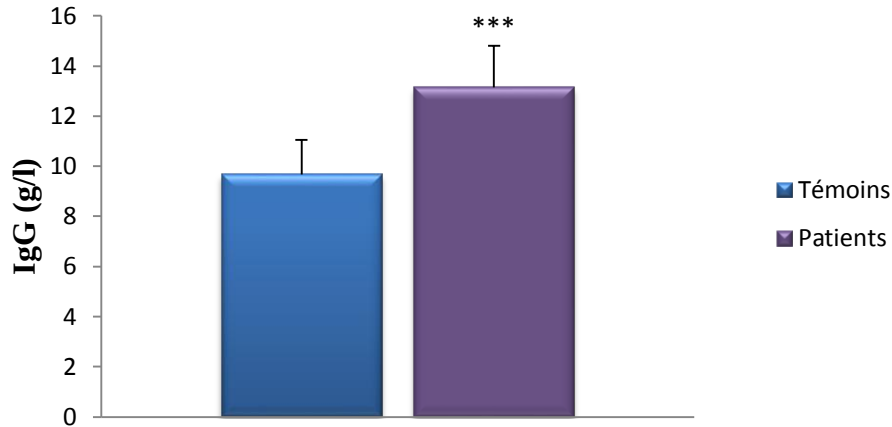


Figure.20: Concentration des immunoglobulines G au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.6.2 Dosage des IgA

Selon la **figure.21**, on remarque que la concentration des immunoglobulines A dans les sérums sanguins des patients ayant des ptérygions est légèrement supérieure à leur concentration au niveau des sérums des témoins sains. Cependant cette différence semble être statistiquement non significative ($p > 0,05$).

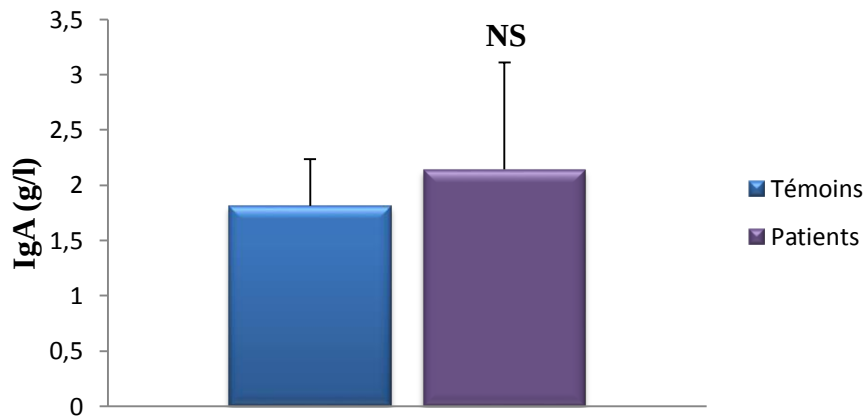


Figure.21 : Concentration des immunoglobulines A au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.6.3 Dosage des IgM

La **figure.22**, illustre une différence entre la concentration des immunoglobulines M trouvées dans les sérums sanguins des patients présentant des ptérygions et celle des témoins sains. Il semblerait que cette concentration soit significativement supérieure chez les patients ($*p \leq 0,05$).

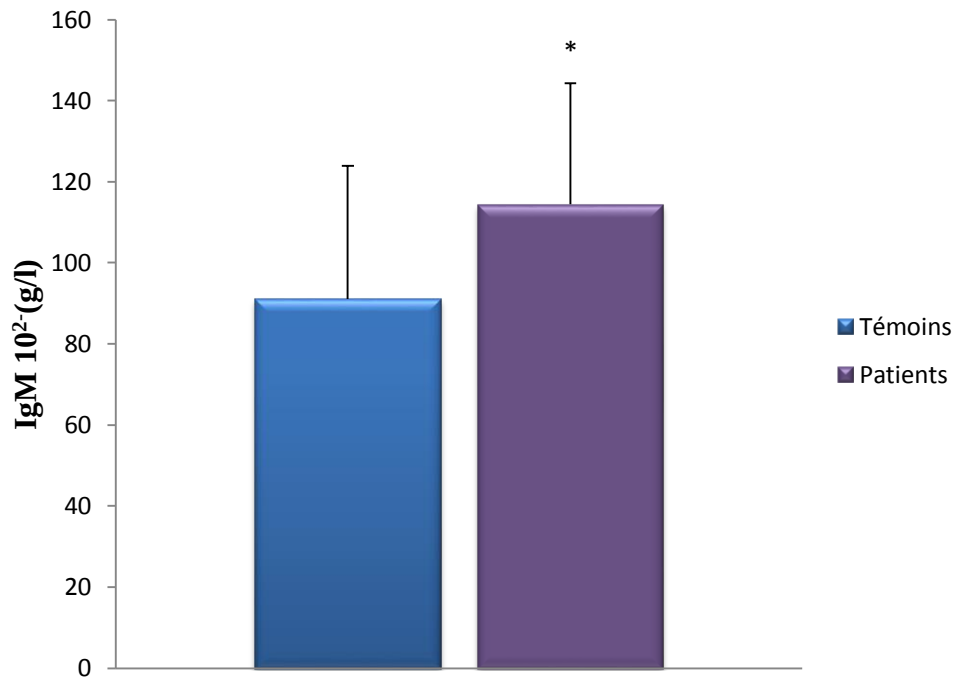


Figure.22 : Concentration des immunoglobulines M au niveau des sérums sanguins des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.7 Evaluation des cytokines (IL-17A, IL-6, IL-10)

II.1.7.1 Evaluation de l'IL-17A

Selon la **figure.23**, nous relevons avec grand intérêt, que la concentration de la cytokine IL-17A (marqueur de la voie Th17) est plus élevée, au niveau des larmes et des sérums sanguins des patients atteints de ptérygions, qu'au niveau des larmes et des sérums sanguins des témoins négatifs (sujets sains). Cette différence de concentrations est statistiquement très hautement significative ($***p \leq 0,001$).

De manière intéressante, chez les patients, la concentration de cette cytokine pro-inflammatoire est supérieure au niveau des larmes (242.20 ± 24.24 pg/ml) qu'au niveau des sérums sanguins (18.04 ± 2.15 pg/ml).

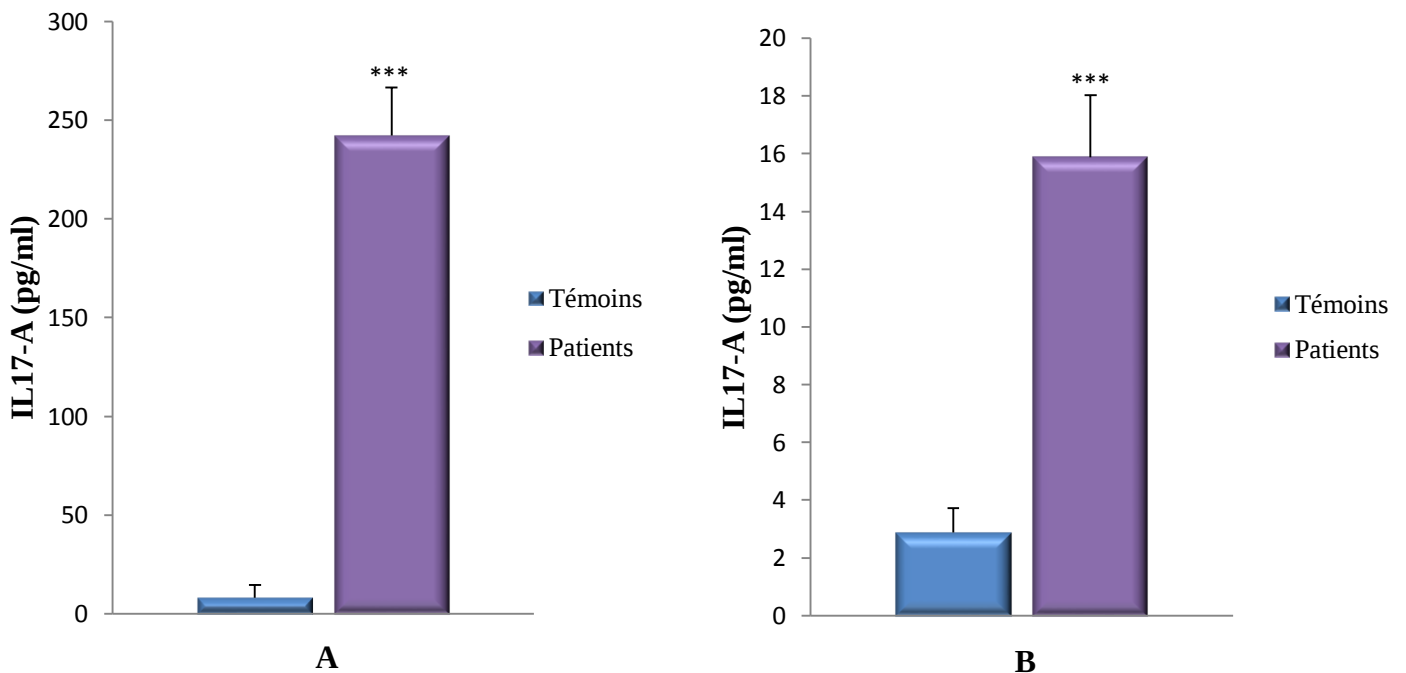


Figure.23 : Concentration de l'IL-17A dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.7.2 Evaluation de l'IL-6

La **figure.24** montre que la concentration de la cytokine IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) est très élevée au niveau des larmes et des sérums des patients présentant des ptérygions, en comparaison avec les larmes et les sérums des témoins. La différence des concentrations de l'IL-6 rapportée entre les patients et les témoins (larmes et sérums), est statistiquement très hautement significative ($***p \leq 0,001$).

La **figure.24** indique également et d'une manière intéressante, que la concentration de cette cytokine proinflammatoire est plus substantielle dans les larmes des patients (69.90 ± 5.59 pg/ml) que dans les sérums (7.66 ± 0.71 pg/ml).

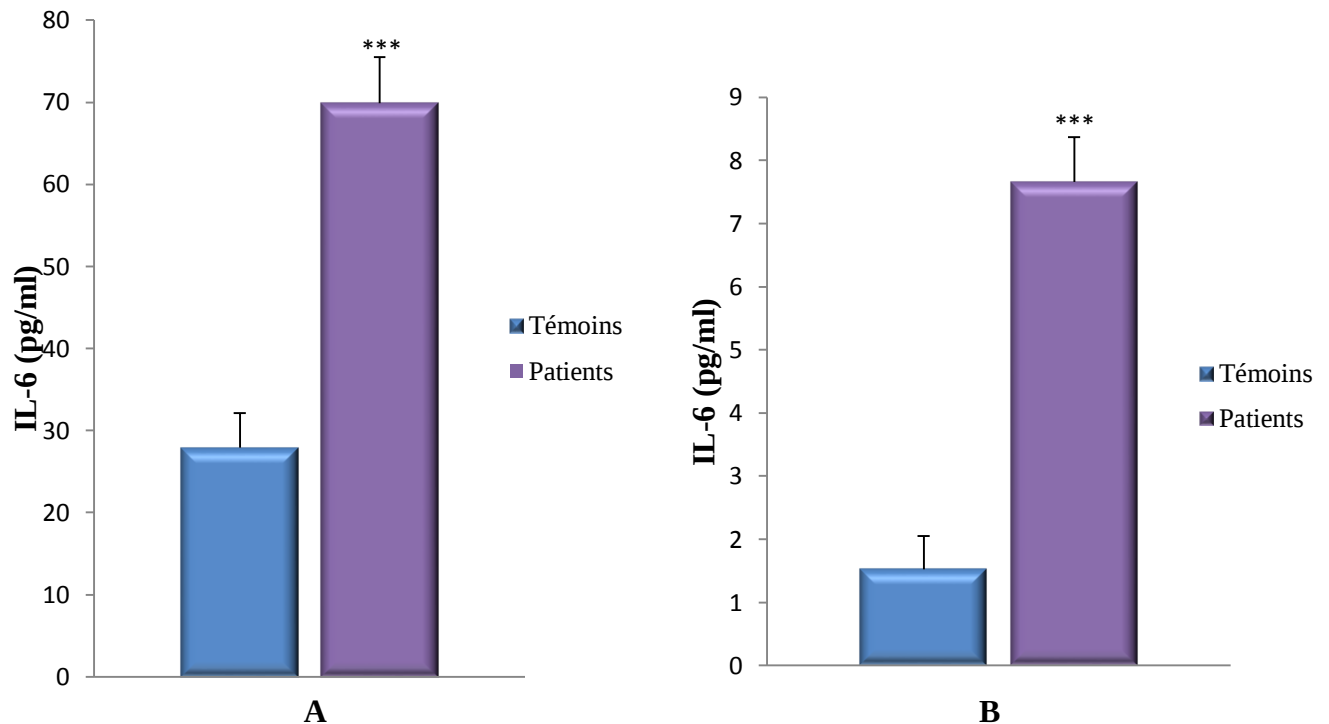


Figure.24 : Concentration de l'IL-6 dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.7.3 Evaluation de l'IL-10

La **figure.25** montre que la concentration en IL-10 (Cytokine immunorégulatrice) au niveau des larmes et des sérums des patients présentant des ptérygions est légèrement plus faible que celle des témoins sains. Cette différence reste cependant statistiquement non significative.

La **figure.25** indique également que la concentration de cette cytokine immuno-suppressive et anti-inflammatoire est plus élevée dans les larmes ($28,5 \pm 3.04$ pg/ml) des patients que dans leurs sérums ($1,52 \pm 0.42$ pg/ml).

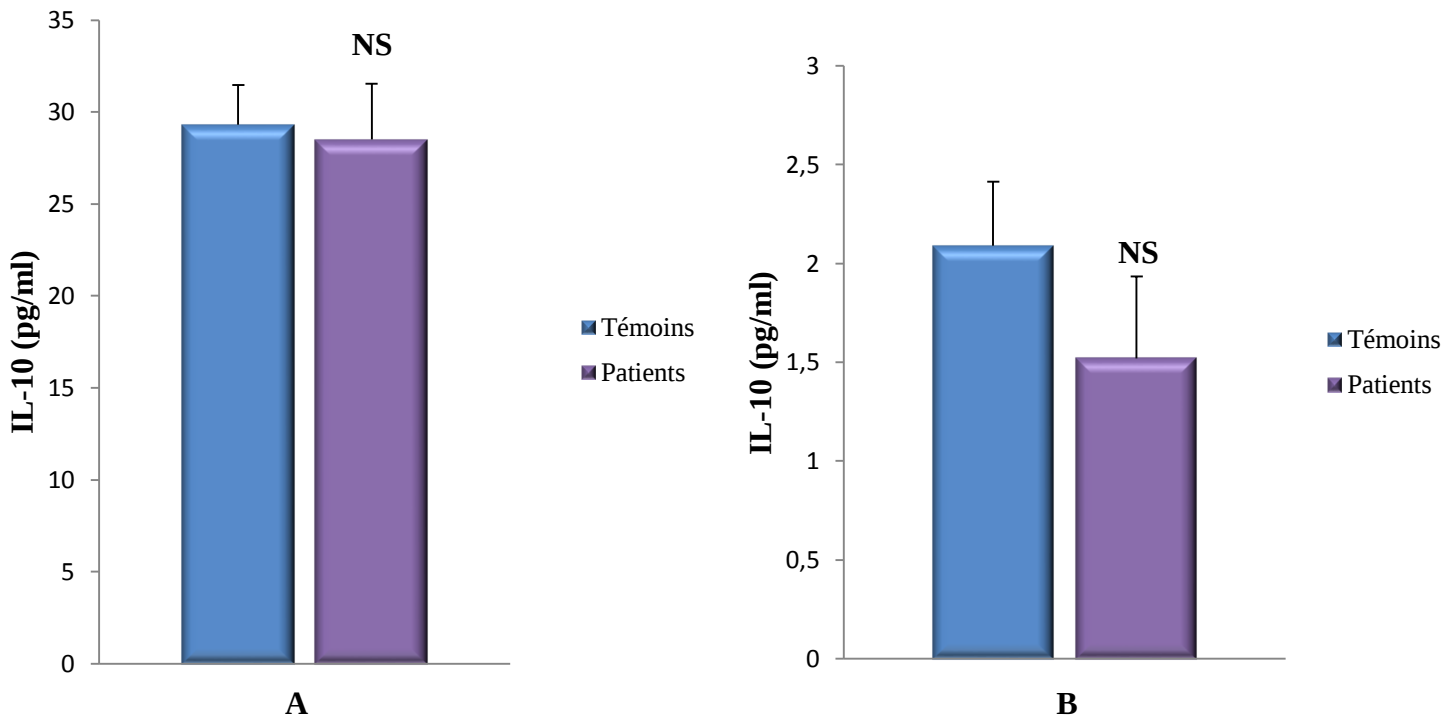


Figure.25 : Concentration de l'IL-10 dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

II.1.8 Evaluation du monoxyde d'azote (NO)

En comparaison avec les témoins négatifs, les concentrations en nitrites totaux, qui correspondent aux concentrations du NO, sont hautement élevées au niveau des larmes et des sérums des patients. Cette différence de concentrations entre patients et témoins sains est très hautement significative ($***p \leq 0,001$) (**Figure.26**).

Il apparaît également que les concentrations en NO soient plus élevées dans les larmes des patients ($106.7 \pm 9.02 \mu\text{M}$) que dans leurs sérums ($58.28 \pm 7.40 \mu\text{M}$) (**Figure.26**).

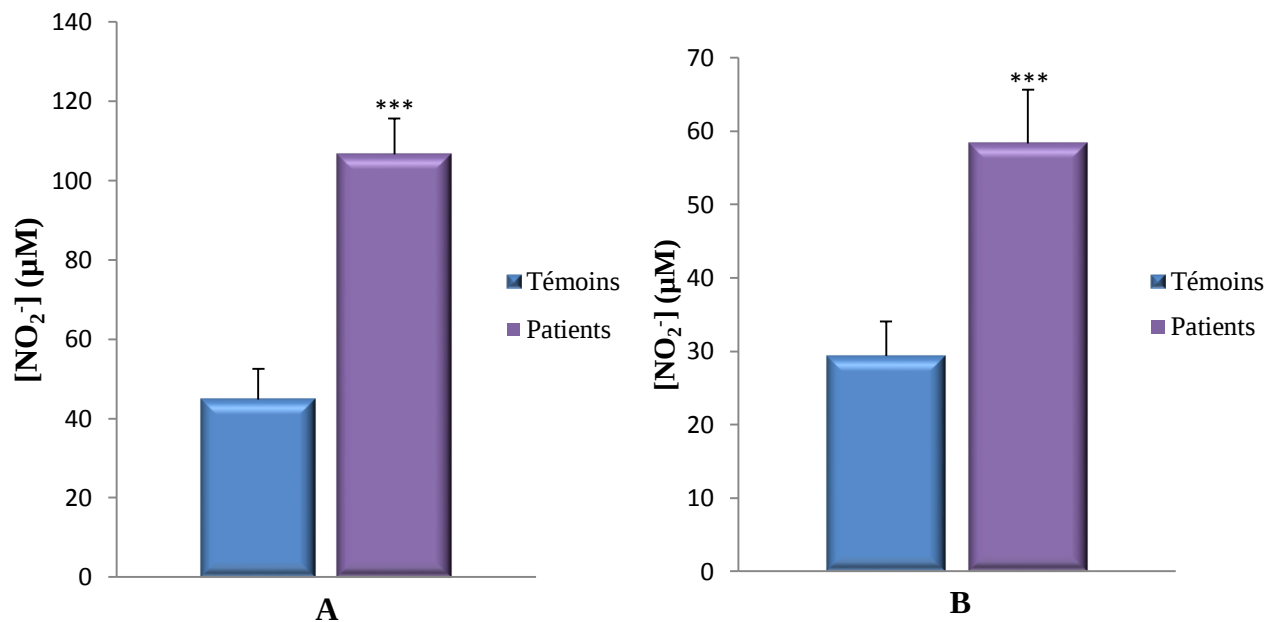


Figure.26 : Concentration des nitrites (équivalents en NO) dans les larmes (A) et les sérums sanguins (B) des patients atteints de ptérygion.

* $p \leq 0,05$ vs témoins, ** $p \leq 0,01$ vs témoins, *** $p \leq 0,001$ vs témoins, NS : Non Significatif

Discussion

II.2 Discussion

Le ptérygion peut être décrit comme une croissance bénigne non contrôlée du tissu conjonctif recouvrant la sclère. Il peut altérer sévèrement la fonction visuelle dans les cas avancés et devenir enflammé, conduisant à la rougeur et à l'irritation de la zone affectée (**Liu et al, 2013**).

Le ptérygion peut toucher certaines populations d'une façon préférentielle (**Lei et al, 2013**). Il est plus fréquent dans les pays à climat chaud et exposés aux rayonnements ultraviolets (**Aslan et al, 2013**). Plusieurs cas ont été détectés en Algérie (**Boulaneb-Bediar, 2014**). A ce titre, nous nous sommes intéressés en premier lieu, à réaliser une enquête épidémiologique sur cette maladie au niveau d'une ville de l'Est Algérien : Annaba. Cette dernière bénéficie d'un climat méditerranéen caractérisé par ses longs étés chauds et secs et par ses hivers doux et humides (il fait généralement chaud surtout de la mi-juillet à la mi-août) (**Boulaneb-Bediar, 2014**).

Durant l'année 2016, nous avons enregistré au niveau de la clinique d'ophtalmologie du Chu Ibn Rochd-Annaba, une fréquence hospitalière du ptérygion qui est de 3.7 %. Notre résultat est presque similaire à celui observé dans une étude marocaine sur la même maladie. En effet, dans cette dernière étude, il a été enregistré 163 cas de ptérygions sur une population de 4500 consultants, soit une fréquence de 3.65% sur une période de 3 années (de 2012 à 2014) (**Abdelaoui, 2014**). L'Algérie et le Maroc étant des contrées voisines, il est possible que l'influence de microclimats intervienne dans la pathogénie et la fréquence du ptérygion.

Durant l'année 2010 une étude épidémiologique sur la même maladie a été réalisée au niveau du même établissement d'Annaba mais également au niveau des polycliniques qui lui sont annexées. Une fréquence hospitalière légèrement supérieure à celle retrouvée dans notre étude a été rapportée (5.9%). Il faut noter que dans cette dernière étude il a été recensé avec les cas primitifs de ptérygions, les cas de ptérygions récidivants (**Boulaneb-Bediar, 2014**).

Il a été mentionné dans la bibliographie que la prévalence du ptérygion varie considérablement selon l'âge, le sexe, la race (ethnies) et la localisation géographique (les zones climatique des lieux d'études) (**Hua et al, 2012**). Elle semble augmenter dans les régions tropicales, subtropicales (situées approximativement entre 0° et 30° de latitude nord et sud) et les régions équatoriales (varie entre 5 et 22.5%), pour diminuer à près de 2% dans les régions tempérées. Elle est hautement fréquente dans les régions à haute altitude et au niveau des pôles terrestres. Ces différences sont imputables au climat, au degré d'ensoleillement (principal facteur de risque du ptérygion) et à l'intensité des radiations solaires, ainsi qu'aux

professions exposant à l'irritation de la surface oculaire et l'instabilité du film lacrymal (Szwarcberg et Flament, 2001 ; Moukoury Nyolo et al, 2009 ; Durkin et al, 2010, Eballé et al, 2018).

La prévalence du ptérygion serait de 3% chez les Australiens, 23% chez la population africaine des États-Unis, 15 % chez les Tibétains de Chine, 18% chez les Mongols de Chine, 30% chez les Japonais et 7% chez les Chinois et les Indiens de Singapour (McCarty et al, 2000 ; Ang et al, 2012).

Dans notre étude nous avons relevé avec intérêt, une prédominance masculine très hautement significative du ptérygion (77,3% avec un sexe ratio= 92 hommes / 27 femmes = 3,4). Ce résultat est en concordance avec celui de deux études Algériennes. La première a été entreprise à Alger en 2007 par (Ailem et al, 2007) et la seconde à Annaba en 2010, par (Boulaneb-Bediar, 2014). Ce résultat a également été retrouvé dans : une étude Tunisienne (Malek et al, 2013), deux études Marocaines (Abdelaoui, 2014 ; Bouyaqba, 2014) et deux études Camerounaises (une au niveau de la ville de Douala en 1997 et l'autre au niveau de la ville de Yaoundé en 2009) (Ebana Mvogo et al, 1997 ; Moukoury Nyolo et al, 2009).

Il a été mentionné dans la littérature, que le ptérygion est deux fois plus susceptible de se produire chez les hommes que chez les femmes, ce qui peut être expliqué par le fait que dans certains pays les hommes passent beaucoup plus de temps dehors que les femmes et sont donc plus exposés aux rayons du soleil (Liu et al, 2013). Toutefois, le facteur hormonal ne devrait pas être occulté.

Certaines études portant sur le ptérygion ont rapporté des résultats opposés. En effet une étude Tunisienne a enregistré une légère prédominance féminine du ptérygion avec un pourcentage de (53%) (Kammoum et al, 2001). D'autres études ont démontré des résultats similaires : une étude Australienne (2000) avec un pourcentage de 55,4% et une étude au Togo (2010), avec un pourcentage de 51.82% (McCarty et al, 2000 ; Ayena et al, 2010).

En ce qui concerne la répartition du ptérygion selon l'âge, nos résultats ont indiqué qu'après la classe de [10-20 ans[, plus les années passent, plus le nombre de cas de ptérygions augmente. En effet plusieurs études ont montré une association positive entre l'augmentation de l'âge et l'incidence du ptérygion (Nangia et al, 2013 ; Song et al, 2017). Toutefois certaines études ont montré que l'âge ne présentait pas un facteur significatif dans l'apparition des nouveaux cas de ptérygion (Zhao et al, 2013).

La classe la plus touchée était celle de [60-70 ans[avec un effectif de 37 malades soit 31,1%. L'âge moyen des patients est de 58 ans $\pm$ 14ans avec des âges extrêmes de 26 à 93 ans. Il n'existe donc pas de malades ayant un âge inférieur ou égale à 20 ans. Ce résultat se

rapproche de celui d'une étude Marocaine où les patients dépassant la cinquantaine représentaient la tranche d'âge dominante (âge moyen de 55 ans avec des extrêmes de 24 à 80 ans) (**Bouyaqba, 2014**).

Selon la littérature, le ptérygion est retrouvé essentiellement chez l'adulte. Il est exceptionnel avant l'âge de 20 ans (**Szwarcberg et Flament, 2001**). Toutefois, il n'est pas impossible de le déceler chez des jeunes patients habitant une région à risque (**Islam et Wagoner, 2001**).

Dans notre étude, l'augmentation des cas de ptérygion autour de la cinquantaine (58 ans) est probablement dûe au fait de son évolution lente et progressive (**Liu et al, 2017**). En effet, le cumul du nombre d'années d'exposition au soleil pourrait être à l'origine de son développement (**Nangia et al, 2013**). Rappelons que les cellules de la surface oculaire ne sont pas épargnées par le phénomène de vieillissement cellulaire ce qui les rend probablement plus sensibles aux facteurs déclenchant la maladie.

Notre étude portant sur la relation entre le métier des patients et l'incidence du ptérygion a montré que chez les sujets de sexe masculin, cette maladie semble toucher une grande proportion de maçons (21%) s'en suit les agriculteurs, les militaires et soudeurs (13%), les chauffeurs (12%), les ouvriers d'usine (8%) et enfin les commerçants et les agents de sécurité (6,5%). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la majorité des professions exercées par les hommes rendent fréquente l'exposition quotidienne de leurs yeux au rayonnement solaire, à la chaleur, aux poussières et aux fines projections. Les radiations UV semblent être la cause essentielle des microtraumatismes responsables des lésions cornéo conjonctivales. Elles altèrent le matériel génétique. Ainsi, il est admis depuis peu que certains gènes supresseurs tumoraux (comme le gène p53 situé sur le bras court du chromosome 17) sont sensibles à ces radiations et que la mutation qui en résulte, peut jouer un rôle dans la pathogénie du pterygion (**Szwarcberg et Flament, 2001 ; Weinstein et al, 2002 ; Di Girolamo et al, 2004 ; Pelit et al, 2009**).

Une étude dans le même axe a été entreprise dans la clinique d'ophtalmologie du CHU Ibn Rochd -Annaba. Il a été constaté d'une manière générale et intéressante que les patients hommes exerçaient des professions similaires aux nôtres avec quelques différences de pourcentages (**Boulaneb-Bediar, 2014**). Cette similitude explique que certaines professions soient plus exposées à la survenue du ptérygion que d'autres.

En ce qui concerne les professions des sujets de sexe féminin, les plus touchées par le pterygion semblent être des femmes aux foyers (70%) et des femmes de ménage (19%). Ce résultat est en accord avec celui de (**Ebana Mvogo et al, 1997**). Il peut être expliqué par

l'exposition de leurs yeux, lors des taches ménagères, aux poussières et aux détergents. Selon la littérature, le pterygion s'observe dans les régions empoussiérées et est favorisé par les irritations de la surface oculaire (**Szwarcberg et Flament, 2001**). Il a été mentionné également que l'effet toxique des substances chimiques constituerait un facteur étiologique de cette maladie (**Džunić et al, 2010**).

Nos résultats montrent d'une manière intéressante que le pterygion toucherait un plus grand nombre de métiers masculins que de métiers féminins. L'importance du nombre d'hommes atteints (par rapport aux femmes) retrouvé précédemment dans notre étude est probablement en rapport avec la plus grande fréquence des métiers à risques exercés par les patients de sexe masculin.

Après la collecte de données épidémiologiques sur le ptérygion, nous nous sommes intéressés à la réalisation d'une étude histologique et immunohistochimique de la maladie.

La méthode d'hématoxyline éosine appliquée sur les biopsies de ptérygions a montré que ces dernières présentaient un épithélium de revêtement stratifié, squameux et sans kératinisation, surmonté de cellules caliciformes constituant une hyperplasie. Parmi toutes les structures de la surface oculaire, ces caractéristiques se rapprochent beaucoup plus de celles d'une conjonctive, ce qui signifie que les ptérygions pourraient être d'origine conjonctivale. En effet plusieurs auteurs définissent le ptérygion comme étant une prolifération et une progression anormale d'une conjonctive bulbaire sur la cornée (**Liang et al, 2001 ; Di Girolamo et al, 2004**).

Dans notre étude, aucune preuve de la présence des cellules caliciformes n'a été trouvée au niveau des sections de conjonctive témoins négatifs (sains). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'épithélium conjonctival varie selon la zone de la surface oculaire d'où il a été excisé. En effet il a été rapporté selon la littérature, que ces cellules à mucus (caliciformes) sont plus présentes au niveau du fornix et elles se font rares en se rapprochant du limbe (**Pisella et al, 2015**). Au niveau des sections de ptérygions, l'hyperplasie due à l'élévation du nombre de ces cellules, pourrait être une réaction locale aux facteurs déclenchant la maladie. Effectivement, il a été rapporté par certaines études que l'augmentation anormale du nombre des cellules caliciformes, au niveau d'une muqueuse conjonctivale, serait une réponse aux agents irritant le segment antérieur de l'œil (la pollution) (**Golu et al, 2011**).

En plus de la structure épithéliale, le tissu conjonctif (chorion dit *Substantia Propria*) du ptérygion indique la présence d'un réseau de vaisseaux sanguins dense (une néovascularisation) probablement en relation avec l'angiogenèse (**Xue et al, 2014**). En effet,

plusieurs études ont montré des résultats similaires aux nôtres ; il a été remarqué au niveau du chorion des biopsies de ptérygion, une micro-vascularisation plus riche que celle des conjonctives normales (surexpression du CD31) (**Livezeanu et al, 2011**). D'autres études ont montré une surexpression des facteurs de l'angiogenèse tels que le VEGF (Vascular endothelial growth factor) et du vWF (Von Willebrand growth factor), au niveau des biopsies de malades (**Marcovich et al, 2002 ; Aspiosis et al, 2007 ; Xue et al, 2014 ; Feng et al, 2017**). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'angiogenèse jouerait un rôle important dans la formation du ptérygion (**Markovich et al, 2002 ; Džunić et al, 2010**).

Le chorion des biopsies de ptérygion indique également la présence d'une fibrose qui est définie par une persistance anormale des cellules de cicatrisation (les fibroblastes), qui en proliférant fortement produisent un dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire (le collagène). Elle est souvent le résultat final d'une réaction inflammatoire chronique induite par une variété de stimuli (les infections persistantes, les réactions auto-immunes, les réponses allergiques, les agressions chimiques, les radiations et les lésions tissulaires) (**Wynn et al, 2008 ; Dulauroy et al, 2012**).

D'une manière intéressante, le chorion constitue également un siège d'infiltrats de follicules inflammatoires denses et localement invasifs, touchant le bord inférieur de l'épithélium et se trouvant autour des vaisseaux sanguins. Notre résultat corrobore celui rapporté par (**Chui et al, 2008**). Il indiquerait donc l'existence d'une réponse inflammatoire chronique locale au niveau des biopsies de ptérygions. Cette hypothèse est soutenue par la forte expression des marqueurs suivants : CD3, CD20 et CD68, ce qui correspond à la forte présence des lymphocytes T, B et macrophages dans les sections de ptérygions. Il a été remarqué que la plupart des cellules T, B et macrophages se trouveraient autour des vaisseaux sanguins et couvriraient inégalement des parties du tissu conjonctif du ptérygion. De manière intéressante, par rapport aux autres cellules immunitaires, les lymphocytes T représentent la majorité des cellules constituant l'infiltrat inflammatoire du ptérygion. Les lymphocytes T et les macrophages semblent être présents aussi bien, au niveau de l'épithélium que du tissu conjonctif. Les lymphocytes B quant à eux, se trouveraient uniquement au niveau de ce dernier. Nos résultats sont similaires à ceux de (**Perra et al, 2002**), de (**Golu et al, 2011**) et de (**Park et al, 2011**).

Par rapport aux conjonctives normales, l'examen microscopique, nous a permis de noter une surexpression concomitante de la NOS2 (NO Synthase inductible) et du NF-κB (Nuclear factor-Kappa B) au niveau de l'épithélium et du tissu conjonctif des biopsies de ptérygion. La présence marquée de la NOS2 a été déjà rapportée par les travaux de (**Lee et al,**

2001), au niveau de l'épithélium et de la tête de pérygions. Selon certaines études, son expression dans différents types cellulaires (tels que les macrophages, neutrophiles, lymphocytes, cellules épithéliales..) est déclenchée par les produits bactériens (LPS : Lipopolysaccharides des bactéries à Gram-) et viraux (double stranded RNA«dsRNA» : ARN double brin), le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor), les UV, le stress oxydatif (les espèces réactives de l'oxygène ROS «reactive oxygen species»), les dommages de l'ADN et plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IFN γ) qui activent le facteur de transcription ubiquitaire «le NF- κ B» (**Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998 ; Yip et al, 2008 ; Pautz et al, 2010 ; Speckmann et al, 2010 ; Xia et al, 2014**). Ce dernier contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire dont le gène de la NOS2, des gènes de cytokines pro inflammatoires (IL6, IL8, TNF α , IL-1 β ...), des chémokines et des molécules d'adhésions cellulaires (**Kelleher et al, 2007 ; Lawrence, 2009 ; Lan et al, 2012 ; Tanaka et al, 2014**). Il est impliqué également dans différents autres processus : la réponse au stress oxydatif, la cicatrisation, l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et l'apoptose (**Lan et al, 2012**).

La voie du NF- κ B a longtemps été considérée comme une voie pro-inflammatoire prototypique (**Lawrence, 2009**). Les résultats de notre étude, suggèrent donc, l'implication de cette voie dans la maladie du ptérygion. Il est probable qu'elle jouerait un rôle important dans sa pathogénèse et son évolution. Ces hypothèses sont soutenues par les travaux de (**Siak et al, 2011**), qui ont montré une forte expression du NF- κ B au niveau de sections de ptérygions mais également une augmentation de la phosphorylation de l'I κ B α (l'I κ B α non phosphorylé empêche la pénétration du NF- κ B dans le noyau) au niveau des fibroblastes de ptérygions traités par le TNF- α (**Siak et al, 2011**).

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est essentiellement régulé par deux processus : la prolifération et l'apoptose cellulaire (**Tan et al, 2000**). Dans le but de vérifier l'implication de la voie anti-apoptotique dans le développement du ptérygion, nous avons évalué l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) dans les sections des malades et celles des témoins négatifs. Nos résultats ont révélé une surexpression de cette protéine, dans l'épaisseur des cellules épithéliales des ptérygions et particulièrement au niveau de leur couche basale. Un faible marquage a également été observé autour des vaisseaux sanguins et des zones avoisinantes (au niveau du tissu conjonctif des ptérygions). Ces observations sont en accord avec celles de (**Tan et al, 2000**) et (**Liang et al, 2011**).

Ayant un rôle opposé à celui du Bcl-2, mais faisant partie de la même famille, la protéine pro-apoptotique Bax (Bcl-2-associated X protein), a été mentionnée par certains

auteurs comme étant exprimée de la même manière dans les conjonctives normales et les sections de ptérygions (**Tan et al, 2000 ; Liang et al, 2011 ; Feng et al, 2017**). D'après ces résultats, nous pouvons supposer que la protéine Bcl-2 est impliquée dans la formation du ptérygion via un phénomène de perturbation de l'homéostasie cellulaire. Ce déséquilibre serait en faveur de la voie anti-apoptotique (en faveur d'une prolifération cellulaire accrue). Plusieurs auteurs ont indiqué l'implication de cette protéine dans le développement de certains cancers (**Thomadaki et Scorilas, 2006 ; Yip et Reed, 2008 ; Huang et al, 2015**).

En effet, le ptérygion partage des traits similaires avec les tumeurs tels que la prolifération cellulaire incontrôlée, l'invasion de la cornée et la récurrence après une résection (**Liang et al, 2011**). Plusieurs auteurs évoquent l'existence d'une relation entre l'inflammation chronique et la formation des tumeurs (**Coussens et Werb, 2002**). On pense que les cytokines pro-inflammatoires (tels que le TNF- α), synthétisées par les cellules tumorales ou les cellules inflammatoires dans le microenvironnement tumoral peuvent favoriser la survie des cellules tumorales par l'induction de gènes codant pour des molécules anti-apoptotiques dépendantes du NF- κ B (tels que les gènes de la protéine Bcl-2) (**Kabel, 2014**). Il serait donc possible que ce facteur de transcription, trouvé surexprimé dans nos biopsies de ptérygions, joue un double rôle dans l'induction de l'inflammation (surexpression de la NOS2) et dans la cancérogénèse par la régulation positive des gènes du Bcl-2 (surexpression de la protéine Bcl-2) (**Heckman et al, 2002**).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'irritation de la surface oculaire essentiellement par les rayons UV, peut conduire à une inflammation. Celle-ci peut provoquer une perturbation de la prolifération cellulaire ce qui conduirait au final, à la formation du ptérygion. L'inhibition de la voie NF- κ B et / ou du Bcl-2 pourrait constituer une stratégie thérapeutique, pour arrêter ou retarder la progression du ptérygion et sa récurrence.

Après avoir effectué une étude histologique et immunohistochimique, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de certains paramètres au niveau des sérums sanguins (CRP, Immunoglobulines «IgG, IgA, IgM», Cytokines «IL-17A, IL-6, IL-10 » et NO), du plasma «vitesse de sédimentation VS» et des larmes (Cytokines «IL-17A, IL-6, IL-10» et NO) des patients atteints de ptérygion.

La concentration de la CRP au niveau des sérums sanguins des patients présentant des ptérygions est légèrement supérieure à celle des témoins sains mais elle est statistiquement non significative. Synthétisée essentiellement par le foie, mais aussi par le tissu adipeux, sous l'action principale de l'IL-6, de l'interleukin-1 β (IL-1 β) et du tumor necrosis factor- α (TNF- α), la CRP constitue une protéine de la phase aiguë (son taux

augmente dans les quelques heures ou jours qui suivent le processus inflammatoire) de l'inflammation aigüe et chronique (**Genest, 2010 ; Bansal et al, 2014**). Elle a été évoquée par certains auteurs comme étant un marqueur général et non spécifique de l'inflammation (**Dhingra et al, 2007**). Il a été mentionné dans certaines études, que la CRP sérique représentait un indicateur de quelques maladies inflammatoires chroniques (les maladies cardiovasculaires) (**Dhingra et al, 2007**). Le ptérygion est une maladie oculaire à évolution lente et progressive (**Liu et al, 2017**). L'œil est un organe immunitaire privilégié. La surface oculaire comporte un réseau de cellules inflammatoires extrêmement nombreuses, faisant partie du système Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT). Ce dernier joue un rôle fondamental dans sa protection (**Pisella et al, 2015**). Dans notre étude, le taux quasi normal de la CRP sérique retrouvé chez les patients présentant des ptérygions signifierait probablement que la réponse inflammatoire se fait plus au niveau de l'œil qu'au niveau systémique. Cette protéine ne représenterait donc pas un marqueur sérique nécessaire et spécifique au diagnostic du ptérygion. Une étude américaine récente sur l'évaluation de l'inflammation de la cornée provoquée par le port de lentilles de contacts a mis en évidence la présence d'une petite quantité de CRP mais localisée au niveau des larmes (**Barett et al, 2014**). Cette nouvelle découverte ne peut pas être confirmée que par une seule étude. Il serait donc souhaitable de refaire les dosages de la CRP au niveau local et systémique en élargissant l'échantillonnage.

En Complément du dosage de la CRP et d'autres protéines de l'inflammation, la VS, est utilisée pour le diagnostic et la surveillance des maladies inflammatoires (évolution et intensité du processus inflammatoire) (**Weill et Batteux, 2003 ; Larousse, 2006**). Les patients atteints de la maladie du ptérygion semblent avoir une VS supérieure à celle des témoins sains. La différence entre les deux vitesses est statistiquement significative. Même si ce résultat ne suffit pas à lui seul, il suggère l'existence d'une relation entre l'inflammation et la maladie du ptérygion.

Dans notre étude, le dosage sérique des immunoglobulines des patients présentant des ptérygions a révélé la présence très hautement significative des immunoglobulines G et significative des immunoglobulines M. La concentration des immunoglobulines A est légèrement supérieure à sa concentration au niveau des sérums des témoins sains mais la différence semble être statistiquement non significative. Ces résultats signifient qu'il existerait éventuellement une relation entre le ptérygion et la réaction immunitaire humorale. Aucune étude sur le ptérygion ayant comme but d'évaluer les concentrations des immunoglobulines sériques, n'a été jusqu'à présent entreprise. Cependant, quatre études ont

révélé la présence des immunoglobulines G, M, A et E localement au niveau des biopsies de ptérygion, en suggérant l'incrimination de l'hypersensibilité dans la pathogénèse de cette maladie (**Pinkerton et al, 1984 ; Liu et Yang, 1993 ; Liu, 1993 ; Perra et al, 2002**).

Les cytokines pro-inflammatoires IL-17A et IL-6 sont synthétisées respectivement et majoritairement par les T helper 17 (Th17) et les macrophages (**Zhang et Jianxiong, 2007 ; Jin et Dong, 2013**). Par rapport aux témoins sains, la concentration de ces deux cytokines semble être plus élevée dans les sérums et les larmes des patients présentant des ptérygions. De manière intéressante, elle semble être plus élevée au niveau des larmes qu'au niveau des sérums sanguins. Nous pouvons ainsi croire à l'existence d'une relation entre la réponse inflammatoire locale et la maladie du ptérygion. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats précédents sur la présence des infiltrats inflammatoires et la surexpression des CD3 et CD68 au niveau des sections malades. De plus, certaines études sur le ptérygion, ont montré une expression élevée et locale de ces cytokines. En effet, il a été remarqué que L'IL-17 est significativement exprimée au niveau des biopsies de ptérygions et du film lacrymal de patients récidivants (**Baustia et al, 2013 ; Tiong et al, 2017**). Certains auteurs évoquent la surexpression de l'IL-6 et de l'IL-8 au niveau de l'épithélium des sections de malades, en comparaison avec des cornées, des conjonctives et des limbes témoins. Il a également été remarqué, que ces deux cytokines sont significativement plus exprimées au niveau des ptérygions traités par les UVB que ceux qui sont non traités, ce qui confirme le rôle important des UV dans la formation de cette maladie (**Di Girolamo et al, 2002 ; Feng et al, 2017**).

L'IL-6 est un médiateur soluble pléiotropique ayant plusieurs effets dans l'inflammation aigue et chronique, la réponse immunitaire et l'hématopoïèse (**Kamimura et al, 2014 ; Tanaka et al, 2014**). Elle est sécrétée par plusieurs cellules (cellules inflammatoires «cellules T, monocytes /macrophages», les cellules Natural killer (NK), les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les ostéoblastes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules stromales de la moelle osseuse ainsi que certaines cellules tumorales. Cette sécrétion survient en réponse à plusieurs stimuli tels que : les prostaglandines E2, platelet derived growth factor (PGF), epidermal growth factor (EGF), UVB, les cytokines pro inflammatoires (l'IL1, l'IL17 et le TNF α) et les récepteurs de type Toll «TLRs : toll like receptor ligands» quand ils sont liés (dans certains cas) aux motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires DAMPS (Damage Associated Molecular Patterns). Ces stimuli déclenchent la voie du facteur de transcription NF- κ B (**Galanaud et al, 1989 ; Di Girolamo et al, 2002 ; Kamimura et al, 2003 ; Dubin, 2007 ; Kamimura et al, 2014 ; Tanaka et al, 2014**). Une fois libérée, l'IL6 agit sur plusieurs cibles cellulaires

(immunitaires et non immunitaires) en activant le STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3). Ce facteur de transcription stimule l'expression de plusieurs gènes de protéines : de la phase aigüe de l'inflammation, de la différenciation et la maturation des cellules immunitaires, de l'angiogenèse, du remodelage tissulaire et de l'anti-apoptose (**Carpenter et Lo, 2014**). En effet, l'IL-6 a plusieurs activités biologiques dépendantes du STAT3 (**Carpenter et Lo, 2014**). Elle régule positivement la synthèse de la CRP par les hépatocytes et induit la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (stimule la production de l'IL-21 qui régule la synthèse des immunoglobulines en particulier des IgG4). Elle joue un rôle dans l'angiogenèse et donc dans l'inflammation en stimulant la production du VEGF (néovascularisation), et en favorisant la perméabilité vasculaire (**Kamimura et al, 2014 ; Tanaka et al, 2014**).

En outre, il a été démontré que cette cytokine stimule l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP) et régule leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs : The tissue inhibitors of mettaloproteinases), ce qui favorise l'installation d'une fibrose (**Di Girolamo et al, 2002 ; Di Girolamo et al, 2004**). L'IL-6 a une activité antiapoptotique (stimule l'expression du Bcl-2) et induit la prolifération des cellules non immunitaires (**Tanaka et al, 2014**). Enfin, elle induit la différenciation des cellules T-CD8⁺ en cellules T cytotoxiques (**Kamimura et al, 2014**).

IL semble que cette cytokine soit vraisemblablement impliquée dans la pathogénèse du ptérygion. En effet, les résultats trouvés dans notre étude ; concernant particulièrement la sécrétion des immunoglobulines sériques, l'angiogenèse, l'anti-apoptose (Bcl-2) et la fibrose au niveau des biopsies de ptérygion concordent avec la majorité des effets de cette cytokine. Toutefois, le taux normal de la CRP trouvé précédemment dans notre étude pourrait être le résultat d'une concentration insuffisante de l'IL-6 sérique à stimuler sa synthèse par les hépatocytes. En effet, nous avons trouvé que la concentration de cette cytokine est plus élevée localement au niveau des larmes. Les inhibiteurs de l'IL-6 pourraient constituer un moyen thérapeutique pour la prévention et / ou le traitement du ptérygion.

L'IL-17 est incriminée dans plusieurs pathologies auto-immunes et inflammatoires (**Chen et Zhou, 2015**). Ses actions se rapprochent de celles de l'IL-6. Elle joue un rôle dans l'angiogenèse (stimule la sécrétion du TNF- α , de l'IL-8 et du VEGF). Elle inhibe l'action de la protéine pro-apoptotique Bax, stimule l'expression des MMPs et régule négativement leurs inhibiteurs TIMPs (**Chen et Zhou, 2015**). La production de tels médiateurs peut déclencher une cascade d'événements qui comprend l'inflammation, la prolifération, l'angiogenèse et

l'anti-apoptose (**Di Girolamo et al, 2002 ; Chen et Zhou, 2015**). Ce qui pourrait entraîner la formation du ptérygion et / ou sa progression.

L'IL17-A est synthétisée principalement par les Th17 (T helper 17). Ces derniers synthétisent également d'autres cytokines : IL-17 F, IL-21 et IL-22 (**Korn et al, 2009**). L'IL-17A et L'IL17-F sont produites accessoirement par d'autres cellules de l'immunité innée telles que : les cellules NK (Natural Killer), les cellules NK T (Natural Killer T), les granulocytes, les cellules $\gamma\delta$ T, Les cellules i Th17 (innate T helper 17), les macrophages et les cellules de Paneth (cellules de l'épithélium intestinal) (**Jin et Dong, 2013**). Le résultat de la concentration élevée de l'IL-17-A perçu dans notre étude suggère l'éventuelle implication de la voie Th17 dans la pathogénèse de cette maladie. Cette cytokine ainsi que ses voies de signalisation pourraient servir comme cibles prometteuses dans le développement de médicaments pour la prévention et/ou le traitement du ptérygion.

Il existe une relation étroite entre l'IL-17A et L'IL-6. En activant le facteur de transcription NF- κ B, l'IL-17A peut stimuler la synthèse de l'IL-6, plusieurs autres cytokines (IL-1 β , TNF α , TGF β et IL-8) ainsi que les prostaglandines et cela en agissant sur plusieurs cibles cellulaires (les monocytes/ macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les fibroblastes) (**Chen et Zhou, 2015**).

Chez l'humain, le TGF- β , l'IL-1 β et l'IL-23 en association avec l'IL-6 (libérée en réponse à l'IL-17A) sont indispensables à la différenciation des cellules T-CD4⁺ naïves en Th17 (**Cambrier et al, 2010 ; Chen et Zhou, 2015**). Cette différenciation passe par trois phases : l'induction, l'amplification et la stabilisation.

D'une manière simplifiée, en se fixant sur son récepteur, l'IL-6 induit la phosphorylation et donc l'activation du facteur de transcription STAT3 par les Janus Kinases 1 et 2 (JAK1 et JAK2) (**Cambrier et al, 2010 ; Owen et al, 2014**). Une fois activé, STAT3 se dimérise transloque dans le noyau où il augmente l'expression du facteur de transcription Retinoid-related Orphan Receptor gamma T (ROR γ T), en induisant la transcription du gène RORC (**Cambrier et al, 2010 ; Gaffen et al, 2014 ; Owen et al, 2014**). ROR γ T va réguler par la suite l'expression des gènes suivants : gènes des cytokines IL-17A et F, IL-21, IL-22, du récepteur de l'IL-23 (IL-23R), du CCL20 (chemokine Ligand 20) et CCR6 (chemokine receptor 6) (**Gaffen et al, 2014 ; De Simone et al, 2015 ; Gastro et al, 2017**). En plus du gène RORC (gène du facteur de transcription ROR γ T) et son isoforme RAR α (Retinoic Acid Receptor alpha), le facteur de transcription STAT3 induit l'expression de plusieurs autres gènes de facteurs de transcription jouant un rôle dans la différenciation des Th17 : les gènes BATF (Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like), IRF4 (Interferon Regulatory

Factor 4) , AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) , c -Maf (c avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene) (**Durant et al, 2010**).

Bien que toutes les étapes de différenciation des Th17 exigent la présence du TGF- β (synthétisée par les monocytes/macrophages, cellules T...), son rôle exact reste inconnu. Il a été évoqué que cette cytokine conditionne les cellules TH-17 à être plus sensible à l'action d'autres cytokines. L'IL-6 induit par le biais de STAT3, l'expression d'un taux faible de ROR γ T qui augmente en présence du TGF- β (**Qin et al, 2009 ; Poniatowski, 2015**). La voie Th17 est amplifiée par l'IL-21 et est stabilisée par l'IL23 (synthétisée par les macrophages, cellules dendritiques ...) (**Cambrier et al, 2010 ; Lee et al, 2010**). En effet, L'IL-21 agit de manière autocrine avec le TGF- β pour induire la multiplication des cellules Th17. Elle favorise également l'expression du récepteur de l'IL-23. Il a été rapporté que les cellules T CD4 naïves (Th0 : T helper zero) n'expriment pas ce type de récepteur. Cela suggère que l'IL-23 n'est pas essentielle à l'initiation de la différenciation des Th17. Néanmoins le maintien du phénotype Th17 nécessite sa présence (**Korn et al, 2009**). En ce qui concerne le rôle de l'IL-1 β (synthétisée par les macrophages et les cellules dendritiques...) chez l'humain ; il semblerait qu'elle agisse en synergie avec l'IL-6 et /ou l'IL-23 pour induire la différenciation des TCD4 naïves en Th17. Elle régulerait l'expression du ROR γ t et de l'IRF4 et elle serait essentielle pour maintenir l'expression du profil cytokinique de ces cellules (**Chung et al, 2009 ; Lee et al, 2010**). Chez les souris, l'IL-1 β jouerait un rôle dans l'amplification de la différenciation des Th 17 induite par la combinaison des deux cytokines : IL-6 et TGF- β (**Veldhoen et al, 2006 ; González -Garcia et al, 2009**).

En résumé, STAT3 phosphorylé (activé) par l'IL-6 joue un rôle clé dans la différenciation des cellules T CD4 naïves en Th 17 sécrétrices d'IL-17A. Cette cytokine va à son tour induire la synthèse de l'IL-6 et ainsi de suite. La production continue de ces cytokines proinflammatoires semble maintenir un état de chronicité de l'inflammation dans la maladie du ptérygion (**Kamimura et al, 2014**). La mise en place de molécules inhibitrices de la voie STAT3 pourraient constituer une stratégie thérapeutique pour le traitement et /ou la prévention du ptérygion.

Nos résultats sur l'interleukine 10 (IL-10) indiquent que sa concentration dans les larmes et les sérums des patients présentant des ptérygions se rapproche de celle des témoins sains. Toutefois, une étude récente sur l'évaluation de la concentration de la même cytokine au niveau des sections de ptérygions et de conjonctives normales a montré un résultat différent au notre ; l'IL-10 et le facteur de transcription des lymphocytes T régulatrices

(LTreg), Foxp3 (Forkhead box p3) semblaient être plus exprimés dans les biopsies des malades (**Liu et Sun, 2014 ; Feng et al, 2017**).

Suite au résultat que nous avons trouvé, il a également été remarqué que la concentration de cette cytokine est supérieure dans les larmes que dans les sérums des patients. Sa synthèse et sa sécrétion semblent donc se faire au niveau de l'œil malade (localement). Les médiateurs inflammatoires (IL17-A et IL-6) sont abondamment présents dans les larmes. Par conséquent, la concentration de l'IL-10 (immuno-suppressive et anti-inflammatoire) semble être insuffisante pour réguler le processus inflammatoire. En effet, Il est connu que Le TGF- β qui stimule la différenciation des cellules T-CD4⁺ naïves en LTreg productrices d'IL-10 et de TGF- β est inhibé par l'IL-6 (**Betelli et al, 2006 ; Tanaka et al, 2014**). Certains travaux incriminent le phénomène de conversion T reg en Th17 en présence de l'IL-6 et de l'IL-1 β (**Touil- Boukoffa et al, 2016**). Il a été admis par plusieurs auteurs que la perturbation de la balance Th17/Treg vers la voie Th17 soit une cause des maladies auto-immunes et inflammatoires (**Kimura et Kishimoto, 2010 ; Tanaka et al, 2014**).

Le principal facteur étiologique incriminé dans l'apparition du ptérygion est l'exposition aux rayons UV. Ces derniers induisent une production excessive de radicaux libres qui causent des dommages cellulaires oxydatifs en agissant sur les macromolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Parmi les radicaux libres, nous pouvons citer : l'ion superoxyde O₂⁻ et le peroxy-nitrite (ONOO⁻) qui est un dérivé du NO et de l'O₂⁻ (**Tripathi et al, 2007 ; Balci et al, 2011 ; Kormanovski et al, 2014**). Il a été rapporté qu'une mutagénèse provoquée par les effets de ces espèces réactives de l'oxygène pourrait être le déclencheur principal des maladies oculaires non cancéreuses, telles que le ptérygion (**Kormanovski et al, 2014**). En effet, Il a été établi qu'une surexposition aux rayonnements UV altère les cellules souches limbiques et induit la mutation de certains gènes des cellules épithéliales conjonctivales (gène de la protéine p53), ce qui résulterait en une prolifération cellulaire incontrôlée et l'invasion de la cornée (**Chen et al, 2018**). Le NO joue un rôle important dans l'immunité et l'inflammation. Il pourrait être cytotoxique pour les cellules qui le produisent et les cellules avoisinantes. Sa cytotoxicité est plus élevée lorsqu'il se lie aux espèces réactives de l'oxygène. Il est également vasodilatateur et intervient dans la perméabilité vasculaire et la formation des œdèmes (**Tripathi et al, 2007 ; Balci et al, 2011**).

Il a été démontré que l'exposition chronique à la lumière ultraviolette déclenche, par une réaction photochimique, une surproduction cellulaire de ce radical (**Kormanovski et al, 2014**). Des études antérieures ont montré des résultats controversés concernant sa présence au niveau des ptérygions. (**Ozdemir et al, 2005**) ont trouvé des niveaux de NO réduits dans les

biopsies des patients alors que l'équipe de **(Balci et al, 2011)** et de **(Kormanovski et al, 2014)** ont montré une augmentation de sa teneur au niveau des mêmes tissus. Bien que notre étude, soit réalisée à la fois sur les sérums et les larmes des patients atteints de ptérygions, nos résultats sont conformes à ceux des deux dernières études. De plus, les concentrations anormalement élevées de NO retrouvées dans les larmes des malades ont été supérieures à celles retrouvées dans leurs sérums. Ce résultat est conforté par l'expression locale de la NOS2, suggérant une production locale de cette molécule dans les tissus de ptérygions.

Toutes ces données indiquent l'incrimination probable du NO dans le déclenchement et le développement de la maladie. Neutraliser cette molécule pourrait constituer un moyen de traitement ou de prévention du ptérygion.

L'ensemble de nos résultats sont résumés dans un schéma hypothétique, montrant l'implication probable de la voie Th17 et des voies NF- κ B /IL-6/ STAT3 dans la pathogénèse du ptérygion **(Figure.27)**.

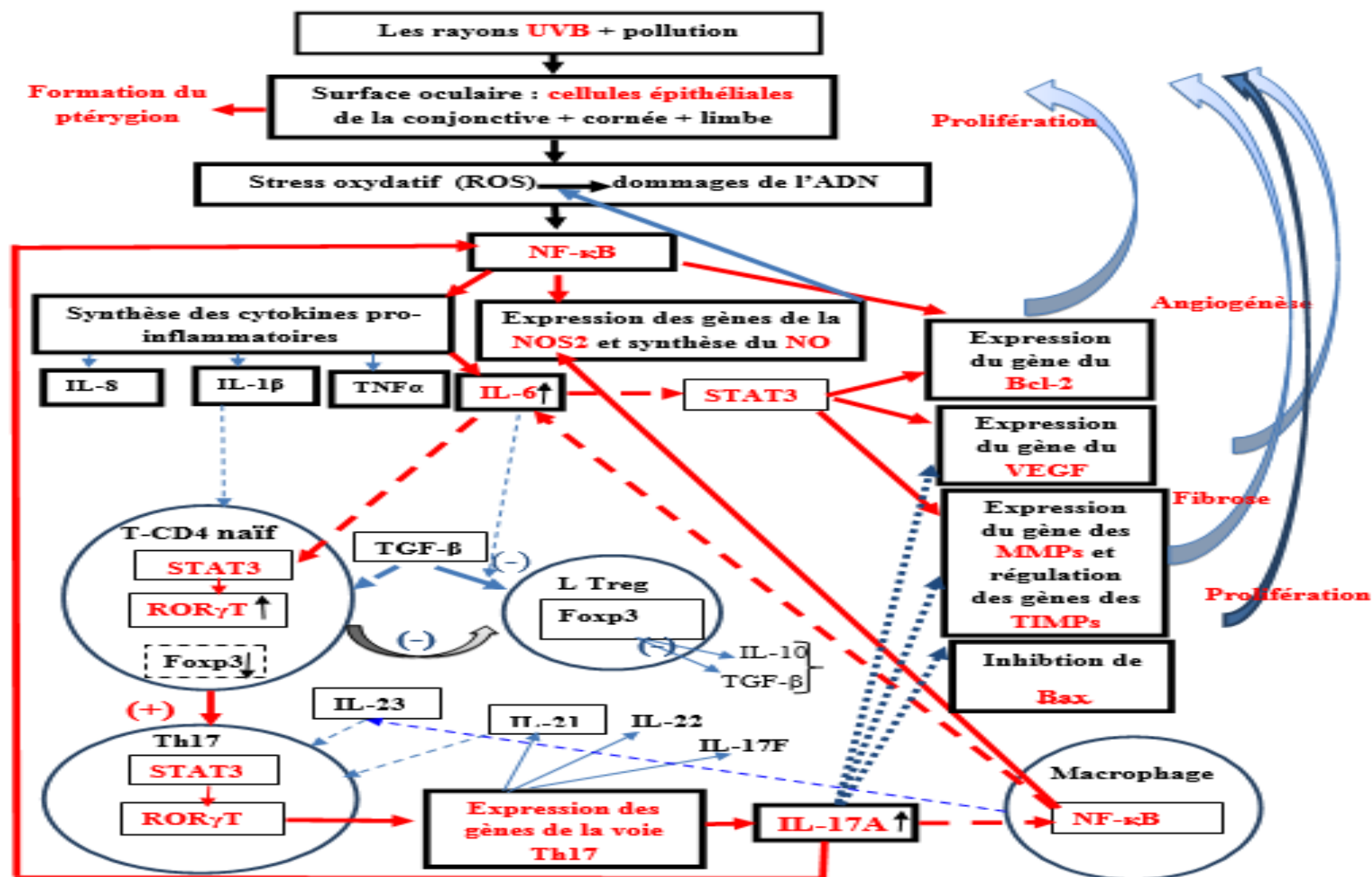


Figure.27 : Implication probable de la voie Th17 et des voies NF-κB / IL-6/ STAT3 dans la pathogénèse du ptérygion.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les résultats retrouvés dans notre étude, nous permettent d'émettre les conclusions suivantes :

Au niveau de la clinique ophtalmologique du CHU Ibn Rochd-Annaba et durant l'année 2016, la fréquence hospitalière du ptérygion était de 3.7 % avec une prédominance masculine. C'est une maladie de l'adulte. Elle touche une population de 26 à 93 ans avec une moyenne d'âge de 58 ans $\pm$ 14 ans. Les professions masculines (Maçons, agriculteurs, soudeurs...) sont plus sujettes que les professions féminines (Femme au foyer et femme de ménage) à la survenue de cette pathologie.

Plusieurs paramètres histologiques, immunohistochimiques et sériques ont été évalués afin de déterminer l'implication de l'inflammation dans la pathogénèse du ptérygion.

Nous pensons que cette maladie est d'origine conjonctivale en raison de son analogie histologique avec une conjonctive saine. Elle se différencie de cette dernière par une hyperplasie épithéliale (présence accrue de cellules caliciformes), une fibrose et de nombreux néo-vaisseaux au niveau des tissus conjonctifs. Ces modifications histologiques seraient probablement en relation avec l'angiogénèse. On a retrouvé également des infiltrats inflammatoires denses et invasifs autour de ces vaisseaux et touchant le bord inférieur de l'épithélium. L'étude immunohistochimique que nous avons entreprise, sur ces infiltrats a montré la présence prédominante de lymphocytes T (surexpression du CD3). Nous avons également retrouvés des macrophages (surexpression du CD68) et de lymphocytes B (surexpression du CD20). Ces derniers (lymphocytes B) se retrouvent uniquement au niveau du tissu conjonctif.

L'évaluation des paramètres sériques suivants : CRP, VS et immunoglobulines (IgG, IgA et IgM) chez des patients atteints de ptérygions, a révélé les résultats suivants :

La VS et la concentration des immunoglobulines IgG et IgM sont plus élevées que la normale, suggérant l'implication probable de l'inflammation et de la réponse immunitaire humorale dans le ptérygion. Toutefois, des concentrations normales de CRP et d'IgA sériques ont également été remarquées. Ces deux derniers paramètres ne constituent probablement pas des marqueurs spécifiques pour le diagnostic de la maladie. Le ptérygion est une maladie de la surface oculaire. L'oeil constitue un organe immunitaire privilégié. Les taux normaux de la CRP et de l'IgA sériques pourraient signifier que l'activation de la réponse immunitaire humorale et inflammatoire, en relation avec le ptérygion, se fait plus, au niveau local que systémique. En effet, nous avons remarqué que les patients atteints de ptérygion présentent

des concentrations anormalement élevées des cytokines pro- inflammatoires : IL-17A et IL-6, au niveau des larmes et des sérums sanguins. Néanmoins, elles sont plus abondantes au niveau des larmes.

Parallèlement, la concentration normale de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire et immuno- régulatrice) dans les deux liquides biologiques semble être insuffisante pour réguler le processus inflammatoire, suggérant un déséquilibre de la balance Th17/ Treg en faveur de la voie Th17 qui pourrait donc jouer un rôle majeur dans la pathogénèse du ptérygion.

En comparaison avec des témoins sains, les concentrations sériques et lacrymales de NO sont anormalement élevées. Le taux le plus élevé est retrouvé au niveau des larmes.

Il est à noter que c'est la première fois qu'une évaluation des cytokines et du NO a été réalisée au niveau des larmes de patients atteints de ptérygion.

La surexpression concomitante de la NOS2 et du CD68 (marqueur des macrophages, principale source de la NOS2) au niveau de l'épithélium et du tissu conjonctif des biopsies du ptérygion, ainsi que la présence d'un taux anormalement élevé de NO lacrymal, indique l'éventuelle implication de ce médiateur de l'inflammation dans l'étiopathogénie de la maladie.

Le NF- κ B est un facteur de transcription reliant l'inflammation à l'apoptose. Il est anormalement surexprimé dans les biopsies de ptérygions en même temps que les protéines dont il régule positivement l'expression (la NOS2, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6). Comme pour la NOS2 et le Bcl-2, le NF- κ B s'exprime anormalement au niveau du tissu épithélial et du chorion. Il est intéressant de remarquer que le Bcl-2 est fortement exprimé au niveau de la couche épithéliale. Il est donc permis de supposer que la formation du ptérygion et sa progression pourraient être le résultat d'un état inflammatoire favorisant une prolifération cellulaire anormale.

A l'avenir nous pouvons :

- Doser l'IgA sécrétoire et les autres immunoglobulines au niveau des larmes et évaluer leur expression au niveau des biopsies du ptérygion.
- Evaluer l'expression locale de la NOS3, des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17A, TNF- α), anti-inflammatoire (IL-10) au niveau des cultures de biopsies ptérygiales et entreprendre des systèmes d'induction de ces cytokines et du NO sur des PBMC (cellules mononuclées sanguines périphériques) de patients.
- Elargir l'éventail du dosage d'autres cytokines pro-inflammatoires et anti- inflammatoires (IL-22, IL-27, IL-35...).

- Evaluer l'expression des facteurs de transcription STAT3, ROR γ T, pour confirmer ou infirmer l'implication de la voie Th17 dans l'étiopathogénie de la maladie.
- Evaluer la balance entre l'expression des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille du Bcl-2.
- Situer, l'influence des hormones sexuelles dans la pathogenèse du ptérygion.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Abbas AK, Lichtman A H (2009). Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Ed Elsevier Masson SAS, p : 19, 28, 44, 114- 270.

Abdelaoui A (2014). Le Ptérygion : expérience du service d'ophtalmologie du CHU Mohammed VI de Marrakech. Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine et de pharmacie- Marrakech, Université Cadi Ayyad, maroc, p : 11, 102.

Ailem A, Lehtihet Y, Mokrani K, Abderrahim R, Ailem Y, Hartani D, Aouchiche M (2007). Le ptérygion dans la région d'Alger : aspects cliniques, épidémiologiques et thérapeutiques. Journal Français d'ophtalmologie Vol. 30, hors-série 2, p : 2s183.

Ali H, Haribabu B, Richardson R M, and Snyderman R (1997). Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. Med Clin North Am 81 (1): 1-28.

Allione A, Bernabei P, Bosticardo M, Ariotti S, Forni G, Novelli F (1999). Nitric oxide suppresses human T lymphocyte proliferation through IFN-gamma-dependant and IFN-gamma independent induction of apoptosis. J. Immunol 163(8):4182-91.

Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. Proc Natl Acad Sci USA. 98(26):15294-9.

Anderson EW, Dwarakanathan S, Haddadin R (2017). Experimental use of an extracellular matrix graft in pterygium surgery Digit J Ophthalmol 23(4):15-17.

Ang LP, Chua JL, Tan DT (2007). Current concepts and techniques in pterygium treatment. Curr Opin Ophthalmol. 18(4):308-13.

Ang M, Li X, Wong W, et al (2012). Prevalence of and racial differences in pterygium a multiethnic population study in Asians. Ophthalmology 119:1509-1515.

Aouiche M (1999). Technique d'excision du ptérygion. Journal Algérien d'ophtalmologie, Vol 00, p : 49.

Argueso P (2013). Glycobiology of the ocular surface: mucins and lectins. *Jpn J Ophthalmol* 57: 150-5.

Aslan L, Aslankurt M, Aksoy A, Ozdemir M, Yüksel E (2013). Comparison of wide conjunctival flap and conjunctival autografting techniques in pterygium surgery. *J Ophthalmol* 2013:209401.

Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, Ioachim E, Skyrilas A, Stefaniotou M and Malamou-Mitsi V (2007). Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye (Lond)* 21:1095-1101.

Ayena KD, Tatounou EK, Dzidzinyo K, Banla M, Amedome KM, Balo K (2010). Ptérygion en milieu rural au Togo : cas du canton d'Aklakou. *Medecine D'Afrique Noire* 57(6): 305-310.

B

Babior BM, Golde D W (2001). Production, distribution, and fate of neutrophils. *ED Seligsohn*, New York, p: 753-759.

Bakhoun S (2006). Guide médical de poche. Examens biologiques. *Ed Vernazobres-grego*, p: 209, 211.

Balci M, Sahin S, Mutlu FM, Yağci R, Karanci P, Yildiz M (2011). Investigation of oxidative stress in pterygium tissue *Mol Vis* 17:443-7.

Bansal T, Pandey A, D D, Asthana AK (2014). C - reactive protein (CRP) and its Association with Periodontal Disease: A Brief Review. *J Clin Diagn Res* 8(7): ZE21–ZE24.

Barett A, Gnehm D, Jones J, Trask B C (2014). α 1 antitrypsin and C-reactive protein levels in tear fluid after continuous contact lens wear. *Clin Exp Optom* 97:66-71.

Barnes PJ, Chung AKF, Page CP (1998). Inflammatory Mediators of Asthma: An Update. *Pharmacol Rev* 50(4): 515-596.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz

DE, Hare JM (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416(6878):337-9.

Barry Lee W, Mannis MJ (2013). Ocular surface disease: Cornea, conjunctiva and tear film. Histological concepts of ocular surface disease. ED Elsevier, p: 3-10.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.

Battelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007). T (H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 8:345-50.

Bautista V, Rangel-Acosta N, López-Espinosa N L, Nava-Castañeda A (2013). Cytokine tear film expression in patients with primary and recurrent pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(15) : 5438.

Beadeux JL et Durand G (2008). Biochimie médicale-Marqueurs actuels et perspectives. 2ème Ed Medecine Sciences Publications, Lavoisier p : 103, 104.

Belguendouz H, Messaoudène D, Lahmar K, Ahmedi L, Medjeber O, Hartani D, Lahlou-Boukoffa O, Touil-Boukoffa C (2011). Interferon- γ and nitric oxide production during Behçet uveitis: immunomodulatory effect of interleukin-10. *J Interferon Cytokine Res* 31(9):643-51.

Beltran B, Orsi A, Clementi E, Moncada S (2000). Oxidative stress and S- nitrosylation of proteins in cells. *Br J pharmacol* 129: 953-960.

Benchabane S, Belguendouz H, Behairi N, Arroul-Lammali A, Boudjelida A, Youinou P, Touil-Boukoffa C (2018). Cardamonin inhibits pro-inflammatory cytokine production and suppresses NO pathway in PBMCs from patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 40(2):126-133.

Benchabane S, Boudjelida A, Toumi R, Belguendouz H, Youinou P, Touil-Boukoffa C (2016). A case for IL-6, IL-17A, and nitric oxide in the pathophysiology of Sjögren's syndrome. *Int J Immunopathol Pharmacol* 29(3):386-97.

Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR (2005). STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J* 392 (Pt 2):335-44.

Bialasiewicz AA, Schaudig U, Ma JX et al (1996). Alpha/beta and gamma delta T- cell receptor positive lymphocytes in healthy and inflamed human conjunctiva. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:467-71.

Bogdan C (1998). The multiplex function of nitric oxide in auto immunity. *J. Exp. Med.* 187(9): 1361-1365.

Bogdan C, Nathan C (1993). Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 685:713-39.

Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, Mansuy D (1994). N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 203(3):1614-21.

Boulaneb-Bediar F (2014). Ptérygion au CHU Annaba : Etude épidémiologique, clinique et traitement par la greffe limbo-conjonctivale. Thèse de doctorat en sciences médicales. Faculté de médecine. Université Badji Mokhtar -Annaba, p : 1-137.

Bouyaqba S (2014). La chirurgie géométrique : Une nouvelle technique pour traiter le ptérygion (A propos de 30 cas). Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine et de pharmacie. Université Sidi Mohammed Benabdellah, Fes, Maroc, p : 33,55, 56.

Brézin A (2010). Les uvéites. Ed Elsevier Masson. Société française d'immunologie, Paris, p : 10,11.

Butovich IA (2009). The meibomium puzzle: combining pieces together. *Prog Retin Eyes Res*: 357-68.

C

Cals-Grierson MM, Ormerod AD (2004). Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*. 10(4):179-93.

Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, Sabbagh L , Ono N, Elford A R , Mak T W, Ohashi PS (2007). TNF- α is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* 117(12) : 3833–3845.

Cambier L, Defaweux V, Baldo A, Mathy A, Tabart J, Bagut ET, Antoine N, Mignon B (2010). Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes. *Ann Méd Vét* 154: 104-112.

Carpenter RL, Lo HW (2014). STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel)* 6(2):897-925.

Castro G, Liu X, Ngo K, De Leon-Tabaldo A, Zhao S, Luna-Roman R, Yu J, Cao T, Kuhn R, Wilkinson P, Herman K, Nelen MI, Blevitt J, Xue X, Fourie A, Fung-Leung WP (2017). ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *PLoS One* 12(8):e0181868.

Cebra P (2007). Guide des analyses spécialisées. 5 ème ED Elsevier/ Masson SAS et Laboratoire Pasteur Cerba, p : 597, 608-613.

Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N (2004). Immunologie clinique : De la théorie à la pratique, avec cas cliniques. Ed De Boek, Bruxelles, p : 22.

Chen J, Liu X, Jiao H, Peng L, Huo Z, Yang W, Shen Q, Li T, Liu Q (2015). Prognostic and clinical significance of STAT3 and MMP9 in patients with gastric cancer: a meta-analysis of a Chinese cohort. *Int J Clin Exp Med.* 8(1):546-57.

Chen XW, Zhou SF (2015). Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF- κ B axis, and tumorigenesis. *Drug Des Devel Ther.* 9:2941-6.

Chen YY, Tsai CF, Tsai MC, Chen WK, Hsu YW, Lu FJ (2018). Anti-fibrotic effect of rosmarinic acid on inhibition of pterygium epithelial cells. *Int J Ophthalmol.* 11(2):189-195.

Chen Z, O'Shea JJ (2008). Th17 cells: a new fate for differentiating helper Tcells. *Immunol Res* 41:87-102.

Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC (2001). Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 291: 2150-2155.

Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N (2011). Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol.* 178(2):817-27.

Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT (2008). The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 6 (1):24-43.

Chujor CS, Klein L, Lam C (1996). Selective inhibition of interleukin-1 beta gene expression in activated RAW 264.7 macrophages by interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 26(6):1253-9.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30(4):576-87.

Clark DA, Coker R (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30(3):293-8.

Clearfield E, Muthappan V, Wang X, Kuo IC (2016). Conjunctival autograft for pterygium. *Cochrane Database Syst Rev.* 2 : CD011349.

Cohen MC, Cohen S (1996). Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol.* 105(5):589-98.

Coleman JW (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1(8):1397-406.

Coussens LM, Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-7.

D

Danson EJ, Choate JK, Paterson DJ (2005). Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther* 106(1):57-74.

Dawn B, Xuan YT, Guo Y, Rezazadeh A, Stein AB, Hunt G, Wu WJ, Tan W, Bolli R (2004). IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res* 64(1):61-71.

De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C (2015). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene* 34(27): 3493-503.

De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE (1992). Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4 : 314-20.

Dhingra R, Gona P, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Benjamin EJ, O'Donnell CJ (2007). C - reactive protein, Inflammatory Conditions and Cardiovascular Disease Risk. *Am J Med* 120(12): 1054–1062.

Di Girolamo N, Chui J, Coroneo M T., Wakefield D (2004). Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 23(2):195-228.

Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D (2002). UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(11):3430-7.

Dinarello CA, Moldawer LL (1999). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Thousands Oaks, Amgen Inc : 19-35.

Dinarello CA (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* (20): s1-s13.

Dinarello CA (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Ed BLOOD*, 117 (14) p: 3720-3732.

Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr (1988). Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol* 18(10) : 1587-92.

Driss V (2008). Les éosinophiles : effecteurs de la réponse immunitaire innée anti-mycobactérienne. Thèse de doctorat en immunologie. Université Lille2, France, p : 10-12.

Dubin PJ, McAllister F, Kolls JK (2007). Is cystic fibrosis a TH17 disease? Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society 56(6):221-7.

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

Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F, Eberl G, Peduto L (2012). Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12 (+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. Nat Med 18(8):1262-70.

Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F, O'Shea JJ (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity 32(5):605-15.

Durante W, Johnson FK, Johnson RA (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. Clin Exp Pharmacol Physiol 34(9):906-11.

Durkin SR, Abhary S, Newland HS, Selva D, Aung T, Casson R J (2010). The prevalence, severity and risk factors for pterygium in central Myanmar: the Meiktila Eye Study. Br J Ophthalmol (92) :25-9.

Džunić B, Jovanović P, Veselinović D, Petrović A, Stefanović I, Kovačević I. (2010). Analysis of pathohistological characteristics of pterygium. Bosn J Basic Med Sci 10(4): 307-13.

E

Eballé AO, Atipo-Tsiba PW, Ngam NNA, Mvogo, CE (2018). Clinical and Epidemiological Characteristics of Pterygium Seen in Laquintinie Hospital of Douala-Cameroon". EC Ophthalmology 9.1 p : 24-27.

Ebana Mvogo C, Bella-Hiag A, Ngosso A, Ellong A (1997). Le Ptérygion : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques à l'hôpital général de Douala. Médecine d'Afrique Noire 44 (5) : 290-292.

Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 19(14): 5910-8.

El Mélaoui M (2016). Traitement du ptérygion par chirurgie géométrique modifiée (A propos de 50 cas). Thèse pour l'obtention d'un diplôme de spécialité en médecine. Option : Ophtalmologie. Université Sidi Mohammed Ben Abdallah. Faculté de médecine et de pharmacie, Fes, Maroc, p : 19, 23.

Eugène NP, Ouaz D F, Mossalayi D M, Follézou J Y, Débré P, Kolb J P, Dugas B (1995). Rôle du CD23 dans la production de monoxyde d'azote par les monocytes humains. *Médecine/ Sciences* 11: 1653-9.

F

Fang FC (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 99(12): 2818–2825.

Faure V, Hecquet C, Courtois Y, Goureau O (1999). Role of interferon regulatory factor-1 and mitogen-activated protein kinase pathways in the induction of nitric oxide synthase-2 in retinal pigmented epithelial cells. *J Biol Chem* 274(8):4794-800.

Feng QY, Hu ZX, Song XL, Pan HW (2017). Aberrant expression of genes and proteins in pterygium and their implications in the pathogenesis. *Int J Ophthalmol* 10(6):973-981.

Fenton M T, Clark B D, Collins K L, Webb A C, Rich, A, Auron P E (1987). Transcriptional regulation of the human prointerleukin-1-beta gene. *J Immunol* 138: 3972-3979.

Flament J (2002). Ophtalmologie. Pathologie du système visuel. Ed Masson, Paris, P: 3, 16, 96.

Förstermann U, Sessa WC (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33 (7):829-37, 837a-837d.

Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM

(2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 15(6):985-95.

Frenzel L, Hermine O (2013). Mast cells and inflammation. *Joint Bone Spine* 80(2):141-5.

G

Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 14(9):585-600.

Galanaud P, Emile D, Le prince C (1989). Une cytokine aux frontières de l'inflammation et de l'immunologie : l'interleukine-6 (IL-6). *Médecine/Sciences* 5: 338-340.

Gautier C, Négrerie M, Wang ZQ, Lambry JC, Stuehr DJ, Collin F, Martin JL, Slama-Schwok A (2004). Dynamic regulation of the inducible nitric-oxide synthase by NO: comparison with the endothelial isoform. *J Biol Chem* 279(6):4358-65.

Gaw A, Murphy M J, Cowan R A, O'Reilly D St J, Stewar M J t, Shepherd J (2004). *Biochimie clinique*. Ed Elsevier, France, p: 48.

Geller DA, Billiar TR (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 17(1):7-23.

Genest J (2010). C-reactive protein: Risk factor, biomarker and/or therapeutic target?. *Volume 26, Supplement A: 41A-44A*.

Golu T, Mogoantă L, Streba CT, Pirici DN, Mălăescu D, Mateescu GO, Muțiu G (2011). Pterygium: histological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol* 52(1):153-8.

González-García C, Martín-Saavedra F M, Ballester A, Ballester S (2009). The Th17 lineage: Answers to some immunological questions. *Inmunología* 28: 32-45.

Gotlieb WH, Abrams JS, Watson JM, Velu TJ, Berek JS, Martínez-Maza O (1992). Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokine* 4(5):385-90.

Gruss, H J and Dower, S K (1995).Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily: Involvement in the Pathology of Malignant Lymphomas. *Blood* (85): 3378-3404.

H

Hassane M (2016). Etude des lymphocytes gamma- delta producteurs d'interleukine -17 au cours des infections respiratoires. Thèse de doctorat en Immunologie. Université Lille 2 Droit et Santé, France, p : 16, 17.

Heckman CA, Mehew JW, Boxer LM (2002). NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t (14; 18) lymphoma cells. *Oncogene*. 21(24):3898-908.

Heinrich, P C, Behrmann I, Haan S, Hermanns H M , Muller-Newen G, Schaper F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20.

Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, and Mayer B (1992).Ca²⁺/ Calmodulin- dependant formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281: 627-630.

Honsawek S, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, Sakdinakittikoon M, Ngarmukos S, Preativatanyou K, Bumrungpanichthaworn P (2011). Relationship of serum IL-6, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and knee skin temperature after total knee arthroplasty: a prospective study. *Int Orthop* 35(1):31-5.

Howard M, O'Garra A (1992).Biological properties of interleukin 10.*Immunol today* 13(6):198-200.

Hua Z, Xueping C; Tao W; Xianchai L, Xun L, Jun L, Ning C, Juanjuan L, Xiaodan S, Yongming Y, Minbin Y, Yuansheng Y (2012). Prevalence of and Risk Factors for Pterygium in Rural Adult Chinese Populations of the Bai Nationality in Dali: The Yunnan Minority Eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (10): 6617-6621.

Huang JQ, Liang HL, Jin TE, Xie Z (2015). Altered expression profile of apoptosis-related molecules correlated with clinicopathological factors in non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8(9) :11278-86.

Hulot R (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine, Paris, p: 19-21, 225-227.

Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM et al (2002). New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung : in vivo function of the novel cytokine IL-25. J Immunol 169: 443-453.

I

Ischiropoulos H, Beckman JS (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? J Clin Invest 111(2): 163–169.

Islam SI, Wagoner MD (2001). Pterygium in young members of one family. Cornea 20(7): 708-710.

J

Jacquot S, Boyer O (2006). Hétérogénéité et fonctions des lymphocytes B chez l'homme. Médecines /Sciences 22: 1075-80.

James SL (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol Rev 59(4):533-47.

Jin W, Dong C (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. Emerg Microbes Infect 2(9):e60.

Jones DT, Monroy D, Pflugfelder SC (1997). A novel method of tear collection: comparison of glass capillary micropipettes with porous polyester rods. Cornea 16 (4):450-8.

K

Kabel AM (2014). Relationship between Cancer and Cytokines. Journal of Cancer Research and Treatment 2(2): 41-43.

Kamimura D, Arima Y, Hirano T, Ogura H, Murakami M (2014). IL-6 and Inflammatory Diseases. Springer Japan: 53-54, 58.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology 2003; 149:1-38.

Kammoun B, Kharrat W, Zouari K, Zribi W, Kemiha N, Fourati M, Chaabouni M (2001). Ptérygion: traitement chirurgical. J Fr. Ophtalmol 24(8): 823-828.

Katz Y, Nadiv O, Beer Y (2001). Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. Arthritis Rheum; 44:2176–84.

Kelleher ZT, Matsumoto A, Stamler JS, Marshall HE (2007). NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. J Biol Chem 282(42):30667-72.

Kenyon KR, Tseng SC (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology 96(5):709-22; discussion 722-3.

Kimura A, Kishimoto T (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. Eur J Immunol 40: 1830–1835.

Kolis JK, Linden A (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 21: 467- 476.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 4 (4):471-9.

Kormanovski A, Parra F, Jarillo-Luna A, Lara-Padilla E, Pacheco-Yépez J, Campos-Rodriguez R (2014). Oxidant/antioxidant state in tissue of primary and recurrent pterygium. BMC Ophthalmol 14:149.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009). IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 27:485-517.

L

Labsi M, Khelifi L, Mezioug D, Soufli I, Touil-Boukoffa C (2016).Antihydatic and immunomodulatory effects of Punica granatum peel aqueous extract in a murine model of echinococcosis. Asian Pac J Trop Med 9(3):211-20.

Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L (2012). Nuclear Factor- κ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases.Ocul Surf. 10(3):137-48.

Lapinet JA, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. Infect Immun 68(12):6917-23.

Larousse médicale (2006).p: 1124.

Lawrence T (2009).The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 1(6):a001651.

Lee DH, Cho HJ, Kim JT, Choi JS, Joo CK (2001). Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. Cornea 20(7):738-42.

Lee WW, Kang SW, Choi J, Lee SH, Shah K, Eynon EE, Flavell RA, Kang I (2010).Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor.Blood 115(3):530-40.

Lehtihet Y, Ailem A (2007). Traitement chirurgical du ptérygion à propose de 36 cas.Journal Français d'ophtalmologie Vol. 30, hors-série 2, p : 2s184.

Lei L, Jingyang W, Jin G, Zhe Y, Desheng H (2013). Geographical prevalence and risk factors of pterygium a systematic review and meta-analysis. BMJ Open 3: e003787.

Liang K, Jiang Z, Ding BQ, Cheng P, Huang Dk, Tao LM (2011). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva.Molecular Vision 17:1687-1693.

Liu J, Xu JH, Xu W, Liang GL, Lou JX, Wang Y, Wen JQ, Cao YB. (2017). Bevacizumab as adjuvant therapy in the management of pterygium: a systematic review and meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 10(7):1126-1133.

Liu L (1993). An immuno-pathological study of pterygium. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 29(3):141-3.

Liu L, Yang D (1993). Immunological studies on the pathogenesis of pterygium. *Chin Med Sci J.* 8(2):84-8.

Liu T, Liu Y, Xie L, He X, Bai J (2013). Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Res.* 38(12):1191-7.

Liu YB, Sun X (2014). The expression and function of Foxp3 and IL-10 in pterygium. *Chinese Journal of Practical Ophthalmology* 32 (8): 977-979.

Livezeanu C, Crăitoiu MM, Mănescu R, Mocanu C, Crăitoiu S (2011). Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. *Rom J Morphol Embryol* 52(3):837-44.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 7(2):156-67.

Lydyard P, Whelan A, Fanger M (2002). L'essentiel en immunologie. Ed Berti, Paris, p: 17, 84-86, 107, 139-143.

M

Malek I, Zghal I, Chebbi A, Lajili Z, Boujemaa C, Nacef L, Bouguila H, Saida Ayed S (2013). Conjunctival limbal autograft versus simple excision with intra-operative mitomycin C in pterygium surgery: a comparative study. *J Fr Ophthalmol* 36(3):230-5.

Marcovich AL, Morad Y, Sandbank J, Huszar M, Rosner M, Pollack A, Herbert M, Bar-Dayana Y (2002). Angiogenesis in pterygium: morphometric and immunohistochemical study. *Curr Eye Res* 25: 17-22.

Marletta MA (1993). Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (17): 12231-12234.

Maurin JF, Renard JP (1989). Anatomie de la conjonctive. Encycl Méd chir. Ed Ophthalmologie, Paris, France, p : 4.

McCarty CA, Fu CL, Taylor HR (2000). Epidemiology of Pterygium in Victoria, Australia. Br J Ophthalmology 84:289-292.

Miljkovic D, Trajkovic V (2004). Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. Cytokine Growth Factor Rev 15(1):21-32.

Morris SM Jr (2009). Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 157(6):922-30.

Mosser DM, Zhang X (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev 226:205–218.

Moukoury Nyolo E., Epee E., Nsangou J F I, Noa Noa Tina B (2009). Le pterygion en zone intertropicale. Analyse de 344 cas au CHU de Yaounde. Bull. Soc. Belge Ophtalmol (311): 11-15.

N

Nangia V, Jonas JB, Nair D, Saini N, Nangia P, Panda-Jonas S (2013). Prevalence and associated factors for pterygium in rural agrarian central of India. The central India eye and medical study. PLoS One 8 (12): e82439.

Narita K, Hu DL, Mori F, Wakabayashi K, Iwakura Y, Nakane A (2010). Role of interleukin-17A in cell mediated protection against Staphylococcus aureus infection in mice immunized with the fibrinogen-binding domain of clumping factor A. Infect Immun 78(10):4234-42.

Nicholson K M, Anderson N G (2002). The protein kinase B/Akt eroxide pathway in human malignancy. Cell Signal 14: 381-395.

O

Oudanane Siham (2012). Efficacité des anti VEGF dans le traitement des pteygions : à propos de 14 cas. Thèse de doctorat en Médecine. Faculté de médecine et de pharmacie. Université Mohammed V-Souissi, RABAT, Maroc, p : 4-18, 34-44, 52-98.

Owen J A, Punt J, Stranford S A (2014). Immunologie. Le cours de Janis Kuby.7 ème Ed Dunod, Paris, p : 40,122, 123, 166- 742.

Ozdemir G, Inanc F, Kilinc M (2005). Investigation of nitric oxide in pterygium. Can J Ophthalmol. 40(6):743-6.

P

Park CY, Choi JS, Lee SJ, Hwang SW, Kim EJ, Chuck RS (2011).Cyclooxygenase-2-expressing macrophages in human pterygium co-express vascular endothelial growth factor. Mol Vis 17:3468-80.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide 23(2):75-93.

Peck A, Mellins ED (2009). Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. Clin Immunol 132(3):295-304.

Pelit, A, Ba N, Akova YA, Demirhan B (2009). P53expresion in pterygium in two climatic regions in turkey. Indian J Ophthalmol 57(3): 203–206.

Perra MT, Maxia C, Zucca I, Piras F, Sirigu P (2002).Immunohistochemical study of human pterygium. Histol Histopathol 17: 139-149.

Petravevsky AV, Trishkin KS (2018).Surgical treatment of pterygium. Vestn Oftalmol. 134(1):85-88.

Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. (1984). Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium.Am J Ophthalmol. 98(2):225-8.

Pisella PJ, Baudouin C, Hoang-Xuan T (2015). Surface oculaire. ED Elsevier/ Masson. Société française d'ophtalmologie, p : 3-55.

Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D (2015). Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* 2015: 137823.

Q

Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, Benveniste EN, Cong Y (2009). TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol* 183(1):97-105.

R

Rafa H (2013). Etude du rôle des cytokines et du NO dans les mécanismes immuno-inflammatoires mis en jeu dans le contrôle, la genèse et la progression des IBD (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) : Impact sur les biothérapies. Thèse de doctorat en sciences de la nature, spécialité : Biochimie-Immunologie. Université USTHB-Alger, p : 60,61.

Rafa H, Amri M, Saoula H, Belkhelfa M, Medjeber O, Boutaleb A, Aftis S, Nakmouche M, Touil-Boukoffa C (2010). Involvement of interferon- γ in bowel disease pathogenesis by nitric oxide pathway: a study in Algerian patients. *J Interferon Cytokine Res* 30(9):691-7.

Rafa H, Saoula H, Belkhelfa M, Medjeber O, Soufli I, Toumi R, de Launoit Y, Moralès O, Nakmouche M, Delhem N, Touil-Boukoffa C (2013). IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid. *J Interferon Cytokine Res* 33(7):355-68.

Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM (2011). eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol* 210(3):271-84.

Rakhit RD, Marber MS (2001). Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection?. *Heart* 86(4):368-72.

Rasolonjatovo AS, Rakotomalala HN, Ralandison DS, Rapelanoro Rabenja F (2014). Quelle place accorder à la vitesse de sédimentation des hématies en 2014 ? What would be the place of the erythrocyte sedimentation rate in 2014? *rev med Madag* 4(2):423-427.

Reich N C, Liu L (2006).Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6: 602-612.

Ren K, Torres R (2009). Role of interleukin-1beta during pain and inflammation.*Brain Res Rev* 60(1):57-64.

Renard JP, Sahel AJ, Mrejen S, Sellem E (2014). Glaucome primitif à angle ouvert. Ed Elsevier /Masson. Société Française d'ophtalmologie, p : 1-792.

Reyes Nj, Saban DR (2014). T helper subsets in allergic eye disease.*Curr Opin Allergy Clin Immunol* 14: 477-84.

Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C (2010).IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(6):413-23.

Ribeiro M A (1997). Levels of C reactive protein in serum samples from healthy children and adults in Sao Paulo Brazil. *Braz J Med Biol Res* 30(9):1055-9.

Rougier J, Maugery J, Begou P, Dorne P A, Franck JP, Francoz Tailanter N, Grange JD, Koenig F, Tapissier J, Trepsat CH, Vadot F (1989). Ophtalmologie pour le praticien. 2 ème ED SIMEP S.A. Paris, France, p : 1,2, 18.

Rousselet MC, Vignaud JM, Hofman P et Chatelet FP (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. Ed AFECAP, p : 1-2.

Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF (2006).TNF alpha in the physiopathology of psoriasis. *Ann Dermatol Venereol* 133(2):174-80.

S

Samama MM, Germain D, Kamoum P (2012). Précis de Biopathologie. Analyses médicales spécialisées. ED Biomnis, p: 213.

Sami DA (2007). Conjunctival Incisions for Strabismus Surgery: A comparison of Techniques. *Techniques in ophthalmology* 5(3): 125-129.

Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9(4):447-53.

Santhanam U, Ray A, Sehgal P B (1991). Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7605-7609.

Saraux H, Lemasson C, Offret H, Renard G (2010). Anatomie et histologie de l'oeil. 2ème Ed Masson, p: 83, 92.

Satriano J, Wead L, Cardus A, Deng A, Boss GR, Thomson SC, and Blantz RC (2006). Regulation of ecto-5'-nucleotidase by NaCl and nitric oxide: potential roles in tubuloglomerular feedback and adaptation. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F1078 –F1082.

Scull CM, Hays WD, Fischer TH (2010). Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J Inflamm Lond* 7:53.

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

Shareef S, Sawada A, Neufeld AH (1999). Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Optic Nerves of Rat Eyes with Chronic Moderately Elevated Intraocular Pressur. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 40(12): 2884-91.

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15(6):252-9.

Siak JJ, Ng SL, Seet LF, Beuerman RW, Tong L (2011). The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(1):230-6.

Song P, Chang X, Wang M, An L (2017). Variations of pterygium prevalence by age, gender and geographic characteristics in China: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 12(3): e0174587.

Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastro-intest Pharmacol Ther* 7(3):353-60.

Spalton DJ, Hitchings RA, Hunter PA (2005). Atlas d'ophtalmologie Clinique. 3ème Ed Elsevier/ Masson, p : 8.

Speckmann B, Pinto A, Winter M, Förster I, Sies H, Steinbrenner H (2010). Proinflammatory cytokines down-regulate intestinal selenoprotein P biosynthesis via NOS2 induction. *Free Radic Biol Med* 49(5):777-85.

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

Stevens A, Lowe J (1997). Histologie humaine. 2ème ED De Boeck Université, p : 383, 384, 393-395.

Stuehr DJ (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-59.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6(8):662-80.

Szwarcberg J, Flament J (2001). Ptérygion. *Encyclopédie médico-Chirurgicale*. ED scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, p : 1-4, 6-10.

T

Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS, Smith DR (2000). Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 84(2):212-6.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10):a016295.

Thomadaki H, Scorilas A (2006). BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43(1):1-67.

Thomas DD, Ridnour L A, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer C H, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45(1):18-31.

Tiong K, Mohd Zahidin AZ, Sumugam SKA, Uchang J, Mohd Isa HD (2017). Evaluation of Interleukin-17 and Interleukin-23 in Pterygium. *Immunohistochemistry Study Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 6(5):403-406.

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-gamma levels. *Biochimie* 80(8-9):739-44.

Touil-Boukoffa C, Mezioug D, Amri M, Belguendouz H, Messaoudène D, Rafa H (2016). Cytokines : immunité et immunopathologie. Ed Office des publications universitaires, p : 9-29.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V (2007). The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FMS Immunol Med Microbiol* 51: 443- 452.

V

Valladeau J (2006). Les cellules de langerhans. *Medecine/sciences* 22 :144-8.

Vallières L, Rivest S (2000). L'interleukine-6 dans le système nerveux central. *Médecine/Sciences* 16: 936-944.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006). TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2):179-89.

Villanueva C, Giulivi C (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 49 (3): 307-16.

W

Ward L D, Howlett G J, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz R L, Simpson R J (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 269 : 23286-23289.

Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207 (Pt 18):3221-31.

Wheater P R, Young B, Health J W (2001). Histologie fonctionnelle. Ed De Boeck, Belgique, p: 406.

Weathley C (2012). Hypotheses in the Life Sciences ISSN 2042 8960 The Very Large Gorilla Sitting in the Room? Adenosylcobalamin is the Missing Link: its Radical and Tetrahydrobiopterin are the Principal in vivo Catalysts for Mammalian Nitric Oxide Synthases. *Hypotheses in the Life Sciences* 2 (2) : 31-54.

Weill B, Batteux F (2003). Inflammation et réactions inflammatoires. Ed De Boeck, Bruxelles, Belgique, p : 2,12, 23, 27.

Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, Lifshitz T, Argov S (2002). Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye (Lond)* (5):619-21.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, and Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80 (5): 617-653.

Wynn TA (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2): 199–210.

X

Xia Y, Shen S, Verma IM (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2(9):823-30.

Xiong S, She H, Takeuchi H, Han B, Engelhardt JF, Barton CH, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H (2003). Signaling role of intracellular iron in NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 278(20):17646-54.

Xue C, Chen Y, Huang Z, Ge Y, Wang H, Wang J (2014). EphB4 expression in pterygium is associated with microvessel density. *Int J Clin Exp Med.* 2014 Nov 15; 7(11):4008-15.

Y

Yaghoubi H, Tabeti Mahmoudi AZ, Haiba F, Hacène F, Benkhoucha S, Idder A (2007). Human Amniotic transplantation in pterygium surgery. *Journal Français d'ophtalmologie* Vol. 30, hors-série 2, p: 2s184.

Yip KH, Huang Y, Waye MM, Lau HY (2008). Induction of nitric oxide synthases in primary human cultured mast cells by IgE and proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol* 8(5):764-8.

Yip KW, Reed JC (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene.* 27 (50): 6398-406.

Z

Zerbato M (2010). Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine CRéactive au cabinet de pédiatrie. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté de Pharmacie. Université Henry Poincaré, Nancy I., France, p : 7.

Zhang JM, Jianxiong An (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* 45(2): 27–37.

Zhao L, You QS, Xu L, Ma K, Wang YX et al (2013). Ten-year incidence and associations of pterygium in adult Chinese. *The Beijing Eye Study. Invest Ophthalmol Vis Sci* 5: 1509-1514.

Zierhut M, Dana MR, Stem ME, Sullivan DA (2002). Immunology of the lacrimal gland and ocular tear film. *Trends immunol* 23 (7): 333-5.

Ziesché E, Bachmann M, Kleinert H, Pfeilschifter J, Mühl H (2007). The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 282(22):16006-15.

Zimmermann O, Li K, Zaczekiewicz M, Graf M, Liu Z, Torzewski J. (2014). C-reactive protein in human atherogenesis: facts and fiction. *Mediators Inflamm* 2014:561428.

Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H (2008). Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45(5):625-32.

Annexes

Annexe 01

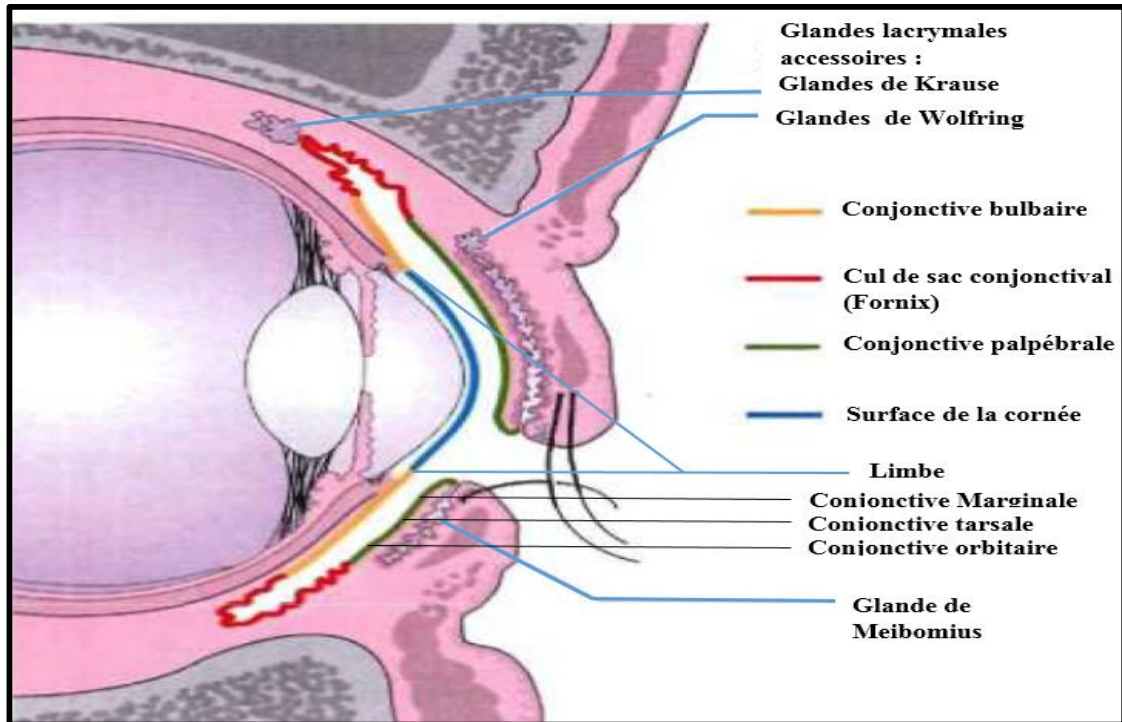


Figure.01 : Anatomie de la conjonctive (Maurin et Renard, 1989 ; Rougier et *al*, 1989 ; Flament, 2002 ; Spalton et *al*, 2005).

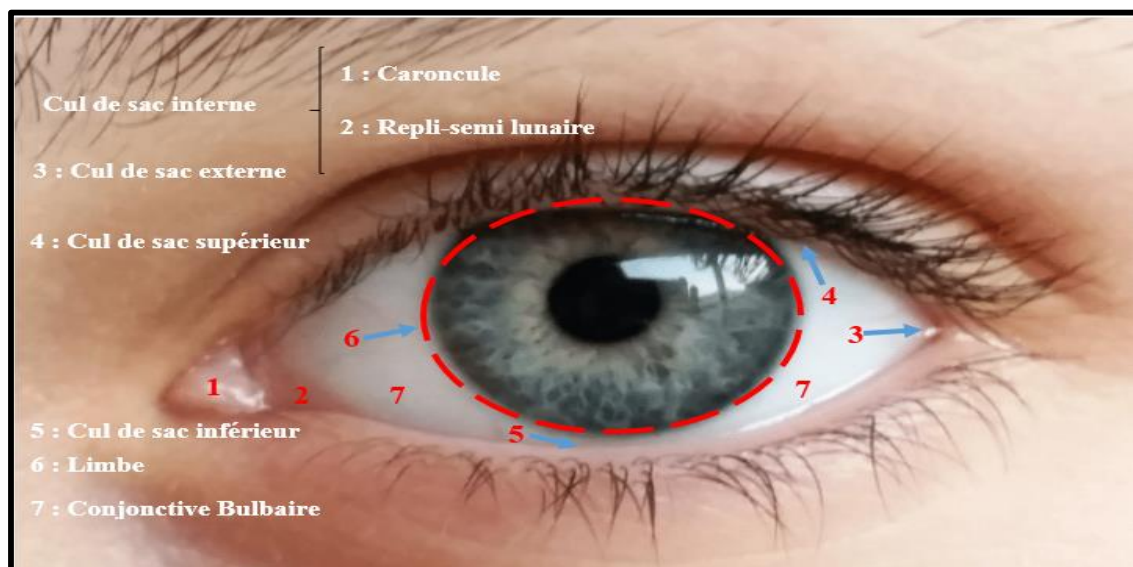


Figure.02 : Localisation des différents culs de sac (Spalton et *al*, 2005 ; Saraux et *al*, 2010).

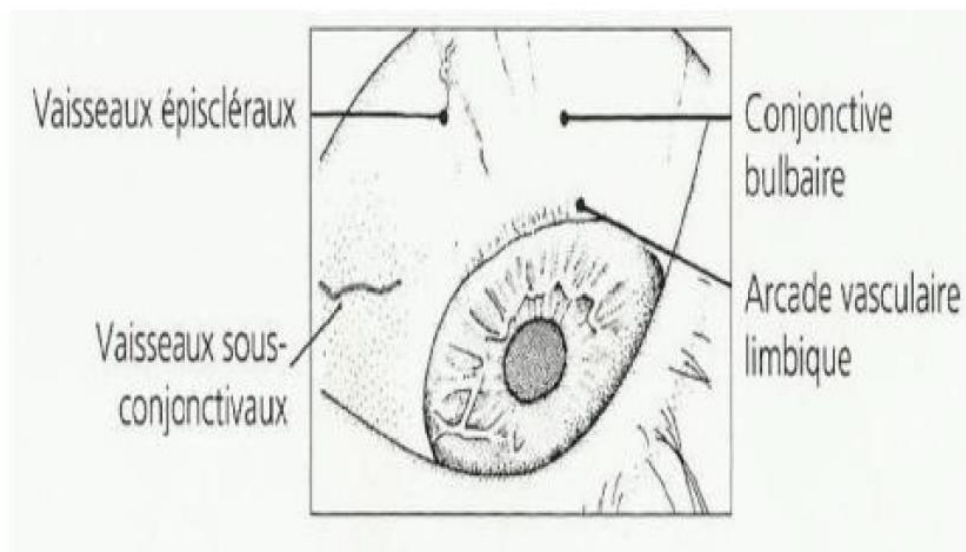


Figure. 03 : La conjonctive bulbaire (Spalton et al, 2005).

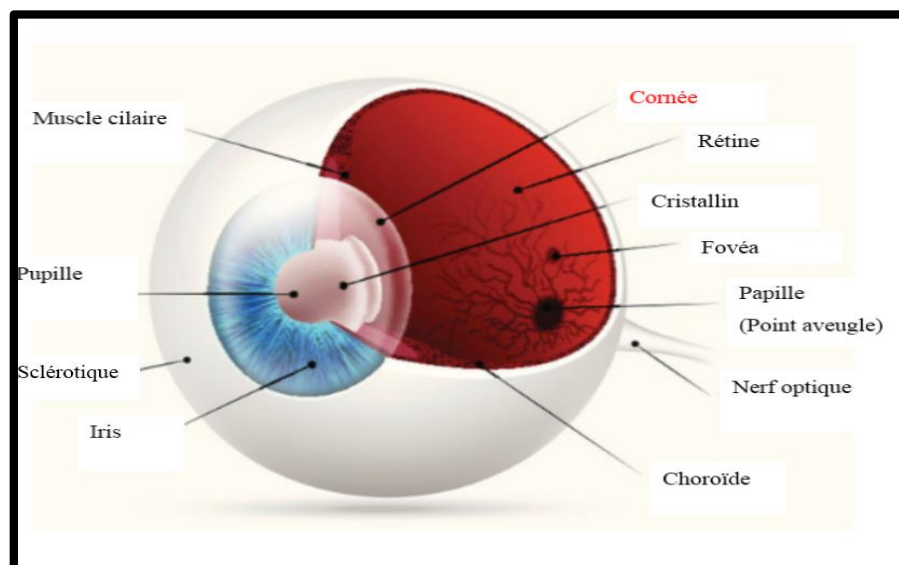


Figure.04 : Anatomie de la cornée (Stevens et Lowe, 1997).

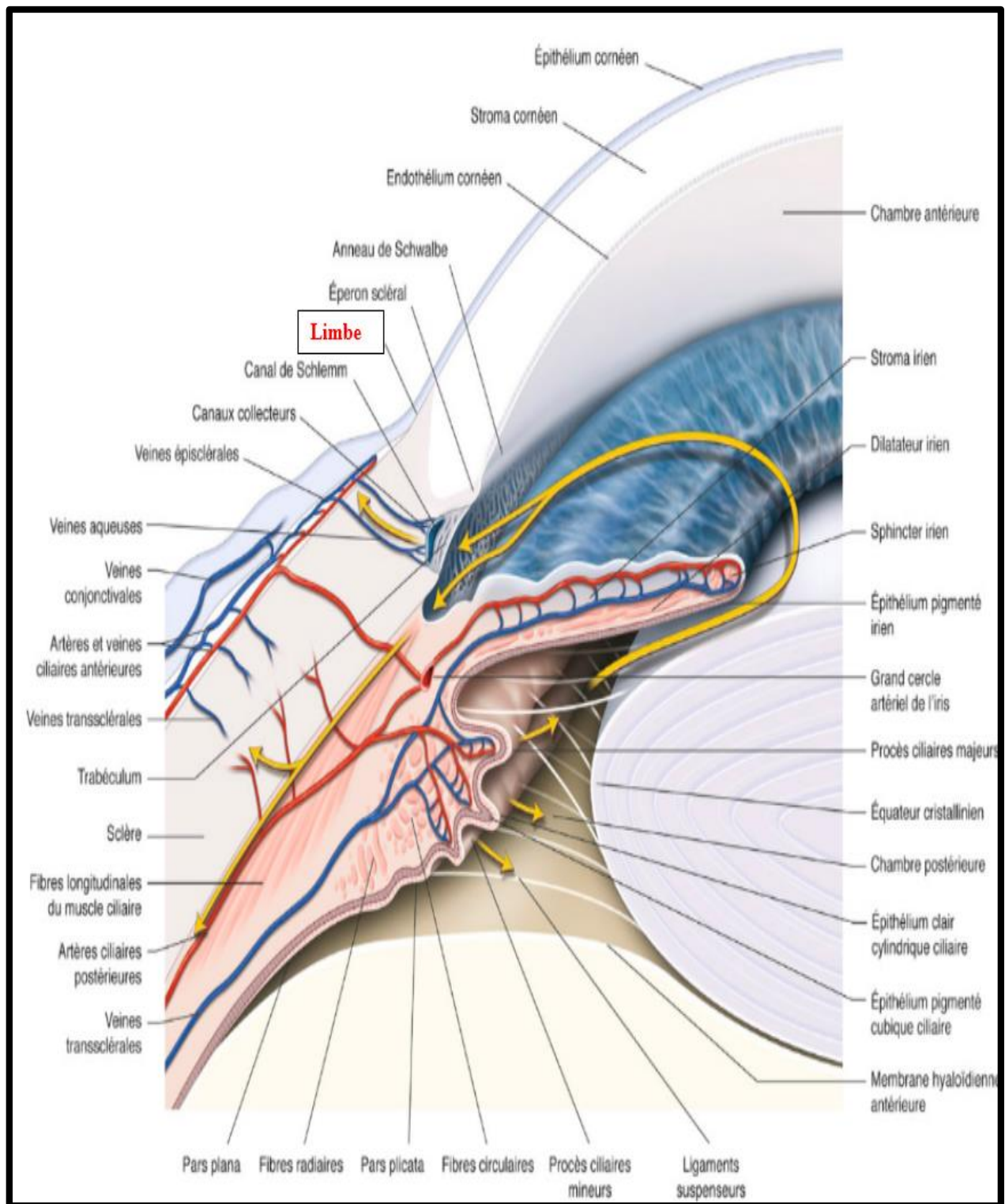


Figure.05 : Localisation du limbe (Renard et al, 2014).

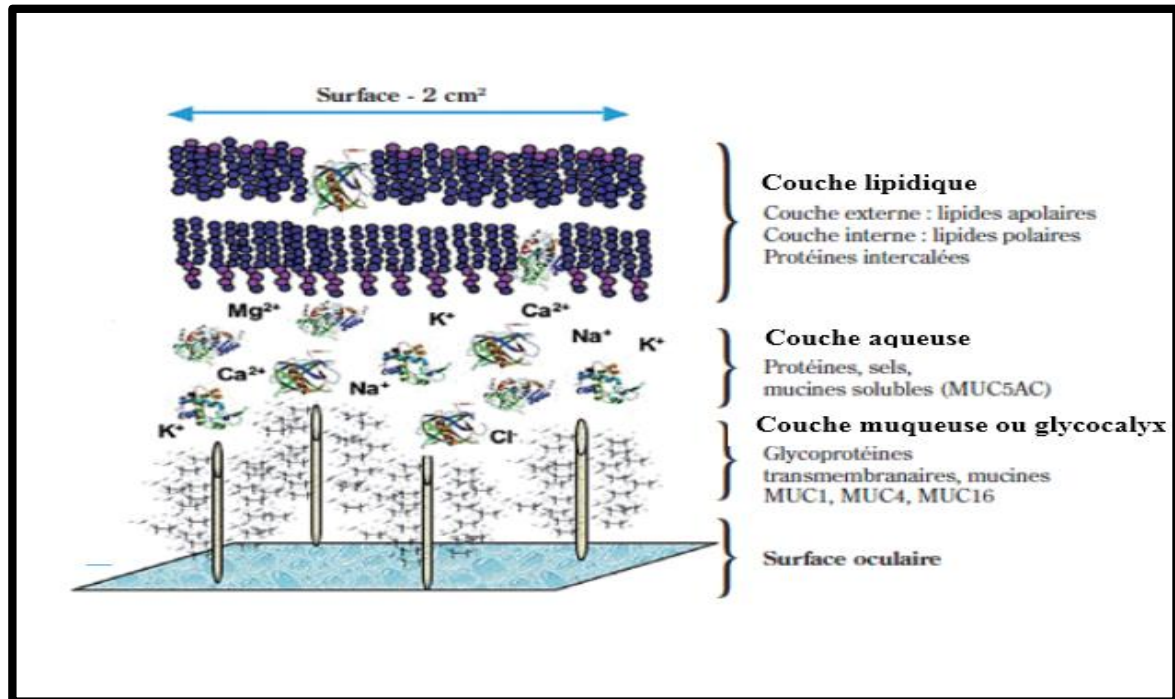


Figure.06 : Organisation du film lachrymal (Butovich, 2009).

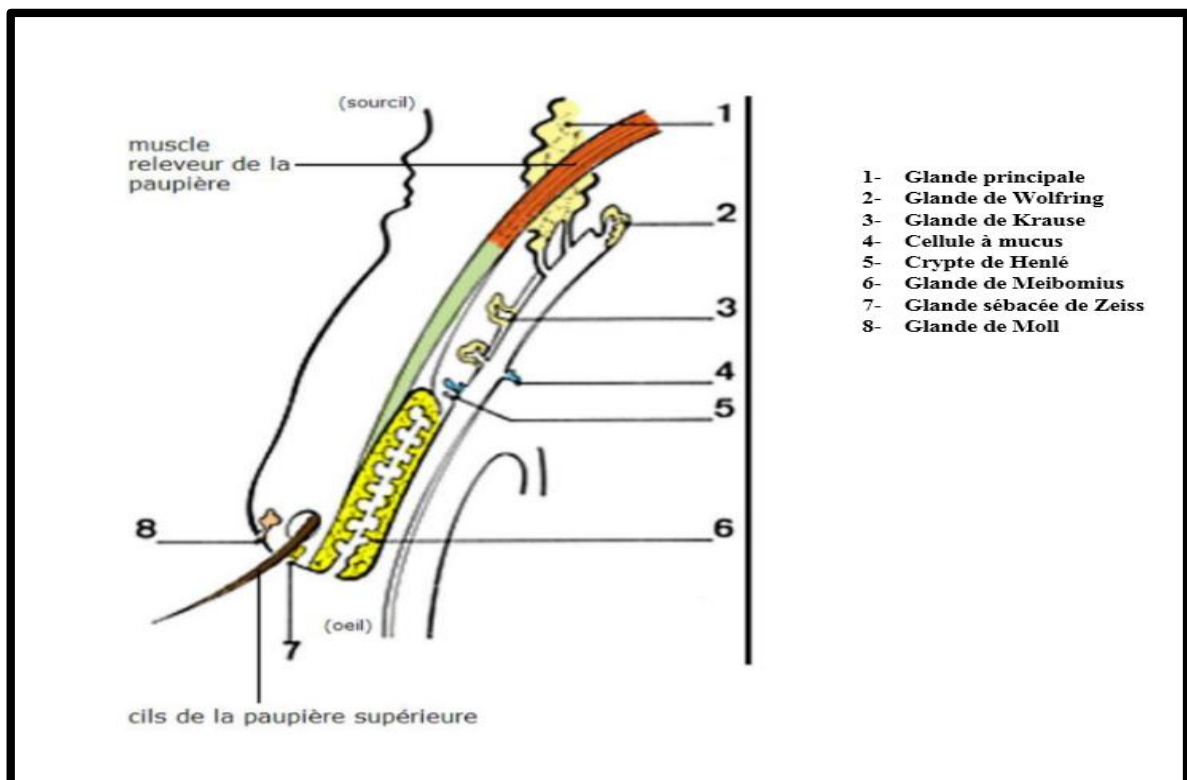


Figure.07 : Les glandes lacrymales palpébrales (Stevens et Lowe, 1997).

Annexe 02

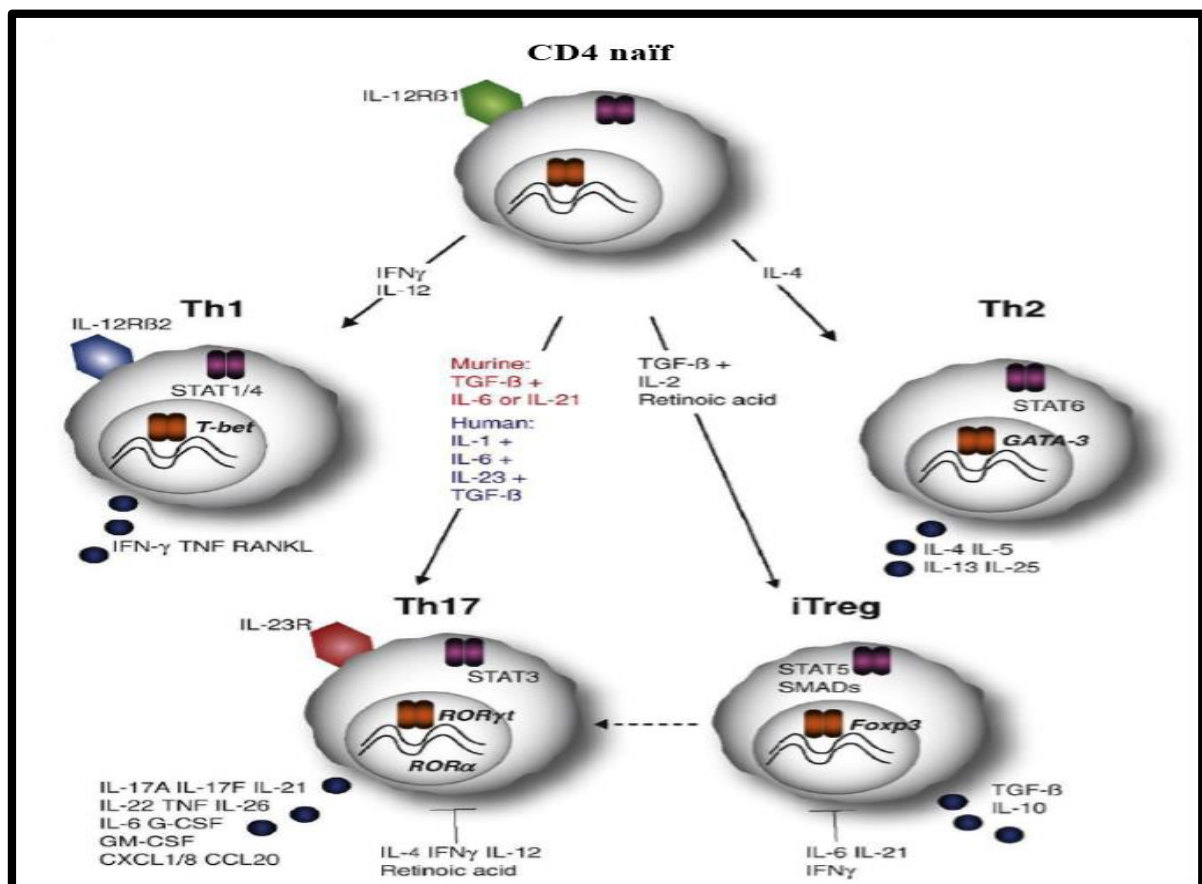


Figure.01: Régulation des Voies Th1/Th2/Th17/Treg. Foxp3: fork head box, RANKL: Receptor Activator of Nuclear Kappa B Ligand, RORγt: Retinoid-related Orphan receptor gamma, T-bet: T-box expressed in Tcells (**Peck et Mellins, 2009**).

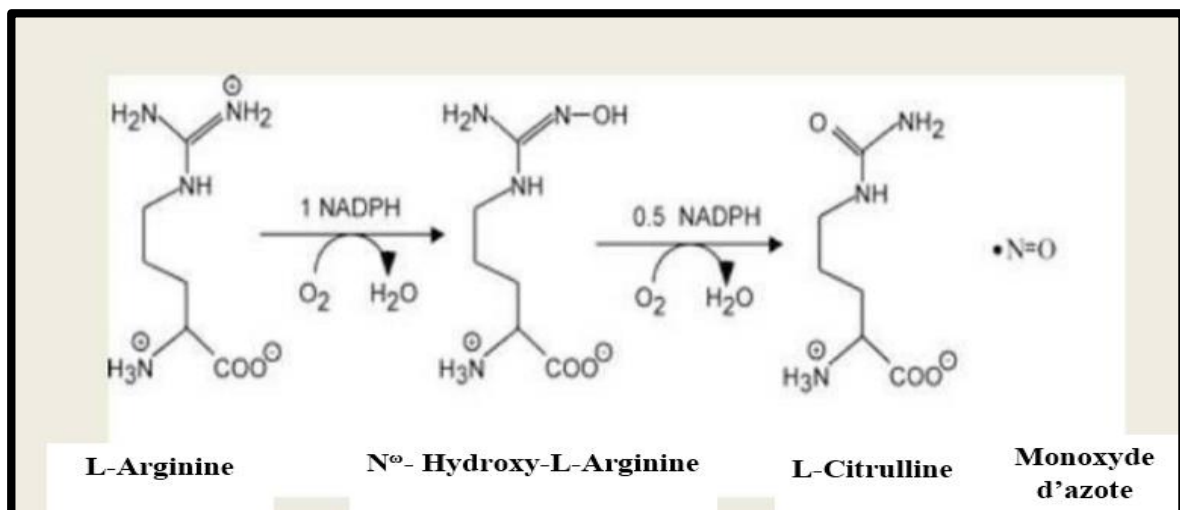


Figure.02 : Les étapes de la biosynthèse du NO par les NOS (**Weathley, 2012**).

Local pro-inflammatory cytokine and nitric oxide responses are elevated in patients with pterygium

S Zidi^{1,2,3}, F Bediar-Boulaneb⁴, H Belguendouz², M Belkhelfa²,
O Medjeber², O Laouar⁵, C Henchiri³ and C Touil-Boukoffa²

International Journal of
Immunopathology and Pharmacology
Volume XX: 1–11
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0394632017742505
journals.sagepub.com/home/iji


Abstract

Pterygium is a common ocular surface disease observed in humans. Chronic ultraviolet (UV) exposure is extensively recognized as an aetiological factor in the pathogenesis of this disease. This hypothesis is sustained by epidemiological and histopathological data in relation to UV injured skin. Although some findings have indicated that genetic factors, anti-apoptotic and immunological mechanisms are involved in the pathogenesis of pterygium, the mechanism by which it develops remains poorly understood. In this study, we analysed the *in vivo* production of IL-17A, IL-6, IL-10 and nitric oxide (NO) in the tears and sera from Algerian patients. Interestingly, we observed that IL-6, IL-17A and NO production in the tears and sera of all patients was strongly associated with inflammatory infiltration, NOS2, NF- κ B and Bcl2 expression in pterygia biopsies. Collectively, our results indicate a relationship between local inflammation and anti-apoptotic processes in pterygium disease, leading to both tissue damage and enhanced cellular proliferation.

Keywords

cytokines, inflammation, NO synthase, pterygium

Date received: 13 May 2017; accepted: 12 October 2017

Introduction

Pterygium is a proliferative, inflammatory and invasive ocular surface disease associated with excessive exposure to ultraviolet (UV) light^{1,2} and has long been believed to be an environmental pathology. UV radiation has been found to play a main role in pterygium development.² In addition, pterygium occurs more frequently in Australia,² Africa^{2,3} and particularly, Algeria. Pterygium is a wing-shaped ocular surface lesion traditionally described as an encroachment of bulbar conjunctiva onto the cornea.^{1,2}

Moreover, pterygium has historically been considered a degenerative disease, characterized by the degradation of Bowman's layer and elastosis.² Clinical advances in surgical treatment involve the use of conjunctival autografts and amniotic

membranes in combination with adjuvant therapies, including mitomycin C, β -radiation and 5-fluorouracil, to reduce recurrence.⁴ In addition, this disease is characterized by cellular proliferation, inflammatory infiltration, fibrosis, angiogenesis and the breakdown of extracellular matrix.¹

¹Department of Biology, University of Guelma, Guelma, Algeria

²Cytokines and NO Synthases Team', LBCM, FSB, USTHB, Algiers, Algeria

³Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁴Department of Ophthalmology, Ibn Rochd University Hospital, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

⁵Department of Anatomopathology, Ibn Rochd University Hospital, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

Corresponding author:

C Touil-Boukoffa, 'Cytokines and NO Synthases Team', LBCM, FSB, University of Sciences and Technology Houari Boumediène (USTHB), BP 32 16111, Algiers, Algeria.
Email: touilboukoffa@yahoo.fr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

The mechanism of pterygium pathogenesis and its progression remain an ophthalmic question. Interestingly, pterygium exhibits a preference for the nasal limbus and affects only humans, indicative of an unique ocular morphology.²

While the pathogenesis of pterygium is not completely understood, important progress has been made towards understanding the mechanisms involved in its pathogenesis. Some researches indicate that signalling pathways activated by UV light result in the induction of mediators responsible for the growth of pterygium.^{1,2} In the same context, genetic studies have reported the implication of hereditary factors in pterygium formation.¹ In rural Australia, a strong positive correlation between climatic UV radiation and pterygium prevalence was found, providing further evidence of a causal relationship.⁵ However, the mechanism by which UV light induces the development of pterygium remains elusive.⁶ To this end, several investigations have been conducted to identify the signalling pathways activated by UV light in pterygium epithelial cells (PECs) that mediate the production of cytokines and growth factors.⁷ In one report, it was postulated that heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in the same cultured cells is involved in the development of pterygia in relation to UV irradiation.⁶

Following the discovery of Th17 cells, many queries regarding the physiopathology of certain chronic inflammatory diseases can now be clarified.^{8–11} Th17 cells are primarily characterized by the transcription factor ROR γ t, the surface markers IL-23R and CCR6, as well as the elevated production of the pro-inflammatory cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, tumour necrosis factor α (TNF- α) and chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20).^{12,13} In addition, these pro-inflammatory cytokines are capable of promoting local tissue damage.^{13,14} It has been reported that Th17 responses play pivotal roles in the pathology of chronic inflammatory diseases.^{11,15} Th17 cells are activated by the combination of IL-6 and transforming growth factor (TGF- β), stimulating the transcription factor ROR γ t.^{13,16}

The generation and secretion of high nitric oxide (NO) concentration by infiltrating cells may lead to perpetuation of local tissue damage.^{11,17,18} We have previously reported that pro-inflammatory cytokines induce inducible nitric oxide synthase

(NOS2) expression and activity in chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel diseases and Behçet disease.^{10,19} In this study, we focused our attention on understanding the mechanism of inflammation involved in pterygium. In this context, we examined the potential association of IL-17 and NO pathways with pterygium development by investigating the production of IL-17A, IL-6, IL-10 and NO in the sera and tears of Algerian patients with pterygium ($n = 43$). This study was conducted concomitantly with histological analyses, examination of inflammatory infiltrates and the expression of NOS2, NF- κ B and Bcl2 expression in pterygium specimens.

Patients and methods

Patients

A total of 43 Algerian patients with Pterygia (32 men and 11 women; age range: 35–62 years) were enrolled in this study. Patients were diagnosed by standard examination in the ophthalmological department (CHU Annaba, Est of Algeria). Most patients exhibited pterygium with a unilateral location. Healthy controls samples ($n = 43$) were obtained from adult volunteer donors who were operated for strabismus. Positive controls samples ($n = 30$) were obtained from patients with inflammatory ocular diseases (conjunctivitis, $n = 20$) or another inflammatory affection (Sjögren-Gougerot syndrome, $n = 10$). All participants provided informed consent for this study, which was carried out according to the World Medical Association Declaration of Helsinki adopted by the ethical committee of Algerian Agency of Research Development in Health (ATRSS). None of the subjects had received pharmacological treatments. The negative controls did not exhibit any inflammatory or infectious diseases.

Pterygia specimens and controls

A total of 43 pterygia and 63 other conjunctiva (positive and negative controls) were surgically removed. The pterygia excisions were made under topical anaesthesia. The surgery was performed behind the limbus, by first removing the heads and extending the incisions into the bodies until the semi-lunar folds (we eliminated pterygia which have invaded Bowman's layer in the cornea from our study). The other conjunctiva samples

(controls) were collected from the temporal bulbar conjunctival region of the eye affected by strabismus or conjunctivitis disease. In the case of primary Sjögren syndrome, labial salivary glands biopsies were removed from the lower lips. For proper orientation, the specimens were sutured onto a sterile cardboard, immediately fixed in 10% neutral buffered formalin and subsequently embedded in paraffin.

Serum collection

Blood samples, collected from healthy donors and patients, were centrifuged at 600g for 10 min to obtain the sera. All serum samples were stored at -45°C until the assessment of IL-6, IL-10, IL-17A and NO at a later time.

Tear collection

Reflex tears were collected using glass capillary micropipettes that had been flame polished before processing (taking care not to touch the conjunctiva and the cornea). Following the stimulation of tears by exposing the diseased and control eyes to a slit lamp, tears were collected in sterile vials and then stored at -70°C until further processing.²⁰

Histological analysis

The histological sections were stained with haematoxylin-eosin. Samples were fixed for 24 h in 10% buffered formalin at room temperature. The specimens were dehydrated by graded ethanol and embedded in paraffin blocks. Tissue sections (3- μm thick) were deparaffinized with toluene and rehydrated through a graded series of ethanol, then stained with haematoxylin and eosin. Digital images were captured with a digital camera integrated with a LEICA light microscope at different magnifications.

Immunohistochemistry procedures

The immunohistochemical study of CD3, CD68, Bcl2, NOS2 and NF- κB expression was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded samples of pterygia and control conjunctiva. Primary Sjögren syndrome samples served as positive controls for NOS2 immunostaining. These paraffin blocks were cut into 3- μm thick sections, deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of

ethanol. For antigen retrieval, the tissue sections were boiled in a target retrieval solution (Dako) for 40 min in a 96°C water bath. For immunohistochemical detection, anti-CD3 (monoclonal antibody clone, dilution of 1:25–1:50, Dako), anti-CD68 (monoclonal antibody clone, dilution of 1:50–1:100, Dako) and anti-Bcl2 (monoclonal antibodies, dilution of 1:50–1:100, Dako) were applied for 1 h at room temperature. To detect NOS2 and NF- κB expression, the sections were incubated with anti-NOS2 (rabbit polyclonal antibodies clone, dilution of 1:500, Santa Cruz Biotechnology) and anti-NF- κB p65 subunit (rabbit monoclonal antibodies, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology), respectively, overnight in a humidified chamber at 4°C . These steps were followed by the application of a secondary antibody (horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse IgG Ab) and then the DAB (3,3',4,4' diaminobenzidine). The DAB chromogen solution was freshly prepared, counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted with Faramount (both from Dako). The slides were observed using a standard light microscope (LEICA), and pictures were taken using a digital camera at different magnifications.

Enzyme-linked immunosorbent assay for IL-17A, IL-6 and IL-10

The levels of IL-17A, IL-6 and IL-10 in the serum and tears (sensitivity: <2 , <1 and <1 pg/mL, respectively) were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). The absorbance was read on an ELISA reader at 450 nm (LABSYSTEM). These assays detected only human cytokines. The results are expressed as pg/mL in relation to a standardized dose curve of the relevant recombinant cytokine (IL-17A, IL-6 or IL-10).

NO assay

NO production was assessed by the determination of the end products of NO oxidation in the sera and tears. The modified Griess method as previously described by our team²¹ was used to determine the nitrite levels (NO_2^-), a stable product of NO, in both the tears and sera. Briefly, 100 μL of the sample was mixed with 50 μL of Griess A (sulphanilamide 5%, HCl 20%) and 50 μL of Griess B

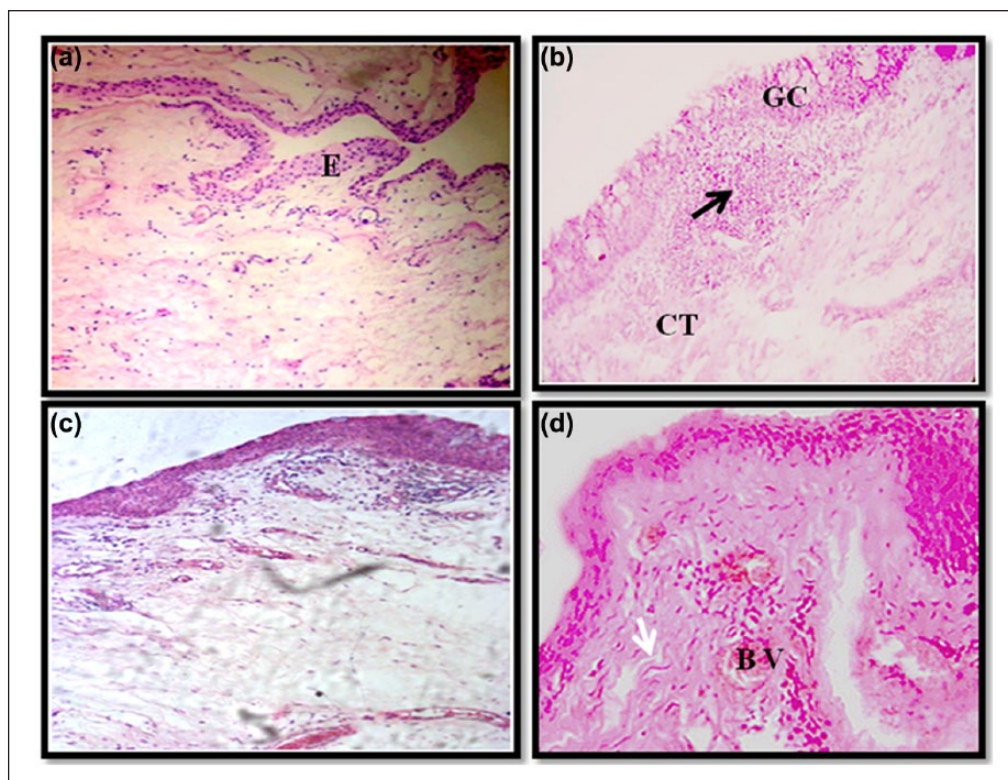


Figure 1. Histopathology of normal conjunctiva tissues (control) (a) and pterygium (b, c and d) biopsies. BV: blood vessels, CT: connective tissue, E: epithelium, GC: goblet cells. Black arrows denote the inflammatory infiltrate and white arrows indicate fibrosis (a and b: original magnification $\times 100$ and c and d: original magnification $\times 250$).

(naphthylethylenediamine dihydrochloride 0.5%, HCl 20%). The preparations were then incubated at room temperature for 20 min, and the optical densities were read using a spectrophotometer (PHARMACIA) at 543 nm. The nitrite concentration was determined according to the standard curve constructed with sodium nitrite.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The data were analysed using Student's *t*-test for the comparison of two means. We considered the difference to be statistically significant with $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using Minitab 16 software.

Results

Pterygia histopathology

In this study, the examination of the histological features revealed that the pterygium exhibits a conjunctivo-epithelial structure (Figure 1(b)–(d)). In most patients, the epithelial coverage appears as a

stratified squamous-type epithelium without keratinization, covered with vacuolated goblet cells (GCs) constituting hyperplasia (Figure 1(c)). We observed that there was no evidence of GCs in the normal conjunctiva sections (Figure 1(a)). In comparison with these control biopsies, the pterygia connective tissue (*Substantia Propria*) comprised a dense and locally invasive follicular inflammatory infiltrate. This infiltrate is tightly connected to the inferior edge of the epithelium (Figure 1(c)). Moreover, the pterygia is often characterized by fibrosis and neovascularization and a substantial network of blood vessels surrounds the inflammatory infiltrates, likely related to angiogenesis (Figure 1(d)).

Detection of CD3, CD68, Bcl2, NOS2 and NF- κ B in pterygium biopsies

Our results have shown that the number of T-lymphocytes and macrophages were significantly higher in the pterygium sections (CD3⁺ and CD68⁺ cells) than the negative controls (normal conjunctivas) (Figure 2(a) and (d) vs Figure 2(b)

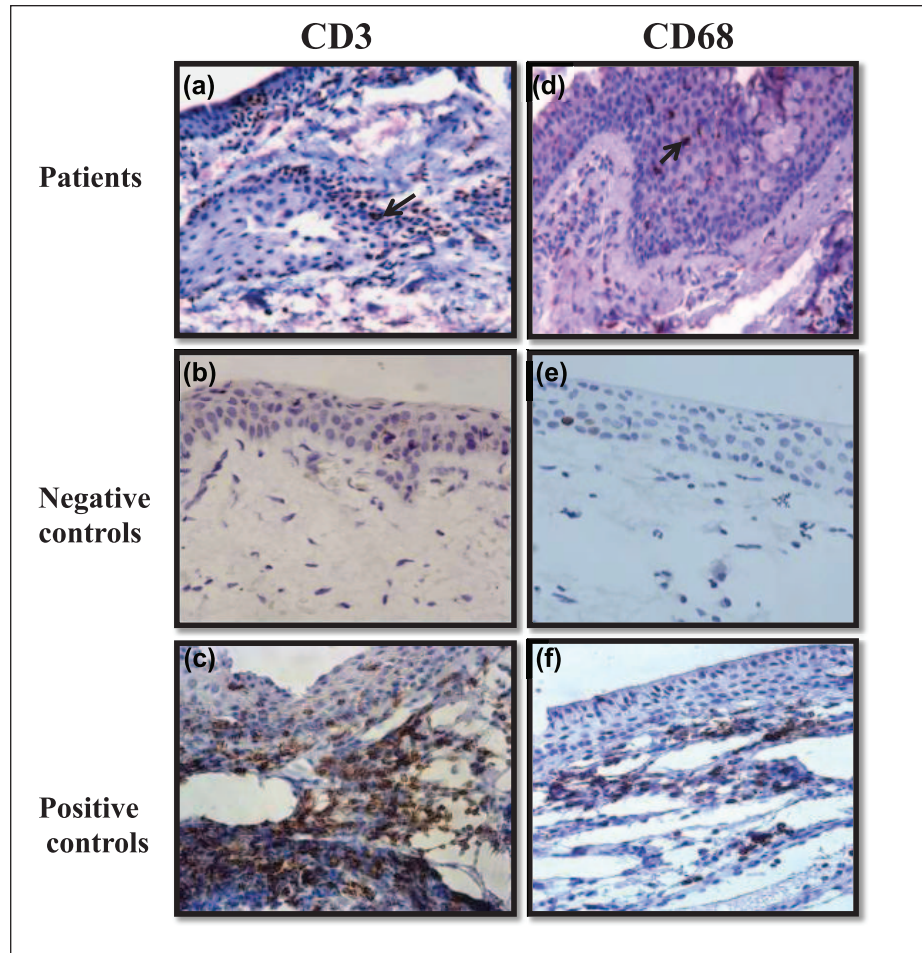


Figure 2. Immunohistochemical staining for CD3 (a, b and c) and CD68 (d, e and f), in pterygium, normal conjunctiva (negative controls) and conjunctivitis (positive controls) biopsies. All slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. The arrows denote the marked regions. Original magnification $\times 400$.

and (e), respectively). Cells were detected in the epithelium and in the connective tissue. In positive controls, the marked cells were predominantly present in the connective tissue (Figure 2(c) and (f)). Interestingly, in comparison to macrophages, T-lymphocytes represent the majority of the immune cells in the pterygium inflammatory infiltrate. In positive controls, the two populations showed a higher staining (Figure 2(a), (c), (d) and (f)). Interestingly, we noted that most T cells and macrophages were found around blood vessels and cover unevenly parts of the pterygium connective tissue (Figure 2(a) and (d)).

Microscopic examination revealed an overexpression of NOS2 (inducible NO synthase) within the epithelium and the connective tissue of the pterygium (Figure 3(d)). In contrast, this was not observed in the normal conjunctival sections

(Figure 3(e)). Moreover, in the same pterygium region, we noted an overexpression of NF- κ B which was not noted in the control sections (Figure 3(a) and (b)). In contrast, the epithelium and the connective tissue in the labial salivary glands of the patients with primary Sjögren-Gougerot were also positively stained for both markers (Figure 3(c) and (f)).

In comparison with normal conjunctival specimens, we remarked with interest that, although significant levels of Bcl2 staining were predominantly found in the basal layer of the PECs, intense positivity was observed throughout the thickness of the epithelium layer (Figure 4(a) and (b)). Furthermore, our results have demonstrated an overexpression of Bcl2 surrounding the blood vessels and nearby regions area of the pterygium connective tissue (Figure 4(a)). In contrast, positive controls showed

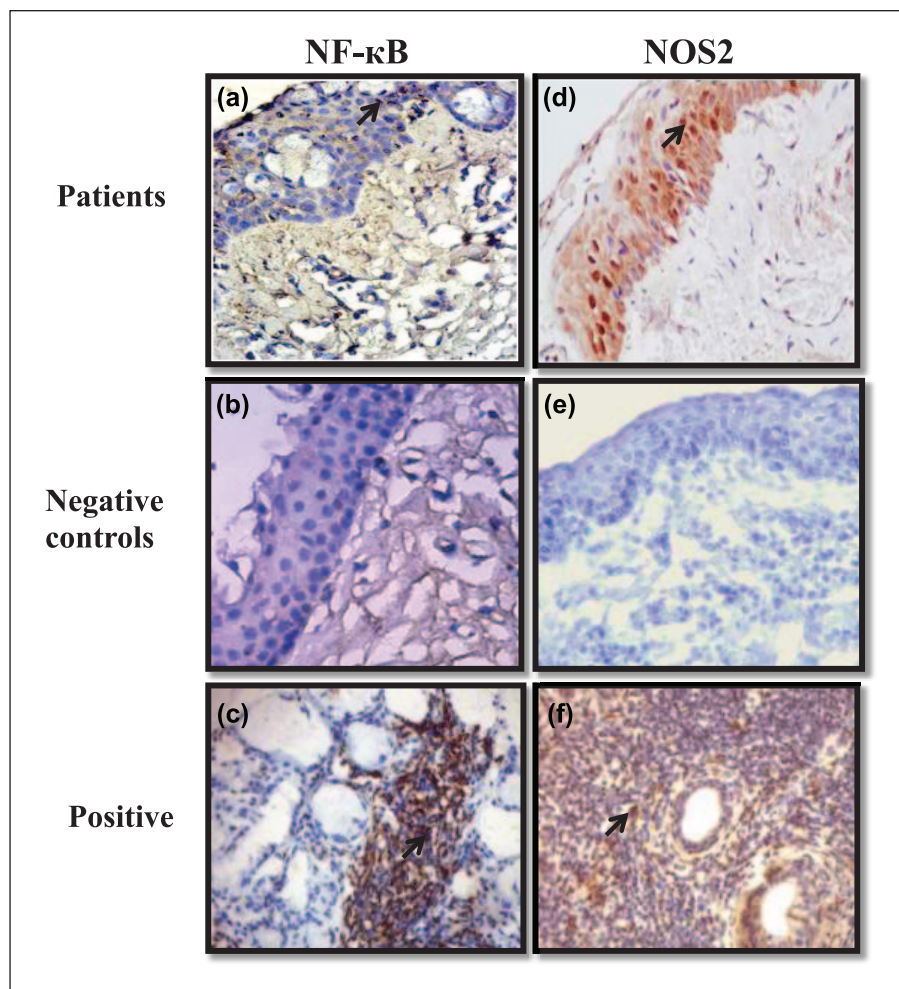


Figure 3. Immunohistochemical staining for NF-κB (a, b and c) and NOS2 (e, f and g), in pterygium, in normal conjunctiva (negative control) and in labial salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients biopsies (positive control). All slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. The arrows express the marked regions. Original magnification $\times 400$.

a strong expression of Bcl2 in the connective tissue in association with the basal layer of the epithelial cells (Figure 4(c)).

IL-17A, IL-6, IL-10 and NO production in the tears and sera of patients with pterygium

As illustrated in Figures 5–8, our results indicate that in all cases, the pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-17A) and NO levels are considerably higher in patients with pterygia compared with the healthy controls. Interestingly, cytokines and NO levels are more pronounced in the tears of the patients compared to their sera (IL-6 tears vs IL-6 sera: 69.90 ± 5.59 pg/mL vs 7.66 ± 0.71 pg/mL, respectively; IL-17A tears vs IL-17A sera: 242.20 ± 24.24 pg/mL vs 18.04 ± 2.15 pg/mL, respectively; NO tears vs NO sera: 106.7 ± 9.02 μ M vs 58.28 ± 7.40 μ M, respectively). Therefore, these

findings indicate that inflammatory mediators were abundantly present in the tears. Additionally, we observed that the concentrations of IL-10 (an immunoregulatory cytokine) were lower in the patients' tears and sera; however, this difference was not statistically significant (Figure 6). Therefore, the concentration of IL-10 appears to be insufficient to regulate the enhanced inflammatory process.

Discussion

Pterygium can be described as a benign uncontrolled growth of the conjunctive tissue that covers the sclera. However, pterygium can severely alter visual function in advanced cases and become inflamed, leading to redness and irritation of the affected area.²² It appears that pterygium is due to an inflammatory and degenerative process that

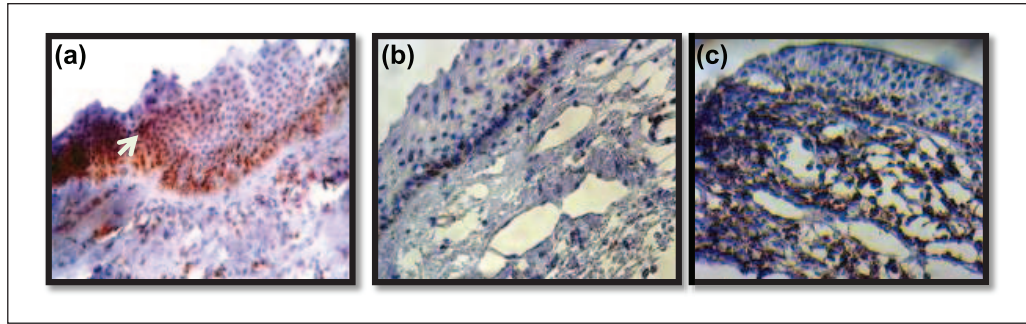


Figure 4. Immunohistochemical staining for Bcl2 in pterygium (a), normal conjunctiva (b, negative controls) and conjunctivitis (c, positive controls) biopsies. All slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. The arrows denote the marked regions. Original magnification $\times 400$.

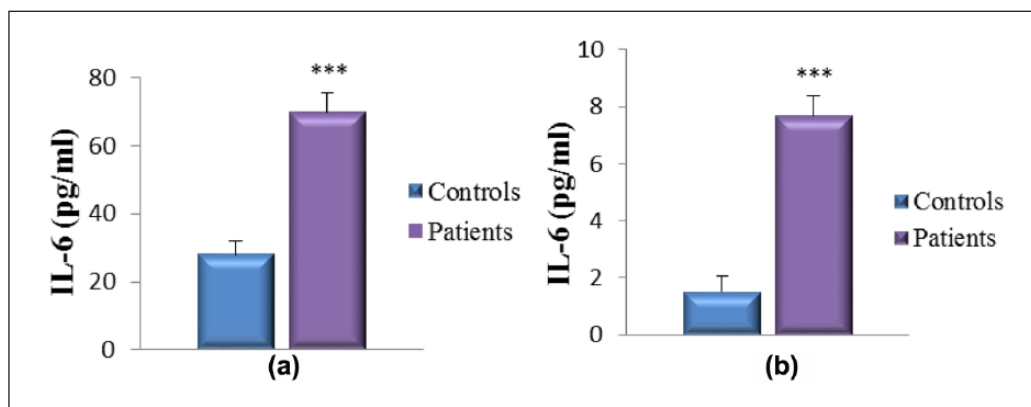


Figure 5. Concentration of IL-6 in the tears (a) and sera (b) from patients with pterygium. * $P < 0.05$ versus Controls; ** $P < 0.01$ versus Controls; *** $P < 0.001$ versus Controls.

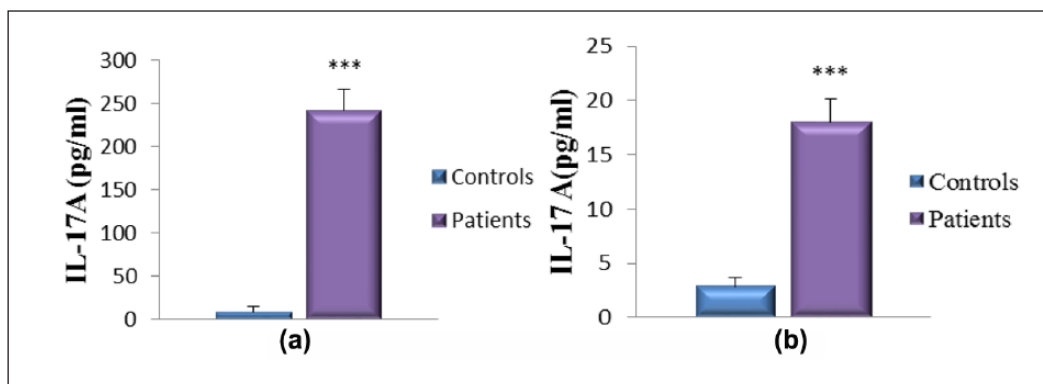


Figure 6. Concentration of IL-17A in the tears (a) and sera (b) from patients with pterygium. * $P < 0.05$ versus Controls; ** $P < 0.01$ versus Controls; *** $P < 0.001$ versus Controls.

stems from uncontrolled cellular proliferation of the subconjunctival and fibrovascular linking tissue on the cornea.²

The main aetiological factor incriminated in pterygium apparition is UV radiation exposure. The molecular mechanism by which tissue proliferation is induced remains unclear. Indeed, it has

been reported that a mutagenesis caused by the effects of reactive oxygen species generated by UV light could constitute the principal trigger of non-cancer ocular diseases, including pterygium.² Chronic exposure to UV light has been shown to trigger excessive production of NO through a photochemical reaction.²³ Previous studies showed

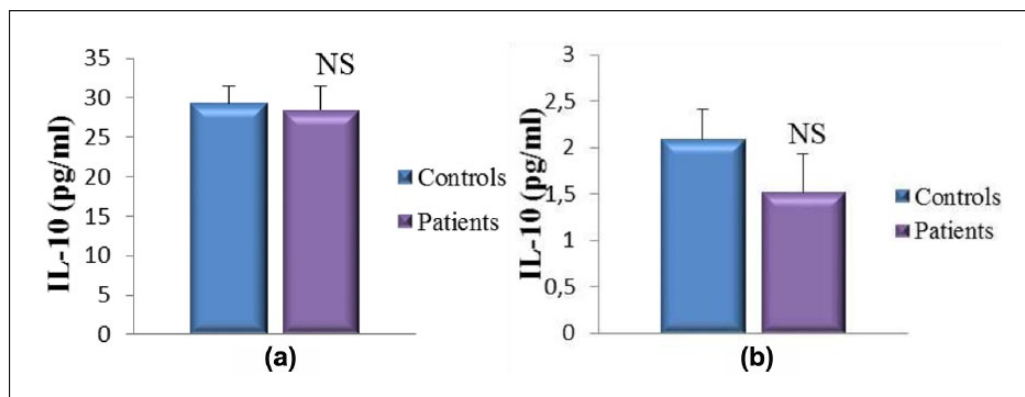


Figure 7. Concentration of IL-10 in the tears (a) and sera (b) from patients with pterygium.

* $P < 0.05$ versus Controls; ** $P < 0.01$ versus Controls; *** $P < 0.001$ versus Controls. NS: not significant.

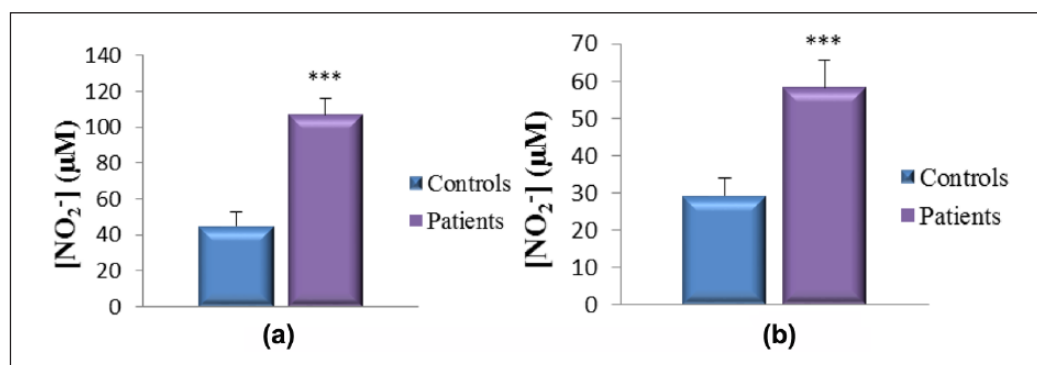


Figure 8. Total nitrite concentration in the tears (a) and sera (b) from patients with pterygium.

* $P < 0.05$ versus Controls; ** $P < 0.01$ versus Controls; *** $P < 0.001$ versus Controls.

controversial results concerning the presence of this radical in pterygium. Ozdemir et al.²⁴ in 2005 found reduced NO levels in patients biopsies while the groups of Balci et al.²⁵ in 2011 and Kormanovski et al.²³ in 2014 showed increased tissue content. Our study, although realized in both sera and tears, is in accordance with the last study. Moreover, this result is comforted by the local expression of NOS2, suggesting a local production of NO in tissue. This presence was reported previously concomitantly with vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the main actors in pterygium pathogenesis.^{26,47,48} These data indicate that NO might be an important factor in the development of pterygium. This radical is likely to cause changes in the oxidant/antioxidant status of the human cornea.²³

NOS2 expression is triggered by several immunological factors as pro-inflammatory cytokines. The main transcriptional factor responsible for this induction is NF-κB.²⁷ In our study, we showed an

important expression and activation of this factor in situ. NF-κB expression was broader than NOS2 expression since it affected all tissue parts. Our results comfort previous reports of NF-κB activation both in vivo and in vitro in cultured epithelial cells showing increased Iκ-Bα phosphorylation.^{28,29} Thus, the NF-κB pathway appears to play a key role in pterygium inflammation, which enhances pterygia pathogenesis and its progression.

NF-κB regulates gene expression implicated in different processes, including cellular proliferation, inflammation and other immune responses and activating genes associated with pro-inflammatory cytokines.³⁰ The activation of NF-κB in pterygia could be one of the mechanisms involved in the inflammatory responses that enhance pterygia pathogenesis and its progression.³¹ The concomitant increase in the local NO and IL-6 secretion with NF-κB expression suggests a relationship between IL-6, NOS2 expression and NF-κB activation in pterygia tissue. In fact, it has been reported

that several inflammatory markers can be induced following in vitro activation of NF- κ B in primary pterygium fibroblasts.^{7,28}

In the same line, several in vitro studies showed the induction of pro-inflammatory cytokines by corneal limbus epithelial cells.³² This response seems to be triggered in vivo since the same profile can be observed in pterygium biopsies.³³ The high levels of IL-17A, IL-6 and NO assessed in the tears of patients with NOS2 and NF- κ B expression in pterygium sections suggest a probable association of the local inflammatory response with pterygium disease. This hypothesis is supported by the high levels of inflammatory infiltrates observed in pterygium samples. In addition, we observed a high expression of CD3 and CD68 associated with the elevated levels of IL-17A, IL-6 and NO in tears of patients with pterygium compared to the healthy controls. Our data suggest that IL-17A and IL-6 production may contribute to the up-regulation of NOS2 expression in patients, thereby inducing the inflammatory process. It appears that the inflammatory response is likely regulated via the Th17 pathway. Our findings are supported by recent studies demonstrating IL-17A expression in the inflammatory regions of pterygium sections.^{34,35} There is increasing evidence that IL-17A is a strong mediator of the inflammatory response in various tissues.^{9,36,37} In particular, IL-17A promotes the pro-inflammatory responses induced by IL-1 β and TNF- α .^{36,37} Moreover, IL-17A is primarily produced by Th17 populations differentiated upon exposure to combinations of IL-1 β , IL-6 and TGF- β .^{9,38–40}

We postulate that UV light exposure may have provided the initial trigger that stimulates epithelial and immune cells to produce IL-17A, IL-6 and NO. Indeed, a previous study reported the possible implication of ultraviolet B (UVB) radiation in the synthesis of two inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8).^{7,41} Therefore, the production of such mediators may initiate a cascade of events that includes inflammation, proliferation, angiogenesis and antiapoptosis.⁴² Furthermore, cytokines have been shown to stimulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), implicating the involvement of these pathways in tissue remodelling, which could contribute to pterygium formation and/or progression.^{43,48}

The maintenance of cellular homeostasis is essentially regulated by two processes: (1) cellular

proliferation and (2) cellular apoptosis.⁴⁴ To assess whether enhancement of anti-apoptotic pathway is involved in the development of pterygia, we evaluated the expression of the anti-apoptotic protein, Bcl2, in pterygia and normal bulbar conjunctival biopsies (negative controls). Our findings revealed that Bcl2 is overexpressed in pterygia sections compared to the negative controls. These results are corroborated by previous research conducted by Tan et al.⁴ and Liang et al.⁴⁶ Bcl2 positivity in the pterygium biopsies may play an important role in the disease. It is likely that pterygium is related to tumours which form in response to inflammatory processes.^{45,46} Based on the findings of this study, in addition to NOS2 up-regulation with pro-inflammatory cytokines, we suggest the potential role of IL-17A and IL-6 in the induction of inflammation and anti-apoptotic events. The concomitant expression of Bcl2 in pterygia biopsies observed in our study sustains this hypothesis and indicates a relationship between inflammation and anti-apoptotic processes in pterygium pathogenesis, thereby enhancing both tissue damage and dysregulated cellular proliferation.

Acknowledgements

The authors thank the patients, controls and the surgical staff of the Ophthalmological Department of the Ibn Rochd University Hospital, Annaba, Algeria. The authors express gratitude to the Department of Anatomopathology of the Ibn Rochd University Hospital, Annaba, Algeria, and Dr Sarah Benchabane for her technical help in particular for immunohistological analysis of positive controls.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by the Algerian Agency of Research Development in Health (ATRSS).

References

1. Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, et al. (2008). The pathogenesis of pterygium: Current concepts and their therapeutic implications. *Ocular Surface* 6: 24–43.
2. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, et al. (2011) Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. *American Journal of Pathology* 178(2): 817–827.

3. Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, et al. (2014) The role of heredity in pterygium development. *International Journal of Ophthalmology* 7(3): 563–573.
4. Cárdenas-Cantú E, Zavala J, Valenzuela J, et al. (2016). Molecular basis of pterygium development. *Seminars in Ophthalmology* 31(6): 567–583.
5. Yam JC and Kwok AK (2014) Ultraviolet light and ocular diseases. *International Ophthalmology* 34(2): 383–400.
6. Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, et al. (2003) The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *American Journal of Pathology* 162(2): 567–574.
7. Di Girolamo N, Wakefield D and Coroneo MT (2006) UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(6): 2430–2437.
8. Awasthi A and Kuchroo VK (2009) Th17 cells: From precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology* 21(5): 489–498.
9. Mesquita D Jr, Cruvinel WM, Câmara NOS, et al. (2009) Autoimmune diseases in the TH17 era. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42(6): 476–486.
10. Rafa H, Saoula H, Belkhef M, et al. (2013) IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: Immunomodulatory effect of retinoic acid. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 33(7): 355–368.
11. Benchabane S, Boudjelida A, Toumi R, et al. (2016) A case for IL-6, IL-17A, and nitric oxide in the pathophysiology of Sjögren's syndrome. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 29(3): 386–397.
12. Brand S (2009) Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: New immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 58: 1152–1167.
13. Soufli I, Toumi R, Rafa H, et al. (2016) Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 7(3): 353–360.
14. Karthikeyan A, Patnala R, Jadhav SP, et al. (2016) MicroRNAs: Key players in microglia and astrocyte mediated inflammation in CNS pathologies. *Current Medicinal Chemistry* 23(30): 3528–3546.
15. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. (2008) Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews* 223: 87–113.
16. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8(9): 967–974.
17. Kolios G, Valatas V and Ward SG (2004) Nitric oxide in inflammatory bowel disease: A universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 113(4): 427–437.
18. Rafa H, Benkhefifa S, Ait Younes S, et al. (2017) All-trans retinoic acid modulates TLR4/NF- κ B signaling pathway targeting TNF- α and nitric oxide synthase 2 expression in colonic mucosa during ulcerative colitis and colitis associated cancer. *Mediators of Inflammation* 2017; 2017: 7353252.
19. Belguendouz H, Messaoudène D, Lahmar K, et al. (2011) Interferon- γ and nitric oxide production during Behçet uveitis: Immunomodulatory effect of interleukin-10. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31(9): 643–651.
20. Jones DT, Monroy D and Pflugfelder SC (1997) A novel method of tear collection: Comparison of glass capillary micropipettes with porous polyester rods. *Cornea* 16(4): 450–458.
21. Touil-Boukoffa C, Bauvois B, Sancéau J, et al. (1998) Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: Relationship between nitrite production and interferon-gamma levels. *Biochimie* 80(8–9): 739–744.
22. Liu T, Liu Y, Xie L, et al. (2013) Progress in the pathogenesis of pterygium. *Current Eye Research* 38(12): 1191–1197.
23. Kormanovski A, Parra F, Jarillo-Luna A, et al. (2014) Oxidant/antioxidant state in tissue of primary and recurrent pterygium. *BMC Ophthalmology* 14: 149.
24. Ozdemir G, Inanc F and Kilinc M (2005) Investigation of nitric oxide in pterygium. *Canadian Journal of Ophthalmology* 40: 743–746.
25. Balci M, Sahin S, Mutlu FM, et al. (2011) Investigation of oxidative stress in pterygium tissue. *Molecular Vision* 17: 443–447.
26. Lee DH, Cho HJ, Kim JT, et al. (2001) Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 20(7): 738–742.
27. Kleinert H, Pautz A, Linker K, et al. (2004) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology* 500(1–3): 255–266.
28. Siak JJK, Ng SL, Seet LF, et al. (2011) The nuclear-factor kappaB pathway is activated in pterygium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(1): 230–236.
29. Torres J, Enríquez-de-Salamanca A, Fernández I, et al. (2011) Activation of MAPK signaling pathway and NF- κ B activation in pterygium and ipsilateral pterygium-free conjunctival specimens.

- Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52: 5842–5852.
30. Napetschnig J and Wu H (2013) Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annual Review of Biophysics* 42: 443–468.
 31. Lee HS, Lee MS, Lee YJ, et al. (2016) Chondrocyte-derived extracellular matrix suppresses pathogenesis of human pterygium epithelial cells by blocking the NF- κ B signaling pathways. *Molecular Vision* 22: 1490–1502.
 32. Chao SC, Hu DN, Roberts J, et al. (2007) Inhibition effect of curcumin on UVB-induced secretion of pro-inflammatory cytokines from corneal limbus epithelial cells. *International Journal of Ophthalmology* 10(6): 827–833.
 33. Josifovska N, Szabó DJ, Nagymihály R, et al. (2017) Cultivation and characterization of pterygium as an ex vivo study model for disease and therapy. *Contact Lens & Anterior Eye* 40(5): 283–292.
 34. Jabarin B, Solomon A and Amer R (2016) Interleukin-17 and its correlation with vascular endothelial growth factor expression in ocular surface pathologies: A histologic study. *European Journal of Ophthalmology* 26(4): 283–286.
 35. Tiong KI, Zahidin AZM, Sumugam SK, et al. (2017) Evaluation of Interleukin-17 and Interleukin-23 in pterygium: Immunohistochemistry study. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* 6: 403–406.
 36. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52(1): 65–70.
 37. Katz Y, Nadiv O and Beer Y (2001) Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: A possible role as a ‘fine-tuning cytokine’ in inflammation processes. *Arthritis & Rheumatism* 44(9): 2176–2184.
 38. Stockinger B and Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* 19(3): 281–286.
 39. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152): 484–487.
 40. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* 27: 485–517.
 41. Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, et al. (2002) UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43(11): 3430–3437.
 42. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, et al. (2004) Pathogenesis of pterygia: Role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research* 23: 195–228.
 43. Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, et al. (2000) Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(3): 671–679.
 44. Livezeanu C, Crăitoiu MM, Mănescu R, et al. (2011) Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 52(3): 837–844.
 45. Tan DT, Tang WY, Liu YP, et al. (2000) Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *British Journal of Ophthalmology* 84(2): 212–216.
 46. Liang K, Jiang Z, Ding BQ, et al. (2011) Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision* 17: 1687–1693.
 47. Szabó C, Ischiropoulos H and Radi R (2007) Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(8): 662–680.
 48. Bianchi E, Scarinci F, Grande C, et al. (2012) Immunohistochemical profile of VEGF, TGF- β and PGE2 in human pterygium and normal conjunctiva: Experimental study and review of the literature. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 25(3): 607–615.

Résumé

Le ptérygion est une maladie de la surface oculaire qui touche uniquement l'être humain. C'est une tumeur bénigne de forme triangulaire, qui se trouve le plus souvent dans l'aire de la fente palpébrale et préférentiellement dans le secteur nasal. C'est une néoformation conjonctivo-élastique qui évolue en menaçant le centre cornéen et par conséquent l'acuité visuelle. Malgré son caractère bénin, sa tendance à la récurrence même après un traitement chirurgical, en fait un véritable défi thérapeutique. Les UV constitueraient son principal facteur de risque. Elle est donc très répandue dans les pays à forte luminosité. Le ptérygion est couramment observé en Algérie. Sa fréquence hospitalière au niveau de la clinique ophtalmologique du CHU Ibn Rochd-Annaba est de 3.7 % avec une prédominance masculine. Elle touche une population adulte de 26 à 93 ans avec un âge moyen de 58 ± 14 ans. Les professions masculines (Maçon, agriculteur...) semblent être les plus exposées à la maladie. Bien que l'étiologie exacte du ptérygion reste incertaine, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer sa pathogénèse. Dans la présente étude nous nous sommes intéressés au rôle de l'inflammation dans le ptérygion. Dans ce contexte, nous avons évalué certains indicateurs biologiques au niveau des biopsies de la lésion, du sang et des larmes des malades. Nous avons remarqué que la VS et les concentrations des immunoglobulines sériques (IgG et IgM) étaient anormalement élevées ce qui suggère l'implication de l'inflammation et de la réponse immunitaire humorale dans sa pathogénèse. Des concentrations anormalement élevées des cytokines pro-inflammatoires (IL-17A et IL-6) et du NO ont également été retrouvés au niveau des larmes et du sang des patients (n=43). L'élévation de la concentration de ces derniers était supérieure dans les larmes en comparaison avec leur élévation sanguine. Parallèlement, des infiltrats inflammatoires constitués de lymphocytes T, B et macrophages, une surexpression de la NOS2, du NF- κ B et du Bcl-2 ont également été repérés dans les biopsies du ptérygion. L'ensemble de nos résultats indiquent l'existence d'une relation entre l'inflammation locale et les processus antiapoptotiques.

Mots clés : cytokines, inflammation, NO synthase, ptérygion, antiapoptose.

Abstract

Pterygium is an ocular surface disease that affects only humans. It is a triangular benign tumor, which is most often found in the palpebral fissure and preferentially in the nasal area. It is an elastic connective neoformation evolve by threatening the corneal center and therefore the visual acuity. Despite its benign character, it's a serious disease because it tends to relapse even after surgical treatment, which makes it a real therapeutic challenge. Considering that UV is its main risk factor, it is widespread in countries with high brightness. Pterygium is commonly observed in Algeria. Its hospital frequency incidence at the ophthalmology department of the Annaba university hospital is 3.7 %, with a male predominance. It affects a population of adults between 26-93 years old with an average age of 58 ± 14 years. Male occupations (Bricklayer, Farmer...) seem to be the most exposed to the disease. Although the exact etiology of pterygium remains uncertain, several hypotheses have been proposed to explain its pathogenesis. In this study, we investigate the role that inflammation plays in the pterygium. In this context, we have evaluated some biological indicators at the level of the lesion biopsies, the blood and the tears of the patients. We found that the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and the immunoglobulin concentrations (IgG and IgM) in blood were abnormally high, suggesting the involvement of inflammation and humoral immune response in the pterygium pathogenesis. Abnormally high levels of pro-inflammatory cytokines (IL-17A and IL-6) and NO were found in the tears and blood of the patients (n = 43). Their elevated concentration was higher in the tears compared to their blood elevation. In parallel, inflammatory infiltrates consisting of T cells, B and macrophages, over expression of NOS2, NF- κ B and Bcl-2 were also identified in pterygium biopsies. The whole results indicate a relationship between local inflammation and antiapoptotic processes.

Keywords: cytokines, inflammation, NO synthase, pterygium, antiapoptotic process.

ملخص

الظفرة مرض لسطح العين خاص بالإنسان. هي عبارة عن ورم حميد ثلاثي الشكل، موجود غالبا في الجانب الأنفي من الصلبة العينية. تتميز بنمو تدريجي للملتحمة مهددة وسط القرنية ومؤدية بالتالي إلى الحد من الرؤية. على الرغم من طبيعتها الحميدة، تعتبر الظفرة تحديا علاجيا حقيقيا، لكونها تعود ولو بعد العلاج الجراحي. يحتمل أن الأشعة فوق البنفسجية هي العامل الرئيسي لظهورها، ولهذا فهي منتشرة في البلدان المتميزة بإشعاع ضوئي كبير. عادة ما يتم ملاحظة الظفرة في الجرائر، فيبلغ معدل انتشارها في عيادة طب العيون التابعة لمستشفى ابن رشد الجامعي لولاية عنابة بـ 3.7٪، حيث يغلب عدد المرضى، الذكور. إنها تصيب الأشخاص الراشدين، البالغين من العمر 26-93 عاما، ويبلغ متوسط أعمارهم 58 ± 14 سنة. يبدو أن مهن الذكور أكثر عرضة لهذا المرض (بناء، فلاح ...). على الرغم من أن الأسباب الحقيقية لظهور الظفرة غير مؤكدة، اقترحت عدة فرضيات لتفسير آليات ظهورها. في هذه الدراسة قمنا بتحري دور الالتهاب في الظفرة. في هذا السياق، قمنا بتقييم بعض المؤشرات البيولوجية على مستوى عينات تشريحية لهذا الورم، وكذلك على مستوى الدم والدموع للمصابين بهذا المرض. لاحظنا حينها، أن سرعة ترسب الكريات الحمراء (VS) وتركيز الأجسام المضادة (IgG و IgM) على مستوى المصل كانت عالية بشكل غير طبيعي، مما يشير إلى تورط الالتهاب والاستجابة المناعية الخلطية في آلية ظهور الظفرة. لقد وجدنا أيضا تركيزات عالية بشكل غير طبيعي من السيتوكينات المؤدية للالتهاب (IL-6 و IL-17A) وأحادي أكسيد النيتروجين (NO) على مستوى دم ودموع المرضى ($n = 43$). وكان الارتفاع في التركيز هذا، أعلى في الدموع بالمقارنة مع الدم. في آن واحد، تم ملاحظة مجموعة من الخلايا الالتهابية (خلايا لمفاوية B، T والخلايا البلعمية الكبيرة) وآثار فائقة التعبير لحمض النيتريك سنثاز 2 (NOS2)، NF- κ B و Bcl-2 على مستوى عينات الورم. جميع نتائجنا تشير إلى وجود علاقة بين الالتهاب المحلي وآليات توقيف الإستماتة الخلوية (الإنقسام الخلوي الغير العادي).

كلمات البحث: السيتوكينات، الالتهاب، حمض النيتريك سنثاز، الظفرة، آليات توقيف الإستماتة الخلوية.