

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 42/D3C/2019

N° de série : 06/BA/2019



Thèse Présentée pour obtenir le diplôme
de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : **Biotechnologie, Biologie et Environnement**
Option : **Immuno-Oncologie**

Présentée par :

OTMANI Khawla

**Etude du rôle de Monoxyde d'azote (NO) dans la progression
du myélome Multiple (MM) et son implication dans le
développement des maladies osseuses associées au MM**

Membres du jury :

Présidente	: Dalila . SATTÀ	Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1
Directrice de thèse	: Dalila . NAIMI	Prof. Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Taoufik KHAZNADAR
Co-directrice de thèse	: Nadia .BOUDERSA	Prof. Faculté de Médecine , Université Salah Bounider , Constantine 3
Examineurs :		
	Rachid .ROUABHI	Prof. Université Larbi Tebessi , Tebessa
	Ibtissem . ELOUAR	MCA. Université Frères Mentouri ,Constantine 1

2018 – 2019

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le Tout Puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma très profonde gratitude à ma directrice de recherche **Professeur Dalila NAIMI**, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie (ENSB) de Constantine, d'avoir eu l'amabilité de diriger ce travail. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance pour tous ses efforts, sa générosité, son savoir, et ses critiques constructives.

Mes plus sincères remerciements s'adressent aussi à ma co-directrice de recherche **Professeur Nadia BOUDERSA**, professeur en Rhumatologie au Centre Hospitalo-universitaire Dr. Ben Badiss de Constantine, pour l'intérêt qu'elle a réservé à ce travail, ainsi que pour ses conseils avisés et son œil critique qui ont contribué à corriger, structurer et améliorer ce travail..

Je tiens aussi à exprimer mes sincères remerciements et reconnaissance aux membres du jury qui ont bien voulu prendre le temps de lire et d'évaluer cette thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement **Docteur Romuald MENTAVERRI**, pour m'avoir intégrée avec bienveillance au sein de son équipe du « Laboratoire INSERM U1088 Amiens, France » et de m'avoir fourni un cadre de travail propice à l'apprentissage. Il a su me transmettre sa passion pour la science et sa rigueur scientifique.

Je tiens également à remercier **Professeur Jean Pierre MAROLLEAU**, le Chef du service d'Oncopole d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire CHU d'Amiens, France, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire «Lymphocyte Normal Pathologique et Cancers, France ».

Mes vifs remerciements vont aussi à : **Pr Djidjik .R** (CHU Béni Messous), **Pr Grifi .F** et **Dr Smaili.K** (CHU Annaba), **Pr Saidi. M** et **Pr Rwabhia. S** (CHU Batna), **Dr Benhalilou .M** (CHU Constantine) qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je voudrais aussi adresser un remerciement chaleureux à mon oncle **Docteur Saii OTMANI**, spécialiste en Hématologie, pour m'avoir encouragé, conseillé et aidé en me fournissant les réactifs dont j'avais besoin pour parachever ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

**à ma Mère et mon Père qui m'ont encouragé, ont veillé avec moi,
m'ont supporté, et qui ont été à mes côtés à tout instant ;**

**à mes frères Fouad et Oussama et mes sœurs Amel, Imene, Asma
et Loudjaina pour leurs encouragements ;**

à mes beaux-frères, Toufik et Mehdi ;

à tous mes amis et collègues ;

et à tous ceux qui ont une place dans mon cœur.

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

PARTIE I : LES DONNEES DE LA LITTERATURE

Chapitre I : Le monoxyde d'azote (NO)

I.1.Définition de monoxyde d'azote	4
I. 2.Sources du NO	4
I.2.1.Voie génomique (NO – Nitric Oxide Synthase Dependent).....	4
I.2.1.a.NOS constitutives	5
I.2.1.b.NOS inductible (iNOS NOS2)	5
I.2.2.Voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO) (NO-NOS-independent)	6
I.3.Biosynthèse du NO	8
I.3.1.Voie génomique (NO– Nitric Oxide Synthase NOS Dependent)	8
I.3.2.Voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO) (NO- NOS-independent)	9
I.4.Régulation de production de NO	11
I.4.1.Régulation de NOS constitutives NOSc	12
I.4.2.Régulation de NOS inductible iNOS	12
I.4.2. 1. Régulation de la transcription et la post-transcription d'iNOS	12
I.4.2. 2. Régulation de la traduction et la post-traduction d'iNOS	13
I.5. Mécanisme d'action de NO	14
I.5. 1.Mécanisme d'action cGMP-dépendante (voie NO-sGC-cGMP)	14

Table des matières

I.5.2. Mécanisme d'action cGMP-Indépendante (voie NO-sGC-cGMP)	14
I.5.2.1. Action via la nitrotyrosination	15
I.5.2.2. Action via la Peroxynitrite (ONOO ⁻).....	16
I.5.2.3. Action via les agents oxydants de NO	16
I.5.2.4. Nitration d'acides gras insaturés (S-alkylation)	17
I.5.2.5. Nitration des nucléotides de guanine (S-guanylation).....	17
I.5.2.6. Action via la S-nitrosylation	17
I.5.2.7. Mode d'action via les modifications épigénétiques	18
I.5.2.8. Action via la mitochondrie	21
I.5.2.9. Action via la signalisation intracellulaire MAPK	21
I.6. Implication du NO dans la réponse immunitaire	21
I.6.1. Implication du NO dans la réponse immunitaire innée	22
I.6.2. Implication du NO dans la réponse immunitaire adaptative	23
I.7. Implication de NO dans le cancer	24
I.7.1. Les effets pro-tumoraux du NO	25
I.7.2. Les effets anti-tumoraux du NO	27
I.7.3. L'implication de NO dans la réponse immunitaire anti-tumorale	28
I.7.3.1. Les effets anti tumoraux de NO au cours de la réponse immunitaire	29
I.7.3.2. Les effets immunosuppresseurs de NO au cours de la réponse immunitaire	30
I.7.4. Implication de NO dans les cancers hématologiques	30
I.8. NO comme cible thérapeutique anti-tumorale	30
I.8.1. L'induction de NO comme cible thérapeutique anti-tumorale	31
I.8.2. L'inhibition de NO comme cible thérapeutique anti-tumorale	32

Table des matières

Chapitre 2 : Le myélome multiple (MM)

II.1. Définition du myélome multiple (MM).....	33
II.2. Epidémiologie de (MM)	33
II.3. Etiologie de (MM)	35
II.3.1. Les Facteurs génétiques.....	35
II.3.1.1. Anomalies oncogéniques primaires.....	35
II.3.1.1.1. Les anomalies non hyperdiploïdes.....	35
II.3.1.1.2. Les anomalies hyperdiploïdes.....	36
II.3.1.2. Anomalies oncogéniques secondaires	37
II.3.1.3. La prédisposition de système d'Antigène de leucocyte humain (HLA).....	38
II.3.2. Les facteurs environnementaux et d'autres facteurs de risque	39
II.3.2. 1. La race	39
II.3.2. 2. L'exposition aux rayons	39
II.3.2.3. Le risque professionnel.....	39
II.3.2.4. L'obésité.....	39
II.3.2.5. Le tabac.....	40
II.3.2.6. Les facteurs viraux.....	40
II.4. La physiopathologie de (MM)	40
II.4.1. Ontogenèse des plasmocytes	40
II.4.2. Ontogenèse du MM	41
II.4.3. Les phénotypes de MM	42
II.4.4. Les types de MM	42
II.4.4.1. Le MM asymptomatique	42

Table des matières

II.4.4.2. Le MM non sécrétoire	42
II.4.4.3. Le MM symptomatique	43
II.4.5. Symptômes et signes pathologiques de MM	43
II.4.5.1. la production des Anticorps monoclonaux (Acms)	43
II.4.5.2. Les maladies osseuses associées au MM (MBD)	44
II.4.5.3. Les signes d'hypercalcémie	46
II.4.5.4. Anémie.....	46
II.4.5.5. Atteinte rénales	46
II.4.5.6. Les infections.....	46
II.4.5.7. Complications neurologiques	46
II.4.5.8. Syndrome d'hyperviscosité	47
II.5. Classification de MM	47
II.5.1. Classification de Durie et Salmon (DS)	47
II.5.2. Classification ISS (International Staging System)	48
II.5.3. Classification moléculaire	48
II.6. La relation de MM avec l'environnement tumoral.....	49
II.7. La réponse immunitaire au cours de MM.....	51
II.7.1. La réponse immunitaire adaptative au cours de MM	51
II.7.1.1. Le rôle de LT dans le MM.....	51
II.7.1.2. Le rôle de LB dans le MM.....	51
II.7.2. La réponse immunitaire innée au cours de MM.....	52
II.7.3. L'échappement tumoral à la réponse immunitaire au cours de MM.....	52
II.8. La thérapie de MM.....	52

Table des matières

PARTIE II : EXPERIMENTATIONS

Matériel et Méthodes

I.1. Matériel biologique	54
I.1.1. Patients	54
I.1.2. Les lignées cellulaires	54
I.2. Produits et réactifs	54
II. Evaluation de concentration de NO chez les patients MM	55
II.1. Précipitation au (Zn ₂ SO ₄)	55
II.2. Précipitation au TCA	55
II.3. Évaluation et caractérisation de la méthode de précipitation	56
II.4.1 Préparation des réactifs	56
II.4.2. Préparation de standard	56
II.4.3. Dosage de Nitrite	56
II.4.4. Dosage de Nitrate	56
II.5. Dosage de NO par le kit Arbor assays	57
II.5.1. Préparation des réactifs	57
II.5.2. Préparation de standard	57
II.5.3. Le dosage de nitrite	57
II.5.4. Le dosage de nitrate	57
III. Evaluation des marqueurs inflammatoires chez MM	58
IV. Evaluation des marqueurs de pronostic chez les patients MM	58
II.1. Dosage de protéines totales	58

Table des matières

II.2.Dosage des Igs dans le plasma des patients MM	58
II.3.Dosage de β 2m dans le plasma des patients MM.....	59
II.4.Dosage des CLL k / λ dans le plasma des patients MM.....	59
V. Evaluation de statut immunitaire des patients MM	59
V.1.Evaluation des cellules immunitaires systémiques chez les patients MM.....	59
V.2.Evaluation de pourcentage des cellules immunitaires infiltrant la tumeur chez les patients MM.....	59
VI. Evaluation des marqueurs de remodelage osseux chez les patients MM	59
VI.1.La culture simple des cellules de RPMI 8226 et MG63	61
VI.2. La co-culture des cellules de RPMI 8226 et MG63	61
VI.3.La co-culture des cellules de RPMI 8226 et avec un nombre décroissant des MG63	61
VI.4.La co-culture des cellules de MG63 avec un nombre décroissant des RPMI 8226.....	62
VI.5.Etude de viabilité des cellules RPMI 8226 et MG63 par le test MTT	62
VI.5.1.Viabilité des cellules RPMI 8226	63
VI.5.2.Viabilité des cellules MG63.....	63
VI.5.3.Dosage de NO	63

Résultats et Discussion

Résultats

Chapitre I : Analyses des données épidémiologiques des patients atteints de MM

I.1. La distribution de genre chez les patients MM.....	64
I.2. La distribution d'âge des patients MM	64
I.3. La fréquence des types d'Ac mproduites par les patients MM.....	64
I.4. la fréquence de la survie des patients MM après confirmation de la maladie	65

Table des matières

I.5. fréquence de la masse tumorale (MPC%) chez les patients MM	65
---	----

Chapitre II: Evaluation de concentration de NO chez les patients MM

II.1.Caractérisation des méthodes de précipitation des protéines dans le plasma.....	66
II.2. Comparaison entre [NOx] dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D.....	66
II.2.1. La[NOx] dosé avec le kit Arbor assays ([NOx] ARB).....	67
II.2.2. La [NOx] dosé avec le kit R&D ([NOx] R&D)	67
II.2.3. Etude de similarité et corrélation entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB)	68
II.2.3.1.Similarité de ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB)	68
II.2.3.2.Corrélation entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB)	69
II.2.4. Etude de la moyenne de concentration de NOx [NOx M] dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D	70

Chapitre III : Statut du NO chez les patients MM

III.1. Étude de l'état inflammatoire	71
III.1.1. III.1.1. Etude de la[CRP].....	71
III.1.2 . corrélation entre [NO] et [CRP]	72
III.2. Le NO et les marqueurs de pronostic des patients MM	73
III.2.1. La [NO] et le genre des patients MM.....	73
III.2.2. la [NO] et l'âge des patients MM.....	73
III.2.3. La [NO] et le type d'Acm produits chez les patients MM	74
III.2.4. La [NO] et la survie des patients MM.....	75
III.2. 5.la [NO] et (MPC%) chez les patients MM	76
III.2.6. a [NO] et [β 2m] chez les patients MM.....	76
III.3.7. a [NO] et [Acm]	77

Table des matières

III.2. 8. La [NO] et [CLL κ] chez les patients MM.....	78
III.2. 9. NO] et [CLL λ] chez les patients MM	78
III.2.10. La [NO] et le (R k / λ) chez les patients MM.....	79

Chapitre IV : Le NO et le statut immunitaire des patients MM

IV.1. NO et (CIIT%)	80
IV.1.1. La [NO] selon (CIIT%).....	80
IV.1.2. Corrélation entre [NO] et (CIIT%)	81
IV.2. La [NO] et (CIS%).....	82
IV.2.1. La [NO] et (Lyn S)	82
IV.2.2. La [NO] et (Gran S)	83
IV.2.3. La [NO] et (Mono).....	84
IV.2.4. La [NO] et (Leu)	85

Chapitre IV :Implication du NO dans le développement des MBD

V.1. Le NO et les marqueurs biochimiques de remodelage osseux.....	86
V.1.1. Évaluation des marqueurs biochimiques de remodelage osseux.....	86
V.1.1.1.Evaluation de la [PAL]	86
V.1.1.2. Evaluation du bilan phosphocalcique.....	87
V.1.2. Corrélation entre [NO]et [PAL]	88
V.1.3. La[NO] selon [PAL] chez les patients MM	89
V.1.4. Corrélation entre [NO] et la concentration phosphocalcique.....	90
V.1.4.1.Corrélation entre [NO] et [Ca ⁺⁺].....	90
V.1.4.2 Corrélation entre [NO] et [phosphore]	91
V.1.5.2.La [NO] selon [phosphore].....	93

Table des matières

V.2. Evaluation de la concentration du NO produit par un modele de co-culture	94
V.2.1. La production du NO par les ostéoblastes (MG63) en culture simple	94
V.2.2. La production du NO par les MPCs (RPMI 8226) en culture simple	95
V.2.3. La production du NO en co-culture des MPCs (RPMI 8226) avec un nombre décroissant des des ostéoblastes (MG63).....	97
V.2.4.La production du NO en co-culture des ostéoblastes (MG63) par un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226)	99
II. Discussion.....	101
Conclusion et Perspectives.....	121
Références bibliographiques	

Liste des Abréviations

- [Acm]** : Concentration des Anticorps monoclonaux
- [Ca⁺⁺]** : Concentration de Calcium
- [CLLk]** : Concentration de chaîne légère lambda
- [CLLλ]** : Concentration de chaîne légère kappa
- [CRP]** : Concentration de CRP
- [NO]** : Concentration de monoxyde d'azote
- [NO_x] ARB** : Concentration des métabolites de NO dosé avec le kit Arbor assays
- [NO_x] R&D** : Concentration des métabolites de NO dosé avec le kit Arbor assays
- [NO_x]** : Concentration de métabolite de NO
- [PAL]** : Concentration de phosphatase Alkaline
- [P]** : Concentration de phosphore
- [β₂m]** : Concentration de β₂ microglobuline
- Ac** : Anticorp
- Acm** : Anticorps monoclonale
- ACSH** : Autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques
- ADMA** : Asymmetric dimethyl arginine
- Ag** : Antigène
- AMMR** : Registre Algérien de myélome multiple
- AMPc**: Adénosine mono phosphatase cyclique
- AP1** : Protéine activatrice 1
- Apaf-1** : Facteur apoptotique activant la protéase-1
- APRIL** : Ligand d'induction de prolifération
- ASK1** : Protéine kinase régulatrice du signal d'apoptose 1
- ATPase** : Adénosinetriphosphatase
- BAFF** : Facteur d'activation des cellules B

Liste des Abréviations

- Bence Jones protein** : Fragment de chaîne légère libre monoclonale
- BIRC**: Baculovirus contenant répétition d'IAP
- BMSC** : cellules stromales de la moelle osseuse
- Ca⁺⁺** : Calcium
- CARD** : Domaine de recrutement de caspase
- CAT1** : Transporteurs cationiques d'acides aminés
- CCND** : gène codant pour la cycline
- CD** : Classes de différenciation
- CE** : Cellules endothéliales
- CIIT%** : Le pourcentage des cellules immunitaires infiltrant de tumeur
- CIS** : Cellules immunitaires systémiques
- CKS1B** : Sous-unité régulatrice 1B kinase dépendante des cyclines
- CL_{Ig}** : Chaines légères des immunoglobulines
- CL_{Ig-k}** : Chaines légères des immunoglobulines kappa
- CL_{Ig-λ}** : Chaines légères des immunoglobulines lambda
- CMH II**: Complexe majeur d'histocompatibilité classe II
- CMML** : Leucémie myéломocytaire chronique
- eNOS** : Monoxyde d'azote synthases constitutives
- CREB**: protéine de liaison d'élément de la réponse à l'AMP cyclique ARNm
- CRP** : Protéine réactive C
- CXCL14** : Chemokine 14
- CYLD**: Cylindromatose
- Cys** : Cystéine
- DC** : Cellules dendritiques
- DC** : Cellules dendritiques

Liste des Abréviations

- Dél 13p**: La délétion du bras court de chromosome 13
- Dél17p** : La délétion du bras court de chromosome 17
- DNA-PK** : Protéine kinase ADN-dépendante
- DNMT** : ADN méthyl transférase
- DO** : Densité optique
- DR4** : Récepteur de la mort 4
- DS** : Classification de Durie et Salmon
- eNOS** : Monoxyde d'azote synthases endothéliales
- eNOS** : NOS endothéliales
- ERK1/2** : Régulateur kinase de signal extracellulaire1/2
- FAD** : Flavin adénine dinucléotide
- FGF** : Facteur de croissance des fibroblastes
- FGFR-3** : Récepteur de facteur de croissance des fibroblastes -3
- FMN** : Flavon mono nucléotide
- GAPDH** : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
- GAT%** : Le pourcentage des granulocytes associés au tumeur
- GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique
- Gran S %** : Le pourcentage des granulocytes systémiques
- GS** : Glutamine synthase
- GS** : Glutamine synthase
- GST** : glutathion S -transférase
- GTPCH** : Guanosine triphosphate cyclohydrolase
- H₂S** : sulfure d'hydrogène/ hydrogène sulfuré
- HAT** : Histones acétyltransférases
- HCs** : Cellules hématopoïétiques

Liste des Abréviations

- HDAC** : Histones deacetylases
- HGF** : Facteur de croissance des hépatocytes
- HHV-8** : l'herpès virus humaine-8
- HIF-1** : Facteur inductible d'hypoxie
- HIF-1** : Facteur inductible d'hypoxie 1
- HLA** : Le système d'Antigène de leucocyte humain
- HSCs** : Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes
- IC** : Cellules immunitaires
- ICAM-1** : Molécule d'adhésion inter-cellulaire
- IFN γ** : Interféron gamma
- IGF-I** : Facteur de croissance de l'Insulin I(IGF-I)
- IgH** : chaînes lourdes des immunoglobulines
- Igs** : Immunoglobulines
- IL** : Interleukine
- iNOS** : Monoxyde d'azote synthases inductible
- IRF1** : Facteur régulateur de l'interféron
- IRP-1** : Protéine régulatrice du fer-1
- IRTA1/2** : Récepteurs immunitaires associés à la translocation
- ISS** : système international de classification
- Jank** : janus kinases
- KDM** : Lysine Demethylases
- KMT** : Lysine méthyl transférases
- LAM** : Leucémie myéloïde aiguë
- L-Arg** : L-arginine
- LB** : Lymphocytes B

Liste des Abréviations

- I'eIF-2a** : Facteur d'initiation eucaryote 2 a
- Leu S %** : Le pourcentage des leucocytes systémiques
- LFA-1** : Antigène associé aux fonctions lymphocytaires 1
- LIT%** : Le pourcentage des lymphocytes infiltrant de tumeur
- LPS** : Lipopolysaccharide
- LT** : Lymphocytes T
- Lyn S%** : Le pourcentage des lymphocytes systémiques
- Maf** : Musculoaponeurotique de fibrosarcome
- MAPK** : Protéines kinases activées par les mitogènes
- MBD** : Maladies osseuses associées au myélome
- MCP-1** : Protein chemoattractant de monocyte 1
- M-CSF** : Facteur stimulant des colonies de macrophages
- MEC** : Matrice extracellulaire
- MET** : le microenvironnement tumoral
- MGUS** : Une gammopathie monoclonale de signification indéterminée
- Milieu DMEM** : Dulbecco's modified Eagle's medium
- Milieu RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium
- MIP-1 α** : Macrophage Inflammatory Proteins
- miRNA** : MicroARN
- ML** : Lymphome malin
- MM** : Myélome multiple
- MMP** : Métalloprotéinase matricielle
- MMSET** : Multiple Myeloma SET domain
- MO** : Moelle osseuse
- Mono %** : Le pourcentage des monocytes

Liste des Abréviations

- MPC %** : Pourcentage des plasmocytes de MM
- MPC** : Plasmocyte de MM
- MPs** : Protéines Monoclonaux
- MSC** : Cellules mésenchymateuses
- mt NOS** : NOS mitochondriale
- MTT** : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
- myé%** : Le pourcentage des myélocytes
- N° Gran S** : Le nombre des granulocytes systémiques
- N° Leu S** : Le nombre des leucocytes systémiques
- N° Lyn S** : Le nombre des lymphocytes systémiques
- N° Mono** : Le nombre des monocytes
- NADPH** : Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate
- NF- κ B** : Nuclear factor-kappa B
- NKT** : LT naturel killer
- nM** : Nanomole
- nNOS** : Monoxyde d'azote synthases neuronal
- NO** : Monoxyde d'azote
- NO₂-FA** : Acides gras nitrés
- NOS** : Monoxyde d'azote synthases
- NO_x** : Métabolite de NO (Nitrate+ Nitrite)
- NR** : Nitrate réductase
- O₂⁻** : superoxydes
- OAF** : Facteurs activateurs d'ostéoclaste
- OB** : Ostéoblastes
- OC** : Ostéoclastes

Liste des Abréviations

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé

ONOO⁻ : Peroxynitrite

OP : Ostéoporose

OPG : Ostiprotegrine

PAL : Phosphatase alcaline

PARP : poly- Adénosine diphosphatase -ribose-polymérase

PBS : Tampon phosphate salin

PDE : Phosphodiesterases

PGE : Prostaglandine E 2

P : Phosphate

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine Kinase G

poly-ADP : poly-Adénosine diphosphatase

PP2A : Protéine phosphatases 2A

PPARs : Récepteurs activé par les peroxisomes

PT : Protéine totale

R κ / λ : Le rapport kappa /lambda

RANK : Récepteur activateur de facteur nucléaire kappa-B

RANK-L : Ligand de Récepteur activateur de facteur nucléaire kappa-B

RKIP : Inhibiteur de protéine kinase raf

RNOI : Réactifs intermédiaires de monoxyde d'azote

RNS : Reactive Nitrogen Species

SAHTS : la Société Algérienne d'Hématologie

Liste des Abréviations

- SAHTS** : Société Algérienne d'Hématologie
- SAPK** : Protéine kinase activée par le stress
- sGC** : Guanylate cyclase soluble
- SNP** : Nitroprussiate de sodium
- SOD mt** : Superoxydes dismutases mitochondriale
- SOD** : Superoxydes dismutases
- SP1** : Protéine spécifique 1
- SSE** : Statut socio-économique
- STAT** : transducteur de signal et activateur de transcription
- SVF** : Sérum de veau foetal
- T-** : Témoins
- TCA** : L'acide trichloroacétique
- TGFh** : Facteur de croissance de transformation h
- TGF- β** : Facteur de croissance de transformation B
- Th1/ 2** : T auxiliaire ½
- TK**: Tyrosines kinases
- TLR** : Toll-like receptor
- TNF α** : Facteur de nécrose tumorale alpha
- TRAF3** : Facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale
- Treg** : T régulatrice
- TSS** : Site d'initiation de transcription
- Tyr** : Tyrosine
- VCAM-1** : Molécules d'adhésion des cellules vasculaires
- VEGF** : Facteur de croissance endothélial vasculaire
- VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des Abréviations

XIA P: Inhibiteur lié à l'X de la protéine d'apoptose

YY1 : Yin Yang 1

Zn : Zinc

ZnSO₄ : Sulfate de zinc

β₂m: β₂microglobuline

κ /λ r : Le rapport κ /λ

Liste des figures

PARTIE I : LES DONNEES DE LA LITTERATURE

Figure 1 : Mécanisme de biosynthèse du NO	4
Figure 2 : Régulation de la voie génomique et non génomique de la production de NO	7
Figure 3 : La voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO)	7
Figure 4 : Structure de NOs	8
Figure 5 : Modèle de génération de dimères iNOS actifs	8
Figure 6 :Oxydation de L-Arginine au cours de la production de NO	9
Figure 7 :Formation de NO via hémoglobines ; myoglobine ; xanthine oxydoréductase	10
Figure 8 : Métabolisme et biosynthèse de NO (voie génomique et non génomique)	11
Figure 9 : La régulation de NO	11
Figure 10 : Mécanisme d'action de RNS	18
Figure 11 : l'incidence et la mortalité de MM par 100 000 dans le monde.....	34
Figure 12 : Les mécanismes de développement de MM.....	42
Figure 13 : la production des Ac monoclonaux au niveau de MM	44
Figure 14 : mécanisme de MBD	45
Figure 15 : la relation de MM avec son environnement	50

PARTIE II : EXPERIMENTAIONS

Chapitre I : Analyses des données épidémiologiques des patients MM

Figure 1 : La distribution de genre chez les patients MM	64
Figure 2 : La distribution d'âge chez les patients MM	64
Figure 3 : La fréquence des types d'Acm produites par les patients MM	64
Figure 4 : La fréquence de la survie des patients MM	65
Figure 5 : La fréquence de MPC% chez les patients MM	65

Chapitre II : Evaluation de concentration de NO plasmatique

Figure 6 : La migration d'électrophorèse des protéines du surnageant traité par le TCA et le Zn ₂ so ₄	66
Figure 7 : Evaluation de ([NOx] ARB) chez les trois groupes	67
Figure 8 : Evaluation de ([NOx] R&D) chez les trois groupes	67
Figure 9 : Corrélation entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB) Chez les trois groupes.....	69
Figure 10 : Evaluation de [NO] chez les trois groupes	70

Chapitre III : Statut du NO chez les patients MM

Figure 11 : Évaluation de taux de CRP chez les trois groupes	71
Figure 12 : Corrélation entre [NO] et [CRP] chez les trois groupes	72
Figure 13 : La [NO] selon le genre des patients MM.....	73
Figure 14 : La [NO] et l'âge des patients MM	73
Figure 15 : La [NO] et le type d'Acm produit par les patients MM	74
Figure 16 : La [NO] et la survie des patients MM	75
Figure 17 : La [NO] et (MPC%) chez les patients MM	76
Figure 18 : La [NO] et [β 2m] chez les patients MM.....	76
Figure 19 : La [NO] et [Acm] chez les patients MM	77
Figure 20 : La [NO] et [CLL κ] chez les patients MM	78
Figure 21 : La [NO] et [CLL λ] chez les patients MM.....	78
Figure 22 : La [NO] et le R k / λ chez les patients MM	79

Chapitre IV : Le NO et le statut immunitaire des patients MM

Figure 23 : La [NO] selon LIT%	80
Figure 24 : corrélation entre [NO] et (CIIT%)	81
Figure 25 : La [NO] et (Lyn S).....	82
Figure 26 : La [NO] et (Gran S).....	83
Figure 27 : La [NO] et (Mono).....	84
Figure 28 : La [NO] et (N° Leu).....	85

Chapitre V : Implication du NO dans le développement des MBD

Figure 29 : Évaluation de [PAL] chez les trois groupes.....	86
Figure 30 : Évaluation de bilan phosphocalcique chez les trois groupes	87
Figure 31 : Corrélacion entre [NO] et [PAL] chez les trois groupes	88
Figure 32 : La [NO] selon [PAL] chez les patients MM.....	89
Figure 33 : Corrélacion entre [NO] et [Ca ⁺⁺] chez les trois groupes	90
Figure 34 : Corrélacion entre [NO] et [P] chez les trois groupes.....	91
Figure 35 : La [NO] selon [Ca ⁺⁺] chez les patients MM	92
Figure 36 : La [NO] selon [P] chez les patients MM	93
Figure 37 : La [NO] produit par un nombre décroissant des MG 63 en culture simple	94
Figure 38 : La [NO] produit par un nombre décroissant des RPMI 8226 en culture simple ..	96
Figure 39 : La [NO] produit par un nombre décroissant des MG 63 et des RPMI 8226 et en co- culture.....	98
Figure 40 : La [NO] produit par un nombre décroissant des MG 63 et des RPMI 8226 et en co-culture.....	100

Liste des tableaux

Liste des tableaux

LES DONNEES DE LA LITTERATURE

Tableau 01 : Les voies des signalisations favorisant l'expression de NOSc.....	5
Tableau 02 : Les voies des signalisations favorisant l'expression d'iNOS.....	6
Tableau 03 : Les voies systémiques de formation de NO à partir de nitrite.....	10
Tableau 04 : les réactions principales de NO.....	14
Tableau 05 : les réactions de NO avec le O ₂	15
Tableau 06 : Les types de MM	43
Tableau 07 : Classification de Durie et Salmon.....	47
Tableau 08 : Classification ISS.....	48
Tableau 09 :Modèle pronostique du myélome multiple basé sur l'anomalie de chromosome 13q et la β_2 -microglobuline.....	49

PARTIEII : EXPERIMENTATION

Tableau 01 : Les méthodes de dosage des paramètres biochimique de remodelage osseux.....	60
Tableau 02 : plaque culture simple et co-culture cellulaire (RPMI 8226 et MG63).....	62
Tableau 03 : Evaluation de similarité entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB),chez les trois groupes.....	68

Introduction

Le myélome multiple (MM) est un cancer hématologique dû à une expansion clonale de lymphocytes B totalement différenciés (plasmocytes) dans la moelle osseuse (MO). Il est caractérisé par une ostéolyse et une sécrétion d'immunoglobulines monoclonales pouvant développer un déficit immunitaire et une insuffisance rénale sévère. Ce cancer est d'incidence moyenne dans le monde (3–5 cas pour 100 000 habitants/an [1]).

Le myélome multiple (MM) est la tumeur modèle pour caractériser les interactions entre la cellule tumorale et son environnement. Différentes études ont déclaré que la MO, le support de l'hématopoïèse sanguine, constitue un milieu favorable pour la croissance et la survie des cellules tumorales du MM [2]. La MO peut favoriser la communication entre les cellules plasmiques malignes et d'autres types cellulaires ainsi que la matrice extra cellulaire par la production de différents facteurs de croissance et des cytokines inflammatoires et pro inflammatoires qui sont impliqués dans la croissance tumorale et la résistance aux médicaments [3]. Ces facteurs de croissances et cytokines sont fortement associées à la physiopathologie de MM y compris l'angiogénese et le développement des lésions ostéolytiques [2].

Les maladies osseuses associées au myélome (MBD) sont l'aspect le plus visible des cellules plasmiques de myélome (myeloma plasma cells) (MPC). Elles se développent chez 79 % des patients atteints d'un myélome, ce qui peut réduire la qualité de vie des patients à cause des douleurs osseuses et des fractures pathologiques [4]. Des études récentes ont démontré que la cause majeure de mortalité chez les patients atteints de myélome multiple est le développement et la progression des maladies osseuses [5]. Cette atteinte osseuse est due à un déséquilibre entre les ostéoclastes responsable de la résorption osseuse et les ostéoblastes formant le remodelage osseux. Le myélome émet des signaux empêchant les ostéoblastes de créer de nouveaux os et accélérant l'activité des ostéoclastes qui sont largement dépendent de l'expression du ligand du récepteur activateur de facteur nucléaire kappa-B (RANKL) et inhibiteur de l'expression d'ostéoprotégérine (OPG), son récepteur soluble dans le microenvironnement tumoral (MET) [6]. Aussi les ostéoclastes produisent des produits chimiques stimulant la croissance des cellules myélomateuses, la formation des lésions ostéolytiques c'est la clé physiopathologique du myélome multiple qui est le résultat de l'interaction des cellules de MM avec le microenvironnement de MO [7].

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre produit par de nombreux types cellulaires. Il est reconnu comme étant un important médiateur biologique dans divers processus

Introduction

physiologiques et pathologiques [8] Le NO est l'un des indicateurs majeurs de l'état inflammatoire propice au développement de la tumeur, En effet les études ont démontré que le NO généré à des concentrations modérées contribue à la tumorigénèse. Cependant le NO produit à de fortes concentrations agit comme un potentiel agent anticancéreux assurant l'apoptose et inhibant l'angiogénèse ,de plus de son rôle majeur dépend de la concentration et le type de la cellule au cours la physiopathologie de beaucoup de tumeur, incluant le cancer du sein, cerveau, poumon, prostate, le cancer colorectal et le cancer du pancréas [9].

Des études ont démontré que le NO est impliqué fortement au cours de la régulation de l'hémostase osseuse et contribue dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes .Ainsi, il a été démontré que la libération de grandes concentrations de NO entraîne l'apoptose des ostéoblastes et diminue la densité minérale osseuse. Le NO joue un rôle important au cours de l'activité ostéoclastique par la production de (OPG) liant avec RANK L, et que le RANKL est auto-régulé par la sécrétion de NO. De plus, plusieurs études cliniques indiquent que l'effet biphasique de NO vis-à-vis l'hémostase osseuse est associée fortement aux cytokines produit dans l'environnement [10].

Le NO qui est fortement exprimé dans la MO est responsable de différent messages intracellulaires [11]. Plusieurs études ont affirmé que la production élevée de NO induit par les cytokines inflammatoires joue un rôle important dans le développement des maladies osseuses y compris ostéoporoses [12]. Cependant, il existe peu de données qui ont rapporté l'effet de NO sur les (MBD) ainsi que son rôle dans la progression et le développement de ce cancer.

Prenant en compte ces données, nous proposons dans ce travail de déterminer le rôle de NO dans la progression et le développement du myélome multiple ainsi que son effet au cours des atteintes osseuses associées au myélome

Diverses approches ont été développées pour atteindre les objectifs suivants :

- Etudier le taux ainsi que la variabilité de la concentration de NO chez les patients atteints de MM de l'Est de l'Algérie.
- Evaluer l'état inflammatoire des patients atteints de MM et étudier la corrélation entre la concentration de NO et la concentration de certains marqueurs inflammatoires.
- Evaluer le statut de NO et son éventuelle corrélation avec les marqueurs de pronostic chez les patients atteints de MM.

Introduction

- Etudier le statut immunitaire et évaluer son éventuelle relation avec la concentration de NO chez les patients MM
- Etudier la relation entre la concentration de NO et l'évolution de certaines manifestations de MM y compris les maladies osseuses associées au MM par :
 - L'étude d'une éventuelle corrélation entre la concentration de NO et les marqueurs biochimiques de remodelage osseux chez les patients atteints de MM.
 - Evaluation de la concentration du NO produite par un modèle proche de MET de MM : une co-culture des MPCs (les lignées cellulaires RPMI8226) avec les ostéoblastes (les lignées cellulaires MG63).

PARTIE I

LES DONNEES DE LA LITTERATURE

Chapitre I

Le monoxyde d'azote (NO)

I.1. Définition de monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical gazeux de faible poids moléculaire caractérisé par une courte demi-vie in vivo, probablement quelques secondes [13]. Il est reconnu comme étant un important médiateur biologique, une molécule de signalisation largement distribuée dans l'organisme et qui est impliquée dans divers processus physiologiques et pathologiques [14].

Le NO est une molécule soluble, ce qui lui permet de se diffuser rapidement dans de nombreux milieux, en particulier en milieu biologique où il peut atteindre facilement de nombreux compartiments cellulaires [15].

I.2. Sources du NO

I.2.1. Voie génomique (NO – Nitric Oxide Synthase Dependent)

La voie dominante de la synthèse du NO est principalement la voie enzymatique [16] dont une famille d'enzymes appelée NO synthases (NOS) utilise L-arginine (L- ARG) et une molécule d'oxygène pour produire le radical libre NO et L-citruline [17] (**Figure 1**).

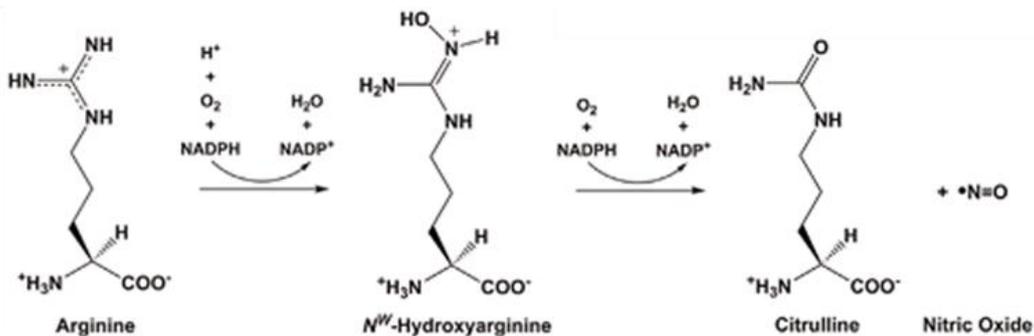


Figure 1 : Mécanisme de biosynthèse du NO [18]

La différence entre chaque (NOS) est basée sur l'expression, la régulation ainsi que la distribution de l'enzyme dans les tissus. Il existe trois iso formes connues de (NOS), à savoir les NOS neuronaux (nNOS, NOS1), les NOS endothéliales (eNOS, NOS3), et les NOS inductibles (iNOS, NOS2) qui constituent le produit de trois gènes distincts localisés sur les chromosomes 7, 12 et 17 respectivement [18].

I.2.1.a. NOSs constitutives

NOS1 et NOS3 sont constitutives et s'expriment principalement dans les cellules endothéliales et les neurones respectivement [19]. Les NOS constitutives peuvent produire des quantités inférieures et basses de NO (nM) pour une courte durée [15]. Plusieurs voies vont être mises en place pour activer l'expression de deux gènes NOS1 et NOS 2 au cours du processus physiologique lié à la production de NO constitutives (**Tableau 1**) [20].

Tableau 1 : Les voies de signalisations favorisant l'expression de NOSc

eNOS/nNOS	voies de transduction	Références
Enos	AKT kinase : PI3K-AKT	[20]
	PKA-AKT PKA-ERK1/2	[21]
	ERK1/2-PP2A-SP1-	[22]
	PKA-P38MAPK-E	[23]
Nnos	La voie AKT kinase : AKT	[24]

I.2.1.b. NOS inducible (iNOS NOS2)

iNOS peut être fortement induit sous certaines conditions dans différents types de cellules. Bien que la principale source de NO plasmatique est liée à l'eNOS, pendant plusieurs conditions cliniques, telles que l'inflammation, iNOS est activée et pourrait être surexprimée en réponse à divers stimulus, y compris les cytokines et les endotoxines bactériennes, qui sont capables de produire de plus grandes quantités de NO pendant des périodes prolongées [15].

Le NO produit par iNOS est souvent induit par trois cytokines pro-inflammatoires majeures: Interféron gamma (IFN γ) , le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et l'interleukine 1(IL-1) et Lipopolysaccharide (LPS) [25], et il est principalement régulé au niveau transcriptionnel où l'induction maximale de la NOS inducible se fait suite à une activation des facteurs de transcription liant à la région promotrice du gène iNOS incluant le facteur nucléaire-kappa B (NF-kB), les hétéro-dimères Jun/Fos, la protéine de liaison d'élément de réponse à l'AMP cyclique (CREB) , le transducteur de signal et activateur de transcription (STAT) , la protéine activatrice 1 (AP1)[26 .27] et le facteur régulateur de l'interféron 1IRF1 [25].

Les mécanismes moléculaires de la transcription du gène iNOS ont été identifiés dans différentes cellules selon le stimulateur et le type de la cellule [28] dont plusieurs protéines de

signalisation, telle que la protéine kinase C (PKC), les tyrosines kinases (TK), les janus kinases (jank), la protéine kinase raf-1 (PK raf-1), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) sont incluses dans différentes voies de signalisation [29] (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Les voies des signalisations favorisant l'expression d'iNOS.

de transduction	Références
P38MAPK-SATAT1-1IRF1	[25]
alpha IKB alpha*NFKB	[27]
mTor IKB alpha*NFKB	[30]
MEK1-ERK1-ERK2	[31]
TLR4MyD88-PI3K	[32]
Syk-PI3K -NFKAB	[33]
MAPK-JNK-STAT1	[34]

Le NO pourrait être stabilisé par oxydation au nitrate NO_3 et nitrite NO_2 . Des molécules endocrines qui sont transportées dans le sang s'accumulent dans les tissus et ont le potentiel de se reconvertir en NO dans des conditions physiologiques et pathologiques [35].

Les scientifiques ont démontré que jusqu'à 90% du nitrite circulant provient directement de la voie (L-Arg)/ /NO [36]. Cependant plusieurs études ont prouvé qu'une portion plus petite (30%) de NO provient de sources alimentaires [37]. Ils ont constaté une augmentation de nitrite circulant dans le plasma après l'administration élevée de nitrate alimentaire [38].

Les chercheurs donc ont détecté que le corps humain possède également une autre voie supplémentaire inorganique pour la production de NO, qui a récemment reçu beaucoup d'attention [35].

I.2.2. Voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO) (NO- NOS-independent)

La voie nitrate–nitrite–NO est une voie de stockage physiologique de NO où le NO_2 formé de nitrate NO_3 peut être réduit en NO bioactif dans des conditions hypoxiques dont la production catalytique de NO par NOS, qui repose sur l'oxygène épuisé [35]. (**Figure 2**)

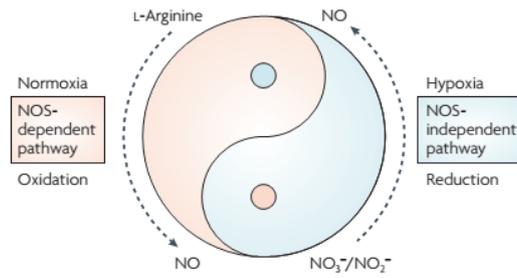


Figure 2 : Régulation de la voie génomique et non génomique de la production de NO [35].

Bien que les mammifères ne possèdent pas l'enzyme de nitrate réductase [41], la flore de la bouche fournit la symbiose nécessaire, avec des enzymes de nitrate réductase bactérienne transformant le nitrate des aliments (l'eau; les légumes à feuilles vertes) et le concentre dans la salive en nitrite, qui est avalé et absorbé systémiquement [39]. Par conséquent, une grande partie du nitrate est excrétée dans l'urine, et que 25% est absorbée par les glandes salivaires et concentrée jusqu'à 20 fois dans la salive. Les bactéries anaérobies commensales utilisent le nitrate comme un accepteur d'électrons pendant la respiration, en réduisant effectivement le nitrate salivaire au nitrite par l'action de nitrate réductase [35]. Le reste de nitrate alimentaire est rapidement absorbé dans le tractus gastro-intestinal supérieur ; dans le sang, il se mélange avec le nitrate formé par l'oxydation du NO endogène produit par les enzymes NOS [40] (**Figure 3**).

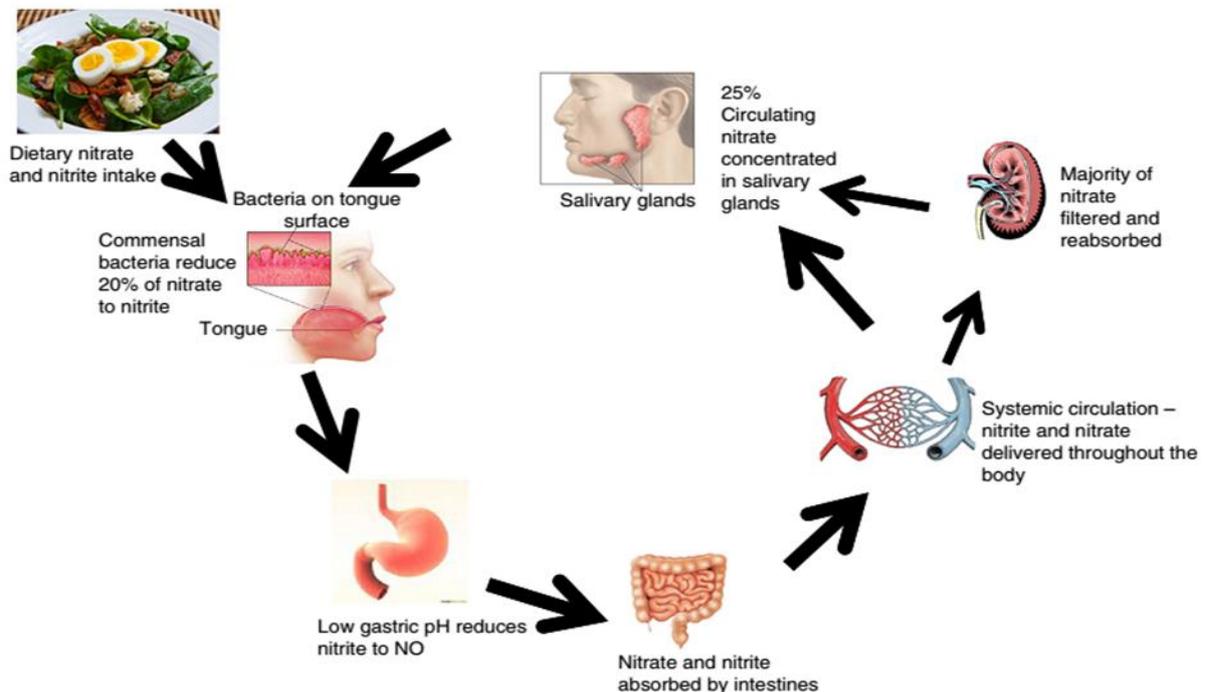


Figure 3 : La voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO) [40].

I.3. Biosynthèse du NO

I.3.1. Voie génomique (NO– Nitric Oxide Synthase Dependent)

Les NOS sont des enzymes dimériques où chaque monomère est composé de deux domaines catalytiques distincts : Un domaine NH₂- terminal oxygénase qui lie le fer protoporphyrin IX (hème), le cofacteur BH₄ qui favorise la stabilisation de dimère, (L-Arg) et le régulateur. Un domaine COOH-terminal réductase lie le Flavon Mono Nucléotide (FMN), le Flavin Adénine Dinucléotide (FAD) et Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate (NADPH) (**Figure 4**) [41.42].

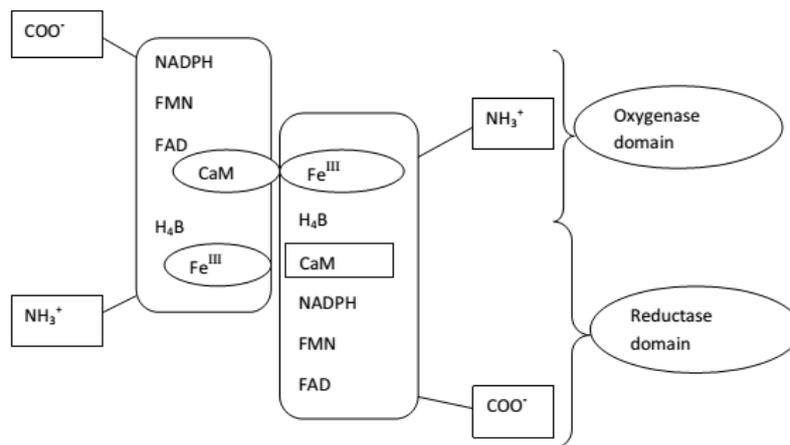


Figure 4 : Structure de NOS [42]

Les enzymes NOS ne semblent actives que sous la forme dimérique [43], dont la dimérisation qui est créée entre les deux domaines oxygénases présente une étape post-traductionnelle nécessaire au cours de l'activation de NOS(**Figure 5**) [44].

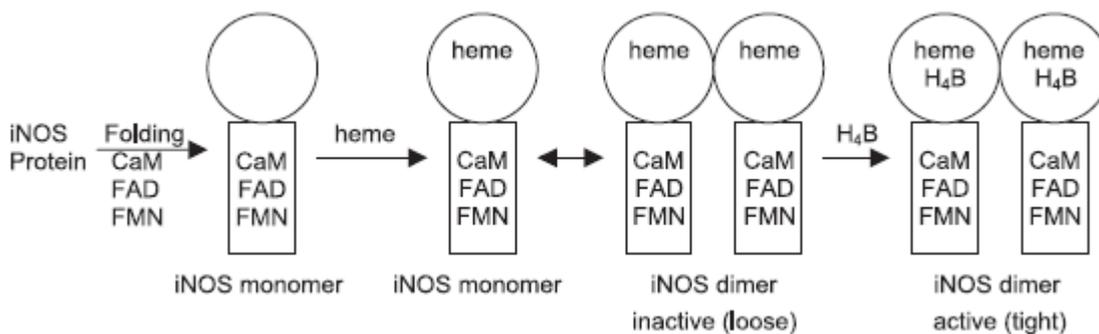


Figure 5 : Modèle de génération de dimères iNOS actifs [45].

Les (NOS) produisent le (NO) à partir de (L-Arg) en présence d'O₂ et de NADPH [13] et comme la réduction de FeIIIO₂ (le hème) par le cofacteur H₄B est plus rapide que sa réduction

par le domaine NOS réductase, le H_4B est oxydé en position N-5 pour donner H_3BS (Figure 2) et transférer un électron à l'intermédiaire $FeIO_2$ pour l'hydroxylation rapide de (L-Arg) à une molécule intermédiaire (NHA) [45.46.47.48].

Le domaine C-terminale réductase de NOS présente une homologie proche avec le cytochrome P450 réductase qui transfère les électrons dérivés de NADPH nécessaires à l'activation réductrice de l'oxygène moléculaire vers le domaine N-terminal, entraînant l'insertion de l'oxygène dans la (L-Arg) et NOH arginine donc, le (NHA) est oxydé dans la présence d' O_2 en produisant L-citrulline et NO [43.13]. Le site de liaison CaM est situé approximativement au centre de NOS et sépare les deux domaines. Les effets de la CaM en tant que commutateur moléculaire induisent un changement de la structure pour l'écoulement des électrons [49]. Il contrôle la communication entre les deux domaines en ce que ses liens de liaison flavin-à-hème électronique. Le zinc (Zn) est responsable de la liaison des monomères aux groupes hème. (**Figure 1**), (**Figure 6**) [43.13].

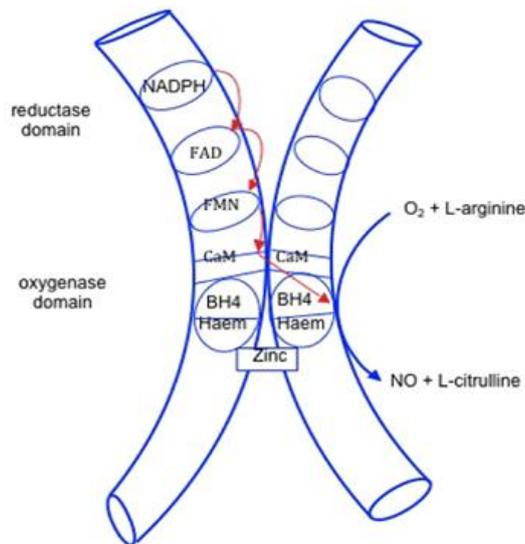


Figure 6 : Oxydation de (L-Arg) au cours de la production de NO [50]

I.3.2. Voie non génomique (la voie nitrate–nitrite–NO) (NO- NOS-independent)

La réduction supplémentaire du nitrite au NO est hautement améliorée où il existe nombreuses voies de réduction supplémentaires de NO une fois que le nitrite est formé dans le corps [37].

La génération de NO par la voie nitrate–nitrite–NO (NOS-independent) est fortement favorisée au cours de l'hypoxie et via différentes voies systémiques, incluant la voie hémoglobines, myoglobine, xanthine oxydoréductase (exemple, L'enzyme formant la chaîne

mitochondriale de transport d'électrons), ainsi que la réduction de nitrite par la présence de protons, polyphénols et ascorbate [37.35] (Figure 7) (Tableau 3).

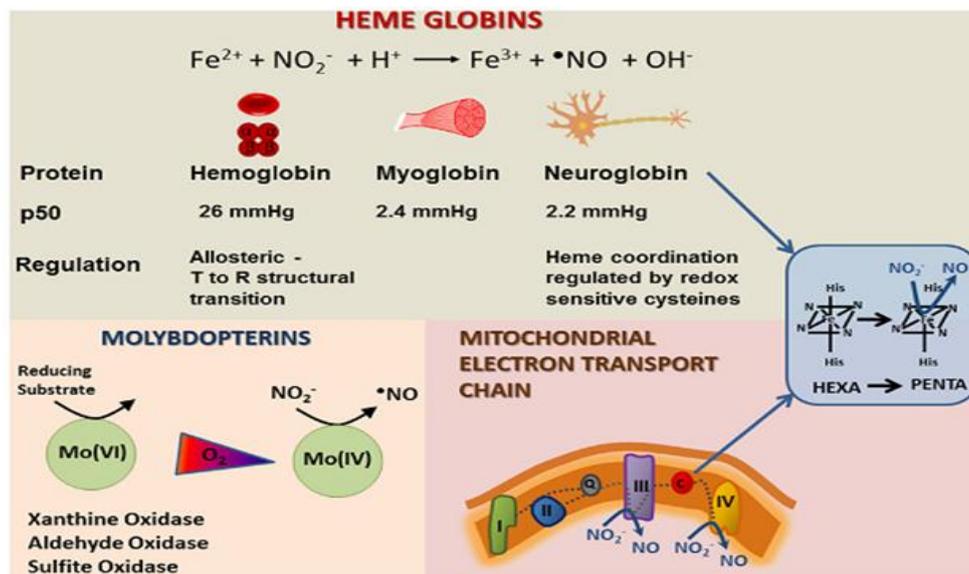


Figure 7 : Formation de NO via hémoglobines ; myoglobine ; xanthine oxydoréductase [37].

Tableau 3 : Les voies systémiques de formation de NO à partir de nitrite [37.35].

La voie de formation de NO à partir de nitrite	Mécanisme
Déxyhémoglobine /myoglobine	$\text{NO}_2^- + \text{deoxyhaemoglobin} \rightarrow \text{methaemoglobin} + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$
xanthine oxydoréductase	$\text{NO}_2^- + \text{Mo}^{+5} + \text{H}^+ \rightarrow \text{*NO} + \text{Mo}^{+4} + \text{OH}^-$
Protons	$\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO}_2$ $2\text{HNO}_2 \rightarrow 2\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{N}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{*NO} + \text{NO}_2$
Ascorbate	$\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO}_2$ $2\text{HNO}_2 + \text{Asc} \rightarrow 2\text{NO} + \text{dehydroAsc} + \text{H}_2\text{O}$
Polyphénols (Ph-oh)	$\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO}_2$ $\text{Ph-oh} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{Ph-oh} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$

Les événements de signalisation cellulaire via la voie alternative NO NOS indépendant sont devenus particulièrement un sujet d'intérêt pour les scientifiques [40] (Figure 8). Plusieurs études ont démontré que le NO (NOS- indépendant) peut jouer un rôle très important au cours de plusieurs événements biologiques [37].

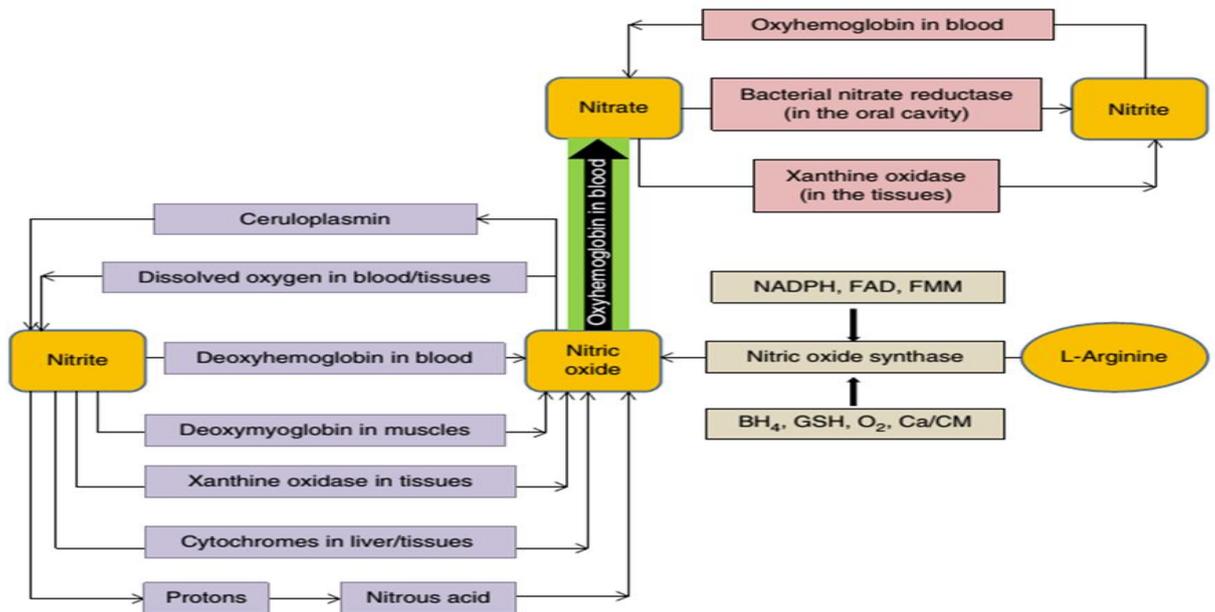


Figure 8 : Métabolisme et biosynthèse de NO (voie génomique et non génomique) [40].

I.4.Régulation de production de NO

La régulation de NO souvent dépend du type et de fonction de la cellule, en effet il a été démontré que la libération des grandes molécules de Asymmetricdimethylarginine (ADMA) peut inhiber la synthèse de NO par une compétition sur le site de L-Arg (Figure 9) [13].

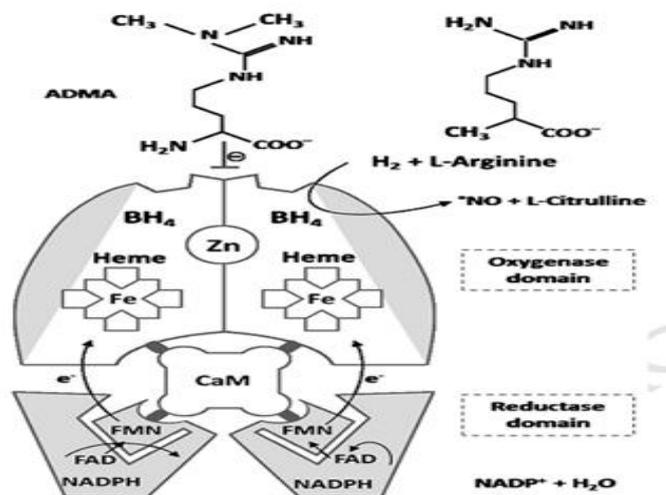


Figure 9 : La régulation de NO [13]

I.4.1.Régulation de NOS constitutives NOSc

Au cours de la régulation de NOSc, le NO agit comme un auto-modulateur de la rétroaction négative (Feedback), dont la liaison de NO avec les enzymes, les substrats ou les cofacteurs qui constituent le NOSc peut empêcher son activité [13]. En outre, les chercheurs ont prouvé le rôle majeur de H₂S qui peut induire la phosphorylation ainsi que la dégradation d'eNOS [39]. Un autre mécanisme d'autorégulation est présenté par la S-nitrosylation qui peut empêcher la dimérisation eNOS [45].

I.4.2.Régulation de NOS inductible iNOS

La régulation de NO-iNOS dépendant diffère selon la fonction et le type de la cellule ainsi que les inducteurs produisant d'iNOS [52]. La biosynthèse de NO-iNOS dépendant est fortement associée à une série de régulations au niveau de la transcription et la traduction de l'enzyme iNOS [45].

I.4.2.1.Régulation de la transcription et la post-transcription d'iNOS

La production de NO est autorégulée par son effet bi-phasique sur la modulation de l'expression de l'ARNm d'iNOS [53]. Le niveau de la libération de NO peut moduler les facteurs de transcription AP-1 et le N-F-kB d'une façon positive ou négative. Cependant, cette voie pourrait être inhibée par les composés et les enzymes antioxydants[54.55].

Dans certains types de cellules, la régulation de la rétro-réaction (feedback) positive de l'expression d'iNOS est stimulée indirectement par les niveaux intracellulaires accrus de cAMP qui peuvent avoir lieu via l'inhibition de PDE III (phosphodiesterase III) [56]. De plus, l'expression d'iNOS est liée aux Récepteurs activé par les peroxisomes (PPARs), qui peuvent être un antagoniste de l'activité des facteurs de transcription, tel que AP-1, STAT et NFkB, malgré que le TNF α et FN γ peuvent modifier l'activité de PPARs [57]. Ainsi, la synthèse, la stabilité, et la dégradation de ARNm d'iNOS est une voie post-transcription qui a été mises en évidence par les scientifiques où la région non traduite (3'UTR) de ARNm joue un rôle très importante au cours de la régulation de NO –iNOS dépendent [58] ; en exemple, l'exposition des cellules à la facteur de croissance de transformation h (TGFh) empêche l'induction d'iNOS via la déstabilisation de ARNm via la région (3'UTR) , ce qui peut influencer l'expression de IRF-1[59] .

La production et l'activation d'iNOS sont régulées principalement au niveau de la transcription et la post-transcription, mais également aux niveaux de la traduction et la post-traduction par des effets sur la stabilité des protéines, la dimérisation, la phosphorylation, la liaison des cofacteurs, et la disponibilité de l'oxygène et de (L-Arg) [45].

I.4.2.2. Régulation de la traduction et la post-traduction d'iNOS

Récemment, plusieurs études ont trouvé que différents composés sont efficaces pour moduler la traduction de l'ARNm d'iNOS [60]. Il a été démontré que l'iNOS peut déclencher la phosphorylation de Facteur d'initiation eucaryote 2 a (l'eIF-2a) qui est liée à la synthèse des protéines au niveau traductionnelle [61]. En outre, le TGF- β peut influencer la stabilité ainsi que la dégradation d'iNOS, comme il peut aussi stimuler la synthèse des protéases [62] [45]. Ainsi, la protéine iNOS peut être dégradée directement sous le contrôle de la voie du protéasome [63]. De plus, il existe un ensemble de protéines qui peut inhiber la production de NO en empêchant l'homodimérisation d'iNOS ; en exemple, la protéine associée au NOS 110 kDa (NAP110) qui est associée au NOS₂ et formant des hétérodimères NOS₂-NAP110 en bloquant la formation de dimères NOS₂ [64]. Ainsi, la surproduction de NO dépend de la concentration de (L-Arg) extracellulaire [65], où il a été démontré que les transporteurs cationiques d'acides aminés (CAT1) et le (CAT2) sont stimulés par LPS peut augmenter l'absorption de (L-Arg). Cependant, l'arginase qui dégrade (L-Arg) en urée et en ornithine pourrait être stimulée, limitant ainsi la production de NO [66]. La synthèse de NO peut être régulée également via la molécule de l'hème. Plusieurs études ont démontré que certains inhibiteurs de NO en combinant avec le hém composant de NOS₂ peuvent diminuer la production de NO [67]. Aussi, la production accrue de NO par les cellules peut bloquer l'incorporation de l'hème dans le monomère iNOS, [45]. La synthèse de NO peut être régulée via H4B, et la guanosine triphosphate cyclohydrolase (GTPCH), l'enzyme clé pour la synthèse de H4B, pourrait être induite ou supprimée par des cytokines particulières. La synthèse de NO peut également être régulée par la modification de la phosphorylation, selon plusieurs études qui ont démontré que les protéines kinases présentent l'un des facteurs très importantes pour la localisation cellulaire et/ou la fonction de l'iNOS [68].

La régulation de la biosynthèse de NO joue un rôle critique dans différents compartiments cellulaires en orientant les mécanismes d'action du NO au cours de plusieurs événements biologiques [45].

I.5. Mécanisme d'action de NO

Plusieurs études ont prouvé le rôle bi-phasique de NO, qui est connu pour réguler une variété de fonctions cellulaires importantes via deux voies principales [69].

I.5.1. Mécanisme d'action cGMP-dépendante (voie NO-sGC-cGMP)

Le NO est facilement diffusé à travers la membrane cytoplasmique et le cytoplasme, qui pourrait agir avec le site actif de la Guanylate Cyclase soluble (GCs) et produire une GMP cyclique (cGMP). Ainsi, la cGMP peut activer la Protéine Kinase G (PKG) et induire la phosphorylation des différentes protéines impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires NO cGMP-dépendante. D'autres éléments peuvent être activés y compris les canaux ioniques et la phosphodiesterases (PDE) GMP dépendante. Le niveau de cGMP pourrait être régulé par les (PDE) [70]. Plusieurs études ont démontré que de la signalisation paracrine de faibles concentrations du NO qui est assurés par l'activation de nNOS et eNOS est une fonction prédominante et GMPc- dépendante [71].

I.5.2. Mécanisme d'action cGMP-Indépendante (voie NO-sGC-cGMP)

Ce mécanisme est connu par la voie d'oxydation du NO. C'est une voie cGMP-indépendante dont un large nombre d'activités cellulaires peut être régulé par des métabolites d'oxydation du NO en se liant aux métalliques, aux protéines, aux lipides et aux nucléotides [72] (**Tableau 4**).

Tableau 4 : les réactions principales de NO [72].

Reaction avec	Le produit
Fe_2^+	$\text{Fe}_2^+ \text{ NO} \text{ ---}$
O_2	$\text{N}_2\text{O}_3, \text{N}_2\text{O}_4, \text{NO}_2, \text{NO}_3, \text{ONOO}$
R-SH	R-S-NO
HOCl	Cl-NO ₂

L'interaction entre le NO et l'oxygène est la réaction la plus abondante au cours du métabolisme de NO. Des études ont démontré que le NO-iNOS dépendant réagit avec l'oxygène jusqu'à 300 fois plus élevé à des conditions hydrophobes dans la membrane cellulaire [45].

L'interaction entre le NO et l'oxygène génère des réactifs intermédiaires de monoxyde d'azote (RNOI) y compris N₂O₃, N₂O₄, NO₂, NO₃, ONOO⁻ [45]. Le RNOI peut réagir avec d'autres biomolécules telles que les thiols et les amines. Par conséquent, l'équilibre de la production ainsi que l'action de NO peuvent être fortement associés à l'état oxydatif de la cellule (**Tableau 4**) (**Tableau 5**). La réaction de NO avec O₂⁻ est souvent supposée être la principale source de modifications nitratives [45].

Tableau 5 : les réactions de NO avec l'O₂ [45.74].

(1)	$2\text{NO} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{O}_4 \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$
(2)	$\text{NO} + \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{N}_2\text{O}_3 + 2\text{H}^+$
(3)	$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^- \rightarrow \text{ONOOH} \xrightarrow{[\text{NO}_2/\text{OH}]} \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$
(4)	$\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{ONOOH} + \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{NO}_2$
(5)	$\text{HbO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{metHB} + \text{NO}_3^-$

I.5.2.1. Action via la nitrotyrosination

La nitration des protéines consiste en l'addition d'un groupe nitro (NO[•]) aux résidus de tyrosine (Tyr) pour donner de la 3nitrotyrosine. Cette réaction stable et irréversible a été considérée comme un indicateur de stress nitrosatif [72] (**Figure 10**).

La nitrotyrosination a été proposée comme modification sélective post-traductionnelle au cours de plusieurs fonctions biologiques importantes [75]. La nitrotyrosination peut moduler l'activité de plusieurs protéines dans la cellule [76], y compris l'enzyme superoxydes dismutases mitochondriale (SOD Mt) [77], l'actine [78], la glutamine synthase (GS) [79], la protéine régulatrice du fer-1 (IRP-1) [80], l'histone désacétylase 2 [81], p53 [82], et la prosta cyclines ynthase [83] en induisant des changements en empêchant leur phosphorylation [84]. De plus, certaines études ont démontré que la nitrotyrosination peut orienter la fonction des cellules par l'activation de plusieurs protéines telles que la PKC [83], le cytochrome c [76], la fibrinogène [85], le glutathion S-transférase (GST) [86], JNK [87] la poly-ADP ribosesynthetase [88].

La nitrotyrosination des protéines via la Peroxynitrite (ONOO⁻) présente l'un des effets les plus dangereux qui peut endommager plusieurs molécules cellulaires [73].

I.5.2.2. Action via la Peroxynitrite (ONOO⁻)

Le NO qui est produit en grande quantité peut réagir rapidement avec les anions superoxydes (O₂•⁻) en formant la (ONOO⁻) [89]. L'affinité de O₂•⁻ au NO est plus élevée que l'affinité du (SOD) [90]. La quantité ainsi que le coefficient de diffusion de NO sont les facteurs limitant de la réaction [91]. Dans des conditions physiologiques, le ONOO⁻ a une demi-vie de 1-2 secondes et peut se dégrader en plusieurs produits toxiques [89]. Il a été démontré que la plus grande partie de la cytotoxicité attribuée au NO est due à la formation d'ONOO⁻ [92]. Aussi, les NOS à des concentrations élevées peuvent présenter des propriétés pathologiques dues à la production d'ONOO⁻ [45] (**Figure 10**).

Bien que plusieurs études aient confirmé le rôle d'ONOO⁻ dans la nitration des protéines [93], le ONOO⁻ peut interagir avec des protéines, des lipides, des glucides et de l'ADN en modifiant leur structure et fonction [45.72.74]. Plusieurs études ont démontré que le ONOO⁻ peut entraîner la nitration des bases d'ADN en formant le 8-nitroguanine. De plus, des niveaux élevés d'ONOO⁻ peuvent inhiber la fonction de plusieurs enzymes dans la cellule, incluant l'ATP synthase, l'aconitase, la créatine kinase, le SOD, et endommager divers composants mitochondriaux y compris l'ADN et la membrane mitochondriale ainsi que les complexes I et II de transport des électrons de la chaîne respiratoire [94.95]. Aussi, l'ONOO⁻ peut moduler certaines enzymes du processus inflammatoire et des fonctions vasculaires, y compris, le métabolisme du cytochrome P450 et de la 5-lipoxygénase [96.97].

L'action d'ONOO⁻ pourrait être due à ses produits secondaires lorsqu'il est interagi à l'acide ONOOH (**équations (3) et (4) Tableau 5**) [98].

I.5.2.3. Action via les agents oxydants de NO

L'ONOOH et ses produits intermédiaires (**équation (3)**) peuvent agir comme des agents oxydants ciblant plusieurs molécules cellulaires [74]. (**Figure 10**).

L'oxydation réalisée par OH (équation (3)) n'est pas spécifique et affecte plusieurs molécules cellulaires [74], tandis que certains acides aminés, tels que lysines, histidines, cystéines et méthionines, sont plus sensibles à l'oxydation par NO₂ (**équation (4)**) [99].

I.5.2.4. Nitration d'acides gras insaturés (S-alkylation)

Les dérivés du NO peuvent se lier à des acides gras insaturés, entraînant la formation de composés hydrophiles représentés par des acides gras nitrés (NO₂-FA) qui peuvent facilement réagir avec les acides aminés hydrophiles tels que l'histidine et la cystéine (**Figure 10**) [72].

I.5.2.5. Nitration des nucléotides de guanine (S-guanylation)

Les dérivés du NO peuvent également se lier aux nucléotides guanine et produire des dérivés électrophiles de NO (8-nitroguanosine), qui conduisent à des modifications dans l'ADN conduisant une modification des protéines [100] (**Figure 10**).

I.5.2.6. Action via la S-nitrosylation

La S-nitrosylation se produit par la liaison du NO oxydé à un résidu de thiol de cystéine (**Figure 10**) [72].

La S-nitrosylation est un mécanisme régulateur post-traductionnel dont le NO peut exercer un impact direct sur la fonction, la localisation et la stabilité des protéines, ainsi que sur la viabilité et la différenciation des cellules [101]. Ce mécanisme de transnitrosylation, peut transformer du S-nitrosylate, le thiol de cystéine impliqué dans les structures des liaisons de (Zn), conduisant à des changements et des modifications au cours de plusieurs activités fonctionnelles [102,97]. Comme les liaisons de (Zn) sont importantes pour les interactions protéine-protéine, protéine-ADN ou protéine-ARN [103], plusieurs études ont rapporté que la S-nitrosylation peut diminuer l'activité de la protéine cible incluant les enzymes (GAPDH, caspases, transglutaminases, aromatasés), les protéines G et les kinases (ERK, JNK) [104]. Il a également été démontré que la S-nitrosylation peut réguler la fonction de plusieurs protéines cellulaires telles que l'ATPase Na⁺/ K⁺ [105], l'hémoglobine [106], l'albumine [107], les métalloprotéases matricielles [108], les récepteurs membranaires [109], certains facteurs inductible d'hypoxie (HIF-1) qui à son tour peut se transloquer au noyau en induisant l'expression des gènes importants pour la fonction cellulaire [73]. En outre, la S-nitrosylation peut affecter plusieurs facteurs de transcription, notamment le facteur de transcription NF- κ B qui perd la capacité à se lier à l'ADN suite à la S-nitrosylation de ses unités [110].

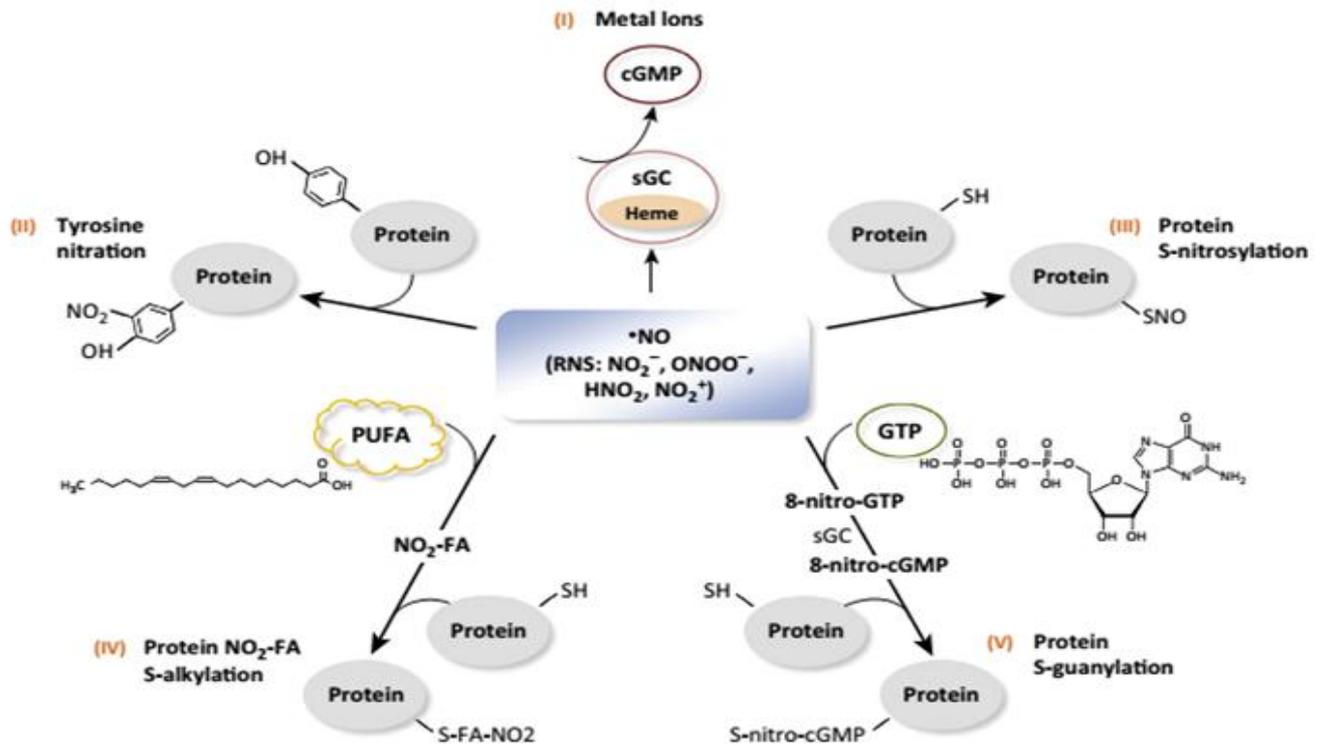


Figure 10: Mécanisme d'action des espèces réactives de Nitrite (RNS) [72].

I.5.2.7. Action via les modifications épigénétiques

Actuellement plusieurs rapports expérimentaux ont établi le rôle majeur de NO dans la régulation épigénétique. Le NO peut influencer l'expression des gènes et des phénotypes cellulaires. Plusieurs études ont rapporté qu'il peut cibler des enzymes qui maintiennent la dynamique de la chromatine pour inhiber ou activer l'expression génétique, y compris les histones acétyltransférases (HAT), les histones et les ADN méthyltransférases (DNMT), les histones désacétylases (HDAC), les histones déméthylases et les déméthylases d'ADN en modifiant ainsi les mécanismes de post-transcriptions telles que la méthylation et la dé-méthylation de l'ADN, la régulation des histones et les microARN (miARN)[111].

I.5.2.7.a. Action via la régulation des (HAT)

Les enzymes HAT sont responsables de l'acétylation des résidus de lysine sur les queues d'histones en utilisant l'acétyl-CoA, une modification couramment associée à l'activation génétique [112]. Plusieurs études ont démontré que le HAT pourrait être régulé par des mécanismes associés au NO, et certaines études ont suggéré que le NO peut induire la localisation nucléaire du (GAPDH) provoquant l'augmentation de l'acétylation ainsi que l'auto-acétylation des histones [113]. De plus, d'autres études ont observé que le traitement

des cellules avec LPS conduit à une activité de HAT et l'acétylation totale de histone (H)3 et H4, tandis que le traitement des cellules avec l'inhibiteur de NOS peut empêcher l'acétylation de plusieurs histones [114].

I.5.2.7.b. Action via la régulation des (HDAC)

Les enzymes HDAC sont responsables de l'élimination des groupes acétylé des résidus de lysine sur les queues d'histones, ce qui est couramment associé à la diminution d'expression des gènes [115]. Plusieurs études ont démontré que la production de NO conduit à la S-nitrosylation de HDAC2 en Cys262 et Cys274 ce qui peut influencer l'acétylation des histones [116]. De plus, il a été observé que la S-nitrosylation peut affecter l'association de HDAC2 avec la chromatine ainsi que son activité enzymatique. Certaines études ont prouvé que la S-nitrosylation peut induire la perte de HDAC2 au niveau du promoteur c-fos [117]. Cependant, des études ont démontré que de faibles concentrations de NO peuvent conduire à la déphosphorylation de HDAC 4 et 5 qui peuvent influencer la translocation de ces enzymes au noyau, entraînant ainsi une diminution globale de l'acétylation des histones [118]. D'autres études ont suggéré que l'exposition de NO aux cellules peut entraîner une perte d'activité de HDAC, et que le NO pourrait être un inhibiteur potentiel de la désacétylase [119].

I.5.2.7.c. Action via la régulation de la Lysine méthyltransférases (KMT)/la Lysine Demethylases (KDM)

Le statut de méthylation des résidus lysine d'histone peut influencer de façon positive ou négative la transcription génétique [120.121]. Il constitue un processus dynamique représenté par l'équilibre des activités des (KMT) et des (KDM) qui peuvent avoir un impact aigu et chronique sur la structure de la chromatine. La capacité du NO à effectuer la méthylation des histones est un mécanisme direct connu et permanent [111]. Des études ont prouvé que les macrophages qui ont été traités avec le NO, présentent une méthylation accrue en H3 [121]. De plus, il a été démontré que le NO peut provoquer une régulation négative de plusieurs gènes, ce qui est dû à sa capacité à augmenter la triméthylations de H3 [122]. En outre, des études ont prouvé que l'inhibition des (KDM) est une cible dominante pour augmenter la méthylation des histones en réponse au NO, et bien que le rôle du NO dans l'activité de (KMT) ne soit pas encore détecté, son effet au niveau de l'expression de l'enzyme pourrait finalement affecter la méthylation des histones [123.120]. Dans ce sens, une étude sur 6500 gènes exprimés sur des cellules exposées à des concentrations physiologiques de NO a prouvé qu'il peut induire des changements bidirectionnels significatifs, soit l'augmentation

ou la diminution de l'expression génétique. Dans cette étude, 88 gènes ont perdu des histones autour de leur site d'initiation de la transcription (TSS) et plus de 3000 gènes ont gagné des histones autour de leur TSS, ainsi qu'environ 900 gènes ont perdu des histones et 900 gènes ont gagné des histones au niveau de leurs régions promotrices [124].

I.5.2.7.e. Action via la régulation de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique important impliqué dans la régulation de l'expression des gènes, et il se produit par l'addition d'un groupe méthyle au cinquième carbone des nucléotides cytosine de l'ADN [111]. Plusieurs rapports relient l'expression de l'iNOS ainsi que la production de NO aux changements dans la méthylation de l'ADN. Par exemple, des études ont démontré que les effets du NO sur l'inhibition des gènes sont médiés par la méthylation de l'ADN qui dépend de l'activité des (DNMT) [125]. D'autres études ont prouvé le rôle de NO dans l'activation des DNMT [126].

I.5.2.7.f. Action via la régulation (miRNA)

Les (miRNA) sont des ARN non codants allant de 18-20 nucléotides qui régulent divers processus physiologiques et pathologiques. Ils peuvent réguler environ 30% des protéines de la cellule par la régulation négative de l'expression de l'ARNm, la dégradation de l'ARNm, la désactivation de l'ARNm, ou l'inhibition de l'assemblage ribosomique [127]. Cependant, il a été démontré que les miARN peuvent augmenter la traduction de cibles spécifiques grâce à un mécanisme mal compris [128.129]. Plusieurs études ont prouvé la sur-régulation de certains miARN suite à la production de NO, y compris miR-1, miR133a, miR-210 et miR-34a [130.131]. D'autres études ont démontré que les actions du NO sur la régulation du miARN semblent être un mécanisme responsable de nombreux changements héréditaires dans l'expression des gènes [111].

En plus des effets directs du NO sur la régulation épigénétique, il a été démontré qu'il peut influencer la régulation des processus métaboliques de plusieurs cofacteurs enzymatiques impliqués dans la modification de la chromatine [111].

De plus des effets de signalisation de NO qui peuvent influencer l'activation et les niveaux d'expression ainsi que la localisation de nombreuses enzymes régulatrices épigénétiques et peuvent ainsi reprogrammer les profils d'expressions géniques et modifier radicalement le phénotype cellulaire, il est bien connu que le NO peut influencer le métabolisme cellulaire, en particulier par des interactions avec les mitochondries [132.133].

I.5.2.8. Action via la mitochondrie

Le NO et les (RNS) fonctionnent comme molécules de signalisation entre le noyau et la mitochondrie [134]. Il a été démontré que le NO produit par le NOS mitochondriale (mt NOS) peut induire une cytotoxicité de la cellule via l'inhibition de la respiration mitochondriale [135]. Cependant, d'autres études ont rapporté que la signalisation de RNS a été associée à la biogenèse mitochondriale et le nombre élevé de mitochondries dans la cellule. Aussi, un grand nombre d'études ont prouvé l'effet de RNS sur le métabolisme cellulaire en modifiant des sites spécifiques dans la chaîne respiratoire [136].

I.5.2.9. Action via la signalisation intracellulaire MAPK

Le NO joue un rôle majeur dans la régulation des voies de signalisation cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les RNS peuvent interagir avec JNK et STAT et les voies NF-kB, ainsi qu'avec les MAPK et certaines protéines G [137]. Plusieurs travaux ont indiqué que le NO peut activer le p21 ras, qui est une protéine G monomère jouant un rôle clé dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose ainsi que la régulation des cyclines, des kinases et leurs inhibiteurs [138].

Les mécanismes d'action du NO sont hautement régulés et présentent une spécificité remarquable qui dépend des conditions physiologiques et physiopathologiques de l'environnement cellulaire [139,45].

I.6. Implication du NO dans la réponse immunitaire

Le NO joue un rôle majeur dans le système immunitaire. Il constitue une molécule immunomodulatrice impliquée dans la régulation de signalisation intra- et-intercellulaire affectant le phénotype, la différenciation, les mouvements, les communications et la fonction des cellules immunitaires [140]. De plus, il peut influencer la production des cytokines et d'autres médiateurs solubles, l'expression des molécules d'adhésion et costimulatrices et la synthèse et le dépôt de composants de la matrice extracellulaire [141].

L'iNOS est fortement exprimé par l'induction de plusieurs stimuli immunologiques. Il constitue l'acteur principal des effets protecteurs et toxiques au cours de la réponse immunitaire [142].

I.6.1. Implication du NO dans la réponse immunitaire innée

Au fil des années, le NO est considéré comme le bras du système immunitaire inné, dont l'iNOS peut produire des concentrations élevées de RNS pour détruire les pathogènes ou digérer les protéines au niveau du phagosome en amplifiant la réponse immunitaire innée [142]. De plus, le NO peut influencer la modulation de la phagocytose, l'expression des molécules du Complexe majeur d'histocompatibilité classe II (CMH II) et costimulatrices, la présentation de l'antigène, la production des cytokines, la différenciation, la survie et l'apoptose des cellules myéloïdes [143]. En outre, un nombre d'études ont prouvé le rôle majeur du NO dans la modulation des phénotypes intrinsèques ainsi que l'acquisition ou l'altération de la capacité fonctionnelle des cellules myéloïdes. De plus, il a été démontré qu'il peut favoriser les effets régulateurs des cellules myéloïdes sur les cellules immunitaires voisines [144].

Le NO est fortement impliqué dans la régulation de la fonctions de macrophages au cours de la réponse immunitaire innée dont l'expression de NOS₂ peut stimuler la production de facteur stimulant des colonies de macrophages (M-CSF) en favorisant la différenciation et la maturation des macrophages [144]. Aussi, il a été démontré que l'engagement de récepteur de Fc dans les macrophages peut déclencher l'activité et la production du NO, ce qui facilite la phagocytose [145].

Au cours de la réponse inflammatoire le NO est impliqué dans la maturation des cellules dendritiques [146]. Des études ont indiqué qu'il peut influencer l'adhésion et le chimiotactisme des leucocytes où ils ont trouvé que le NO peut réguler l'expression de protéine src qui est impliqué fortement dans la migration et le mouvement du macrophage. Les chercheurs ont indiqué que l'iNOS est hautement localisé au niveau du cytoplasme, des petites vésicules, des mitochondries, des granules primaires et tertiaires et à proximité des phagosomes dans les tissus infiltrant de macrophage et neutrophile [144]. De plus, des études ont démontré que le NO peut moduler la production des chimiokines telles que la protéine chemoattractant de monocyte 1 (MCP-1), les Protéines Inflammatoires de Macrophage (MIP-1 α) et (MIP-2 α). Il constitue aussi un substrat des voies peroxydases des neutrophiles et des éosinophiles [144]. D'un autre côté, plusieurs études ont trouvé que le NO est un immunosuppresseur qui peut empêcher le roulement, l'adhérence, la transmigration des leucocytes (monocytes et granulocytes) et inhiber l'activité des chimiokines tels que l'IL-8. De plus, il a été démontré que le NO peut diminuer l'expression de certain molécules d'adhésion, telles que les

molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1), les molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), CD62E (E-sélectine) et CD62P (P-sélectine), ainsi que il peut inhiber l'expression et la fonction des intégrines sur les neutrophiles, tels que CD11a, CD18, Antigène associé aux fonctions lymphocytaires1 (LFA-1) [147.148.149.150.151].

Le NO peut stimuler la perméabilité vasculaire et déclencher la synthèse des protéines de la phase aiguë, ce qui permet le recrutement et l'activation des cellules de la réponse immunitaire adaptatives [152]. Dans ce sens, plusieurs études ont démontré que le NO peut orienter la réponse immunitaire adaptative et moduler la balance Th1 (T helper 1)/Th2 (T helper 2) par la régulation de la différenciation de macrophage M1/M2. Les macrophages M1 peuvent exprimer le iNOS qui est responsable de la métabolise de (L-Arg) en NO et en citrulline, tandis que les macrophages M2 sont caractérisés par l'expression de l'enzyme arginase qui hydrolyse l'arginine en ornithine et en urée. Les cytokines Th1 (L'IL-12, IFN- γ , TNF) favorisent la production de INOS et la différenciation et la maturation du macrophage M1. Cependant, les cytokines Th2 (IL-4 : IL-10, IL-13), peuvent augmentent l'activité de l'arginase et la différenciation et la maturation du macrophage M2. Pour cela, la voie de l'arginase peut limiter la disponibilité de l'arginine pour la synthèse du NO et la compétition entre l'iNOS et l'arginase peut influencer la différenciation des macrophages M1/M2 en modulant la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th1/la voie Th2 [153].

I.6.2. Implication du NO dans la réponse immunitaire adaptative

Le NO pourrait jouer un rôle de molécule effectrice au cours de la sélection, l'éducation et le développement des lymphocytes T (LT) dans le thymus. Des études ont trouvé que l'iNOS est fortement exprimé dans les cellules épithéliales et dendritiques après contact avec des auto-antigènes ou avec des thymocytes activés par la stimulation des récepteurs LT(TCR) au niveau de la jonction cortico-médullaire et médullaire du thymus. De plus, le NO libéré par les cellules stromales thymiques est l'un des facteurs responsables de la délétion des thymocytes double-positifs [154]. En outre, des études récentes ont prouvé l'effet du NO sur la différenciation de Th0 [155]. Aussi, le NO peut inhiber la prolifération et provoquer la mort des lymphocytes T, dont des études ont trouvé que les souris qui sont dépourvues des mécanismes antioxydants présentaient une déficience significative des LT et LB en raison d'une S-nitrosylation excessive et d'une apoptose lymphocytaire [140]. D'un autre côté, de petites quantités de NO favorisaient la survie et la différenciation des sous-populations de cellules T, notamment les cellules T régulatrices (Treg) qui peuvent ainsi inhiber la

différenciation des cellules Th17 [155]. De plus, des études récentes ont montré que le NO exogène peut réguler la différenciation des Th9 et Th17. Ces études ont trouvé que les souris qui présentent un déficit d'iNOS peuvent montrer une fréquence réduite de cellules Th9 [156].

A ce jour, les chercheurs n'ont pas une vision claire de la fonction du NO dans les cellules B, malgré que le sérum des souris qui présentent un déficit de NOS₂ ait prouvé que le NO peut influencer la prolifération des plasmocytes ainsi que les types d'anticorps produits [144].

I.7. Implication du NO dans le cancer

Parmi les trois enzymes NOS dans les systèmes mammifères, l'iNOS est fortement impliqué dans la biologie du cancer en générant plus de NO que les NOS constitutifs [151]. Les iNOS qui s'expriment après l'exposition à plusieurs stimuli inflammatoires (les cytokines et les endotoxines) peuvent moduler différents processus et mécanisme cellulaire dans le MET présentant un double rôle tumorigène et tumoricide [69]. Des études ont démontré que l'iNOS est fortement exprimé dans plusieurs types de tumeurs, incluant le cancer du sein, de cerveau, des poumons, de la vessie, de l'ovaire, de la cavité buccale, de la prostate, de l'œsophage, et du pancréas [157]. Les chercheurs ont également prouvé que plusieurs polymorphismes qui se produisent dans le promoteur iNOS humain ont été corrélé avec la gravité de cancer gastrique, de carcinomes urothélial et de gliome [158]. De plus, il a été démontré que l'activité accrue de l'iNOS a été positivement corrélée avec le degré de malignité des tumeurs gynécologiques, des carcinomes, des sarcomes, des tumeurs de la tête et du cou, des carcinomes hépatocellulaires, des mélanomes et de la leucémie de Kaposi [159]. Il a aussi été démontré que l'inhibition d'iNOS peut favoriser la métastase cellulaire chez les souris atteintes de cancer hépatique [69]. De plus, des études ont indiqué que la transfection du gène iNOS dans les cellules de mélanome peut induire l'apoptose, inhiber la tumorigène et abroger la métastase [160]. D'ailleurs, il a été démontré que la délétion d'iNOS peut augmenter la croissance tumorale et les métastases des sarcomes ovariens [161]

Le MET à la capacité de produire des concentrations différentes de NO, dont le rôle est très complexe, peut induire l'apoptose ou la croissance cellulaire. En effet, des études ont démontré que le NO généré à des concentrations modérées contribue à la tumorigenèse. Cependant, le NO produit à de fortes concentrations agit comme un potentiel agent anticancéreux assurant l'apoptose et inhibant l'angiogenèse [162].

Donc, un double rôle du NO dans le cancer a été bien reconnu [162]. Plusieurs études ont été développées en discutant les mécanismes menant à ces deux activités du NO pro-tumoraux et anti-tumoraux [69].

I.7.1. Les effets pro-tumoraux du NO

Plusieurs études ont indiqué que la production du NO peut favoriser la progression du cancer en provoquant la prolifération, la migration, l'invasion, la métastase des cellules tumorales, l'angiogenèse et la résistance à la thérapie [163.164.165]. Il a été démontré que les RNS jouent un rôle majeur dans l'instabilité de génome et peuvent provoquer la transformation néoplasique. Ainsi, des études ont prouvé que les modifications épigénétiques irrégulières induites par le NO impliqué dans plusieurs voies pro-oncogènes [157]. En outre, des études ont démontré que le NO peut exploiter les mutations de p53 pour contribuer à la croissance des cellules tumorales [166].

Le NO peut cibler certaines caspases qui sont impliquées dans l'apoptose. Les chercheurs ont prouvé que la S-nitrosylation peut influencer la caspase-3 et la caspase-9 [167.168]. Récemment, il a été démontré que l'inhibiteur lié à l'X de la protéine d'apoptose (XIAP), un inhibiteur puissant des caspases peut subir une S-nitrosylation en cystéine 213, ce qui peut induire une altération aux fonctions anti-apoptotique et associée à la tumorigenèse et la survie de nombreuses cellules malignes [169]. Ainsi, le NO joue un rôle majeur dans les voies de signalisation responsables la tumorigenèse incluant la voie MAPk et la voie JNK [138]. De ce fait, il a été démontré que la production de NO endogène dans les cellules de fibrosarcome peut inhiber l'activité des protéines kinases régulatrices du signal d'apoptose 1 (ASK1) dans la voie p38 MAPK [170]. En outre, le NO peut influencer le contrôle de la voie NF- κ B qui représente un mécanisme de survie dans plus de 50% des cancers. Les chercheurs ont démontré que l'activation accrue du NO peut influencer l'hyperactivité de NF- κ B, ce qui contribue à la tumorigenèse en favorisant l'expression de divers gènes impliqués dans la survie et la prolifération [171.172]. De plus, des études ont prouvé que la S-nitrosylation de l'inhibition de certaines protéines d'apoptose cellulaire peut induire l'activation du NF- κ B et conférer une résistance à l'apoptose [173].

Le NO peut induire l'expression de gènes cytoprotecteurs tels que Les protéines de choc thermique de 70 KD (HSP70) qui peut inhiber l'oligomérisation de facteur apoptotique activant la protéase-1 (Apaf-1) en se liant au domaine de recrutement de caspase (CARD), ce qui empêche la formation de l'apoptosome, ou inhibe la libération du cytochrome C [174]

[175.176] .D'ailleurs, il a été démontré qu'au cours des maladies inflammatoires chroniques, une exposition prolongée à des agents pathogènes et une production accrue de NO accompagnées de processus de cicatrisation qui persistent et peuvent conduire à la fibrose ou à la croissance de tumeur. Egalement, l'expression élevée de NOS₂ chez les patients atteints de colite indique un risque plus élevé de développer un cancer du côlon [177]. De plus, l'induction cellulaire de NO dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) peut influencer l'expression des facteurs inflammatoires incluant la chimiokine (CXCL14) [178]. En outre, la mammographie mammaire est proposée pour produire une réponse au stress qui peut augmenter la production de NO et des signaux de stress kinase JNK1, conduisant à un processus inflammatoire favorisant le cancer du sein [179].

Le NO peut favoriser la migration et l'invasion des cellules tumorales par la réduction de l'adhésion cellulaire. Des études ont trouvé que les niveaux élevés de NO dans le microenvironnement contribuent à la migration du cancer du poumon [180]. Ainsi, il a été démontré que le NO peut influencer l'activité de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ et la tyrosine kinase src, ce qui peut améliorer la migration cellulaire [181]. De plus, le NO a été impliqué dans les voies d'activation de la métalloprotéinase matricielle1 (MMP-1), MMP-2, MMP-3 et MMP-9. Plusieurs études ont démontré qu'il peut moduler l'expression et l'activation de pro-collagénase proMMP-8 provoquant l'invasion des cellules tumorales [182.183]des études chez des patients atteints d'un cancer gastrique ont montré que l'expression d'iNOS était associée à la métastase et le développement des vaisseaux lymphatiques et vasculaires [184].

Le NO peut jouer un rôle critique dans l'angiogenèse et l'organisation de la matrice extracellulaire. Il a été observé que l'augmentation du taux de NO dans le MET entraîne une régulation positive de facteur de croissance l'endothélium vasculaire (VEGF) qui peut à son tour augmenter la prolifération et la migration des cellules endothéliales et favoriser l'angiogenèse dans plusieurs tumeurs [184]. Plusieurs études ont démontré que la nitrosylation peut stabiliser le (HIF) α , un facteur de transcription qui peut stimuler la libération du (VEGF) en favorisant l'angiogenèse tumorale [185]. De plus, le NO peut stimuler la production et l'activité de la COX-2 et la (PGE2). Ceci permet une augmentation dans la production de VEGF, ainsi qu'une action directe du NO peut avoir lieu dans l'induction de la production de VEGF [69].

Le NO peut favoriser la résistance aux chimiothérapies, aux radiothérapies et aux médicaments anti-tumoraux. Les chercheurs ont prouvé que l'inflammation chronique du

MET au niveau du cancer du mélanome peut promouvoir la résistance aux médicaments via la production de NO [165]. Ainsi, il a été démontré que l'inhibition de la production de NO dans les tumeurs du gliome peut supporter le traitement par radiation [186]. De plus, dans des modèles animaux provenant des tumeurs du sein et de la prostate, une résistance à la destruction cellulaire a été rapportée en raison de l'augmentation du NO dérivé de l'iNOS [187]. En outre, le NO peut influencer différentes voies de signalisation favorisant la résistance accrue aux médicaments anti tumorale. Des études ont prouvé que l'activation de NF-kB peut conférer une résistance acquise après une chimiothérapie [188].

Il est maintenant évident que le NO joue un rôle important dans divers stades de la cancérogenèse, tels que l'endommagement de l'ADN, l'activation des oncogènes, l'inhibition des enzymes réparatrices d'ADN et des gènes suppresseurs de tumeurs, la modulation de l'apoptose, l'induction des métastases et l'angiogenèse et la résistance au traitement [160]. Cependant, plusieurs travaux ont bien élucidé les effets anti-tumoraux du NO qui comprennent les dommages directs de l'ADN, l'apoptose, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et la perturbation de la physiologie mitochondriale [69].

I.7.2. Les effets anti-tumoraux de NO

Les mécanismes typiques de l'apoptose médiée par le NO incluent la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la libération du cytochrome c des mitochondries, la modulation des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, l'activation des caspases et l'augmentation de l'expression de p53 [189]. Plusieurs études ont démontré que le NO peut induire l'expression de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK), une enzyme clé dans la réparation de l'ADN qui confère une protection contre l'endommagement de l'ADN et les transformations néoplasiques [190]. Ainsi, il a été démontré que le NO peut modifier l'expression et la fonction des différentes protéines liées à l'apoptose incluant le Bcl-2, le p53 et les poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) [191.192]. D'autres études ont démontré que des concentrations élevées de NO peuvent conduire à l'accumulation et la stabilisation de p53, ce qui pourraient favoriser l'apoptose et l'inhibition de la croissance des cellules tumorales [193]. De plus, l'activation de JNK/SAPK et p38 MAPK qui est médiée par le NO peut conduire à l'activation des cascades ce qui peut stimuler le programme génétique pro-apoptotique [74]. En outre, Plusieurs autres études ont démontré que la S-nitrosylation des récepteurs de la mort Fas et DR4 constitue une étape obligatoire pour la transmission du signal de la mort qui peut sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite [194]. Certains travaux ont prouvé

que la S-nitrosylation des cystéines 199 et 304 dans les cellules du cancer colorectal peut augmenter l'expression de Fas, présentant ainsi un effet fonctionnel pro-apoptotique [195].

Le NO est constitué d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire. Plusieurs études ont démontré que l'activité de l'arginase II peut augmenter les polyamines qui sont impliquées fortement dans la prolifération cellulaire. Cependant, l'iNOS peut entraîner une compétition avec l'arginase [196]. Ainsi, le NO peut également exercer son action antiproliférative via la voie de signalisation Ras et certains facteurs de transcription qui peuvent être désactivés par la S-nitrosylation [197]. De plus, le NO peut réguler l'activité de PKA, ce qui peut augmenter l'expression de P53 et P21[198]. En outre, plusieurs études ont démontré que le NO peut induire un retard du cycle cellulaire, où il peut favoriser l'inhibition de cycline A et l'activation d'inhibiteur de la protéine kinase cyclin-dépendant (CKI) [199].

Des études ont démontré que le NO peut induire un dysfonctionnement mitochondrial en affectant l'homéostasie cellulaire, ce qui peut initier l'apoptose. Il a été démontré qu'il peut déclencher l'apoptose en se liant au cytochrome c provoquant ainsi l'endommagement des complexes mitochondriaux I, II, IV et V, comme il peut affecter les membranes mitochondriales, ADN mitochondrial, SOD mitochondriale et provoquer la libération de Calcium (Ca⁺), la perméabilité transitoire, et le gonflement mitochondrial [200].

Une étude récente a rapporté que le NO peut inhiber la résistance et les métastases des cellules tumorales par l'inhibition de l'activité du NF-κB en ciblant le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) et l'inhibiteur de la protéine kinase raf (RKIP) [201]. De plus, il a été démontré que le NO peut avoir un effet cytotoxique sur la dispersion des cellules. Des études ont trouvé que l'induction d'iNOS et la génération de NO peuvent inhiber les métastases hépatiques [69].

Les mécanismes anti-tumoraux du NO amènent à croire que le NO peut jouer un rôle important dans le développement d'une réponse immunitaire contre les tumeurs.

I.7.3. L'implication de NO dans la réponse immunitaire anti-tumorale

Le NO peut avoir un rôle multiforme et complexe dans l'immunologie anti-tumorale car il existe une très fine ligne entre le rôle tumoricide bénéfique et le rôle immunosuppresseurs néfastes du NO au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale [144].

Plusieurs études ont démontré qu'au cours des premiers événements de la tumorigenèse, les RNS servent le bras de système immunitaire pour déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses et détruire les cellules transformées émergentes. Cependant, au cours du développement de tumeur qui peut échapper au système immunitaire, le NO est reprogrammé par le MET pour soutenir les cellules cancéreuses. L'équilibre entre ces deux effets dépend de la localisation du NO produit par les cellules tumorales, par les cellules myéloïdes infiltrant de tumeur ou par les LT effectrices anti-tumorales ainsi que la quantité de NO générée dans les cellules tumorales [69.144].

Plusieurs études ont démontré que le NO généré par le NOS2 qui est exprimé par les cellules cancéreuses peut altérer la réponse immunitaire anti-tumorale, alors que le NO produit par des cellules myéloïdes agit en conjonction avec des cellules T CD8+ pour éradiquer la tumeur ? Donc, le NO présente une interaction dynamique entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires qui pourraient être changée en fonction du moment, du lieu, de la concentration et le changement des conditions du MET [69.144].

I.7.3.1. Les effets anti tumorale de NO au coures de la réponse immunitaire

La destruction des tumeurs est associée fortement au NO-NOS₂ dépendant dérivé des macrophages [202]. Plusieurs rapports ont indiqué que les macrophages sont nécessaires pour la réponse immunitaire anti-tumorale et peuvent détruire différents types de tumeurs in vitro et in vivo, y compris le cancer du pancréas, le cancer de l'ovaire, le cancer du foie et le cancer du mélanome [69]. Des études ont prouvé qu'au cours du développement de la tumeur, les macrophages et les cellules NK utilisent le NO pour tuer les cellules tumorales [60]. De plus, il a été démontré que le NO synthétisé par les cellules myéloïdes infiltrant tumeur peut activer les cellules T CD8+ cytotoxique. Une étude qui a été effectuée sur des souris porteuses de tumeur de lymphome a confirmé que le NO était essentiel pour l'activité anti-tumorale des LTCD8+ et que la production de NO exogènes peut stimuler le système immunitaire et initier une régression tumorale [203]. En outre, la mort des cellules tumorales peut également être due à l'induction de l'iNOS en réponse à l'IFN- γ et TNF α qui sont libérés par les lymphocytes cytotoxiques [204].

Bien que le NO est fortement impliqué dans la surveillance et la réponse immunitaire anti-tumorale, ses effets immunosuppresseurs favorisant la tumeur, tels que la prévention de l'infiltration leucocytaire et la suppression de la prolifération des LT ont été récemment mise en évidence par les scientifiques [144.203.69].

I.7.3.2. Les effets immunosuppresseurs de NO au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale

Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de la production de NO peut améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale, à mesure que la tumeur progresse le NO peut soutenir l'angiogenèse, limiter l'infiltration des leucocytes et augmenter les facteurs immunosuppresseurs, ce qui peut inhiber la fonction des LTet faciliter l'échappement des cellules cancéreuses aux réponses immunitaires anti-tumorales [144]. Ainsi, la balance des voies Th1/Th2 est l'un des mécanismes qui peuvent expliquer l'altération des réponses immunitaire anti-tumorales. Certaines études ont trouvé que les patients atteints du cancer du rein peuvent présenter des niveaux élevés d'expression de l'arginase 2 associés à une déplétion en (L-Arg) et, un dysfonctionnement des L T, et une augmentation de la croissance tumorale [175]. De plus, il a été démontré que la synthèse de polyamines pourrait inhiber l'effet tumoricide du NO au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale [153].

Le rôle du NO dans la réponse immunitaire anti-tumorale est essentiel pour développer des stratégies immuno-thérapeutiques contre différents types de tumeur [69].

I.7.4. Implication du NO dans les cancers hématologiques

Le NO est fortement exprimé dans le microenvironnement de la MO. Il peut jouer un rôle primordial dans la croissance et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques normales et malignes [11]. Cependant, plusieurs études ont prouvé l'effet cytotoxique du NO sur la culture primaire des cellules hématologiques malignes [205]. Des études ont trouvé que le donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), peut provoquer des effets cytotoxiques sur les cellules des patients atteints de lymphome malin (ML), de leucémie myéloïde aiguë (LAM), et de leucémie myélomonocytaire chronique (CMML) [206]. Aussi, le médicament JS-K en libérant le NO peut favoriser une activité anticancéreuse sur les cellules via plusieurs mécanismes [208]. Plusieurs composés pharmacologiques peuvent présenter des propriétés tumoricides sur les cellules de leucémie en générant des RNS et induire l'apoptose p53dépendant [193].

I.8. Le NO comme cible thérapeutique anti-tumorale

L'effet thérapeutique du NO a été amplifié par les scientifiques en explorant de nouvelles stratégies de traitement au cours de diverses maladies [11]. Un grand intérêt a été généré par les chercheurs dans le développement de médicaments anticancéreux qui peuvent cibler le

métabolisme du NO [203]. Les applications cliniques des inhibiteurs de l'iNOS, des donneurs de NO et des médicaments liés à (l-Arg) ont été développés pour atteindre des résultats thérapeutiques améliorés au cours de plusieurs cancers, y compris le cancer de l'ovaire et cancer hépatique [209.210]. Les études ont trouvé que l'inhibition d'iNOS ne présente pas le seul moyen pour réduire la progression tumorale. Ainsi, l'induction de l'iNOS est l'un des mécanismes qui ont été examinés et peut présenter une activité anti-tumorale au cours de plusieurs cancers [194].

I.8.1. L'induction de NO comme cible thérapeutique anti-tumorale

Le NO est apparu comme un adjuvant puissant pour l'hypersensibilisation des tumeurs aux chimiothérapies et radiothérapies. L'activité apoptotique et tumoricide de l'induction de l'iNOS a été mise en évidence par nombreux essais thérapeutiques [69]. De nouvelles données ont indiqué que les donneurs de NO et les agents S-nitrosylants peuvent améliorer la chimiothérapie anticancéreuse. D'ailleurs, il a été démontré que la S-nitrosylation des sous-unités IKK présente une stratégie puissante pour améliorer la thérapie au cours de plusieurs cancers en interférant avec la voie NF-kB [211]. Il a été notamment démontré que certains médicaments anticancéreux peuvent générer des RNS en favorisant l'apoptose via l'activation de caspases 3 [212]. De plus, l'effet anti-prolifératif et anti-invasif des médicaments anticancéreux qui peuvent libérer de NO a été prouvé au cours de plusieurs cancers y compris les carcinomes mammaires, les cancers hépatiques, et le cancer de la prostate [209.210.213].

Les études génétiques ont prouvé que la surexpression de l'iNOS présente une stratégie thérapeutique anticancéreuse potentielle *in vitro* et *in vivo*. Le transfert de gène d'iNOS dans les cellules cancéreuses prostatiques DU145 et PC3, les cellules cancéreuses du côlon HT-29 et les modèles d'animaux de fibrosarcome, du cancer de la thyroïde, du cancer pancréatiques, du cancer du côlon et du cancer de l'ovaire, a favorisé l'inhibition de la tumorigenèse, la croissance tumorale et les métastases, et a augmenté la sensibilité des cellules à l'apoptose et à la radiothérapie [214.215]. De plus, la transfection des rétro virus iNOS-positive chez les souris atteintes du cancer pulmonaire a induit la diminution des métastases et la croissance tumorale [216]. En outre, certaines nanoparticules peuvent induire une cytotoxicité et une destruction cellulaire dans les cellules du cancer du sein ZR-75- en libérant le NO [217]. D'ailleurs, ils ont trouvé que l'administration de l'arginine par les patients atteints du cancer de l'ovaire peut réduire la viabilité des cellules cancéreuses [210].

I.8.2. L'inhibition de NO comme cible thérapeutique anti-tumorale

Plusieurs recherches thérapeutiques ont été concentrées se sont concentrées sur le maintien des niveaux physiologiques de NO dans l'organisme. L'inhibition de l'activation de NFκB a été considérée comme une stratégie thérapeutique initiale pour inhiber l'activation de l'iNOS au cours de plusieurs cancers [69]. Ainsi, l'administration des inhibiteurs de iNOS a été associée à l'inhibition de croissance des cellules du cancer colorectal de HT-29 [172]. De plus, il a été démontré que les anti-inflammatoires en inhibant la production et l'activité de l'iNOS peuvent réduire la prolifération des cellules du cancer du côlon [218]. Plusieurs études ont démontré que la combinaison d'inhibiteurs de NO avec la thérapie photodynamique peut améliorer la réponse au traitement dans le cas du cancer du sein et du cancer hématologique [119].

Les approches thérapeutiques contre le cancer et qui est basé sur la modulation de NO nécessitent des études bien dirigées. La meilleure quantification de NO et la compréhension de la situation cellulaire ainsi que la régulation de voies de signalisation entraînent un développement intense des traitements thérapeutiques anti-tumoraux efficaces [69.11].

Chapitre II

Le myélome multiple (MM)

II.1. Définition du myélome multiple (MM)

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est un cancer hématologique dû à une expansion clonale des plasmocytes envahissant la MO. Il est caractérisé par une ostéolyse et une sécrétion des protéines Monoclonales (MPs) (Ig monoclonale (Igms) ou un fragment d'IgM (chaîne légère libre)) pouvant développer un déficit immunitaire et une insuffisance rénale sévère [1].

II.2. Epidémiologie de (MM)

Le MM est le deuxième cancer du sang le plus courant dans le monde, et il représente 15 à 20% des hémopathies malignes [219.220]. L'organisation mondiale de santé (OMS) a déclaré qu'entre 2000 et 2025, le MM peut toucher 1,71/105 habitants de la population mondiale (1,75 pour les hommes et 1,68 pour les femmes). Des études ont prouvé qu'environ 86 000 cas de MM se produisent chaque année (47 000 hommes et 39 000 femmes), ce qui représente environ 0,8% de tous les nouveaux cas de cancer dans le monde [221].

Une augmentation de la mortalité du myélome a été observée au cours des dernières décennies, environ 63 000 sujets sont signalés à mourir de la maladie chaque année, (33 000 hommes et 30 000 femmes), représentant 0,9% de tous les décès par cancer [222]. Cette maladie touche légèrement plus d'hommes que de femmes. L'âge médian au moment du diagnostic du myélome est d'environ 70 ans, avec plus de 75% de cas ont été détectés chez les personnes de plus de 50 ans [223]. L'incidence du myélome varie en fonction de la race et de la localisation géographique. Le taux d'incidence annuel s'élève à 1,7/100 000 habitants chez les hommes et 1,2 chez les femmes, et le taux de mortalité est à 1,2 pour les hommes et 0,9 pour les femmes [219.220]. Géographiquement, la fréquence est inégalement distribuée dans le monde. Les taux les plus élevés de myélome sont observés en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Amérique du Nord, en Europe du Nord et de l'Ouest, tandis que les taux les plus bas sont observés en Asie (**Figure 11**) [222].

En Algérie, l'incidence des hémopathies malignes a été difficile à estimer pendant de nombreuses années [224]. Les deux approches épidémiologiques qui ont été réalisées entre 1995 et 2005 et entre 2006-2012 ont indiqué que l'incidence de MM était identique : 1,1 et 1,01 respectivement et ne dépasse pas 350 personnes par an et la fréquence des patients de moins de 40 ans était de 25% [225.226]. Cependant, une étude qui a été effectuée par la Société Algérienne d'Hématologie (SAHTS) dans le Registre Algérien de myélome multiple

(l'AMMR)entre juin 2014 et juin 2016 a prouvé que la fréquence des patients atteints de MM est importante en Algérie, et que l'incidence était supérieure de 1,71 par rapport aux deux études précédentes, plus de 1000 patients en 2 ans. L'âge médian était de 63 ans, avec 53% de moins de 65 ans [221].

La fréquence géographique du MM en Algérie est inégalement distribuée avec 62% des patients au centre, 19% de la région d'Ouest et 19% de la région de l'Est [221].

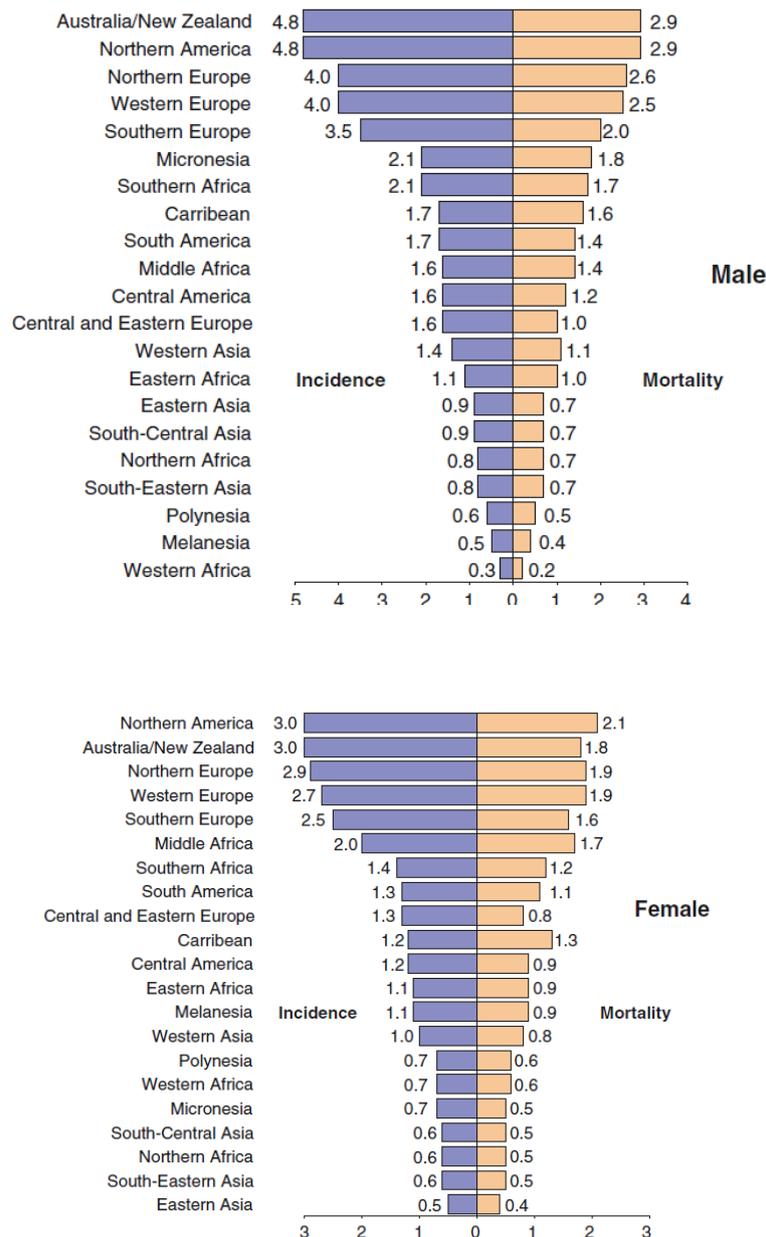


Figure 11 : l'incidence et la mortalité de MM par 100 000 dans le monde [222].

I.3. Etiologie de (MM)

L'étiologie du myélome multiple est mal comprise car l'enquête semble difficile pour une maladie à faible fréquence. De plus, la plupart des facteurs de risque qui jouent un rôle majeur dans le développement des maladies malignes n'a pas été trouvée clairement impliquer dans l'étiologie du MM. Cependant, des efforts importants sont actuellement établis pour améliorer les études étiologiques de l'hémopathie malignes et du myélome multiple en particulier [227].

Le facteur de risque le plus confirmé pour le myélome est l'augmentation de l'âge. C'est un marqueur de substitution pour les complications génétiques qui contribuent directement à la maladie [228].

II.3.1. Les Facteurs génétiques

Le MM est un cancer très hétérogène dû aux nombreuses aberrations génétiques successives induisant des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, des translocations, des mutations, des pertes ou gains chromosomiques [229.230], et qui peuvent cibler des gènes suppresseurs ou promoteurs de tumeurs, des gènes de cycle cellulaire, des facteurs de croissance ou des facteurs anti-apoptotiques qui sont impliqués dans les processus de la tumorigenèse de MM [231.232.233.234].

II.3.1.1. Anomalies oncogénétiques primaires

Ces anomalies représentent les événements précoces qui permettent l'initiation du processus de l'oncogenèse de MM [232].

II.3.1.1.1. Les anomalies non hyperdiploïdes

Elles constituent les translocations récurrentes du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) situé sur le chromosome 14 impliquant la région 14q32. Ces anomalies se produisent au cours du réarrangement des immunoglobulines lors de la commutation isotopique, ce qui représente les translocations les plus fréquentes observées dans 90% des lignées cellulaires de MM, et se trouvant chez 60% des patients atteints de MM [233.235.236].

Nombreux partenaires chromosomiques ont été identifiés au cours des translocations non hyperdiploïdes [237].

II.3.1.1.1.a. La translocation t (11 ; 14) (q13 ; q32)

Elle est portée par le chromosome 11q13 et se produit chez 17% des patients atteints de MM. Elle peut provoquer la dérégulation de gène codant pour la Cycline D1 (CCND1) impliquée dans la régulation de cycle cellulaire [238].

II.3.1.1.1.b. La translocation t (4 ; 14) (p16 ; q32)

Cette translocation est portée par le chromosome 4p16 et se produit chez 15% des patients atteints de MM. Elle peut provoquer la dérégulation de MMSET (Multiple Myeloma SET domain) et de Récepteur de facteur de croissance des fibroblastes -3 (FGFR-3). Et peut induire une surexpression de gène codant pour la Cycline D2 (CCND2) [239].

II.3.1.1.1.c. La translocation t (14 ; 16) (q32 ; q22-23)

Elle est portée par le chromosome 16q22-23 et se produit chez 5 à 10% des patients atteints de MM. Elle peut provoquer la dérégulation de l'oncogène c-Musculo-aponeurotique de fibrosarcome (c-Maf) et induire la surexpression de (CCND2) [235.238].

II.3.1.1.1.d. La translocation t (14 ; 20) (q32 ; q11)

Cette translocation est portée par le chromosome 20q11 et se produit chez 5% des patients atteints de MM. Elle peut provoquer une surexpression de proto-oncogène (Maf B) et induire la dérégulation de la Cycline D2 [240].

II.3.1.1.1.e. La translocation t (6 ; 14) (p21 ; q32)

Cette translocation est générée par le chromosome 6p21 et se produit chez 2% des patients atteints de MM. Elle peut induire la surexpression de gène codant pour la Cycline D3 (CCND3) [241.242].

De plus, des études ont révélé d'autres translocations qui impliquent les chaînes légères des immunoglobulines (CLiG) CLiG-Kappa (CLiGk) situées sur le chromosome (2p12) et IgL-Lambda (CLiGλ) situées sur le chromosome (22q11) [222].

II.3.1.1.2. Les anomalies hyperdiploïdes

Il s'agit de multiples trisomies qui peuvent toucher particulièrement les chromosomes impairs (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21). Elles se trouvent chez 40% des patients atteints de MM et

peuvent induire la surexpression de certaines Cyclines, de c-Myc, des MAP Kinase et des facteurs de croissance [239].

En plus des premiers changements génétiques permettant le démarrage du processus de l'oncogenèse de MM, la progression de la pathologie est expliquée par la survenue d'autres aberrations oncogéniques secondaires [233].

II.3.1.2. Anomalies oncogéniques secondaires

Elles constituent les évènements et les aberrations génétiques qui peuvent s'accumuler sur les anomalies oncogéniques primaires pour produire le phénotype malin du myélome et conduire à la progression et le développement de la maladie. Elles incluent des amplifications génétiques, des délétions, des insertions, des mutations, des modifications épigénétiques, des translocations secondaires et des variations dans le nombre des chromosomes [243].

II.3.1.2.1. Délétion du chromosome 13

Elle constitue la délétion du bras court du chromosome 13 (dél 13) ou souvent la perte de séquences en 13q14. La dél 13 se place en seconde position après les anomalies de chromosome 14 et se trouve chez environ 45% des patients atteints de MM [244.245].

II.3.1.2.2. Délétion du chromosome 17 et mutations de P53

La perte du bras court du chromosome 17 (del 17p) se trouve dans 40% des lignées cellulaires et chez 10% des patients atteints de MM. Elle peut toucher le gène codant pour le p53 (17p13.1). Cette délétion est associée à plusieurs mutations qui peuvent affecter l'expression de certains oncogènes [246].

II.3.1.2.3. Les anomalies du chromosome 1

Le gain du chromosome 1q21 se trouve chez 30% à 40% des patients atteints de MM. Il est responsable de la surexpression de sous-unité régulatrice des cyclines 1B kinase dépendante (CKS1B) qui est associé fortement à l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [247]. De plus, les récepteurs immunitaires associés à la translocation 1et 2 (IRTA1 et 2), ont été identifiés comme oncogènes de chromosome 1q qui sont fortement exprimés dans les lignées tumorales [248].

II.3.1.2.4. Mutations de RAS

Les mutations des oncogènes Ras se trouvent chez environ 30% des patients atteints de MM, et elles sont responsables de l'augmentation et la prolifération cellulaire et les transformations malignes au niveau des plasmocytes [239].

II.3.1.2.5. La translocation t (8 ; 14) (q24 ; q32)

Elle Portée par le chromosome 8q24, se trouve chez environ 15% des patients atteints de MM, et représente un événement complexe responsable a la surexpression de l'oncogène c-Myc [249].

II.3.1.2.6. L'activation du NF-κB

Plusieurs études ont prouvé le rôle majeur de NFκB au cours de l'oncogenèse du MM. Il a été démontré que la voie de NFκB est activée chez 40% des patients atteints de MM et contribue fortement à la survie et la prolifération cellulaire des (MPC). De plus, des études ont trouvé que plusieurs délétions peuvent cibler des inhibiteurs de la voie NF-κB incluant le (BIRC2/3) (Baculovirus contenant répétition d'IAP) BIRC 2/3 sur le chromosome 11 et le Facteur associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale3 (TRAF3) sur le chromosome 14 ou cylindromatose (CYLD) sur le chromosome 16 [250].

II.3.1.2.7. Les anomalies de p16 et p18

L'inactivation de gène p16 par méthylation a été observée dans 50% des cas de MM. Bien que son rôle dans la pathogenèse de MM reste inconnu, des études récentes ont montré que la p16 ne pourrait pas être exprimée dans la plupart des tumeurs de MM [251.252].

Les délétions de p18 ont été observées dans 10% des cas de MM. Un nombre important d'études a démontré que l'inactivation de p18, est un phénomène important pour la prolifération des MPC [253].

II.3.1.3. La prédisposition de système d'Antigène de leucocyte humain (HLA)

Certains études ont rapporté la prédisposition de HLA comme facteur héréditaire qui favorise le développement de MM [228]. Des études récentes ont observé une fréquence accrue de HLA-CW5 chez les hommes atteints de MM [254]. De plus, une autre étude a prouvé le risque accru de myélome associé à HLA-CW2 [255].

II.3.2. Les facteurs environnementaux et d'autres facteurs de risque

En plus des facteurs génétiques, le MM résulte d'une combinaison de plusieurs facteurs de risque [228].

II.3.2.1. La race

La race semble être un facteur de risque très important au cours de MM. Certaines études ont démontré que l'incidence du MM chez les noirs présente le double en comparant avec les blancs [256].

II.3.2.2. L'exposition aux rayons

L'exposition aiguë au rayon est un facteur important de prédisposition de MM. Plusieurs études effectuées sur les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima et de Nagasaki ont prouvé qu'ils peuvent présenter un risque accru pour développer un MM. Cela a été confirmé par l'exposition de la MO des souris à une dose de rayon, ce qui peut favoriser le développement d'un MM à stade avancé [257.258].

II.3.1.3. Le risque professionnel

Le risque professionnel a été identifié comme contribuant potentiel aux facteurs de risque de MM. L'effet du statut socio-économique (SSE) sur l'incidence du MM a été examiné dans plusieurs études qui ont trouvé que 37% des cas de MM étaient survenus chez des personnes à faible SSE et 17% chez les personnes à fort SSE. Ceci peut expliquer le nombre élevé de MM chez les noirs. De plus, il a été démontré que les facteurs socio-économiques tels que l'occupation, le revenu et l'éducation ont présenté 49%, 28% et 17% respectivement de risque de MM chez les noirs [259]. En outre, plusieurs études ont détecté l'association de l'agriculture avec le risque élevé de MM, bien qu'il y ait une suggestion que les herbicides et les pesticides peuvent jouer un rôle important dans le développement de cette maladie [260].

II.3.2.4. L'obésité

L'obésité pourrait être un facteur de risque qui est fortement associé au MM. Certains travaux ont trouvé que les sujets obèses présentent un risque accru de MM. Aussi, l'obésité peut affecter la mortalité et la survie des patients atteints de MM [261.262].

II.3.2.5. Le tabac

Plusieurs études ont examiné l'effet du tabac sur le risque de la malignité hématologique. Il existe peu de preuves d'un risque accru de MM chez les fumeurs. De plus, la plupart des enquêtes sur le rôle de la consommation d'alcool ont prouvé qu'il ne peut pas contribuer à l'étiologie du MM. Ainsi, plusieurs études ont rapporté l'absence d'association du tabac avec le risque de MM [228.263].

II.3.2.5. Les facteurs viraux

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'hépatite C semblent liée à un risque élevé de MM [264.265]. Plusieurs études ont démontré un risque accru de MM chez les personnes vivantes avec le SIDA. De plus, il a été démontré qu'un lien avec l'herpès virus humaine-8 (HHV-8) est possible au cours de MM [228].

D'autres facteurs de risque professionnels et environnementaux y compris les solvants organiques et autres produits chimiques ont été étudiés en tant que facteurs de risque potentiels du myélome [228].

II.4. La physiopathologie de (MM)

II .4.1 . Ontogenèse des plasmocytes

Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSHM) peuvent subir plusieurs étapes de différenciation et maturation pour arriver à la formation des plasmocytes ; des étapes indépendantes de l'antigène (Ag) au niveau de la MO aboutissent à la formation des lymphocytes B (LB) matures naïves et des étapes dépendantes de l'Ag où les LB matures naïves circulent dans les différents organes lymphoïdes secondaires périphériques à la rencontre des Ag spécifiques. Ainsi, les LB pourraient être activés par les LT et initier la formation des centres germinatifs [266.267].

Dans les centres germinatifs, les LB matures sont soumis à un processus d'hyper-mutation somatique des régions variables des gènes des immunoglobulines(Ig) et une sélection des LB à forte affinité pour l'antigène. Ensuite, la commutation isotypique pourrait être formée pour produire des cellules effectrices (LB) mémoires et plasmocytes sécrétant des Anticorps (Acs) [266.267].

Dans les conditions physiologiques, l'IL-6 constitue le facteur principal de différenciation des LB en plasmocytes. Aussi, les plasmocytes présentent des cellules qui appartiennent au

système lymphoïde et se trouvent très rarement dans la circulation sanguine. De plus, ils ne représentent que 0,14 à 0,3% des cellules de MO. Les plasmocytes normaux ayant achevé leur différenciation et ne prolifèrent plus dans la MO [227].

II.4.2. Ontogenèse du MM

Les précurseurs des cellules souches des MPC ne sont pas encore bien élucidés. Cependant, certaines études ont indiqué que les plasmoblastes post-germinative qui ont subi les phénomènes physiologiques d'hyper mutation somatique et de commutation isotypique pourraient être des cellules progénitrice de MM [268].

Le MM peut être prévenu par une maladie précancéreuse non maligne appelée une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), qui se caractérise par une charge tumorale plus faible, inférieure à 10%, et une absence des lésions ostéolytiques. Au cours de MGUS, le clone tumoral était stable, asymptomatique et ne se développait pas progressivement. Plusieurs études ont démontré qu'environ 2% des patients atteints de MGUS progressent par an pour développer un MM [268.227.228] (**Figure 12**).

L'oncogenèse du MM présente un processus en deux étapes, les cellules B qui possèdent des anomalies génétiques primaires en induisant l'initiation d'un MGUS qui peuvent subir une accumulation de nombreuses anomalies génétiques secondaires et favoriser la prolifération anarchique des plasmocytes et le développement d'un MM. Le MM peut être initié par un stade asymptomatique qui est caractérisés par une prolifération anormale des plasmocytes dans la MO sans complications symptomatiques. Ce stade pourrait évoluer à un MM intra-médullaire qui est caractérisé par une charge élevée des MPC en induisant plusieurs complications symptomatique. le MM extra-médullaire constitue le stade avancé de la maladie. Il est caractérisé par des plasmocytes circulants qui se nichent hors de la MO (sang, liquide pleural, ascite) formant des métastases. Les lignées cellulaires de MM sont presque exclusivement générées à partir des prélèvements de liquides extra-médullaires. La migration des plasmocytes extra-médullaire vers le sang (supérieure ou égale à 20%), peut favoriser le développement d'une leucémie à plasmocytes [253] (**Figure 12**).

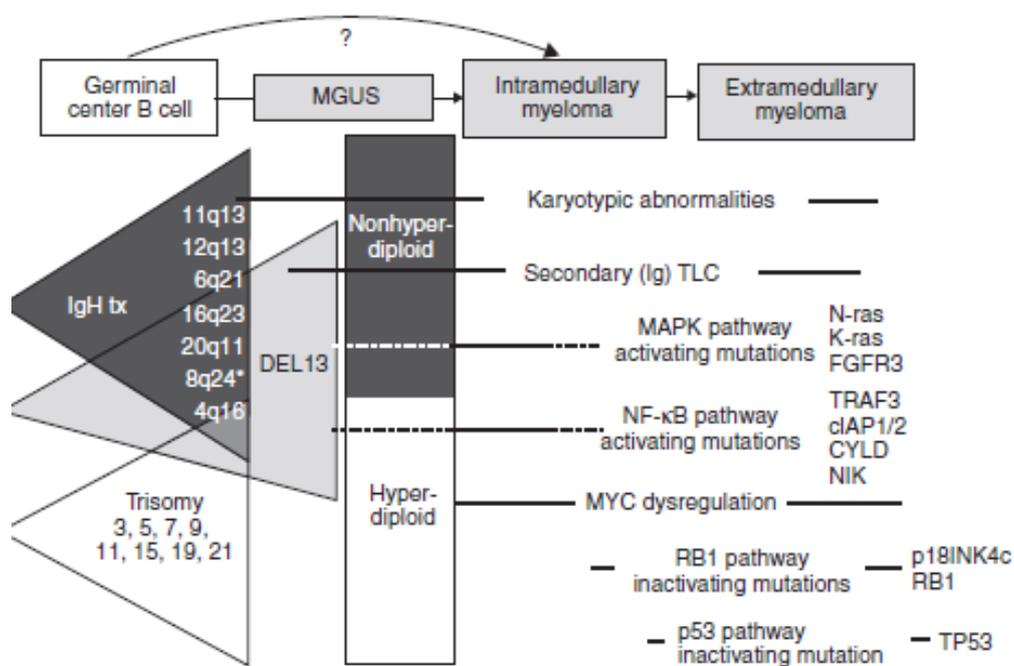


Figure 12 : Les mécanismes de développement de MM [253].

II.4.3. Les phénotypes de MM

Les cellules plasmocytaires sont caractérisées phénotypiquement par la co-expression du CD 38 et du CD 138 qui permettent d'affirmer la nature plasmocytaire d'une cellule médullaire [269.270]. Par ailleurs, plusieurs études ont identifié des marqueurs à la fois des cellules normales et les cellules malignes. Le caractère malin d'un plasmocyte nécessite donc l'analyse d'un profil phénotypique plus élargi, comme l'évaluation de l'expression du CD 19, CD 27, CD 28 et CD 56, CD44, CD10 [253].

II.4.4. Les types de MM

II.4.4.1. Le MM asymptomatique

Il est caractérisé par une concentration sérique d'Ig monoclonale supérieure à 30g/L et des MPCs supérieurs à 10% sans complications symptomatiques. Le taux de progression en MM symptomatique est de 10% par an durant les 5 premières années [271].

II.4.4.2. Le MM non sécrétoire

Ce type de MM est caractérisé par l'absence de MP dans le sérum des patients et des MPCs supérieur à 10%. Il présente entre 3% et 5% de la population totale de MM. Le diagnostic

dans ces cas dépend de la biopsie de la MO et de la mise en évidence ultérieure de plasmocytes [253].

II.4.4.3. Le MM symptomatique

Il est également caractérisé par un pic monoclonal sérique supérieur à 30g/L et des MPCs supérieurs à 10%. Pendant ce stade, les patients souffrent des symptômes dus à l'envahissement de la MO par les MPCs [227] (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Les types de MM [227].

Criterion	MGUS	Smoldering Myeloma	Nonsecretory Myeloma	Symptomatic MM
M-protein	< 30 g/L in serum	≥ 30 g/L in serum and/or plasma cells ≥ 10%	None in serum and/or urine with immunofixation	Present in serum and/or urine
Bone marrow clonal plasma cells	< 10% and low level of plasma cell infiltration in a trephine biopsy (if done)	≥ 10% and/or M-protein ≥ 30 g/L in serum	Plasmacytosis ≥ 10% or plasmacytoma	Present ^b or plasmacytoma
Related organ or tissue impairment ^a	Absent	Absent/asymptomatic	Present	Present
Other signs	No evidence of other B cell proliferative disorders			

II.4.5. Symptômes et signes pathologiques de MM

Le MM se manifeste par différents symptômes généraux. La malignité du MM qui est liée à la prolifération anarchique des plasmocytes dans la MO et la production des Ig monoclonal s'exprime par une destruction osseuse, une anémie, une hypogammaglobulinémie et un dysfonctionnement du système immunitaire avec des infections récurrentes et une insuffisance rénale [1].

II.4.5.1. la production des Anticorps monoclonaux (Acms)

Les protéines monoclonales qui sont produites en excès par les MPC, s'accumulent dans le sang et pourraient être excrétées dans les urines. Les scientifiques peuvent l'identifier par un pic monoclonal dans l'électrophorèse [272] (**Figure 13**).

La quantité des MPs produite par les MPC varie d'un patient à un autre. Les MPs peuvent perdre la fonction des anticorps et présenter des structures anormales qui ont la capacité d'interagir entre elles et/ou avec d'autres tissus comme les cellules sanguines, les parois vasculaires et d'autres composants sanguins [272.273].

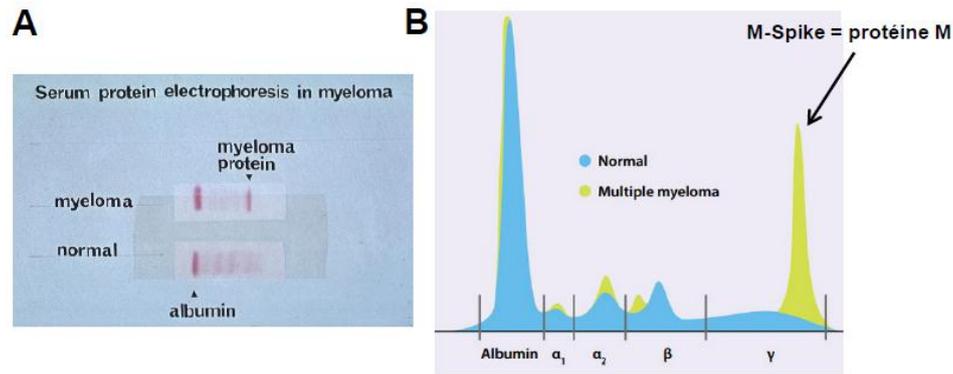


Figure 13: la production des Ac monoclonaux au niveau du MM [272]

Au cours de nombreux cas de MM, les chaînes légères sont produites en excès par rapport aux chaînes lourdes en formant les protéines de Bence Jones qui pourrait être fixées par certaines hormones ou minéraux circulants, entraînant toute une variété d'anomalies endocriniennes ou métaboliques et avec des facteurs de coagulation, en favorisant un risque accru d'hémorragies ou de thromboses [274.275.276.277].

II.4.5.2. Les maladies osseuses associées au MM (MBD)

Les MBD sont l'aspect le plus visible qui se développent chez environ 79 % des patients atteints de MM. Elles constituent fréquemment le révélateur de la maladie et représentent la cause majeure de mortalité au cours du MM. MBD peuvent réduire la qualité de vie des patients de MM à cause des fractures pathologiques et des douleurs osseuses, principalement localisées au niveau de la colonne vertébrale (tassement vertébral avec ou sans compression médullaire), du thorax (les côtes), du bassin et du crâne. En effet, les atteintes osseuses au cours du MM sont dues à un déséquilibre entre les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes formant le remodelage osseux [4.5]. Les MPCs et l'environnement tumoral du MM peuvent stimuler la sécrétion de plusieurs facteurs appelés « les Facteurs activateurs d'ostéoclaste » (OAF) y compris l'IL-6, l'IL-1, IL-7, le TNF- α , le TNF- β , MIP-1a, MIP-1b et la Tartrate-Resistant Acide Phosphatase (TRAP) qui peuvent activer les ostéoclastes et inhiber les ostéoblastes aboutissant à une augmentation de la résorption osseuse. De plus, des études récentes obtenues in vitro ont prouvé la capacité des MPCs à produire des MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-9) en contribuant à la résorption osseuse [278]. Donc, le myélome peut émettre des signaux empêchant les ostéoblastes de créer de nouveaux os et accélérant l'activité des ostéoclastes. A son tour, le processus de la résorption osseuse induit la sécrétion des facteurs de croissance qui participent à l'augmentation de la

masse tumorale et peuvent conduire à l'amplification du processus ostéolytique. Plusieurs études ont prouvé que les ostéoclastes peuvent induire des signaux et des substances chimiques en stimulant la croissance des MPCs [279].

Au cours des conditions physiologiques, le système RANK -RANK-L - (OPG) constitue l'acteur principal d'équilibre de remodelage osseuse. Le récepteur RANK s'exprime à la surface des ostéoclastes et appartient à la famille des récepteurs du TNF. L'activation de RANK avec son ligand RANK-L, qui est sécrété par les ostéoblastes et par les lymphocytes T, peut déclencher la différenciation et l'activation des ostéoclastes. Cependant, l'OPG, la protéine soluble sécrétée par les ostéoblastes, joue un rôle de récepteur piège qui peut induire la neutralisation RANK-L et empêcher la fixation de RANK-RANK-L en inhibant ainsi l'activité des ostéoclastes. Certaines études ont démontré que l'influence de MPC et le microenvironnement tumorale du MM sur l'équilibre de remodelage osseux sont largement dépendant de la dérégulation du système RANK-RANK-L-OPG (**Figure 14**) [280].

Par ailleurs, d'autres études ont indiqué qu'au cours du MM, l'expression de l'OPG-ligand (OPG-L) par les cellules stromales augmente de manière importante tandis que la production de l'OPG pourrait diminuer à cause de plusieurs interactions entre les MPCs et les cellules stromales [280].

Pour cela, la formation des lésions ostéolytiques est la clé physiopathologique du MM et constitue le résultat de l'interaction des MPCs avec le microenvironnement de la MO tumorale [279.280].

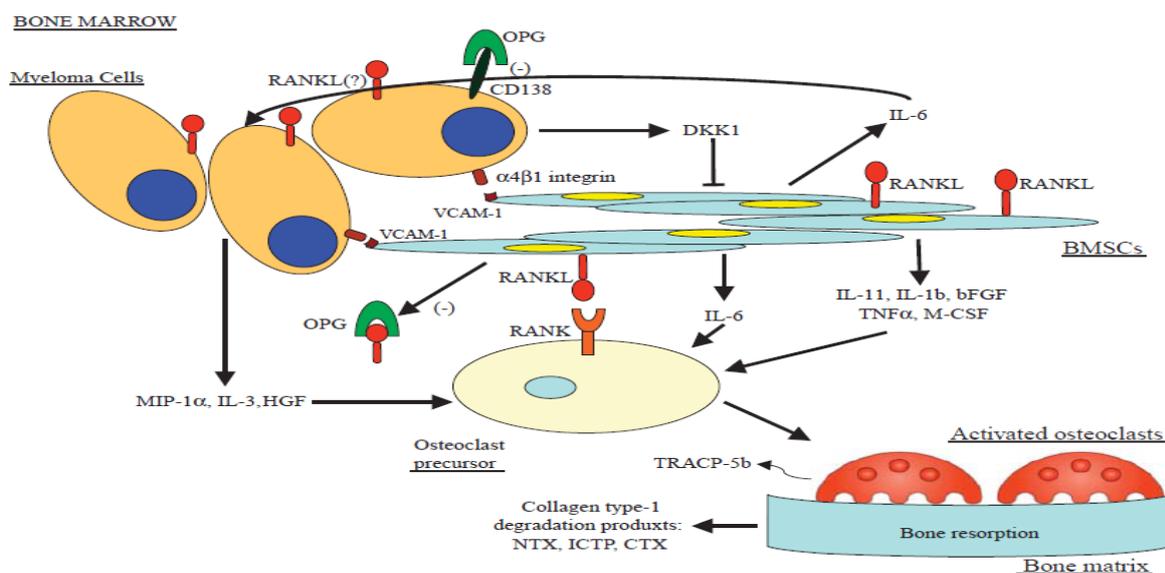


Figure 14: Physiopathologie de MBD [280].

II.4.5.3. Les Signes d'hypercalcémie

L'hypercalcémie constitue un élément de gravité lié à la progression de la résorption osseuse, et se développe chez environ 45% des patients atteints de MM. Les complications d'hypercalcémie se présentent souvent par des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, des signes de déshydratation, une faiblesse, des troubles musculaires et des troubles du rythme cardiaque [281.282].

II.4.5.4. Anémie

L'anémie se développe chez 50% des patients atteints de MM et pourrait être révélatrice de MM. L'envahissement médullaire par les MPCs peut favoriser le dysfonctionnement de la MO associé à une diminution de la fabrication des globules rouges. De plus, plusieurs études ont démontré que certaines cytokines sécrétées par le MET du MM peuvent favoriser l'inhibition des érythrocytes [283].

II.4.5.5. Atteintes rénales

Les atteintes rénales se développent chez 70% des patients atteints de MM. Elles sont dues à la production excessive des MPs. Les complications rénales au cours du MM représentent 80% des insuffisances rénales aiguës [284.285].

II.4.5.5. Les infections

Les infections récidivantes sont l'une des causes majeures de mortalité des patients au cours du MM. L'envahissement de la MO par les MPC peut favoriser le dysfonctionnement des cellules immunitaires, la diminution des lymphocytes B polyclonaux et l'hypogammaglobulinémie, l'inhibition des fonctions LT et l'activation aberrante de la fonction des monocytes, des macrophages et des neutropénies. Donc, les patients de MM pourraient être très sensibles aux infections virales et bactériennes [286.287].

II.4.5.6. Complications neurologiques

Elles constituent des compressions médullaires par tassement vertébral. En effet, la compression de la gaine nerveuse est expliquée par la contiguïté avec l'atteinte osseuse et la prolifération plasmocytaire [288].

II.4.5.7. Syndrome d'hyperviscosité

L'hyperprotidémie constitue l'augmentation de taux d'Ig dans le sang qui pourrait être responsable d'un syndrome d'hyperviscosité et une hypervolémie plasmatique. Les complications des syndromes d'hyperviscosités peuvent présenter des syndromes hémorragiques, des thrombopathies, des épistaxis, des hémorragies intestinales. Des céphalées, des troubles de la vision, et des bourdonnements d'oreille [289].

II.5. Classification de MM

La moyenne de survie des patients atteints de MM est de 4 à 5 ans. En se basant sur différentes caractéristiques clinico-pathologique et la combinaison des facteurs de pronostique associés à la gravité du MM, tels que le taux de prolifération du MPC, la quantité des Acms produite, l'hypercalcémie et la β 2-m élevée, nombreuses classifications du MM sont proposées. Cependant, peu de systèmes de classification uniformes ont été acceptés afin de prédire la survie, les réponses au traitement et élaborer des analyses rétrospectives des thérapies ainsi que la planification prospective des essais cliniques [227].

II.5.1. Classification de Durie et Salmon (DS)

Le DS constitue le premier système de classification utile pour le MM qui a été proposé par Durie et Salmon en 1975, et il est devenu largement acceptée et utilisée depuis plus de 30 ans. Le DS a été créée en mesurant la masse des cellules tumorales et les MPs synthétisés corrélées par des caractéristiques cliniques [228] (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Classification de (DS) [228].

Stade	Critères	Masse tumorale ($\times 10^{12}/m^2$)
I	Tous ces critères sont présents : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hémoglobine > 10g/dl ▪ Calcémie normale ≤ 120 mg/l ▪ Os normal ou plasmocytome isolé ▪ Taux d'Ig monoclonale faible : IgG < 50 g/L, IgA < 30 g/L, Ig monoclonale urinaire < 4 g/24 h 	< 0,6 (faible)
II	Aucun des critères du stade III ni du stade I	0,6–1,2 (intermédiaire)
III	L'un au moins des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hémoglobine < 8,5 g/dl ▪ Calcémie > 120 mg/l ▪ Multiples lésions lytiques (lésions destructrices ou fractures pathologiques) ▪ Taux élevé d'Ig monoclonale : IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l, Ig monoclonale urinaire ≥ 12 g/24 h 	> 1,2 (élevée)
Sous-classification :		
A – Fonction rénale normale (créatininémie < 20 mg/L).		
B – Fonction rénale anormale (créatininémie ≥ 20 mg/L).		

La classification DS reste d'actualité alors qu'elle a peu de valeur pronostique. Pour cette raison, d'autres classifications basées sur des facteurs de pronostic d'importance et des anomalies cytogénétiques ont été rajoutées [227.228] .

II.5.2. Classification ISS (International Staging System)

Une base des données encore plus grande de 10 750 patients d'Asie, d'Europe et d'Amérique du Nord est à l'origine de la création du système international de classification (ISS) publiée en 2005. L'ISS est un nouvel indice international de valeur pronostic basé sur l'étude de deux paramètres biologiques prédictifs de la durée de survie globale, la β_2 -microglobulinémie et l'albuminémie [253] (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Classification ISS [253].

Stade	I	II	III
Critères	β_2 m sérique < 3,5 mg/L et albuminémie > 35 g/L	<i>ni I ni III</i>	β_2 m sérique > 5,5 mg/L
Durée de survie médiane	62 mois	44 mois	29 mois

II.5.3. Classification moléculaire

Les changements cytogénétiques sont maintenant présents chez presque tous les patients atteints de myélome. Bien que la spécificité des altérations chromosomiques soit fortement associée à la survie et le pronostic des patients, la classification moléculaire au cours du MM n'est pas largement disponible pour l'incorporer dans un système utile, malgré que certains essais ont été appliqués par plusieurs cliniciens [227]. (**Tableau 9**).

En Algérie, et selon une étude effectuée en 2016, le pronostic des patients atteint de MM était évalué selon la classification de SD et le ISS. La classification ISS était utilisée sur 72% des patients, avec 16,21% au stade I, 18,56% au stade II et 36,92% au stade III. La cytométrie en flux était réalisée uniquement chez 45 patients (4,5%) et la cytogénétique chez un seul patient [227.253].

Tableau 9 : Modèle pronostique du myélome multiple basé sur l'anomalie du chromosome 13q et la B2-microglobuline [227].

Risk	Features	Median overall survival (months)
Low	Normal 13q and B2M < 4 mg/L	102
Intermediate	Del(13q) or B2M > 4 mg/L	46
High	Del(13q) and B2M > 4 mg/L	11
Low	Normal 13q and B2M < 2.5 mg/L	111+
Intermediate	Del(13q) or B2M > 2.5 mg/L	47
High	Del(13q) and B2M > 2.5 mg/L	25

II.6. La relation de MM avec l'environnement tumoral

L'environnement médullaire de la MO est composé de nombreux types cellulaires: des cellules hématopoïétiques (CH), des cellules mésenchymateuses (MSC), des cellules immunitaires (IC), des cellules stromales (BMSC), des ostéoclastes (OB), des ostéoblastes (OB) et des cellules endothéliales (CE), qui sont intégrés dans une matrice extracellulaire (MEC) et un milieu liquide.. L'homéostasie et les communications cellulaires de ce réseau complexe sont associées fortement à plusieurs médiateurs chimiques et forces physico-mécaniques qui pourrait être un siège de développement tumoral au cours du MM [290].

Les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires, qui sont exprimées de façon autocrine par les PMCs et paracrine par la MO tumorale sont impliqués fortement dans le recrutement des plasmocytes qui peuvent à leur tour influencer l'équilibre médullaire pour amplifier les transformations malignes, la prolifération, la survie, l'invasion, la migration et les métastase de MPC ainsi que l'angiogenèse et la résistance aux médicaments [291.292.293] .

L'IL6 est une cytokine pro-inflammatoire qui est fortement sécrété par les cellules de microenvironnement médullaire au cours du MM. Il constitue l'un des facteurs de croissance les plus importants pour la croissance, la différenciation et la survie de MPC, dont une sécrétion autocrine a été confirmée par plusieurs études [294]. De plus, certaines études ont prouvé l'implication d'autre cytokine et facteurs inflammatoires de la MO dans l'amplification de la progression tumorale au cours du MM, y compris : le Facteur de croissance d'insuline (IIGF-I), le VEGF, IL1b, ,IFN , Facteur de croissance des hépatocytes(HGF) , Facteur de croissance des fibroblastes (FGF) [227].

Les lésions osseuses, le signe majeur des patients atteint de MM, représentent un modèle optimal et clair qui peut expliquer la relation de MPC avec son environnement, dont les facteurs de croissance peuvent interagir avec les récepteurs spécifiques de l'environnement pour soutenir le développement et la progression tumorale [280].

Plusieurs études ont démontré que les récepteurs membranaires et les molécules d'adhésion au niveau de la MO, incluant les intégrines, les cadhérines, les sélectines, les syndecans, les membres de la superfamille du TNF (CD40, TNF α , Facteur d'activation des cellules B (BAFF), ligand d'induction de prolifération (APRIL) et les membres de la superfamille de Ig, ont un rôle essentiel dans la prolifération et la niche médullaire des MPC. Aussi, il a été démontré que les interactions entre les cellules peuvent activer plusieurs voies de signalisation, y compris la voie Ras/MAPK, la voie PI3K/Akt, la voie Jak2/Stat3 et la voie NF- κ B, qui sont impliqués fortement dans la survie et l'inhibition d'apoptose de MPC [228] (Figure 15).

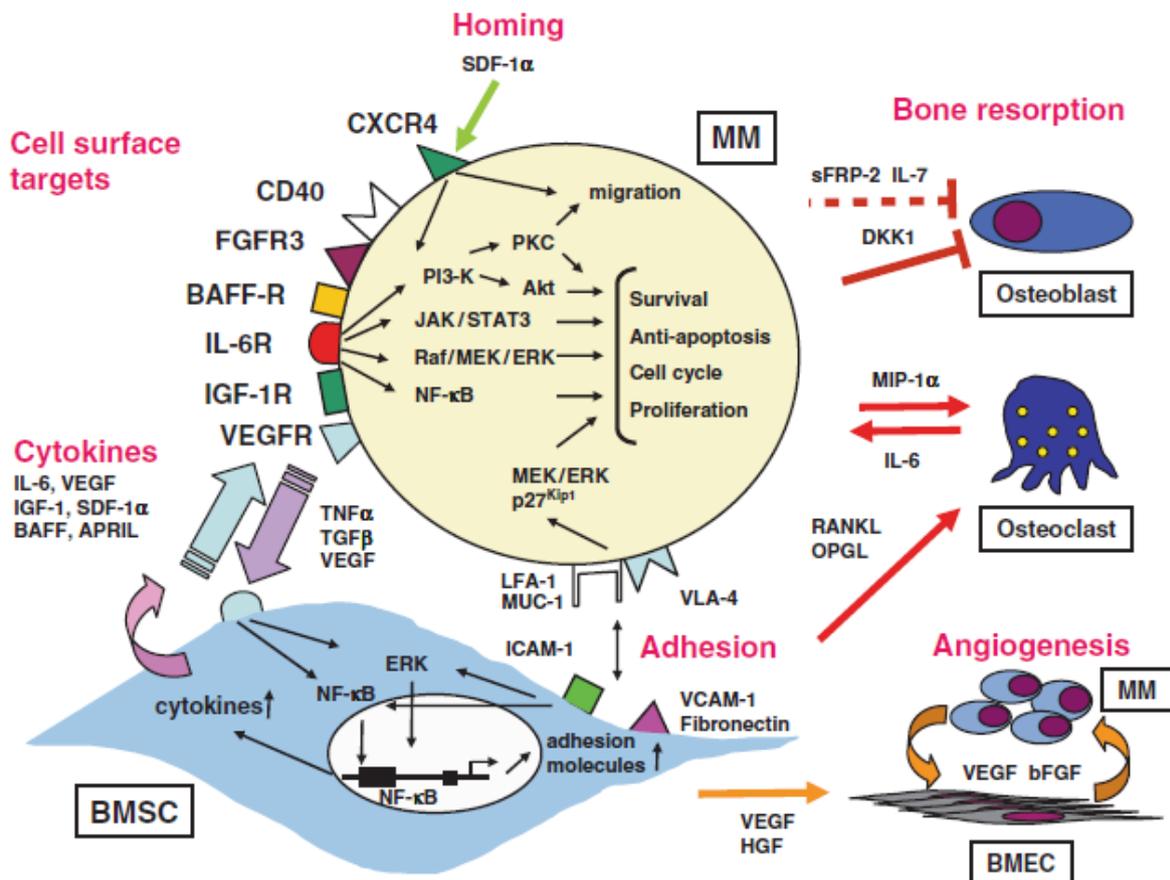


Figure 15 : la relation de MM avec son environnement [228].

II.7. La réponse immunitaire au cours de MM

Les cellules du système immunitaire peuvent occuper un espace important dans le MET de MM, et comme le MM constitue une tumeur des cellules immunitaires, plusieurs études ont prouvé le rôle majeur des interactions immunitaires innées et adaptatives au cours de cette maladie [295].

II.7.1. La réponse immunitaire adaptative au cours du MM

II.7.1.1. Le rôle de LT dans le MM

Plusieurs études ont démontré que les patients à des stades avancés de MM peuvent avoir une distribution élevée des lymphocytes infiltrant de tumeur (TIL) spécialement les sous-ensembles lymphoïdes CD4+ et CD8+ par rapport aux contrôles sains [244]. Récemment, il a été démontré que les LT CD8+ réactives peuvent reconnaître et tuer les cellules tumorales de MM. Un certain nombre d'études ont prouvé le rôle majeur de LT4 dans la réponse anti-tumorale du MM [296.297]. De plus, plusieurs études ont trouvé que les LT qui sont isolés du sang ou de la moelle des patients atteints du MM peuvent facilement effectuer une réponse anti-tumorale *in vitro* en utilisant des cellules dendritiques (DC) chargées d'antigènes tumoraux du MM [298]. D'autres études ont démontré que les LT CD4+ et CD8+ peuvent déclencher une réponse immunitaire dans l'état pré-maligne de MM chez les patients atteints de MGUS [299]. En outre, d'autres populations, telles que les LT $\gamma\delta$, jouent également un rôle important dans la surveillance immunitaire et cytotoxicité anti-tumorale chez la souris atteintes de MM [300].

De plus, il a été démontré que lymphocytes sanguins périphériques des patients atteints du MM peuvent effectuer une activité anti tumorale direct vis à vis certains lignages cellulaires de MM. D'après certaines études, il a été trouvé qu'au cours de l'immunothérapie adoptive anti MM, le transfert des LTs dérivés des donneurs immunocompétents a effectué une activité anti-tumorale chez certains patients qui ont rechuté après la greffe de la MO allogénique [301].

II.7.1.2. Le rôle de LB dans le MM

La diminution de la réponse immunitaire humorale qui est caractérisée par la diminution des cellules B et l'augmentation des cellules pré-B au cours de MM a été fortement décrite par les chercheurs. Plusieurs études ont trouvé que le nombre des lymphocytes B circulants présente

un bon pronostic au cours du MM. Cependant, des études récentes ont indiqué que l'immunité humorale présente un contrôle important dans la réponse immunitaire anti tumorale au cours du MM où il a été démontré que les patients qui ont reçu les perfusions des lymphocytes du donneur peuvent développer des anticorps contre les antigènes exprimés par les MPC [302.303].

II.7.2. La réponse immunitaire inné au cours de MM

Plusieurs études ont démontré que les cellules du système immunitaire inné sont également impliquées fortement dans la réponse anti-tumorale au cours du MM [304].

En raison de leur rôle central dans la présentation de l'antigène, les DC et les macrophages sont largement distribués dans le MET du MM. Les DC ont été recrutés et activés par les chimiokines sécrétées par MPC et impliquées fortement dans les lésions du MM [305]. De plus, des études récentes ont trouvé que les NK peuvent reconnaître les cellules de myélome primaire, et soutenir l'évaluation de réponse immunitaire anti-myélome [306]. Il a été démontré que les cellules NKT chez plusieurs patients au stade avancé du MM, peuvent reconnaître et tuer les cellules de myélome, ainsi qu'ils peuvent s'impliquer fortement dans l'immunothérapie adoptive chez les patients atteints de MM [307].

II.7.3. L'échappement tumoral à la réponse immunitaire au cours du MM

Le MET présente plusieurs obstacles vis à vis l'efficacité des réponses immunitaires anti-tumorales au cours du MM. Il a été démontré qu'il peut produire des quantités élevées de facteurs immunosuppresseurs, y compris TGF β et l'IL10 [254]. Les cellules de MM ont également la capacité d'échapper à la surveillance immunitaire via plusieurs mécanismes, comme la diminution du potentiel cytotoxique des effecteurs du système immunitaire et l'induction du dysfonctionnement des DC [308][309].

II.8. La thérapie du MM

Le traitement du MM a longtemps reposé sur la chromothérapie, la corticothérapie, les agents alkylants, les immuno-modulateurs et les inhibiteurs du protéasome ainsi que l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ACSH) [253].

Bien que le MM est encore une maladie incurable, plusieurs nouvelles cibles moléculaires et stratégies thérapeutiques ont été élaboré récemment pour améliorer le traitement du MM et

prolonger la survie des patients ainsi qu'améliorer leur qualité de vie en évitant la résistance aux médicaments et en diminuant la toxicité [228].

La compréhension des interactions entre le système immunitaire et les cellules malignes du MM a fortement développé la conception clinique afin d'élaborer des protocoles efficaces pour le traitement du MM. Plusieurs approches d'immunothérapie sont actuellement évaluées. Des essais cliniques pour traiter les patients atteints de MM par l'utilisation des cellules immunitaires anti-tumorale ont été mis en évidence récemment par les scientifiques. Plusieurs travaux ont prouvé le rôle majeur des anticorps dans la thérapie du MM [227.228.253].

PARTIE II

EXPERIMENTATIONS

Matériels

et

Méthodes

I.1. Matériels biologiques

I.1.1. Patients

Nous avons procédé au recrutement de notre population d'étude pendant deux ans (2014 et 2015), après consultation autorisée de leurs dossiers aux services d'hémo-oncologie et rhumatologie de trois hôpitaux de l'Est Algérien (Constantine, Batna et Annaba). Notre étude a inclus 3 groupes :

- 40 patients (29 - 87 ans) n'ont pas subi une chimiothérapie et selon les critères cliniques, biochimiques, cytologiques et Radiologiques ont permis de conclure au diagnostic de myélome multiple avec des syndromes osseux : **(Patients MM)**
- 27 patients atteints d'Ostéoporose (OP) (35 - 65 ans) : **(Patients OP)**
Ce groupe a été considéré comme un contrôle positif dans l'étude
- 28 sujets volontaires (27 - 50 ans) semblant être en bonne santé : **(Sujets témoins T-)**
Ce groupe a été considéré comme un contrôle négatif dans l'étude

Le sang des 3 groupes d'études a été collecté sur des tubes secs et héparinés, après centrifugation (15min à 1400 trs/mn). Les sérums et les plasmas ont été aliquotés et congelés à - 80°C jusqu'à utilisation.

Les données épidémiologiques générales des patients MM (recueillies à partir des dossiers) comprennent l'âge, le sexe, la survie, le type d'Acm produit, le pourcentage de la masse tumorale (MPC%) sont pris en considération. **(Annexe)**

Tous les sujets ont signé un consentement clair afin que nous puissions réaliser cette étude en respectant les règles édictées de la déclaration de HELSENKI (août 2004).

I.1.2. Les lignées cellulaires

Afin d'évaluer in vitro le NO produit par les 2 lignées cellulaires, MPC (RPMI 8226) et d'ostéoblaste (MG63), nous proposons un modèle d'un microenvironnement qui renseigne sur les interactions cellulaires entre ces deux types de cellules : « coculture des cellules RPMI 8226 et MG63 » (les RPMI 8226 (ATCC® CCL155™) et les MG-63 (ATCC® CRL-1427™), ont été obtenus du laboratoire Lymphocyte Normal et Pathologique et Cancers .Amiens. France). Ce modèle a été proposé afin d'étudier les mécanismes d'implication de NO dans les MBD.

I.2. Produits et réactifs

Les kits de quantification de (NO) ont été obtenus des sociétés d'Arbor assays et R & D.

L'acide trichloroacétique (TCA), le sulfate de zinc (ZnSO₄), le n-naphthyl-1-éthylènediamine dichlorhydrate et le Sulfamide ont été obtenu de Sigma Aldrich.

Le marqueur de taille des protéines a été obtenu de Cell signaling (7 bandes entre 7et 175 kD ref :7720S)

Les kits de dosage de CRP (C reactif proteine) , protéine totale (PT) , Calcium (Ca⁺²) , phosphate (P) et phosphatase alcaline (PAL) ont été obtenu de Cobas[®] (roche).

Les kits de dosage d'Ig, β2m et les chaines légère libre (CLL) ont été obtenu de binding sites[®].

Les milieux de cultures RPMI 1640 et DMEM, le sérum de veau foetal (SVF), la pénicilline streptomycine, le L-glutamine, le PBS, le bleu de trypan ont été obtenu de Eurobio[®].

Le MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) a été obtenu de Sigma Aldrich.

II .Evaluation de concentration de NO chez les patients MM

Cette étude a été réalisé par deux kits différents : « Arbor assay » et « R&D » dont, la déprotéinisation est une étape nécessaire pour la mesure de monoxyde d'azote car la présence des protéines entraîne une interférence sur la réaction de Griess. Deux méthodes de précipitation (au Zinc et au TCA) ont été testées afin de choisir la meilleure méthode appropriée au dosage de NO.

II.1. Précipitation au (Zn₂SO₄)

6mg de sulfate de zinc ont été ajoutés à 400 µl de plasma (15g / l), le mélange a été vortexé, Centrifugé (10min à 1400 trs/min à 4 C°).

II.2. Précipitation au TCA

Le plasma a été traité avec TCA 20 % (w/v) pendant 30 min dans la glace, le mélange a été centrifugé (15min a 1400 trs/min à 4 C°).

Les deux surnageants ont été récupérés et soumis à une électrophorèse des protéine

II.3.Évaluation et caractérisation de la méthode de précipitation

Une électrophorèse a été effectuée pour tester la présence des protéines dans les deux surnageant. (Gel acrylamide 10%, marqueur de taille entre 7et 175 kD)

II.4.Dosage de NO par le kit R&D

Le kit contient des réactifs nécessaires à la réaction de Griess, Il inclut la nitrate réductase (NR) lyophilisée et son diluant de stockage, le NADH lyophilisé et le diluant concentré de la réaction ainsi que le standard de nitrite et nitrate et le réactif de Griess I et II .

II.4.1.Préparation des réactifs

Pour préparer 300 ml de diluant de la réaction (1X) on ajoute 30 ml de diluant concentré (10X) à l'eau distillée.

La (NR) a été reconstituée avec 1ml de diluant de stockage de NR et diluée immédiatement avant l'utilisation selon l'équation

A:Nitrate Réductase (μ l)= (nombre de puis +2) \times 5 μ l

B:réaction Diluent (1X) (μ l)=volume de A \times 4

Le NADH a été reconstitué avec 5ml de l'eau distillée et placé sur la glace.

II.4.2.Préparation de standard

100 μ l de standard de nitrite et nitrate (2000 μ mol/L) ont été rajouté à 900 μ L de diluant (1X), 500 μ l de diluant ont été mis dans le reste des tubes, 500 μ l de mélange a été transféré entre les tubes pour réaliser une série de dilutions ou (200 μ mol/L) a été identifié comme le standard le plus élevé et le diluant (1X) sert au blanc (0 μ mol/L).

II.4.3.Dosage de Nitrite

50 μ l d'échantillon ou standard de nitrite a été mis sur microplaque, une dilution avec le diluant 1X v/v a été effectué, 50 μ l de Griess I ainsi que 50 μ l de Griess II ont été rajoutés, le mélange a été incubé 10 min à température ambiante, la DO a été lue à λ = 570 nm.

II.4.4.Dosage de Nitrate

50 μ l d'échantillon ou standard de nitrate a été mis sur microplaque, une dilution avec le

diluant 1X v/v a été effectué, 25 μ L de NADH a été rajouté avec 25 μ l de NR diluée au puits et le mélange a été incubé 37 minute a 37 C°, 50 μ l de Griess I ainsi que 50 μ l de Griess II ont été rajoutés, le mélange a été incubé 10 min à la température ambiante et la DO a été lue à $\lambda = 570$ nm.

II.5.Dosage de NO par le kit Arbor assays

Le kit contient des réactifs pour réaliser la réaction de Griess , il inclut la solution de nitrate réductase et son enzyme de stabilisation, la solution concentrée de NADH et un tampon de kit ainsi que le standard de nitrite et nitrate et le réactif de Griess A et B.

II.5.1.Préparation des réactifs

550 μ l de l'enzyme de stabilisation ont été rajoutés à la solution de NR, le mélange a été vortexé et dilué avec le tampon de kit v/3v.

Le NADH concentré a été dilué avec le tampon de Kit v/v

II.5.2.Préparation de standard

40 μ l de standard de nitrite et nitrate (2000 μ mol/L) ont été rajoutés à 360 μ L de tampon de kit, 200 μ l de diluant ont été mis dans le reste des tubes, 200 μ l de mélange ont été transférés entre les tubes pour réaliser une série de dilution ou (200 μ mol/L) a été identifié comme le standard le plus élevé et le diluant (1X) sert au blanc (0 μ mol/L).

II.5.3.Le dosage de nitrite

50 μ l de standard de nitrite et 12.5 μ l d'échantillon ont été et mis à la microplaque, une dilution avec le tampon de kit v/4v a été effectué, 25 μ l de Griess A ainsi que 25 μ l de Griess B ont été rajoutés, le mélange a été incubé 5 min à température ambiante. La DO a été lu $\lambda = 570$ nm.

II.5.4.Le dosage de nitrate

50 μ l de standard de nitrate et 12.5 μ l d'échantillon ont été et mis à la microplaque, une dilution avec le tampon de kit v/4v a été effectuée, 10 μ L de NADH a été rajouté avec 10 μ l de NR diluée au puits et le mélange a été incubé 20 min à température ambiante ,25 μ l de Griess A , ainsi que 25 μ l de Griess B ont été rajoutés, le mélange a été incubé 5 min à température ambiante la DO a été lue à $\lambda = 570$ nm.

La somme de nitrate et nitrite (NO_x = nitrate + nitrite) est l'indicateur de NO dans le plasma. La concentration de NO_x [NO_x] = la concentration de NO [NO] = la concentration de nitrite + concentration de nitrate

III. Evaluation des marqueurs inflammatoires chez MM

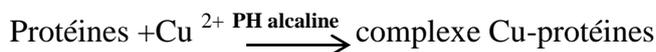
Dosage de protéine réactif C(CRP)

La CRP plasmatique a été mesurée par une méthode immunoturbidimétrique. Les particules de la CRP humaine s'agglutinent avec les particules de latex recouvertes d'anticorps anti-CRP. Le précipité est mesuré par turbidimétrie à $\lambda = 552\text{nm}$. Les valeurs de CRP ont été obtenues avec l'analyseur COBAS INTEGRA 400 plus (Roche) au sein de CHU Dr BENBADIS Constantine, en utilisant le Kit (CRPLX COBAS[®] ref : 20764930 322).

IV. Evaluation des marqueurs de pronostic chez les patients MM.

II.1. Dosage de protéines totales

Les protéines totales ont été dosées par la méthode colorimétrique de Biuret. Les ions cuivriques réagissent en solution alcaline avec les liaisons peptidiques des protéines en formant un complexe violet. L'intensité de couleur est directement proportionnelle à la concentration des protéines et a été déterminée à $\lambda = 552\text{ nm}$.



Les valeurs de protéines totales ont été mesurées avec l'analyseur COBAS INTEGRA 400 plus (Roche) au sein du Centre Hospitalier Universitaire Dr BENBADIS Constantine, en utilisant le kit (TP2 COBASR ref : 03183734 190).

II.2. Dosage des Igs dans le plasma des patients MM

La concentration des Acms a été mesurée par une électrophorèse capillaire, une technique quantitative et automatisée qui permet la séparation des particules chargées, en utilisant des capillaires de verre ouverts pour séparer les molécules de tailles très variables. La concentration des Acms a été obtenue avec l'automate (SPA.PLUS) en utilisant le kit de (FreeliteTM de Binding Site[®]) au sein de laboratoire d'immunologie Beni Messous .Alger .

II.3.Dosage de β_2m dans le plasma des patients MM

La β_2m a été mesuré par la méthode immuno-néphélométrique en utilisant des particules de polystyrène recouvertes d'anticorps anti- β_2m humaine spécifiques qui s'agglutinent avec les molécules de β_2m . L'intensité de la lumière dispersée par le système est proportionnelle à la concentration de la de β_2m de l'échantillon. Les valeurs de β_2m ont été obtenues avec l'analyseur Hitachi Cobas 6000 en utilisant le kit (LK043.L.OPT (.A) de Binding Site®) au sein de laboratoire d'immunologie Centre Hospitalier Laennec Creil. France.

II.4.Dosage des CLL κ/λ dans le plasma des patients MM

Les CLL a été mesuré par la méthode immuno-néphélométrique se basant sur des anticorps polyclonaux sur des particules de latex réagit uniquement à des épitopes exposés de CLL, qui sont masqués si la chaîne légère est associée à la chaîne lourde. les valeurs de CLL ont été obtenues avec l'analyseur (BN ProSpec) en utilisant le kit (Freelite™ de Binding Site®) au sein de laboratoire d'immunologie Centre Hospitalier Laennec Creil .France.

V. Evaluation de statut immunitaire des patients MM

V.1.Evaluation des cellules immunitaires systémiques chez les patients MM

Le nombre des cellules immunitaires dans le sang des patients MM a été mesuré par FNS (formule numérique sanguine) dans le laboratoire d'hématologie des trois hôpitaux le jour de prélèvement.

V.2.Evaluation de pourcentage des cellules immunitaires infiltrant la tumeur chez les patients MM

Le pourcentage des cellules immunitaires infiltrant la tumeur a été évalué à partir de myélogramme étudié par les hématologues des trois hôpitaux.

VI. Evaluation des marqueurs de remodelage osseux chez les patients MM

Le dosage des marqueurs biochimiques de remodelage osseux a été effectué avec l'analyseur multiparamétrique COBAS INTEGRA 400 plus (Roche) au sein de Centre Hospitalier Universitaire Dr BENBADIS Constantine. Les principes des méthodes analytiques et les kits utilisés sont regroupés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : les méthodes de dosage des paramètres biochimique de remodelage osseux.

Les paramètres	Principe des méthodes analytiques	Référence des kits
Le Calcium	<p>Une méthode colorimétrique repose sur la réaction des ions de calcium avec le 5–nitro-5’-méthyl-BAPTA (NM-BAPTA) dans un milieu alcalin, en formant ainsi un complexe coloré avec l’EDTA.</p> $\text{Ca}^{2+} + \text{NM-BAPTA} \xrightarrow{\text{pH alcaline}} \text{complexe calcium -NM-BAPTA} + \text{EDTA} \xrightarrow{\text{pH alcaline}} \text{NM-BAPTA} + \text{complexe Calcium - EDTA}$ <p>L’intensité de la coloration de complexe développée est directement proportionnelle à la concentration en calcium et mesurée par photométrie.</p>	(CA2 COBASR reff : 05061482 190)
Le phosphate	<p>Une méthode colorimétrique repose sur la réaction de phosphate inorganique avec le molybdate d’ammonium en formant du phosphomolybdate $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{M}_6\text{O}_3)_{12}]$ en présence d’acide sulfurique.</p> $\text{Phosphate d'ammonium} + \text{molybdate} \xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4} \text{ammonium phosphomolybdate}$ <p>La concentration de phosphate inorganique est déterminée à une longueur d’onde de $\lambda = 340 \text{ nm}$.</p>	(PHOS2 COBASR reff : 03183793 122)
Le PAL (phosphatase Alkaline)	<p>Une méthode colorimétrique repose sur l’hydrolyse de p-nitrophénylphosphate en présence d’ions Mg^{2+} et Zn^{2+} par les phosphatases alcalines en phosphates et p-nitrophénol .</p> $\text{p-nitrophénylphosphate} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{PAL}} \text{Phosphate} + \text{p-nitrophénol}$ <p>l’activité de PAL est déterminée à une longueur d’onde de $\lambda = 409 \text{ nm}$.</p>	(ALP2S COBASR reff : 03333752 190)

VI. Effet de NO produit dans le microenvironnement tumoral MM (coculture cellulaire des MPC « lignée cellulaire de RPMI 8226 » et ostéoblastes « lignée cellulaire de Mg 63 »)

VI.1. La culture simple des cellules de RPMI 8226 et MG63

Les deux lignées MG63 et RPMI 8226 ont été cultivées respectivement dans un milieu RPMI, DMEM complet et incubé jusqu'à 80% de l'état de confluence dans un incubateur (37C°, Pi CO2: 5%).

à 80% de confluence des cellules de Mg 63, le milieu de culture a été jeté et les cellules ont été lavées par 5ml de PBS, ensuite 2.5ml de trypsine (5%) a été rajouté au flasque et incubé pendant 5min. 5 ml de milieu de culture a été rajouté et le mélange a été centrifugé 5min à 1500 trs/mn, le surnageant a été retiré et les cellules ont été solubilisées dans 2ml de milieu DMEM.

à 80% de confluence des cellules de RPMI 8226, le mélange a été centrifugé 5min à 1500 trs/mn, le surnageant a été retiré et les cellules ont été solubilisées dans 2ml de milieu RPMI et un test de viabilité a été effectué (le test de viabilité de bleu de trypan où les cellules mortes absorbent le colorant et apparaissent bleues)

Après comptage, un volume contenant un nombre important des cellules par flasque a été récupéré, un nombre décroissant des cellules de MG63 et RPMI 8226 ont été mis en culture dans une plaque de 24 puits (**tableau 2**) pendant 24h, 48h et 72h.

VI.2. La co-culture des cellules de RPMI 8226 et MG63

La co-culture cellulaire a été effectuée selon le protocole de (**Claire M et al 2003**) [310]. Le protocole a été modifié selon les buts de notre étude

VI.3. La co-culture des cellules de RPMI 8226 et avec un nombre décroissant des MG63

Un nombre croissant des cellules de MG63 ont été mis en culture dans une plaque de 24 puits (**tableau 2**) pendant 12h (le temps de l'adhérence des cellules), ensuite deux lavages avec le PBS et le milieu RPMI1640 ont été effectués respectivement. Un nombre fixe des cellules de RPMI 8226 a été rajouté dans chaque puits des plaques selon le (**tableau 2**).

VI.4.La co-culture des cellules de MG63 avec un nombre décroissant des RPMI 8226

Un nombre fixe des cellules de MG63 ont été mis en culture dans une plaque de 24 puits (**tableau 2**) pendant 12h (le temps de l'adhérence des cellules), ensuite deux lavages avec le PBS et le milieu RPMI1640 ont été effectués respectivement. Un nombre décroissant des cellules de RPMI 8226 a été rajouté dans chaque puits des plaques selon le (**tableau 2**) pendant 24h, 48h et 72h.

Tableau 2 : plaque culture simple et co-culture cellulaire (RPMI 8226 et MG63).

0 cellule+500µl MDEM)	10 ⁷ cellules MG63+500µl MDEM	10 ⁶ cellules MG63+ 500 µl MDEM	10 ⁵ cellules MG63+ 500 µl MDEM	10 ⁴ cellules MG63+ 500 µl MDEM	10 ³ cellules MG63+ 500 µl MDEM
0 cellule+500µl RPMI	10 ⁷ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁶ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI	10 ⁵ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI	10 ³ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI
10 ² cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁷ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁶ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI	10 ⁵ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI8226 + 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI 8226 + 500 µl RPMI	10 ³ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI
10 ⁴ cellules MG63+10 ⁷ RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ⁶ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ⁵ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ⁴ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ³ cellules RPMI8226+ 500 µl RPMI	10 ⁴ cellules MG63+10 ² RPMI8226 + 500 µl RPMI

VI.5.Etude de viabilité des cellules RPMI 8226 et MG63 par le test MTT

Principe : la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes transforme le MTT en cristaux bleus de formazan. Ces cristaux sont dissous par du Diméthylsulfoxyde (DMSO), la DO a été déterminé à $\lambda = 560$ nm. 5mg de MTT en poudre a été ajouté dans 1ml de PBS afin de préparer la solution mère de MTT qui a été filtrée à 0.22 µm et conservée à 4°C et à l'obscurité 2 semaines maximum.

Après la culture cellulaire des trois plaques pendant 24h ,48h, 72h, 25 µl de solution mère de MTT ont été rajoutées sur les cellules, agitées et incubées pendant 1heure. En suite 250µl

d'une solution de DMSO et Isopropanol (V/V) ont été distribuées sur les puits, pour la dissolution des cristaux violets, une agitation jusqu'à l'homogénéisation de la coloration (environ 5min) a été effectué. La DO a été déterminé à $\lambda= 560$ nm.

Le pourcentage de la viabilité cellulaire a été calculé en utilisant la formule suivante (Patel et al, 2009):

$$\% \text{ de prolifération cellulaire} = (A_t - A_c) \times 100$$

A_t : la valeur d'absorbance de cellule

A_c : la valeur d'absorbance de blanc milieu seul

VI.5.1. Viabilité des cellules RPMI 8226

Après la culture des plaques pendant 24h, 48h et 72h, les cellules en suspension (les cellules de RPMI 8226) ont été récupérées et transférées dans une plaque de 96 puits, ensuite 10 μ l de solution mère de MTT ont été rajoutées sur les cellules, agitées et incubées pendant 1heure. Ensuite 200 μ l d'une solution de DMSO et Isopropanol (V/V) ont été distribué par puits, pour la dissolution des cristaux violets, une agitation jusqu'à l'homogénéisation de la coloration (environ 5min) a été effectué. La DO a été déterminé à $\lambda= 560$ nm.

VI.5.2. Viabilité des cellules MG63

Le reste des cellules adhérent sur la plaque (les cellules de MG63) a été traité avec 25 μ l de solution mère de MTT, après une agitation et incubation pendant 1heure. 250 μ l d'une solution de DMSO et Isopropanol (V/V) ont été distribuées par puits, pour la dissolution des cristaux violets et une agitation jusqu'à l'homogénéisation de la coloration (environ 5min) a été effectué. La DO a été déterminé à $\lambda= 560$ nm.

VI.5.3. Dosage de NO

La concentration de NO est directement proportionnelle à la concentration de nitrite qui a été mesurée par la méthode de Griess dans le surnageant récupéré de chaque puits de la plaque de co-culture de 24 puits qui ont été cultivées pendant 24h, 48h et 72h.

Résultats

et

Discussions

Résultats

I.1. La distribution de genre chez les patients MM

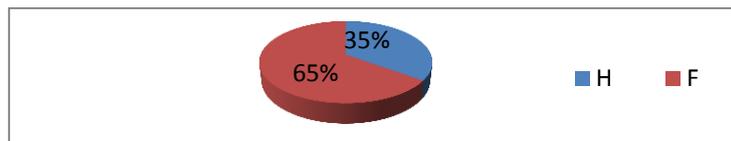


Fig 1 : La distribution de genre chez les patients MM

Les résultats de **la Fig 1** rapportent que les femmes sont les plus touchées (65%) par le MM que les hommes (35%).

I.2. La distribution d'âge des patients MM

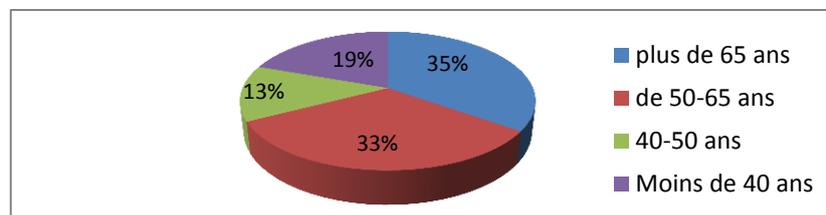


Fig 2 : La distribution d'âge chez les patients MM

La **Fig 2** montre que les patients entre **50 à 65ans** et **plus de 65 ans** et **représentent respectivement une fréquence très importante (33%,35%)**, comparativement aux tranches d'âge **40 à 50ans** et **moins de 40 ans (13%,19%)**. La moyenne d'âge des patients a été **59 ans** avec extrêmes de **(29 ans - 85 ans)**.

I.3. La fréquence des types d'Acm produites par les patients MM

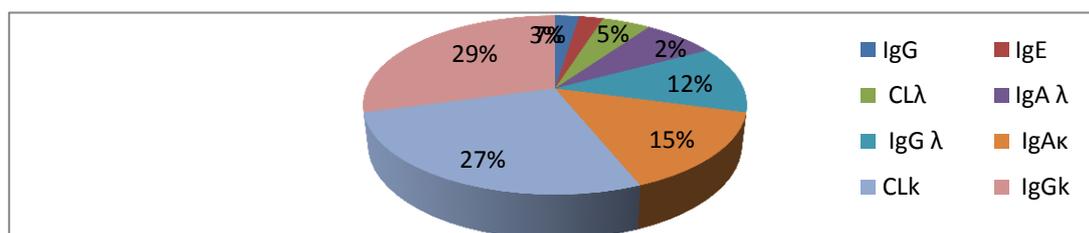


Fig 3 : Fréquence des types d'Acm produites par les patients MM

La **Fig 3** montre que le **MM à IgG κ**, à **CLL κ** et à **IgA κ** représentent **une fréquence très importante (29%,27%,15%)**, comparativement aux **MM à IgG λ**, à **CLL λ** et à **IgA λ** qui sont moins fréquents (**12%,5%,12%**).

Les **MM à IgE** et à **IgD** représentent les types les **plus rares (2%, 2%)**.

I.4. la fréquence de la survie des patients MM après confirmation de la maladie

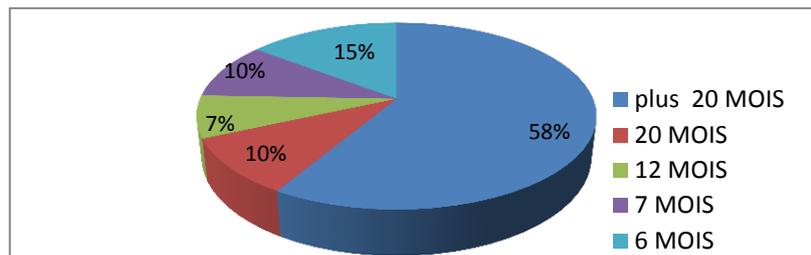


Fig 4 : Fréquence de la survie des patients MM

La **Fig 4** montre que les patients de survie **plus de 20 ans** représentent **une fréquence très importante (58%)**, comparativement aux **MM** avec une survie de **20 mois ,18 mois, 11mois, 7 mois** qui sont moins fréquent (**15%, 10%, 10%,7%**).

I.5. fréquence de la masse tumorale (MPC%) chez les patients MM

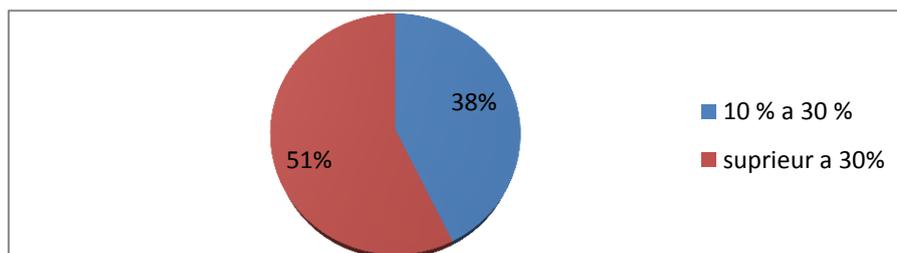


Fig 5 : Fréquence de MPC% chez les patients MM

La **Fig 5** montre que les patients avec une masse tumorale **supérieure à 30 %** représentent **une fréquence très importante (51 %)**, comparativement aux **MM** avec une masse tumorale de **(10 % à 30%)** qui représentent **(38%,)**.

Un **MPC %** anormal (**>10 %**) a été observé chez **98%** des patients **MM**. La moyenne de **MPC%** a été **35 %** avec extrêmes de **(2%- 83%)**

L'analyse épidémiologique a confirmé la variété des critères cliniques et cytologiques des patients **MM** recruté dans cette étude , ce qui pourrait être expliqué par le caractère multidisciplinaire et la complexité de la biologie tumorale de ce cancer .

II.1. Caractérisation des méthodes de précipitation des protéines dans le plasma

Deux méthodes de précipitation des protéines ont été comparées par une électrophorèse des protéines afin de choisir la meilleure méthode pour une précipitation optimale des protéines dans le plasma.

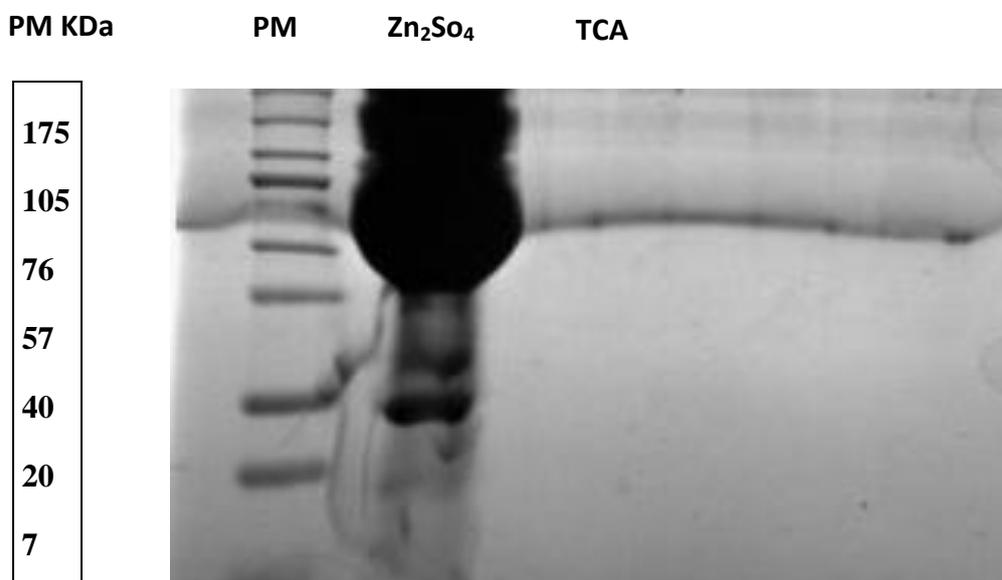


Fig 6 : La migration d'électrophorèse des protéines du surnageant traité par le TCA et le Zn₂so₄. **PM** (marqueur de taille), **TCA**: surnageant traité avec du TCA. **Zn₂so₄**: surnageant traité avec Zn₂so₄

La **Fig 6** montre une meilleure précipitation des protéines au niveau des surnageants traités avec le TCA, cette méthode a été retenue pour les deux kits.

II.2. Comparaison entre [NOx] dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D

Afin d'étudier les taux fiables du NO, nous avons procédé à doser la concentration de NOx (Nitrite + Nitrate) [NOx] chez les trois groupes (patients MM, OP « population de contrôle positif » et « contrôle négatif ») en utilisant deux kits commerciaux Arbor assays et R&D.

[NOx] dosé avec les deux kits a été comparé.

II.2.1. La [NOx] dosé avec le kit Arbor assays ([NOx] ARB)

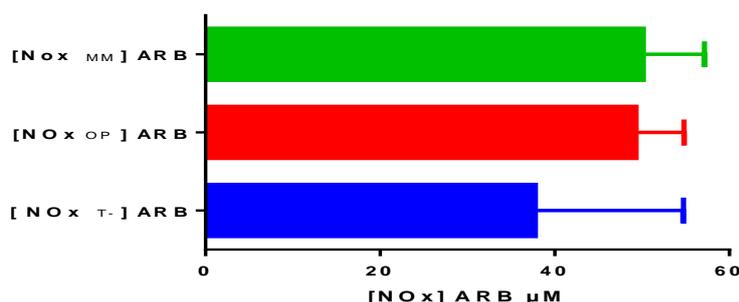


Fig 7 : Evaluation de ([NOx] ARB) chez les trois groupes

En utilisant le kit Arbor assays, la Fig 7 montre que [NOx] ARB chez les patients MM ($50,17 \mu\text{M} \pm 6,98 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients OP ($49,32 \mu\text{M} \pm 5,39 \mu\text{M}$) et des T- ($37,77 \mu\text{M} \pm 16,97 \mu\text{M}$). Le test de comparaison ANOVA montre **une différence significative** entre [NOx] ARB a des patients MM et des patients OP ($P= 0,0024$). Une différence **très hautement significative** a été observée entre [NOx] ARB chez les patients MM ($P < 0,0001$) et les sujets T-, entre les patients OP ($P=0,0002$) et les sujets T-.

II.2.2. La [NOx] dosé avec le kit R&D ([NOx] R&D)

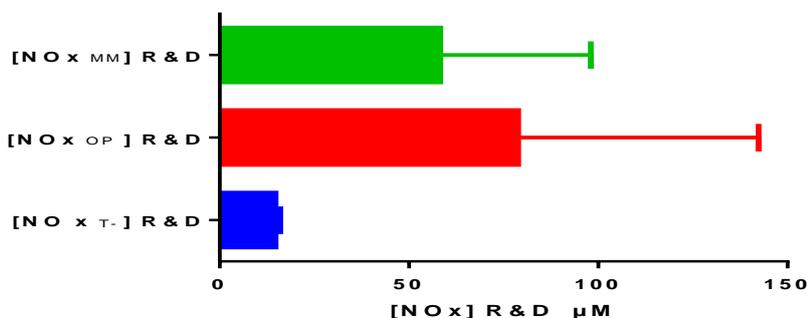


Fig 8 : Evaluation de ([NOx] R&D) chez les trois groupes

En utilisant le kit R&D, la Fig 8 montre que [NOx] R&D chez les patients MM ($58,26 \mu\text{M} \pm 39,75 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des sujets T- ($31,24 \mu\text{M} \pm 2,65 \mu\text{M}$). [NOx] R&D chez les patients OP ($78,85 \mu\text{M} \pm 62,18 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients MM et des sujets T- ($31,24 \mu\text{M} \pm 2,65 \mu\text{M}$). Le test de comparaison ANOVA montre **une différence significative** entre [NOx] R&D chez les patients MM et les patients OP ($P=0,0500$) et une différence **très hautement significative** a été remarqué entre [NOx] R&D chez les patients MM et les sujets T- ($P < 0,0001$), entre les patients OP et les sujets T- ($P < 0,0001$).

II.2.3. Etude de similarité et corrélation entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB)

Dans le but d'évaluer la concentration fiable de NO dosée avec les des deux kits Arbor assays et R&D, nous avons étudié la similarité et la corrélation entre [NOx] chez les trois groupes : les patients MM, les patients OP et les sujets T-.

II.2.3.1. Etude de similarité de ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB)

L'étude de ressemblance de [NOx] dosé par les deux kits selon le test de student montre **une différence importante entre les deux kits** chez les sujets T- (**0.01 % de similarité** , $t=2,0085$, $p < 0,0001$) , chez les patients OP (**2.95 % de similarité**, $t=1,248606$ - , $p=0,029514$) et les patients MM (**21.56 % de similarité** , $t=1,24860$ - , $p=0,012897$).

Tableau 12 : Evaluation de similarité entre ([NOx] R&D) et ([NOx] ARB),chez les trois groupes .

Concentration de NOx ([NOx])			
	Population des T-	Population des patients OP	Population des patients MM
Pourcentage de ressemblance de deux kits selon le test de student	0.01 % t=2,0086 p < 0,0001	2.95 % t=1,248606- p=0,029514	21.56 %. t=1,248606- p=0,012897

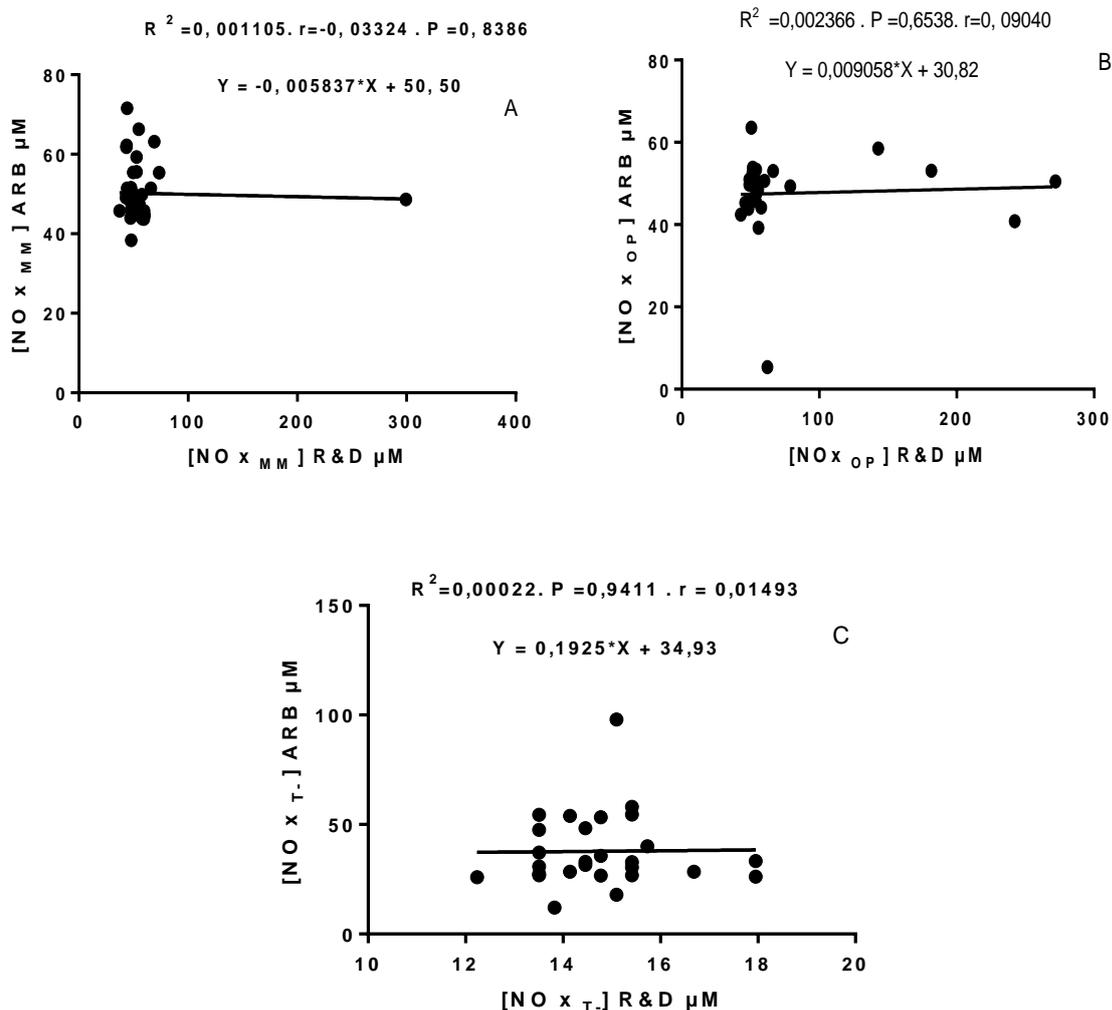
I1.2.3.2. Etude de corrélation entre ([NO_x] R&D) et ([NO_x] ARB)

Fig 9 : corrélation entre ([NO_x] R&D) et ([NO_x] ARB) Chez les trois groupes

La **Fig 9** montre **une absence de corrélation** entre l'effet des deux kits Arbor Assays et R&D sur [NO_x] dosé chez les trois groupes. Les résultats montrent une corrélation très faible chez les patients OP B (**0.23%**, $r = 0.09040$, $P = 0.6538$) et les sujets T- C (**0.022%**, $r = 0.01493$, $P = 0.9411$), Chez les patients MM, une corrélation très faible et négative A (**0.1%**, $r = -0.03$, $P = 0.83$) a été remarqué.

I1.2.4. Etude de la moyenne de concentration de NOx [NOx M] dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D

En prenant compte les résultats de similarité et corrélation entre les deux kits Arbor assays et R&D. Nous avons calculé la moyenne de concentration de [NOx M] dosé avec les deux kits, chez les trois groupes :

$$[\text{NOx M}] = [\text{NO}] = [\text{NOx ARB} + \text{NOx R\&D}] / 2$$

La moyenne de concentration de NOx [NO] chez les trois groupes a été comparée.

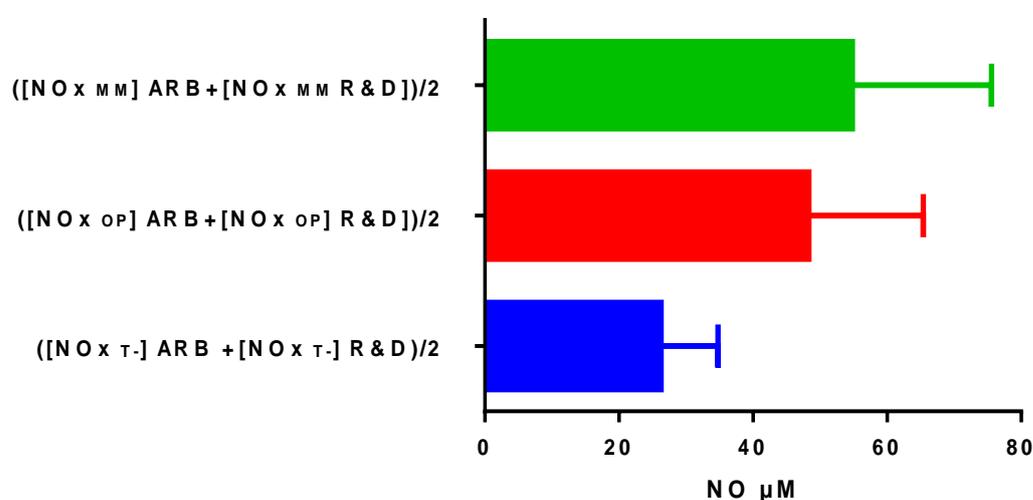


Fig 10 : Evaluation de [NO] chez les trois groupes

Les résultats illustrés dans la **Fig 10** montrent que [NO] dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D chez les patients MM (**54,20 μM ± 19,81μM**) est supérieure à celle des patients OP (**48,33 μM ± 16,71 μM**) et des sujets T- (**26,27 μM ± 8,36 μM**).

Le test de comparaison ANOVA montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM et OP (**P=0,7473**) et une **différence très hautement significative** a été remarquée entre les patients MM (**P < 0,0001**) et les sujets T-, entre les patients OP et les sujets T- (**P < 0,0001**).

III.1. Étude de l'état inflammatoire

Afin d'évaluer l'état inflammatoire chez les patients MM, nous avons procédé à déterminer le taux du marqueur majeur de l'inflammation le (hi CRP) chez les trois groupes (Fig 11). La corrélation entre [NO] et la concentration de CRP [CRP] chez les trois groupes (Fig 12) a été considérée.

III.1.1. Etude de la[CRP]

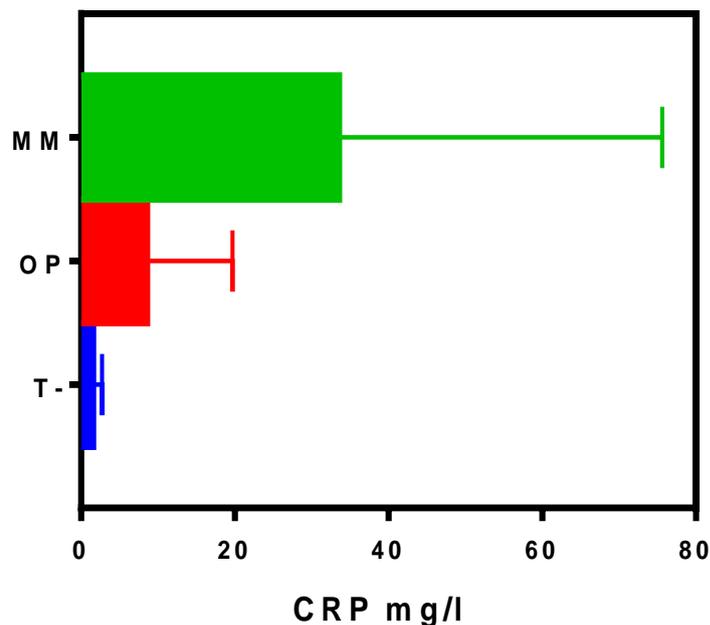


Fig 11 : Évaluation de taux de CRP chez les trois groupes

Les résultats illustrés dans la Fig 11 montrent que [CRP] chez les patients MM ($33,587 \text{ mg/l} \pm 41,50 \text{ mg/l}$) est supérieure à celle des patients OP ($8,58 \text{ mg/l} \pm 16,71 \text{ mg/l}$) et des sujets T- ($8,58 \text{ mg/l} \pm 10,96 \text{ mg/l}$).

Le test de comparaison ANOVA montre **une différence très hautement significative** entre [CRP] chez les patients MM et les patients OP ($P < 0,0001$), entre les patients MM et les sujets T- ($P < 0,0001$) et entre les patients OP et les sujets T-.

III.1.2. corrélation entre [NO] et [CRP]

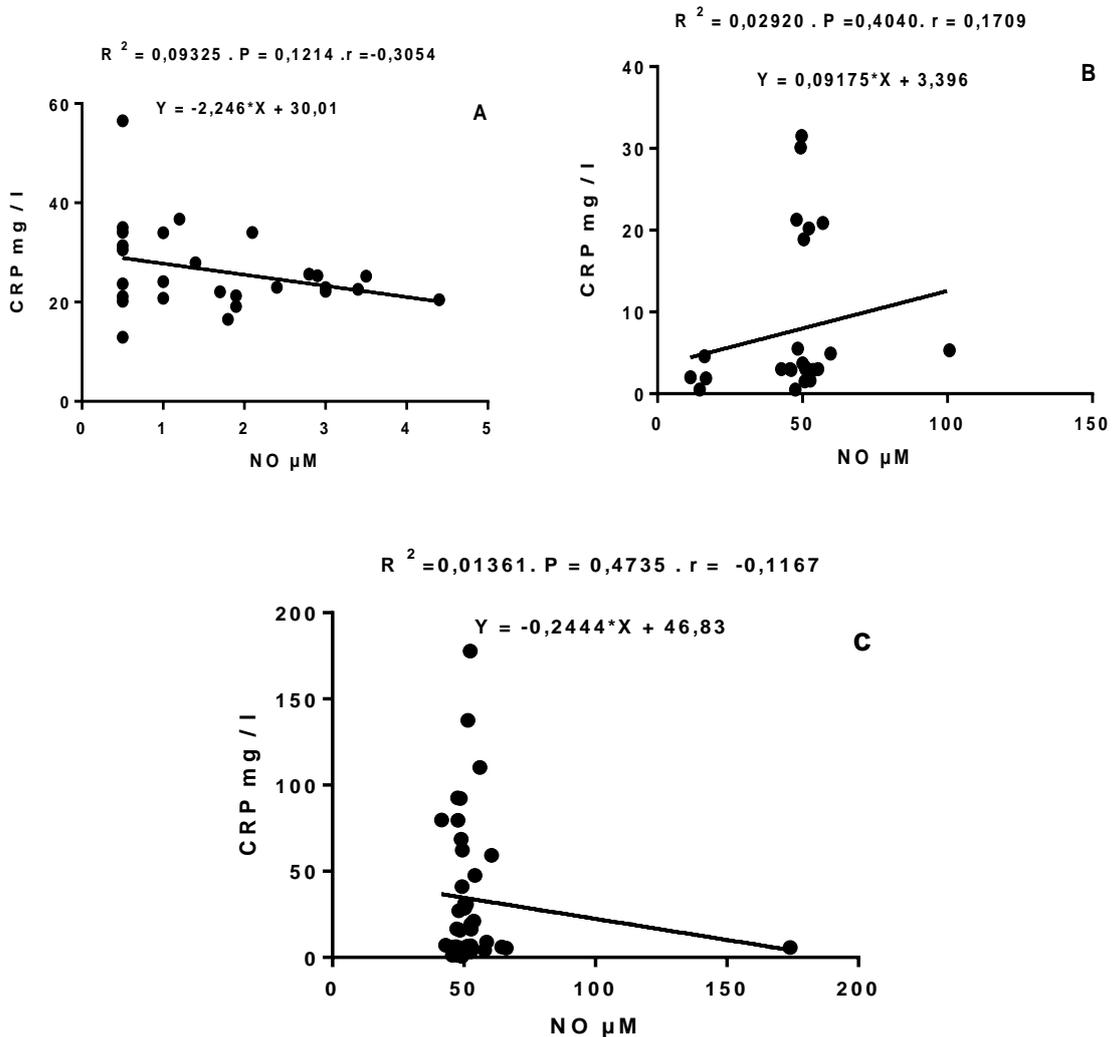


Fig 12 : Corrélation entre [NO] et [CRP] chez les trois groupes. **A :** chez les sujets T-, **B :** chez les patients OP. **C :** chez les patients MM.

Les résultats illustrés dans la **Fig 12** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et [CRP] dosées chez les trois groupes. Les résultats montrent une corrélation très faible et négative chez les patients MM **C (1.96%, $r = -0.1401$, $P = 0.4082$)** et les sujets T- **A (9.32%, $r = -0.3054$, $P = 0.9411$)**. Chez les patients OP, une corrélation très faible **B (2.92% $r = 0.1709$, $P = 0.4040$)** a été remarquée.

III.2. Le NO et les marqueurs de pronostic des patients MM

Afin d'évaluer le rôle de NO chez les patients MM et son éventuelle corrélation avec les marqueurs de pronostic de MM, nous avons procédé à étudier la corrélation entre la [NO] et certains marqueurs de pronostic incluant : le genre (**Fig13**), l'âge (**Fig 14**), la survie des patients (**Fig 15**), le type d'Acm produit (**Fig 16**), (MPC%) (**Fig 17**), la concentration de $\beta 2m$ [$\beta 2m$] (**Fig 18**), la concentration des Acm [Acm] (**Fig19**), la concentration de $CLL\kappa$ [$CLL\kappa$] (**Fig 20**), la concentration de $CLL\lambda$ [$CLL\lambda$] (**Fig 21**) le rapport κ/λ R κ/λ) (**Fig 21**).

III.2.1. La [NO] et le genre des patients MM

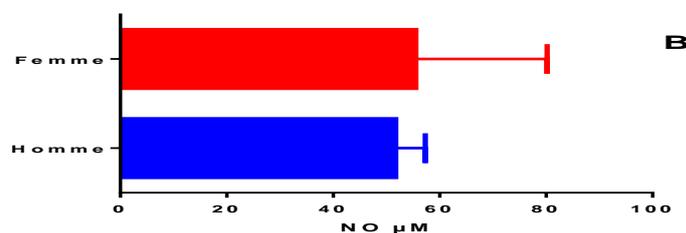


Fig 13 : La [NO] selon le genre des patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 13** montrent que [NO] chez les femmes ($55,54 \mu M \pm 24,15 \mu M$) est supérieure à celle des hommes ($51,73 \mu M \pm 5,37 \mu M$).

Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les deux sexes (**58,68% de similarité**, $t=-0,5484$, $p=0,5868$).

III.2.2. la [NO] et l'âge des patients MM

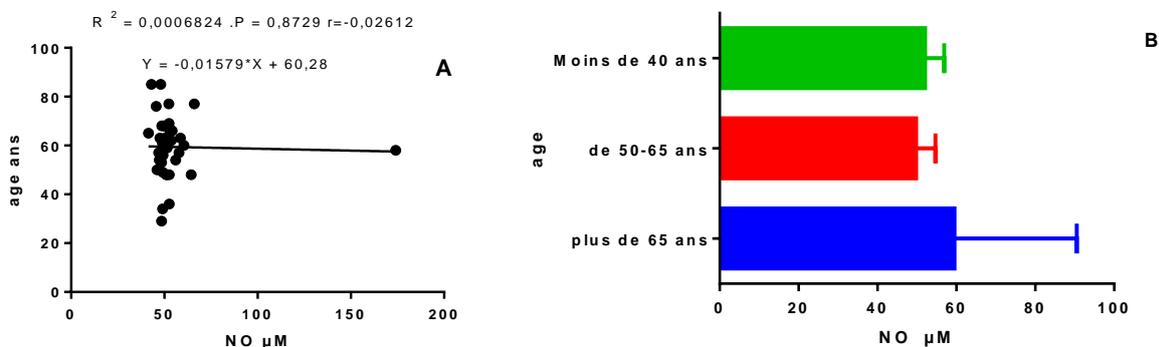


Fig 14 : **A** : Corrélation entre [NO] et l'âge. **B** : La [NO] selon l'âge

Chez les patients MM, la **Fig 14A** montre **une absence de corrélation** entre [NO] et l'âge. Cependant, une corrélation très faible et négative **A** (**0.068%**, $r= - 0.02612$,

$P= 0.8729$) a été remarquée. La **Fig 14B** montre que [NO] chez les patients MM **plus de 65 ans** ($59,54 \mu\text{M} \pm 29,99 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients **moins de 65 ans** ($50,65 \mu\text{M} \pm 4,79 \mu\text{M}$), tandis que [NO] chez les patients MM **moins de 40 ans** ($52,09745389 \mu\text{M} \pm 4,555272085 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients **de 50 à 65 ans**, ($49,78131523 \mu\text{M} \pm 4,730717084 \mu\text{M}$). Le test de comparaison ANOVA montre **une différence très hautement significative** entre [NO] chez les patients MM d'âge **plus de 65 ans** et **moins de 40 ans** ($P < 0,0001$). Cependant, **une absence de différence significative** a été remarquée entre [NO] chez les patients **moins de 40 ans** et de **50 à 65 ans** ($p= 0,4384$) ainsi qu'entre les patients de **plus de 65 ans** et de **50 à 65 ans** ($P =0,3853$).

III.2.3. La [NO] et le type d'Acm produits chez les patients MM

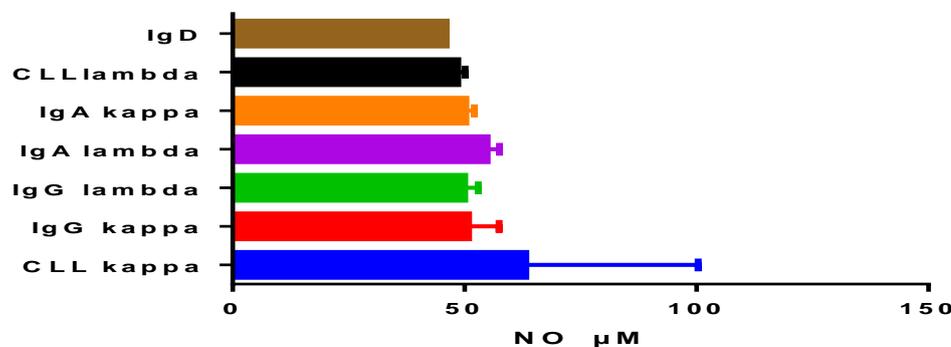


Fig 15 :La [NO] selon le type d'Acm produit par les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 15** montrent que [NO] chez les patients MM à **CLL κ** ($64,4812687 \mu\text{M} \pm 36,9279452 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients à **IgA λ** ($54,8578417 \mu\text{M} \pm 2,16338693 \mu\text{M}$), à **IgG κ** ($50,9132678 \mu\text{M} \pm 6,27733224 \mu\text{M}$), à **IgA κ** ($50,316427 \mu\text{M} \pm 1,618854143 \mu\text{M}$), à **IgG λ** ($50,0425474 \mu\text{M} \pm 2,64267189 \mu\text{M}$), à **CLL λ** ($48,57555325 \mu\text{M} \pm 1,08415925 \mu\text{M}$) et MM à **IgE** et à **IgD** ($46,0034485 \mu\text{M}$). Le test de comparaison ANOVA montre **une absence de différence significative** entre la [NO] chez la plupart des types des patients MM. **Une absence de différence significative** a été remarqué entre [NO] chez les patients MM à **IgA λ** et à **IgG λ** ($P = 4.135$), entre les patients à **IgG λ** et à **CLL λ** ($P= 0,7596$), entre les patients à **IgA λ** et à **CLL λ** ($P =0,3853$), entre les patients à **IgG κ** et à **IgA κ** ($P = 0,3741$), entre les patients à **CLL κ** et à **IgA κ** ($0,4127$). **Une différence très hautement significative** a été également remarquée entre [NO] chez les patients MM à **CLL κ** et à **IgA κ** ($< 0,0001$).

III.2.4. La [NO] et la survie des patients MM

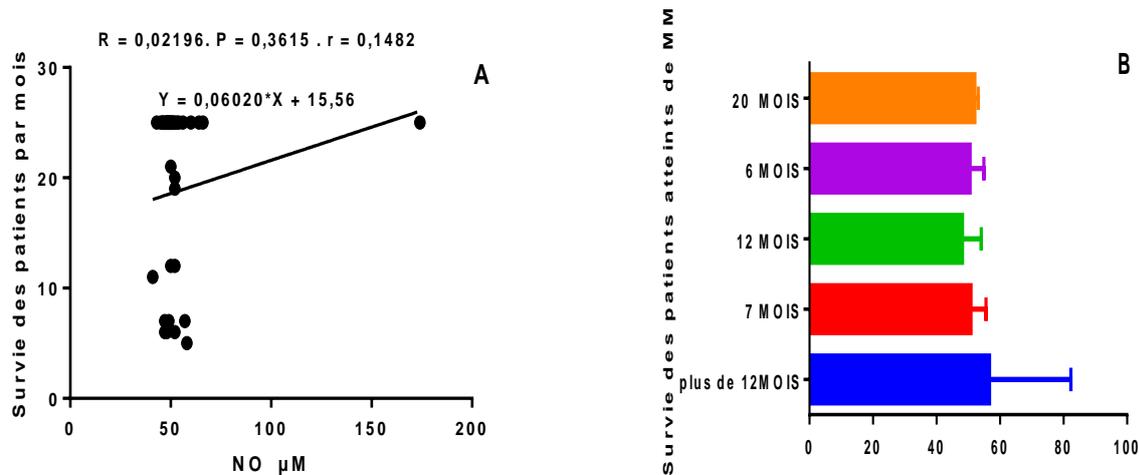


Fig 16 : A : Corrélation entre [NO] et la survie des patients MM. **B :** la [NO] selon la survie des patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 16A** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et la survie des patients MM. Une corrélation très faible a été observée **A (2.19%, $r = 0.1482$, $P = 0.3615$)**. La **Fig 16B** montre que [NO] chez les patients MM avec une survie **plus de 20 ans (56,68 µM ± 25,06 µM)** est supérieure à celle des patients avec une survie de **20 mois (52,10 µM ± 0,86 µM)**, de **7 mois (50,87 µM ± 4,07 µM)**, de **6 mois (50,57µM ± 3,94µM)** et de **12 mois (48,18µM ± 4,81µM)**.

Le test de comparaison ANOVA montre **une différence très hautement significative** entre [NO] chez les patients MM avec une survie **plus de 20 mois** et **une survie de 6 mois**. **Cependant, une absence de différence significative** a été remarquée entre [NO] chez les patients avec une survie **plus de 20 mois** et **une survie de 7 mois ($p = 0,7742$)**, de **7 mois** et de **6 mois ($P = 0,7467$)**, **plus de 20 mois** et de **20 mois ($P = 0,8169$)**, de **20 mois** et de **12 mois ($P = 0,8044$)** ainsi qu'entre les patients MM avec une survie **plus de 20 mois** et de **12 mois ($P = 0,7467$)**.

III.2.5. la [NO] et (MPC%) chez les patients MM

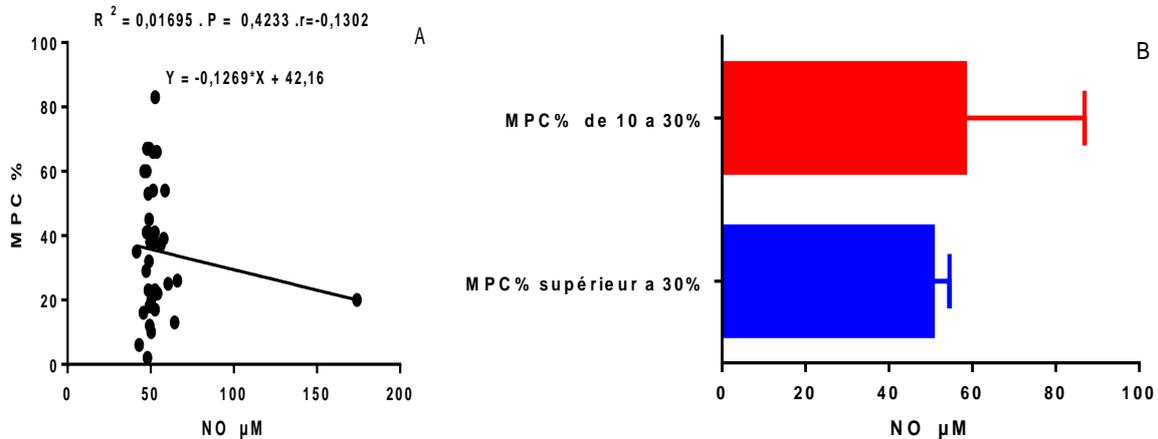


Fig 17 : A : Corrélation entre [NO] et (MPC%). B : La [NO] selon (MPC%) des patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 17A** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et (MPC%) chez les patients MM. Une corrélation très faible et négative (**1.69%**, $r = -0.1302$, $P = 0.4233$) a été remarquée. La **Fig 17B** montre que [NO] chez les patients de masse tumorale (**10 à 30%**) ($56,77 \mu\text{M} \pm 28,67 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients de masse tumorale (**supérieur à 30%**) ($50,54 \mu\text{M} \pm 3,96 \mu\text{M}$). Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec MPC % de (**10 à 30%**) et (**supérieur à 30%**) (**21,84% de similarité**, $t = -1,2526$, $p = 0,2184$).

III.2.6. la [NO] et [$\beta_2\text{m}$] chez les patients MM

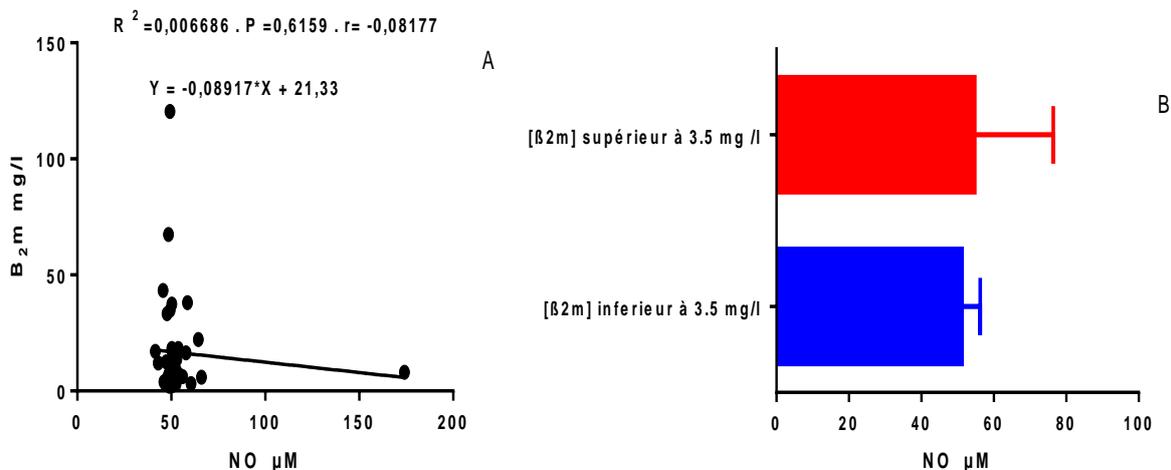


Fig 18 : A : Corrélation entre [NO] et [$\beta_2\text{m}$]. B : la [NO] selon [$\beta_2\text{m}$] chez les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 18A** montrent **une absence de corrélation entre [NO] et [β_2m]** chez les patients MM. Une corrélation très faible (**0.66 %**, $r = -0.08177$, $P = 0.6159$) a été remarquée. Une [β_2m] anormale (**Stade III > 3.5 mg/l**) a été observée chez **85%** des patients MM. Le moyenne de [β_2m] a été (**16,49 mg/l**) avec extrêmes de (**2.11 mg/l - 120, 45 mg/l**). La **Fig 18B** montre que [NO] chez les patients avec [β_2m]**>3.5mg/l** (**54,14 μ M \pm 22,38 μ M**) est supérieure à celle des patients avec [β_2m] **\leq 3.5mg/l** (**51,22 μ M \pm 4,57 μ M**).

Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec (**$\beta_2m > 3.5mg/l$**) et avec (**$\beta_2m \leq 3.5mg/l$**) (**78,21% de similarité**, $t = -0,2785$, $p = 0,7821$).

III.3.7. la [NO] et [Acm].

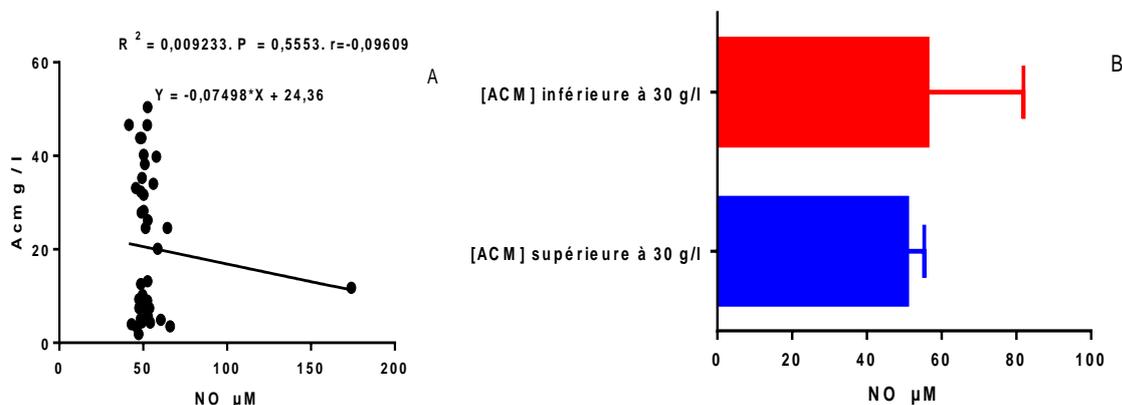


Fig 19 : A : Corrélation entre [NO] et [Acm] . B : la [NO] selon [Acm] chez les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 19A** montrent **une absence de corrélation entre la et [NO] et [Acm]** chez les patients MM. Une corrélation très faible et négative (**0.92%**, $r = -0.09609$, $P = 0.5553$) a été remarquée. La [**Acm**] anormale (**>30g/l**) a été observée chez **37%** des patients MM. La moyenne de [**Acm**] a été (**20,29 g/l**) avec extrêmes de (**1.9 g/l -50, 4 g/l**). La **Fig 19B** montre que [NO] chez les patients avec [**Acm**] **\leq 30 g/l** (**56,26 μ M \pm 25,13 μ M**) est supérieure à celle des patients avec [**Acm**]**>30g/l**. (**50,78 μ M \pm 4,42 μ M**).

Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec (**[Acm] \leq 30 g/l**) et avec (**[Acm]>30g/l \leq 3.5mg/l**) (**43,15% de similarité**, $t = -0,7960$, $p = 0,43153$).

III.2.8. La [NO] et [CLL κ] chez les patients MM

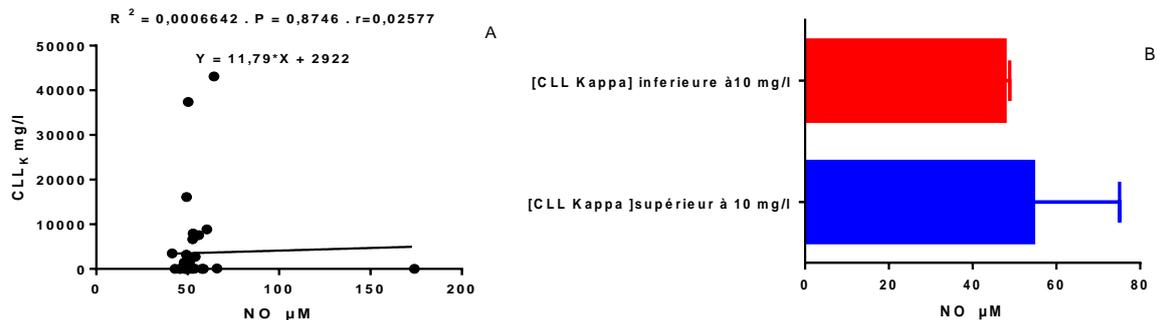


Fig 20 : A : Corrélation entre [NO] et [CLLκ]. **B :** la [NO] selon la [CLLκ] chez les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 20A** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et [CLL κ] chez les patients MM. Une corrélation très faible (**0.066 %**, $r = 0.02577$, $P = 0.8746$) a été remarquée. La [CLLκ] anormale (**>10mg/l**) a été observée chez **98%** des patients MM. La moyenne de [CLLκ] a été (**274,57 mg/l**) avec extrêmes de (**8.2 mg/l -43100 mg/l**). La **Fig 20B** montre que [NO] chez les patients avec [CLLκ] (**>10mg/l**) (**54,54μM ± 20,27μM**) est supérieure à celle des patients avec [CLLκ] (**≤ 10 mg/l**) (**47,75 μM ± 1,135 μM**).

Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec ([CLLκ] **>10mg/l**) et avec ([CLLκ] **>10mg/l**) (**58,82% de similarité**, $t = -0,5459$, $p = 0,5882$).

III.2.9. [NO] et [CLL λ] chez les patients MM

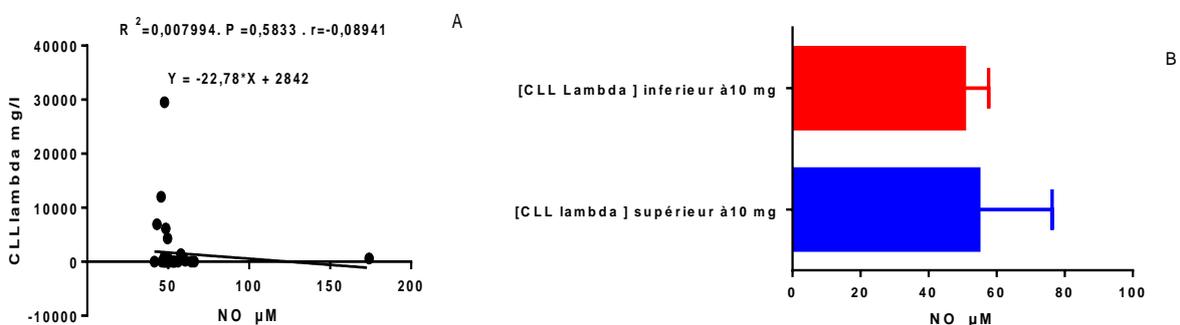


Fig 21 : A : Corrélation entre [NO] et [CLL λ]. **B :** la [NO] selon la [CLL λ] chez les patients MM.

Les résultats illustrés dans la **Fig 21A** montrent **une absence de corrélation entre [NO] et [CLL λ]** chez les patients MM. Une corrélation très faible et négative (**0.79%**, $r = -0.08941$, $P = 0.5833$) a été remarquée. Une [CLL λ] anormale (**>10mg/l**) a été observée chez **83%** des patients MM. Le moyenne de [CLL λ] a été (**1607,57 mg/l** avec extrêmes de (**0,0019 mg/l - 29500 mg/l**)). La **Fig 21B** montre que [NO] chez les patients MM avec [CLL λ] (**>10mg/l**) (**54,54μM ± 20,27μM**) est supérieure à celle des patients avec [CLL λ] ≤ 10 mg/l (**50,99μM ± 6,997μM**). Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec ([CLL λ] >10mg/l) et avec ([CLL λ] ≤ 10mg/l) (**71,46%**, de similarité, $t = -0,3686$, $p = 0,7145$).

III.2.10. La [NO] et le (R k /λ) chez les patients MM

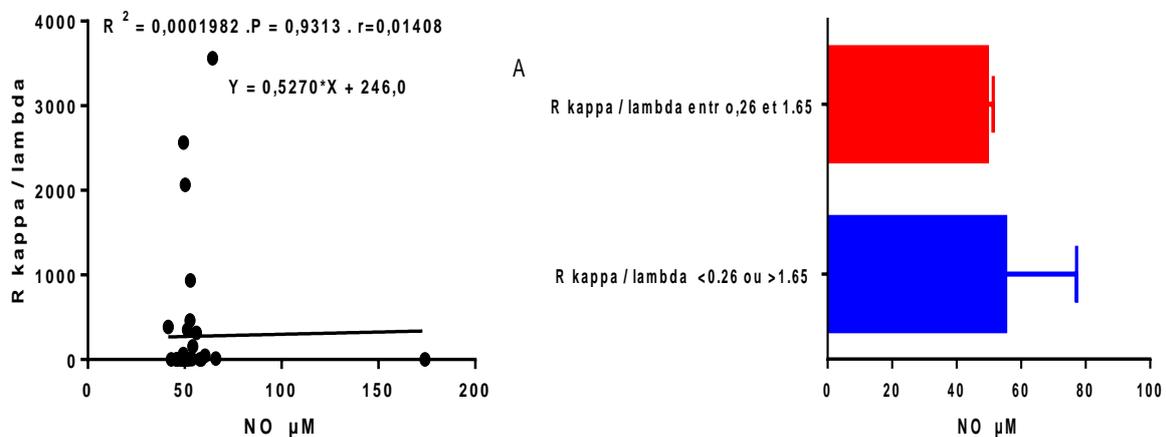


Fig 22 : A : Corrélation entre [NO] et le R k /λ. B : la [NO] selon le (R k /λ) chez les patients MM.

Les résultats illustrés dans la **Fig 22A** montrent **une absence de corrélation entre [NO] et (R k /λ)** chez les patients MM. Une corrélation très faible (**0.019%**, $r = 0.01408$, $P = 0.9313$) a été remarquée. Un (**R k /λ**) anormal (**<0.26 or >1.65**) a été observé chez **83%** des patients MM. La moyenne de (**R k /λ**) a été **274,57** avec extrêmes de (**0,0019 - 2066,29**). La **Fig 22B** montre que [NO] chez les patients MM avec un (**R k /λ**) **<0.26 ou >1.65** (**55,2049 μM ± 21,670 μM**) est supérieure à celle des patients avec un (**R k /λ**) **entre (0.26 et 1.65)** (**49,50 μM ± 1,71 μM**). Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec (**R k /λ <0.26 or >1.65**),) et avec (**R k /λ entre 0.26 et 1.65**) (**53,55%** de similarité, $t = 0,6256$, $p = 0,5354$).

Dans le but d'étudier le statut immunitaire et d'évaluer son éventuelle relation avec la [NO] chez les patients MM, nous avons étudié la relation entre [NO] et le pourcentage des cellules immunitaires infiltrant la tumeur (CIIT%) : les lymphocytes infiltrant la tumeur (LIT%), les myélocytes (myé%) et les granulocytes associés à la tumeur (GAT%), (Fig 23, Fig 24). Nous avons étudié également la relation entre [NO] et le taux des cellules immunitaires systémiques (périphériques) (CIS%) comprenant : les lymphocytes systémiques (N° Lyn S, Lyn S%) (Fig 25), les granulocytes systémiques (N° Gran S, Gran S %) (Fig 26), les monocytes (N° Mono, Mono %) (Fig 27) et les leucocytes systémiques (N° Leu S, Leu S %) (Fig 28).

IV.1. NO et (CIIT%)

IV.1.1. La [NO] selon (CIIT%)

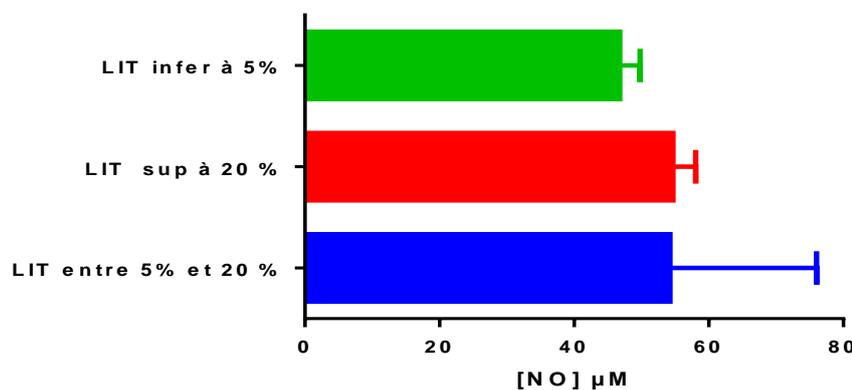


Fig 23 : La [NO] selon LIT% chez les patients MM

LIT% normal (entre 5% et 20%) représente une fréquence très importante (75%) comparativement aux MM avec LIT% anormal (supérieur à 20%) et (inférieur à 5%) qui sont moins fréquents, (15%) (10%) respectivement. La moyenne de LIT% a été 16% avec extrêmes de (2% à 46%).

Myé% anormal (inférieure à 21%) a été observé chez (100%) des patients MM avec moyenne de 10% et extrêmes de (4% à 18%).

GAT% anormal (supérieure à 25%) a été observé chez (100%) des patients MM avec moyenne de 43% et extrêmes de (28% à 65%).

La **Fig 23** montre que [NO] chez les patients MM avec **LIT%** anormal (**supérieure à 20%**) ($54,67\mu\text{M} \pm 3,09 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients avec **LIT%** normal (**entre 5% et 20%**) et **LIT%** anormal (**inférieur à 5%**) ($54,12 \mu\text{M} \pm 21,45 \mu\text{M}$) ($46,77 \mu\text{M} \pm 2,61 \mu\text{M}$) respectivement.

Le test de comparaison ANOVA montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec **LIT%** (**Entre 5% et 20%**) et (**supérieure à 20%**) ($p=0,7633$), et avec **LIT%** (**supérieure à 20%**) et (**inférieur à 5%**) ($p= 0,8186$). Une **différence très hautement significative** entre [NO] chez les patients MM avec **LIT%** (**Entre 5% et 20%**) et (**inférieur à 5%**) a été remarquée ($P < 0,0001$).

IV.1.2.Corrélation entre [NO] et (CIIT%)

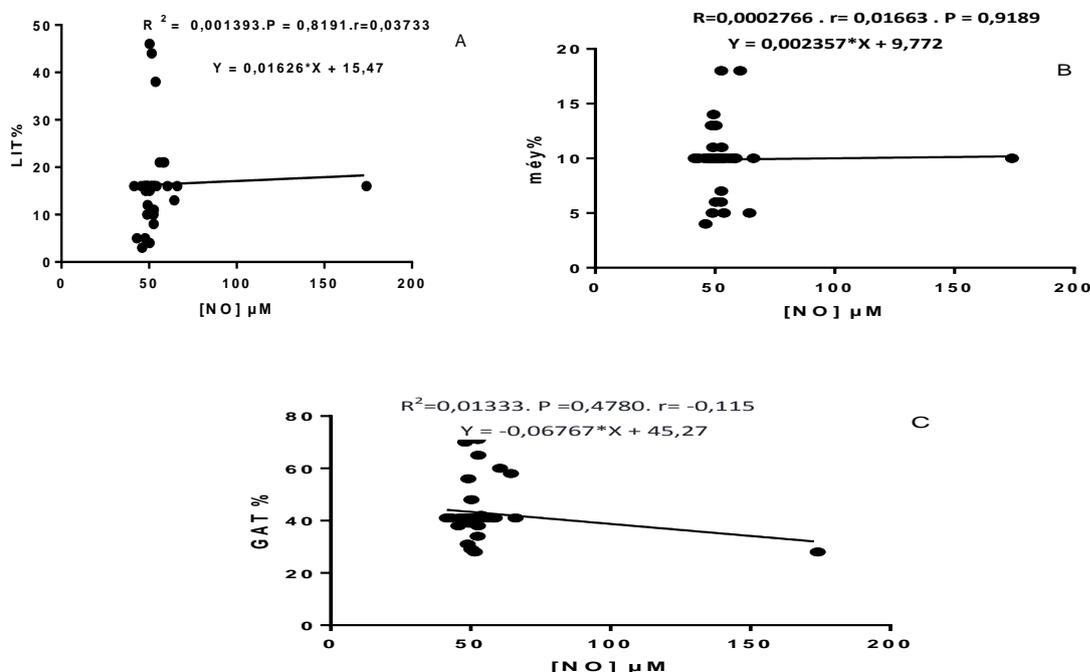


Fig 24 : Corrélation entre [NO] et (CIIT%) chez les patients MM. **A :**LIT%. **B :** Myé%. **C :** GAT%.

Les résultats illustrés dans la **Fig 24** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et (CIIT %) chez les patients MM. Une corrélation très faible a été remarqué avec (LIT %) et myé %°. A (**0.13%**, $r= 0.03733$, $P= 0.8191$), B (**0.027%**, $r = 0.01663$, $P= 0.9189$) respectivement **Fig 24A et B**. La **Fig 24 C** montre également une corrélation négative, très faible avec les GAT % (**1.33%**, $r= - 0.115$, $P= 0.47840$).

IV.2. La [NO] et (CIS%)

IV.2.1. La [NO] et (Lyn S)

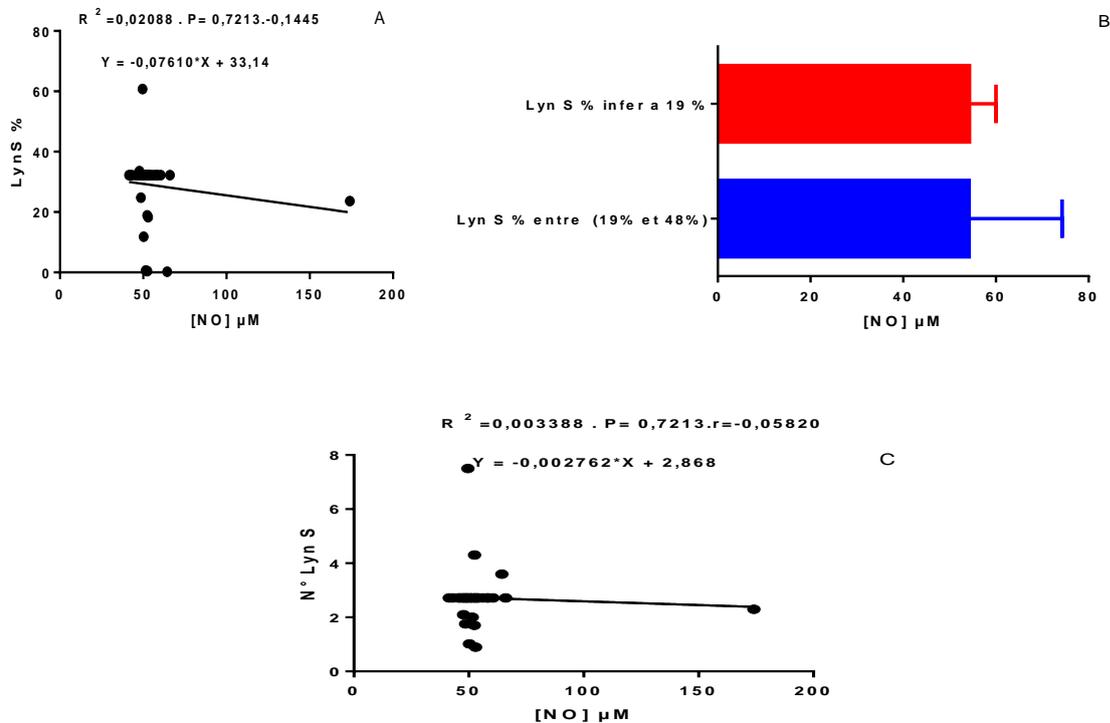


Fig 25 : A : Corrélation entre [NO] et (Lyn S %). **B :** la [NO] selon (Lyn S %).

C : corrélation entre [NO] et (N° Lyn S)

Les résultats illustrés dans la **Fig 25A** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et (Lyn S %) chez les patients MM. Une corrélation très faible et négative a été remarquée A (2.08%, $r = 0.1445$, $P = 0.7213$). Lyn S % normal (entre 19% et 48%) représente **une fréquence très importante (88%)** comparativement aux MM avec Lyn S % anormal (inférieure à 20%) (12%). La moyenne de LYN S % a été 30% avec extrêmes de (0.24% à 40%) La **Fig 25B** montre que [NO] chez les patients MM avec Lyn S % anormal ($54,28\mu\text{M} \pm 5,11\mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients avec Lyn S % normal ($54,19\mu\text{M} \pm 21,09\mu\text{M}$).

Les résultats illustrés dans la **Fig 25C** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et (N° Lyn S) chez les patients MM. Une corrélation très faible et négative a été C (0.33%, $r = 0.05820$, $P = 0.7213$) Le (N° Lyn S) normal (entre 0.9 et $5.2 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$) a été observé chez (100 %) des patients MM avec moyenne de $2.71 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ et extrêmes de (0.9 à $4.3 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$).

IV.2.2. La [NO] et (Gran S)

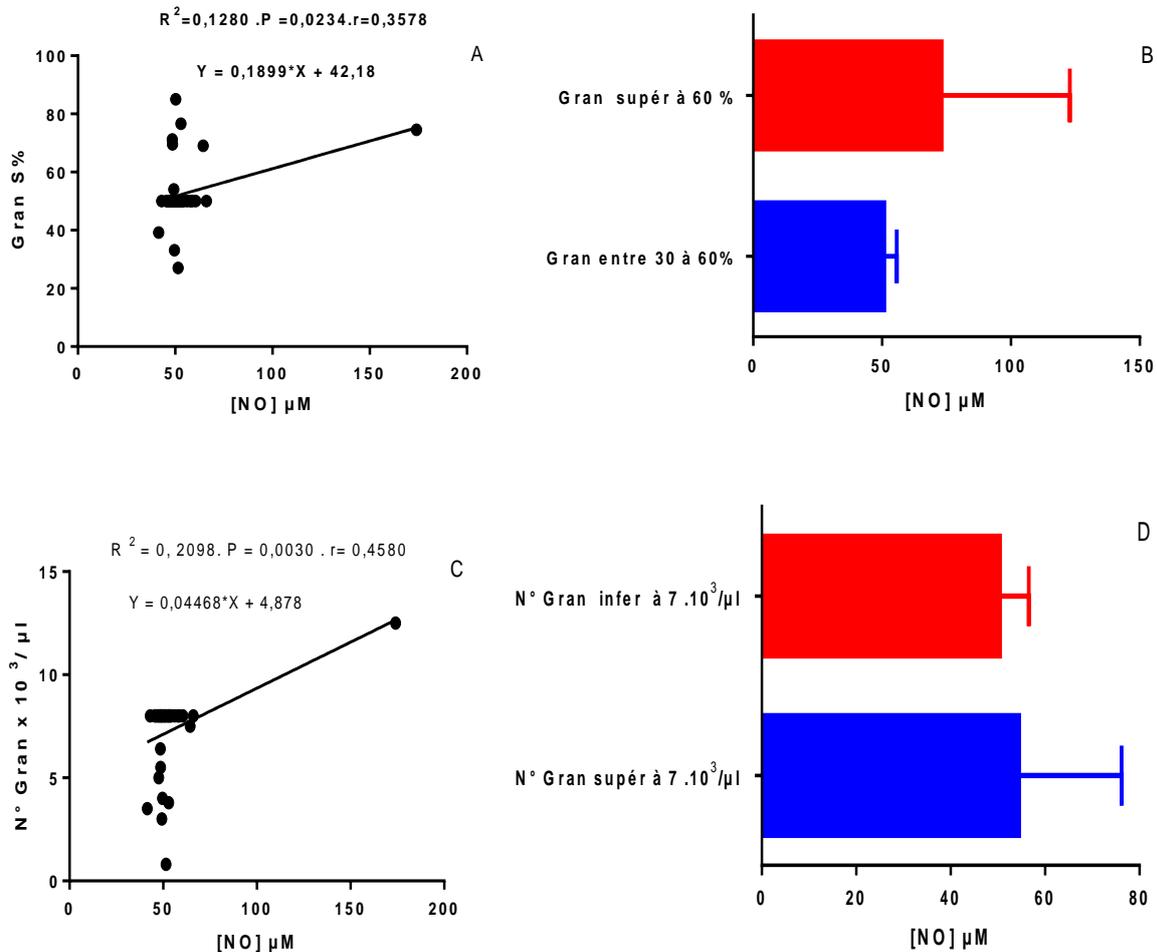


Fig 26: **A :** Corrélation entre [NO] et (Gran S %). **B :** La [NO] selon (Gran S %). **C :** Corrélation entre [NO] et (N° Gran S). **D :** La [NO] selon (N° Gran S)

Les résultats illustrés dans la **Fig 26A** montrent **une corrélation faible** entre [NO] et (**Gran S%**) A ($r= 0.3578$, $P= 0.0234$) des patients MM. Les patients MM avec **Gran S%** normal (**entre 30% et 60%**) représentent **une fréquence très importante (85%)** comparativement aux MM avec **Gran S%** anormal (**supérieure à 60%**) (15%). La moyenne de **Gran S%** a été (52%) avec extrêmes de (33% à 85%). La **Fig 26B** montre que [NO] chez les patients MM avec **Gran S%** anormal ($73,11\mu\text{M} \pm 45,46\mu\text{M}$) est **supérieur** à celle des patients avec **Gran S%** normal ($50,86\mu\text{M} \pm 4,79\mu\text{M}$).

Le test de **student (t)** montre **une différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec **Gran S%** (**entre 30% et 60%**) et (**supérieure à 60%**) ($t= -2,98$, $p= 0,0051$).

Une corrélation faible a été également remarquée entre [NO] et N° Gran S des patients MM C ($r= 0.4580$, $P= 0.0030$) Fig 27C. Les patients MM avec N° Gran S normal (entre 1.7 et $7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) représentent **une fréquence très importante (80%)** comparativement aux MM avec N° Gran S anormal (supérieure à $7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) (20%). La moyenne de N° Gran S a été ($7.3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) avec extrêmes de (3.5 à $12.5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). La Fig 26D montre que [NO] chez les patients MM avec N° Gran S anormal ($55,29 \mu\text{M} \pm 22,17 \mu\text{M}$) est supérieure à celle des patients avec N° Gran S normal ($50,44 \mu\text{M} \pm 5,74 \mu\text{M}$).

Le test de student (t) montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec N° Gran S (entre 3.8 et $9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) et (supérieure à $9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) (57,53% de similarité, $t= 0,56$, $p= 0,57$).

IV.2.3. La [NO] et (Mono)

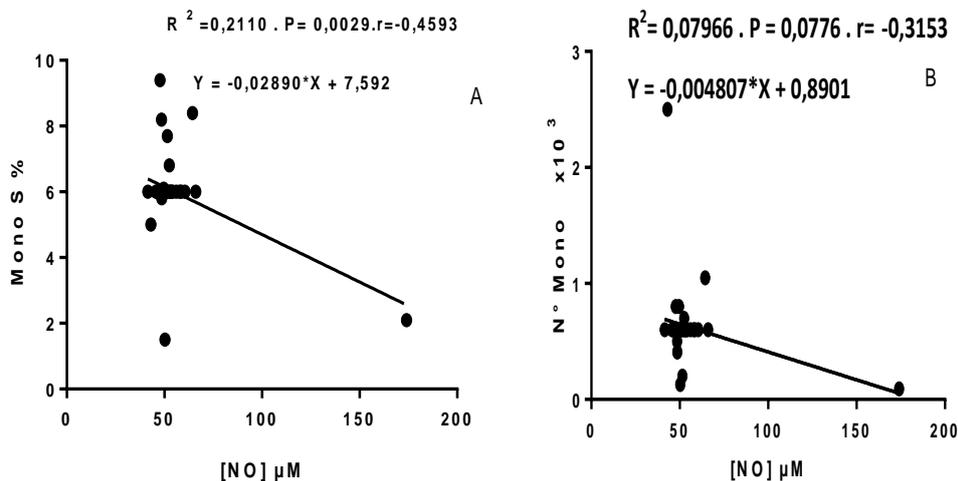


Fig 27 : A : Corrélation entre [NO] et (Mono %). B : Corrélation entre [NO] et (N° Mono).

Le Mono % normal (entre 3% à 10%) a été observé chez (100 %) des patients MM avec moyenne de 6% et extrêmes de (1.5% à 8.4%). Les résultats illustrés dans la Fig 27A montrent **une corrélation négative A** ($r= -0.4593$, $P= 0.0029$) entre [NO] et (Mono %) des patients MM. Le N° Mono normal (entre 0.1 à $1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) a été observé chez (100 %) des patients MM avec moyenne de $0.6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ et extrêmes de (0.13 à $1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). La Fig 27 B montre **une corrélation négative B** ($r= -0.3153$, $P= 0.0776$) entre [NO] et le (N° Mono) des patients MM.

IV.2.4. La [NO] et (Leu)

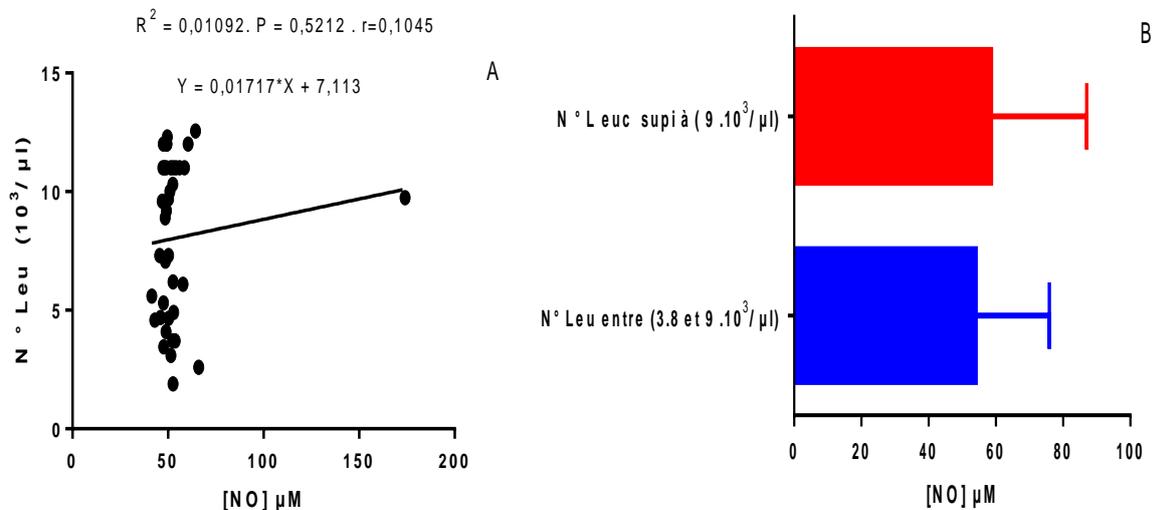


Fig 28 : A : Corrélation entre [NO] et (N° Leu). **B :** La [NO] et selon (N° Leu)

Les résultats illustrés dans la **Fig 28A** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et (N° Leu) dans le sang des patients MM. Une corrélation très faible (**1.092%**, $r = 0.1045$, $P = 0.5212$) a été observée.

N° leu normale (entre **3.8 et 9 .10³/ µl**) (**51%**) a été presque similaire au N° leu anormal (supérieure à **9 .10³/ µl**) (**49%**). La moyenne de N° leu a été (**8 .10³/ µl**) avec extrêmes de (**3.7 à 13 .10³/ µl**).

La **Fig 28B** montre que [NO] chez les patients MM avec **un N° leu anormal** (**58,68 µM ± 27,56 µM**) est supérieure à celle des patients avec N° leu normal (**48,11 µM ± 5,21 µM**).

Le test de **student (t)** montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec N° leu (entre **3.8 et 9. 10³/ µl**) et (supérieure à **9. 10³/ µl**) (**18,99% de similarité**, $t = -1,37$, $p = 0,17$).

V.1. Le NO et les marqueurs biochimiques de remodelage osseux

V.1.1.Évaluation des marqueurs biochimiques de remodelage osseux

Dans le but d'étudier l'effet du NO sur l'évolution de certaines manifestations de MM et afin d'évaluer le rôle de NO dans les maladies osseuses associées au MM ainsi son éventuelle corrélation avec les marqueurs de l'équilibre osseux chez les patients MM, nous avons étudié la corrélation entre [NO] et certains marqueurs biochimiques de remodelage osseux inclut la PAL (**Fig 29**), le bilan phosphocalcique (Ca^{++} , P) (**Fig 30**, **Fig 31**).

V.1.1.1.Evaluation de la [PAL]

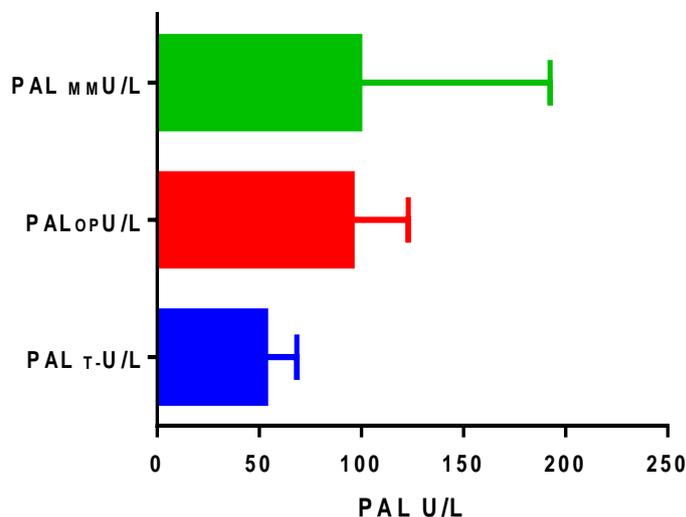


Fig 29 : Évaluation de [PAL] chez les trois groupes

Les résultats illustrés dans la **Fig 29** montrent que [PAL] chez les patients **MM** ($99,17 \text{ U/l} \pm 92,08 \text{ U/l}$) est supérieure à celle des patients **OP** ($95,53 \text{ U/l} \pm 27,02 \text{ U/l}$) et des sujets **T-** ($53,11 \text{ U/l} \pm 14,97 \text{ U/l}$).

Le test de comparaison **ANOVA** montre **une différence très hautement significative** entre [PAL] chez les patients **MM** et les sujets **T-** ($P < 0,0001$) ainsi qu'entre les patients **MM** et les patients **OP** ($P < 0,0001$). **Une différence significative** [PAL] chez les patients **MM** et les patients **OP** ($P = 0,0359$) a été remarquée.

V.1.1.2. Evaluation du bilan phosphocalcique

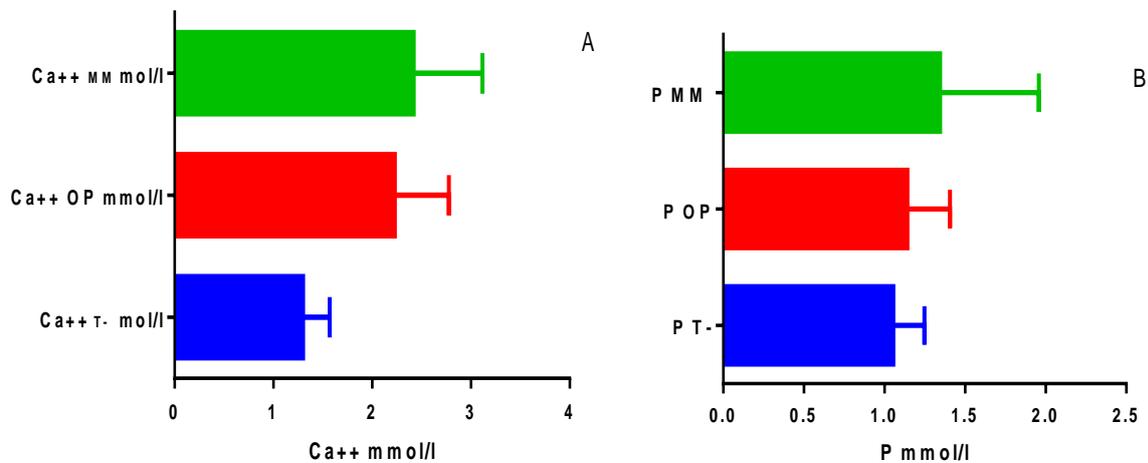


Fig 30 : Évaluation de bilan phosphocalcique chez les trois groupes **A** : Evaluation de [Ca⁺⁺]. **B** : Evaluation de [P].

Le bilan phosphocalcique représente des teneurs élevées chez les patients MM par rapport aux patients OP et sujets T-. La Fig 30A montre que la concentration de Ca⁺⁺ [Ca⁺⁺] chez les patients MM (99,17 mmol/l ± 92,08 mmol/l) est supérieure à celle des patients OP (95,53 mmol/l ± 27,02 mmol/l) et des sujets T- (1,30 mmol/l ± 0,26 mmol/l). La Fig 30B montre que la concentration de P [P] chez les patients MM (1,34 mmol/l ± 0,60 mmol/l) est supérieure à celle des patients OP (1,14 mmol/l ± 0,26 mmol/l) et des sujets T- (1,05 mmol/l ± 0,19 mmol/l).

Le test de comparaison ANOVA montre une différence très significative entre la concentration phosphocalcique chez les patients MM, les patients OP et les sujets T-. Le test montre une différence très hautement significative entre [Ca⁺⁺] chez les patients MM et les patients OP (P < 0,0001) et entre les patients MM et les sujets T- (P < 0,0001), ainsi qu'une différence très significative entre [Ca⁺⁺] chez les patients MM et les patients OP (P = 0,0062) ont été enregistrées. Une différence très hautement significative entre [P] chez les patients MM et les patients OP (P < 0,0001), et entre les patients MM et les sujets T- (P < 0,0001), ainsi qu'une différence très significative entre [P] chez les patients OP et les sujets T- (P = 0,0078) ont été remarquée.

V.1.2. Corrélation entre [NO] et [PAL]

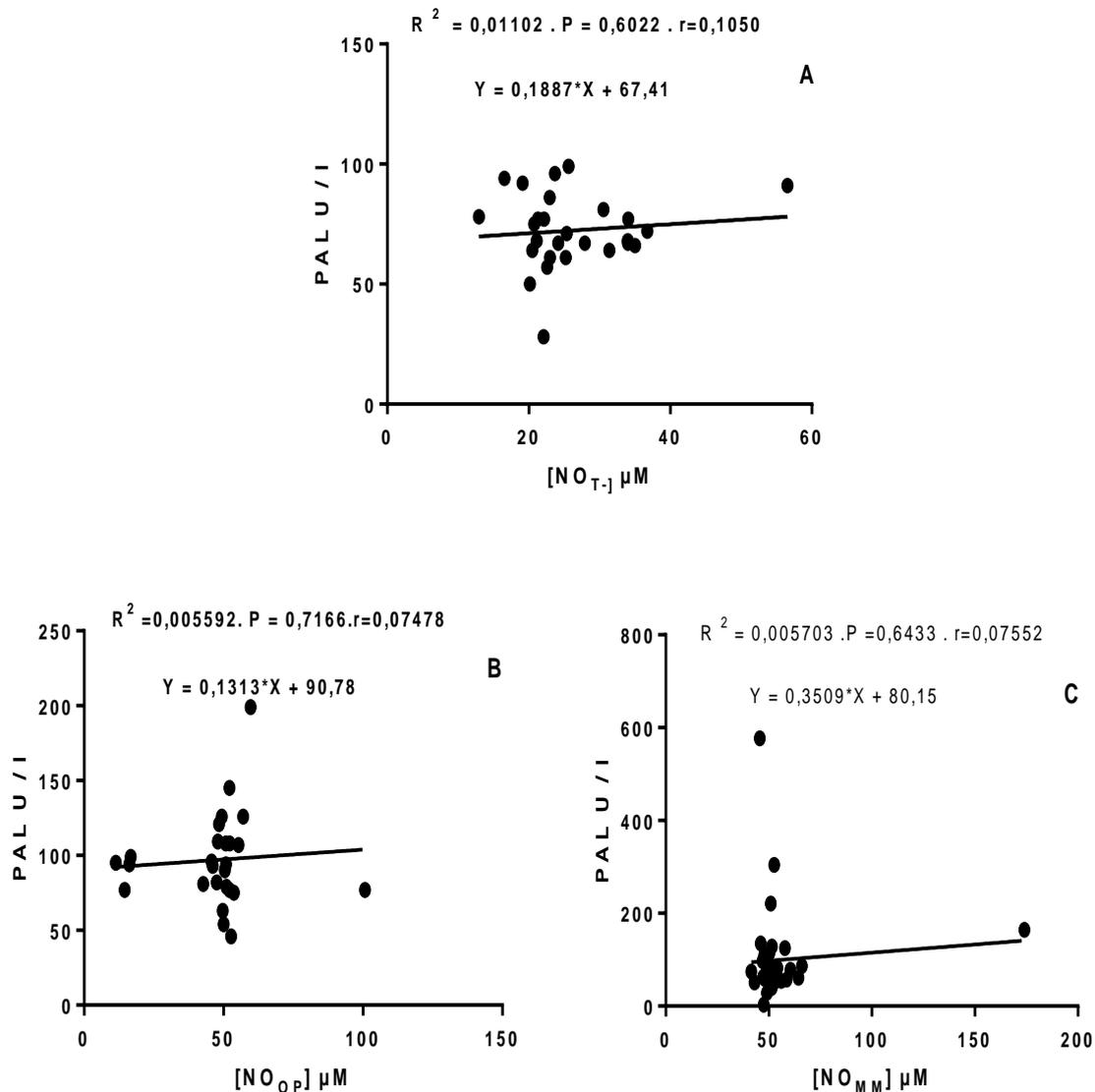


Fig 31 : Corrélation entre [NO] et [PAL] chez les trois groupes. **A :** Chez les sujets T-, **B:** Chez les patients OP. **C :** Chez les patients de MM.

Les résultats illustrés dans la **Fig 31** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et [PAL] chez les trois groupes : Chez les sujets T- **A (1.10 %, r= 0 .1050, P= 0.6022)**, chez les patients OP **B (0.55%, r= 0.07478, P= 0.7166)** et chez les patients MM **C (0.57%, r= 0.07552, P= 0.6433)** une corrélation très faible a été enregistré

V.1.3. La[NO] selon [PAL] chez les patients MM

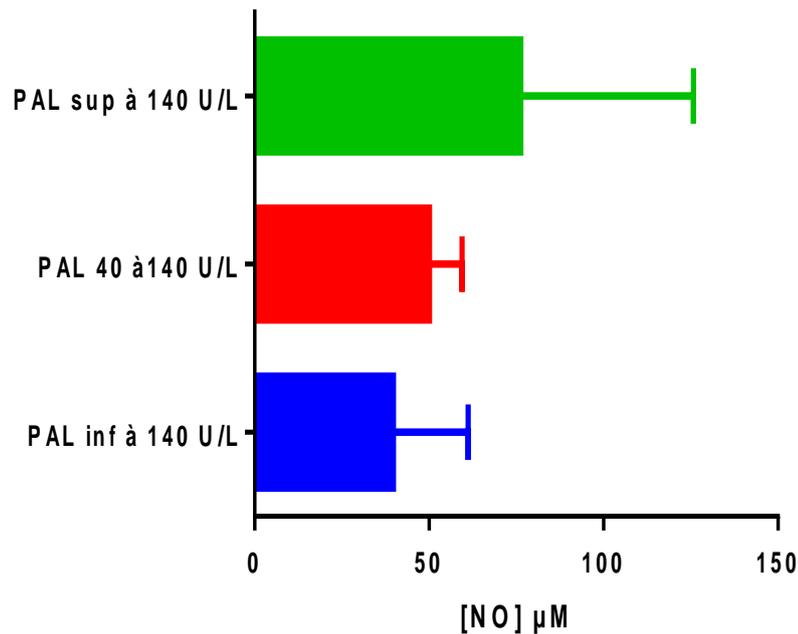


Fig 32 : Étude de [NO] selon [PAL] chez les patients MM

Les patients avec [PAL] normal (40 à 140 U/l) représentent **une fréquence très importante (33%)** comparativement aux patients MM avec [PAL] anormal (**inférieur à 40 U/l**) et (**supérieure à 40U/l**) qui sont moins fréquents, (**10%**) (**8%**) respectivement. La moyenne de [PAL] a été **99.71 U/l** avec extrêmes de (**3 U/l** à **304 U/l**).

La **Fig 32** montre que [NO] chez les patients MM avec [PAL] anormal (**supérieure à 40 U/l**) (**80,78 µM ± 53,90 µM**) est supérieure à celle des patients avec [PAL] normal (**40 à 140 U/l**) et [PAL] anormal (**inf à 40 U/l**) (**51,42µM ± 5,29µM**) (**49,33 µM ± 1,60µM**) respectivement.

Le test de comparaison ANOVA montre **une différence hautement significative** entre les [NO] chez les patients MM avec [PAL] normal (**40 à 140 U/l**) et anormal (**supérieure à 40 et inf à 40 U/l**) (**P < 0,0001**).

V.1.4. Corrélation entre [NO] et la concentration phosphocalcique

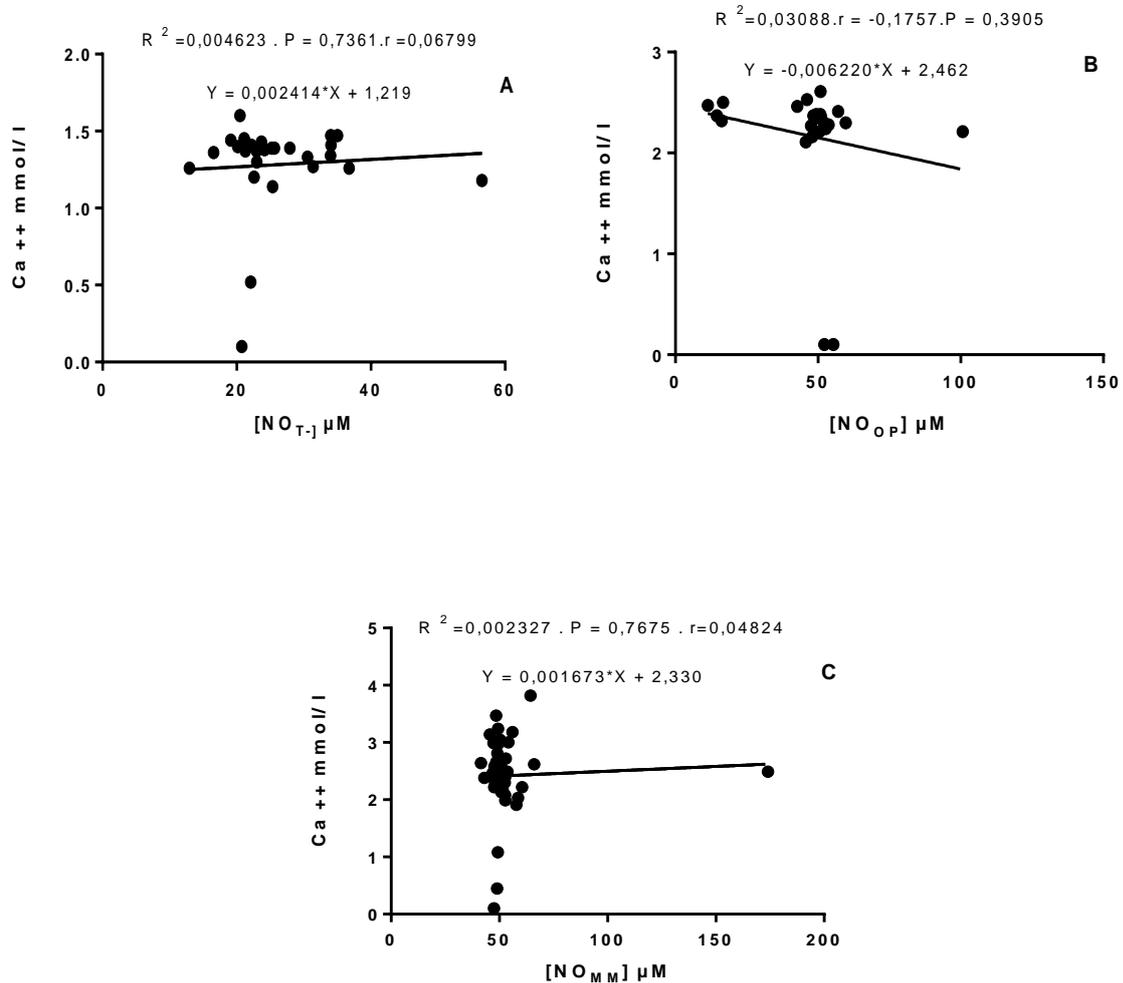
V.1.4.1. Corrélation entre [NO] et [Ca⁺⁺]

Fig 33 : Corrélation entre [NO] et [Ca⁺⁺] chez les trois groupes. **A :** Chez les sujets T-, **B:** Chez les patients OP. **C :** Chez les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 33** montrent **une absence de corrélation** entre [NO] et [Ca⁺⁺] chez les trois groupes. La **Fig 32A** et **Fig 32C** montre une corrélation très faible et négative chez les sujets T- **A (0.46%, r= 0.06799, P= 0.7361)** et les patients MM **C (0.23%, r= 0.04824, P= 0.7675)**. Une corrélation très faible et négative a été remarqué également chez les patients OP **B (3.08%, r= -0.1757, P= 0.3805) Fig26B**.

V.1.4.2 Corrélation entre [NO] et [phosphate]

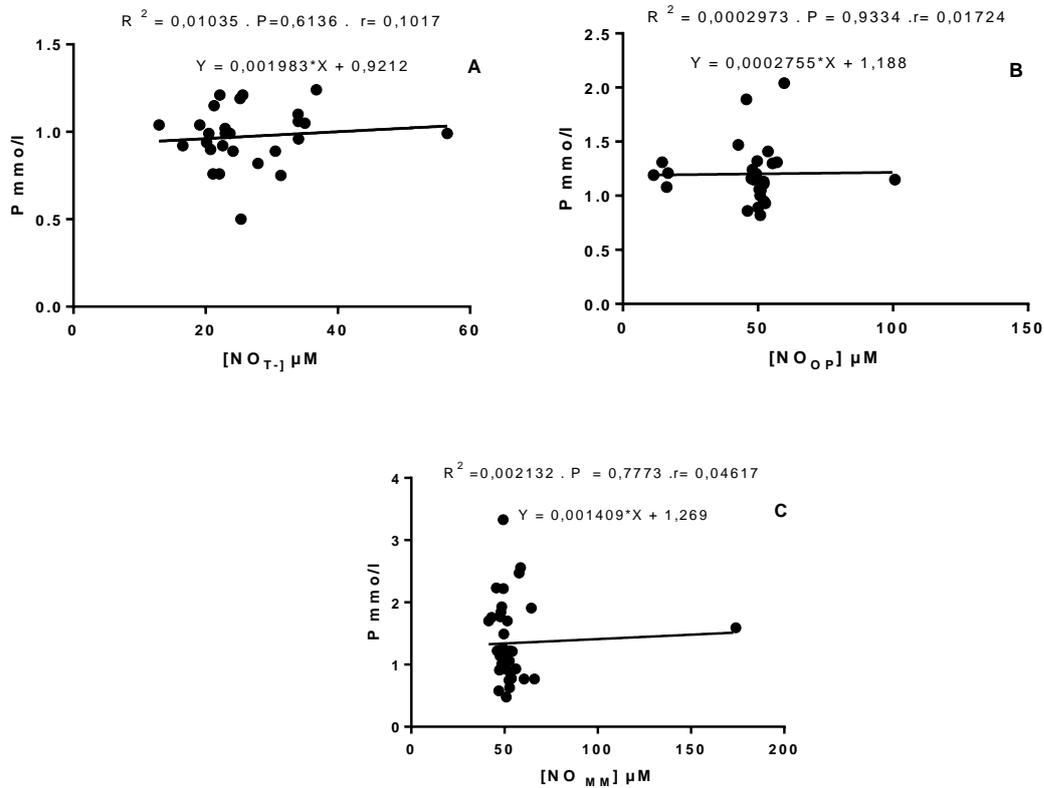


Fig 34 : Corrélation entre [NO] et [P] chez les trois groupes. **A :** Chez les sujets T-. **B:** Chez les patients OP. **C :** Chez les patients MM

Les résultats illustrés dans la **Fig 34** montrent **une absence de corrélation** entre la [NO] et [P] chez les trois groupes. Une corrélation très faible chez les sujets T-, chez les patients OP et chez les patients MM a été remarquée **A (1.03% $r = 0.1017$, $P = 0.6136$), B (0.02%, $r = 0.01724$, $P = 0.9334$), C (0.21%, $r = 0.04617$, $P = 0.7773$).**

V.1.5. La[NO] selon la concentration phosphocalcique

V.1.5.1.La [NO] selon [Ca⁺⁺]

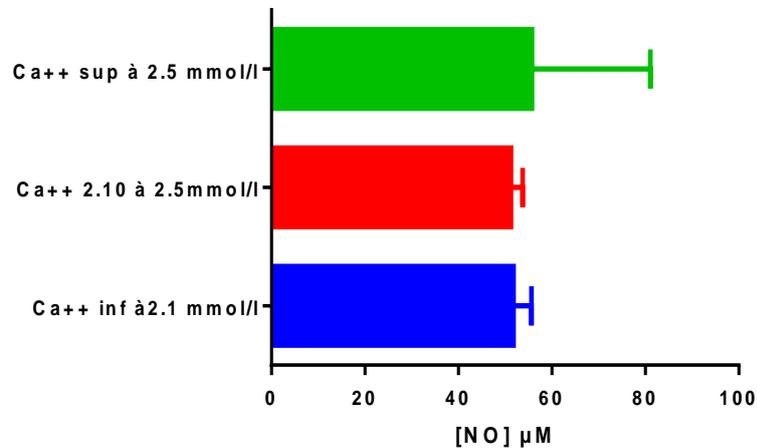


Fig 35 : La [NO] selon la [Ca⁺⁺] chez les patients MM

Les patients avec [Ca⁺⁺] anormal (supérieure à 2.5 mmol/l) représentent **une fréquence très importante (63%)** comparativement aux patients MM avec [Ca⁺⁺] anormal (inférieur à 2.1 mmol/l) et [Ca⁺⁺] normal (de 2.1 à 2.5 mmol/l) qui sont moins fréquents, (25%) (10%) respectivement. la moyenne de [Ca⁺⁺] a été **2,42 mmol/l** avec extrêmes de (de 0.1 mmol/l à 3.82 mmol/l).

La Fig 35 montre que [NO] chez les patients MM avec [Ca⁺⁺] anormal (supérieure à 2.5 mmol/l) (**55,76 µM ± 24,80 µM**) est supérieure à celle des patients avec [Ca⁺⁺] normal (de 2.1 à 2.5 mmol/l) et [Ca⁺⁺] anormal (inférieur à 2.1 mmol/l) (**51,26 µM ± 2,22 µM**) (**50,26 µM ± 3,67 µM**) respectivement.

Le test de comparaison ANOVA montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec [Ca⁺⁺] (supérieure à 2.5 mmol/l) et (de 2.1 à 2.5 mmol/l). (**p=0,8255**), et avec [Ca⁺⁺] (de 2.1 à 2.5 mmol/l) et (inférieur à 2.1 mmol/l) (**p= 0,6277**). **Une différence très hautement significative** entre [NO] chez les patients MM avec [Ca⁺⁺] (supérieure à 2.5 mmol/l) et (inférieur à 2.1 mmol/l) a été remarquée (**P < 0,0001**).

V.1.5.2.Étude [NO] selon [phosphate]

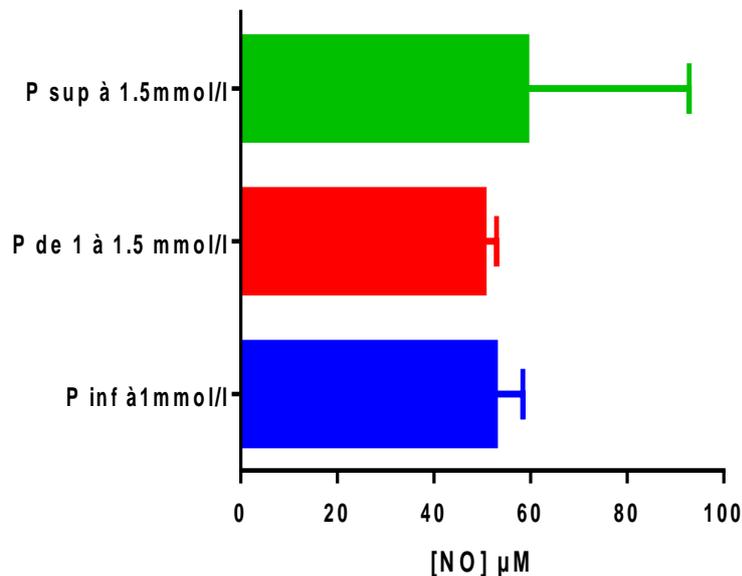


Fig 36 : La [NO] selon [P] chez les patients MM

La fréquence des patients avec [P] **normal (de 1 à 1.5 mmol/l) (35%)** a été **presque similaire** à celle des patients MM avec [P] anormal (**supérieure à 1.5 mmol/l) (35%)** et (**inférieur à 2.1 mmol/l) (30%)** la moyenne de [p] a été **2,42 mmol/l** avec extrêmes de (de **0.1 mmol/l à 3.82 mmol/l**).

La **Fig 35** montre que [NO] chez les patients MM avec [p] anormal (**supérieure à 1.5 mmol/l) (59,23µM ± 32,38 µM)** est supérieure à celle des patients avec [p] anormale (**inférieur à 1 mmol/l) (52,76 µM ± 5,42 µM)** et avec [p] **normale (de 1 à 1.5 mmol/l) (50,41µM ± 2,45 µM)**.

Le test de comparaison ANOVA montre **une absence de différence significative** entre [NO] chez les patients MM avec [p] (**supérieure à 1.5 mmol/l**) et (**de 1 mmol/l à 1.5 mmol/l**). (**p=0,4985**), et avec [P] (**de 1 mmol/l à 1.5 mmol/l**) et (**inférieur à 1 mmol/l**) (**p= 0,3008**). **Une différence très hautement significative** entre [NO] chez les patients MM avec [p] (**supérieure à 1.5 mmol/l**) et (**inférieur à 1 mmol/l**) a été remarquée (**P < 0,0001**).

V.2. Evaluation de la concentration du NO produit par un modèle de co-culture cellulaire « des MPCs (RPMI 8228) avec les ostéoblastes (MG63) »

Nous proposons un modèle de co-culture « des MPCs (RPMI 8228) avec les ostéoblastes (MG63) » pour créer un MET proche de microenvironnement de MM

V.2.1. La production du NO par les ostéoblastes (MG63) en culture simple

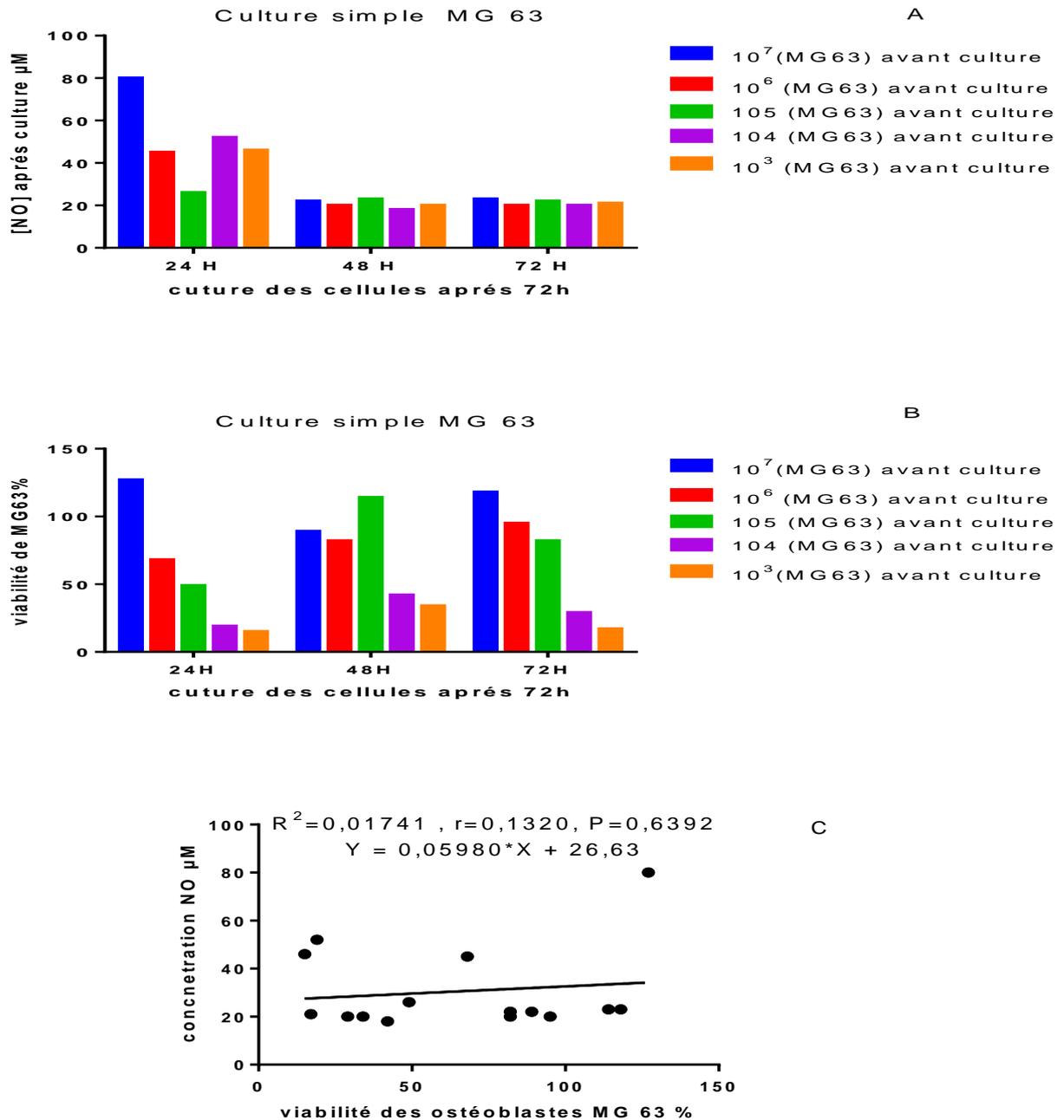


Fig 37: A. La [NO] produit par les MG 63. B. la viabilité des MG63. C. Corrélation entre [NO] et la viabilité des MG63 en culture simple

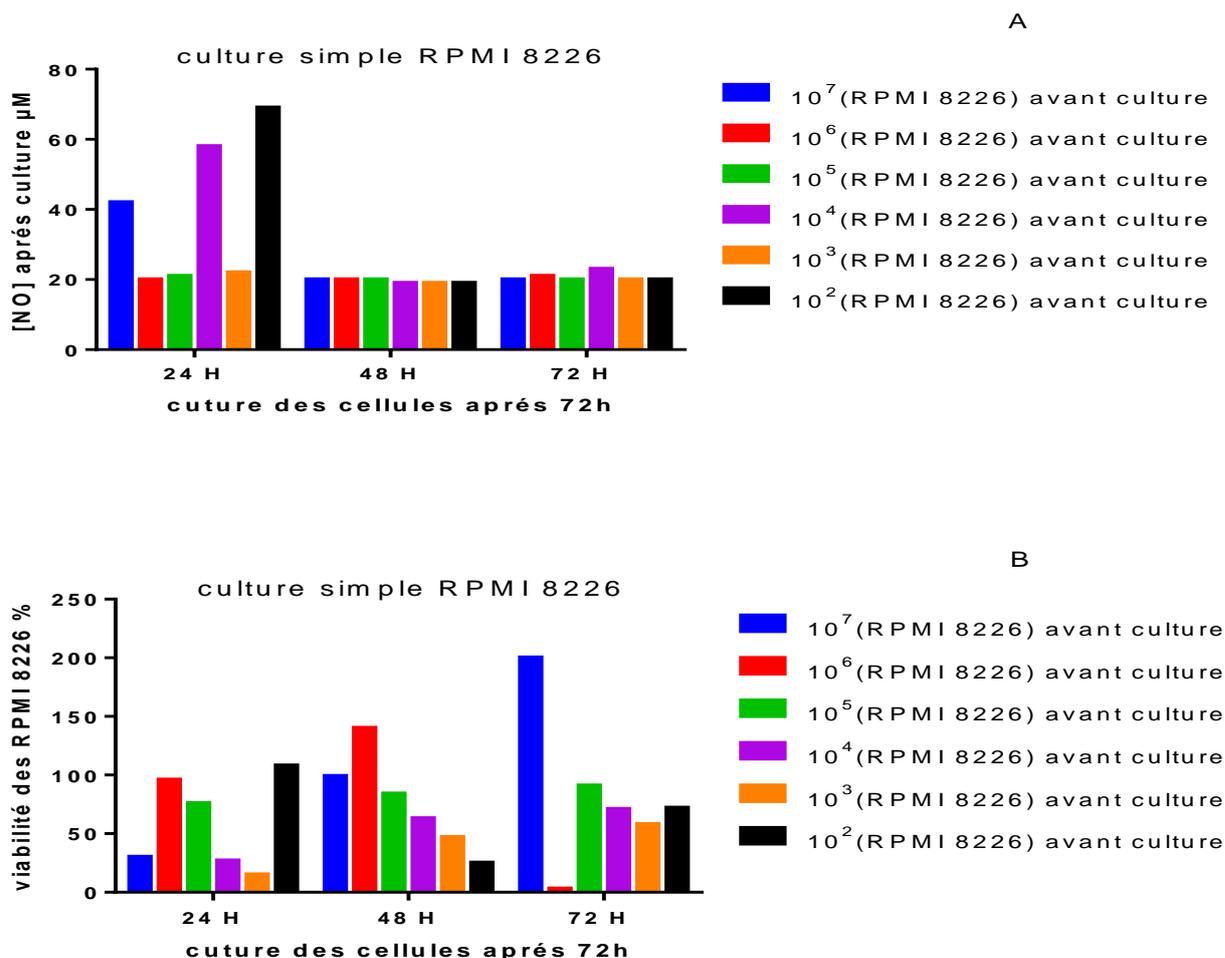
La moyenne de [NO] produit par un nombre décroissant des ostéoblastes (MG63) en culture simple a été ($30,53 \mu\text{M} \pm 16,98 \mu\text{M}$) avec extrêmes de ($18 \mu\text{M}$ à $80 \mu\text{M}$).

La moyenne de viabilité d'un nombre décroissant des ostéoblastes (MG63) en culture simple a été (65%) avec extrêmes de (15% à 127%).

Les résultats illustrés dans la Fig 37 A. B montrent que , après une culture de 24 h, plus le nombre des cellules avant culture est élevé , [NO] et la viabilité des MG 63 a été augmenté dans 63% des puits, après une culture de 48h et 72h , plus le nombre des cellules avant culture est élevé , la viabilité des MG 63 a été augmenté dans 90 % des puits et la [NO] a été presque constante dans 100 % des puits .

la Fig 37 C montre une absence de corrélation entre [NO] et viabilité MG 63. Une corrélation très faible a été remarquée C (1.74% $r= 0.130$, $P= 0.6392$).

V.2.2.La production du NO par les MPCs (RPMI 8226) en culture simple



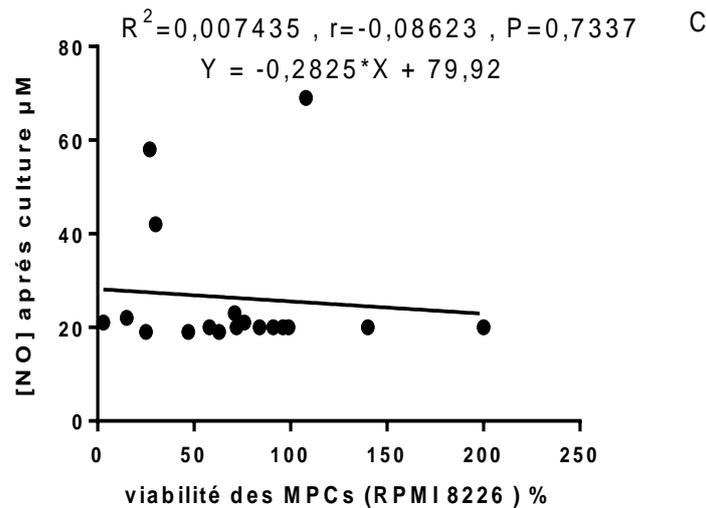


Fig 38: A. [NO] produit par les RPMI 8226. **B.** la viabilité des RPMI 8226. **C.** Corrélation entre [NO] et la viabilité des RPMI 8226 en culture simple

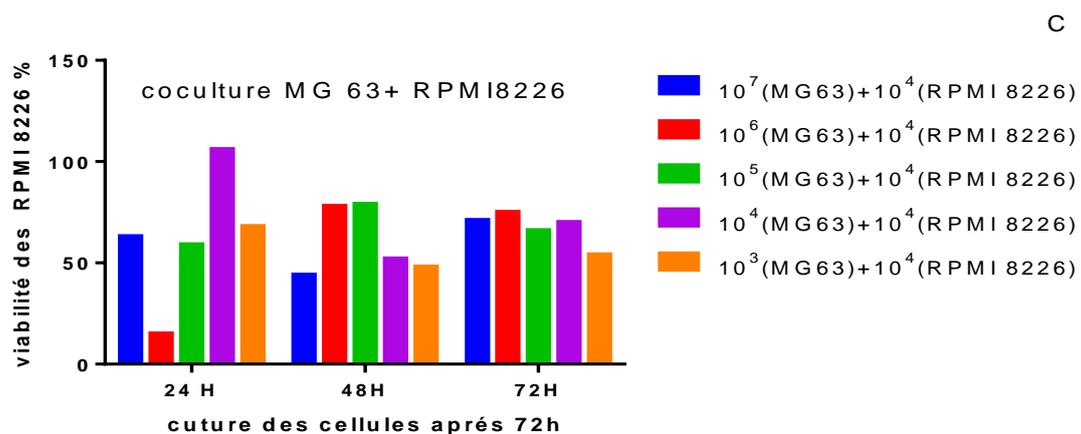
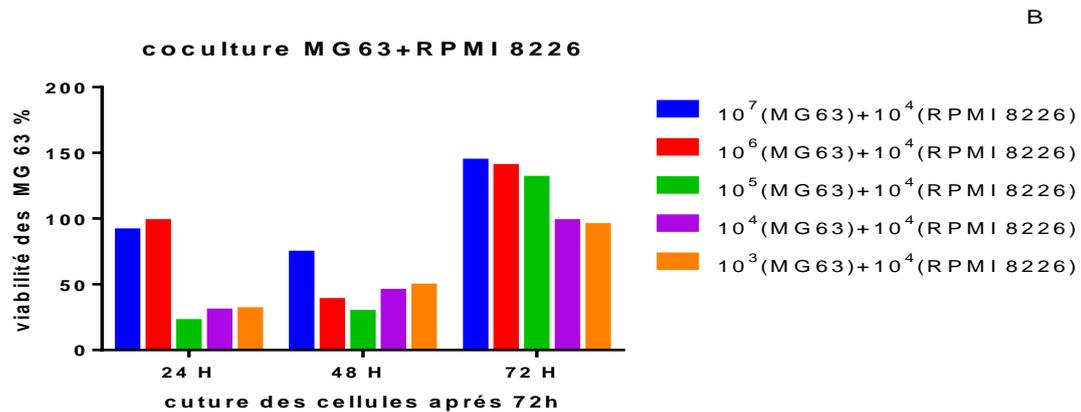
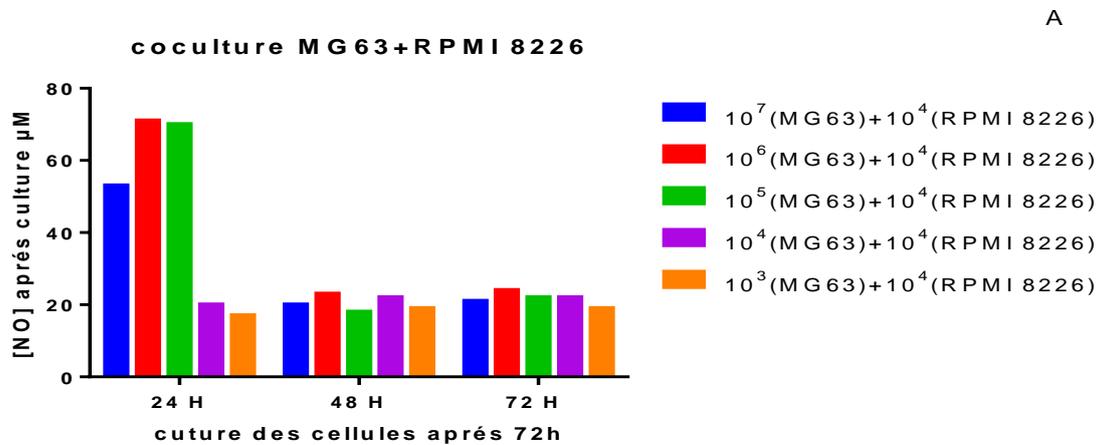
La moyenne de [NO] produit par un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226) en culture simple a été ($26,27 \mu\text{M} \pm 14,21 \mu\text{M}$) avec extrêmes de ($19 \mu\text{M}$ à $69 \mu\text{M}$).

La moyenne de viabilité d'un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226) en culture simple a été (72%) avec extrêmes de (200% à 3%).

Les résultats illustrés dans la **Fig 38 A. B** montrent que , **la culture des cellules pendant 24 h est trop variable** , plus le nombre des cellules avant culture est élevé , la viabilité des **RPMI 8226** a été augmenté dans **67%** des puits, [NO] a été diminué dans **50%** des puits **et constante dans les autre puits** , après une culture de **48h et 72h** , plus le nombre des cellules avant culture est élevé , la viabilité des **RPMI 8226** a été augmenté dans **75 %** des puits et la [NO] a été presque constante dans **100 %** des puits .

La **Fig 38 C** montre **une absence de corrélation** entre [NO] et viabilité des **RPMI 8226**. Une corrélation très faible et négative a été remarquée **C** (**0.74%**, $r = -0.086$, $P = 0.7337$).

V.2.3. La production du NO en co-culture des MPCs (RPMI 8226) avec un nombre décroissant des des ostéoblastes (MG63)



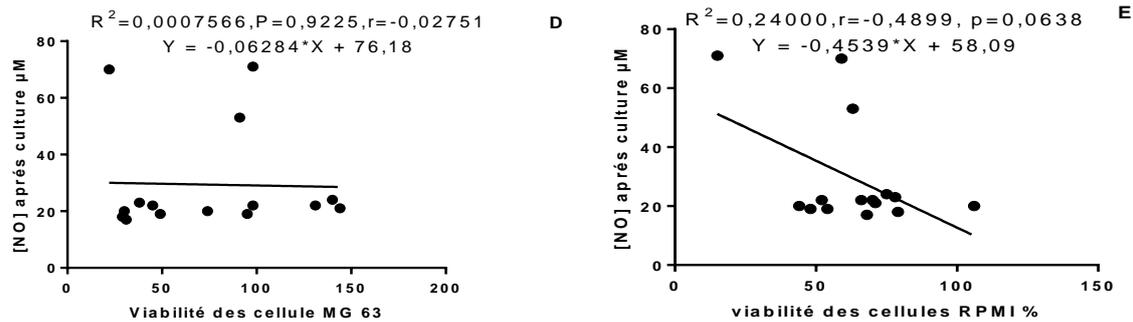


Fig 39: **A.** [NO] produit par les RPMI 8226 et les MG 63. **B.** la viabilité des MG63. **C.** La viabilité des RPMI 8226. **D.** Corrélation entre [NO] et la viabilité MG 63 en co-culture. **E.** Corrélation entre [NO] et la viabilité des RPMI 8226 en co-culture.

La moyenne de [NO] produit en co-culture des MPCs (RPMI 8226) avec un nombre décroissant des ostéoblastes (MG63) a été ($29,4 \mu\text{M} \pm 18,10 \mu\text{M}$) avec extrêmes de ($19 \mu\text{M}$ à $69 \mu\text{M}$).

La moyenne de viabilité des MPCs (RPMI 8226) en co-culture avec un nombre décroissant des ostéoblastes (MG63) a été (63%) avec extrêmes de (15% à 106%).

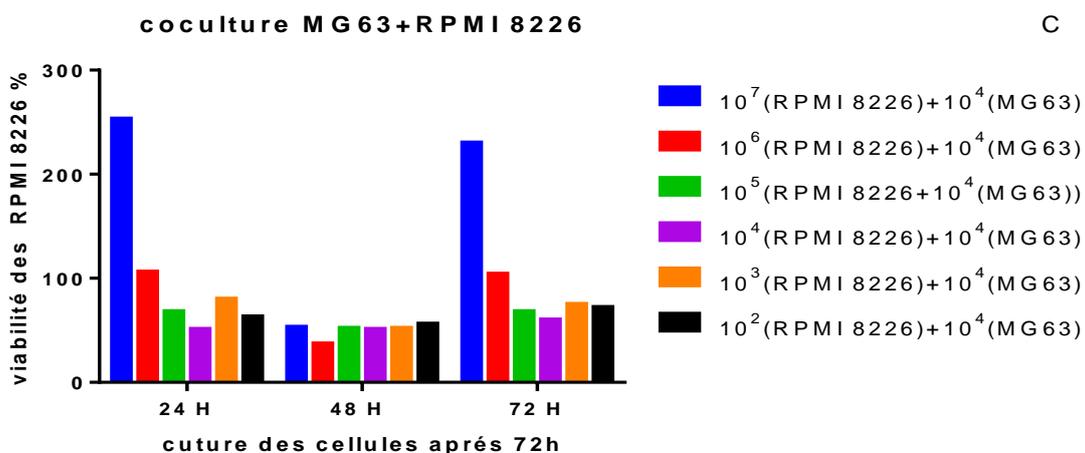
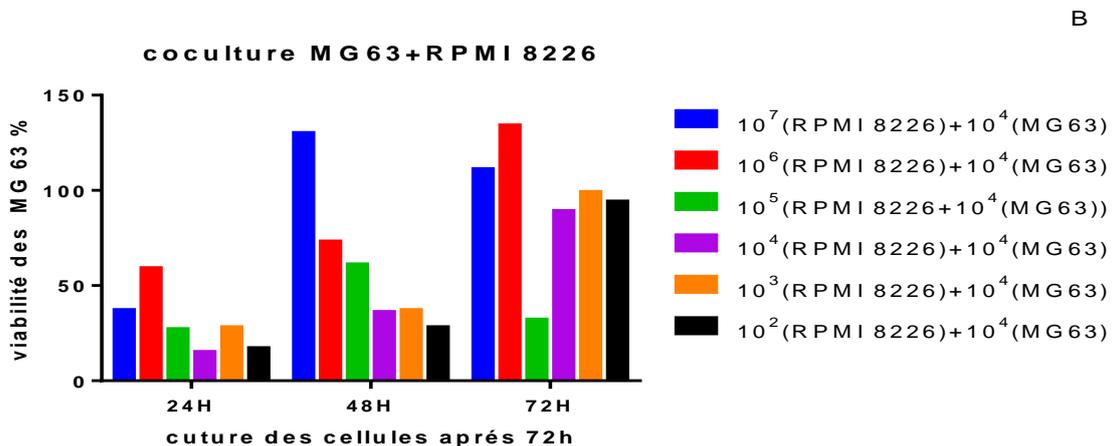
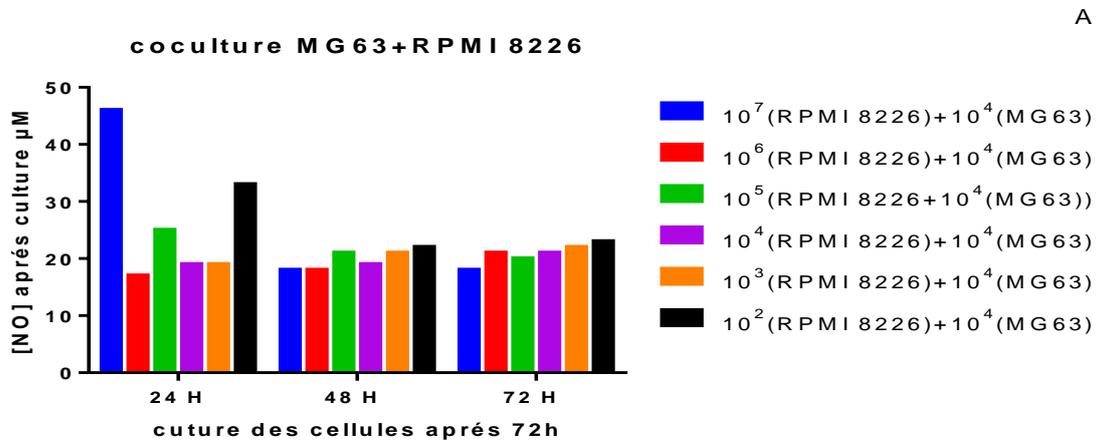
La moyenne de viabilité d'un nombre décroissant des ostéoblastes (MG63) en co-culture avec des MPCs (RPMI 8226) a été (74%) avec extrêmes de (29% à 144%).

Les résultats illustrés dans la **Fig 39A. B.C** montrent que, **après une co-culture** des RPMI avec un nombre décroissant des ostéoblastes **pendant 24 h**, plus le nombre des cellules avant culture est élevé, [NO] a été augmenté dans **80 %** des puits, la viabilité des **MG 63** a été augmenté dans **20%** des puits, la viabilité des **RPMI 8226** a été augmenté dans **40%** des puits. **après une culture de 48h et 72h**, plus le nombre des cellules avant culture est élevé, la viabilité des **MG 63** a été augmenté dans **80 %** des puits, la viabilité des **RPMI 8226** a été augmenté dans **60%** des puits et la [NO] a été presque constante dans **100 %** des puits.

La **Fig 39 D** montre **une absence de corrélation** entre [NO] et viabilité des **MG 63**. Une corrélation très faible et négative a été remarquée **D** (0.75% , $r = -0.02751$, $P = 0.9225$).

La **Fig 39 E** montre **une absence de corrélation** entre [NO] et viabilité des **RPMI 8226**. Une corrélation très faible et négative a été remarquée **E** (24% , $r = -0.4899$, $P = 0.0638$).

V.2.4. La production du NO en co-culture des ostéoblastes (MG63) par avec un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226)



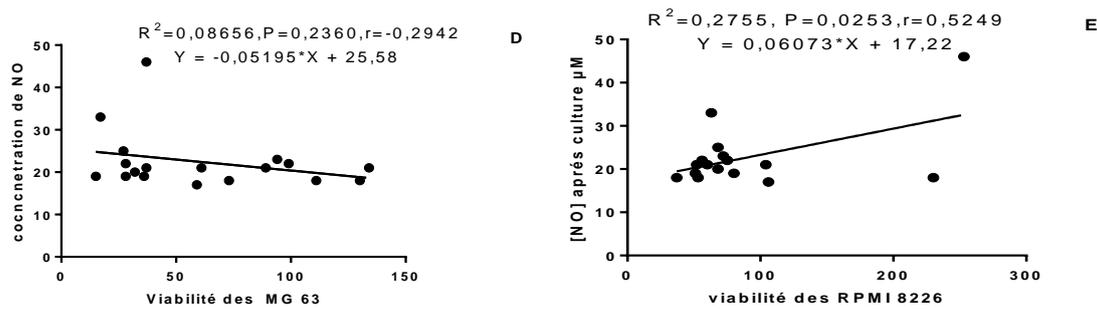


Fig 40: **A.** [NO] produit par les RPMI 8226 et les MG 63. **B.** la viabilité des RPMI 8226. **C.** la viabilité des MG63 **.D.** Corrélation entre [NO] et la viabilité MG 63 en co-culture simple **.E.** Corrélation entre [NO] et la viabilité des RPMI 8226 en co-culture.

La moyenne de [NO] produit par un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226) en coculture avec des MG 63 ($22,38 \pm 6,71 \mu\text{M}$) avec extrêmes de ($19 \mu\text{M}$ à $69 \mu\text{M}$).

La moyenne de viabilité d'un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226) en coculture avec des MG 63 a été (85%) avec extrêmes de (37% à 257%).

La moyenne de viabilité des MG 63 en coculture avec un nombre décroissant des MPCs (RPMI 8226) a été (61%) avec extrêmes de (17% à 134%).

Les résultats illustrés dans la Fig 40 A. B .C montrent que, après une coculture d'un nombre décroissant des RPMI 8226 avec des MG 63 : pendant 24 h, plus le nombre des cellules avant culture est élevé, [NO] a été augmenté dans 50% des puits, la viabilité des MG 63 a été augmenté dans 50 % des puits, la viabilité des RPMI 8226 a été augmenté dans 67 % des puits. Pendant 48h : plus le nombre des cellules avant culture est élevé, la viabilité des MG 63 a été augmenté dans 86 % des puits. La viabilité de RPMI 8226 et la [NO] a été presque constante dans 100 % des puits. Pendant 72h : plus le nombre des cellules avant culture est élevé, la viabilité des MG 63 a été augmenté dans 33 % des puits , la viabilité des RPMI 8226 a été augmenté dans 67 % des puits et la [NO] a été presque constante dans 100 % des puits

La Fig 40 D montre une absence de corrélation entre [NO] et la viabilité des MG 63. Une corrélation très faible et négative a été remarquée D (8.65% , $r = 0.2360$, $P = 0.2942$).

La Fig 40 E montre corrélation positive forte entre [NO] et la viabilité des RPMI 8226. E (27% , $r = 0.5249$, $P = 0.025$).

Discussions

L'inflammation est un acteur principal au cours de MM. La moelle osseuse, le siège du MET de MM est la clé majeure de développement et progression de ce cancer. Elle peut permettre la communication entre les plasmocytes malins et les cellules de la matrice cellulaire, par la production des facteurs inflammatoires et pro-inflammatoires favorisant la croissance et la survie des MPCs [2.3].

Le NO, l'un des principaux indicateurs d'inflammation propice au développement de tumeur, est fortement exprimé dans la moelle osseuse et est responsable de différents messages intracellulaires dans la croissance et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques normales et malignes [11]. L'association du NO avec le développement des cancers hématologiques et les complications de remodelage osseux a été largement prouvée [206.10].

C'est dans ce contexte que notre travail propose d'évaluer le rôle du NO dans la progression du cancer de MM et étudier l'effet de cette molécule sur l'éventuelle évolution d'une des complications les plus visibles : les MBD.

L'association d'ostéoporose avec une concentration élevée de (NO) a été fortement démontrée [12], ainsi la population d'étude a inclu des patients MM avec MBD, des patients OP comme « contrôles positifs » et des sujets sains témoins comme « contrôles négatifs ».

Dans le but d'analyser les critères cliniques et cytologiques des patients MM, nous avons procédé par une étude épidémiologique où l'âge, le genre, la survie, le type des Acms produits et la masse tumorale des patients MM sélectionnés ont été reportés. La moyenne d'âge était de **59 ans**. Une fréquence importante est remarquée chez les patients de **plus de 50 ans** comparativement à ceux **de moins de 40 ans**. **Saidi et al (2017)**, ont déclaré une médiane d'âge de **63 ans** et une fréquence importante de MM chez les patients entre **50 et 63 ans** [221]. Nos résultats concordent aussi avec le travail de **Saidi et al(2011)** qui ont indiqué que la fréquence de MM chez les sujets de **moins de 40 ans** ne dépasse pas **25%** en Algérie [225]. Nos résultats confortent aussi ceux trouvés par plusieurs approches épidémiologiques en Afrique et dans le monde y compris les travaux de Mrabet et al.(2010) en Tunisie [310], de Koffi et al.(2000) en Côte d'Ivoire [311], de Zannou et al.(2011) au Bénin [312], de Kakpovi et al.(2014) au Togo [313], de Bataille et al. (1997) en France [314], et de Kyle et al aux Etats-Unis [315].

L'aspect plus jeune des patients Algériens atteints de MM peut être expliqué par la jeunesse de la population dans plusieurs études [316].

Bien que l'égalité d'incidence de MM chez les deux sexes en Algérie a été rapportée par **Saidi et al. (2017)** [221], la population d'étude au cours de ce travail a représenté une prédominance féminine, ce qui contraste avec les études de **Ali et al. (2008)** [317] et les études de **Ketari et al. (2006)** qui rapportèrent la similarité de l'incidence de MM chez les deux sexes [318]. D'autres travaux ont déclaré la prédominance masculine au cours de MM [310, 319, 320] ce qui a été également confirmé par l'OMS qui prévoit que l'incidence attendue de MM chez la population mondiale (entre 2000 et 2025) pourrait arriver à 1,75 chez les hommes et 1,68 chez les femmes pour 105 habitants [221].

Le MM constitue une maladie non curable, le caractère multidisciplinaire de cette maladie peut expliquer la complexité de survie des patients MM. En effet, l'amélioration continue de ce cancer hétérogène a été largement prouvée [228]. Plusieurs études ont suggéré que la médiane de survie des patients MM est passée de 3 à 6 ans ces 20 dernières années grâce au progrès des recherches sur la compréhension de la biologie tumorale de MM et le développement des approches thérapeutiques plus efficaces [321, 322].

Plusieurs études ont rapporté que la survie des patients MM pourrait se prolonger de quelques mois à **15 ans** ou plus [323]. La survie de nos patients (**survie de plus de 20 mois, 58 %**) représente une fréquence très importante. Ces résultats sont proches de ceux des études de classification de Salmon et Durie liées aux patients MM en stade III « **environ 29 mois** » [253]. La survie prolongée qui est relativement notable pourrait être due à l'aspect plus jeune de la population dont plusieurs études ont confirmé l'impact d'âge sur la survie des patients MM [324]. Ces données concordent également avec l'étude de **Mohammadi et al (2017)** qui ont affirmé qu'à partir des années **1990**, la survie des patients MM en Algérie s'est significativement améliorée avec la mise en place des approches thérapeutiques avancées [325].

Ces auteurs ont rapporté que, malgré le nombre élevé des patients Algériens MM avec un stade III (**82%, entre 2008-2015**), la durée de survie était de **30 mois** et le taux de rémission était augmenté [325].

La survie très courte de certains de nos patients (**6 à 12 mois**) pourrait être expliquée par le caractère progressif de la maladie et surtout le retard de diagnostic. Ceci est supporté aussi par les données de **Mohammadi et al. (2017)** qui ont suggéré que le manque d'étude génétique sur les patients Algériens et le retard de diagnostic peut influencer les résultats de survie des patients MM [325].

Les résultats épidémiologiques ont également montré une prédominance des **MM à IgG κ** , à **CLL** et à **IgA κ** respectivement à côté d'une fréquence modérée de **MM à IgG λ** et à **CLL λ** et quelque cas de **MM à IgE** et à **IgD**. Cette répartition est largement proche des résultats de **Saidi et al.(2017)** et **Mohammadi et al.(2017)** qui ont rapporté que les types majeurs des Ig sécrétées par la patients MM en Algérie sont **les IgG, les IgA et les CLL**[221.325]. Nos résultats sont similaires aussi à plusieurs données épidémiologiques rapportées **en Tunisie** [326], **au Maroc** [327], **en Afrique** [313] et **aux EtatsUnis**[328].

Le myélogramme médullaire est le révélateur du MM dans **61%** des cas en Algérie [329]. Dans la présente étude, le taux moyen d'infiltration médullaire des **plasmocytes** a été de **35%**. La masse tumorale (MPC) de **10 à 30%** représente la fréquence la plus importante comparée aux MPC de **30 à 50%** et **plus de 50%**.

L'envahissement des plasmocytes qui a été observé par l'étude médullaire chez nos patients a été compatible avec les manifestations de la maladie de MM et les critères de **Salmon et Durie** décrits précédemment, dont MPC% est supérieur à 10% chez la plupart des patients étudiés [228]. Ces résultats concordent avec ceux de **Saidi et al (2017)** et **Mohammadi et al.(2017)**, qui ont trouvé que **89,79%** des cas ont une infiltration des MPC médullaire **supérieure à 10%** chez les patients MM en Algérie [221.325].

Selon certaines études il serait possible de prédire le stade de MM à partir de MPC% ,trois étapes ont été suggérés (**stade I : 20%**, **stade II : 20-50%**, **stade III : plus de 50% des MPC**) [330] . Ces données appuient nos résultats (stade III avec complications osseuses).

Tenant compte de la complexité des critères épidémiologiques qui est largement associée aux manifestations symptomatiques et cliniques de MM [227] et afin d'étudier le rôle du NO comme messager intra cellulaire favorisant le développement de ces manifestations, il a été indispensable de développer une étude approfondie sur la quantification et le dosage de ce paramètre dans notre population d'étude.

La fonction de NO est largement basée sur la concentration produite dans un microenvironnement particulier [331]. La quantification de NO dans les échantillons biologiques représente un grand défi pour les scientifiques [332]. L'estimation directe du NO devient très difficile à cause de la durée de vie très courte et son oxydation rapide avec plusieurs composants dans les systèmes biologiques. La littérature scientifique a également fait état d'une grande variabilité dans la mesure du NO entre $2\mu\text{M}$ jusqu'à $17\mu\text{M} - 44\mu\text{M}$ chez

les individus sains [333]. Beaucoup de travaux ont été effectués dans le but de parvenir à une méthode de haute performance et une meilleure fiabilité dans le cadre de la précision, la spécificité, la sensibilité avec un minimum d'interférences [334].

La méthode de Griess a été la plus utilisée dans la mesure du NO et les chercheurs utilisent couramment la somme des métabolites stables (nitrate et nitrite (NO_x)) comme indicateur de sa concentration dans les milieux biologiques [335]. Les kits de la méthode de Griess sont généralement variés selon la base de réduction de nitrate utilisée (protocole à base de cadmium ou enzymatique) et de déprotéinisation des échantillons (produits chimiques ou, Ultrafiltration) [336]. Les scientifiques ont trouvé que les kits enzymatiques et la précipitation avec les méthodes chimiques sont moins coûteux et plus rapide et couramment utilisés par les laboratoires [337]. Dans cette étude, et dans le but d'étudier le taux du NO et ses métabolites NO_x (nitrite et nitrate) et de diminuer la variabilité et tester la fiabilité de quantification du NO plasmatique chez les trois groupes de notre population, nous avons procédé à la quantification du NO_x en utilisant deux kits commerciaux à base enzymatique Arbor assays et R&D. Ces kits de haute sensibilité contiennent des réactifs de la réaction de Griess. Afin de se rapprocher de la concentration réelle, différentes méthodes de déprotéinisation sont discutées.

Plusieurs études ont prouvé que la concentration élevée de NO dans les échantillons biologiques est due à une concentration élevée des protéines et une déprotéinisation inadéquate [338]. La précipitation des protéines au cours de la quantification de NO par la méthode de Griess constitue un défi pour les scientifiques. C'est une étape très importante et nécessaire au cours de la préparation des échantillons qui peut influencer les concentrations de NO obtenues [339]. Différentes méthodes ont été testées pour trouver un mécanisme d'élimination optimale des protéines qui n'interfèrent pas avec la réaction de Griess où plusieurs chercheurs se sont accordés à éviter l'utilisation des solvants organiques et les ammonium de sulfate et de sodium; ces méthodes sont non recommandées à cause des résidus protéiques restant dans le milieu précipité et l'interférence de ces composants avec la réaction de Griess. Les scientifiques se limitent aujourd'hui à l'utilisation de TCA et Zn₂So₄ où les résultats sont très proches [339.340.341] Pour toutes ces raisons, la précipitation avec le TCA a été choisie pour le dosage de NO dans ce travail.

La variabilité de quantification du NO plasmatique a été confirmée dans cette étude, dont les résultats de similarité et corrélation entre la concentration de NO_x dosé avec les deux kits Arbor assays et R&D, montrent une différence importante ainsi qu'une absence de corrélation

significative entre les deux kits chez les trois groupes. Malgré la variabilité qui a été enregistrée, des teneurs élevées de NO ont été détectés au niveau des plasmas des patients MM par rapport aux patients OP et sujets témoins en utilisant les deux kits.

En calculant la moyenne de concentration de NOx dosé avec les deux kits, une production accrue du NO chez les patients MM a été confirmée. Ces résultats concordent avec les données de la littérature, qui ont déclaré que la concentration élevée de NO plasmatique a été associée à plusieurs cancers hématologiques tels que la leucémie et cancers solides, incluant le carcinome colorectal, le carcinome hépatocellulaire, le Cancer de la cavité auriculaire, le cancer du mélanome, le cancer du sein, le cancer gastrique [69]. Nos données sont également en accord avec l'étude récente de Parween et al (2017) qui ont trouvé une différence très significative entre la concentration de NO plasmatique chez 100 patients MM comparés aux sujets sains [342]. R.V.Mendes et al. (2001) ont observé une forte expression d'iNOS(100%) dans les cellules tumorales provenant du MM par rapport à l'expression de NOSe et NOSn qui a été respectivement de 30% et 50% [343].

Le niveau élevé de NO chez les patients MM pourrait être un marqueur majeur de l'état d'inflammation au cours de ce cancer. Afin d'évaluer le statut inflammatoire chez les patients MM, nous avons procédé à la quantification de l'un des marqueurs d'intérêt reconnu au cours de la réponse inflammatoire systémique, la CRP [344]. Les résultats obtenus ont révélé des teneurs élevées de (CRP) plasmatique chez les patients MM par rapport aux patients OP et sujets témoins. Cela pourrait être expliqué par les réactions et les processus inflammatoires diffusés dans le MET de MM [228]. Ces données ont été également supportées par plusieurs études qui ont indiqué que la production de CRP est principalement régulée par (IL-6), le facteur clé fourni par les cellules de la moelle osseuse et responsable de la croissance et la survie des MPCs [345,228]. Klein et al (1991) ont rapporté une diminution de CRP sérique chez les patients MM après la perfusion d'AcM anti-IL-6 [346]. D'autres études ont confirmé que la CRP représente un marqueur de pronostic significatif et très important au cours de MM. Bataille et Klin(1998) ont proposé une classification de pronostic simple pour les patients MM en utilisant la β_2m et la CRP. Les auteurs ont décrit l'association entre la concentration élevée de CRP sérique, la prolifération de plasmocytes et le taux de β_2m [247]. L'étude de Brown et al (2015) a indiqué par contre que la CRP ne reflétait pas nécessairement les changements de l'évolution de la maladie [348]. d'autre part, il a été démontré que la CRP peut augmenter significativement la synthèse de NO exprimé dans diverses conditions inflammatoires particulières [349]. Notre travail a enregistré l'absence

d'une corrélation entre la concentration plasmatique de CRP et le NO ; ceci pourrait être expliqué par le nombre limité des échantillons. Aussi, il a été démontré que le dosage de CRP pourrait être influencé par certaines conditions liées aux patients et ne semblent pas être liées à l'inflammation impliquant les polymorphismes génétiques, l'ethnicité, les différents régimes alimentaires, et l'obésité [350].

Le NO a été pris comme marqueur pronostique corrélé positivement avec le grade tumoral et la survie des patients au cours de plusieurs cancers. Il peut influencer divers aspects de la biologie tumorale [69]. Pour étudier l'effet de NO et comprendre son rôle physiopathologique chez les patients MM, nous avons examiné l'éventuelle relation entre la concentration de NO plasmatique et certains marqueurs de pronostic épidémiologique et clinique du MM, notamment, l'âge, le genre, le type des Acms produits, la survie, la masse tumorale (PMC%), la concentration des Acms, la concentration de β 2microglobuline et le rapport des chaînes légères κ / λ .

L'influence du genre au cours de MM a été clairement prouvée par la littérature. Plusieurs études ont confirmé le rôle des modifications hormono-sexuelles chez les femmes et les hommes dans le développement de ce cancer [351]. L'étude de l'influence du sexe dans ce travail montre une prédominance féminine représentant un niveau élevé de NO en comparant au sexe masculin. Ces données ont été supportées par de nombreuses études qui ont montré l'implication des hormones sexuelles dans la régulation de la fonction de NO au cours de plusieurs cancers. Nos résultats vont dans le sens indiqué par Knappet al (2013) qui ont rapporté que les œstrogènes peuvent favoriser l'échappement d'apoptose en modifiant l'expression d'iNOS [352].

L'âge représente un marqueur de mauvais pronostic au cours de MM [324]. Notre travail montre une concentration élevée de NO chez les patients plus de 65 ans par rapport aux patients moins de 65 ans, une différence très significative a été notée entre les deux tranches d'âge. Nos résultats sont appuyés par plusieurs études qui ont prouvé que le macrophage peut augmenter la synthèse de NO avec l'âge [354].

L'étude de concentration de NO selon le type des Acms produits a montré des teneurs très élevés chez les patients MM à chaîne légère libre représentant une prédominance dans la population. Plusieurs études ont rapporté que ce type de MM constitue un mauvais pronostic, et qu'il est fortement associé à des complications majeures telles que l'atteinte rénale et l'hypercalcémie [354].

Dispenzieri et al. (2008) ont trouvé un dysfonctionnement tubulaire chez presque tous (98%) les patients MM à chaîne légère libre [355]. L'étude de Donald. (1968) a également confirmé par une technique d'immunofluorescence l'accumulation des chaînes légères kappa et lambda dans la lumière rénale des patients avec une insuffisance rénale [356]. Donc, en fonction de leur tropisme pour les structures glomérulaires ou tubulaires, les chaînes légères peuvent provoquer une amylose, une maladie de dépôt en chaîne légère, une néphropathie, une destruction tubulaire plus souvent associée avec une lésion rénale aiguë [357]. Ce processus est associé généralement à la production des facteurs et cytokines pro-inflammatoires, dont plusieurs études ont confirmé l'association étroite de la production accrue de NO et l'évolution de l'insuffisance rénale et la néphropathie [358]. Ces résultats donc ont renforcé notre hypothèse qui suppose l'association de la production de NO avec la progression de certaines complications de MM

Dans ce travail, des teneurs élevées de NO ont été également remarquées chez les patients MM à IgA et à IgG, représentant une fréquence très importante, comparativement à la concentration de NO chez les MM à IgD et à IgE qui sont très rares et pareil au MM à chaîne légère.

Ces résultats ont été supportés par l'étude de Kearney et al. (2011) qui ont observé une immunofluorescence intense des IgG dans la lumière rénale des patients atteints d'insuffisance rénale [359]. Nos données également concordent avec plusieurs recherches rapportant l'implication de NO dans la synthèse des immunoglobulines. Stena et al. (2016) ont trouvé que le NO iNOS-dépendant peut réguler la production d'IgA sécrétoire par l'expression des facteurs qui peuvent influencer la commutation de classe des cellules B vis-à-vis des antigènes thymo-dépendants et thymo-indépendants. Les auteurs ont déclaré que, les taux sériques d'IgA et d'IgG_{2b} chez les souris dépourvues de gène INOS (iNOS²⁻) ont été significativement plus faible comparativement au contrôle tandis que les taux sériques d'autres sous-classes d'immunoglobulines n'ont pas été affectées [360]. Nos données sont aussi en accord avec les travaux de Sato et al (2003) qui ont déclaré que le traitement des cellules plasmiques par IL6 et (iNOS) peut favoriser la sécrétion des IgA [361].

L'étude de la concentration de NO selon la durée de survie des patients a montré des teneurs très élevées chez les patients MM avec une survie de plus de 20 ans et qui a été supérieure à celle des patients avec une survie de 20 mois, 7 mois, 6 mois et de 12 mois respectivement, ainsi qu'une différence très hautement significative entre la concentration du NO chez les

patients MM avec une survie de plus de 20 mois et une survie de 6 mois a été remarqué .Ces résultats concordent relativement avec plusieurs travaux rapportant l'association de l'expression d'INOS et la survie des patients atteints de MM .Le travail de Botta et al (2016) a étudié le rôle de 20 gènes responsables des processus inflammatoires dans la progression et la survie des patients au cours de MM.L'étude a déclaré que le gène INOS était parmi les 8 gènes qui ont été indépendamment corrélés à la survie des patients MM. Les auteurs ont expliqué les résultats par l'implication de NO dans le recrutement des cellules immunitaires, les macrophages, les neutrophile et les LT ,ce qui s'accompagne par l'augmentation de la production des cytokines principalement suppresseurs de tumeur, favorisel'amplification de la réponse Th1(TIL cytoxique), et peut conduire ainsi à une augmentation de ladurée de survie des patients MM [362]. Par ailleurs, une absence de corrélation significative entre la concentration de NO et la survie des patients MM a été remarquée dans notre travail, ce qui pourrait être expliqué par la taille réduite des échantillons.

La ponction médullaire peut fournir des informations importantes pour évaluer le diagnostic de MM et prédire la progression et l'état de maladie. Il a été rapporté que 5% et plus des MPC% dans la moelle osseuse est un facteur de risque indépendant de progression [228]. Dans ce travail, l'étude de la concentration de NO selon la masse tumorale représente une concentration élevée chez les patients avec MPC% entre 10 et 30% comparativement aux concentrations de NO chez les patients avec MPC% supérieure à 30%.Prenant en compte la cinétique de la prolifération des plasmocytes, MPC% de 10 à 30% correspond à un critère mineur de diagnostic de MM tandis que MPC% supérieurs à 30% constitue le critère majeur de la maladie. Nos données donc pourraient être expliquées par les études de Botta et al (2016) cité précédemment, dont le NO pourrait être un agent important dans la réponse immunitaire diffusée dans le microenvironnement MM impliqué dans la suppression et la cytotoxicité des cellules tumorales (MPC) [362]. Nos résultats ont montré une absence de corrélation significative entre la concentration de NO et le pourcentage de masse tumorale (MPC%) ainsi qu'une absence de différence significative entre la concentration de NO chez les patients MM avec MPC de 10 à 30% et supérieur à 30% a été enregistré. En plus de la taille réduite de l'échantillon des patients recrutés dans notre population, ces données pourraient être expliquées par la nature inégale de la moelle osseuse qui peut influencer l'étude cytologique et rendre l'interprétation plus difficile. Des chercheurs ont trouvé que la variété des résultats de l'examen médullaire constitue l'une des causes les plus fréquentes d'échec de rémission des patients MM [253]. Il a été rapporté qu'environ 50% à 100% des

variations des MPC% a été enregistré au cours de MM. Le MPC% a été très petit au départ, et les estimations visuelles peuvent fournir une réduction de 50% des MPCs réelle [268] . La moelle osseuse donc ne présente pas toujours des signes d'atteinte typique de MM [253] .De plus, d'autres études ont prouvé que le myélogramme est effectué dans des parties minces d'échantillon contenant uniquement des cellules individuelles clairement visibles et très loin des particules où les PCM sont souvent regroupées. Cette approche a été confirmée par les hématologues qui ont déclaré la présence d'une agrégation focalisée des PCMs, bien que cette partie ne soit pas incluse dans le pourcentage indiqué dans le myélogramme [263] . En outre, certaines études ont trouvé que le myélogramme ne montre pas souvent des plasmocytes monoclonaux comparativement aux techniques moléculaires plus sensibles (réarrangements des gènes et cytométrie en flux) [253]. Afin de minimiser l'erreur d'échantillonnage de myélogramme, d'autres marqueurs clinique doivent être rajoutés pour le diagnostic de MM et évaluer l'état de malade incluant : Le taux sérique de β_2M , le taux d'Acm, S-FLC (serum free light chain) (le dosage de chaîne légère libre sérique) (le dosage Freelite) et le R k/ λ .

Le β_2M est un facteur de pronostic important et plus utile chez les patients atteints de MM [228]. L'augmentation de ce marqueur est fortement associée à un mauvais pronostic. Plusieurs études ont trouvé que le taux sérique de β_2M et le stade clinique, sont les facteurs de pronostic les plus significatifs pour la survie des patients comparativement aux autres marqueurs associés à un pronostic plus sombre [227] . Des études ont déclaré une différence importante entre la survie des patients de stade III avec un taux élevé de β_2m (aucun survivant à 5 ans) et les patients de stade I avec un taux normal (durée de vie plus de 5 ans) [264].

Dans ce travail, un taux de β_2m anormal (Stade III > 3.5 mg/l) a été observé chez 85% des patients recrutés avec une moyenne de (16,49mg/l) et des extrêmes de (2.11 mg/l à 120.45mg/l). De plus, la concentration de NO chez les patients avec le taux de β_2m >3.5mg/l a été supérieur à celle des patients avec un taux $\beta_2m \leq 3.5mg/l$, ce qui est soutenu relativement par les données de stade clinique et survie des patients recrutés [253].

L'absence de corrélation significative entre la concentration de NO et la concentration de β_2m chez les patients MM dans notre travail pourraient être supportées par les travaux de Kyle et al (2009) qui ont trouvé que le taux de β_2m au cours de MM ne peut pas fournir une bonne estimation de masse tumorale [265]. La quantité d'Acm sérique est utilisée pour mesurer la charge tumorale et le statut de MM [366]. Dans ce travail, un taux d'Acm anormal (>30g/l) a été observé chez 37% des patients MM avec une moyenne de (20.29 g/l) et des extrêmes de

(1.9 g/l à 50.4g/l).ce qui n'a pas été d'accord avec les données de la littérature et la classification de Salmon et Durrie (stade III>30g/l)des patients recrutés [227].

Nos données ont également montré que la concentration de NO chez les patients avec Acm ≤ 30 g/l est supérieure à celle des patients avec Acm >30g/l et une absence de corrélation significative entre la concentration de NO et la concentration des Acm. Ces résultats pourraient être supportés par plusieurs études qui ont déclaré que le rapport des Acms est relativement insensible dans les laboratoires et ne permet pas d'évaluer la quantité réelle des protéines sériques M au cours de MM [367]. La limite des échantillons également pourrait être un facteur raisonnable influençant nos résultats. Prenant en compte les inconvénients de dosage d'Acm qui il est insensible, depuis 2001, l'utilité clinique de l'examen CLLs a été largement prouvée. Ce test joue un rôle central dans le dépistage, l'évaluation de progression et la réponse au traitement des patients MM [368]. Le niveau normal d'un type de CLL (k ou λ) dans le sang est environ (10 mg/l) [369]. Au cours de ce travail ,le taux sérique de CLL a montré des valeurs anormales (>10mg/l) chez 98% (CLL κ) et 83%(CLL λ) des patients MM, avec une moyenne de (CLL κ 274.57 mg/l)(CLL λ 1607.57 mg /l). Nos donnée sont également montré que la concentration de NO chez les patients MM avec CLLs(>10mg/l) est supérieure à celle des patients avec concentration de CLLs (≤ 10 mg/l).Plusieurs travaux ont suggéré que le taux des CLL peut fournir des informations pour détecter la clonalité et suivre les changements dans la sous-structure clonale au fil du temps [370], ainsi , l'association de CLLs élevée avec les caryotypes complexes et anormaux et la charge plasmocytaire élevée a été fortement confirmé. Nos données peuvent donc supposer l'implication de NO dans la carcinogenèse et la prolifération anarchique des MPCs [371]. Cependant, une absence de corrélation significative entre la concentration de NO et le taux sérique de CLLk et λ a été remarquée dans ce travail

Le R κ/λ est un rapport puissant pour le diagnostic et la surveillance de MM, si le niveau de CLL κ ou CLL λ est très élevé ou faible, le rapport est anormal <0.26 ou >1.65, ce qui indique que le myélome est actif. Si les niveaux des deux types CLL κ et CLL λ sont augmentés, le rapport peut être dans la plage normale, ce qui indique généralement une maladie autre que le MM tel que l'insuffisance rénale [369]. Un R k / λ anormal (<0.26 ou >1.65) a été observé chez 83% des patients MM dans notre étude avec une moyenne de 274.57 et des extrêmes de (0.0019et2066.29). Cela concorde avec les travaux de Fleur et al (2007) qui ont trouvé qu'entre 70% et 100% des patients MM présentent un R k / λ anormale. Plusieurs travaux ont déclaré qu'un niveau augmenté de R k / λ est toujours associé de manière significative à une

diminution de durée de survie, ainsi qu'une corrélation positive a été confirmée entre ce rapport $R_{\kappa/\lambda}$ et l'infiltration des MPC dans la moelle osseuse [369]. D'autres études ont aussi confirmé l'association entre $R_{\kappa/\lambda}$ à chaque stade de l'ISS ainsi que sur la base de $R_{\kappa/\lambda}$ et la concentration de β_2m [371].

Nos résultats ont également montré que la concentration de NO chez les patients MM avec un $R_{\kappa/\lambda} < 0.26$ ou > 1.65 est supérieure à celle des patients avec un $R_{\kappa/\lambda}$ entre 0.26 et 1.65. Il a été démontré que les patients avec $R_{\kappa/\lambda}$ significativement anormal ont une charge tumorale plus importante, une progression plus agressive et un pronostic défavorable. Certaines études ont montré que les anomalies cytogénétiques étaient associées fortement à un $R_{\kappa/\lambda}$ élevé [371]. Nos données peuvent supporter d'implication du NO dans la carcinogenèse des MPC.

Une absence de corrélation significative entre la concentration de NO et $R_{\kappa/\lambda}$ a été remarquée, ce qui pourrait être expliqué par les études de Radocha J et al (2015) qui n'ont pas détecté une association entre le $R_{\kappa/\lambda}$ et la cytogénétique [373], ainsi que les travaux José Luis et al (2016) qui ont déclaré que le $R_{\kappa/\lambda}$ est associé à des patients MM au stade 2 de l'ISS, mais pas aux stades 1 et 3 [371].

Dans ce travail, l'étude de corrélation du NO avec certains marqueurs de pronostic de MM a fortement imposé l'hypothèse de l'implication de cette molécule dans la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale et l'évolution de certaines complications associées à cette maladie. Afin de se rapprocher du rôle régulateur du NO dans la réponse immunitaire au cours de MM, le niveau des cellules immunitaires des patients recrutés (indiqué dans le myélogramme et l'FNS) ainsi que la corrélation de la concentration de NO avec la charge immunitaire ont été étudiés.

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (LIT) constituent la forme majeure d'inflammation locale au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale [244]. Il a été démontré que la MO est un réservoir des lymphocytes spécialement LT avec une activité anti-tumorale remarquable adaptée aux antigènes des MPCs [297]. Bien que les patients de cette étude représentent un stade tardif de la maladie, les données de myélogramme et l'FNS ont montré que les patients MM avec un taux de LIT et LS normal représentent une fréquence très importante comparativement aux patients avec un taux de LIT et LS supérieure à la fourchette normale. Nos résultats peuvent confirmer l'association de MM avec les anomalies numériques du sous-ensemble immunitaire et la capacité des MPCs à modifier le microenvironnement local de MO et moduler l'immunité de l'hôte pour soutenir leur croissance et leur

échappement immunitaire [374.375]. Nos données s'accordent avec les travaux de Sze et al. (2001) qui ont trouvé une relation étroite entre le pourcentage réduit des lymphocytes T et un mauvais pronostic chez les patients atteints de MM [376], ce qui a été confirmé aussi par Marcin et al. (2014) qui ont n'ont pas enregistré une différence entre les pourcentages de LT activés chez les patients MM et les sujets témoins [377] Chapoval et al 2001 ont expliqué ces rapports immunitaires modifiés par la surexpression des molécules co-inhibitrices dans la MO qui ont été impliquées dans le dysfonctionnement immunitaire au cours de MM [378] D'autre travaux plus approfondis suggèrent un rôle critique de LT contribuant à la tumorigenèse et à la progression de MM. Douglas et al (2008) ont démontré que l'accumulation de Treg dans la MO des patients MM a été mise en parallèle par la diminution des fonctions effectrices de T et cellules NK [379].

Le dysfonctionnement de NKT peut également inhiber l'immunité anti-tumorale des patients MM. Terabe et al (2000) ont déclaré que les NKT peuvent supprimer l'immuno-surveillance des tumeurs sur la base de leur production accrue des cytokines Th2 [380]. Une autre sous-population des LT a été signalée par les chercheurs, les Th17, plusieurs travaux ont trouvé que la MO des patients atteints de MM présente une augmentation de Th 17 par rapport aux témoins qui sont impliqués fortement dans l'inhibition des lymphocytes et favorisent la croissance des cellules MM [382. 381].

Dans le myélome, les interactions immunitaires hôte-tumeur sont très complexes .Les résultats illustrés dans ce travail concordent en partie avec plusieurs études rapportant la variabilité de la charge immunitaire chez les patients MM [382]. La fréquence modeste des patients MM recrutés avec un taux LIT et LS supérieurs à la fourchette normale n'éloigne pas l'intervention des effecteurs immunitaires notamment les lymphocytes infiltrant la moelle osseuse dans la réponse immunitaire anti-tumorale au cours de MM, ce qui a été confirmé dans la littérature [376. 377]. Plusieurs observations cliniques ont rapporté des phénomènes immunologiques actifs chez les patients MM qui consistent à des tentatives partiellement réussies du système immunitaire spécialement les LT cytotoxiques, les NK et les NKT de l'hôte pour supprimer les MPCs [377]. Les patients MM qui peuvent clairement montrer un contrôle de leur malignité pendant de nombreuses années avec une stabilité au niveau de MP ont confirmé une destination d'une immno-homéostasie entre le MM et l'hôte [379]

Malgré la fréquence modérée des patients recrutés avec un taux de LIT et LS élevé, il a été remarqué qu'ils ont un taux très élevé de NO. Aussi, une différence très hautement

significative a été remarquée chez les patients MM avec TIL% entre 5% et 20% et inférieur à 5%. On peut suggérer selon ces données que, plus la concentration de NO est élevée, plus le taux de LIT et LS est très élevée. Cette approche pourrait être supportée fortement par plusieurs études qui ont rapporté l'implication de NO dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative en modulant la balance Th1/Th2. Meera et al (2014) ont trouvé que l'INOS peut favoriser fortement la production des cytokines Th1 (L'IL-12, IFN- γ , TNF : le facteur de nécrose tumorale) qui ont été remarqué un taux très élevé au cours de MM [153.382]. Nos données s'accordent aussi avec les travaux de Yang J (2013) qui ont démontré que le NO favorise la différenciation de Tho en sous-population de LT, notamment les Treg et les th17, dont le rôle dans le MM a été décrit précédemment [155.379.381.382]. De plus, nos résultats pourraient être soutenus par les études de Hiram et al. (2014) qui ont rapporté l'association de la concentration élevée de NO avec l'action cytotoxique de LTC et la régression tumorale au cours des cancers hématologiques notamment, les lymphomes [383]. Bogdan C et al (2001) ont prouvé que les cellules NK peuvent favoriser la destruction des cellules tumorales en utilisant la molécule de NO [60]. En revanche, le rôle du NO dans le dysfonctionnement des lymphocytes immunitaires a été aussi confirmé par Mieke et al. (2014) qui ont trouvé que le NO peut influencer la régulation des cytokines immunosuppressives qui représentent un rôle majeur dans le dysfonctionnement immunitaire au cours de MM particulièrement IL10 et TGF B [386]. Ainsi Massini et al. (2013) ont trouvé que le taux de NO élevé peut réguler la voie Fas-Fas-L qui constitue l'acteur principal pour l'inhibition et l'apoptose des lymphocytes notamment les LT chez les patients MM [194.388].

Nos données représentent un myé % inférieur à la fourchette normale chez presque tous les patients MM recrutés. En plus de la ligne lymphoïde infiltrant la tumeur, les progéniteurs myéloïdes au cours de MM pourraient être représentés spécialement par les MDSC (suppressives dérivées des myéloïdes), un sous-ensemble hétérogène de lignée myéloïde immature avec une activité immunosuppressive importante [386]. Nos résultats concordent avec l'étude de Barbara et al (2011) qui n'ont pas trouvé une corrélation entre les MPCs et la fréquence des MDSCs infiltrant la MO chez les patients MM [375]. Nos données sont aussi soutenues par l'étude de Jinheng et al (2016) qui ont déclaré que les MDSCs s'accumulent dans la MO pendant le développement de MM chez les patients nouvellement diagnostiqués [309]. Ainsi, il a été démontré que la fréquence des MDSCs a été similaire chez les patients MGUS et les patients MM. Ces observations peuvent donc supporter les données de notre

étude, malgré l'activité immunosuppressive des MDSCs largement rapportée au cours de MM, la charge tumorale ne présente pas le moteur principal pour induire l'accumulation de ces cellules [375].

Une absence de corrélation entre le myé % et la concentration du NO a été remarquée dans ce travail. En effet, le rôle de NO dans la régulation de l'activité des (MDSCs) au cours de MM était largement rapporté dans la littérature [386,376, 388]. Il a été démontré que les MDSCs exercent leur activité immunosuppressive dans plusieurs types de cancers solides et hématologiques à travers les deux enzymes arginase 1 (ARG1) et (iNOS). Drass et al. (2014) ont trouvé que pendant l'inflammation chronique ou la tumorigenèse, les MDSCs peuvent favoriser l'épuisement en L-arginine et provoquer l'arrêt de la prolifération de différents types cellulaires y compris Les LT et NK en agissant sur les régulateurs du cycle cellulaire. Yinhui et al. (2017) ont déclaré que la libération de NO au cours de MM pour améliorer l'activité immunosuppressive de MDSC [388]. De plus, Il a été démontré que les exosomes libérés par les MDSCs sont impliqués également dans la régulation des voie STAT3 et NFkB afin d'augmenter l'expression d'iNOS au cours de MM. Il est intéressant de noter aussi que la MDSC est fortement impliquée dans l'angiogenèse, la croissance et la survie des MPCs via la sécrétion de plusieurs molécules incluant le NO [304].

Les lignées myéloïdes matures chez les patients MM recrutés ont été représentées spécialement par les granulocytes associés à la tumeur (GAT) et les granulocytes de sang périphérique (GS) [389], nos résultats représentent un niveau élevé des GAT qui a été supérieur aux valeurs normales chez presque tous les patients MM recrutés, et s'accompagne par un niveau diminué des granulocytes systémiques (une fréquence importante des patients MM avec une valeur normale de grany%), ce qui est du probablement a la migration de ces cellules vers le site de tumeur (la MO). Les chercheurs ont largement rapporté le rôle majeur des granulocytes, notamment les neutrophiles, dans le développement de divers types de cancer, y compris le MM [390]. Nos données sont fortement supportées par plusieurs études qui ont prouvé l'implication des granulocytes dans le dysfonctionnement immunitaire et la progression de MM, Nous citons les travaux de Parrinello et al (2013) qui ont trouvé que les neutrophiles isolés des patients MM représentent une capacité phagocytaire réduite et une fonction immunitaire altérée, ce qui peut favoriser l'inhibition de l'activité de LT [391]. Nos résultats s'accordent aussi avec les travaux de Camille et al. (2016) qui ont déclaré que les neutrophiles infiltrant la tumeur constituent un facteur clé et nécessaire pour la différenciation et la maturation des MPCs [304]. Ainsi, plusieurs études ont trouvé que les neutrophiles sont

impliqués dans la chimiorésistance de MM par la production des cytokines et facteurs de croissance influençant la croissance de MPCs [392]. Il a été démontré aussi que les éosinophiles peuvent augmenter les effets immunosuppresseurs dans le microenvironnement de MM et peut induire le dysfonctionnement de LT tumoral [392,393]. En utilisant des modèles de souris de MM Wong et al (2014) ont trouvé que l'épuisement des éosinophiles par le blocage de l'IL-5 a fortement réduit la charge tumorale de MM [392]. Ceci a été confirmé par les études in vitro de Chu et al. (2011) qui ont démontré que le surnageant d'éosinophiles était suffisant pour induire une prolifération des MPC [394]. En effet, les scientifiques ont prouvé que le niveau élevé de TAG qui s'accompagne par une lymphopénie (le cas de la plus part des patients recrutés dans cette étude) constitue un marqueur important pour la prédiction de l'inflammation locale et le dysfonctionnement immunitaire au cours de MM, ce qui reste susceptible d'avoir un pronostic médiocre et une survie courte des patients MM [395].

Nos résultats ont montré une corrélation significative entre la concentration de NO et le pourcentage ainsi que le nombre des granulocytes systémiques. Nous avons remarqué également que la concentration de NO chez les patients MM avec un nombre et un pourcentage des GS est supérieure à celle des patients avec un nombre et un pourcentage des GS. Nos résultats sont appuyés par l'étude de Anupam et al (2013) qui ont trouvé que la transcription d'INOS est présente de manière constitutive chez les neutrophiles des hommes et souris, le NO se trouve dans le cytosol, dans les granules et dans d'autres organites subcellulaires des neutrophiles [396]. Aussi, nos données sont fortement soutenues par les travaux de Nataša et al (2013) qui ont trouvé que les lymphocytes th17 favorisent la migration et l'infiltration ainsi que le recrutement des neutrophiles via la production de NO comme messager intra- et intercellulaire [397]. Sarah et al (2017) ont également déclaré que les neutrophiles et les (MDSC) présentent les mêmes cellules progéniteuses qui peuvent prendre les mêmes caractéristiques [392], ce qui a été confirmé par Camille et al. (2015) qui ont trouvé que les neutrophiles peuvent supprimer la fonction de NKT via la production d'un niveau accru de NO dans la MO [304].

Dans ce travail nous avons remarqué que presque tous les patients MM recrutés ont représenté un taux des monocytes systémique normal, ce qui est du probablement à la migration de ces cellules vers la MO et la différenciation vers un macrophage associé à la tumeur (TAM). Nos résultats sont soutenus par plusieurs études qui ont déclaré que les macrophages associés au myélome proviennent des monocytes recrutés et non pas des précurseurs monocytaires résidant dans la MO [304]. Nos données pourraient être supportées également par plusieurs

travaux qui ont trouvé que les MPCs et les cellules de MET peuvent stimuler la différenciation des monocytes en TAM, en sécrétant des médiateurs et cytokines inflammatoires [389]. Une fois les monocytes recrutés dans le MET, ils acquièrent un profil pro-inflammatoire qui est impliqué dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Cependant, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que (TNF), (IL-1), IL-6, IL-8 peut induire une instabilité génétique et une évolution des clones malins [304]. Plusieurs études ont trouvé que les macrophages favorisent et soutiennent la croissance des MPCs et la résistance aux médicaments au cours de MM. Il a été démontré que le niveau élevé des macrophages peut favoriser la croissance et diminuer l'apoptose des lignées cellulaires de myélome [389.304]. Les scientifiques ont prouvé que l'infiltration des TAM a été associée à un pronostic défavorable chez les patients MM [398].

Le NO constitue le médiateur clé produit par les macrophages au cours de la réponse immunitaire innée, ce qui a été aussi confirmé par les données de notre travail en présentant une corrélation remarquable entre la concentration de NO et le taux de monocytes [200]. Nos résultats s'accordent avec ceux de Sessa et al (2009) qui ont rapporté que les TAM peuvent libérer un taux élevé de NO, ce qui favorise la vasodilatation et l'angiogenèse au cours de MM [398]. Les études de Asimakopoulo et al (2013) ont également prouvé que les TAM peuvent favoriser le dysfonctionnement immunitaire et soutenir la croissance de MPC via la production élevée de NO [3]. Par ailleurs, nos résultats concordent largement avec les travaux de Varic et al. (2014) qui ont prouvé que le NO peut moduler la production des chimiokines, telles que MCP-1 (Monocyte Chimo-attractant Protein-1), IP-10 et MIP-1 α qui sont impliqués dans l'activation des monocytes et macrophages et peuvent être associés aussi à la progression de MM [399].

L'étude de leucocytes systémiques dans ce travail a remarqué que la fréquence des patients avec un taux normal de leucocytes similaire à celui des patients avec un taux de leucocytes très élevé. Une concentration de NO chez les patients avec un niveau de leucocyte anormal est supérieure à celles des patients avec un niveau des leucocytes intégrés dans la fourchette normale. Nos résultats concordent avec ceux qui ont été décrits précédemment, dont la plus part des leucocytes peuvent largement migrer vers le site de tumeur au cours de MM [304]. Plusieurs études ont démontré que le NO est un immunosuppresseur qui peut empêcher le roulement, l'adhérence et la transmigration des leucocytes (monocytes et granulocytes) et inhiber l'activité des chimiokines telle que l'IL-8 [144 .147.148].

Le NO peut avoir un rôle multiforme et complexe au cours de la réponse immunitaire anti-tumorale car il existe une très fine ligne entre le rôle tumoricide bénéfique et le rôle immunosuppresseur néfaste de NO [69]. Il semble plus clair maintenant que le NO pourrait être un marqueur immunitaire de valeur importante à explorer au cours de MM.

Le diagnostic de MM est un défi pour le médecin en raison des symptômes et complications hétérogènes qui sont associées à cette maladie (douleurs osseuses, infections récurrentes, anémie) [253]. Les manifestations osseuses associées au myélome sont les plus fréquentes comme signes révélateurs de MM. Elles constituent l'aspect le plus visible et la cause majeure de mortalité qui se développe chez 80% des patients MM [4]. Les MBD se caractérisent par un déséquilibre de remodelage osseux, ce qui provoque des lésions et douleurs osseuses et fractures pathologiques et peut réduire la qualité de vie des patients MM [5.6.253].

L'os est un tissu dynamique caractérisé par un équilibre entre la formation osseuse maintenue par les ostéoblastes et la résorption continue par les ostéoclastes, ce qui conduit à l'intégrité structurelle du squelette et l'équilibre d'homéostasie minérale du calcium et phosphore [400]. Dans le but d'étudier l'effet du NO sur l'évolution d'une complication primordiale associée au MM (MBD), des marqueurs reconnus pour l'activité des ostéoblastes (PAL) et l'homéostasie phosphocalcique (Ca^{++} , Phos) ont été évalués chez les patients MM recrutés, ainsi qu'une étude pour chercher une éventuelle corrélation entre ces marqueurs biochimiques et la concentration de NO.

Malgré les atteintes osseuses, largement rapportées au cours de la maladie d'ostéoporose [12], nos résultats ont représenté une concentration très élevée de PAL et des teneurs phosphocalciques chez les patients MM comparativement aux patients OP et témoins. Ces données peuvent approuver la perturbation accrue du remodelage osseux chez les patients MM recrutés, ce qui pourrait être confirmé aussi par les manifestations osseuses représentées par les patients MM en stade III [228]. Nos résultats suggèrent une destruction osseuse développée qui a été représentée par les composants minéraux « phosphocalciques » de la matrice osseuse libérés dans le sang et une concentration élevée de PAL qui a été associée couramment avec une activité ostéoblastique continue. Nos données sont en accord avec les travaux de Deepika et al (2016). En se basant sur des études histologiques et les processus précoces de développement de MBD, les auteurs ont trouvé que l'augmentation de la résorption osseuse a été accompagnée par l'accroissement de l'activité des ostéoblastes et la formation osseuse, tandis que cette activité pourrait être supprimée au cours des

complications osseuses plus avancées [401]. Ces observations suggèrent que, dans la première phase de MBD, le recrutement et l'activité d'ostéoblastes maintient la régulation entre la résorption et la formation de l'os, ce qui est perdu après dans les dernières étapes de la maladie et résulte en une amplification d'ostéolyse, des fractures et lacunes osseuses étendues [402.403]. Nos résultats sont appuyés par ceux de Nurhan et al. (2016) qui ont remarqué une augmentation de PAL associée à des fractures osseuses [404], ce qui concorde également avec des observations souvent faites à une étape plus avancée de MM lorsque la perte osseuse est déjà survenue, dont le niveau de PAL chez les patients MM a été dans la fourchette normale ou assez faible à cause de l'activité supprimée des ostéoblastes [402.401].

Bien que la concentration élevée de NO a été impliquée fortement dans le déséquilibre de remodelage osseux au cours de l'ostéoporose [12], nos données ont représenté des teneurs élevées de NO chez les patients MM par rapport aux patients OP. Ces résultats peuvent supposer l'hypothèse que le NO non seulement peut favoriser la progression et le dysfonctionnement immunitaire au cours de MM, mais également cette molécule peut s'engager simplement comme un médiateur impliqué dans les complications osseuses associées au MM. Nos données présentent des teneurs élevées de NO qui ont été distinguées chez les patients MM représentant une concentration élevée phosphocalcique et de PAL. Nos résultats sont soutenus par plusieurs travaux qui ont rapporté l'implication de NO dans le recrutement et l'activité des ostéoclastes [405]. Aussi, il a été démontré que la voie iNOS est essentielle pour la résorption osseuse stimulée in vivo et in vitro [12]. D'autre part, des études ont trouvé que le NO peut agir comme stimulateur autocrine de la croissance des ostéoblastes [406]. Le NO a des concentrations physiologiques peut influencer la croissance et la différenciation des ostéoblastes, mais à des concentrations élevées, il peut provoquer l'apoptose et l'altération de la fonction de ces cellules [405].

Le déséquilibre entre la formation et la résorption de l'os est la cause majeure des MBD qui est survenu grâce à des séries de changements dans le microenvironnement de MM [278]. Plusieurs études ont prouvé que le NO plasmatique ne pourrait pas toujours fournir une évaluation précise du profil de NO dans le corps et en particulier dans les tissus endommagés [333]. Afin de se rapprocher des mécanismes de la régulation impliquée par la production de NO dans le microenvironnement MM, nous avons proposé, et ce pour la première fois, un modèle d'un MET de MM qui est représenté par la coculture des MPC « lignée RPMI 8226 » et des ostéoblastes « lignée MG63 ».

La culture simple des MG 63 a représenté une production élevée de NO qui a subi une régulation après une culture de 72h. Ces résultats peuvent confirmer nos données qui ont été décrites précédemment, où le NO peut s'intégrer dans le profil des ostéoblastes et influencer la différenciation et la prolifération de ces cellules de manière dépendante de la concentration [405]. Nos données ont représenté également une production élevée de NO dans la culture simple des MPCs. Ces résultats sont soutenus par les travaux de R. V. Mendes et al. (2001) qui ont observé une forte expression d'iNOS (100%) dans les cellules tumorales provenant du MM [343].

Nos résultats aussi ont enregistré une viabilité appréciable des MG 63 qui ont été en coculture avec un nombre modéré des MPC comparativement à la viabilité de ces cellules en culture simple. Nos résultats peuvent expliquer la concentration élevée de PAL qui a été rapportée dans cette étude chez les patients MM recrutés, ce qui est en accord aussi avec les travaux de Roodman, G.D. (2011) qui ont remarqué un changement fonctionnel dans la nature des ostéoblastes après l'infiltration des MPC [407], ainsi que Deepika et al (2015) qui ont démontré que les MPCs peuvent favoriser l'engagement dans le cycle cellulaire dans les pré-ostéoblastes [401]. Bataille et al (1991) ont déclaré également que les MPCs peuvent augmenter directement le recrutement des ostéoblastes avec plusieurs mécanismes [408]. Cependant, plusieurs études ont déclaré que ces changements ont été dépendants du temps d'expression des gènes liés à la croissance tumorale des MPCs et le métabolisme osseux dans la MO [401]. Les MPCs peuvent établir des relations étroites et intimes avec les cellules osseuses afin d'exercer leurs effets prolifératifs [279].

Ces rapports pourraient être représentés clairement dans notre travail. Dans le cas de la coculture des MG63 avec un nombre décroissant des MPCs, nous avons remarqué une diminution étendue dans la viabilité des MG63 accompagnée par une augmentation remarquable dans la viabilité des MPCs comparativement à la viabilité de ces cellules en culture simple. Nos données pourraient être supportées par plusieurs études de la littérature qui ont prouvé le rôle de MET dans la croissance des MPC [227.228.278.279]. Natalie et al. (2001) ont déclaré que la perte d'ostéoblastes au cours de MM a été en fonction de l'évolution de la tumeur qui peut favoriser la réduction des facteurs dérivés des ostéoblastes et augmenter la libération des facteurs de croissance qui sont impliqués dans la résorption osseuse continue [278]. Les scientifiques ont déclaré aussi que l'évolution de MM peut favoriser la diminution rapide des ostéoblastes et peut modifier avec le temps le profil de l'expression des gènes dans les pré-ostéoblastes pour soutenir leur croissance [401]. En paires, notre étude a présenté

une corrélation positive et claire entre la production de NO et la viabilité des MPC en coculture avec un nombre modéré et fixe des MG 63. Ces données suggèrent que le NO pourrait être un médiateur important produit dans le microenvironnement de MM qui peut favoriser la croissance des MPCs et influencer également les complications osseuses associées au MM.

Un cycle vicieux se met en place au cours de MM. Le déséquilibre de remodelage osseux peut favoriser la libération des facteurs de croissance nécessaires qui sont enfermés dans la matrice osseuse et peut favoriser la prolifération des MPCs. A leur tour, les MPCs peuvent libérer des facteurs pour influencer la fonction des cellules osseuses en particulier et provoquer une ostéoclastogenèse et une altération fonctionnelle des ostéoblastes formant l'os [228.278.279]. Une des particularités qui a été clairement prouvée par cette étude est que le NO pourrait être l'un des médiateurs essentiels produits par les MPCs et les cellules de MET (MO) pour favoriser leur croissance tumorale et influencer la dérégulation de remodelage osseux au cours de MM.

Il est intéressant de noter que cette étude a été effectuée lors de la présence de certaines limites incluant la petite taille des échantillons qui a été due à l'exclusion des patients MM ne présentant pas un MBD et ne déclarent pas un consentement clair pour la participation dans cette étude, ce qui peut influencer la forte signification des études statistiques de corrélation, ainsi que le temps de suivi de la survie des patients (représenté par le temps d'échantillonnage 2 ans). Enfin, la variabilité des résultats des éléments immunitaires à cause de l'utilisation de plusieurs types d'appareils de FNS, la difficulté de la lecture des myélogrammes est un facteur qui peut également influencer ces données.

Malgré l'absence des corrélations statistiques de la plus part des marqueurs de pronostic de MM avec la concentration plasmatique de NO, l'étude de la coculture peut fortement confirmer notre hypothèse et confirmer le rôle de NO comme marqueur de pronostic indépendant et de valeur important au cours de MM. Donc, cette molécule pourrait être un médiateur important qui favorise les messages inter et intra cellulaires dans le MET de MM qui sont impliqués fortement dans la progression du MM, dans le dysfonctionnement immunitaire et certaines complications associées à ce cancer incluant les MBD. En conséquence, le NO pourrait être une cible fondamentale et prometteuse pour des approches thérapeutiques vis-à-vis de ce cancer .

Conclusion and Perspectives

Conclusion and Perspectives

Notre travail a pour objectif d'évaluer le rôle de NO dans la progression et le développement du cancer du myélome multiple et d'étudier son effet sur les atteintes osseuses associées au MM. Notre étude a permis de conclure que :

- La concentration de NO chez les patients atteints de MM de l'Est Algérien est élevée comparativement aux patients atteints d'OP et aux sujets témoins.
- Le NO est impliqué dans la modulation du statut inflammatoire chez les patients atteints de MM.
- Le NO est impliqué dans l'évolution de MM où il pourrait être un marqueur de pronostic indépendant chez les patients atteints de MM.
- Le NO est impliqué dans la modulation de statut immunitaire y compris le recrutement des monocytes et granulocytes dans le microenvironnement tumoral.
- Le NO est impliqué dans l'évolution des maladies osseuses associées au MM chez les patients atteints de MM .
- La production de NO par le microenvironnement tumoral de MM est élevée en se basant sur le modèle de co-culture (MPCs et ostéoblastes).une corrélation positive entre la concentration de NO et la viabilité des MPCs a été confirmée.

Au terme de cette étude, certains points se sont avérés très intéressants à approfondir dans des recherches futures :

- Evaluer le taux et l'expression d'iNOS chez les patients atteints de MM
- Evaluer d'autres marqueurs biochimiques de remodelage osseux tels que les Osteocalcin, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), et C terminaux du collagène de type I (CTX) chez les patients atteints de MM .
- Evaluer le rapport RANKL/OPG chez les patients atteints de MM.
- Etudier la corrélation entre la concentration de NO et INOS et les cytokines de mauvais pronostic tel que l'IL6, Le VEGF et le TGF β .

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] **James. N. P, M.D, Philip. M. P.(2004)** .multiple myeloma .*Group International*; Inc. ISBN: 0-597-84045-8
- [2] **Ivan. B .(2012).**Can we change the disease biology of multiple myeloma?*Leukemia Research*.;36 (1): pp3–12.
- [3] **Asimakopoulos .F , Kim .J ; Denu. RA , Hope. C , Jensen. JRL , Ollar .SJ , Hebron .E ,Flanagan .C, Callander. N , Hematti. P. (2013).** Macrophages in multiple myeloma emerging concepts and therapeutic implications. *Leukemia & Lymphoma*; 10:54 .
- [4] **Ulrike .H, Claudia. F, Ivana .Z, Martin. K, Monica .H, Christian .J, Orhan.S. (2006).**Bone markers in multiple myeloma. *European journal of cancer* ;42 :pp1544–1553.
- [5] **Ruan. J ,Trotter.TN , Nan. L, Luo. R, Javed .A , Sanderson. RD, Suva. LJ, Yang .Y.(2013).**Heparanase inhibits osteoblastogenesis and shifts bone marrow progenitor cell fate in myeloma bone disease. *Bone* ; 57 (1).
- [6] **Ai. LS, Sun. CY , Wang. YD, Zhang .L, Chu .ZB , Qin .Y , Gao. F , Yan .H, Guo .T, Chen .L et al. (2013).**Gene silencing of the BDNF/TrkB axis in multiple myeloma blocks bone destruction and tumor burden in vitro and in vivo .*International journal of cancer*; 133(5).
- [7] **Papadopoulou. EC, Batzios .S P, Dimitriadou .M, Perifanis .V, Garipidou .V . (2010).**Multiple myeloma and bone disease: pathogenesis and current therapeutic approaches. *Paschos ka hippokratia*; 14(2): 76-81
- [8] **Denise. Be, Yanina. L, Bárbara Prack. Mc C, Lucas. C, Eduardo. S, Ana María. E. (2014).**Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express INOS; *Nitric Oxide*; 36:11–18.
- [9] **Jason. R, Hickokand. D, Thomas. D. (2010).**Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes; *Curr Pharm Des*; 16(4). 381–391
- [10] **Scott. P.N, Wesley L. S, Ahyeon. K, Mark H. S. (2012).**Local delivery of nitric oxide: Targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues; *Advanced Drug Delivery Reviews* ;64:1177–1188.
- [11] **Wang. W, Lee. Y, Lee. C. (2015).**Effects of nitric oxide on stem cell therapy .*Biotechnology Advances*; S0734-9750(15)30037-9.
- [12] **Leiting .P, Kun .S, Fen .Hu, Wenwu. S, Imshik. Le. (2013).**Nitric oxide induces apoptosis associated with TRPV1channel-mediated Ca²⁺ entry via S-nitrosylation in osteoblasts. *European Journal of Pharmacology* ;715: 280–285

Références bibliographiques

- [13] **Luc. R, Julie. L, Marianne. Z, Jean-Claude .G, Luc. L, Yves. Co, Catherine .V. (2013)** .Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *PharmacolTher*; 140(3):239-57.
- [14] **Ranjbaran .M , Kadkhodae .M, Seifi .B, Adelipour .M, Azarian.B.(2017)**. Erythropoietin attenuates experimental haemorrhagic shock-induced renal damage through an iNOS- dependent mechanism in male Wistar rats.*Injury* ; 48(2):262-269.
- [15] **Luo .J, Chen A.F, (2005)**. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing; *Acta Pharmacol.Sin*; 26 :259–264.
- [16] **Vergely .C, Rechette. L. (2002)**. Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* ;**51**:109-116.
- [17] **Hibbs J.B.J,(1991)**: Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol* ;**142**:565–569.
- [18]**Safia .H, Asif A. (2003)**. Role of Nitric Oxide in Sports .*Nutrition and Enhanced Sports Performance* .
- [19] **Förstermann. U, Boissel. JP., Kleinert. H., (1998)**.Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).*Faseb j*;12(10):773-90.
- [20]**Feng .M. H, Wan Wan . Lin, Bing C .C, Chien M. C , Chia-Ron Y,Lian Y. L, Chih Chang .L, Shing H. Liu , Chiau S. L . (2006)**.High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- κ B and c-Jun NH₂-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway.*Cellular Signalling* ; 18:391 – 399
- [21]**Li P. G.a , Sun L.b ,Han X.b , Ling S.b , GanW.b , XuJ.W.b. (2012)**. Quercetin Induces Rapid eNOS Phosphorylation and Vasodilation by an Akt-Independent and PKA-Dependent Mechanism .*Pharmacology*; 89:220–228.
- [22]**Katarzyna .C, Chii-Ming. L , Jih-Luh .T, Kenneth K. W. (1999)**.Transcriptional Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by an Interaction between Casein Kinase 2 and Protein Phosphatase 2A.*The journal of biological chemistry* ;274 (49): 3 pp34669–34675.
- [23]**Ozlem E, Linnea E, Hua X, Åke S, Qimin Z and Thomas N. (2013)**. Exendin-4 protects endothelial cells from lipoapoptosis by PKA, PI3K, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways .*Journal of Molecular Endocrinology*; 50 (2): 229–241.

Références bibliographiques

- [24] **Thiago M. C, Danilo R-C, Celina M. L, Hugo L. D, Guilherme R. S, Waldiceu A. V Jr , Mani I. F, Quintino M. D, Ieda R. S, Andressa C. D, Daniela .S, Silvana .C, Mauro M. Teixeira, John S. H, Jader S. C, Fernando Q. C and Sergio H. F. (2010)** Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K/ AKT/nNOS/NO/K_{ATP} signaling pathway. *Pnas*; **107 (9)**:p4442–4447.
- [25] **Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J.(1994)**: Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* ; **263**: pp1612–1615.
- [26] **Murphy .S, Coughlan .T. (2006)**. Nitric Oxide Synthases in Brain Function. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*; pp 223-247.
- [27] **Malabendu .J, Jamar A.A Ramendra .N.S ,Xiaojuan. L ,Kalipada .P. (2005)**. Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* ;38(5):pp 655-664
- [28] **Sagar .S, Parida .SR, Sabnam .S, Rizwan. H, Pal .S, Swain .M, Pal. A. (2017)**. Increasing NO level regulates apoptosis and inflammation in macrophages after 2-chloroethyl ethyl sulphide challenge. *Int J Biochem Cell Biol.*, **83** :1-14.
- [29] **Grossini. E, Farruggio. S, Qoqaiche. F, Raina .G, Camillo. L, Sigaud.L, Mary.D, Surico .N, Surico. D. (2016)**. Monomeric adiponectin modulates nitric oxide release and calcium movements in porcine aortic endothelial cells in normal/high glucose conditions . *Life Sciences*; **161**:1-9.
- [30] **Lucia. L, Pierluigi .N, Douglas L F, Cinzia D R.(2011)** .The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *Journal of Neuro inflammation* ;8:1.
- [31] **Endale . M1 , Park .SC, Kim .S, Kim .SH, Yang. Y, Cho. JY, Rhee. MH.(2013)**. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF-κB-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology* ;218(12):1452-67.
- [32] **Chun J1, Choi RJ, Khan S, Lee DS, Kim YC, Nam YJ, Lee DU, Kim YS.(2012)** .Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by down-regulating NF-κB, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* ;14(4):375-83.

Références bibliographiques

- [33] **Zheng .Z, Li. Z, Chen .S, Pan. J, Ma. X.(2013).** Tetramethylpyrazine attenuates TNF- α -induced iNOS expression in human endothelial cells: Involvement of Syk-mediated activation of PI3K-IKK-I κ B signaling pathways .*XExp Cell Res*;15:319(14):pp 2145-51.
- [34] **Ji Su .M,Wan J.K.Jae Jin .K,Tack Joong .K,Sang Kyu.Y,Min Dong.S ,Hyun .K,Dong Woo.K, Won Kook .M,kwang Ho. L. (2010).**Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells . *Nitric Oxide* ; 23(3): pp 214-219.
- [35] **Jon O.L, Eddie .W and Mark T.G. (2008).**The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics.*Nature reviews*; 7:pp156-167.
- [36] **Rhodes P.M, Leone A.M, Francis P.L, Struthers A.D, Moncada S. (1995).** The L-arginine nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans, *Biochem. Biophys*; 209 : 590–596.
- [37] **Sruti S. (2013).** Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function.*Redox Biology*;140–44.
- [38] **Emmelie A.J, Liyue H, Ronny M, Mirco G, Carina N, Annika. O, Margareta. S.J. Petersson Lena .H, Eddie W and Jon O.L. (2008).**A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis .*Nature Chemical Biology* ;4 (7) :pp411-417.
- [39] **Paola C, Jesús T, Mark T.G.(2013).**Evidence mounts that red cells and deoxyhemoglobin can reduce nitrite to bioactive NO to mediate intravascular endocrine NO signaling: commentary on “Anti-platelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: involvement of cGMP and influence of sex .*Free Radical Biology and Medicine* ;65:pp1518–1520.
- [40] **Parthasarathy D and Bryan N.S.(2014)** .Physiology of Nitric Oxide. *Encyclopedia of Meat Sciences* ; 1.
- [41] **Knowles R.G, Moncada S. (1994).** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* ; 298:249–258.
- [42] **Sahil .K, Rajesh K. S., Bhardwaja .T.R.(2017).**Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule.*Biomedicine & Pharmacotherapy*; 85 :182-201
- [43] **Alderton. W.K, Cooper C.E, Knowles R.G, (2001).** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*; 357 (3): 593-615.

Références bibliographiques

- [44] Siddhanta. U, Wu .C, Abu-Soud H.M, Zhang .J, Ghosh D.K, Stuehr D.J, (1996). Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *Journal of Biological Chemistry*; 271 (13) :pp7309-7312.
- [45] Fugen. A. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sciences*; 75:pp 639–653.
- [46] Gorren. A.C, Kungl. A.J, Schmidt. K, Werner. E.R, Mayer. B. (2001). Electrochemistry of pterin cofactors and inhibitors of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* ;5 (2):pp176–186
- [47] Hurshman. A.R, Marletta. M.A. (2002). Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry* ;41 (10) : pp 3439–3456
- [48] Wang. B.S, Lin. J.K, Lin-Shiau. S.Y. (1999). Role of tyrosine kinase activity in 2,2V,2-tripyridine-induced nitric oxide generation in macrophages. *Biochemical Pharmacology* ; 57 (12): pp 1367–1373.
- [49] Ruan. J, Xie. Q, Hutchinson. N, Cho. H, Wolfe. G.C, Nathan. C. (1996). Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry* ;271 (37):pp 22679–22686.
- [50] Ma. S, Ma. CC. (2014). Recent developments in the effects of nitric oxide-donating statins on cardiovascular disease through regulation of tetrahydrobiopterin and nitric oxide. *Vascul Pharmacol*; 63(2):PP63-70.
- [51] Kondo. K, Bhushan. S, King. A.L, Prabhu. S.D, Hamid. T, Koenig. S, Murohara. T, Predmore. B.L, Gojon. G.S, Gojon. G.J, Wang .R, Karusula. N, Nicholson. C.K, Calvert. J.W, Lefer. D.J. (2013). H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*;127(10):pp 1116-11127.
- [52] Jungi.T.W, Adler. H, Adler. B, Thony. M, Krampe. M, Peterhans. E. (1996). Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species-specific regulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 54 (1–4) :323–330.

Références bibliographiques

- [53] Connelly. L, Palacios-Callender. M, Ameixa C, Moncada. S, Hobbs. A.J. (2001). Biphase regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of Immunology*; 166 (6) :3873–3881.
- [54] Leceta .J, Gomariz R.P, Martinez .C , Abad .C, Ganea .D, Delgado. M. (2000). Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 921 :92–102.
- [55] Bowie. A, O'Neill. L.A , (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochemical Pharmacology*; 59 (1) :13–23.
- [56] Perez-Sala. D, Cernuda-Morollon. E, Diaz-Cazorla. M, Rodriguez-Pascual. F, Lamas. S. (2001). Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/c GMP pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*; 280 (3) :F466–F473.
- [57] Chinetti. G, Griglio. S, Antonucci. M , Torra. I.P, Delerive. P, Majd. Z, Fruchart. J.C , Chapman. J, Najib. J, Staels. B . (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *Journal of Biological Chemistry*; 273 (40): 25573–25580.
- [58] Rodriguez-Pascual. F, Hausding .M ,Ihrig-Biedert. I , Furneaux. H , Levy. A.P, Forstermann. U , Kleinert. H , (2000). Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *Journal of Biological Chemistry*; 275 (34) :26040–26049.
- [59] Vodovotz.Y , (1997). Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*; 1 (1), 3–17.
- [60] Bogdan. C, (2001): Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*; 2 (10), 907–916.
- [61] Petrov .T, Underwood B.D, Braun .B, Alousi S.S, Rafols J.A. (2001): Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *Journal of Neurotrauma*; 18 (8) :799–812.

Références bibliographiques

- [62] **Matsuno R, Aramaki, Y, Tsuchiya, S, (2001)**. Involvement of TGF-beta in inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production by macrophages stimulated with lps. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 281 (3): 614–620.
- [63] **Musial. A, Eissa. N.T. (2001)**. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry*; 276 (26):24268–24273.
- [64] **Ratovitski.E.A, Bao. C, Quick. R.A, McMillan.A, Kozlovsky. C, Lowenstein. C.J. (1999)**. An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *Journal of Biological Chemistry*; 274 (42): pp 30250-30257.
- [65] **Mori. M, Gotoh.T, (2000)**. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 275 (3): 715–719.
- [66] **Nicholson. B, Manner. C.K, Kleeman. J, MacLeod. C.L. (2001)**. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *Journal of Biological Chemistry*; 276 (19):15881–15885.
- [67] **Watts. R.N ,Ponka. P, Richardson. D.R. (2003)**. Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochemical Journal*; **369** (Pt 3): 429–440.
- [68] **Pan J, Burgher K.L, Szczepanik A.M, Ringheim G.E, (1996)**. Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. *Biochemical Journal*; **314** (Pt 3) : 889–894.
- [69] **Frederica. V, Khosrow .K, Niharika .Na, (2016)**. The dual role of iNOS in Cancer. *Redox Biology* ;6 :pp 334-343.
- [70] **Catarina.R, Rayana Leal de. A. L, Ana Karolina S. N, RodolfoT, Christina A P.(2014)**. iNOS-NO-cGMP signaling in modulation of inflammatory and myelination processes. *Brain Research Bulletin* ;
- [71] **Sarah. L, Wynia. S, Brian C. S .(2016)**. Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases. *Nitric Oxide*, 1-9.
- [72] **Yasuko. I, Moon Y.K. (2015)**. Nitric oxide in liver diseases, *Trends in Pharmacological Sciences*. 1–13.
- [73] **Santos .B, Raquel H, Gustavo. F, Manuel Miguel .R-A , María Angeles P. (2017)**. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric Oxide* ; 62: 32-43
- [74] **Guix. F.X, Uribesalgo. I, Coma. M, Mun˜oz. F.J. (2005)**. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain, *Progress in Neurobiology* ;76: 126–152.

Références bibliographiques

- [75] **Ischiropoulos.H.(2003)**.Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration .*Biochem.Biophys* ;305, 776–783.
- [76] **Cassina. A.M, Hodara. R, Souza. J.M , Thomson. L, Castro. L, Ischiropoulos . H, Freeman. B.A, Radi.R.(2000)**.Cytochrome c nitration byperoxynitrite. *J. Biol. Chem*; 275: 21409–21415.
- [77] **Ischiropoulos. H, Zhu. L, Chen. J, Tsai. M, Martin J.C, Smith, C.D, Beckman, J.S. (1992)** .Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzedby superoxide dismutase. *Biochem. Biophys*; 298: 431– 437.
- [78] **Aslan .M, Ryan T.M, Townes T.M, Coward. L, Kirk M.C, Barnes. S, Alexander. C.B, Rosenfeld S.S , Freeman B.A. (2003)**.Nitric oxide dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J. Biol. Chem* ; 278: 4194–4204.
- [79] **Berlett .B.S, Friguet. B, Yim. M.B, Chock P.B, Stadtman E.R. (1996)**. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; 93:1776–1780.
- [80] **Gonzalez .D, Drapier .J.C, Bouton. C. (2004)**. Endogenous nitration of iron regulatory protein-1 (IRP-1) in nitric oxide-producing murine macrophages: further insight into the mechanism of nitration in vivo and its impact on IRP-1 functions. *J. Biol. Chem*; 279, 43345–43351
- [81] **Ito. K, Hanazawa. T, Tomita. K, Barnes. P.J, Adcock. I.M. (2004)** . Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem.Biophys*; 315 :240–245.
- [82] **Cobbs C.S, Whisenhunt. T.R , Wesemann. D.R, Harkins . L.E , Van Meir. E G , Samanta.M. (2003)**.Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer Res*; 63: 8670–8673.
- [83] **Hink. U, Oelze. M, Kolb. P, Bachschmid. M, Zou. M.H, Daiber. A, Mollnau. H, August. M, Baldus.S ,Tsilimingas. N, Walter. U, Ullrich. V, Munzel.T. (2003)**. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J. Am. Coll Cardiol* ;42 :1826–1834.
- [84] **Newman. D.K , Hoffman .S , Kotamraju. S , Zhao.T , Wakim. B , Kalyanaraman .B , Newman .P.J. (2002)**. Nitration of PECAM-1 ITIM tyrosines abrogates phosphorylation and SHP-2 binding. *Biochem.Biophys. Res. Commun* ;296 :1171–1179.
- [85] **Vadseth .C, Souza J.M, Thomson. L, Seagraves. A, Nagaswami. C, Scheiner. T, Torbet. J, Vilaire .G, Bennett. J.S, Murciano. J.C, Muzykantov. V, Penn .M.S, Hazen.S.L , Weisel. J.W, Ischiropoulos .H. (2004)**.Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species .*J. Biol. Chem* ; 279 :8820–8826.
- [86] **Ji. Y, Bennett B.M. (2003)**.Activation of microsomal glutathione Stransferase by peroxynitrite. *Mol. Pharmacol* ; (63):136–146.

Références bibliographiques

- [87] **Go. Y.M, Patel. R.P , Maland. M.C, Park. H, Beckman. J.S, Darley- Usmar. V.M , Jo .H , (1999).** Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH (2) terminal kinase. *Am. J. Physiol* ; 277 :H1647–H1653.
- [88] **Zhang. J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H. (1994).** Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* ; 263 :687–689.
- [89] **Beckman. J.S, Beckman T.W, Chen .J, Marshall P.A, Freeman B.A. (1990).** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **87** :1620–1624.
- [90] **Huie R.E, Padmaja S, (1993).** The reaction of no with superoxide. *FreeRadic*; **18**:195–199
- [91] **Saran. M, Michel C, Bors W. (1990).** Reaction of NO with O² implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic.* ; 10: 221–226.
- [92] **Levrاند. S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, Pacher P, Feihl F, Waeber B, Liaudet L, (2006).** Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med*; 41: 886–895.
- [93] **Brennan. M.L, Wu.W, Fu. X, Shen. Z, Song. W, Frost. H , Vadseth. C , Narine .L, Lenkiewicz .E, Borchers. M.T, Lulis. A.J , Lee .J.J, Lee. N.A , Abu-Soud. H.M , Ischiropoulos, H , Hazen .S.L. (2002).** A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation *in vivo* using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem*; 277 :17415–17427.
- [94] **Brown. G.C. (2001)** .Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase . *Biochimica et Biophysica Acta* .1504 (1) :46–57.
- [95] **Borutaite. V , Budriunaite . A, Brown. G.C. (2000).** Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite-and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols . *Biochimica et Biophysica Acta* ;1459 (2–3) :405–412.
- [96] **Bloodsworth. A, O'Donnell V.B, Freeman B.A. (2000).** Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* ; 20 (7) :1707–1715.
- [97] **Coffey. M.J., Phare, S.M., Peters-Golden, M. (2002).** Interaction between nitric oxide, reactive oxygen intermediates, and peroxynitrite in the regulation of 5-lipoxygenase metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* ; 1584 (2–3) :81–90.

Références bibliographiques

- [98] **Beckman. J.S., Koppenol, W.H. (1996).** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol* ; 271:C1424–C1437.
- [99] **Butterfield. D.A , Stadtman. E.R. (1997) .** Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol* ; 2 :161–191.
- [100] **Trostchansky. A. et al (2013).** Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal* ;19 :1257–1265.
- [101] **Gould. N, Doulias. PT, Tenopoulou .M, Raju .K, Ischiropoulos. H .(2013).** Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem*; 288:26473-9.
- [102] **Kroncke. K.D. (2001).** Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. *The FASEB Journal* ;15 (13): 2503–2507.
- [103] **Berendji.D , Kolb-Bachofen. V, Zipfel P.F, Skerka. C, Carlberg.C, Kronck . K.D. (1999) .** Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Molecular Medicine*; 5 (11): 721–730.
- [104] **Broillet. M.C. (1999).** S-Nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci* ;55 :1036–1042.
- [105] **Choi .Y.B, Tenneti. L, Le. D.A, Ortiz. J, Bai. G, Chen. H.S, Lipton. S.A (2000).** Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation .*Nat. Neurosci* ;3: 15–21.
- [106] **Jia. L , Bonaventura .C, Bonaventura. J, Stamler .J.S. (1996).** S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* .380: 221–226.
- [107] **Stamler J.S , Jaraki. O, Osborne. J, Simon.D.I, Keaney. J, Vita.J, Singel. D, Valeri. C.R, Loscalzo .J. (1992).** Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 7674–7677.
- [108] **Gu. Z, Kaul. M, Yan.B, Kridel. S.J, Cui. J, Strongin. A, Smith. J.W, Liddington. R.C, Lipton .S.A. (2002).** S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* ;297:1186–1190.
- [109] **Akshaya .C, Maria delPilar .S .I, J. Andrés .M. (2016).** Redox control of senescence and age-related .*Redox Biology*; doi:10.1016/j.redox.2016.11.005.

Références bibliographiques

- [110] **Liu .H, Colavitti .R, Rovira , Finkel T. (2005).** Redox-dependent transcriptional regulation. *Circulation research*; 97:967-74.
- [111] **Samantha S .R. C.,Bovee M. B, Palczewski J. R, Hickok Dougla D. T. (2017)** .Epigenetics: the third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacological Research* ; doi:10.1016/j.phrs.2017.04.011.
- [112] **Roth S.Y , J.M. Denu, and Allis C.D. (2001).** Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*; 70: p. 81-120
- [113] **Arif .M et al. (2010).**Nitric oxide-mediated histone hyperacetylation in oral cancer: target for a water-soluble HAT inhibitor, CTK7A.*ChemBiol* ;17(8): p903-13.
- [114] **Rios E.C, et al. (2016).** The role of nitric oxide in the epigenetic regulation of THP-1 induced by lipopolysaccharide. *Life Sci* ;147: pp110-6.
- [115] **Ruijter. A.J , et al. (2003).** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* ; 370(Pt 3): p. 737
- [116] **Nott .A et al (2008).** S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* ;455 (7211): p. 411-5.
- [117] **Riccio. A, et al (2006).** A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* ; 21(2): p. 283-94.
- [118] **Illi. B et al (2008).** Nitric oxide modulates chromatin folding in human endothelial cells via protein phosphatase 2A activation and class II histone deacetylases nuclear shuttling. *Circ Res* ;102(1): pp51-8.
- [119] **Claudia. C et al (2011).** HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *PNAS* ; 105(49):19183–19187
- [120]**Jason R. H , Divya .V, William E. A, Douglas D. Thomas. (2013)** .Nitric Oxide Modifies Global Histone Methylation by Inhibiting Jumonji C Domain-containing Demethylases . *the journal of biological chemistry* ; 288(22) : pp 16004–16015.
- [121]**Tausendschön. M, N. Dehne and B. Brüne .(2011).** Hypoxia causes epigenetic gene regulation in macrophages by attenuating Jumonji histone demethylase activity. *Cytokine*;13(2): pp117-211.
- [122]**Mora-Castilla .S et al.(2010).**Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell death and differentiation* ;17(6): pp1025-1033.

Références bibliographiques

- [123] **Hickok .J.R et al (2011)**. Nitric oxide suppresses tumor cell migration through N-Myc downstream-regulated gene-1 (NDRG1) expression: role of chelatable iron. *The Journal of biological chemistry* ; 286(48): pp 41413-41424
- [124]**Vasudevan. D, et al. (2015)**. Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications. *Cancer Res.*, 75(24): p. 5299-308.
- [125] **Hmadcha .A, F.J. Bedoya and F. Sobrino .(1999)**. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1 via nitric oxide production .*The Rockefeller University Press* ;190 (11): pp 1595–1603.
- [126] **Huang F.-Y.Y et al. (2012)**. Helicobacter pylori induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer* . 118(20): pp 4969-4980.
- [127]**Griffiths A.J, W.S.R, Carroll S.B, Doebley .J. (2012)**. Introduction to Genetic Analysis.10 ed, New York W.H . Freeman and Co.
- [128] **Felekis. K et al (2010)**.microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* ; 14(4): p. 236-240.
- [129] **Valinezhad .O. A, R. Safaralizadeh, and M. Kazemzadeh-Bavili . (2014)** .Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation .*International journal of genomics* : pp 970607
- [130] **Vecellio . M et al (2012)**. In vitro epigenetic reprogramming of human cardiac mesenchymal stromal cells into functionally competent cardiovascular precursors .*PLoS One* ;7(12): p e51694.
- [131] **Lee .Y.E et al.(2015)**.MicroRNA-1 participates in nitric oxide-induced apoptotic insults to MC3T3-E1 cells by targeting heat-shock protein-70. *Int J Biol Sci* ;11(3): p. 246-55.
- [132] **Cyr .A.R, Hitchler M.J and Domann F.E. (2013)** . Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxidants & redox signaling* ;18(15): pp1946-1955.
- [133] **Su .X, K.E. Wellen and Rabinowitz J.D. (2016)**.Metabolic control of methylation and acetylation .*Current opinion in chemical biology* ; 30 :pp52
- [134] **Riobó N. A , Clementi . E, Melani. M, Boveris. A , Cadenas .E , Moncada. S ,Poderoso. J. J. (2001)**. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activitythrough peroxynitrite formation. *Biochem. J.* 359:139-145.
- [135]**Moncada .S, Erusalimsky. J.D .(2002)**. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* ; 3 : 214–220.

Références bibliographiques

- [136] **Cooper .C. E, Mason .M. G, Nicholls. P.A. (2008).** dynamic model of nitric oxide inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochim.Biophys. Acta*; 1777:867-786.
- [137] **Schindler. H, Bogdan. C, (2001).** NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int. Immunopharmacol* ;1 :1443–1455.
- [138] **Lander H.M , Jacovina A.T , Davis R.J , Tauras J.M. (1996) .** Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species . *J. Biol. Chem*; 271 :19705–19709
- [139] **Musial .A, Eissa N.T. (2001).** Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J. Cell. Biol.* 276 :24268–24273.
- [140] **Bogdan.C. (2000).** The function of nitric oxide in the immune system. *Nitric Oxide*; pp: 443–492.
- [141] **Bogdan. C. (2001) .**Nitric oxide and the immune response. *Nat.Immunol*; 2 : pp 907–916
- [142] **Stuehr. D.J. and Marletta.M.A. (1985)** Mammalian nitrite biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7738–7742
- [143] **Bogdan .C. (2011).** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in the immune system. In *The Immune Response to Infection* ; pp 69–84.
- [144] **Christian .B .**Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. (2015) .*Trends in Immunology* ;36 (3).
- [145] **Huang. Z et al (2012).** Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium dependent neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem* ; 287: pp 4492–4502.
- [146] **Adler . H.S. et al (2010).** Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells. *J. Immunol*;184 : pp 6025–6034
- [147] **Spiecker .M, Darius. H, Kaboth. K, Hübner. F. & Liao .J. K.(1998).** Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J. Leukoc. Biol*; 63 :732–739

Références bibliographiques

- [148] **DAVID J. L, STEVEN P. J, WESLEY G. G, AMARPREET .B, MATTHEW .B. G, ADAM S. C, PAUL L. H, ROSARIO S. (1999)** . Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *leukocyte behavior in nos-deficient mice* ;pp1943-1499.
- [149] **Grisham M. B, Granger D. N. & Lefer D. J.(1999)**.Modulation of leukocyte–endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad. Biol. Med.* 25 ; pp 404–433.
- [150] **Banick P. D, Chen Q, Xu Y.A. & Thom S. R. (1997)**. Nitric oxide inhibits neutrophil β 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic cGMP synthesis. *J. Cell. Physiol*; 172 : 12–24.
- [151] **Hickey M. J. et al .(1997)**. Inducible nitric oxide synthase–deficient mice have enhanced leukocyte–endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* ;11 : 955–964
- [152] **Greiller C.L, Martineau A. R ,(2015)**. Modulation of the immune response to respiratory viruses by vitamin D ; *Nutrients* .7 (6) : pp 4240-4270.
- [153] **Meera .R, Ingrid .M, Pascale .K, Ellen I. C and Markus .M (2014)**.Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophage .*frontiers in immunology*; (5) : 532.
- [154]**Tai X.-G et al. (1997)**. Expression of an inducible type of nitric oxide (NO) synthase in the thymus and involvement of NO in deletion of TCR-stimulated double-positive thymocytes. *J. Immunol*;158 : 4696–4703
- [155] **Yang J. et al .(2013)**. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med* ; 210: 1447–1462.
- [156] **Niedbala. W. et al. (2014)**. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. *Nat. Commun* ; 5: 4575
- [157] **Burke A.J. et al. (2013)** . The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* ;34: 503–512
- [158] **Kaise. M, Miwa J, Suzuki N, Mishiro S, Ohta Y, Yamasaki T, et al.(2007)**. Inducible nitric oxide synthase gene promoter polymorphism is associated with increased gastric mRNA expression of

Références bibliographiques

inducible nitric oxide synthase and increased risk of gastric carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*;19:139-45.

[159] **Arnold H. Z, Ashok .A, David .T** .Dual Effect of Interferon (IFN α)-Induced Nitric Oxide on Tumorigenesis and Intracellular Bacteria .*Vitamins and Hormones*; 96:pp300-316

[160] **Xie. K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, et al. (1995)**. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *The Journal of experimental medicine*;181:1333-43.

[161] **Shi. Q, Xiong .Q, Wang .B, Le. X, Khan .NA, Xie. K. (2000)**. Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis. *Cancer research*;60:2579-83.

[162] **Simendra SetiAlok K.G.** (2011). Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol* ; **67**:1211–1224

[163] **Lala .PK , Orucevic .A. (1998)**.Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer metastasis reviews*; 17: 91-106.

[164] **Wink .DA, Vodovotz .Y, Laval . J, Laval .F, Dewhirst .MW , Mitchell .JB. (1998)**. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* ;19:711-21.

[165] **Glynn .SA, Boersma .BJ, Dorsey .TH, Yi. M, Yfantis .HG, Ridnour .LA et al. (2010)**. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *The Journal of clinical investigation*;120:3843-54.

[166] **Alessandro .F, Marco .S ,Emanuela .M, Iacopo. S, Milena .P, Oreste G. (2002)**.Expression of Matrix Metalloproteinase 1, Matrix Metalloproteinase 2, and Matrix Metalloproteinase 9 in Carcinoma of the Head and Neck .Correlation with p53 Status, Inducible Nitric Oxide Synthase Activity, and Angiogenesis. *Cancer* ; 95:1902–10.

[167] **Mannick J.B. , Hausladen . A, Liu. L , Hess D.T , Zeng .M, Miao . Q.X, Kane L. S, Gow A. J ,J.S. (1999)**. Stamlar,Fas-induced caspase denitrosylation,*Science*; 284: 651–654.

[168] **Török .N.J ,Higuchi .H ,Bronk .S , Gores .G.J. (2002)**.Nitric oxide inhibits apoptosis Downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase9.*CancerRes* ; 62: 1648–1653.

Références bibliographiques

- [169] Nakamura.T, Wang L. , Wong C.C, Scott F.L , Eckelman B.P , Han .X , Tzitzilonis C, Meng .F, Gu Z , Holland E.A , Clemente A.T , Okamoto S, Salvesen G.S , Riek R, Yates J.R S.A . (2010).Lipton,Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death.*Mol.Cell* ;39:184–195.
- [170] Liu .H, Nishitoh .H , Ichijo .H, Kyriakis .J.M. (2000).Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) by tumornecrosis factor receptor associated factor 2 requires priordissociation of theASK1 inhibitor thioredoxin, *Mol.CellBiol* ;20 :2198–2208.
- [171] Grivennikov .SI, Karin .M.(2010) . Inflammation and oncogenesis: a vicious connection .*Current opinion in genetics & development*;20:65-71.
- [172] Gochman .E, Mahajna .J, Shenzer .P, Dahan. A, Blatt. A, Elyakim .R, et al. (2012) .The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta histochemica*;114:8 27-35.
- [173] Talbott S.J, Luanpitpong .S , Stehlik .C , Azad N , Iyer A.K , Wang .L, Rojanasakul Y. S. .(2014) .Nitrosylation of FLIC Einhibitory protein determinesitsin-teraction with RIP1 and activation of NF-κB, *CellCycle* ;13 :1948–1957.
- [174] Hao .W, Myhre A.P, Palmer J.P. (1999). Nitric oxide mediates IL-1beta stimulation of heat shock protein but not IL-1beta inhibition of glutamic acid decarboxylase. *Autoimmunity* ;29 :93–101.
- [175] Beere H.M ,Wolf B.B , Cain. K,Mosser D.D,Mahboubi. A, Kuwana.T,Tailor. P, Morimoto. R.I, Cohen G.M, Green D.R. (2000). Heatshock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol* ;2 : 469–475.
- [176] Mosser.D.D,Caron.A.W,Bourget.L,Denis-Larose.C,Massie.B. (1997).Role of the human heat shock protein hsp70 in protection againststress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol*; 17: pp5317–5327.
- [177] Gochman.E,Mahajna.J,Shenzer.P,Dahan.A,Blatt.A,Elyakim.R et al. (2012). The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta histochemica*; 114:pp827-35.
- [178]Augsten.M et al. (2014).Cancer-associated fibroblasts express-ing CXCL14 relyupon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties.*Cancer Res*; 74: pp2999–3010

Références bibliographiques

- [179] **Lisanti.MP, Tsirigos.A, Pavlides.S, Reeves.KJ, Peiris-Pages.M, Chadwick.AL**, et al. (2014). JNK1 stress signaling is hyper-activated in high breast density and the tumor stroma: connecting fibrosis, inflammation, and stemness for cancer prevention. *Cell cycle* ;13:pp 580-99.
- [180] **Sanuphan.A.** et al. (2013) .Long-term nitric oxide exposure enhances lung cancer cell migration. *Biomed Res*; pp186972
- [181] **Gupta.SK, Vlahakis.NE.** (2009). Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. *Journal of cell science*; 122: pp 2043-54.
- [182] **Tronc.F, Mallat.Z, Lehoux.S, Wassef.M, Esposito.B, Tedgui.A.** (2000). Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: *interaction with NO. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*; pp20:.
- [183] **Upchurch.G.J, Ford.J , Weiss.S J, Knipp.B S, Peterson.DA, Thompson.RW** et al. (2001). Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Journal of vascular surgery*; pp34:76-83.
- [184] **Zhang.W, He.XJ, Ma.YY, Wang.HJ, Xia.YJ, Zhao.ZS** et al.(2011). Inducible nitric oxide synthase expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor prognosis in gastric cancer patients. *Human pathology*;42:pp1275-82.
- [185] **Liu.H, Colavitti.R, Rovira.II, Finkel.T.** (2005). Redox-dependent transcriptional regulation. *Circulation research*;97: pp 967-74.
- [186] **Kashiwagi.S.** et al. (2008) Perivascular nitric oxide gradients normalize tumor vasculature. *Nat. Med.* 14, pp255–257
- [187] **Girrotti.AW.**(2015). Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*;14 : pp1425-32.
- [188] **Yang .J , Amiri K.I , Burke J.R , Schmid J.A. , Richmond A.** (2006) . targets inhibitor of NF-kappa B kinase and induces apoptosis in melanoma :involvement of nuclear factor kappa B and mitochondria pathways;*Clin.CancerRe.*12:950–960.

Références bibliographiques

- [189] **Choi.BM ,Pae. HO,Jang .SI ,Kim. YM,Chung.HT.(2002)**. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of biochemistry and molecular biology*;35:pp116-26.
- [190] **Xu.W,Liu.L,Smith.GC,Charlesl.G.(2000)**. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcsto protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. *Nature cell biology*;2:pp339-45.
- [191] **Messmer.UK,Ankarcrona.M,Nicotera.P,Brüne.B.R.CM,Thompson.CB. (1994)**. p53 expressionin nitric oxide induced apoptosis. *FEBS Lett* ; 355:pp23-26.204.
- [192] **Brune.B,Mohr.S,Messmer.UK. (1996)**. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO)signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* ;127: pp 1-30.
- [193] **Kaushik .B, Avishek .G, Paramita ., Avijit .S, Suryabhan .S,Mitali .C, Subrato .B , Soumitra K .C .(2014)** .ROS and RNS induced apoptosis through p53 and iNOS mediated pathway by a dibasic hydroxamic acid molecule in leukemia cells.. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* ;52: 146–164.
- [194] **Stéphanie .P ,Sabrina .R, Véronique .L .Ali .B .2015**. S-nitrosylationin TNF superfamily signaling pathway; Implication in cancer p53. *Redox Biology* ; 6: pp 507-515.
- [195] **Leon-Bollotte .L, Subramaniam .S, Cauvard .O, Plenchette C .S, Paul .C , Godard .C, Martinez-Ruiz .A, Legembre .P, Jeannin J.F , Bettaieb A, (2011)**. S-ni Trosylation of the death receptor Fas promotes Fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells.*Gastroenterology* : pp1402009.
- [196] **Ignarro. L , Sisodia .J M , Trinh.K, Bedrood.S, Wu.G, Wei.L, Buga .H, G.M. (2002)**. Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferationby mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *NitricOxide*; 7:pp 83–90.
- [197] **Gonzalez. Z, Feldman .M, Klesse A.B, Kalb L.J , Dillman R.G , Parada J.F , Dawson L.F, Dawson T.M. V.L. (2000)**. Requirement fornitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase inneuronal ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*;97: pp436–441.
- [198] **D'Souza F.M.S, Chen R.L, Kadowitz. H , Jeter .P.J, Jr.J.R.Am.J. (2003)**. Mechanism of eNOS gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Physiol. Cell Physiol*; 284: C191–C199.

Références bibliographiques

- [199] **Ishida.A, Sasaguri.T, Kosaka.C, Nojima.H, Ogata.J, J.Biol Chem. (1997).** Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *the journal of biological chemistry* ; 272 (15) : pp10050–10057.
- [200] **Brown.G.C. (1999).** Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim.Biophys. Acta*; 1411 (2–3) 5 : pp351–369.
- [201] **Bonavida.B, Baritaki.S. (2011)** Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric oxide* ; pp24:1-7.
- [202] **Nathan.C. (1992)** .Nitric oxide as a secretory product of *mammalian cells*. *FASEB J* ; 6: pp3051–3064
- [203] **Bahar S. R, Abhinav A, Deepak .N .T (2017)** .The Forgotten Child of Tumor Metabolism. *Trends in cancer* ; 3 (9): pp 659-672
- [204] **Kwak.J-Y et al. (2000).** Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell. Immunol*; 203: pp84–94.
- [205] **Yabuki.K, Tsutsui.A.A, Horton.T. (2000).** Yoshioka Caspase activation and cytochrome *c* release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor . *Free Radical Research*; 32 :(6).
- [206] **E.F. Silva. (2012).** Programmed Cell Death: Apoptosis, Autophagy, Necrosis and Oxidative Stress in Hematological Malignancies. *Physiopathogenesis of Hematological Cancer* ;(20): pp 14-33.
- [208] **Varun. K, Sam.Y. H, Anna.E. J, E. Saavedra. M , Douglas. H. A, Robert K. P, Larry. K. K and Harinath. C T . (2010)** .Stabilization of the Nitric Oxide (NO) Prodrugs and Anti-Cancer Leads, PABA/NO and Double JS-K through Incorporation into PEG-Protected Nanoparticles. *Mol Pharm* ; 7 (1) : 291.
- [209] **Angel. J, De la .R , Luís M. Marín, Francisco .J P. (2013)** .Nitric oxide and cell death in liver cancer cells . *Mitochondrion*; 13(3) : pp: 257-262
- [210] **Ahmed El .S, Lynne M .P, Yang X. Fu . (2016)** . Nitric oxide signaling in human ovarian cancer: A potential therapeutic target . *Nitric Oxide* ; 54 :pp 30-37.
- [211] **Marshall .H.E, Stamler J.S .(2001).**Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation, *Biochemistry*; 40: pp1688–1693.

Références bibliographiques

- [212] Hess. DT, Matsumoto.A , Kim.SO, Marshall .HE, Stamler.JS. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology*;6:pp150-66.
- [213] Olson.MV, Lee.J,Zhang.F, Wang.A, Dong.Z. (2006) .Inducible nitric oxide synthase activity is essential for inhibition of prostatic tumor growth by interferon-beta gene therapy. *Cancer gene therapy*; 13:pp676-85.
- [214] Adams.C, Mc.Carthy, HO.Coulter, JA.Worthington, J.Murphy, C.Robson,T, et al. (2009). Nitric oxide synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells. *The journal of gene medicine*; 11:pp160-8
- [215] Chung.P, Cook.T,Liu.K, Vodovotz.Y, Zamora.R, Finkelstein.S, et al. (2003). Overexpression of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances radiation-induced apoptosis in colorectal cancer cells via a caspase-dependent mechanism. *Nitric oxide* ;8:pp119-26.
- [216] Juang .SH, Xie. K, Xu. L, Wang.Y, Yoneda.J, Fidler.IJ. (1997). Use of retroviral vectors encoding murine inducible nitric oxide synthase gene to suppress tumorigenicity and cancer metastasis of murine melanoma. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*; 12:pp167-75.
- [217] Mc.Carthy, HO.Zholobenko, AV.Wang, Y.Canine, B.Robson, T.Hirst DG et al.(2011). Evaluation of a multi-functional nanocarrier for targeted breast cancer iNOS genetherapy . *International journal of pharmaceutics*;405:pp196-202.
- [218] Spiegel.A, Hundley.TR, Chen.J, Gao.J,OuyangN, Liu X, et al. (2005). NO-donating aspirin inhibits both the expression and catalytic activity of inducible nitric oxide synthase in HT-29 human colon cancer cells. *Biochemical pharmacology*; 70:pp993-1000.
- [219] Bhowmick.R, Girotti. AW. (2013). Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress. *Free radical biology & medicine*; 57 :pp39-48.
- [219] Becker.N, de Sanjosé.S, Nieters.A, Maynadié.M, Foretova.L, Cocco.PL,Staines.A,Alvaro.T, Vornanen.M, Brennan.P, Boffetta.P. (2007). Birthorder, allergies and lymphoma risk: results of the European collaborative research project. *Epilymph.Leuk Res* ;31:pp1365–1372
- [220] Devesa.SS, Fears.T. (1992). Non-Hodgkin's Lymphomatime trends: United States and international data. *Cancer Res*; (Suppl) 52:pp5432s–5440s
- [221] Saidi .M , Abad . MT, Taoussi . S , Ghezlane .C, Hamladji .RM , Ahmed Nacer .R, Belhadri F et al. (2017). Epidemiological Data from the Algerian Multiple Myeloma Registry

Références bibliographiques

- (AMMR) over 2 Years (June 2014-June 2016): Report of the Algerian Multiple Myeloma Study Group (GETMA). *Blood* ; 130:pp5385.
- [222] **Parkin.M, Bray.F, Ferlay.J,Pisani.P. (2005).** Global cancerstatistics ; *CA Cancer J Clin.* 55:pp74–108
- [223] **Howe.HL, Wu.X, Ries.LA et al. (2006).** Annual report to the nation on the status of cancer,1975–2003 .*Cancer* ; 107 (8) :pp1711 – 42 .
- [224] **Mohamed Amine.B, Rose Marie.H, Meriem.B, Fatima Zohra.A, Mohand Tayeb.A, Hadj.T and all. (2011).** A population-based study of the epidemiology and clinical features of adults with acute myeloid leukemia in Algeria: report on behalf of the Algerian *Acute Leukemia Study Group* .*Hematol Oncol Stem CelTher*;4 (4): pp161-166
- [225] **Saidi.M. (2011).** Epidemiology and clinical features of multiple myeloma in Algeria: Report of the Algerian myeloma study group (GETMA). *Haematologica* ; *Abstract* p-pp404: 96(S1)
- [226] **M'rabet.R, Bekadja.MA, Zouani.S et al. (1998).** Young adults with multiple *myeloma*. *Hématologie* ; 4: pp94.
- [227] **Thomas . M , Hartmut .G. (2011)** .Multiple Myeloma. *Springer Heidelberg Dordrecht London New York*.
- [228] **Sagar Lonial .MD . (2008).** Myeloma Therapy Pursuing the Plasma Cell; *Humana Press*.
- [229] **Hallek.M, Bergsagel.P.L and Anderson K.C .(1998).** Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*; 91 ,pp 3-21.
- [230] **Gonzalez.D, van der Burg.M, Garcia-Sanz.R, Fenton.J.A, Langerak. A.W,Gonzalez, M.,van Dongen.J.J, San Miguel J.F, and Morgan. G.J. (2007).** Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma .*Blood* ;110: pp3112-3121.
- [231] **Smadja.NV, Fruchart.C, Isnard.F et al. (1998).** Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* ; 12(6):pp960-9.
- [232] **Fonseca.R, Barlogie.B, Bataille.R et al. (2004).** Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*; 64 (4):pp1546-58.
- [233] **Avet-Loiseau.H, Attal.M.Moreau.P, Charbonnel.C, Garban.F,Hulin.C, Leyvraz.S, Michallet.M, Yakoub-Agha.I, Garderet,L, et al. (2007).** Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*; 109 :pp 3489-3495.

Références bibliographiques

- [234] Avet-Loiseau.H, Hulin.C, Campion.L, Rodon.P, Marit.G, Attal. M, Royer.B, Dib.M, Voillat.L, Bouscary.D et al. (2013). Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myelome experience. *J Clin Onc*; 131: pp 2806-2809.
- [235] Decaux.O, Lode.L, Minvielle, S. and Avet-Loiseau.H. (2007). Genetic abnormalities in multiple myeloma: role in oncogenesis and impact on survival. *Rev Med Interne* ; 28:pp 677-681.
- [236] Bergsagel P.L, Chesi.M, Nardini.E, Brents.L.A, Kirby S.L. and Kuehl W.M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple Myelom. *Proc Natl Acad Sci* ; 93 :pp13931-13936.
- [237] Chng.WJ, Van.Wier.SA, Ahmann.GJ et al. (2005). A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and non hyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood*; 106(6):pp2156-61
- [238] Chesi.M, Bergsagel.P.L, Brents.L.A, Smith, C.M, Gerhard, D.S. and Kuehl, W.M. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* ;(88) :pp 674-681.
- [239] Prideaux, S.M, Conway O'Brien.E, and Chevassut.T.J. (2014). The genetic architecture of multiple myeloma. *AdvHematol*.
- [240] Hanamura.I, Iida.S, Akano.Y, Hayami,Y, Kato.M, Miura.K, Harada.S, Banno.S, Wakita.A, Kiyoi.H. et al. (2001). Ectopic expression of MAFB gene in human myelomacells carrying (14;20) (q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res*; 92: pp 638-644.
- [241] Zhan.F, Huang, Y.Colla.S, Stewart.J.P, Hanamura.I, Gupta.S, Epstein.J, Yaccoby, S.Sawyer, J, Burington. B. et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* ;108 : pp2020-2028.
- [242] Smadja .NV , Bastard .C , Brigaudeau. C , Leroux .D , Fruchart. C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma . *Blood*; 98 (7) :pp 2229 – 2238 .
- [243] Konigsberg.R, Zojer.N, Ackermann.J.et al. (2000) . Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol*; 18 (4):pp 804-12.
- [244] Morgan.GJ, Walker.BA, Davies.FE. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews Cancer* ;12:335-48.
- [245] Chiecchio.L, Protheroe.R.K, Ibrahim.A.H, Cheung.K.L, Rudduck.C, Dagrada.G.P, Cabanas.E.D, Parker.T, Nightingale.M, Wechalekar.A. et al. (2006). Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia*; 20:pp1610-1617.

Références bibliographiques

- [246] **Chang. H, Sloan .S, Li. D. (2004).** Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions .*British Journal of Hematology* ; 127 (3) :pp280-284.
- [247]**Shaughnessy.J. (2005).** Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology*;10 (Suppl 1):pp117-126.
- [248]**Hatzivassiliou.G, Miller.I, Takizawa.J,Palanisamy.N,Rao.PH,Iida.S. et al. (2001)** .IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulinsuperfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy.*Immunity*; 14:pp277–89.
- [249]**Carrasco .DR, Tonon .G, Huang.Y et al. (2006).** High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic *subgroups of multiple myeloma patients*. *Cancer cell*;9: pp313-25.
- [250]**Keats.JJ, Fonseca.R, Chesi.M. et al. (2007).** Promiscuous mutations activate the non canonical NF-kappa B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*;12:pp131-44.
- [251]**Mateos.MV, Garcia-Sanz.R, Lopez-Perez.R.et al. (2002).** Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol*; 118(4):pp1034-40.
- [252]**Dib.A, Barlogie.B, Shaughnessy.JD, Jr.Kuehl WM. (2007).** Methylation and expression of the p16INK4A tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Blood*;109 (3):pp1337 .
- [253] **S.Vincent , Rajkumar .M, Kyle Mayo .A. (2009).** Treatment of Multiple Myeloma and Related Disorders .*Cambridge University Press*.
- [254]**Leech.SH, Bryan.CF, Elston.RC, Rainey.J, Bickers.JN, Pelias.MZ. (1983).** Genetic studies in multiple myeloma. Association with HLA-Cw5 . *Cancer* ; 51 (8) : pp1408 – 11 .
- [255]**Pottern.LM , Gart.JJ, Nam.JM et al. (1992).** HLA and multiple myeloma among black and white men: Evidence of a genetic association . *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*; 1 (3): pp177 – 82 .
- [256]**Benjamin.M, Reddy.S, Brawley.OW. (2003).** Myeloma and race: A review of the literature . *Cancer Metastasis Reviews* ; 22 (1) : pp 87 – 93 .
- [257]**Nishiyama.H, Anderson.RE, Ishimaru.T, Ishida.K,Ii.Y, Okabe.N. (1973).** The incidence of malignant lymphoma and multiple myeloma in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors, 1945–1965 . *Cancer* ; 32 (6) : pp1301 – 9 .
- [258]**Ichimaru.M, Ishimaru.T, Mikami.M, Matsunaga.M. (1982).** Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950–76: relationship to radiation dose absorbed by marrow . *Journal of the National Cancer Institute* ; 69 (2) : pp323 – 8 .

Références bibliographiques

- [259] **Baris.D, Brown.LM, Silverman.DT. et al.** (2000). Socioeconomic status and multiple myeloma among US blacks and whites . *American Journal of Public Health*; 90 (8) : pp1277 – 81 .
- [260] **Khuder.SA, Mutgi.AB.** (1997). Meta-analyses of multiple myeloma and farming . *American Journal of Industrial Medicine* ; 32 (5) : pp510 – 6 .
- [261] **Brown.LM, Gridley.G, Pottern.LM et al.** (2001). Diet and nutrition as risk factors for multiple myeloma among blacks and whites in the United States . *Cancer Causes Control* ; 12 (2) : pp117 – 25.
- [262] **Friedman.GD, Herrinton.LJ.** (1994). Obesity and multiple myeloma . *Cancer Causes Control* ; 5 (5) : pp479 – 83 .
- [263] **Alexander.D, Mink.PJ, Adam.HO, Cole.P, Mandel.JS, Oken.MM, Trichopoulos.D.** (2007). Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120:pp40–61
- [264] **Grulich.AE, Wan.X, Law.MG, Coates.M, Kaldon.JM.** (1999). Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS* .13:pp839–843
- [265] **Nieters.A, Kallinowski.B, Brennan.P, Ott.M, Maynadié.M, Benavente.Y, Foretova.L, Cocco.PL, Staines.A, Vornanen.M, Whitby.D, Boffetta.P, Becker.N.** (2006). Hepatitis C and risk of lymphoma: results of the European multicenter case-control study. *Gastroenterology* ;131:pp1879–1886.
- [266] **Gerd-Riidiger .B, Antonio .P** (1998). Atlas de poche D'immunologie Bases, *Georg Thieme Verlag*.
- [267] **Julius M. Cruse , Robert E. Lewis.** (1937). Atlas of immunology .2nd ed.p. *CRC Press LLC*
- [268] **Gösta .G, Brian G.M. D.** (2004) . Multiple myeloma and related disorders. *A member of the Hodder Headline Group LONDON* .
- [269] **Vallario.A, Chilosì.M, Adami.F, Montagna.L, Deaglio.S, Malavasi.F et al.** (1999). Human myeloma cells express the CD38 ligand CD31. *Br J Haematol* ;105:pp441–4.
- [270] **Ridley.RC, Xiao.H, Hata.H, Woodliff.J, Epstein.J, Sanderson.RD.**(1993) .Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood*; 81:pp767–74.
- [271] **Blade.J, Dimopoulos.M, Rosinol.L, Rajkumar.SV, Kyle.RA.** (2010). Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *J Clin Oncol* ;28: pp690–697
- [272] **Sunita .T.** (2012) .Role of Serum Protein Electrophoresis in the Detection of Multiple Myeloma: An Experience of a Corporate Hospital. *J Clin Diagn Res*; 6(9): pp1458–1461.
- [273] **Kenshi .S.** (2012) . Diagnosis and treatment of multiple myeloma and AL amyloidosis with focus on improvement of renal lesion. *Clin Exp Nephrol*; 16:659–671.

Références bibliographiques

- [274] **José M. M, Marshall R. P, Joseph R. T and Charles. E. (1991).** Hypophosphatemia in Multiple Myeloma Due to a Phosphate-Binding Immunoglobulin. *Cancer*; 68:pp1092-1094.
- [275] **Bruce .R, Kathryn L. P, Michael K. E, Neil E. K, Agustin P. D and Frank Q. N .(1992).** Brief Report: Hypoglycemia Due to a Monoclonal Insulin-Binding Antibody in Multiple Myeloma. *Engl J Med*; 326:994-998.
- [276] **Zhi-Qiang .H and Paul W.S. (1997) .**Localization of a Single Binding Site for Immunoglobulin Light Chains on Human Tamm-Horsfall Glycoprotein *.The Journal of Clinical Investigation ; 99 (4):pp732–736.*
- [277]**Atsushi S, Hiroshi K, Michael C. B, Shin K, Kazumi S, Yuichi H, Osamu S, Toshiro N.(2005) .**Characterization of a myeloma patient with a life-threatening hemorrhagic diathesis: presence of a lambda dimer protein inhibiting shear-induced platelet aggregation by binding to the A1 domain of vonWillebrand factor. *Thromb Haemost*; 93(05): pp889-896.
- [278]**Natalie.S C, David. G, Roodmana et al. (2001).**Myeloma bone disease *.Seminars in Hematology*; 38; (3):276-285
- [279]**Giuliani.N, Rizzoli.V,Roodman.GD. (2006).** Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*; 108 (13): pp3992 – 3996.
- [280] **Terpos .E , Dimopoulos.M-A. (2005).** Myeloma bone disease: pathophysiology and management;*Annals of Oncology ;16: 1223– 1231.*
- [281] **CARL.J. B, PAUL. P. C and LEON. R .(1964).** The Effect of Prednisone on 'Calcium Metabolism and Ca⁴⁷Kinetics in Patients with Multiple Myeloma and Hypercalcemia.*Journal of Clinical Investigation*;43(11).
- [282] **Beverly M. N, Sarah H. T, and Vincenf F. G .(1993) .**Incidence of Hypercalcemia in Patients with Malignancy. *CANCER ; 71(4).*
- [283] **Ludwig,H,Pohl,G,Osterborg.A. (2004) .** Anemia in multiple myeloma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology ; 2(4):233-241.*
- [284]**Raymond .A ,Bart .B, Dennis .D .(1990).** Renal Failure in Multiple Myeloma. *Arch Intern Med ; 150(8):pp1693-1695.*
- [285] **Martinez-MM, Jackson .Y, Wadi.N. S, Garabed .E et al. (1971).** Renal complications in multiple myeloma: Pathophysiology and some aspects of clinical management.*pergamon press 24 (4) :pp221–224.*

Références bibliographiques

- [286] **Cecilie .B, Erik H, Ulf-Henrik M, Ola L, Magnus B , Malin H, Christian K, Ingemar T and Sigurdur Y. K. (2015)** .Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients..*haematologica* ;100(1).
- [287] **Links.J, Zolla-Pazner. S .(1986)**. Immunosuppression and infection in multiple myeloma. *Seminars in Oncology* ;13(3): pp282-290
- [288] **Al-Sobhi .E, Osoba A.O, Karar and Zuraiki A.M. (2009)**. Multiple myeloma of the central nervous system: a clinicopathological. *Eastern Mediterranean Health Journal* ;15(6).
- [289] **L.Kopp, M.D.1Gregory, J.Beirne, M.D.1Robert, O.BurnsM.D. (1967)**. Hyperviscosity syndrome in multiple myeloma. *The American Journal of Medicine* ;43(1) :pp 141-146.
- [290] **Podar. K, Chauhan .D, Anderson KC.(2009)**. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy *.Leukemia*; 23(1): PP 10–24. doi:10.1038/leu.2008.25.
- [291]**Dvorak .H.F, Weaver V.M,Tlsty T.D, and Bergers. G. (2011)**. Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol* ;103:468–474. doi:10.1002/jso.21709.
- [292]**Burger.J.A, Ghia. P, Rosenwald .A., and Caligaris-Cappio .F.(2009)**. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* ;114:3367–3375.
- [293]**Hideshima.T.CM.G, TononP.G.R and Anderson. K.C. (2007)**. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets.*Cancer* 7:585–598.
- [294]**Chauhan.D, Kharbanda.S, Ogata.A, Urashima.M,Teoh.G, Robertson.M, Kufe.D.W. &Anderson.K.C. (1997)**. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* ;89 : pp227-234.
- [295]**Marina .B,Denise .T,Federica C .Emanuel .V,Franco .A ,N .Giulianiac .(2018)**.The link between bone microenvironment and immune cells in multiple myeloma: emerging role of cd38. *Immunology Letters* ;
- [296]**Dhodapkar.MV.(2005)**. Harnessing host immune responses to preneoplasia: promise and challenges . *Cancer Immunol Immunother* ; 54 (5) : pp409 – 13 .
- [297] **Marina .B, Denise.T , Federica .C, Emanuela.V ,Franco .A ,Nicola. G (1999)**. Altered T cell Repertoire Usage in CD4 and CD8 Subsets of Multiple Myeloma Patients, a Study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E9487).*Leukemia & Lymphoma*; 33(1-2): 127 – 33
- [298]**William .R .H and Francis R.C.(2001)** .Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001 ; 19 : pp47 – 64

Références bibliographiques

- [299] **Dhodapkar.MV, Krasovsky.J, Osman.K, Geller.MD. (2003).** Vigorous premalignancy specific effector T cell response in the bone marrow of patients with preneoplastic gammopathy. *J Exp Med*; 198 : pp1753 – 7.
- [300] **Madhav V. D and Joshua .R. (2011).** Harnessing Natural Killer T (NKT) cells in Human Myeloma: Progress and Challenges. *Clin Immunol.* 140(2): pp160–166.
- [301] **Tricot.G, Vesole.DH, Jagannath.S et al. (2001).** Graft versus myeloma effect: proof of principle . *Blood ;87 (3): pp 1196-1198.*
- [302] **Broder.S, Humphrey.R, Durm.M et al.(1975).** Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein)immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma. Role of suppressor cells . *Engl J Med ; 293 (18) : pp887 – 92 .*
- [303] **Pilarski.LM, Mant.MJ, Ruether.BA. (1985).** Pre-B cells in peripheral blood of multiple myeloma patients . *Blood ; 66 (2) : pp416 – 22 .*
- [304] **Camille .G,Kyohei N,Slavica V,Geoffrey R. H ,Mark J. S . (2016).**Immune responses in multiple myeloma: role of the Natural immune surveillance and potential of immunotherapies. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 73 (8) : pp 1569–1589
- [305] **Bahlis.NJ, King.AM, Kolonias.D et al. (2007).** CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood;* 109 (11): 5002 – 10 .
- [306] **Shotaro .H, Noriko .S and Junji .T. (2017).** Phenotypic Analysis of NK Cell in Multiple Myeloma Patients .*Blood;*130:5384
- [307] **Joshua R, Natalia N, Lin Z, Shiny N, Tamara M, Ranjini S ,Fred Miesowicz, Kavita M. D and Madhav V. D.(2013).**Clinical regressions and broad immune activation following combinationtherapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood;* 121(3): pp423-430
- [308] **Yinhui X, Xiaoying Z, Hongbo L, Pan Z, et al (2017).**Mesenchymal stromal cells enhance the suppressive effects ofmyeloid-derived suppressorcells of multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma ;58(11): pp 2668-2676*
- [309] **Jinheng .W, Kim De .V, Sylvia .F ,Maria Antonia .F , Domenico .R, Angelo .V, Eline .M . (2016).**Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrowmicroenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *J Pathol;*239(2):pp 162-173.
- [310] **Mrabet.D, Bejaoui.B, Rekik.S, Sahli.H, Cheour.I, Elleuch.M et al. (2010).** Les manifestations ostéo-articulaires au cours du myeloma multiple : à propos de 43 patients. *Rev Rhum;*77.
- [311] **Koffi.KG, Sanogo.I, Trazo.D, Touré.AH, Tolo.A, Kouakou.N et al.(2000).** Caractéristiques du myélome multiple du noir africain : expérience de la Côte d’Ivoire. *Médecine d’Afrique Noire ;47:430-35.*

Références bibliographiques

- [312] **Zannou.DM, Sossou.R, AzonKouanou.A, Yekpe.P, Moussa.B, Adegbidi.H et al. (2011).** Myélome multiple des os : aspects cliniques,radiographiques et biologiques à propos de 05 cas observes aucentre national hospitalier et universitaire de Cotonou. *Journal de lasociété de Biologie Clinique*;15:18-22.
- [313] **Kakpovi .K, Oniankitan .O, Houzou .P, Koffi-Tessio .V, Tagbor .K C, Fianyo .E , Mijiyawa M .(2014).**Profil du Myélome Multiple des os en consultation rhumatologique à Lomé (Togo). Profile of Multiple Myeloma among rheumatology inpatients in Lomé (Togo). *Rev Mar Rhum*; 27: 48-53.
- [314]**Bataille.R, Donadio.D, Morlock.G. (1997).**Myélobes multiples des os :étude retrospective des facteurs pronostiques à partir d'une série de 243 malades. *Rev Rhum*;46:pp77 – 83.
- [315]**Kyle.RA. (1975).** Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc*;50:29 -40.
- [316]**M'rabet.R, Bekadja.MA, ZouaniS et al. (1998).** Young adults with multiple myeloma. *Hématologie* ;4: pp 94.
- [317]**Ali.EH, Hanni.EH, Dahou.F, Mechid.C, Si.Ahmed.F, Telmoun.H et al. (2008).** Myélome multiple en milieu rhumatologique. *Rev Rhum* ;75:pp1168.
- [318]**Ketari.S, Ben Dhaou.B, Daoud.F et al. (2006).** Myélome multiple du sujet âgé. *Rev Rhum*;73:1089-259.
- [319]**Omoti.CE, Omuemu.CE. (2007).** Multiple myeloma: a ten year study of survival and therapy in a developing nation. *J Pak Med Assoc* ;57:341-4.
- [320]**Daboiko.JC, Eti.E, Yapi.I, Ouali.B, Ouattara.B, N'zué.K. (2004).** Les affections rhumatologiques inflammatoires ayant motivé une hospitalisation au centre hospitalo-universitaire de Cocody (Abidjan) entre mars1998 et mars 2000. *Rev. Rhum (Ed Fr.)* 2004, 74:pp1215-20.
- [321]**Hideshima.T, Bergsagel.P, Kuehl .L, W.M. & Anderson.K.C. (2004).** Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications.*Blood* ;104 :pp607-618.
- [322]**Kumar.S.K, Dispenzieri.A, Lacy.M.Q, Gertz.M.A, Buadi.F.K, Pandey.S et al (2014).** Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* ;28 :pp1122-1128.
- [323]**Barlogie.B, Kyle.RA, Anderson.KC. et al. (2006).** Standard chemotherapy compared with high dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: Final results of phase III US Intergroup Trial. *J Clin Oncol*; 24 : pp929 – 936.
- [324] **Stig .L, Martin .H, Jan .W, Lorentz. B et al (2006).** Impact of age on survival after intensive therapy for multiple myeloma: a population-based study by the Nordic Myeloma Study Group. *British Journal of Haematology* ;133: 389–396
- [325]**Latifa.M, Noria .H, Mohamed.Br, Soraya.M, Mohamed Amine.B. (2017).** Epidemiological, clinical and pronostic aspects of multiple myeloma eligible for therapeutic intensification followed by

Références bibliographiques

autologous hematopoietic stem cell in the Algerian West: report of 147 cases. *La tunisie Medicale* ; 95 (06) : 415-421.

[326] **S.Mseddi H.S, Haddou M, BenAyed.N, Tahri.M, Elloumi.S, Baklouti .J, Hachicha. M.S, Krichen .Z. Bahloul .H, Masmoudi. (2005).** Gammopathies monoclonales en Tunisie : analyse épidémiologique, immunochimique et étiologique d'une série de 288 cas Monoclonal gammopathies in Tunisia: epidemiological, immunochemical and etioloical analysis of 288 cases *.Pathologie Biologie* ; 53(1) :pp19-25.

[327],**Gaougaou N. Bahri.L, Quessar.a, Benchekroun.S, El Bakkouri.J, Riyad. M ,Fellah. H (2014).** Présentation épidémiologique, clinique, biologique et pronostique du myélome multiple à Casablanca (Maroc). *African Journal of Cancer* ; 6 (3) : pp 159–165 .

[328] **ROBERT A. K , MORIE A.G, THOMAS E. W, JOHN A. L et al (2003).** Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clin Proc*;78:21-33.

[329]**Lefkir.T.S, Bencharif.I, Hermez.S, Koura.S, Hounas.F, Bekour.D et al.(2010).** Les formes tumorales du myélome multiple. *Rev Rhum* ;77:A301.

[330]**Bartl.R, Frisch.B, Burkhardt.R, Fateh-Moghadam.A, Mahl.G, Gierster.P et al. (1982) .** Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging:*Br J Haematol*; 51:361–75.

[331]**Hill.B.G, Dranka.B, P.Shannon.M.B, Lancaster.Jr.J, R.Darley-Usmar.V. M. (2010).**What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to th eCardinal Questions in Nitric Oxide Biology.*the journal of biological chemistry* ; 285:(26):pp19699–19704

[332]**Miranda.K.M, Espey.M.G, Wink.D.A. (2001).** Rapid Simple Spectrophotometrie Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite.*Nitric oxide*; 5(1): pp62–71 .

[333]**Viinikka.L.(1996).** Nitric oxide as a challenge for theclinical chemistry laboratory. *Scandina vian Journal Clinical and laboratory investigation*;56:7

[334]**Moshage.H, Kok.B.s, R.Jansen.P, L.M. (1995).** Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: A Critical Evaluation *.clin chem*; 41(6):pp892-896.

[335]**Tsikakos.D. (2007).** Analysis of nitrite and nitrate inbiological fluids by assays based on the Griessreaction: Appraisal of the Griess reaction in thel-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*;851:pp51–70

[336]**Bart.K, Johannes.R.H, Peter.L.M.J. (1995).** Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma:A Critical Evaluation *.CLIN.CHEM* ;41:6, pp892-896.

[337]**Jie.S, Xueji.Z, Mark.B, Harry.F. (2003).** Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay *.Sensors* ;3 (8):pp276-284.

Références bibliographiques

- [338] **Federica.R, Stefano A.S, Eleonora.C, Dario .P, Barbara.T, Angela M.A, Giuseppe .L, Enrico Di S .(2007).** Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *Journal of Chromatography B*; pp257-851
- [339] **Asghar. G, Mehdi.H, Hamed.B. (2007).** Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay . *JMSR* ; 2
- [340] **Sivaraman.T, Kumar.T.K, S.Jayaraman.G, Yu. C. (1997).** The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. *Journal of Protein Chemistry*;16 :4267.
- [341] **Reinhard .B, Svenja .P-S, Renate .R. (2004).** Measurement of Nitric Oxide by Reconversion of Nitrate/Nitrite to NO. *Methods in Molecular Biology, Nitric Oxide Protocols: Second Edition* ;279 :p1-p8
- [342] **Parween A.Ismail1, S.Jameel Ali2, Jassim.M.A. (2017).** “Assessment of Serum Nitric Oxide and Some Essential Trace Elements Levels in Patients of Multiple Myeloma”.
- [343] **Mendes R.V, Martins A.R, Nucci G , Murad F. F.A. (2001).** Soares.Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunore activity by B-cell non-Hodgkin’s lymphomas and multiple myeloma.*Histopathology* ;39 (2): pp172-8.
- [344] **Satoh .M, Nakamura .M, Akatsu .T,Shimoda. Y, Segawa .I, Hiramori .K. (2005).** C-reactive protein co-expresses with tumor necrosis factor- α in themyocardium in human dilated cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure* ;7 (5) :pp748– 754.
- [345] **Kim .Do-K, Yong Oh .S, Kwon .H-Ch, Lee .S, Kyung .A, Kwon et al** Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. *BMC Cancer* 9:155.
- [346] **Klein.B, Wijdenes.J, Zhang.XG, Jourdan.M, Boiron.JM, Brochier.J, Liautard.J, Merlin.M, Clement.C, Morel-Fournier et al .(1991).** anti-interleukin 6 monoclonal antibody therapy in myeloma. *Blood* ;78:1198,
- [347] **Regis .B ,Boccardo .M, Klein .B, Durie. B. (1992) et al .** C-Reactive Protein and 8-2 Microglobulin Produce a Simple and Powerful Myeloma Staging System. *Blood*;80(3): pp 733-737
- [348] **Brown R. D , Snowdon L., Uhr E., Gibson J.& D. Joshua .(1993).**C-Reactive Protein (CRP) Levels Do Not Reflect Disease Status in Patients with Multiple Myeloma .*Leukemia and Lymphoma*;9: (6) : pp 509-512.
- [349] **Ikeda.U, Maeda.Y, Yamamoto.K et al. (2002).** C-reactive protein augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiacmyocytes. *Cardiovasc Res.* 2002;56:86–92

Références bibliographiques

- [350] **Steven .B, Irving .K, and David S. (2004)** .C-reactive Protein *JBC Papers in Press*; 279 (47), pp :48487–48490,
- [351] **Hele .E and Jane. L. (1993)**. Sex hormones and immune dysregulation in multiple myeloma. *Cancer Immunol* ;36:205 -209
- [352] **Karpuzoglu .E, Ansar S., Nitric Oxide A. (2006)**. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxid synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis *Nitric oxide*; 15: 177–186
- [353] **Ying .W, Michelle .W-H et al .(2015)**. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell* ;14 : pp678–688
- [354] **Kumar S , Dispenzieri. A, Katzmann .JA, Larson .DR et al .(2010)**..Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features *BLOOD*;116 (24).
- [355] **A Kyle .R , Merlini .G, Miguel .JS, Ludwig .H, Hajek .R, Palumbo .A et al (2009)** International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*; 23:pp 215–224.
- [356] **Donald F.L, Ralph C.W Jr. , Folke L.(1968)**. Immunofluorescent studies of the myeloma kidney with special reference to light chain disease *The American Journal of Medicine* ;44 (6): pp 922-933.
- [357] **Randall M .E, William D.I et al (1976)**. The Manifestations of systemic light chain deposition *American Journal of Medicine* ;60 :pp 293-299.
- [358] **Michael S.G, Sergey V.B , Eisei N. (2002)**. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS *Kidney International*; 61 (3) :pp 855-861.
- [359] **N.Kearneya J, Podolak .L, Matsumur .D, Houghton .M. (2011)**. Patterns of IgG Subclass Deposits in Membranous Glomerulonephritis in Renal Allografts. *Transplantation Proceedings*;43(10): pp 3743-3746.
- [360] **Andrea .C and Maria .R. (2008)**. The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses. *Immunity* ; 28(6): pp 740-750.
- [361] **Sato.A, Hashiguchi.M, Toda.E, Iwasaki.A, Hachimura.S and Kaminogawa. S.(2003)**. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J. Immunol* ;171 :pp3684–3690.
- [362] **Botta .C, Martino Di. .MT, Ciliberto .D et al .(2016)** . gene expression inflammatory signature specifically predicts multiple myeloma evolution and patients survival *Blood Cancer Journal* ; 6:511.

Références bibliographiques

- [363] **Tevatia .S, Swati.J .P . (2016)**. A Comparative Study To Evaluate The Efficacy Of Bone Marrow Aspiration And Bone Marrow Biopsy For Haematological Disorders.*Int J Res Med*; 5(3) :pp122-128.
- [364] **Bartl .R, Frisch .B, Diem .H, Mündel .M, Fateh-Moghadam .A. (1989)** . Bone marrow histology and serum beta 2 microglobulin in multiple myeloma — a new prognostic strategy; 43(S51):pp88-98
- [365] **Kyle RA and Rajkumar SV.(2009)** . Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma .*Leukemia*; 23(1): 3–9.
- [366]**Malcolm LB . (1999)** .The search for meaning in monoclonal protein. Is it multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance? *Postgraduate Medicine*; 106(2):pp135-42; quiz 185.
- [367] **Syreeta .H, Petros .A, Elyara .K, Soaresc .M. (2016)** .Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies .*Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* ; 38 (1,):pp 37-43
- [368] **Dejoie .T, Attal .M, Moreau .P, Harousseau .J-L and Av-L .H.** Comparison of serum free light chain and urine electrophoresis for the detection of the light chain component of monoclonal immunoglobulins in light chain and intact immunoglobulin multiple myeloma . *Haematologica* ;101(3): 356-362.
- [369] **Gertz MA . (2015)**.Utility of the immunoglobulin free light chain assay for plasma cell disorders .*Leukemia & Lymphoma* ;56 (10):2757-8.
- [370] Vij R, Wang M, Jagannath S, Niesvizky R, Jakubowiak AJ , Kavalerchik E , Huang M , Siegel DS. (2016).Serum-free light-chain analysis in diagnosis and management of multiple myeloma and related conditions. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* ;76(sup245)
- [371]**J.L.G. de Veas Silva ,Camen .B.G et al .(2016)**. Prognostic Value of Serum Free Light Chains Measurements in Multiple Myeloma Patients. *Plos one* ; 22 (1),
- [372] **Fleur .W ,Claire.T , Dominique .W .(2007)**. Assessment of the analytical performance and the sensitivity of serum free light chains immunoassay in patients with monoclonal gammopathy. *Clinical Biochemistry* ;40 (5–6):pp351-354,
- [373]**Radocha.J,Pour.L,Pika.T,Maisnar.V,S.Īpička I,Gregora.E et al. (2015)** . Multi centered patient-based evidence of the role of free light chain ratio normalization in multiple myeloma disease relapse. *Eur J Haematol* ;26.

Références bibliographiques

- [374] **Fanny.P.b, Alessandra .C, Caterina.G ,Matteo.B et al (2016)** .Bone marrow B lymphocytes in multiple myeloma and MGUS: Focus on distribution of naive cells and memory subsets .*Leukemia Research* ; 49 :pp51–59 .
- [375]**Barbara.C, Myriam.F, Patrizia.S, Micol.R, Marta.C et al (2015)**. Anergic bone marrow V α 9V β 2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1 targetable microenvironment-induced immune suppression in human myeloma. *OncoImmunology*; 4 :(11).
- [376]**Sze.D.M,Giesajtis.G,Brown.R.D,Raitakari. M et al. (2001)** .Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8+CD57+CD28- compartment. *Blood*; 98: pp2817-2827
- [377]**Marcin.P ,Ewelina.G,Agata.K,Stanisław.G et al .(2015)** .Assessment of peripheral blood and bone marrow T, NK, NKT and dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Postepy Hig Med Dosw*; 69: 1435 -1442
- [378]**Chapoval A.I,Tamada K,Chen.L.(2000)** In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood*; 95: 2346-2351
- [379] **Douglas.E.J,Ross.D, Brown.P, Joy.H, John .G. (2008)**. Regulatory T Cells and Multiple Myeloma .*Clinical Lymphoma & Myeloma*; 8 :(5), pp283-286.
- [380]**Terabe.M,Matsui.S,Noben-Trauth.N,Chen.H et al (2000)** .NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* ; 1: pp515–520.
- [381] **Rao. H P ET al . (2010)** . Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma .*BLOOD*; 115 (26).
- [382] **Walter.M,T.Braga,Djordje.A, and Gisele.W, B.Colleoni .(2012)**.The Role of Regulatory T Cells and TH17 Cells in Multiple Myeloma .*Clinical and Developmental Immunology* ; 2012 :4.
- [383] **Marina.B,DeniseT,Federica.C,Emanuela.V.b,Franco.A.C,Nicola G.C.(2018)**. The link between bone microenvironment and immune cells in multiple Myeloma: Emerging role of CD38..*Immunology Letters*.
- [384] **Madhav V. D and Joshua .R. (2011)**. (Harnessing Natural Killer T (NKT) cells in Human Myeloma: Progress and Challenges. *ClinImmunol* ; 140(2): pp160–166.
- [385] **John.D, MacMicking.t ,Carl Nathan.t,Gary.H,Nicole.Ch,Daniel.S et al . (1995)**. Altered Responses to Bacterial Infection and Endotoxic Shock in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase .*Cell*; 61: 641-650,
- [386] **John D.M Carl .N. Gary .H. (2014)**.Immunotherapeutic approaches to treat multiple Myeloma .*Human Vaccines & Immunotherapeutics* ; 10 (4): pp896–910.
- [387] **Mine.H, Seçkin.Ç, Mustafa.P et (2006)** .Immunohistochemical detection of CD 95 (Fas) & Fas ligand (Fas-L) in plasma cells of multiple myeloma and its correlation with survival .*Leukemia & Lymphoma* ; 47 : (2).

Références bibliographiques

- [388] **Jinheng.W, Kim.De.V ,Sylvia.F ,Maria.A.F ,Domenico.R ,Angelo.V and Eline.M . (2016)** Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression .*J Pathol* ; 239: pp162–173.
- [389] **Yinhui.X ,Xiaoying.Z ,Hongbo.L ,Pan.Z, Yafang.Ch,Yimin.L,Zhiqing.Z, & Xiaofang (2017).**Mesenchymal stromal cells enhance the suppressive effects of myeloid-derived suppressor cells of multiple myeloma, *Leukemia & Lymphoma* ; 58: (11).
- [386] **Mieke.WH.R,Willemijn.H, Nicolaas.S ,& Harry.D.** Immunotherapeutic approaches to treat multiple Myeloma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* ; 10(4):pp896–910.
- [387] **Mine.H, Seçkin.Ç, Mustafa.P, Başak.D, Murat.T and Saliha.S. (2006)** Immunohistochemical detection of CD 95 (Fas) & Fas ligand (Fas-L) in plasma cells of multiple myeloma and its correlation with survival.*Leukemia & Lymphoma* ; 47: (2) .2006
- [388] **Yinhui.X, Xiaoying.Z, Hongbo.L, Pan.Z, Yafang.Ch, Yimin.L, Zhiqing.Z &Xiaofang.W. (2017)** .Mesenchymal stromal cells enhance the suppressive effects ofmyeloid-derived suppressor cells of multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*; 58: (11).
- [389] **Leonardo.F-de-L, Ana FláviaFernan .R.N, Erivan.S.R-J, Luciana.C, Jéssica.S.L ,Leonardo M.d, Juliana.E.L, Angelo.M and Alexandre.M. (2017).** Multiple Myeloma Cells Express Key Immunoregulatory Cytokines and Modulate the Monocyte Migratory Response .*Front. Med* ; 27.
- [390] **Noll.JE, Williams.SA, Tong.CM, Wang.H, Quach.JM, Purton.LE et al. (2013)** .Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating *the proliferation of mesenchymal stromal cells*. *Haematologica* ; 99:pp163–71.
- [391] **Parrinello.N, Conticello.C, Cavalli.M, La.Fauci.A, Rizzo.G et al. (2013).** Neutrophils of Multiple Myeloma Are Dysfunctional and Immunosuppressive. *Blood*; 122: pp3138–3138.
- [392] **Sarah.E .Herlihy ,Cindy.L ,Yulia.N. (2017).**Bone marrow myeloid cells in regulation of multiple myeloma progression .*Cancer Immunotherapy*; 66 :(8) pp 1007–1014.
- [393] **Wong.D, Winter.O, Hartig.C, Siebels.S, Szyska.M, Tiburzy.B et al. (2014)** .Eosinophils and megakaryocytes support the early growth of murine MOPC315 myeloma cells in their bone marrow niches. *PLoS One* ; 9 (10):e109018
- [394] **Van T C . Anja F .Gudrun .S.** Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* ; 12(2): pp151–159
- [395] **Lihui S, Xiaoqi Q, Huijun W, Yonghui X .(2017).**Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio and decreased platelet-to-lymphocyte ratio are associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Oncotarget*. 21; (12): pp18792–18801.
- [396] **Anupam J , Abhishek K. S. (2013).** Interaction of Inducible Nitric Oxide Synthase with Rac2

Références bibliographiques

Regulates Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generation in the Human Neutrophil Phagosomes: Implication in Microbial Killing *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*.

[397] **Nataša.O, Jeffrey.L.W, Robert.P, E et al (2013)**. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *Exp. Med*; 210 (7):pp1433-1445

[398] **Sessa. WC et al .(2009)** .Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide *JTH*; 7(Suppl 1): pp35–7.

[399] **Francesco D .S , Sara S. (2014)**. The emerging immunological role of post-translational nmodifications by reactive nitrogen species in cancer microenvironment *Front. Immunol*.

[400] **Sarah.R.A , Ozge. U et al (2015)**. Thrombospondin-1 Regulates Bone Homeostasis Through Effects on Bone Matrix Integrity and Nitric Oxide Signaling in Osteoclasts *Journal of Bone and Mineral Research*; 30 (1): pp 106–115.

[401] **Deepika.K, Darren.L, Anna.L, Holly.E, Andy.Ch, Neil.R, Peter.C and Kwee.L Y. (2016)** Myeloma impairs mature osteoblast function but causes early expansion of osteo-progenitors: temporal changes in bone physiology and gene expression in the KMS12BM model *British Journal of Haematology* ; 172: pp64–79

[402] **Taube.T, Beneton, M.N, McCloskey, E.V, Rogers.S,Greaves.M. &Kanis.J.A. (1992)**. Abnormal bone remodeling in patients with myelomatosis and normal biochemical indices of bone resorption *European Journal of Haematology* ; 49: pp192–198

[403] **Bataille,R,Chappard.D. & Basle.M . (1995)** .Excessive bone resorption in human plasmacytomas: direct induction by tumor cells in vivo. *British Journal of Hematology* ;90: 721–724.

[404] **Nurhan O, Muhammed A, Erkan .D. (2016)** .A Case of Second Primary Multiple Myeloma Mimicking Bone Metastases in a Patient with Breast Cancer: An Approach to Osseous Metastases. *American Journal of Cancer Prevention*; 4(2):33-35.

[405]. **R. J. Van'T.H , Ralston .S .H .(2001)**. Nitric oxide and bone *Immunology* 103: pp255-261.

[406] **Ralston. SH, Todd. D et al (1994)**. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*; 135(1) : pp 330–336

[407] **Roodman.G.D. (2011)** Osteoblast function in myeloma. *Bone*; 48: pp135–140.

[408] **Bataille.R ,Chappard.D ,Marcelli.C, Dessauw.P, Baldet.P, Sany.J. Alexandre.C. (1991)**.

Références bibliographiques

Recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event in the pathogenesis of human multiple myeloma. *Journal of Clinical Investigation*; 88: pp62–66.

Annexe

Annexe

Tableau 1 : Listes des échantillons et données épidémiologiques des patients

Patients	Sexe	Age (ans)	le type d'Acm	la survie des patients (Mois)
P1	H	61	CLL k	25
P2	F	54	IgG k	07
P3	F	48	IgG k	19
P4	F	57	IgA k	25
P5	H	61	CLL k	06
P6	F	63	IgG k	06
P7	F	66	IgA k	20
P8	H	48	IgG k	21
P9	F	66	IgG la	25
P10	H	76	IgG k	25
P11	F	67	CLL k	12
P12	F	34	IgA la	25
P13	F	68	IgA k	25
P14	F	58	IgG k	25
P15	H	57	IgG k	25
P16	F	60	IgG la	25
P17	F	36	CLL k	25
P18	H	58	IgG k	25
P19	F	29	IgA k	25
P20	F	59	CLL k	25
P21	H	56	IgG k	07
P22	F	68	IgG la	12
P23	F	54	CLL k	06
P24	F	77	IgG la	06
P25	F	65	IgA la	11
P26	H	68	CLL k	25
P27	F	85	IgD	06
P28	H	77	IgA k	25
P29	F	54	IgA k	25
P30	F	48	CLL k	25
P31	H	48	CLL la	25
P32	F	53	IgG k	25
P33	H	57	IgG la	07
P34	F	49	CLL k	07
P35	F	63	CLLla	05
P36	H	69	CLL k	19
P37	F	50	IgG k	25
P38	H	63	CLL k	25
P39	F	85	IgA la	25
P40	H	62	IgG k	25

Annexe

Tableau 2 : Listes des échantillons et données du myélogramme et d’FNS des patients

Patients	MPC %	LIT %	Myl %	GAT %	LS %	LS N°10 ³ / µl	GS %	GS 10 ³ / µl	Mono %	Mono 10 ³ / µl	Leu 10 ³ / µl
P1	39	15	6	29	11,80	1,020	85	8,0	1,5	0,13	9,69
P2	29	16	10	41	30,25	1,718	50	7,0	6,0	0,60	10,00
P3	17	8	18	71	32,25	2,077	51	8,0	9,0	0,50	6,20
P4	29	15	09	42	34,2	2,718	50	9,0	6,0	0,60	9,59
P5	32	10,	5	31	32,25	3,718	52	6,0	3,0	0,70	4,10
P6	60	16	11	41	31,25	2,718	05	5,0	6,0	0,90	5,30
P7	22	17	10	40	18,30	0,900	76,6	3,8	9,0	0,60	4,90
P8	21	18	12	45	33,25	1,718	47,0	8,0	5,0	0,30	10,00
P9	22	16	10	35	32,25	0,918	50,0	10,0	6,0	0,90	11,00
P10	16	14	08	38	30,25	1,518	53,0	8,0	4,0	0,70	7,30
P11	83	11	11	65	33,25	2,718	51,0	7,0	6,0	0,60	12,00
P12	45	19	07	41	32,25	0,918	52,0	9,0	5,0	0,50	11,00
P13	23	16	13	37	24,80	2,760	69,5	5,5	5,8	0,41	7,07
P14	20	13	14	28	23,60	3,300	74,5	12,5	2,1	0,09	9,74
P15	41	17	09	45	33,25	2,077	50	8,0	7,0	0,50	12,00
P16	25	16,	18	60	32,25	2,718	52	6,0	6,0	0,30	12,00
P17	23	15	7	38	30,25	2,359	51	8,0	8,0	0,60	1,90
P18	12	12	14	39	33,25	2,718	53	9,0	5,0	0,80	12,00
P19	41	16	11	41	32,25	2,359	50	8,0	9,0	0,70	7,20
P20	54	44	07	28	0,650	2,000	27	0,8	7,7	0,20	3,10
P21	67	20	12	41	33,25	2,718	54	3,0	6,0	0,40	12,00
P22	10	46	13	48	31,25	1,359	49	8,0	3,0	0,60	4,66
P23	67	5	10	39	33,60	2,459	50,0	9,0	9,4	0,80	3,46
P24	38	11	11	42	18,90	2,700	49,0	8,0	6,0	0,90	3,70
P25	35	19	08	43	34,25	2,718	39,2	3,5	5,0	0,60	5,60
P26	38	13	12	41	60,80	7,859	33,1	4,0	6,1	0,80	12,30
P27	02	15	10	70	32,25	2,718	48,0	8,0	4,0	0,30	09,00
P28	26	20	09	40	31,25	2,077	47,0	7,0	6,0	0,40	2,60
P29	37	22	07	42	34,25	3,718	50,0	9,0	5,0	0,70	11,00
P30	66	15	10	38	31,25	2,359	51,0	8,0	6,0	0,60	12,00
P31	13	13	05	58	0,240	3,959	69,0	7,5	8,4	1,05	12,56
P32	53	17	13	44	32,25	2,077	71,2	6,4	8,2	0,50	8,90
P33	39	19	06	41	30,25	3,718	50,0	8,0	6,0	0,50	6,10
P34	18	12	11	56	31,25	2,718	47,0	9,0	7,0	0,80	9,20
P35	54	23	14	36	33,25	2,359	50,0	7,0	5,0	0,60	12,00
P36	41	10	06	34	0,417	4,659	52,0	9,0	6,8	0,70	10,30
P37	60	03	04	46	34,25	2,718	50,0	8,0	6,0	0,40	4,70
P38	20	04	09	41	32,25	2,077	53,0	6,0	8,0	0,60	7,30
P39	06	05	11	40	31,25	3,718	50,0	8,0	5,0	2,50	4,58
P40	66	38	05	42	33,25	2,718	49,0	9,0	6,0	0,80	3,70

Annexe

Quantification of Nitric oxide in Multiple Myeloma Algerian Patients Using R&D and Arbor Assays Kits

Khawla Otmani¹, Dalila Naimi^{2*}, Romuald Mentaverri³,
Thibaut Objois³, Nadiabouderssa⁴ and Jean Pierre Marolleau⁵

¹Laboratory of Microbiological Engineering & Applications Molecular Biology and Cellular Physiology Constantine1University ,Constantine ,Algeria.

²HigherNational School of Biotechnology, ENSB Taoufik Khaznadar Constantine,Algeria.

³Laboratory of Inserm U1088, Amiens,France.

⁴Department of Rheumatology Hospital Dr BENBADIS, Constantine, Algeria.

⁵Laboratory of Normal and Pathological Lymphocyte and Cancers, ONCOPOLE Clinical Hematology and Cell Therapy Department Hospital, Amiens, France.

*Corresponding author E-mail: dalila.naimi76@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1466>

(Received: 19 April 2018; accepted: 17 May 2018)

Nitric oxide (NO) is an instable free radical considered as a marker of physiological and pathological processes. NO quantification is very sensitive and shows a great variability because of the NO short life time. Myeloma bone diseases (MBD) constitute one of the most visible aspects in MM cancer, which is a favorable microenvironment for the promotion of communication between malignant plasma cells and other cell types using cellular messengers including NO. On the other hand, many researchers have confirmed the association of osteoporosis with a high concentration of (NO) which has been proven to play a primary role in bone remodeling. The relationship between plasma NO concentration and MM pathology is poorly documented. This work aimed to study the variability of NO quantification using R&D and Arbor assays kits in plasma MM patients in comparison with osteoporosis (OP) patients as positive control. MM and OP blood samples were obtained from patients in three hospitals at the East of Algeria. The results showed a slight similarity (21.56%) between NOx concentrations assayed with two kits, that the average concentration of NOx in MM patients(54, 22iM / l ± 20, 06iM/l) was higher than the average concentration of NOx in patients with OP (48,34iM/l ± 16,71iM/l). Our results confirmed an important difference and variability in NO quantification Thus the high NOx level production in MM patients comparing with OPpatients was noticed.

Keywords: Nitric Oxide (NO), Multiple Myeloma (MM), Nitrate/Nitrite (NOx) quantification, R&D and Arbor assays kits.

Nitric oxide (NO) is a free radical of low molecular weight (30 Da)¹. It is known as a major factor in most regulating cellular functions in various physiological processes². NO is a prognostic marker for many diseases especially in inflammation and oxidative stress³.

The Griess method is most widely used to measure the amount of conversion of NO to (Nitrate (NO₃) / Nitrite (NO₂)) (NOx), representative of unstable NO release⁴. However, scientific literature shows a great variability in the measurement of NO between 2iM up to 17 iM - 44

iM in healthy individuals, when using the methods based on the Griess reaction⁵. For this reason, much work has been done to achieve a method of high performance and reliability in the context of accuracy, specificity, and sensitivity with minimal interference⁶. Furthermore, the quantification of NO in biological samples is a major challenge for scientists because of NO rapid release, its short life span⁷, and the different functions based on the concentration of this molecule produced in a particular microenvironment².

In tumor microenvironment, the role of NO is very complex; it is produced in different concentrations that induce either apoptosis or tumor cell growth. At high concentrations, NO acts as a potential anti-cancer agent that favors apoptosis and inhibits angiogenesis. At moderate concentrations, this molecule is linked to tumorigenesis and anti-apoptotic processes⁸.

Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer in a clonal expansion of fully differentiated B cells (plasma cells) in the bone marrow⁹. It is characterized by osteolysis and a monoclonal immunoglobulin secretion that can develop an immune deficiency and severe renal impairment¹⁰.

Several studies have validated the association of cancer with high concentrations of NO¹¹ in different types of tumors : breast, brain, lung, prostate, colorectal and pancreatic tumors¹². On the other hand, no studies have reported the relationship between NO concentration and MM pathology where quantification of NO levels in MM patients were poorly studied.

Myeloma bone diseases (MBD) are one of the most visible aspects in MM cancer, which can reduce the quality of life of patients because of bone pain and pathological fractures¹³. As well as osteoporosis (OP) is a disease characterized by low bone mass and deterioration of bone tissue¹⁴. Many researchers have confirmed the association of osteoporosis with a high concentration of (NO)¹⁵. In addition, other works have proven the primary role of NO in bone remodeling¹⁶.

The aim of this work is to assess the level of plasma nitric oxide in multiple myeloma and to study its quantification variability using two different commercial kits R&D and Arbor assays. OP patients will be used as an internal control.

The interference of the deproteinization

of the samples during the Griess reaction has been proven by several authors¹⁷. In this study, different methods of deproteinization will be discussed.

MATERIALS AND METHODS

Nitric Oxide (NO) quantification kits were purchased from Arbor Assays and R&D societies. Trichloroacetic Acid (TCA), zinc sulphate (ZnSO₄) were purchased from Sigma Aldrich.

Patients

The diagnosis of patients was confirmed after the Clinical and biological examinations, where 40 MM patients and 27 OP patients aged between 35 and 60 were collected over two years (2014 and 2015) in hemato-oncology department at three hospitals in the East of Algeria (Constantine, Batna and Annaba). All subjects signed a clear consent so that we were able to carry out this study by respecting the rules edited by the declaration of HELSENKI (August 2004).

Plasma Samples Preparation

The heparinized blood was centrifuged for 15min at 1400 rpm; the plasmas were aliquoted and frozen at -80°C until use.

Deproteinization

Deproteinization is a necessary step for the quantification of nitric oxide because the presence of protein causes interference on the Griess reaction. Two deproteinization protocols were tested in this work.

Deproteinization with ZnSO₄

*6 mg of ZnSO₄ were added to 400 μ l of plasma (15 g/l); the mixture was vortexed and centrifuged (for 10 min at 1400 rpm, and 4 ° C)

1.2.2. Deproteinization with TCA

*The plasma was treated with TCA 20% (w/v) for 30 min in ice; the mixture was centrifuged (for 15min at 1400 rpm and 4 ° C).

Both supernatants were collected and subjected to protein electrophoresis.

Determination of nitric oxide

By the R&D kit

The kit contains reagents necessary for the Griess reaction, including the lyophilized Nitrate Reductase (NR), its storage diluent, lyophilized NADH, the concentrated reaction diluent, and the nitrite and nitrate standard and the Griess reagent I and II.

Preparation of reagents

To prepare 300 ml of reaction diluent (1×), 30 ml of concentrated diluent (10×) were added to deionized water.

The (NR) was reconstituted with 1 ml of NR storage diluent and diluted, immediately before use according to the equations:

$$A: \text{Reductase Nitrate (il)} = (\text{number of wells} + 2) \times 5\mu\text{l}$$

$$B: \text{Diluent reaction (1X) (il)} = \text{volume of A} \times 4$$

The NADH was reconstituted with 5ml of deionized water and placed on ice.

Standard Preparation

100 μl of nitrite and nitrate standard (2000 imol/L) were added to 900 iL of diluent (1X).

500 μl of diluent were placed in the remaining tubes, 500 iL of mixture was transferred between the tubes to carry out a series of dilutions when (200 imol/L) has been identified as the highest standard and the diluent (1X) is used to be (0imol/L).

Determination of nitrites

50 μl of OP and MM samples or standard of nitrite was added to the microplate, diluted with 1X v/v diluent, 50 iL of Griess I and 50 iL of Griess II were added, the mixture was incubated for 10 min in room temperature, the OD(optical density) was read at $\lambda = 570$ nm.

Determination of Nitrate

50 μl of OP and MM samples or standard of nitrate was added to the microplate, diluted with 1X v/v diluent. 25 iL of NADH was added with 25 iL of diluted NR to the well and the mixture was incubated for 37 min at 37 ° C. 50 iL of Griess as well as 50 iL of Griess II were added, the mixture was incubated for 10 min at room temperature and the OD was read at 570 nm.

By the Arbor assays kit

The kit contains reagents to perform the Griess reaction, including the nitrate reductase solution and its stabilizing enzyme, the concentrated NADH solution and kit buffer as well as the nitrite and nitrate standard and the Griess A reagent and B.

Reagents preparation

550 μl of the stabilizing enzyme was added to the NR solution, the mixture was vortexed and diluted with the v / 3v kit buffer. The concentrated NADH was diluted with Kit buffer v/ v.

Standard preparation

40 μl of nitrite and nitrate standard (2000 imol/l) were added to 360 iL of kit buffer. 200 iL of diluent were placed in the remaining tubes. 200 iL of the mixture were transferred between the tubes to produce a series of dilution or (200 imol/l) was identified as the highest standard and the diluent (1X) is used for white (0imol/l).

Determination of nitrites

50 μl of nitrite standard and 12.5 iL of OP and MM samples were added to the microplate, dilution with the v / 4v kit buffer was carried out, 25 iL of Griess A and 25 iL of Griess B were added, Mixture was incubated for 5 min at room temperature and the OD (optical density) was read at 570 nm.

Determination of Nitrate

50 μl of nitrate standard and 12.5 iL of OP and MM samples were added to the microplate, diluted with the v / 4v kit buffer, 10 iL of NADH was added with 10 iL of diluted NR to the well and the mixture was incubated for 20 min at room temperature, 25 iL of Griess A and 25 iL of Griess B were added, the mixture was incubated for 5 min.

Statistics

All the statistical analysis was performed by using student t test and XL STAT software

RESULTS**Characterisation of plasma deproteinization methods**

A migration gel of the proteins by electrophoresis was performed to test the presence of proteins in both supernatants treated with ZnSO₄ and TCA (figure 2).

A great difference has been observed between proteins intense migration in the supernatant treated with Zn₂SO₄ and TCA, that an absence of proteins in the supernatant due to precipitation with TCA was noticed.

Quantification of NOx concentration with Arbor assays and R&D kits in plasma MM patients

The concentration of NOx (nitrite +nitrate) in plasma MM assayed by the two kits was compared to each other (figure 2). The results showed that the concentration of NOx assayed with Arbor assays (NOx= 50,16±6,98 iM/l) presents low concentration in comparison with NOx assayed

with R&D kit ($\text{NOx} = 58,26 \pm 39,75 \text{ iM/l}$) where the concentration of Nitrate quantified with Arbor assays ($\text{NOx} = 40,05 \pm 6,522 \text{ iM/l}$) was higher than the concentration of Nitrate quantified with R&D kit assays ($\text{NOx} = 30,02 \pm 39,10 \text{ iM/l}$), while the concentration of Nitrite quantified with Arbor assays ($\text{Nitrite} = 10,10 \pm 1,02 \text{ iM/l}$) present low concentration in comparison with Nitrite quantified with R&D kit ($\text{Nitrite} = 28,22 \pm 4,75 \text{ iM/l}$).

Similarity study between NOx concentrations quantified with Arbor assays and R&D kits

A similarity study between NOx concentrations using the student t test was performed. Very important difference and variability

in nitrite and nitrate concentrations assayed with two kits was noticed in the MM patients (**13.1%**), (**0.01%**); however, a slight resemblance in NOx concentration was detected (**21.56%**) (Table1).

Correlation study of NOx concentration quantified between Arbor assays and R&D kits in plasma MM patients

Linear regression and correlation study of NOx concentrations quantified with the two Arbor assays and R&D kits in MM showed a negative and very low significant linear correlation that could be negligible Fig3a ($r = -0.03324$, $P = 0.8386$). In

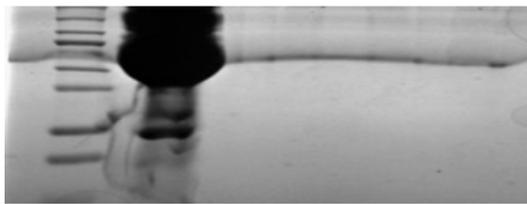


Fig.1. Proteins electrophoresis migration of the supernatant treated with TCA and Zn2so4. MW (molecular weight), TCA: supernatant treated with TCA. Zn2so4: supernatant treated with Zn2so4

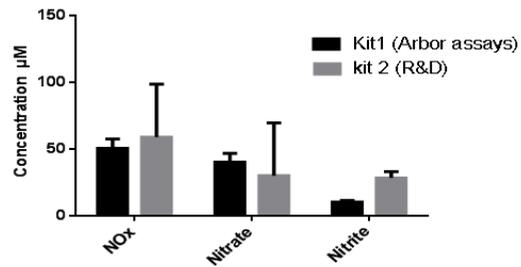


Fig. 2. Comparison between the mean of NOx concentrations, quantified by Arbor assays and R&D kits in plasma MM patients

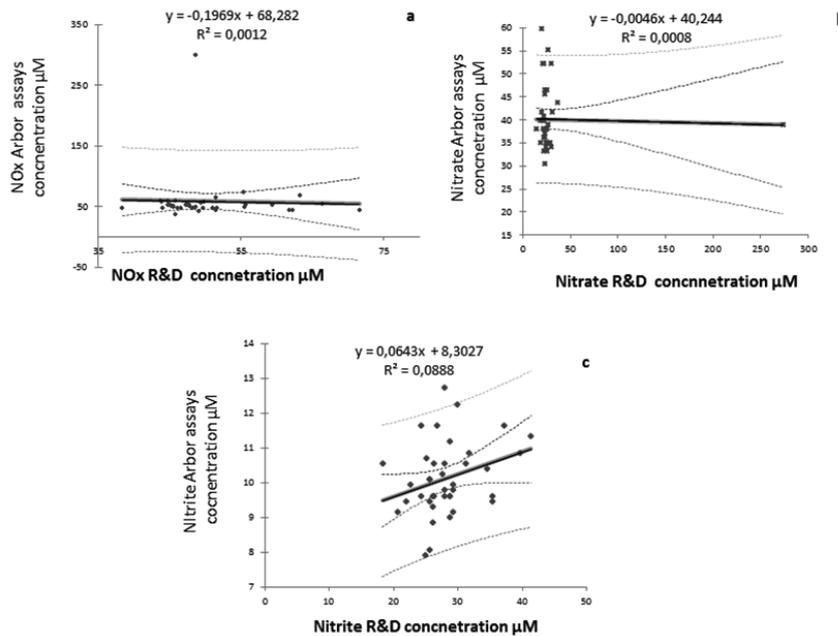


Fig. 3. Correlation between NOx concentrations quantified by Arbor assays and R&D kits in plasma MM patients .a. correlation of NOx concentration. Correlation of Nitrate concentration. c. correlation of Nitrite concentration

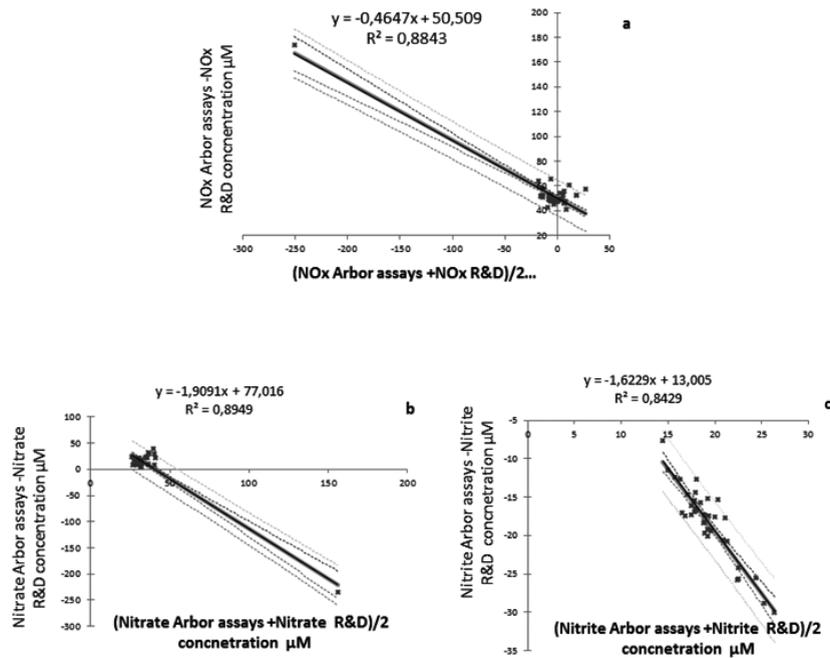


Fig. 4. Correlation study between the difference and the average of NOx concentrations quantified by Arbor assays and R&D kits in plasma MM patients. a. Correlation of NOx concentration b. Correlation of Nitrate concentration c. Correlation of Nitrite concentration.

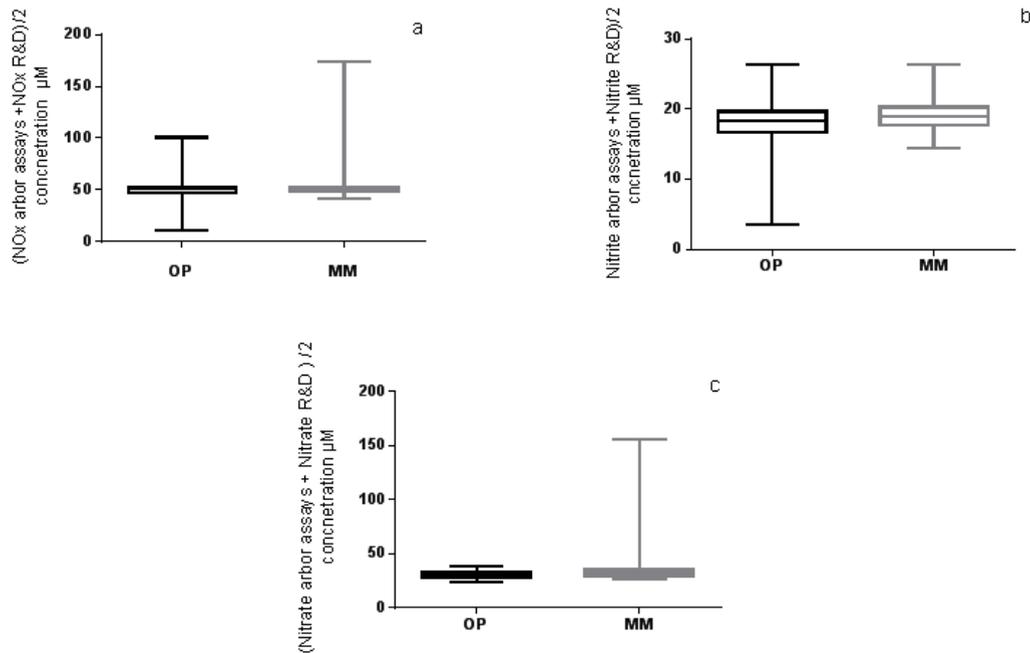


Fig. 5. Comparison of the average concentration of NOx quantified with Arbor assays and R & D kits in plasma MM and OP patients. a. comparison between NOx concentration. b. comparison between Nitrite concentration. c. comparison between Nitrate concentration

Table 1. The percentage of NOx concentration similarity quantified by the two Arbor assay and R&D kits according to t test student

	NOx	MM patients Nitrate	Nitrite
Percentage of NOx concentration similarity using two kit	21.56 % t=1,248606 p=0,012897	13.1% t=1.52483 p=0.13145	0.01% t=22.9570 p<0.0001

addition, a significant average positive linear correlation in Nitrate and Nitrite concentration was found Fig3b($r = 0.2969$, $P = 0.0628$), Fig3c($r = 0.2969$ $P = 0.0628$).

Study of the impact of Arbor assays and R&D kits on (NOx) quantification in plasma MM patients

The study of the impact of Arbor assays and R&D kits on (NOx) quantification in MM patients showed a very strong and highly significant negative linear correlation between the difference and the average impact rate of the kits on plasma samples. More NOx, Nitrate and Nitrite concentration values increase, the difference between NOx, Nitrate and Nitrite concentrations using the two kits decrease Fig4 a ($r = -0.9402$, $P < 0.0001$), Fig4 b ($r = -0.9178$, $P < 0.0001$), Fig4 c ($r = 0.9178$ $P < 0.0001$).

Comparison between the averages concentration of NOx quantified with Arbor assays and R&D kits in MM and OP patients

The average concentration of NOx assayed with Arbor assays and R&D kits was compared in OP and MM patients, where we have found that MM patients present high concentration of NOx in comparison with OP patients.

Fig5a ($\text{NOx}_{\text{MM}} = 54.22 \pm 20.06 \text{ iM/l}$), $\text{NOx}_{\text{OP}} = 48.34 \pm 16.71 \text{ iM/l}$); Fig5b (Nitrite $\text{MM} = 19.18 \pm 2.55 \text{ iM/l}$, Nitrite $\text{OP} = 17.70 \pm 4.45 \text{ iM/l}$); Fig5c (Nitrate $\text{MM} = 35.04 \pm 19.49 \text{ iM/l}$, Nitrite $\text{OP} = 29.16 \pm 3.27 \text{ iM/l}$).

DISCUSSION

To investigate the rate of NO and its metabolites NOx (Nitrite + Nitrate) measured by the kits, and to test the variability of its quantification in the plasma of MM patients, we have compared proteins' precipitation methods.

These methods constitute a great challenge for scientists as they are a very important and necessary step during the preparation of samples, which may influence the NO concentrations obtained.

Several studies showed that the high concentration of NO in samples is due to a high protein concentration and inadequate deproteinization⁶. Different methods have been tested to find an optimal mechanism that does not interfere with the Griess reaction for proteins removal. Many research advice to avoid the use of organic solvents and ammonium and sodium sulphate. Moreover, these methods are not recommended because of the protein residues remaining in the precipitated medium and the interference of these components with the Griess reaction¹⁷.

Scientists' discussion is restricted between the use of TCA and Zn_2SO_4 , where the results are very close¹⁷. Both methods will be tested in this study for further comparison of their efficiency regarding samples deproteinization techniques.

The results of plasma proteins electrophoresis after precipitation show a great difference and variability. It has been observed that proteins intense migration in the supernatant of Zn_2SO_4 treated plasmas accompanied by an absence of proteins in the supernatant due to precipitation with TCA.

These data confirm the effect of TCA in precipitating protein components in comparison with Zinc. Previously *Han Moshage et al (1995)* reported that zinc sulphate can eliminate at least 50% of proteins in the precipitated medium⁶. It is also consistent with studies of *T. Sivaraman et al (1997)*, who observed that the TCA precipitation due to the three-chlorine groups (Cl^-) that ensure the increase of the electronegative charge ($-$) can result in an optimum pH physical acid medium.

However, in acidic media, optimal precipitation of proteins cannot be completed; thus, the precipitated pH medium with TCA is sufficient and constitutes the optimum pH of precipitation action¹⁸. Some studies showed that the Zinc is so highly reactive and can reduce the result of quantified nitrite¹⁹. The use of an acidic medium such as TCA can accelerate the Griess reaction²⁰. Moreover, several researchers have been satisfied with the results of NOx due to the precipitation of Zinc¹⁷, where they have found that it is very effective for the formation of precipitation/turbidity, and removal of the fatty and particular substances that interfere with the Griess reaction¹⁹. Deproteinization in an acid medium would favor the loss of nitrite, which can easily convert to nitric oxide and nitrogen dioxide gas that must be avoided⁷.

Study on variability of NO quantification in MM patients is poorly documented; However there are different providers of NO assay kits based on Griess reaction.

These kits are generally varied according to the nitrate reduction method used (cadmium or enzymatic protocol) and samples deproteinization methods (chemicals or ultrafiltration)¹⁹.

In this work, we have studied the variability of nitric oxide plasma quantification in MM using two different commercial kits R&D and Arbor assays where the proposed precipitation protocol of the ultrafiltration membrane was changed with a cheaper and quicker precipitation method that has been tested previously: precipitation by the use of TCA. The results obtained using osteoporosis patients as an internal control were compared to have a preliminary idea of NO concentration in MM patients.

NO has a very short life span and it is rapidly oxidized with several components in biological systems. The quantification of NO is becoming very difficult, researchers routinely use the sum of these stable nitrate and nitrite metabolites (NOx indicators of the production of nitric oxide²¹).

Both kits contain reagents to ensure the Griess reaction in order to dose the nitrite as (NO_2^-) supplemented by the reduction of (NO_3^-) nitrates to nitrites in the presence of NADPH-sensitive reductase.

The study of NO production revealed a significant difference and variability between the

nitrite (NO_2^-) and (NO_3^-) nitrates concentration obtained by the two kits in the MM patients; however, a slight similarity in (NOx) concentration quantified using the two kits was detected.

Thereafter, we noticed an absence of a significant linear correlation between (NOx) (Nitrite) concentration obtained by R&D and Arbor assays kits. The concentration of (Nitrate) using the two kits reveals an average significant positive linear correlation in MM patients.

The results obtained in the study of the kits impact on NOx concentration in multiple myeloma patients can be explained in terms of higher concentration values of (NOx)– (Nitrate) and (Nitrite), the difference and variability of NO quantification in MM decrease.

Many studies have proven the relationship of NO with the progression of hematological cancers¹³. This explains the resemblance that has been found between the two kits at high (NOx) concentrations in the case of hematologic cancer myeloma. Thus, at high levels of (NOx), (Nitrite) and (Nitrate) in the plasma, both kits can perform very similar activities.

The current study revealed a high plasma level in MM patients despite the variability that was noticed in NO concentration using the two kits.

High concentration of NOx was observed in the plasma of OP patients, which was confirmed by many published works^{15, 22, 23, 24}. In the present work, it has been found that the average of NOx plasma levels in MM patients is higher than the average of NOx plasma levels in OP patients.

Previously, NOS (NO synthase) isoforms expressions *in situ* have been proven by R.V.Mendes *et al.* (2001), while NOS2 was expressed in 100% of myeloma plasma cells. Thus, the expression of NOS1 and NOS3 was 30% and 50% respectively²⁵, which concords with myeloma cells, can produce NO in high concentration. Furthermore, the quantification of plasma nitric oxide has been carried out in several hematological cancers, such as leukemia²⁶, and solid tumors including colorectal carcinoma²⁷, hepatocellular carcinoma²⁸, Oral Cavity Cancer²⁹, melanoma cancer³⁰, breast cancer³¹, gastric³² cancer.

NO has been taken as prognostic marker correlated positively with tumor grade and patients' survival, it seems to play a complex role in tumor microenvironment.

It has been also related to many cell growth processes, angiogenesis, immunomodulation, and apoptosis¹¹.

CONCLUSION

We conclude that NO quantification methods need to be improved in order to reach the real concentration of NO in plasma.

According to our results, high NO level in MM has been found despite the important variability in NO quantification that was noticed even in using the commercial kits. Hence, to explain the physiological and pathological role of NO in MM, further studies should be completed to investigate the correlation of NO plasma level with other prognostic markers of MM disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their appreciation of the financial support of the laboratories EA4666 - LNPC "Lymphocyte Normal - Pathologique et Cancers" and Inserm Unit 1088 in Amiens, France..

The authors would like to thank Pr.Grifi.F (The Department of Hematology, Hostiptal of Annaba), Pr.Saidi(The Department of Onco-hematology, Hostiptal of Batna), Pr.Rwabhia. S (The Department of internal medicine, Hostiptal of Batna), Dr.Benhalilou .M (The Department of Hematology, Hostiptal of Constantine), Algeria for their cooperation in collecting samples.

REFERENCES

1. Delsouc .M.B,Morales.L.D, Vallcaneras.S.S., Bronzi .D, Anzulovich.A.C,Delgado .S .M,Casais.M. Participation of the extrinsic cholinergic innervation in the action of nitric oxide on the ovarian steroidogenesis in the first proestrous in rats. *General and Comparative Endocrinology*, **236**: pp54–62 (2016).
2. Hill .B.G,Dranka .B .P,Shannon M. B, Lancaster Jr .J. R, Darley-Usmar V. M. .What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *the journal of biological chemistry*, **285**: (26):pp19699–19704 (2010).
3. Pacher.P, Beckman J.S, Liaudet.L .Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *PhysiolRev*, **87**: pp315–424 (2010).
4. Tsikas.D.Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, **851**:pp51–70 (2007).
5. Viinikka.L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scandinavian Journal Clinical and laboratory investigation*, **56**:7 (1996).
6. Moshage .H, Kok .B,Huizenga. J .R ,Jansen .P .L. M.Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: A Critical Evaluation .*clin.chem*, 1995; **41**(6): pp892-896.
7. Miranda.K.M,Espey .M.G,Wink.D.A.Rapid Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitricoxide.Biology and chemistry*, **5**(1): pp 62–71 (2001).
8. Singh .S, Gupta A .K. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer ChemotherPharmacol*, **67**: pp 1211–1224 (2011).
9. Podar.K, Richardson. P. G, Hideshima .T, Chauhan .D, Anderson .K.C.The malignant clone and the bone-marrow environment. *Best Pract Res ClinHaematol*, **20**(4):pp597-612 (2007).
10. James N. P, M.D, Philip M. P..*Multiple Myeloma .Group International, Inc.ISBN*, 0-597-84045-8 (2004).
11. Vannini.F, Kashfi. K,Nath.N.The dual role of iNOS in cancer.*Redox Biology*, **6**: pp334-343 (2015).
12. Burke .A .J,Sullivan .F.J, Giles .F. J, Glynn.S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression.*Carcinogenesis*, **34**(3):pp503–512 (2013).
13. Heider .U, Fleissner .C, Zavrski .I, Kaiser. M, Hecht. M,Jakob .C, O. Sezer. Bone markers in multiple myeloma.*european journal of cancer*, **42**: pp1544–1553.10.1016 (2006).
14. Lerner.U.H, Bone Remodeling in Postmenopausal Osteoporosis.*Journal of Dental Research*, **85**(7) (2006).
15. Ozgocmen.S, Kaya.H, Fadillioğlu.E, Aydoğan. R,Yılmaz.Z.Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal. *Mol Cell Biochem*, **295**(1-2):pp45-52 (2007).
16. Van't Hof .R.J, Ralston S. H.Nitric oxide and bone. *The journal of cells, molecules, systems and technologies*, **10**: pp1365-2567 (2001).
17. Ghasemi.A, Hedayati .M, Biabani. H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. *Journal of Medical Sciences Research*. (2007).
18. Sivaraman .T, Kumar T. K. S, Jayaraman .G, Yu.

- C. The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. *Journal of Protein Chemistry*, **16**: 4267 (1997).
19. Sun.J,Zhang. X, Broderick .M, Fein .H.Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay .*Sensors*, **3**: pp276-284 (2003).
 20. Berkels.R, Purol-Schnabel.S, Roesen.R. Measurement of Nitric Oxide by Reconversion of Nitrate/Nitrite to NO. *Methods in Molecular Biology:Nitric Oxide Protocols: Second Edition*, **279**: pp1-8 (2004).
 21. Guevaraa.I, Iwanejkoa.J,Dembińska-Kieæa .A, Pankiewicz .J, Wanata .A,Anna.P,Go³²a'beka .I, Bartuæa .S, Malczewska-Maleca .M,Szczudlikb.A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griessreaction.*ClinicaChimicaActa*, **274**: pp 177–188 (1998).
 22. Katharine.E. A, Robert .J. V, Peter. S. Grabowski, David .M. R, Stuart .H. R. Evidence for a Pathogenic Role of Nitric Oxide in Inflammation-Induced Osteoporosis.*Journal of Bone and Mineral Research* .**14**(12):2137.10.1359 (1999).
 23. Armour .K.J, ArmourK. E,Van'tH of R.J,Reid D.M,Wei .X,Liew F. Y,RalstonS.H.Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis.*Arthritis& Rheumatology*, **44**(12).pp2790–2796.10.1002 (2001).
 24. Ozgocmen.S, Kaya.H,Fadillioglu.E , Yilmaz.Z.EffectsofCalcitonin, Risedronate, and Raloxifene on Erythrocyte Antioxidant Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and Nitric Oxide in Postmenopausal Osteoporosis.*Archives of Medical Research*, **38**(2).pp196-205 (2007).
 25. R.V.Mendes,A.R.Martins,G.Nucci,F.Murad,F.A .Soares.Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosineimmunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma.*Histopathology*, **39**(2):pp172-8 (2001).
 26. Zhao .H, Dugas .N, Mathiot. C, Delmer .A, Dugas B, Sigaux F and Kolb J.P.K.B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Express a Functional Inducible Nitric Oxide Synthase Displaying Anti-Apoptotic Activity. *The American Society of Hematology*, **92**:pp1031-1043 (1998) .0006-4971/98/9203-0026\$3.00/0.
 27. Akbuluta.H,Altuntas.F,Akbulute K. G, Ozturk.G, Cindoruk .M,FikriIcli.E .U.prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma .*Cytokine*, **20**(4):pp 184–190 (2002).
 28. EISSA.L. A,EISA.N. H, EBRAHIM .M. A, RAGAB.M ,EL-GAYAR.A. M. Nitric Oxide is à Potential Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Sci Pharm*, **81**:pp763–775 (2013).
 29. Beevi. SS.S ,Rasheed.A.M, Geetha.A.Evaluation of Oxidative Stress and Nitric Oxide Levels in Patients with Oral Cavity Cancer.*Jpn J ClinOncol*, **34**(7): pp379-85 (2004).
 30. Ekmekcioglu.S .E, Ellerhorst. J, Smid. C.M, Prieto.V. G,Munsell.M, A.C. Buzaid, Grimm .E.A.Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Human Metastatic Melanoma Tumors Correlate with Poor Survival.*Clinical Cancer Research*, (6):4768–4775 (2000).
 31. Alagöl .H, Erdem .E,Sancak .B, Turkmen .G, Camlibel M. Bugdayci. G. Nitric oxide biosynthesis and malondialdehyde levels in advanced breast cancer.*Australian and New Zealand Journal of Surgery*, **69**: pp647–650 (1999).
 32. Bakan. E, Taysi.S, Polat.M .F, Dalga. S, Umudum.Z, Bakan.N, Gumus. M. Nitric Oxide Levels and Lipid Peroxidation in Plasma of Patients with Gastric Cancer. *Jpn J Clin Oncol*, **32**(5):pp162-6 (2002).

الملخص :

أكسيد النيتريك (NO) هو مؤشر حساس للالتهاب يرتبط ارتباطًا وثيقًا مع تطور السرطان. الورم النخاعي المتعدد (MM) هو سرطان دموي لخلايا بلازمية متميزة تمامًا في نخاع العظم (MPCs) ، هذا الأخير الذي يمثل بيئة ملائمة لتعزيز الاتصال بين الخلايا البلازمية الخبيثة وأنواع الخلايا الأخرى باستخدام وسائط التهابية تعتبر امراض عظام الورم النخاعي المتعدد (MBD) وإفراز الجلو بولين المناعي وحيد النسيلة من أكثر المظاهر وضوحًا في (MM).

يهدف هذا العمل إلى دراسة دور أكسيد النيتريك كوسيط التهابي في تطور MM وتأثيره على تطور الـ MBD. قمنا بتقييم تركيز NO البلازمي عند مرضى MM في الشرق الجزائري، وارتباطه المحتمل مع بعض مؤشرات تطور هذا المرض، أيضا مع تطور جهاز المناعة وبعض مؤشرات إعادة تشكيل العظام عند هؤلاء المرضى. إضافة إلى ذلك، أجرينا دراسة مخبرية لتقييم إنتاج NO من قبل البيئة السرطانية لـ MM من خلال اقتراح الزرع المشترك لخلايا الورم النخاعي المتعددة (MPCs) الممثلة بـ (8226 RPMI) مع خلايا الاستيوبلاستات (ostéoblastes) الممثلة بـ (MG63) في نفس الوسط. أظهرت النتائج زيادة محسوسة في تركيز NO في بلازما المرضى (MM) مقارنة بالشواهد ($p < 0,01$). ومن ثم ، سمح بيان تركيز الـ NO بالكشف عن علاقة طفيفة ببعض مؤشرات تطور الـ (MM). علاوة على ذلك وجدنا علاقة ذات دلالة إحصائية بين تركيز NO ومعدل الخلايا المناعية احادية النواة (les monocytes) ($p < 0,01$) وكذلك معدل الخلايا الحبيبية ($P < 0,01$) عند مرضى (MM).

بالإضافة إلى ذلك ، أكدت الدراسات المخبرية إنتاجًا مهمًا لـ NO من قبل سلالة خلايا الورم النخاعي المتعدد (RPMI 8226) والذي لوحظ أيضا بكمية كبيرة في حالة الزرع المشترك لهذه الخلايا السرطانية مع الخلايا العظمية (63MG). اين تم تأكيد وجود علاقة إيجابية بين تركيز الـ NO وتكاثر RPMI 8226.

سمح هذا العمل بإلقاء الضوء على دور NO في سرطان (MM) وتأثيره على ضعف المناعة و على بعض المظاهر المتصلة بهذا المرض بما في ذلك MBD.

الكلمات المفتاحية: الالتهاب ، أكسيد النيتريك (NO) ، الورم النخاعي المتعدد (MM) ، الخلايا البلازمية لورم النخاعي المتعدد (MPC) ، امراض عظام الورم النخاعي المتعدد (MBD). مؤشرات التطور ، مؤشرات إعادة تشكيل العظم ، الاستيوبلاستات (ostéoblastes) .

Abstract :

Nitric oxide (NO) is sensitive marker of inflammation and it is widely associated with cancer development. Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer of fully differentiated plasma cells in the bone marrow which is a favorable microenvironment for the promotion of communication between malignant plasma cells MPC (Myeloma plasma cells) and other cell types using pro-inflammatory mediators. Myeloma bone diseases (MBD) and monoclonal immunoglobulin secretion are the most visible aspects in MM.

The present work aims to study the role of (NO) as an inflammatory mediator in the progression of MM and its effect on the development of MBD. We evaluated *in vivo*, the NO concentration in the plasma of MM patients in the Algerian East, and its possible correlation with some prognostic marker evolution, the statue of the immune system, and some bone remodeling markers in these patients. We have also carried out a study *in vitro* to evaluate NO production by myeloma microenvironment using MPC (RPMI 8226 cell lines) co-culture with osteoblast (MG63 cell line) and to investigate anti-proliferative and cytotoxic effect of iNOS inhibitor on the two cell lines co-culture .

The results showed a significant increase of NO concentration in the plasma of MM patients comparing with the plasma of positive and negative controls ($p > 0.01$). Hence, the profile of NO concentration allowed the revealing of a slight relation with some prognostic and bone remodeling markers. Furthermore we found a significant relationship between NO concentration and monocytes ($p > 0.01$) as well as granulocytes rate ($p > 0.01$) in the MM patients.

In addition, the studies realized *in vitro* confirmed an important production of NO by myeloma cell line (RPMI 8226), which was also noticed in the case of the co-culture of myeloma cell line (RPMI 8226) with the osteoblast (MG63).

This work has elucidated the role of NO in MM cancer and its effect on some manifestations of the disease, including MBD.

Key words : inflammation , nitric oxide (NO) , multiple myeloma (MM) , myeloma microenvironment , (MPC) myeloma plasma cells meyeloma bone deseases MBD. Myeloma prognostic marker, bone remodeling marker ,iNOS inhibitor, osteoblast.

Année universitaire : 2018-2019

Présentée par : OTMANI Khawla

Intitulé

Etude du rôle de Monoxyde d'azote (NO) dans la progression du myélome Multiple (MM) et son implication dans le développement des maladies osseuses associées au MM chez une population de l'Est Algérien

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat

Résumé :

Le monoxyde d'azote (NO) est un marqueur inflammatoire qui est largement associé au développement du cancer. Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler, est une hémopathie maligne, caractérisée par la prolifération au niveau de la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux sécrétant le plus souvent une immunoglobuline monoclonale. Cette prolifération crée un microenvironnement tumoral favorable à la communication entre les plasmocytes malins (MPC) et différents types cellulaires en utilisant des médiateurs pro-inflammatoires. Les maladies osseuses associées au MM (MBD) et la sécrétion d'immunoglobuline monoclonale sont les aspects les plus visibles au cours de MM.

Ce travail vise à étudier le rôle de monoxyde d'azote en tant que médiateur inflammatoire dans la progression de MM et son effet sur le développement des (MBD). Nous avons évalué la concentration de NO plasmatique chez des patients atteints de MM (dans un échantillon de population de l'Est Algérien) et étudié la corrélation de la concentration de NO avec l'évolution des marqueurs de pronostic, le développement du système immunitaire et l'évolution des certains marqueurs de remodelage osseux chez ces patients. Nous avons également mené une étude in vitro pour évaluer la production de NO par le microenvironnement de MM en proposant la co-culture des MPCs (les lignées cellulaires RPMI 8226) avec des ostéoblastes (lignées cellulaires MG63)

Les résultats ont montré une augmentation significative de la concentration de NO dans le plasma chez les patients atteints de MM comparativement au plasma des contrôles positifs et négatifs ($p > 0,01$). Ainsi, le profil de concentration de NO a permis de révéler une légère relation avec certains marqueurs pronostiques de MM. une corrélation négative a été également remarquée entre la concentration de NO et le niveau de certains éléments immunitaires incluant le taux des monocytes ($p > 0,01$) et le taux des granulocytes ($p > 0,01$). En outre, l'étude a révélé une relation étroite entre la concentration de NO et la concentration de certains marqueurs biochimique de remodelage osseux chez les patients MM.

Les résultats réalisés in vitro ont confirmé une importante production de NO par les cellules RPMI 8226 ce qui a été remarqué également dans le cas de la co-culture des RPMI 8226 avec les MG63. Une corrélation positive entre la concentration de NO et la viabilité des RPMI 8226 a été confirmée.

Ce travail a permis d'élucider le rôle du NO dans la progression de cancer du MM et son effet sur le dysfonctionnement immunitaire et certaines manifestations associées à la maladie, y compris les MBD.

Mots clés : inflammation, monoxyde d'azote (NO), myélome multiple (MM), le microenvironnement de MM, myeloma plasma cells (MPC). Les maladies osseuses associées au MM (MBD). Marqueur pronostique de MM, marqueur de remodelage osseux, ostéoblaste.

Laboratoire de recherche :