

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

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENNE

Faculté des Sciences Biologiques

MEMOIRE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de magister

En : Sciences de la nature

Spécialité : **Biochimie –Immunologie**

Par :

M^{elle} AMRI MANEL

Thème :

Etude de l'effet synergique ou additionnel de deux fractions antigéniques solubles et/ou de l'IFN- γ sur la production de l'IL-12, de l'IL-8 et du NO sur culture de PBMC préparées à partir de sang de patients atteints d'hydatidose :
Perspective d'une stratégie anti-hydatique.

Soutenue publiquement le 04/07/05 devant le jury :

Mme F. Laraba Djebari	Présidente
Mme C. Touil-Boukoffa	Directrice de thèse
Mr R. Bakour	Examineur
Mme D. Hammoudi- Triki	Examinatrice
Mr B. Hamrioui	Examineur
Mr A. Touabti	Examineur

DEDICACES



*A ma très chère mère que j'adore
Bien faible témoignage d'affection et de reconnaissance*

*A mes très chers frères Sofiane et Mehdi
Avec ma tendre affection*

*A la mémoire de ma grand-mère, de mon père
Et de mon beau-père*

A toute ma famille

A mes amies Sihem et Selma

Dieu les garde

REMERCIEMENTS



Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « cytokines et NO synthase » du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté des Sciences Biologiques– USTHB.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements particulièrement à :

Mme Touil-Boukoffa C., Professeur à la faculté des Sciences Biologiques. Nous avons eu le privilège de travailler sous la direction de ce grand maître des interférons et des cytokines. Elle a inspiré, suivi et guidé ce travail depuis le commencement. Nous avons apprécié sa rigueur scientifique et ses critiques . Nous la remercions vivement et lui devons une reconnaissance toute particulière pour l'affection et la confiance qu'elle nous a témoignées.

Mme Laraba-Djebari F., Professeur à la faculté des Sciences Biologiques qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Nous la remerciant pour ses encouragements et sa gentillesse. Nous avons beaucoup profité de son enseignement en ingénierie des protéines.

Mr Bakour R., Professeur à la faculté des Sciences Biologiques pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce travail. Nous avons beaucoup profité de son enseignement

Mme Hammoudi-Triki D., Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques. Nous la remercions d'avoir aimablement accepter d'examiner ce travail. Nous la remerciant pour ses encouragements et sa gentillesse. Nous avons beaucoup profité de son enseignement.

Mr Hamrioui B., Professeur Chef de service du Laboratoire de Parasitologie au CHU Mustapha d'Alger pour l'intérêt qu'il porte à notre travail. Nous lui sommes reconnaissants pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

Mr Touabti A., Professeur Chef de service au CHU de Sétif et Doyen de la faculté de médecine à l'université de Sétif, pour nous avoir honorés de sa présence en se déplaçant de Sétif pour examiner ce travail.

Qu'ils trouvent tous ici le témoignage de notre profonde reconnaissance pour leurs intérêt et disponibilité malgré leurs lourdes occupations .

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à :

Mme Djerdjouri B., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques pour sa gentillesse et ses encouragements. Son enseignement nous a été très profitable.

Mr Ahmedi E.L., Chargé de cours à la Faculté des Sciences Biologiques pour ses conseils, ses encouragements et son aide.

A tous mes professeurs, Mme Addour, Mme Otmani, Mr Abderahmani, Mr Soltani et tous les autres.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de notre profonde reconnaissance pour l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

A Mme Benazzoug et Mr Boufersaoui, Professeurs à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous ont honoré de leur confiance en nous facilitant l'accès à leurs laboratoires pour la réalisation de la partie histologique de cette étude.

Nos remerciements s'adressent également aux ingénieurs de laboratoire en particulier Radia, Ibtissem, Karima, Soukaina et Mourad. A toute l'équipe de Biochimie.

A tous les membres de notre équipe : Ramdane, Saliha, Nabil, Dalila, Djamel, Razika et Hadjira.

A mes camarades et amies magister en physiologie : Amel, Saida, Rbiha, Nadjiba et Samia. A Hanane.

A ma très chère amie et camarade de route Houda à qui nous devons énormément. Sans son amitié, son aide et ses encouragements pénible aura été la durée de cette étude.

A tous mes amis membres de l'équipe de Biochimie: Amel, Nabila, Abdou, Fatah avec lesquels nous avons tant partagé. Avec nos sincères remerciements pour leur amitié, leur aide et leurs encouragements.

A Hayet et Nadia, avec toute mon amitié et mon affection.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à tout le personnel des services hospitaliers et aux patients , à qui nous souhaitons un prompt rétablissement

Enfin , à toutes les personnes dont les noms ne sont pas cités ici mais qui par leur sourire et leur gentillesse nous ont apporté réconfort et soutien.

LISTE DES ABREVIATIONS

a	After
AcM	Anticorps monoclonaux
AF	Acessory Factor
Ag	Antigène
Akt	Protéine kinase B
AP-1	Activator protein-1
APC	Antigen presenting cell
b	Before
BH4	Tétrahydrobioptérine
CLMF	Facteur de maturation des lymphocytes cytotoxiques
ConA	ConcanavallineA
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
DAG	Diacylglycerol
<i>E.g</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
EAE	Encéphalomyélite expérimentale auto- immune
EDRF	Facteur relaxant dérivant de l'endothélium
EG95	<i>Echinococcus granulosus</i> 95
eIF-2	Facteur d'initiation de la translocation eucaryotique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GAF	Gamma activating factor
GAS	Gamma activating séquence
GDP	Guanidine diphosphate
GMPc	Guanidine monophosphate cyclique
GTP	Guanidine triphosphate
hIFN- γ	h : humain
HIV	Human immunodéficiency virus
HNF-1	Facteur nucléaire des hépatocytes -1
IB	Immunoblot
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire
IDD	Immunodiffusion double
IES	Immunoélectrosynérèse
IFI	Immunofluorescence indirect
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IHA	Hémaagglutination indirect
IL	Interleukine
iNOS/NOS2	NO synthase inductible (2)
IP3	Inositol 1.4.5-triphosphate
IRF-1	Interferon regulatory factor-1
ISICR	International society of interferon cytokine research
JAK	Janus activating kinase
KH	Kyste hydatique
LAK	Lymphocyte activated killer
L-Arg	L-arginine
LHT	Liquide hydatique total

LHP	Liquide hydatique du poumon
LHF	Liquide hydatique du foie
LHPT	Liquide hydatique total du poumon
LHNF	Liquide hydatique non fertile
LHC	Liquide hydatique de la cuisse
LHO	Liquide hydatique de l'ovaire
LIF	Leukemia inhibitory factor
L-NMMA	N-monométhyl-L-arginine
LTA	Acide lipoteichoïque
LTB ₄	Leucotriène B ₄
MAF	Macrophage Activating Factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDCF	Monocyte-derived chemotactic factor
MuIFN- γ	Mu : murin
NADPH	β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NAF	Neutrophil activating factor
NF-K β	Nuclear factor κ B
NK	Natural killer
NKSF	NK stimulating factor
NOHA	N-hydroxy- arginine
PAF	Platelet-activating factor
PAIR	Ponction, Aspiration, Injection et Réaspiration
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphériques
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PHA	Phytohémagglutinine
PI	Phosphoinositol
PI3K- γ	Phosphatidyl inositol 3 kinase- γ
PIP ₂	Phosphatidyl inositol 4.5-diphosphate
PIP ₃	Phosphatidyl inositol 3.4.5-triphosphates
PKR	Protéine kinase de régulation des RNA
PLC/PKC	Phospholipase C/protéine kinase C
PLD	Phospholipase D
PSC	Protoscolex
PTK	Protéine tyrosine kinase
ROI	Reactive oxygen intermediates
RX	Rayon X
SCF	Stem cells factor
TCR	T cell receptor
TGF-B	Tumor growth factor -B
Th	Lymphocytes T auxiliaires
TNF	Tumor necrosis factor
TYK	Tyrosine kinase
UAE	Uveite auto-immune expérimentale

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
L'INTERFERON- GAMMA	
I- Introduction	3
II- Structure de l'IFN- γ	3
III- Sources cellulaires de l'IFN- γ	4
IV- Les principaux inducteurs de l'IFN- γ	4
V- Régulation de la synthèse de l'IFN- γ	4
VI- Le récepteur de l'IFN- γ	5
VII- Mode de transmission de l'information	5
VIII- Les propriétés de l'IFN- γ	7
1. La propriété immuno-modulatrice	7
2. La propriété antivirale	8
3. La propriété antiparasitaire	8
IX – L'IFN- γ et le TNF- α	9
X – Pathologies associées à l'IFN- γ	12
XI – Les applications cliniques (Thérapeutiques) de l'IFN- γ	12
LE MONOXYDE D'AZOTE	
I – Introduction	14
II – Biosynthèse du monoxyde d'azote	14
1. Les cellules productrices de NO	14
2. Les NO synthases	15
3. Le mécanisme de biosynthèse du NO	16
III – Régulation du métabolisme des NOS	16
IV – Les dérivés (métabolites) du NO	18
V – Rôle biologique du NO	18
1. Rôle du NO dans la transmission de l'information	18
2. Rôle du NO dans l'immunité et l'inflammation	18
2a - Cytotoxicité anti-tumorale du NO	20
2b - Cytotoxicité antivirale du NO	20
2c - Cytotoxicité antibactérienne et antiparasitaire du NO	20
VI - NO et physiopathologies	20
VII – Utilisation directe ou indirecte du NO dans les études de cytotoxicité bactérienne, parasitaire et tumorale	23
L'INTERLEUKINE-12	
I – Introduction et historique	24
II – Structure de l'IL-12	24
III – Production de l'IL-12	25
IV – Principaux inducteurs de la production de l'IL-12	25
1. Production de l'IL-12 en réponse à un stimulus bactérien	25
2. Production de l'IL-12 en réponse à l'interaction CPA-cellule T	25
V – Régulation de la production de l'IL-12	25
VI – Le récepteur de l'IL-12	26
VII- Le mode de transmission du signal	27

VIII – Les principaux effets biologiques de l’IL-12 -----	27
IX - L’IL-12 et physiopathologies -----	29
X – Utilisation thérapeutique de l’IL-12 dans certaines pathologies infectieuses -----	29

L’INTERLEUKINE-8

I – Introduction -----	31
II – Structure de l’IL-8 -----	32
III – Production ubiquitaire de l’IL-8 -----	32
IV – Régulation de la production de l’IL-8 -----	33
V – Les récepteurs de l’IL-8 -----	33
VI – Transduction du signal -----	34
VII – Les activités biologiques de l’IL-8 -----	35
A - Action de l’IL-8 sur les leucocytes neutrophiles -----	35
B - Action de l’IL-8 sur d’autres types de leucocytes -----	37
VIII – Rôle de l’IL-8 dans les manifestations inflammatoires -----	37
X - Rôle de l’IL-8 dans les pathologies infectieuses -----	38
A - L’IL-8 dans les infections bactériennes -----	38
B - L’IL-8 dans les infections virales -----	38

L’ECHINOCOCCOSE

I – Introduction -----	39
II – La forme adulte du parasite -----	39
a- Morphologie -----	39
b- L’hôte définitif -----	40
c-La production des œufs -----	40
III – La transmission à l’hôte intermédiaire -----	40
a. Les œufs (embryophores) -----	40
b. L’infestation et l’évolution larvaire -----	40
IV - L’évolution larvaire chez l’homme -----	42
a- Le mode d’infestation -----	42
b- La forme larvaire du parasite -----	42
V – Le pouvoir antigénique du parasite -----	44
a- L’antigène A -----	46
b -L’antigène B -----	46
VI – La répartition géographique -----	46
VII – Symptomatologie et localisations -----	47
a- La symptomatologie -----	47
b- Les localisations -----	47
VIII – Le diagnostic -----	47
IX – La thérapie -----	49
a- La thérapie chirurgicale -----	49
b- La chimiothérapie -----	51
c- La ponction évacuatrice des kystes (PAIR) -----	51
X – La prophylaxie -----	51
XII – La vaccination -----	53
XIII – Les réponses immunitaires de l’hôte -----	53
a- La réponse tissulaire -----	53
b- La réponse cellulaire -----	53
c- La réponse humorale -----	54
XV – Les mécanismes d’échappement -----	54

MATERIEL ET METHODES

A – Matériel -----	57
1 - Les sérums -----	57
2 - Les cellules -----	57
3 - Les kystes et liquides hydatiques -----	57
4 - Les tissus -----	57
5 - Les milieux de culture -----	58
6 - L'interféron de référence -----	58
7 - La souche <i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 8062 -----	58
8 - Les réactifs Immunotech -----	58
B – Méthodes -----	59
I – Préparation et Caractérisation des deux entités antigéniques : soluble : LHT et figurée : PSC -----	59
1 - Préparation des deux antigènes -----	59
2 - Caractérisation antigénique et biochimique des échantillons de LHT et de PSC -----	59
a- Caractérisation biochimique -----	59
a1 – Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS -----	59
a2 – Par chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A-Ultrogel -----	60
b- Caractérisation antigénique -----	60
b1 – Par immunoélectrophorèse -----	60
b2 – Par immunodiffusion double -----	60
b3 – Par ELISA -----	61
b4 – Par Immunoblot -----	61
II – Identification des différentes fractions du liquide hydatique pulmonaire humain par gel filtration sur séphadex G200 -----	62
III – Mise en culture des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et inductions -----	62
1 - Préparation des PBMC -----	62
2 – Etude de l'effet de l'antigène 5 et la fraction P50 purifiées du liquide hydatique et/ou de l'IFN- γ sur la production de l'IL-12, de l'IL-8 et du NO sur culture de PBMC -----	63
3- Etude de l'effet de concentrations croissantes de LHT et de PSC sur la production de NO. Impact sur la viabilité des cellules et des PSC -----	63
4 - Etude de l'effet de l'IFN- γ sur la production de NO sur culture de PBMC Impact sur la viabilité des PSC -----	63
4 - IV – Dosage <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO -----	63
1 - Dosage des cytokines -----	63
2 - Dosage du monoxyde d'azote -----	64
IIV – Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO ₂ ⁻ sur :	
1 - L'hydatide -----	64
2 - Le tissu pulmonaire bovin (étude histologique) -----	65

RESULTATS ET DISCUSSION

I – Préparation de l'antigène soluble total : le liquide hydatique -----	67
1 - Caractérisation biochimique des liquides hydatiques -----	67
2 - Caractérisation antigénique des liquides hydatiques -----	70
II- Préparation de deux fractions antigéniques du liquide hydatique : l'antigène 5 (F5) et la protéine de 50 kDa (P50) -----	73
1 - Caractérisation biochimique des deux fractions sélectionnées -----	75
2 - Caractérisation antigénique de la F5 et de la P50 -----	75
III - Préparation de l'antigène figuré : les protoscolex -----	80
III - 1 - Evaluation de la viabilité des protoscolex par -----	80

III – 1 a - Le Test d'exclusion de l'éosine à 1 % -----	80
III – 1 b - Le Test de mobilité -----	80
III- 2 - Caractérisation biochimique des échantillons de protoscolex (Etude comparative avec le liquide hydatique) -----	85
III- 3 - Caractérisation antigénique des échantillons de protoscolex (Etude comparative avec le liquide hydatique) -----	85
IV- Dosage <i>in vivo</i> des cytokines (l'IL-8 et l'IL-12) et du monoxyde d'azote dans les sérums et les liquides hydatiques de patients atteints d'hydatidose -----	88
IV-1– Dosage sérique de l'IL-8, l'IL-12 et du NO -----	88
IV-1a- Dosage cytokinique -----	88
IV- 1b- Dosage sérique du NO -----	94
IV- 1c- Dosage du NO sérique et immunoréactivité -----	97
IV–2- Dosage de l'IL-8, l'IL-12 et du NO dans les liquides hydatiques -----	100
V- Etude de la production <i>in vitro</i> de l'IL-8, l'IL-12 et du NO au niveau des cultures de PBMC induites avec les deux antigènes F5 et P50-----	107
VI- Etude de l'effet de l'IFN- γ (10 UI/ml et 100 UI/ml) sur la production <i>in vitro</i> de l'IL-8, l'IL-12 et du NO au niveau des cultures de PBMC induites avec les deux antigènes F5 et P50 -----	112
VII- Etude de l'effet du liquide hydatique et des protoscolex sur la production <i>in vitro</i> de NO. Impact sur la viabilité des cellules et des protoscolex -----	122
VII-1 – Effet de concentrations croissantes de liquide hydatique sur la production de NO. Impact sur la viabilité des cellules -----	122
VII-2 – Effet de concentrations croissantes de protoscolex sur la production de NO. Impact sur la viabilité des PSC -----	125
VIII- Etude de l'effet de l'IFN- γ sur la viabilité des protoscolex mis en coculture avec les PBMC de sujets hydatiques. Rôle potentiel du NO-----	129
IX– Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur l'hydatide et le tissu pulmonaire bovin -----	134
IX-1– Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur l'hydatide -----	134
IX-2 – Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur le tissu pulmonaire bovine (étude histologique) -----	139
Discussion générale -----	141
CONCLUSION -----	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	150
RESUME -----	173

INTRODUCTION

L'hydatidose est une cestodose larvaire due au ténia de chien *Echinococcus granulosus*. Le cycle parasitaire se déroule habituellement entre le chien (hôte définitif) et des mammifères herbivores ou omnivores. Elle peut également toucher l'homme en tant qu'hôte intermédiaire. Elle est cosmopolite et s'observe avec une plus grande fréquence dans les pays du bassin méditerranéen dont l'Algérie où elle constitue un véritable problème de santé publique. Elle est asymptomatique d'où la difficulté d'effectuer un diagnostic précis et précoce. La chirurgie reste le traitement de choix (Margutti et al., 2002 ; Siracusano et al., 2002 ; Zhang et al., 2003).

La complexité antigénique des extraits de liquide hydatique constitue un obstacle au diagnostic sérologique de certitude de l'hydatidose. Dans ce contexte, une meilleure connaissance de l'origine et de la structure des antigènes hydatiques et leur obtention à l'état pur permettrait probablement d'assurer un diagnostic avec une plus grande efficacité (Touil-Boukoffa et al., 1998 ; Rigano et al., 2001 ; Ortona et al., 2000). Les recherches entreprenant *in vitro* portant sur l'aptitude des antigènes hydatiques à induire la production de cytokines et de monoxyde d'azote par les cellules des sujets hydatiques devraient ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de pathogenèse et l'immunosurveillance voire l'immunothérapie de cette pathologie. Cet aspect a fait l'objet de nombreux travaux dont ceux de Touil-Boukoffa et al (Touil-Boukoffa et al., 1997 ; 1998, 2000a et 2000b ; Ait Aissa, 2002 ; Mezioug et al., 2004) qui ont mis en évidence le rôle de l'antigène 5, antigène majeur isolé du liquide hydatique dans l'induction de plusieurs cytokines (l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-12) et du NO au cours du processus de défense de l'hôte contre ce macroparasite. Les travaux antérieurs (réalisés au sein de l'équipe du Pr Touil-Boukoffa) ont également révélé l'implication de l'interféron- γ et du NO dans la réponse immunitaire anti-hydatique.

L'IFN- γ est une cytokine aux effets pléiotropiques (Trinchieri et Perussia, 1985). Il joue un rôle important dans la phase d'initiation et de modulation de la réponse immunitaire. C'est l'agent inducteur essentiel de la production de l'IL-12 (Lepage et al., 1997 ; Trinchieri, 1997) de l'IL-8 (Matsushima et al., 1988 ; Baggiolini et al., 1997) et de la voie de synthèse du NO (Drapier, 1997). Il joue également un rôle essentiel dans l'activité cytotoxique des macrophages vis à vis des cellules tumorales, des bactéries et des parasites à multiplication intracellulaire *in vivo* et *in vitro* (Murray, 1994b). Cette activité cytotoxique est due à la production de superoxyde et de NO (Drapier et al., 1988 ; Piedrafita et Liew, 1998; Szabo et al., 2003). Ce dernier est un important médiateur cytotoxique et cytostatique pour une variété de pathogènes incluant champignons, bactéries et parasites (Asenzi et al., 2003 ; Piedrafita et Liew, 2004).

Toutes ces données nous ont incité à rechercher d'une part, une nouvelle fraction antigénique du liquide hydatique pouvant avoir un intérêt dans le diagnostic de certitude de l'hydatidose. D'autre part, nous avons voulu identifier ou rechercher une ou plusieurs molécules impliquées dans la défense anti- hydatique dans une perspective d'utilisation thérapeutique.

Notre démarche expérimentale a porté sur les points suivants :

Dans le premier volet de ce travail, nous nous sommes attachés à la purification et à la caractérisation biochimique et antigénique de deux fractions du liquide hydatique : l'antigène 5 et une nouvelle protéine non identifiée jusqu'à l'heure actuelle. Nous avons été également amenés à situer l'aptitude de ces deux antigènes à induire deux cytokines l'IL-12 et l'IL-8 (marqueurs essentiels dans la réponse immunitaire innée et adaptative) et le monoxyde d'azote (effecteur majeur de la réponse inflammatoire sous le contrôle des cytokines) par les cellules mononuclées préparées à partir du sang circulant de patients hydatiques. Cette production a été également évaluée en présence d'IFN- γ (à deux titres). L'étude a été complétée par l'évaluation de la production des trois biomolécules *in vivo*.

Dans le second volet de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet de l'IFN- γ sur la viabilité des protoscolex mis en cocultures avec les PBMC de sujets hydatiques et à quantifier l'un des produits de son induction : le monoxyde d'azote (NO). Cette étude a été complétée par l'évaluation de l'effet des nitrites sur l'hydatide et le tissu pulmonaire.

L'INTERFERON- GAMMA

I - INTRODUCTION :

Les réponses immunitaires sont la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types de cellules (lymphocytes T, lymphocytes B, polynucléaires, progéniteurs de l'hématopoïèse...etc.), qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de facteurs solubles appelés : cytokines. Ces messagers solubles représentent le langage universel dans le dialogue mené entre les différentes cellules de l'organisme. Ce sont des effecteurs pouvant modifier, induire ou supprimer les fonctions de nombreux types cellulaires (Galanaud, 1993 ; Pelletier et *al.*, 1993 ; Wietzerbin et *al.*, 1997 ; Fradelizi, 1998 ; Touil-Boukoffa, 1998)

C'est en 1957, qu'Isaacs et Lindenmann observèrent que des cellules de membranes chorio-allantoïdiennes de poulet infectées par un virus produisent *in vitro* un facteur soluble protéique. Ce dernier est capable d'induire l'inhibition de la multiplication virale. Cette protéine néo-synthétisée sera baptisée l'interféron (IFN) (Isaacs et Lindenmann, 1957). Elle a la propriété d'instaurer un état de résistance sur des cellules saines contre l'infection virale.

Les interférons représentent une famille hétérogène de cytokines (Manninier, 1993) qui peuvent être classés sur la base de leur origine génétique et les effets produits en deux sous classes (Falcoff et *al.*, 1972 ; Ijzermans et Marquet, 1989 ; ISICR, 2001).

- La sous classe I : qui comprend l'IFN- α et β .
- La sous classe II : qui comprend l'IFN- γ .

Récemment, d'autres IFN ont été définies par la commission internationale ISICR. Il s'agit de l'IFN de type I nommé l'IFN- ω et de l'IFN trophoblastique des ruminants ou l'IFN- τ (Sen, 1996 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Lepage et *al.*, 2000 ; ISICR, 2001)

L'interféron- γ est le premier produit sécrété par les cellules T (Wheelock, 1965 ; Gallin et *al.*, 1995) et le premier produit des cellules T clonées (Falcoff et *al.*, 1972 ; Gray et Goeddel, 1983 ; Sanceau et *al.*, 1992) mis en évidence.

II - STRUCTURE DE L'IFN- γ :

L'interféron- γ ou MAF (Macrophage Activating Factor) est une glycoprotéine de 143 résidus aminés chez l'homme (Wietzerbin et *al.*, 1979 ; Gray et Goeddel, 1983 ; Wietzerbin, 1984 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Janeway, 2003 ; Szabo et *al.*, 2003). Elle est codée par un gène unique situé sur le chromosome 12 (Gray et Goeddel, 1982 ; Mammette, 2002) qui donne une protéine de 17 kDa. Cette dernière subira une glycosylation post-transcriptionnelle sur les résidus 16 et 69, aboutissant à la formation de la forme mature de la protéine dont le poids moléculaire varie entre 20 kDa et 25 kDa (Yip et *al.*, 1982). La glycosylation ne joue pas un rôle dans l'expression de l'activité de cette cytokine, mais influence sa demie vie (Kelker et *al.*, 1983).

La forme biologiquement active est un homodimère stabilisé par des liaisons non covalentes (Fountoulakis et *al.*, 1992). Les deux sous unités étant organisées en six hélices α et feuillet β (Farber, 1995 ; Gallin et *al.*, 1995 ; Greenlund et *al.*, 1995).

III – LES SOURCES CELLULAIRES DE L'IFN- γ :

Les cellules productrices de l'IFN- γ sont extrêmement variées, cependant nous retrouvons majoritairement : les cellules T CD4⁺ de type Th1 (Wheelock, 1965 ; Touil-Boukoffa, 1986 ; Romagnani, 1996 et 1997 ; Singh et *al.*, 1999), les cellules NK et les cellules T CD8⁺ (Touil-Boukoffa, 1986 ; Cher et Mosmann, 1987 ; Farber, 1995 ; Gallin et *al.*, 1995 ; Constant et Bottomly, 1997 ; Billiau et *al.*, 2000 ; Murphy et *al.*, 2000 ; Szabo et *al.*, 2003 ; Schroder et *al.*, 2004).

D'autres études rapportent l'existence probable d'autres sources cellulaires telles que les cellules dendritiques, les cellules TCD4⁺ naïves et les lymphocytes B (Munder et *al.*, 1998 ; Yoshimoto et *al.*, 1998 ; Fukao et *al.*, 2000 ; Grogan et *al.*, 2001 ; Szabo et *al.*, 2003) et les cellules T CD3⁺ (Janeway, 2003). Toutefois, ces données sont sujet à controverse (ISICR, 2004)

IV - LES PRINCIPAUX INDUCTEURS DE L'IFN- γ :

La synthèse de l'IFN- γ est stimulée par plusieurs agents mitogènes tels que la phytohémagglutinine (PHA) (Wheelock, 1965), les ARN bicaténaires naturels ou de synthèses (Falcoff et Falcoff, 1970 ; Falcoff et *al.*, 1972 ; 1973), les lipopolysaccharides (Johnson et *al.*, 1977), l'enterotoxine A des staphylocoques (Younger et *al.*, 1965 ; Langford et *al.*, 1981), la concanavaline A (ConA) (Van Damme et *al.*, 1981) et l'ion nitrogène 12-myristate 13 acétate-ionomycine (PMA) (Rigano et *al.*, 1998).

Les inducteurs peuvent également être d'origine parasitaire tels que les antigènes hydatiques (Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et *al.*, 2000) ou les parasites protozoaires tels que les Trypanosomes (Plata et *al.*, 1984 ; Nathan, 1992 ; Gallin et *al.*, 1995).

V - REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE L'IFN- γ :

La synthèse d'ARNm codant pour l'IFN- γ est détectable 6 à 8 h après la stimulation des lymphocytes T. La protéine est sécrétée immédiatement après sa synthèse. Elle peut être détectée dans le milieu extracellulaire 8 à 12 h après stimulation, avec un pic de sécrétion 12 à 24 h après. Après, sa sécrétion déclinera progressivement.

Plusieurs cytokines ont été décrites en tant que facteurs régulateurs de la production de l'IFN- γ . En effet, les cytokines sécrétées par certaines APC (antigen presenting cell) induisent l'expression du gène de l'IFN- γ dans les cellules sources. Les plus importantes étant l'IL-12 et l'IL-18 synthétisées par les macrophages et les cellules dendritiques (Seder et *al.*, 1993 ; Constant et Bottomly, 1997 ; Billiau et *al.*, 2000). En revanche, l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes sont impliqués dans la régulation négative de cette synthèse (Billiau et *al.*, 2000 ; Fukao et *al.*, 2000 ; Schroder et *al.*, 2004).

VI – LE RECEPTEUR DE L'IFN- γ :

L'IFN- γ exerce son effet par liaison à un récepteur présent dans plusieurs types de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de type II caractérisés par une constante d'affinité élevée (Wietzerbin et *al.*, 1984 ; Sancéau et *al.*, 1992 ; Boehm et *al.*, 1997 ; Szabo et *al.*, 2003).

Le récepteur de l'IFN- γ est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques α (R1) et β (R2, ou AF : accessory factor) (Aguet et Merlin, 1987 ; Farber, 1995). La chaîne α est à la fois nécessaire et suffisante pour la liaison du ligand (IFN- γ) (Aguet et *al.*, 1988 ; Foutoukalis et *al.*, 1991 ; Gallin et *al.*, 1995 ; Benarbei et *al.*, 2001), tandis que la chaîne transmembranaire β est responsable de la transduction du signal (Bazan, 1990 ; Igarashi et *al.*, 1994 ; Soht et *al.*, 1994 ; Gallin et *al.*, 1995 ; Kotenko et *al.*, 1995 ; Benarbei et *al.*, 2001 ; Schroder et *al.*, 2004). Chez l'homme il a été mis en évidence la présence de trois AF (AF-1, AF-2 et AF-3) (Cook et *al.*, 1994).

Malgré une forte concentration du récepteur (350.000 récepteurs/cellule), les cellules humaines ne répondent qu'à l'hIFN- γ (h : humain) et non au MuIFN- γ (Mu : murin). Ces études suggèrent l'existence d'un composant spécifique de l'espèce, nécessaire au fonctionnement du récepteur. Il a été démontré plus tard que ce composant est la sous unité β (Gray et *al.*, 1997). Cette dernière a pour rôle la stabilisation du complexe formé entre le ligand et la sous unité α .

VII – MODE DE TRANSMISSION DE L'INFORMATION :

L'interaction de l'IFN- γ avec la sous unité α du récepteur entraîne la dimérisation des 2 sous unités (α et β) et le rapprochement des protéines JAK (janus activating kinase) (Levy, 1995). L'autophosphorylation de la protéine JAK2 associée au R2 se produit en premier, elle est nécessaire pour la transphosphorylation de la protéine JAK1 liée au R1 (Shnaike et *al.*, 1994 ; Farber, 1995 ; Briscoe et *al.*, 1996 ; Schroder et *al.*, 2004). Cette phosphorylation croisée des protéines JAK induit leur activation et leur permet de phosphoryler à leur tour le résidu tyrosine 440 du R1 (Igarashi et *al.*, 1994 ; Wietzerbin et *al.*, 1997).

Après phosphorylation, le R1 offre des sites contenant des phospho-tyrosines proches de la partie C-terminale reconnue par les domaines SH2 du facteur cytoplasmique STAT1 α (Greenlund et *al.*, 1995 ; Lepage et *al.*, 1997). Ces facteurs sont alors phosphorylés par les protéines JAK sur les résidus tyrosines, ce qui induit leur association en homodimères appelés GAF (gamma activation factor).

Après la translocation nucléaire, les GAF se fixent sur des séquences cibles spécifiques de l'ADN appelées GAS (gamma activation sequence) en amont des gènes régulés par l'INF- γ (Pellegrini et Schindler, 1993 ; Darnell et *al.*, 1994 ; Greenlund et *al.*, 1995 ; Wietzerbin et *al.*, 1997 ; Takikawa et *al.*, 1998) (Fig. 1).

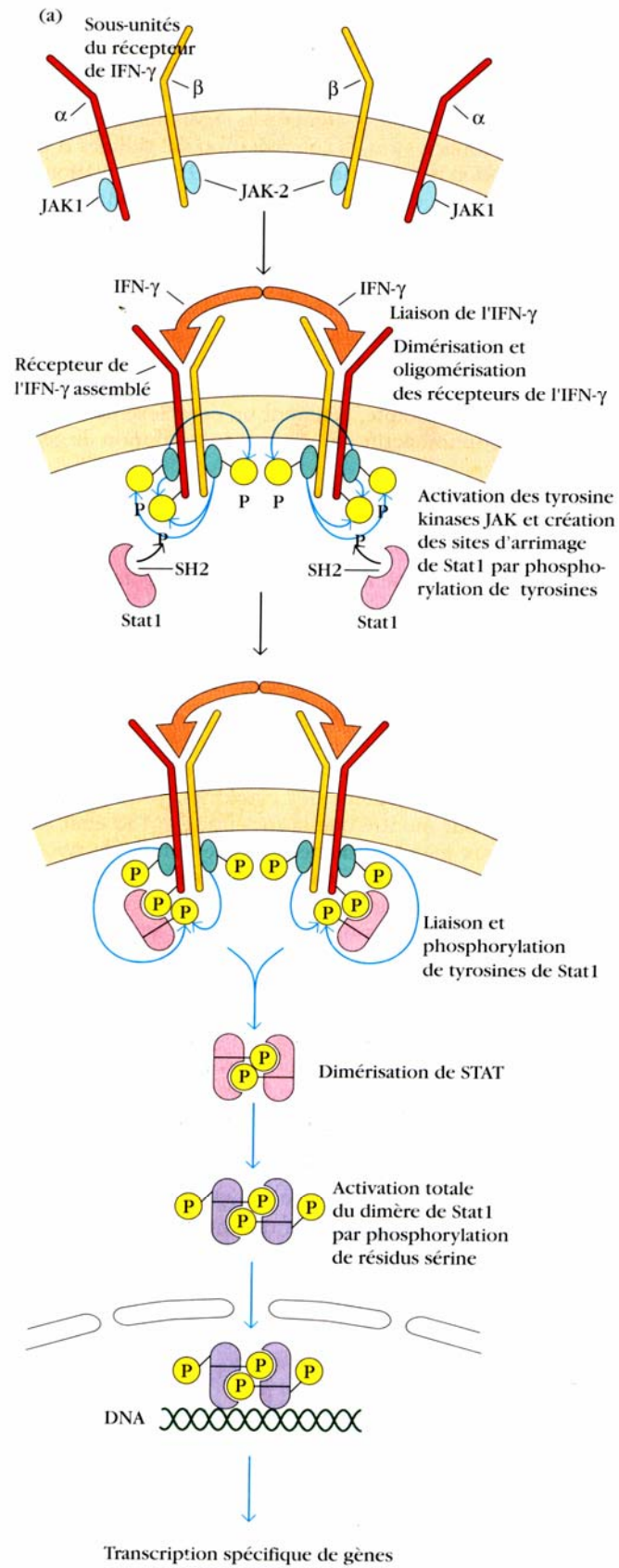


Figure 1 : Transduction du signal émis par l'IFN- γ (Schroder et *al.*, 2004)

VIII – LES PROPRIETES DE L'IFN- γ :

L'IFN- γ est une cytokine aux effets pléiotropiques (Trinchieri et Perussia, 1985), elle joue un rôle important dans la régulation des différents stades de la réponse immunitaire.

L'activité majeure de ce puissant activateur de macrophage semble être l'immunomodulation contrairement à celle des autres IFN qui est surtout antivirale (Ijzermans & Marquet, 1989 ; Williams *et al.*, 1993 ; Lepage *et al.*, 1997).

2. LA PROPRIETE IMMUNOMODULATRICE :

L'IFN- γ agit sur les cellules par l'induction de l'expression de plusieurs gènes (Tableau I). Le spectre de gènes induits dépend du type de cellule cible impliquée et de la nature des cytokines présentes dans son environnement.

- **Action sur l'hématopoïèse :** L'action de l'IFN- γ sur la différenciation des cellules myélomonocytaires module l'expression des protéases de surface et l'expression de certaines intégrines impliquées dans l'interaction cellule- matrice (Bauvois *et al.*, 1992).
- **Action sur les cellules endothéliales :** L'IFN- γ stimule l'expression de certaines molécules d'adhésion intercellulaire telles que l'ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule) à la surface de la membrane des cellules endothéliales, ce qui induit l'augmentation de l'adhésion aux leucocytes. Cet effet probablement dû à la production précoce de l'IFN- γ dans l'inflammation aspécifique (ex. par les cellules NK) est co- responsable d'une adhésion entre les lymphocytes et les cellules endothéliales comme un prélude à leurs spreading et diapédèse sur le site de la réaction inflammatoire et d'hypersensibilité (Young et Hardy, 1995 ; Billiau, 1996 ; Billiau *et al.*, 2000).
- **Action sur les APC :** L'IFN- γ est spécialement connu pour son effet sur la potentialisation de l'effet des APC (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B) en augmentant l'expression des CMH de classe I et II, d'où son rôle capital dans la présentation de l'antigène (Brieva *et al.*, 1990 ; Billiau *et al.*, 2000 ; Szabo *et al.*, 2003).

L'IFN- γ joue également un rôle essentiel dans l'activité cytotoxique des macrophages vis à vis des cellules tumorales, des bactéries ou des parasites à multiplication intracellulaire *in vivo* et *in vitro* (Murray, 1994b). Cette activité cytotoxique est due à la production de superoxide et de NO après une action synergique entre l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-6 ou l'IL-1 (Drapier *et al.*, 1988 ; Boehm *et al.*, 1997 ; Szabo *et al.*, 2003).

Sur les lymphocytes B, l'IFN- γ agit en régulant négativement l'adhésion des cellules B immatures (Flaishon *et al.*, 2000 ; Szabo *et al.*, 2003) et en inhibant certaines réponses prolifératives comme la liaison du LPS sur les lymphocytes B matures (Snapper *et al.*, 1996 ; Szabo *et al.*, 2003).

- **Action sur la production des chémokines :** La production des chémokines est sous le contrôle de cytokines particulièrement l'IFN- γ et le TNF- α . L'effet de priming de l'IFN- γ sensibilise les cellules à l'induction de la production de RANTES par le TNF- α . (Marfaing-Koka *et al.*, 1995 ; Billiau *et al.*, 2000).

- **Action sur la balance Th1/Th2 :** La balance est affectée selon le type de cytokines produites par les cellules T, l'isotype des Ig et l'efficacité des mécanismes de défense contre un agent infectieux particulier. Une production élevée d'IFN- γ est le critère le plus important pour catégoriser une réponse en type Th1. En effet, il favorise la production des immunoglobulines de type Th1 (IgG2a) (Snapper *et al.*, 1988 ; Szabo *et al.*, 2003) et la réaction d'hypersensibilité retardée.

De plus, l'IL-12 et l'IL-18 induites par un agent pathogène agissent sur les cellules du système inné de l'immunité. Ces dernières (Cellules dendritiques et cellules NK) sont capables de produire et de sécréter des taux significatifs d'IFN- γ , ce qui favorise une boucle d'autorégulation suffisante pour permettre à l'immunité innée de commencer à combattre un agent infestant au site d'infection avant le développement de la réponse adaptative. Cette boucle autocrine prime les cellules dendritiques et les macrophages pour une fonction APC optimale, en augmentant la présentation de l'antigène mais également la production de l'IL-12 et de l'IFN- γ fournissant ainsi un mécanisme par lequel l'arme innée du système immunitaire induit et amplifie une réponse adaptative Th1 spécifique (Constant et Bottomly, 1997 ; Billiau *et al.*, 2000 ; Murphy *et al.*, 2000 ; Szabo *et al.*, 2003).

- **Action dans l'apoptose :** L'IFN- γ joue un rôle central dans la vie et la mort des lymphocytes T humains. En effet, si ces derniers expriment des taux élevés de R1et faibles de R2, l'IFN- γ agira dans la promotion de leur prolifération. Par ailleurs, si le taux des deux chaînes est élevé, elles subiront une apoptose (Novelli *et al.*, 1996 ; Benarbei *et al.*, 2001). La protéine typique de cette voie apoptotique induite par l'IFN- γ est l'IRF-1 (IFN regulatory factor-1) (Harada *et al.*, 1993 ; Tamura *et al.*, 1995 ; Benarbei *et al.*, 2001).

3. LA PROPRIETE ANTIVIRALE :

L'IFN- γ possède une action antivirale qui se distingue de celle des autres interférons, par sa restriction d'espèces, la variation de l'efficacité de son action en fonction du type de virus auquel il est confronté, et par sa cinétique d'induction qui est beaucoup plus lente (plusieurs heures au lieu de 10mn à 30mn) (Falcoff *et al.*, 1972). Sa protection antivirale est basée sur le fait qu'il contrôle l'expression des gènes codant pour des molécules nécessaires aux réactions immunitaires comme la synthèse du CMH, des molécules d'adhésion cellulaire, des cytokines et des protéines cytosoliques (Tableau I). Il exerce son effet par :

- La dégradation des ARN viraux par activation de l'enzyme 2'-5'-oligo-A synthétase (Merlin & *al.*, 1983) responsable de la synthèse des 2'-5' oligo-nucléotides, activateurs d'une endonucléase (RNase L) qui dégrade les ARN messagers viraux (Chebath *et al.*, 1987 ; Wietzerbin *et al.*, 1990).
- L'inhibition de la traduction des ARN viraux par activation d'une protéine kinase (PI₃ kinase), qui inhibe par phosphorylation le facteur d'initiation de la synthèse protéique (Zilberstein *et al.*, 1976).

En plus de ces propriétés, l'IFN- γ inhibe la réplication du virus Ectomelia, virus de la vaccine et de l'herpès dans les macrophages (Karupiah *et al.*, 1993). Cette inhibition est associée en grande partie à la production du monoxyde d'azote (NO), ce qui souligne

nettement l'intérêt des NOSII dans le mécanisme de défense antivirale (Drapier et *al.*, 1988; Touil-Boukoffa, 1998).

4. LA PROPRIETE ANTI-PARASITAIRE :

Il est actuellement admis que l'IFN- γ confère une résistance partielle ou totale à des cellules humaines et murines infectées par différents parasites à multiplication intracellulaire tels que : *Toxoplasma gondii* (Nathan et *al.*, 1983), *Leishmania donovani* (Murray et *al.*, 1983), *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, *Leishmania major* (Cox et Liew, 1992), *Trypanosoma cruzi* (Plata et *al.*, 1987), *Listeria monocytogenes* (Bruchmeier et Schreiber, 1985), *Rickettsia prowazekii* (Turco et Winkler, 1983), *Mycobacterium leprae* (Nogueira et *al.*, 1984) et *Chlamydia psittaci* (Rothermel et *al.*, 1983).

Suite aux travaux de Mc Kaness en 1969, il a été établi que les macrophages activés jouent un rôle important dans le contrôle des infections intracellulaires, ceci par l'établissement d'un processus microbicide résultant de l'apparition de métabolites toxiques de l'oxygène, du monoxyde d'azote et du tumor necrosis factor- α . Ces derniers sont synthétisés dans les macrophages préalablement activés par l'IFN- γ (Nathan et *al.*, 1979 et 1983 ; Drapier et *al.*, 1988, Murray, 1994).

L'IFN- γ peut également agir par l'induction du tryptophane pyrolase (enzyme qui dégrade le tryptophane) dans certaines cultures cellulaires. L'induction de cette enzyme apparaît bloquer la croissance des parasites intracellulaires tels que *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn, 1984 ; Takikawa et *al.*, 1998) par déplétion du tryptophane dans les cellules infectées.

Touil-Boukoffa et *al* ont démontré le rôle de cette cytokine dans l'induction de la NOS2 lors de la réponse immunitaire empruntée au cours de l'infection par le macroparasite *Echinococcus granulosus* (Touil-Boukoffa et *al.*, 1997 et 1998 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Ait Aissa, 2002). Ces données ouvrent de nouvelles perspectives dans la thérapie de certaines formes de déviations physiologiques associées à cette pathologie.

IX – L'IFN- γ ET LE TNF- α :

L'un des partenaires assidus de l'IFN- γ est le TNF- α . Ce dernier est essentiel à l'expression d'une activité maximale de l'interféron. En effet, le TNF- α amplifie l'activité antivirale induite par l'IFN- γ (Wietzerbin et *al.*, 1990). Il amplifie également son effet antibactérien et antiparasitaire (Esparza et *al.*, 1987 ; Wietzerbin et *al.*, 1990) en augmentant l'effet cytotoxique des macrophages (Drapier et *al.*, 1988). Les deux partenaires coopèrent aussi à l'induction de la production par les cellules monocytaires d'une cytokine proinflammatoire, l'IL-6 (Sanceau et *al.*, 1990a ; 1990b et 1991).

Tableau I : Effet de l'IFN- γ sur la production de biomolécules médiant certaines de ses activités dans la défense de l'hôte.

EFFETS DE L'IFN-γ	PROTEINES PRODUITES	FONCTIONS	REFERENCES
EFFET ANTIVIRAL	- PKR (Protéine kinase de régulation des RNA) -(2'-5') oligo A synthétase E	-Inhibe la synthèse de protéines virales par phosphorylation des sous unités α de eIF-2 (eucaryotique translation initiation factor), active le NF- κ B et l'apoptose. -Synthèse de (2'-5') A, avec activation de la ribonucléase.	- Zilberstein et <i>al.</i> , 1976 - Wietzerbin et <i>al.</i> , 1990
EFFET ANTIBACTERIEN ET ANTIPARASITAIRE	-iNOS/NOS2 -Argininosuccinate synthétase -NADPH oxydase -Indolamine 2,3-dioxygénase	-Production du NO. -Production de la L-Arg. -Production de superoxyde. -Dégradation du tryptophane.	-Drapier et <i>al.</i> , 1988; Kolb et <i>al.</i> , 1995 -Nussler et <i>al.</i> , 1994. -Byrne et <i>al.</i> , 1986 ; Takikawa et <i>al.</i> , 1998
EFFET APOPTOTIQUE	-IRF-1 -Caspase-1 -Fas/Fas L -TNF- α -R	-C'est un suppresseur de gène de tumeur requit pour l'induction de l'apoptose. Plusieurs de ses effets sont médiés par la Caspase-1. -Protéase impliquée dans la génération de l'IL-1 β et l'IL-18 et dans la médiation de l'apoptose des macrophages. - L'IFN- γ augmente l'effet apoptotique du TNF- α en augmentant l'expression de son récepteur.	-Chin et <i>al.</i> , 1997. -Zhang et <i>al.</i> , 2002 -Tsujimoto et <i>al.</i> , 1986

EFFETS DE L'IFN- γ	PROTEINES PRODUITES	FONCTIONS	REFERENCES
EFFET IMMUNOMODULATEUR	-IL-12	-Activateur de la production du l'IFN- γ et de la différenciation des CD ₄ ⁺ en Th1.	-Kubin et <i>al.</i> , 1994
	-TNF- α -MCP-1	-Partenaire de l'IFN- γ . -Chémoattractant pour les monocytes/macrophages.	-Gupia et <i>al.</i> , 1992
	-ICAM-1	-Molécule d'adhésion entre les lymphocytes/leucocytes et les cellules endothéliales	-Hou et <i>al.</i> , 1994
	-V.CAM-1		-Billiau, 1996
	-B7.2	-Molécule de surface des APC qui fournit un costimuli pour l'activation des cellules T.	-Wallach et <i>al.</i> , 1982
	-Chaîne lourde des CHM classe I - β_2 -microglobuline du CMH classe I -Chaîne $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ du CHM classe II	- Présentation de l'antigène	-Chang et <i>al.</i> , 1995

X – PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'IFN- γ :

En 1999, Egwuagu et *al* ont montré chez des souris IFN- $\gamma^{-/-}$ l'apparition d'une encéphalomyélite auto-immune, une albuminurie et une pathologie glomérulaire. Ces travaux suggèrent que l'IFN- γ endogène limite les dégénérescences immunologiques notamment rénales induites par des antigènes extérieurs. D'autres études ont montré, qu'après une transplantation cardiaque chez la souris et un traitement aux immunosuppresseurs, la déficience en IFN- γ induit une diminution significative de l'épaississement vasculaire, ce qui suggère qu'il contribuerait au développement artériosclérotique post-transplantation (Raisanen-Sokolowski et *al.*, 1998).

Rappelons toutefois, que l'IFN- γ n'exerce pas toujours un rôle protecteur. Il joue effectivement, un rôle central dans la pathogenèse au cours de maladies variées telles que le diabète, l'arthrite ou encore la sclérose en plaque (Charreire et *al.*, 1998 ; Van Weyenbergh et *al.*, 1998).

XI - LES APPLICATIONS CLINIQUES (THERAPEUTIQUES) DE L'IFN- γ :

L'IFN- γ a un effet pléiotropique adjuvant sur les défenses de l'homme. De ce fait il émerge comme une cytokine particulièrement importante dans le traitement des maladies infectieuses. C'est ainsi que des applications prometteuses basées sur l'utilisation de l'IFN- γ ont été mises en évidence au cours de ces dernières années.

En effet, chez les patients atteints de leishmaniose et présentant une résistance à l'antimoine administré au cours des séances de chimiothérapie, l'IFN- γ transforme ce pronostic en engendrant une rémission chez la majorité des patients (Bottasso et *al.*, 1992; Falcoff et *al.*, 1993 et 1994) ou au moins une diminution de la durée de la chimiothérapie (Anna et *al.*, 1994).

Dans le cas de la toxoplasmose, l'IFN- γ peut inhiber *in vitro* la réplication de *T.gondii*. Chez le modèle animal, l'administration de l'IFN- γ ou de l'IL-12 augmente la survie des cobayes. Cet effet est dû à une diminution importante du nombre des cellules inflammatoires infiltrantes, résultant probablement d'une diminution du nombre de tachyzoïtes dans le cerveau (Suzuki et *al.*, 1988 et 1990 ; Gallin et *al.*, 1995 ; Khan et Moretto, 1999). Chez plusieurs patients atteints du HIV, les monocytes obtenus durant un traitement par l'IFN- γ ou l'IL-12 ont la capacité d'inhiber la croissance de *T.gondii* (Murray et *al.*, 1992). Ces données renforcent l'utilisation de l'IFN- γ dans le traitement de l'encéphalite toxoplasmique, l'une des infections opportunistes les plus fréquentes chez les patients atteints de SIDA.

L'administration de l'IFN- γ avec l'IL-12 et le TNF- α est importante dans le maintien de l'effet protecteur établi après une vaccination par l'IL-12 et des œufs de *Schistosoma mansoni* chez le modèle murin (Hoffmann et *al.*, 1998 ; Mac Donald et *al.*, 2002).

Liance et *al* rapportent en 1998 une diminution de la charge parasitaire d'*Echinococcus multilocularis* après un traitement par l'IFN- γ administré à des souris.

L'action de l'IFN- γ , dans les pathologies parasitaires, est probablement liée au rééquilibrage de la balance Th1/ Th2 et à la production du NO (Scott, 1991 ; Munoz Fernandez et *al.*, 1992).

En 1994, des études menées parallèlement en Europe et aux Etat Unis, ont montré que l'utilisation de l'IFN- γ réduit nettement l'infection chez plus de 70% des patients atteints de

granulomatose (Curnutte et al., 1994). Cette maladie chronique provoque des désordres du métabolisme oxydatif dans les cellules phagocytaires à cause d'une déficience des NADPH oxydase (Gallin et al., 1990).

En 1991, Yamamura et al rapportent également, qu'à ce jour deux infections mycobactériennes ont pu être traitées par le biais de l'IFN- γ : l'une est une infection dûe à *M.avium*, l'autre est dûe à *M.leprae*. Ainsi un traitement basé sur l'administration de l'IFN- γ et d'un agent antimycobactérien montre une diminution importante du taux de bacilles à l'origine de cette infection (Gallin et al., 1995). Cet effet résulte probablement de l'augmentation observée *in vivo* du métabolisme oxydatif (Nathan, 1992) et non oxydatif des phagocytes. *In vitro*, l'interféron- γ augmente la concentration intracellulaire de certains antibiotiques particulièrement les macrolides (Bermudez et al., 1991).

De par ses propriétés immunosuppressives, il a également été utilisé dans diverses maladies auto-immunes expérimentales telles que l'EAE (experimental auto-immune encephalomyelitis) (Billiau et al., 1988 et 2000), l'UAE (uveite auto-immune experimental) (Billiau et al., 2000).

L'effet de l'IFN- γ reste à élucider et à étudier dans de nombreuses maladies, particulièrement dans notre modèle macroparasitaire. L'établissement d'un protocole d'action parasiticide efficace avec des effets secondaires minimes est nécessaire.

LE MONOXYDE D'AZOTE

I - INTRODUCTION:

L'histoire du NO a commencée avec le système vasculaire, avec les travaux de Furchgott et Zawadski en 1980. Ces derniers ont démontré que l'action vasodilatatrice de l'acétylcholine sur les vaisseaux requiert la libération par les cellules endothéliales d'un facteur myorelaxant. Celui-ci fut nommé EDRF (endothelial-derived relaxing factor). Il agirait sur les muscles lisses en activant une enzyme, la guanylyl cyclase soluble, induisant ainsi une augmentation intracellulaire du GMPc.

En 1987, l'EDRF a été identifié par l'équipe de Moncada comme étant le monoxyde d'azote (Palmer et *al.*, 1987). Ce dernier fut identifié en 1991 comme un messager neuronal (Garthwaite, 1991). Il est consacré molécule de l'année 1992 aux Etats-Unis (Culotta et Koshland, 1992). Ce n'est qu'en 1998 qu'il fait son entrée sur la scène des médiateurs biologiques, pour son rôle très important, tant dans la transmission de l'information, que dans la réponse immunitaire (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998).

Le NO est une molécule à la fois simple et complexe. Simple, puisque c'est un gaz qui à l'état dissous, peut aisément franchir les membranes biologiques et diffuser librement d'une cellule à l'autre. Il constitue ainsi le messager paracrine idéal. Complexe, le NO l'est sûrement puisque son électron célibataire en fait un radical extrêmement réactif (Stamler, 1994). Il est aussi complexe par l'ubiquité de ses effets puisqu'il peut être impliqué dans différents processus/dans les réponses immuno-inflammatoires (Dugas et *al.*, 1995 ; Moncada et Higgs, 1995), dans le choc septique et dans la mort neuronale au cours de l'ischémie. Il a été également rapporté son implication dans certains mécanismes cellulaires liés à l'apprentissage de la mémoire et à l'érection (Crépel et Lemaire, 1995).

II - BIOSYNTHESE DU MONOXYDE D'AZOTE :

Le monoxyde d'azote est biosynthétisé par une famille d'enzymes appelées : les NO Synthases qui consomment du β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'oxygène moléculaire afin d'oxyder la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (Marletta, 1989 ; Moncada et *al.*, 1989 ; Nathan et Hibbs, 1991 ; Nathan et Xie, 1994).

1. LES CELLULES PRODUCTRICES DE NO :

La mise en évidence de la production de nitrites et de nitrates par les macrophages murins activés (Stuehr et Marletta, 1985) a largement facilité la mise en évidence de sa présence (Ignarro et *al.*, 1987 ; Hibbs et *al.*, 1987 ; Palmer et *al.*, 1987).

La NOS2 est exprimée dans la plupart des cellules mononuclées de mammifères activées par le LPS et/ou des cytokines (le TNF- α et l'IFN- γ) (Drapier et *al.*, 1988). Les macrophages murins sont la principale source de NOS2 (Werner et *al.*, 1990). Bien qu'il existait une controverse quant à la production du NO par les macrophages humains (Denis, 1994), plusieurs études démontrèrent la présence au niveau de ces cellules: de l'ARNm de la NOS2 (Vouldoukis et *al.*, 1995), d'une voie de signalisation dépendante du NO (Kolb et *al.*, 1994) et d'une activité iNOS (Vouldoukis et *al.*, 1995) .

La production du NO est également induite dans les monocytes dérivants des macrophages (Denis, 1991), les macrophages alvéolaires (Sherman et *al.*, 1991), les monocytes du sang périphérique (Hunt et Goldin, 1992) et les neutrophiles (Moncada, 1992).

D'autres sources cellulaires n'appartenant pas au système immunitaire classique, peuvent également exprimer la NOS2 après activation. Nous pouvons citer les fibroblastes (Werner-Felmayer, 1990), les hépatocytes (Nussler et *al.*, 1992), les cellules du muscle vasculaire lisse (Kilbourn et *al.*, 1992), les astrocytes (Lee et *al.*, 1994), les cellules endothéliales (contenant également la cNOS) (Kilbourn et Billono, 1990), les cellules rénales, les chondrocytes et les cellules épithéliales (Billar et *al.*, 1991 ; Nussler et Billiar, 1993 ; Nathan, 1994 ; Moncada et Higgs, 1995). Le NO peut également être synthétisé par les cellules Th1 (Barnes et Liew, 1995).

2. LES NO SYNTHASES:

Il existe trois isoformes de NO Synthase. La NOS2 a été purifiée et clonée pour la première fois dans les macrophages de souris (Stuehr et Marletta, 1987) puis chez l'homme (Forstermann et *al.*, 1995). Les différences majeures entre ces isoformes sont le mode d'expression, la localisation, la régulation et la fonction. En revanche, elles possèdent la même structure générale.

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

Les NOS sont le premier exemple d'oxygénase à hème-thiolate auto-suffisante chez les mammifères, c'est à dire fonctionnant en absence d'autres enzymes, telles que les réductases. Elles ressemblent ainsi au cytochrome P-450 bactérien (Bredt et *al.*, 1991). Elles ne sont actives que sous forme homodimérique car le domaine oxygénase du monomère est inactif. En revanche, le domaine réductase du monomère garde sa capacité de transfert des électrons (Marletta, 1994). Le domaine oxygénase est responsable de la structure dimérique de la NOS2, alors que le domaine réductase le déstabilise (Ghosh et *al.*, 1996 ; Venema et *al.*, 1997).

Les conditions d'assemblage des sous unités diffèrent selon le type de NOS. Pour la NOS2, l'hème et le BH4 (ou analogue) sont nécessaires à la formation du dimère (Presta et *al.*, 1998). La présence de la L-Arginine (ou d'un analogue) facilite cette dimérisation (Sennequier et *al.*, 1996). Pour les NOS 1 et 3, seul l'hème est indispensable à la dimérisation (Venema et *al.*, 1996). Le BH4 sert seulement à stabiliser le dimère ainsi formé (Gorren et *al.*, 1996).

Les NOS constitutives (NOS1 et NOS3) engendreront une petite élévation du taux de NO pendant une durée courte (Bredt et Snyder, 1990). La NOS2 générera une élévation importante du taux de NO qui s'étalera sur une longue période (Nathan, 1992 ; Dugas et *al.*, 1995 ; James, 1995) (Fig. 1).

3. LE MECANISME DE BIOSYNTHESE DU NO :

Le NADPH se fixe sur le domaine réductase des NOS par lequel il est oxydé. Les 2 électrons ainsi libérés transitent par le FAD puis par le FMN avant d'aboutir dans le domaine oxygénase des NOS. Au niveau de ce domaine, il existe un site de fixation de l'hème et du tetrahydrobioptérine (BH4) (Mellouk et *al.*, 1994). Ce flux d'électrons n'est possible que si la calmoduline est couplée à l'enzyme, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendantes de la concentration en ion Calcium (la calmoduline étant couplée fortement à l'isoforme inductible (Cho et *al.*, 1992). Le substrat (L-arg.) est alors hydroxylé par l'hème du domaine oxygénase en N-hydroxyarginine (NOHA) grâce aux électrons provenant du NADPH et à l'oxygène moléculaire. La NOHA est oxydée à son tour pour donner le NO et la L-citrulline (Fig. 1).

III - REGULATION DU METABOLISME DES NOS :

Cette biosynthèse est régulée à plusieurs niveaux : transcriptionnel, mais aussi par la concentration du milieu en ion Calcium, par l'assemblage du dimère des NOS, ou encore par leur substrat (L-arginine) et leur produit (NO) (James, 1995).

La régulation des NOS se fait par :

1 - Le couplage à la calmoduline : Les NOS constitutives (NOS 1, NOS 3) ne sont actives qu'après couplage à la calmoduline (James, 1995), qui intervient comme un interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme (Abu-Soud et *al.*, 1994), mais aussi l'assemblage des monomères de la NOS 3 (Hellermann et *al.*, 1997). **L'activité de ces deux isoformes est donc régulée par la concentration en ions calcium** qui règle le couplage de la calmoduline (Thiemermann, 1995).

L'activité de la NOS inductible (NOS 2) est indépendante des ions calcium, car elle est fortement couplée à la calmoduline. La régulation de cette isoenzyme est étroitement associée aux réponses immuno-inflammatoires (Nathan, 1992 ; Dugas et *al.*, 1995 ; Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998).

2 – Le substrat : Cette régulation peut avoir lieu dans plusieurs cas :

- **En absence du substrat :** Les NOS, tout comme les cytochromes P450, peuvent produire même en l'absence de substrat du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène via l'hème (le découplage).
- **En présence d'une concentration saturante du substrat :** La saturation en L-arginine provoque une diminution de la vitesse d'oxydation du NADPH, d'un facteur de 2 à 3 pour la NOS1 contre une augmentation d'un facteur de 4 à 6 pour la NOS 2.

3 – Le produit (le NO) : Cette régulation s'effectue par la fixation du NO sur l'atome de fer des NOS avant même de quitter le site actif. Le complexe inactif résultant se forme transitoirement pendant la production du NO. Il représente 80% de l'enzyme totale dans le cas de la NOS1. Il devient instable en présence d'oxygène, dont la concentration module l'activité de la NOS1 (Griscavage et *al.*, 1993 ; Dweik et *al.*, 1998).

4 - L'arginase : L'arginase est une enzyme qui transforme l'arginine en urée et en ornithine (Chang *et al.*, 1998). La NOHA s'est avérée être l'un des meilleurs inhibiteurs de cette enzyme (Boucher *et al.*, 1994). Il pourrait donc exister une régulation croisée des deux systèmes enzymatiques métabolisant l'arginine, la NOS et l'arginase. En effet, l'un des mécanismes d'échappement des parasites à la cytotoxicité du NO est l'activation de l'arginase. Cette activation induit une déplétion de la L-arginine (nécessaire pour la synthèse du NO) et une augmentation de la production de polyamine (nécessaire pour la croissance et la différenciation du parasite) (Vincendeau *et al.*, 2003) (Fig. 1).

5 - Les cytokines : L'IFN- γ , et le TNF- α sont les plus importants inducteurs de la transcription de la NOS2 (Stuehr et Marletta, 1987 ; Drapier *et al.*, 1988b). Ces deux cytokines agissent en général en synergie (Drapier *et al.*, 1988b). Elles peuvent également être combinées aux LPS et à l'IL-1 pour un effet maximal (Nussler *et al.*, 1992). La région promotrice de la NOS2 possède de nombreux sites de régulation potentiels incluant, en particulier, deux motifs importants : une séquence de liaison de l'interferon regulatory factor 1 (IRF-1) et du NF κ B. Ces deux séquences sont impliquées dans la régulation par l'IFN- γ et le LPS respectivement (Martin *et al.*, 1994).

D'autres cytokines agissent sur la régulation négative de la production du NO, en réduisant la transcription des ARNm des NOS inductibles, ou encore en affectant leur stabilité (Bogdan et Nathan, 1993 ; James, 1995). Ainsi le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-10 modulent directement la production du NO en inhibant l'expression de la NOS2 au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel. L'étendue de leurs effets varie selon les conditions expérimentales (Liew *et al.*, 1991 ; James, 1995). Leur fonction inhibitrice dépend étroitement de la durée de contact avec les macrophages avant l'introduction de stimuli nécessaires à leur activation (Liew *et al.*, 1989 ; Ding *et al.*, 1990 ; Gazzinelli *et al.*, 1992 ; James, 1995). Ces trois cytokines agissent également en synergie pour inhiber l'activité cytotoxique des macrophages, et engendrer un arrêt de la production du NO (Oswald *et al.*, 1992 ; James, 1995) (Fig. 1).

Cependant, l'IL-4 peut avoir un effet inducteur indirect sur la production du NO par l'induction de l'expression du CD23 (Kolb *et al.*, 1994 ; Dugas *et al.*, 1995 ; Paul-Eugène *et al.*, 1995).

6 - Le CD23 : Le CD23 joue un rôle fonctionnel dans l'activation rapide des NOS2, dans les macrophages humains. La fixation d'IgE complexées sur le CD23 provoque la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que le NO. Il contribue ainsi au développement des réactions inflammatoires dépendantes des IgE. Après l'activation *in vitro* et *in vivo*, la voie de production du NO dépendante du CD23 est inhibée par l'IL-4. Cette observation démontre que l'immunopropriété de l'IL-4 (induction ou suppression) est différente en fonction de l'état d'activation de la cellule (Capron, 1980 ; Mossalayi *et al.*, 1994 ; Dugas *et al.*, 1995 ; Moncada et Higgs, 1995 ; Paul Eugène *et al.*, 1995 ; Vouldoukis *et al.*, 1995).

7 -L'autorégulation : Le NO inhibe la production de l'IL-1 (Chujor *et al.*, 1996) et de l'IL12 (Roth *et al.*, 1996) des macrophages, ce qui peut représenter une boucle d'autorégulation.

Le NO peut intervenir dans la régulation négative de l'IL-12 par :

- L'induction d'un antagoniste de l'IL-12 : le (P40)₂ (Rothe *et al.*, 1996).
- L'inhibition des JAK2 et JAK3 (Dué *et al.*, 1998).
- La suppression de la réponse des cellules Tho à l'IL-12 (Rothe *et al.*, 1996).

8 - La prostaglandine E₂ (PGE₂) : Ce médiateur physiologique produit par les macrophages est connu pour ses propriétés régulatrices vis à vis de la production du NO. Ceci est peut être dû à son effet inhibiteur sur les cellules Th1 provoquant ainsi une diminution de la production d'IL-12 et d'IFN- γ (Philip *et al.*, 1991 ; James, 1995). D'autres études rapportent que la

prostaglandine inhibe la production du NO en agissant directement sur les macrophages activés (Raddassi et *al.*, 1993 ; Alleva et *al.*, 1994 ; James, 1995).

9 - La phosphorylation : La phosphorylation pourrait aussi constituer un mécanisme de régulation supplémentaire pour l'ensemble des NOS. Cependant, le rôle de cette modification post-transcriptionnelle n'est pas encore bien défini (Feron, 1997).

IV - LES DERIVES (METABOLITES) DU NO :

En réagissant avec l'oxygène moléculaire ou certains de ses dérivés (comme l'anion superoxyde), le NO se transforme rapidement en nitrite et nitrate en milieu aqueux (Hibbs et *al.*, 1988), deux produits physiologiquement stables. Cette transformation passe par des intermédiaires instables mais très réactifs. Certains sont encore mal définis mais il semble que les cellules phagocytaires soient capables de produire du peroxyde de nitrite, produit de la combinaison entre NO et O₂⁻ (Ischiropoulos et *al.*, 1992).

Dans le sang total, les nitrites sont rapidement transformés en nitrates (Kelm et *al.*, 1992). En effet, le taux basal de nitrites dans le sang est faible en comparaison à celui des nitrates (Green et *al.*, 1982).

V – ROLE BIOLOGIQUE DU MONOXYDE D'AZOTE :

L'éventail des propriétés biologiques attribué au monoxyde d'azote continue à s'étendre. Du fait de sa réactivité et de sa faible taille, le NO atteint potentiellement toutes les cibles.

L'impact de la biosynthèse de NO dépend d'une part, de la quantité produite et d'autre part, des cibles situées à proximité du lieu de sa synthèse.

1 - ROLE DU NO DANS LA TRANSMISSION DE L'INFORMATION :

Le NO produit par les NOS constitutives est impliqué dans la transmission de l'information par activation réversible de la guanylate cyclase soluble, induisant ainsi une augmentation du GMPc dans les cellules cibles. Ce dernier servira comme second messager dans l'activation de plusieurs protéines kinases. Le NO agit en particulier comme neurotransmetteur lorsqu'il est produit par la NOS1 (neuronale). A l'inverse, lorsqu'il est produit par la NOS3 (endothéliale et vasculaire) il joue le rôle d'un vasodilatateur (Marletta, 1989) (Fig. 1).

2 - ROLE DU NO DANS L'IMMUNITE ET L'INFLAMMATION :

L'expression de la NOS inductible est généralement le résultat de réponses inflammatoires localisées ou diffuses, suite à une infection ou à une altération tissulaire. Le NO produit par les NOS2, joue par conséquent un rôle important dans la régulation, l'initiation et le développement des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte (Dugas et *al.*, 1995 ; Moncada et *al.*, 1995). L'activation des macrophages par des cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS2. Le NO produit peut alors agir sur des cellules tumorales, des bactéries ou des parasites intracellulaires par son action cytotatique et cytotoxique (Nathan et Hibbs, 1991 ; Moncada, 1992) (Fig. 1).

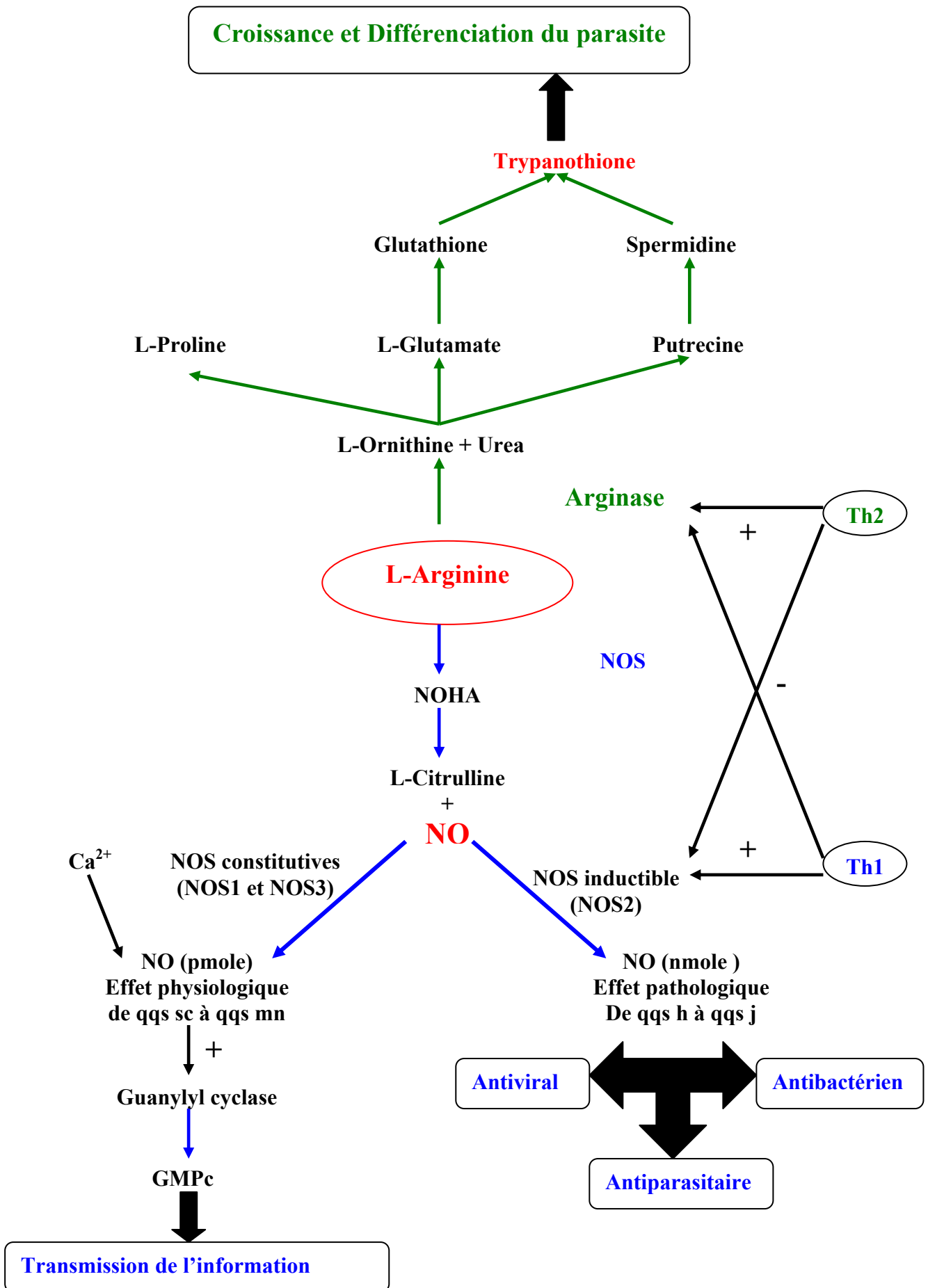


Figure 1 : La balance entre la voie des NOS et celle de l'arginase.

(Vincendeau et al., 2003 ; Piedrafita et Liew, 2004)

L'effet cytotoxique du NO apparaît être dû à l'inactivation de plusieurs voies métaboliques essentielles, à travers la formation de complexes iron-dinitrosyl-dithiolate. Le NO inactive certaines enzymes clés au niveau des sites catalytiques par nitrosylation des centres Fe-S (Girard et Potier, 1993 ; Woods *et al.*, 1994). Parmi ces enzymes, nous pouvons citer ceux du cycle du Krebs telles que : l'aconitase, ceux de la chaîne respiratoire telles que l'ubiquinone oxydoréductase (Stamler *et al.*, 1992) et la ribonucléotide réductase impliquées dans la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire. (Drapier et Hibbs, 1986 ; Hibbs *et al.*, 1990 ; Ignarro, 1991 ; Kwon *et al.*, 1991 ; Lepoivre *et al.*, 1992 ; Moncada et Higgs, 1993).

2a - Cytotoxicité anti-tumorale du NO :

In vitro, le NO est un effecteur de la Cytotoxicité anti-tumorale des macrophages murins (Hibbs *et al.*, 1987). En effet, le NO exerce un effet anti-prolifératif rapide en inhibant l'activité de la ribonucléotide réductase, enzyme limitante de la réplication de l'ADN (Lepoivre *et al.*, 1991). Il peut également être toxique en inhibant la respiration mitochondriale (Drapier *et al.*, 1988a) et en réalisant des cassures dans l'ADN (Nguyen *et al.*, 1989).

In vivo, l'expression de la NOS2 a été associée à des macrophages infiltrant des tumeurs chez l'animal et l'homme. Cependant la question de savoir si le NO a un effet anti- ou pro-tumoral dans ces conditions est encore en suspens (Jenkins *et al.*, 1995).

2b - Cytotoxicité antivirale du NO :

Le NO est impliqué dans l'inhibition de la réplication virale (Mannick, 1995). Dans plusieurs modèles expérimentaux, l'induction de la NOS2 bloque la réplication dans les macrophages de plusieurs types de virus : le flavivirus (Kreil et Eibl, 1996), le virus de la vaccine (Karupiah *et al.*, 1993) et même un rétrovirus : le virus de Friend (Akarid *et al.*, 1995).

2c - Cytotoxicité antibactérienne et antiparasitaire du NO :

De nombreux micro-organismes pathogènes, particulièrement à développement intracellulaire, sont sensibles au NO. En effet, il a été démontré que l'expression de la NOS2 et une forte production de NO accompagnent les infections par des parasites intracellulaires (Evans *et al.*, 1993). De plus, l'inhibition de la NOS2 chez certains animaux est parallèle à une exacerbation de l'infection. Les résultats obtenus avec des animaux NOS2^{-/-} semblent le confirmer. En effet, dans deux études indépendantes, il a été démontré que ces souris sont plus sensibles à l'infection par des bactéries ou des parasites pathogènes (Macmicking *et al.*, 1995 ; Wei *et al.*, 1995).

VI - NO ET PHYSIOPATHOLOGIES :

Bien que le NO soit un composant essentiel de la physiologie normale de la cellule, sa surproduction s'avère être à l'origine de diverses physiopathologies (Barus et Liew, 1995. Dugas *et al.*, 1995 ; Moncada et Higgs, 1995). En effet, cette hyperproduction entraîne l'inhibition d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire, comme la ribonucléotide réductase et certaines enzymes du transport mitochondrial. Cet effet se produirait éventuellement après réaction du NO avec l'ion superoxyde pour former l'ion peroxonitrique (Dugas *et al.*, 1995).

Le choc septique semble être le cas le plus extrême et dont l'issue est souvent fatale (Thiemermann, 1995). Dans ce cas, l'expression incontrôlée de la NOS2 par le tissu vasculaire, en réponse à l'infection, est probablement en partie responsable des symptômes observés (Invasion du système circulatoire par des microorganismes, hypotension, dysfonctionnement de plusieurs organes, ...) (Smalt et al., 1997). Le NO produit surstimule les mécanismes régulateurs de la pression sanguine normalement réglée par la NOS3 (Endo et al., 1996). L'inhibition spécifique de la NOS2 a été tentée avec succès dans un modèle murin. En effet, une dose adéquate d'inhibiteur (la S-méthyllisothiocitrulline, dans ce cas) réduit l'hypotension sans interférer avec les fonctions régulatrices de la NOS3 sur la microcirculation (Moncada, 1992 ; Rosselet et al., 1998). Cependant, bien que ce traitement réduit le taux de mortalité, il ne réduit pas les dommages infligés au foie, un des organes les plus atteints lors du choc septique. Chez les patients atteints de choc septique, de faibles doses de N^G-monométhyl-L-arginine ajoutées à la thérapie standard, renverse l'hypotension (Petros et al., 1991).

L'altération de la capacité anti-oxydante des cellules infectées par le HIV1 (Green Spam et Aruoma, 1994 ; Dugas et al., 1995) entraîne une incapacité à produire des protéines anti-oxydantes naturelles telles que la lactoferrine (Paul Eugène et al., 1993 ; Defér et al., 1995 ; Dugas et al., 1995). Cet effet est dû à l'hyperactivité phagocytaire des macrophages observée lors d'une telle infection. Dans ce cas, des intermédiaires réactifs de l'oxygène et le NO induisent l'expression du gène HIV et la réplication virale, par leur capacité à activer le NF- κ B (Schreck et al., 1991 ; Dugas et al., 1995). Cette activation aboutit à l'induction de la production du TNF- α qui amplifie la vague initiale de production d'oxygène réactif et de NO, et définit ainsi un cycle vicieux pour la réplication du HIV (Dugas et al., 1995).

La production en excès du NO est associée aux réponses inflammatoires chroniques telles que l'asthme (Barnes et Liew, 1995) et l'arthrite rhumatoïde (Kolb et Kolb-Bachofen, 1992).

Si une forte concentration de NO exerce un effet cytotoxique tumoral, une production plus faible favoriserait *in vivo* la croissance tumorale par un effet positif sur la vascularisation (Jenkins et al., 1995).

Le NO peut également être impliqué dans des altérations tissulaires. En effet, il peut être aussi bien cytotoxique pour les micro-organismes infestant que pour les cellules qui le produisent ainsi que les cellules avoisinantes. Plusieurs études indiquent aussi le rôle des inhibiteurs des NOS (Buckberg et al., 1992 ; Oury et al., 1992) ainsi que les donneurs de NO (Lefér, 1992) dans la protection contre de telles lésions. Ceci est probablement dû à la double fonction du NO, qui est d'une part cytotoxique et d'autre part vasodilatateur et potentiellement protecteur. De plus, le NO a une multi-facette dans les réactions inflammatoires, induisant à la fois une vasodilatation et la formation d'œdème.

Le bilan des actions *in vivo* du NO produit par la NOS2 est donc loin d'être achevé. L'équilibre entre les signaux positifs et négatifs permet de maintenir un état physiologique normal des cellules de l'organisme. La perturbation de cette balance par des pathogènes sera à l'origine du développement des réponses inflammatoires et immunitaires spécifiques (Kolb et Kolb-Bachofen, 1992) (Fig. 2).

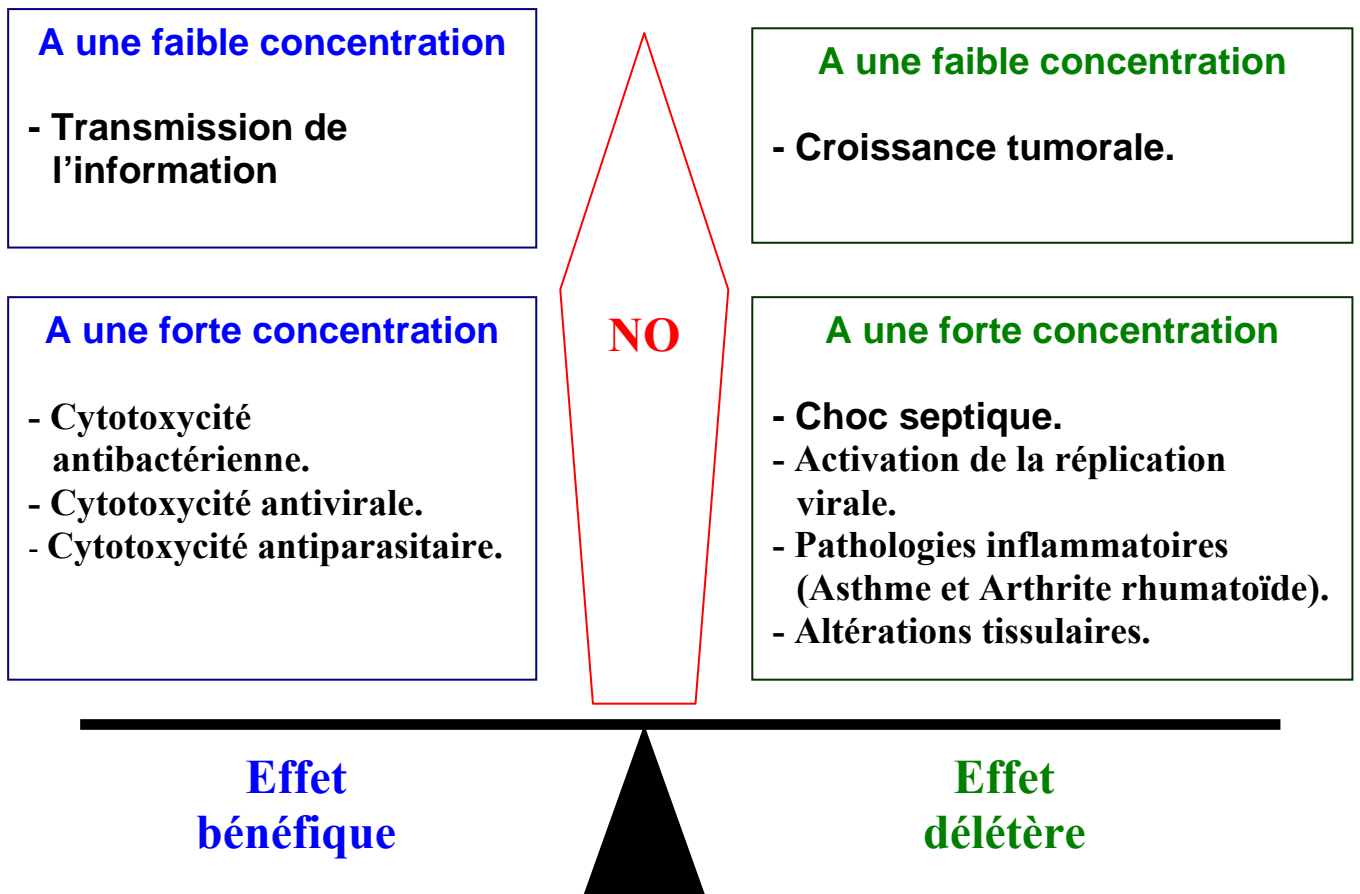


Figure 2 : Dualité fonctionnelle du monoxyde d'azote (Burgner et al., 1999 ; Brunet, 2001).

VII - UTILISATION DIRECTE OU INDIRECTE DU NO DANS LES ETUDES DE CYTOTOXICITE BACTERIENNE, PARASITAIRE ET TUMORALE :

Il a été rapporté que l'engagement du CD23 à la surface des macrophages par des complexes IgE/anti IgE ou par des anticorps monoclonaux anti-CD23 induit *in vitro* l'expression des ARNm de la NOS2 dans les macrophages humains (Dugas et *al.*, 1995). Cette expression entraîne une destruction NO dépendante de parasites intracellulaires tels que : *Leishmania major* et *Toxoplasma gondii* (Vouldoukis et *al.* 1995). Elle régule également la prolifération du HIV1 (Ouaaz et *al.*, 1996) et induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 (Mossalayi et *al.*, 1994). Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'utilisation *in vivo* du CD23 comme un outil pharmacologique thérapeutique.

L'engagement du CD69, molécule membre de la famille des lectines de type C (comme le CD23), induit également une production de NO par les monocytes humains qui deviennent alors cytotoxiques *in vitro* pour des cellules tumorales (De Maria et *al.*, 1994).

L'injection individuelle ou complexée de TNF- α , d'IL-1 et/ou de lymphotoxines à des souris atteintes de malaria induit la production de nitrates et de nitrites et une diminution de la charge parasitaire. L'utilisation d'un inhibiteur des NOS (le N-monométhyl-L-arg. : L-NMMA) bloque la production des dérivés de NO induis par le TNF- α . Ces résultats sont compatibles avec la possibilité que le TNF- α , l'IL-1 et/ou la lymphotoxine peuvent contribuer par la génération du NO, à la défense de l'hôte en réponse à une infection parasitaire (Rockett et *al.*, 1992).

Les recherches de Gobert et *al* en 2000 ont démontré que *Trypanosoma brucei brucei* transformait *in vivo* de la L-arginine en polyamine (nécessaire pour la synthèse de l'ADN et de la trypanothione). L'utilisation *in vitro*, d'un inhibiteur des arginases diminue la production de polyamines et augmente la production de nitrites par les macrophages. Cet effet est accompagné par une destruction parasitaire plus importante. *In situ*, la restauration de la production de NO et de la résistance au parasite est observée après un traitement par un excès de L-arg. Ces effets sont abolis après l'utilisation de D.arg. ou de N^o-nitro-L-arg.

L'INTERLEUKINE-12

I – INTRODUCTION ET HISTORIQUE :

L'interleukine 12 est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle capital dans l'orientation des réponses lymphocytaires vers un profil Th1. Elle exerce également des effets immunorégulateurs importants sur les cellules NK et sur la production d'IFN- γ .

L'IL-12 humaine fut originellement purifiée et caractérisée en 1989 par Kobayashi et *al* à partir de surnageants de la lignée de cellules lymphoblastoïdes B activées par le phorbol-diester. Elle fut initialement nommée facteur stimulateur des cellules NK (NKSF) pour sa capacité à augmenter l'activité lytique des cellules NK et à induire la production d'IFN- γ par les cellules NK et les lymphocytes T (CD 4⁺ et CD 8⁺) (Wolf et *al.*, 1991).

Quelques mois plus tard, un deuxième groupe a identifié un facteur capable d'agir en synergie avec l'IL-2 pour la génération des cellules LAK (lymphocyte activated killer) à partir de cellules mononuclées. Il a été purifié à partir du surnageant d'une lignée de cellules B et fut appelé CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor) (Stern et *al.*, 1990 ; Gubler et *al.*, 1991).

Cependant, l'analyse biochimique, le clonage et le séquençage du cDNA codant pour le NKSF et le CLMF ont montré que ces deux facteurs représentaient une seule et même molécule. L'appellation unifiée d'interleukine 12 fut attribuée par convention à ce facteur (Wolf et *al.*, 1991).

II – STRUCTURE DE L'IL-12 :

C'est une glycoprotéine de 70 kDa composée de deux sous unités liées par un pont dissulfure essentiel pour leur activité biologique. Les deux sous unités ont un poids moléculaire de 40 kDa et 35 kDa (Kobayashi et *al.*, 1989 ; Stern et *al.*, 1990 ; Wolf et *al.*, 1991 ; Gubler et *al.*, 1991 ; Trinchieri, 1994). Chacune d'elle est codée par un gène distinct indépendamment régulé (Gillesen et *al.*, 1995 ; Ling et *al.*, 1995 ; Tsang et Weatherbee, 1996 ; Gately et *al.*, 1997). En effet, le gène codant pour la P₄₀ de l'IL-12 humaine se situe sur le chromosome 5 dans une région comportant les gènes codant pour plusieurs récepteurs, à savoir le récepteur du M-CSF. Le gène codant pour la P₃₅ est localisé sur le chromosome 3 (Sieburth et *al.*, 1992 ; Gately et *al.*, 1997).

La chaîne lourde de l'IL-12 humaine (P₄₀) est composée de 306 aa avec 10 cystéines, 4 sites potentiels de N glycosylation et un site de fixation de l'héparine. La chaîne légère (P₃₅) a une structure secondaire riche en hélice α . Elle contient 197 aa avec 7 cystéines et 3 sites potentiels de N glycosylation (Wolf et *al.*, 1991 ; Gubler et *al.*, 1991). Les deux chaînes contiennent respectivement 10% et 20% de carbohydrate (Podlaski et *al.*, 1992).

Il n'existe aucune homologie de séquence entre la P₃₅ et la P₄₀ (Gubler et *al.*, 1991 ; Wolf et *al.*, 1991 ; Chua et *al.*, 1994). Toutefois, la P₃₅ présente une homologie de séquence avec l'IL-6 et le G-CSF (Meberg et *al.*, 1992 ; Bellone et Trinchieri, 1994 ; Brunda et Gately, 1995 ; Gately et *al.*, 1997). La séquence de la P₄₀ est homologue à celle de la partie extracellulaire de la chaîne α du récepteur de l'IL-6 et du récepteur du G-CSF (Gearing et Cosman, 1991 ; Schoenhaut et *al.*, 1992 ; Bellone et Trinchieri, 1994 ; Brunda et Gately, 1995 ; Gately et *al.*, 1997). Ces

homologies suggèrent que la P₄₀ peut exister sous forme liée à la membrane et que le récepteur de l'IL-12 peut être en relation avec une gp130. Toutefois, aucune preuve de l'existence d'une forme de l'IL-12 liée à la membrane n'a été établie, mais il est admis qu'un composant du récepteur de l'IL-12 est structurellement relié à la gp130.

III – PRODUCTION DE L'IL-12 :

Les principales sources d'IL-12 sont les cellules phagocytaires/cellules présentatrices de l'antigène (CPA) : essentiellement les monocytes/macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques activées (D'Andrea et al., 1992 ; Macatonia et al., 1995), ainsi que les cellules microgliales (Constantinescu et al., 1996). Il a été démontré également que les neutrophiles (Cassatella et al., 1995), les mastocytes (Smith et al., 1994) et les kératinocytes (Argane et al., 1994) pouvaient produire de l'IL12 *in vitro*. D'autres types de cellules peuvent produire de l'IL-12 *in vitro* à des niveaux bas parmi lesquelles figurent des lignées de cellules myéloïdes : THP-1, ML-3 et HL-60 stimulées par le LPS. Les lignées de cellules stromales thymiques sont également source d'IL-12 (Lamont et Adorini, 1996 ; Gately et al., 1997).

IV - PRINCIPAUX INDUCTEURS DE LA PRODUCTION DE L'IL-12 :

Deux voies principales d'activation induisent la production d'IL-12 :

1 – Production de l'IL-12 en réponse à un stimulus bactérien :

Dans un nombre de cellules effectrices, il a été démontré *in vitro* que les monocytes/macrophages produisent de l'IL-12 en réponse à une variété de bactéries ou à leurs constituants tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou l'acide lipoteichoïque (LTA), après interaction avec le CD14 (Cleveland et al., 1996). Un autre groupe a montré que l'ADN bactérien était également un inducteur de l'IL-12 (Ballas et al., 1996).

Après infection par des bactéries ou des parasites intracellulaires l'IL-12 est produite rapidement, par l'intermédiaire d'un mécanisme indépendant des cellules T (Gazzinelli et al., 1993 ; Tripp et al., 1993).

2 – Production de l'IL-12 en réponse à l'interaction CPA-cellule T :

La deuxième voie engendrant la production d'IL-12 par les CPA est activée par l'interaction entre CPA et le lymphocyte T, lors de la présentation de l'antigène grâce à des interactions de type CD40-CD40L et TCR- peptide CHM classe II (Dekruyff et al., 1997 ; Maruo et al., 1997). C'est par ce dernier mécanisme que l'IL-12 joue un rôle pivot dans l'immunité adaptative.

V – REGULATION DE LA PRODUCTION DE L'IL-12 :

La régulation de la production d'IL-12 est rendue complexe à cause de la structure hétérodimérique de cette cytokine. Toutefois, elle peut être régulée par des signaux de 'feed back positifs' ou négatifs (Gately et al., 1997 ; Ma et al., 2000).

- **L'IFN- γ** : Il potentialise l'induction de la production de l'IL-12 et de la chaîne P₄₀ (Trinchieri, 1995 ; Ma et al., 1996).

- **Les cytokines de type Th2** : L'IL-4, l'IL-13, le TGF- β est principalement l'IL-10 sont de puissants inhibiteurs de la production d'IL-12 par les cellules phagocytaires (D'Andrea, 1993 et 1995 ; Kubin *et al.*, 1994 ; Murphy *et al.*, 1994).
- **La prostaglandine E₂ (PGE₂)** : C'est un puissant facteur des réponses Th2. Il inhibe la production de l'IL-12 induite par le LPS dans les monocytes humains, d'une manière indépendante de l'IL-10. Cette inhibition serait induite par une élévation de l'AMPc intracellulaire puisque d'autres agents qui augmentent la concentration de cette dernière molécule inhibent également la production de l'IL-12 (Gately *et al.*, 1997).
- **L'homodimère P₄₀ -P₄₀** : Plusieurs travaux ont montré chez l'homme et la souris, l'existence d'un homodimère P₄₀ -P₄₀. Ce dernier se fixe sur le récepteur de l'IL-12 sans induire de réponse biologique, et pourrait jouer le rôle d'antagoniste de l'IL-12. Ces résultats suggèrent un rôle physiologique de régulation négative de l'homodimère P₄₀, qui reste néanmoins à démontrer expérimentalement (Mattner *et al.*, 1993 ; Gillessen, 1995 ; Ling *et al.*, 1995 ; Gately *et al.*, 1996).

VI – LE RECEPTEUR DE L'IL-12 :

Les chaînes du récepteur de l'IL-12 sont exprimées principalement sur les lymphocytes T (CD₄⁺ et CD₈⁺) activées, les cellules NK activées et aux repos (Chizzonite *et al.*, 1992 ; Dessai *et al.*, 1992 ; Naume *et al.*, 1993 ; Lamont et Adorini, 1996 ; Gately *et al.*, 1997). Récemment, une expression du récepteur a été détectée sur les CPA (Grohmann *et al.*, 1998) notamment sur les lymphocytes B (Airoldi *et al.*, 2000).

L'IL-12R est un membre de la superfamille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques. Il a une structure analogue au gp130, un composant commun de la signalisation des récepteurs de l'IL-6, de l'IL-11 et du LIF (leukemia inhibitory factor) (Chua *et al.*, 1994 ; Lamont et Adorini, 1996 ; Gately *et al.*, 1997 ; Shepherd et Abdohasilina, 1997).

Le récepteur de l'IL-12 est une glycoprotéine transmembranaire dimérique ou oligomérique formée de deux types de chaînes β_1 et β_2 . Au niveau de la surface cellulaire, chacune des deux sous unités s'organise en dimère ou oligomère indépendamment de la liaison du ligand. La chaîne dite β (ou β_1) est transmembranaire avec un poids moléculaire de 100 kDa. Elle présente deux domaines, un extracellulaire de 516 aa, 6 sites de N glycosylation, 2 paires de résidus cystéines et une séquence WSXWS conservée. Le domaine intracytoplasmique renferme 91 aa, 3 sites de phosphorylation et 2 séquences conservées Box 1 et Box 2. Cette chaîne à elle seule, lie l'IL-12 avec une faible affinité et paraît être impliquée dans la signalisation de l'IL-12, malgré l'absence de résidus tyrosine dans sa partie cytoplasmique (Chua *et al.*, 1994 ; Lamont et Adorini, 1996 ; Presky *et al.*, 1996 ; Gately *et al.*, 1997). La chaîne α (ou β_2) de 130 kDa se lie également à l'IL-12 avec une faible affinité. Elle possède trois résidus tyrosine dans la région cytoplasmique (Chua *et al.*, 1994 ; Presky *et al.*, 1996 ; Gately *et al.*, 1997 ; Shepherd et Abdohasilina, 1997).

Chez l'homme la co-expression des deux sous unités est indispensable à la formation de sites de haute affinité (Gately, 1998). La chaîne β_1 est indispensable à la formation de récepteurs de haute affinité, donc à la liaison stable de l'IL-12, alors que la chaîne α transduit le signal.

VII- LE MODE DE TRANSMISSION DU SIGNAL :

Le modèle proposé pour la transduction du signal de l'IL-12 suggère que la sous unité P₄₀ serait nécessaire à la fixation de l'hétérodimère sur le récepteur au niveau de la chaîne β_1 . Le domaine de liaison P₄₀-P₃₅ interagirait ensuite avec la chaîne β_2 , ce qui permettrait de transduire le signal (Chua et al., 1994 ; Presky et al., 1996 ; Wang et al., 1999 ; Gately, 1998). Cette hypothèse expliquerait que l'homodimère P₄₀-P₄₀ n'ait qu'un rôle d'antagoniste, sans effet biologique propre, puisqu'il est incapable de se fixer sur la sous unité β_2 (Presky et al., 1996).

La fixation de l'IL12 entraîne l'activation par tyrosine phosphorylation de TYK₂ et JAK₂ associés aux sous unités β_1 et β_2 respectivement (Bacon et al., 1995 ; Zou et al., 1997). Ces kinases activées, phosphorylent à leur tour la chaîne β_2 qui recrute alors la molécule cytoplasmique STAT₄. Cette dernière interagit par son domaine SH2 avec la tyrosine phosphorylée en position 800 du récepteur, au niveau d'une séquence appelée site d'arrimage pour être phosphorylée par les JAK (Naeger et al., 1999). Activés, les STAT₄ s'associent en dimères et transloquent vers le noyau où elles se lient à des éléments de réponses spécifiques sur l'ADN et activent la transcription de certains gènes (Ihle et al., 1995; Jacobson et al., 1995 ; Schindler et Darnell, 1995 ; Xu et al., 1996).

VIII – LES PRINCIPAUX EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-12 :

Comme les autres cytokines, l'IL-12 est une cytokine à activité pleiotropique, en effet elle présente la capacité d'augmenter l'activité lytique des cellules NK/LAK et les CTL, d'induire la production de l'IFN- γ par les cellules T et NK et de stimuler la prolifération de celles-ci. Toutefois, l'activité principale de l'IL-12, en association avec l'IFN- γ , est d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire en vue de la promotion, de la maturation et de l'activation des cellules Th0 en Th1 (Chua et al., 1994 ; Gately et al., 1997).

D'autres travaux ont montré que l'IL-12 jouait également un rôle important dans la défense de l'organisme contre des agents pathogènes à multiplication intracellulaire.

1 - L'IL-12 et l'IFN- γ :

L'IL-12 est l'un des inducteurs les plus importants de la production de l'IFN- γ par les cellules T et NK activées et au repos (Kobayashi et al., 1989 ; Chan et al., 1991 et 1992), en augmentant la transcription des gènes codant pour cet interféron. Plusieurs cytokines incluant le TNF- α (Tripp et al., 1993), l'IL-1, l'IL-2 et l'IL-15 (Carson et al., 1995) agissent en synergie avec l'IL-12 pour stimuler la production d'IFN- γ (Chan et al., 1991). De plus, le CD28 coagit avec l'IL12 dans l'induction de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (Kubin et al., 1994 ; Murphy et al., 1994 ; Gollob et al., 1999). L'IL-12 induit également l'expression du récepteur de l'IL-18 sur les cellules productrices d'IFN- γ , ce qui permet à l'IL-18 d'agir en synergie avec l'IL-12 pour la production d'IFN- γ (Li et al., 1996). Cette propriété de l'IL-12 est à l'origine de plusieurs de ses activités biologiques (Gately et al., 1997).

2 - Induction de la production d'autres cytokines par l'IL-12 :

L'IL-12 est également capable d'induire la production d'autres cytokines parmi lesquelles : le TNF- α , l'IL3, le GM-CSF, le M-CSF, l'IL-2 et l'IL-8. Cependant, elle apparaît produire le TNF- α en faible quantité *in vivo* et *in vitro* (Naume et al., 1992 ; Nastala et al., 1994 ; Gately et al., 1997).

3 - Effet de l'IL-12 sur l'hématopoïèse :

L'IL-12 par elle-même ne semble pas avoir un effet sur l'hématopoïèse *in vitro*. Toutefois, elle peut augmenter la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques *in vivo* et *in vitro* dans le système murin en réponse à l'IL-3, les stem cells factor (SCF) (l'IL-6, l'IL-11, le G-CSF et le LIF) et l'érythropoïétine. Cependant, en présence des cellules NK, l'IL-12 inhibe la formation des colonies myéloïdes et érythroïdes et ceci par l'induction de la production d'IFN- γ et de TNF- α (Bellone et Trinchieri, 1994).

L'effet de l'IL-12 sur l'hématopoïèse *in vivo* est complexe. L'induction de l'IFN- γ apparaît être en relation *in vivo* avec l'inhibition de l'hématopoïèse murine. Cette action serait régi par l'IL-12 (Eng et *al.*, 1995). Toutefois, cet effet est généralement rapidement réversible (Tare et *al.*, 1995)

4 - Effet de l'IL-12 sur les réponses lymphocytaires B :

L'IL-12 combinée à l'IL-2 augmente de manière très significative la prolifération des cellules B activées et la sécrétion d'anticorps. En effet, l'administration d'IL-12 à des souris augmente de manière significative la production des IgG2b et IgG3 (Finkelman et *al.*, 1990) et inhibe la sécrétion d'IgG1 et d'IgE *in vitro* et *in vivo* (Kiniwa et *al.*, 1992 ; Buchanan et *al.*, 1995 ; King et *al.*, 1995). La différenciation des cellules B naïves est médiée par l'IL-12. En revanche, l'IL-12 n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules B mémoires (Dubois et *al.*, 1998).

5 - Effet de l'IL-12 sur les activités cytotoxiques des cellules NK et CTL :

L'effet de l'IL-12 sur l'augmentation de la cytotoxicité NK s'accompagne de l'augmentation de la granulosité des cellules ainsi que d'une augmentation de la transcription et de la traduction de plusieurs molécules cytotoxiques retrouvées dans ces granules : granzyme A et B ainsi que la perforine et la sérine estérase (Cesano et *al.*, 1993 ; Mehrotra et *al.*, 1993 ; Salcedo et *al.*, 1993 ; Aste-Amezaga et *al.*, 1994). L'IL-12 augmente également l'expression de plusieurs molécules d'adhésion impliquées dans l'interaction des cellules NK avec leurs cibles cellulaires (Robertson et *al.*, 1992 ; Rabinowich et *al.*, 1993). L'efficacité de l'IL-12 est inférieure à celle de l'IL-2. La combinaison des 2 cytokines permettrait un effet maximal additif et non synergique (Kobayashi et *al.*, 1989 ; Chehimi et *al.*, 1993).

L'IL-12 augmente également la prolifération, la différenciation et la cytotoxicité des CD8⁺ et des CTL *in vivo* et *in vitro* chez l'homme (Gately et *al.*, 1992 et 1994 ; Mohrotra et *al.*, 1993).

6 - Effet antitumoral de l'IL-12 :

L'élévation observée des taux d'IL-12 dans de nombreux modèles de tumeurs dans le système murin a montré que ce facteur possède un puissant effet antitumorale et antimétastatique par la l'augmentation de la production d'IFN- γ . Cet effet est indépendant des cellules NK mais requiert l'induction de la réponse en cellules CD8⁺. Il dépend de la nature et de la localisation de la tumeur (Brunda et Gately, 1994 ; Lamont et Adorini, 1996).

7 - Effet de l'IL-12 dans les pathologies infectieuses :

La production de l'IL-12 en réponse à une infection microbienne représente un des éléments déterminants impliqué dans les mécanismes de défense majeurs du système immunitaire contre certains agents bactériens (Ahmed et *al.*, 1999), tels que : *Listeria monocytogenes* (Tripp et *al.*,

1994) dans le système murin et *Mycrobactérium tuberculosis* (Cooper et al., 1995), *Mycrobactérium avium* (Castro et al., 1995) et *Brucella abortus* (Ahmed et al., 1999) dans le système humain.

Il apparaît également qu'elle joue un rôle important dans les mécanismes de défense instaurés par des agents parasitaires à multiplication intracellulaire (Gazzinelli et al., 1993) tels que : *Toxoplasma gondi* (Hunter et al., 1995) et *Leishmania* sp. (Heinzel et al., 1996) dans le système murin.

IX - L'IL-12 ET PHYSIOPATHOLOGIES :

Dans la physiologie, l'action de l'IL-12 est ambivalente. Elle peut être aussi bien bénéfique que délétère. En effet, une étude sur des sujets allergiques a montré que le gène de la sous unité β_2 du récepteur de l'IL-12 était muté chez 32 % de ces patients (Matsui et al., 1999). L'IL-12 aurait donc une activité anti-allergique, clairement démontrée par son habilité à prévenir l'asthme (Trinchieri, 1997).

Bien que la production de l'IL-12 joue un rôle crucial dans les premières lignes de défense contre les infections, elle est aussi responsable dans le cas d'une hyper expression, de certains effets négatifs tels que les altérations tissulaires (Trinchieri, 1997).

X - UTILISATION THERAPEUTIQUE DE L'IL-12 DANS CERTAINES PATHOLOGIES INFECTIEUSES :

La capacité de l'IL-12 à induire des réponses immunitaires de type Th1 est à la base de son utilisation comme adjuvant dans la vaccination en combinaison avec des antigènes solubles ou des pathogènes morts. Ces derniers sont le plus souvent considérés comme inefficaces pour maintenir une immunité protectrice. Ce concept a été initialement utilisé avec succès lors d'une infection par *Leishmania major* (Afonso et al., 1994) puis étendu à d'autres pathogènes.

Dans la maladie de Chagas, l'administration du rIL-12 à des souris améliore l'efficacité des tests d'immunisation. De plus, la coadministration du gène de l'IL-12 avec les gènes des antigènes de surface de *Trypanosoma cruzi* augmente l'efficacité de cette immunisation. Cet effet se traduit par l'induction des cellules T CD8+ (Katae et al., 2002) dont l'importance dans l'immunité protectrice a été déjà établie (Wizel et al., 1997). Ces résultats renforcent l'utilité des adjuvants immunomodulateurs tels que le gène de l'IL-12 pour l'induction d'une protection contre des parasites intracellulaires.

L'IL-12 exogène pourrait être utilisée dans le cas du SIDA. En effet, les monocytes circulants de sujets séropositifs pour le HIV ont une production effondrée en IL-12 hétérodimérique (ce qui contraste avec une production normale ou augmentée des cytokines pro-inflammatoires) (Chehimi et al., 1994). De plus, L'IL-12 inhibe l'apoptose de lymphocytes T activés provenant aussi bien de patients séronégatifs pour le HIV que de patients infectés par ce virus (Estaquier et al., 1995). Il est également possible que la déficience de la production d'IL-12 chez les patients atteints d'HIV joue un rôle crucial dans l'induction de l'état d'immunodéficience caractérisant cette maladie. L'IL-12 pourrait donc, tout au moins *in vitro* corriger certaines des déficiences liées aux réponses en cellules T chez ces patients (Clerici et al., 1994).

Il est admis que la transfection avec le gène de l'IL-12 dans les fibroblastes en coculture avec des cellules tumorales ou directement dans les cellules tumorales est plus efficace qu'un traitement systémique pour freiner la croissance tumorale et minimiser les risques de rechutes. Ces observations suggèrent une possible utilisation des deux gènes de l'IL-12 dans la thérapie des tumeurs.

En se basant sur les résultats encourageants des thérapies utilisant l'IL-12 dans des modèles murins et primates cancéreux, ainsi que le profil toxicologique acceptable, la première phase d'étude du rIL-12 humain administré par injection en intraveineuse à des patients cancéreux a débutée en Mai 1994 (Atkin et *al.*, 1996 ; Robertson et Ritz, 1996). Les réponses les plus probantes ont été observées chez les patients atteints du cancer du rein et de mélanome.

L'INTERLEUKINE-8

I – INTRODUCTION :

L'accumulation des cellules polynucléaires neutrophiles dans un tissu est un signe de la présence d'une inflammation. Cette dernière serait le résultat d'une réaction de défense contre des agents infectieux. Les neutrophiles sont recrutés à partir du sang par un stimulus chimiotactique tel que les chémokines.

Les chémokines sont des cytokines de faible poids moléculaire (de 8 à 10 kDa) (Lindly et *al.*, 1993), initialement caractérisées par leur capacité à induire la migration de leucocytes (Baggiolini et *al.*, 1994 et 1997 ; Segerer et *al.*, 2000 ; Zlotnik et Yoshie, 2000). Il a été démontré que les chémokines travaillaient de concert avec les sélectines et les intégrines pour produire des signaux directionnels permettant la migration dirigée des leucocytes (Baggiolini, 1998 ; Luster, 1998). De plus, les chémokines jouent un rôle important, non seulement dans le contrôle du recrutement des leucocytes, leur activation et leur fonction effectrice, mais aussi dans la modulation de l'hématopoïèse, de l'angiogenèse et de l'immunité adaptative (Baggiolini et *al.*, 1997 ; Myrphy et *al.*, 2000 ; Rossi et Zlotnik, 2000 ; Segerer et *al.*, 2000).

La plupart des chémokines ont été découvertes au cours de cette dernière décennie. Il existe aujourd'hui plus de 44 chémokines et 21 récepteurs décrits chez l'homme. La superfamille de chémokines peut être divisée en 4 branches ou sous-familles (C, CC, CXC et CX3C), selon la position des 2 premiers résidus de cystéine compris dans un motif de 4 résidus. Ces 2 cystéines peuvent être séparées par 1 (CXC) ou 3 (CX3C) aminoacides (désignés par X). Les membres de la classe « CC » et « C » sont caractérisés par la perte dans leur structure de 1 et 2 des 4 résidus cystéines caractéristiques respectivement. Cependant, le reste de la molécule présente de grande homologie de séquence avec les CXC et les CX3C. La plupart des chémokines appartiennent aux sous-familles CC et CXC (Rossi et Zlotnik, 2000 ; Nelson et Krensky, 2001).

La nomenclature officielle utilisée pour décrire les chémokines et leurs récepteurs est fondée sur la sous-famille à laquelle elles appartiennent (C, CC, CXC CX3C) (Myrphy et *al.*, 2000 ; Rossi et *al.*, 2000 ; Zlotnik et Yoshie, 2000 ; Douglas et *al.*, 2002) suivit par « L » pour ligand. Le nombre qui suit correspond généralement au même nombre utilisé dans la nomenclature du gène correspondant. Pour la nomenclature des récepteurs, elle commence par la sous famille des chémokines suivit par « R » pour récepteur et le nombre. Les CXC chémokines ont été subdivisées en ELR⁺ CXC et ELR⁻ CXC selon la présence ou l'absence d'un tripeptide (Glu-Leu-Arg) au niveau de l'extrémité N-terminale avant la première cystéine. Les chémokines ELR⁺ CXC agissent généralement comme chémoattractant des neutrophiles alors que les ELR⁻ CXC se lient à des récepteurs différents et sont plus actives sur les lymphocytes (Murphy, 1994 ; Ahuja et Murphy, 1996).

Bien que les structures tertiaires des chémokines humaines CXC et CC soient très similaires, leurs structures quaternaires sont complètement différentes. L'IL-8 (CXC) est un dimère globulaire, alors que MIP-1 β (CC) est un dimère allongé et cylindrique. Cette particularité serait à l'origine des différences observées au niveau des activités biologiques entre les CXC et les CC (Schall, 1994 ; Szabo et *al.*, 1995).

L'IL-8 fut identifiée en 1987 (Yoshimura et *al.*, 1987). C'est le premier facteur chémoattractant des neutrophiles cloné et purifié à partir du surnageant de culture de cellules mononuclées

humaines stimulées par le LPS (Yoshimura et *al.*, 1987 ; Matsushima et *al.*, 1988). Plusieurs appellations ont été attribuées à l'IL-8, la première étant le NAF (neutrophil activating factor) (Walz et *al.*, 1987) suivie par le MDCF (monocyte-derived chemotactic factor) (Yoshimura et *al.*, 1987) et encore bien d'autres. Cependant, selon la nouvelle nomenclature (Rossi et *al.*, 2000 ; Douglas et *al.*, 2002), l'IL-8 fut renommée CXCL8.

II - STRUCTURE DE L'IL-8 :

Le gène de l'IL-8 est localisé sur le chromosome 4. Cette cytokine est synthétisée sous forme d'un précurseur de 99 aa. Elle est sécrétée après clivage d'une séquence signal de 20 résidus aboutissant ainsi à une protéine mûre de 72 ou 77 aa (Matsushima et *al.*, 1988). Des transformations extracellulaires de la partie N-terminale de la forme mûre conduit à plusieurs variantes biologiquement actives en fonction des cellules productrices et des conditions de culture (Van Damme et *al.*, 1989a-b et 1990). En effet, les protéases sécrétées par les cellules sources fournissent différentes formes de l'IL-8 de 77, 72, 71, 70 et 69 aa (Yoshimura et *al.*, 1989 ; Hebert et *al.*, 1990 ; Nakagawa et *al.*, 1991 ; Padrines et *al.*, 1994). Les deux variantes prédominantes sont les peptides de 77 et 72 aa. Ces dernières sont synthétisées par les cellules tissulaires (cellules endothéliales et fibroblastes) et les leucocytes circulants respectivement (Oppenheim et *al.*, 1991). C'est une protéine basique (pH=8.3) contenant 4 résidus cystéines formant 2 ponts dissulfure. Elle est résistante aux peptidases du plasma, à la chaleur, à un pH extrême et à d'autres traitements dénaturants. Elle est très rapidement inactivée après réduction des ponts dissulfure.

L'IL-8 forme un dimère de deux sous unités identiques dans une solution concentrée (Baldwin et *al.*, 1991). Le monomère présente une extrémité N-terminale courte et flexible, suivie par une région en boucle, trois feuillets β antiparallèles et une hélice α terminale (Baggiolini et Lewis, 1997). Cependant, à des concentrations faibles de l'ordre du nanomolaire (taux physiologique induisant une activité biologique maximale) la majorité de l'IL-8 agit en monomère. Cette observation suggère que la forme active de cette cytokine est le monomère (Burrows et *al.*, 1994 ; Paolini et *al.*, 1994).

III – PRODUCTION UBIQUITAIRE DE L'IL-8 :

L'IL-8 fut initialement identifiée dans le milieu de culture des monocytes du sang humain stimulés par le LPS (Yoshimura et *al.*, 1987 ; Schroder et *al.*, 1987). Beaucoup de cellules ont la capacité de produire l'IL-8 après stimulation. L'expression des ARNm et la libération de la cytokine biologiquement active furent observées dans les cellules leucocytaires (monocytes, cellules T et cellules NK) et les cellules non leucocytaires (cellules endothéliales et fibroblastes) (Oppenheim et *al.*, 1991 ; Mukaida et *al.*, 1992 ; Mukaida, 2000). D'autres cellules peuvent également produire la CXCL8 telles que les kératinocytes, les cellules synoviales, les chondrocytes ainsi que certaines cellules tumorales. Les neutrophiles sont une source intensifiant leur propre recrutement au site de l'inflammation.

IV - REGULATION DE LA PRODUCTION DE L'IL-8 :

La production du CXCL8 est inductible. En effet, l'IL-1 β et le TNF- α (ou TNF- α +IFN- γ) sont les inducteurs essentiels de la production de l'IL-8 (Matsushima et *al.*, 1988). Les monocytes/macrophages produisent l'IL-8 après stimulation par l'IL-3, le GM-CSF, les lecthines, le phorbol ester et les particules opsonisées (Taub et Oppenheim, 1994 ; Baggiolini et Lewis, 1997). D'autres agents inducteurs ont été identifiés tels que : les bactéries (*Helicobacter pylori* et *Pseudomonas aeruginosa*) (DiMango et *al.*, 1995 ; Aihara et *al.*, 1997), les produits bactériens (le LPS) (Cassatella, 1995), les virus (le rhinovirus, le virus syncytial respiratoire et l'adenovirus) (Johnston et *al.*, 1997 ; Casola et *al.*, 2000 ; Alcorn et *al.*, 2001) et les produits viraux (protéine X du virus de l'hépatite B humaine) (Mahe et *al.*, 1991). D'autres chémoattractants tels que le C5a et le fMLP sont également responsables de l'induction de l'expression de l'IL-8 dans les monocytes et les macrophages (Browning et *al.*, 1997 ; Hsu et *al.*, 1999).

L'IL-4, l'IL-10, les glucocorticoïdes et la PGE2 sont des agents anti-inflammatoires inhibiteurs de la transcription des gènes de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-8 (Mukaida et *al.*, 1989). Cependant, la régulation par les PGE2 est observée dans les macrophages humains mais non dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse (Takayama et *al.*, 2002). L'IFN- β apparaît également inhiber la transcription de l'IL-8 induite par le TNF- α via le NF- κ B (Oliveira et *al.*, 1994).

Les facteurs environnementaux peuvent influencer la production de l'IL-8 dans plusieurs types cellulaires. En effet, l'hypoxie stimule la production de taux élevés de CXCL8 par plusieurs types de cellules tumorales via l'activation du NF- κ B et de l'AP-1 (activator protein-1) (Kunz et *al.*, 1999), deux facteurs de transcription essentiels dans la régulation génique de cette cytokine (Mukaida, 2000). Les ROI (reactive oxygen intermediates) active également le NF- κ B pour la biosynthèse de l'IL-8 (Janssen-Heininger et *al.*, 2000).

Le promoteur du gène de l'IL-8 présente des sites pour les deux facteurs de transcription cités précédemment (le NF- κ B et l'AP-1) ainsi que pour le HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) et l'IRF-1 (interféron regulatory factor-1) (Mukaida et *al.*, 1989 ; Stein et *al.*, 1993). Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression d'un large nombre de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-8.

En 2000, les travaux de Browning et *al* ont démontré que l'IL-8 agirait comme un régulateur autocrine de sa propre production par les monocytes via l'activation d'une voie de signalisation dépendante des MEK/ERK et des MAP kinases. Cette régulation dépend du type cellulaire et du taux d'expression des récepteurs de l'IL-8. En effet, les cellules mononuclées du sang périphérique exprimant faiblement les CXCR1 et CXCR2, exhibent une réponse plus importante en comparaison aux polynucléaires neutrophiles. Les mécanismes dictant cette différence de réponse entre les deux types cellulaires ne sont pas encore élucidés (Cassatella, 1995).

V - LES RECEPTEURS DE L'IL-8 :

Les récepteurs de l'IL-8 sont largement exprimés sur les polynucléaires neutrophiles, les cellules mononuclées du sang périphérique, les cellules T et NK et sur des lignées de cellules myéloïdes. Ils sont également présents sur les cellules endothéliales et neuronales ainsi que sur

les fibroblastes et les kératinocytes. Ces récepteurs sont au nombre de 14.000 à 64.500 par cellule.

Le récepteur de l'IL-8 appartient à la superfamille des récepteurs couplés à la GTP-binding protéine (G-proteines). Cette superfamille inclue les récepteurs des hormones, des neurotransmetteurs, de la rhodopsine ainsi que les récepteurs chémoattractiques pour le C5a et le fMLP (Watson et Arkinstall, 1994). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence de 7 domaines transmembranaires (Murphy, 1994 ; Murdoch, 2000; Murphy et al., 2000). Plusieurs études ont révélé l'existence de deux types de récepteurs de l'IL-8 avec la même haute affinité: CXCR1 et CXCR2 (Holmes et al., 1991 ; Murphy et Tiffany, 1991 ; Lee et al., 1992 ; Lusti-Narasimhan et al., 1996). Les deux récepteurs peuvent fixer d'autres chémokines : ELR⁺CXC. Le CXCR1 est plus spécifique pour l'IL-8, en effet il fixe le CXCL6 avec une faible affinité. Le CXCR2 quant à lui, peut lier plusieurs chémokines telles que la CXCL1, 2, 3, 5 et 6 (Schumacher et al., 1992 ; Murphy et al., 2000).

La structure tridimensionnelle du dimère de l'IL-8 présente certaines homologies avec le domaine fixant l'antigène de la molécule HLA. En effet, la niche fixant l'antigène est formée par deux hélices α suggérant que les hélices C-terminale du dimère de l'IL-8 constituent le site de fixation au récepteur. Toutefois, l'utilisation d'analogues chimiquement synthétisés a montré que la suppression du domaine C-terminal diminue mais ne supprime pas l'activité biologique de l'IL-8. De récentes études sur la relation structure- fonction ont montré que deux régions étaient responsables de la liaison avec le CXCR1 : le motif ELR et la séquence du 7^{ème} au 50^{ème} aa. Ceux impliqués dans la liaison avec le CXCR2 semblent être le motif ELR et l'extrémité C-terminale (du 52^{ème} au 72^{ème} aa) (Clark-Lewis et al., 1991 ; Hebert et al., 1991 ; Schraufstotter et al., 1993).

VI - TRANSDUCTION DU SIGNAL :

Après la liaison du ligand, les récepteurs de l'IL-8 sont internalisés puis recyclés rapidement dans les 60 mn (Samanta et al., 1990). Il s'en suit l'activation de la protéine G hétérodimérique inactive (sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*) couplée au récepteur (Murdoch, 2000). Après activation par phosphorylation du GDP en GTP, la protéine G se dissocie en sous unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ (Kupper et al., 1992 ; Janes et al., 1996). Cette dernière reste au voisinage du complexe récepteur- ligand en recrutant et activant les enzymes de 3 voies principales (Fig. 1) :

- La voie de la PLC/PKC (phospholipase C/protéine kinase C) : La PLC agit sur le PIP₂ (phosphatidyl inositol 4.5-diphosphate) pour la libération de deux seconds messagers intracellulaires : l'IP₃ (inositol 1.4.5-triphosphate) et le DAG (diacylglycerol). L'IP₃ entraîne une augmentation transitoire du calcium intracellulaire avec pour conséquence l'activation de l'exocytose. Le DAG coagit avec le Ca²⁺ pour l'activation (par phosphorylation) de la PKC et la PLD induisant ainsi une cascade d'activation. Cette dernière aura pour conséquence la translocation du p47 phox et la génération d'anions superoxydes (Knall et al., 1995 ; Li et al., 2000).
- la voie du PI3K- γ (phosphatidyl inositol 3 kinase- γ) : Cette kinase génère du PIP₃ (phosphatidyl inositol 3.4.5-triphosphates) (Servant et al., 2000) qui active une protéine kinase B (Akt) et des GTPases. Ces activations induisent directement la migration des cellules (Turner et al., 1998 ; Hirsch et al., 2000).

- La voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) : l'activation d'une protéine Ras membranaire induit l'activation par phosphorylation des PTK (protein tyrosine kinase). Ces kinases activent à leur tour les MAPK et les ERK1/2. Elles activent CXCR1 et CXCR2 par phosphorylation des résidus sérine et thréonine de l'extrémité C-terminale. Elles activent également la PLA2 (Bacon et *al.*, 1996 ; Knall et *al.*, 1996 ; Kampton et *al.*, 1998 ; Chen et *al.*, 1999)

Le DAG, la PKC et la PLA2 coagissent avec des mécanismes d'activation cellulaires spécifiques qui auront pour conséquence la mobilité cellulaire, la dégranulation, la libération d'anions superoxyde et la modification de l'avidité des intégrines (Murdoch et Finn, 2000).

VII - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'IL-8 :

Les polynucléaires neutrophiles sont la cible privilégiée de l'IL-8. Cependant, elle peut également agir sur d'autres leucocytes. Ces effets sont effectifs même à des concentrations faibles de l'ordre du nanomolaire.

A - Action de l'IL-8 sur les leucocytes neutrophiles :

L'IL-8 fut à l'origine connue comme étant une protéine agissant sur les cellules neutrophiles et provoquant leur chimiotactisme et la libération de granules d'enzyme. En effet, cette cytokine est internalisée par les cellules endothéliales, elle transite vers la surface luminaire pour être présentée aux neutrophiles (Middleton et *al.*, 1997). Ces données laissent à penser que l'IL-8 est un nouveau type de chémoattractant dans la lignée du C5a, du fMLP, du PAF et du LTB₄. Ces effets impliquent (Fig. 1):

- Un changement de forme et une migration directionnelle des neutrophiles (Jones et *al.*, 1996). Cet effet reflète l'activation du système contractile provoquant l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales ainsi que la migration. Il est initié par l'induction de l'expression des β_2 -intégrines (CD11b/CD18 et CD11c/CD18) à la surface des neutrophiles (Carveth et *al.*, 1989 ; Detmers et *al.*, 1990 ; Huber et *al.*, 1991). Ces dernières se lient à leurs homologues présents à la surface des cellules endothéliales (ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3) (Springer, 1994). Le déséquilibre entre l'actine globulaire et filamenteuse entraîne la polymérisation de l'actine, l'élongation de la cellule et la polarisation de sa membrane.

Ces changements du cytosquelette sont des phénomènes pré-requis pour les mouvements cellulaires et leur transmigration vers les tissus. L'IL-8 induit la migration des neutrophiles par l'endothélium (Huber et *al.*, 1991), l'épithélium pulmonaire (Mul et *al.*, 2000) et les fibroblastes (Burns et *al.*, 1996) .

- Une exocytose des protéines stockées (dégranulation) (Mukaida, 2000) permet la libération de protéines solubles stockées dans les granules telles que la α -défensine-1, α -défensine-2 et la CAP37/azurocidine. Cette exocytose induit également un remodelage de la membrane plasmique des neutrophiles par fusion avec les organelles de stockage (Baggiolini et *al.*, 1989).

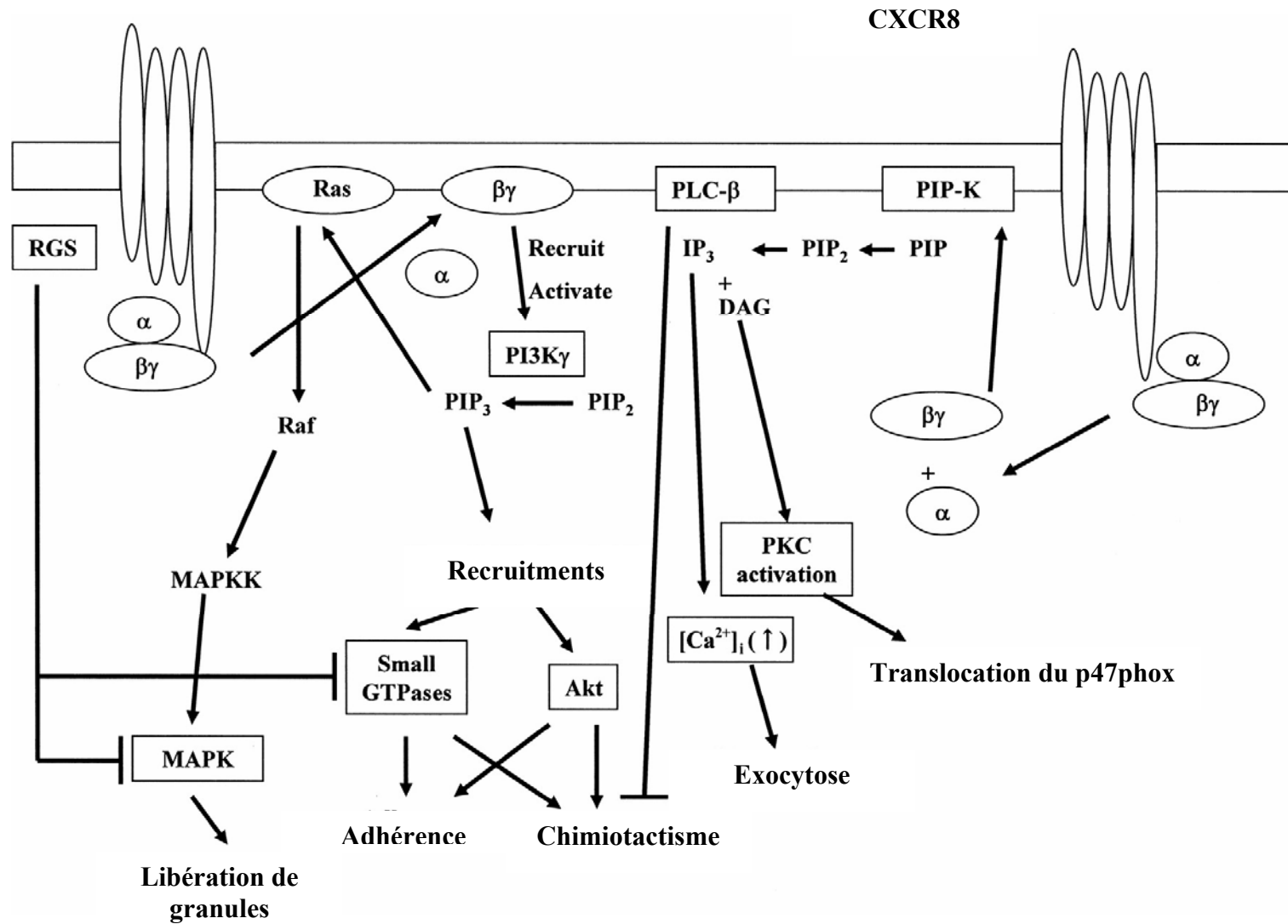


Figure 1: Transduction du signal par l'IL-8 et activités biologiques (Mukaida, 2003)

- Un déclenchement de la chaîne respiratoire via le CXCR1 (Oppenheim et *al.*, 1991 ; Jones et *al.*, 1996). En effet, l'IL-8 provoque l'activation rapide et transitoire de la NADPH oxydase entraînant à la formation de superoxyde et de H₂O₂ via la voie du PI3K et celle de la PLC/PKC (Baggiolini et *al.*, 1989).
- L'IL-8 stimule également les neutrophiles par induction de la 5-lipooxygénase avec libération du LTB₄ (leucotriène B₄) et de l'acide 5-hydroxyeicosanoïque en présence d'acide arachidonique exogène (Schroder, 1989) induisant ainsi la synthèse du PAF (platelet-activating factor) (Bussolino et *al.*, 1992).

B - Action de l'IL-8 sur d'autres types de leucocytes :

D'autres activités sont attribuées à l'IL-8. Elles concernent d'autres types de leucocytes. Sur les basophiles, elle induit le chimiotactisme (Geiser et *al.*, 1993 ; Taub et Oppenheim, 1994), l'adhérence aux cellules endothéliales (Bacon et *al.*, 1994), la libération d'histamine et de leucotriène (Dahinden et *al.*, 1989). Elle n'induit aucun chimiotactisme des éosinophiles (Schroder et *al.*, 1987) sauf après traitement par l'IL-3 ou le GM-CSF (Warringa et *al.*, 1991). Elle joue un rôle dans la migration des macrophages (Gerszten et *al.*, 1999) et exhibe une activité chimiotactique envers les lymphocytes T directement (Larsen et *al.*, 1989) ou via la libération de plusieurs facteurs protéiques contenues dans les granules des neutrophiles en présence d'activateurs secondaires tels que le TNF- α ou la cytochalasine B (Taub et *al.*, 1994 ; Chertov et *al.*, 1996). L'IL-8 agit sur les lymphocytes B, induisant leur chimiotactisme (Jinquan et *al.*, 1997) et inhibe sélectivement la production des IgE induite par l'IL-4 (Kimata et *al.*, 1992).

La CXCL8 joue un rôle crucial dans la régulation négative de la croissance (Broxmeyer et *al.*, 1996 ; Norgauer et *al.*, 1996) et dans la régulation positive de l'angiogénèse (Koch et *al.*, 1992).

VIII - ROLE DE L'IL-8 DANS LES MANIFESTATIONS INFLAMMATOIRES :

L'inhalation du CXCL8 provoque directement une broncho-constriction chez les cochons de la Guinée (Fujimura et *al.*, 1999). Cet effet suggère qu'elle contribue probablement dans l'établissement de l'asthme à différents stades directement et indirectement par l'induction de l'infiltration et de l'activation des neutrophiles.

La production d'IgE dans l'inflammation pulmonaire induite par des allergènes est amplifiée chez les souris déficientes en CXCR2 (De Sanctis et *al.*, 1999). Ce phénotype peut être expliqué par l'action de l'IL-8 dans l'inhibition de la production d'IgE induite par l'IL-4 (Kimata et *al.*, 1992 et 1995). Sachant qu'un traitement par les IgE chez l'homme induit la production de l'IL-8 (Erger et *al.*, 1998), cette dernière pourrait constituer un « feed back » négatif de la production d'IgE.

Ces données démontrent que la CXCL8 est un médiateur important dans l'inflammation aigüe médiée par les neutrophiles.

X - ROLE DE L'IL-8 DANS LES PATHOLOGIES INFECTIEUSES :**A - L'IL-8 dans les infections bactériennes :**

L'IL-8 est fréquemment détectée au site d'infection. Elle amplifie *in vitro* l'élimination intracellulaire par les neutrophiles de *Mycobacterium fortuitum* (Nibbering et al., 1993) et *Candida albicans* (Djeu et al., 1990). Ces observations sont confirmées *in vivo* avec les souris déficientes en CXCR2. Ces dernières présentent une plus grande susceptibilité et une réduction de l'infiltration des neutrophiles dans les tissus infectés par *C. albicans*, *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*. Ces données suggèrent que l'IL-8 joue un rôle crucial dans l'éradication des bactéries infestant un site restreint.

B - L'IL-8 dans les infections virales :

Une relation étroite existe entre l'IL-8 et l'infection par plusieurs virus. En effet, l'IL-8 peut inhiber *in vitro* l'activité antivirale de l'IFN- α et l'IFN- β (Khabar et al., 1997). Son effet s'observe également dans la relation inversement proportionnelle existant entre le taux de l'IL-8 dans les sérums et la sensibilité au traitement par les interférons chez les patients atteints d'hépatite C (Polyak et al., 2001). L'Adénovirus de type 7, agent causal de la pneumonie neutrophilique, induit la production de l'IL-8 par les cellules épithéliales pulmonaires par activation de la voie des ERK1/2 (Alcorn et al., 2001). Induisant également cette voie de transduction du signal (Knall et al., 1996), l'IL-8 peut agir en synergie avec l'adénovirus pour une amplification de sa propre production. Cette coopération induirait ou amplifierait éventuellement la maladie. Chez les patients immuno-déficients atteints de pneumonies, l'IL-8 augmente la réplication du cytomégalovirus dans les fibroblastes (Murayama et al., 1994), suggérant la présence d'une boucle d'amplification entre le CXCL8 et l'infection par ce virus.

L'ensemble de ces données fait de l'IL-8 (ou de ses antagonistes) un système potentiellement intéressant dans une perspective d'utilisation thérapeutique.

L'ECHINOCOCCOSE

I - INTRODUCTION :

Le terme échinococcose désigne l'ensemble des manifestations pathologiques médicalement et socialement graves provoquées par les formes larvaires (métacestodes) de petits cestodes du genre *Echinococcus* (famille des Taeniidae) dont le cycle de vie implique deux hôtes mammifères. Un hôte définitif carnivore dont l'intestin est le siège du développement de la forme adulte et un hôte intermédiaire herbivore porteur des formes larvaires du parasite (Euzeby, 1977 ; Nozais, 1997 ; Rippert, 1998 ; Chrieki, 2002 ; Zhang et al., 2003).

Les métacestodes des quatre espèces d'*Echinococcus* peuvent infecter de façon accidentelle l'homme et causer différentes formes d'échinococcose (Khuroo, 2002 ; Siracusano et al., 2002 ; Zhang et al., 2003). Cependant, les formes les plus fréquentes chez l'homme sont l'échinococcose cystique et alvéolaire (Rippert, 1998 ; Gottstein, 2001) dont la répartition géographique, l'épidémiologie et le rôle pathogène sont nettement distincts. Les deux autres espèces (*Echinococcus oligarthrus* et *E. vogeli*) sont rarement retrouvées (Golvan, 1983).

L'espèce *granulosus* est composée en un complexe de quatre principales sous espèces en fonction des couples hôte/définitif- hôte/intermédiaire et de quelques différences morphologiques. Il est admis également l'existence de diverses souches en fonction du couple d'hôtes, la répartition géographique et la transmissibilité à l'homme. Les recherches récentes permettent de déceler des différences phénotypiques entre ces souches telles que la morphologie du rostre et des crochets (Moulinier, 2003).

II - LA FORME ADULTE DU PARASITE :

a) Morphologie :

Echinococcus granulosus est un cestode de très petite taille mesurant de 3 à 6 mm de long (AFEP, 1997) (Fig. 1A).

- **La tête (scolex)** est périforme, subglobulaire et mesure environ 300 µm de diamètre (Nozais, 1997). Elle comporte quatre ventouses plus aux moins circulaires situées sur la partie équatoriale. Le rostre, non rétractile mais saillant, est muni d'une double couronne de 30 à 40 crochets, les plus grands (35 à 45 µm) étant situés en avant des plus petits (20 à 35 µm). Ces derniers sont constitués d'un manche et d'une lame et entre les deux la garde (Nozais, 1997 ; Moulinier, 2003).
- **Les anneaux (strobiles)** (au nombre de 3 à 5) deviennent de plus en plus longs et larges, le premier étant difficile à distinguer (Nozais, 1997). Seul l'avant dernier anneau, plus long que la moitié du corps présente un organe génital hermaphrodite développé. Ce dernier est constitué d'un système reproducteur femelle (avec un ovaire réniforme et bilobé, des glandes vittellogènes, un vitelloducte et un vagin) et un système reproducteur mâle (avec 21 à 70 testicules, des glandes prostatiques, une vésicule séminale, un canal éjaculateur et l'organe copulateur ou cire). Tandis que l'utérus sacciforme remplit le dernier anneau ovigère et mur. La cavité utérine étant entièrement occupée par plusieurs centaines (entre 400 et 800) d'embryophores et comportant sur un coté le pore génital (Nozais, 1997 ; Moulinier, 2003).

b) L'hôte définitif :

L'adulte vit dans l'intestin grêle du chien principalement et de quelques canidés sauvages (loup, chacal, coyote,...) (Fig. 2). Il est fixé au niveau des villosités intestinales par son scolex, le reste du ver flottant dans la lumière intestinale. Il peut parasiter le chien en très grand nombre avec une longévité de l'ordre d'un an à deux ans en l'absence de réinfestation (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997 ; Khuroo, 2002). En cas de parasitisme important, en particulier chez les chiens vivants en zone rurale, il existe des lésions de la muqueuse d'ordre inflammatoire engendrant une fibrosclérose.

c) La production des œufs :

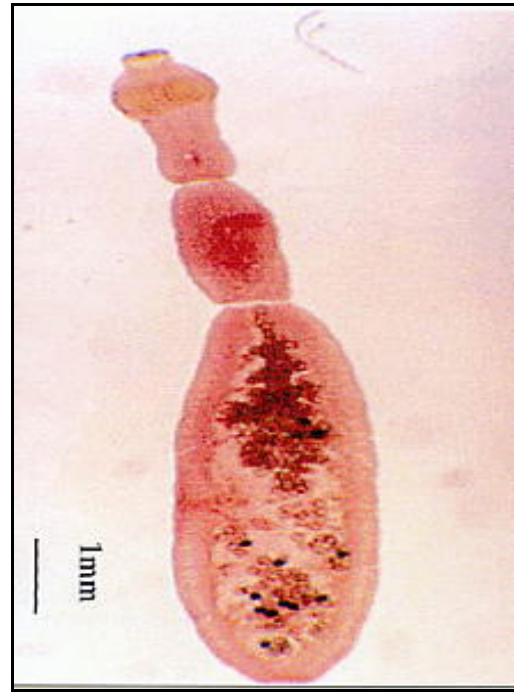
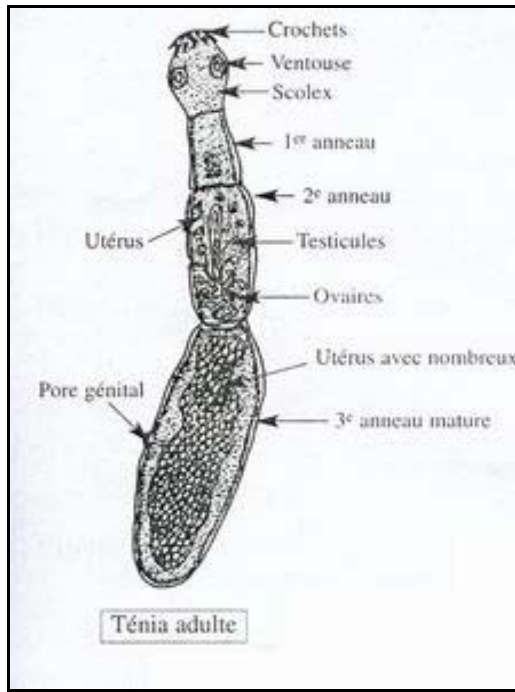
La production des œufs s'effectue par autofécondation ou fécondation croisée (permettant le mélange des clones). Le dernier anneau mur se détache activement de la chaîne et s'élimine avec les fèces, s'ouvrant sur le sol et les végétaux (AFEP, 1997 ; Nozais, 1997). Il pourrait être dispersé sur une assez vaste surface par le vent, la pluie, les insectes, Cependant, ce segment ovigère est fragile. Il se désintègre parfois lors du passage du sphincter anal, les œufs se déposant alors sur la peau de la marge anale. Le prurit anal est très fréquent chez les chiens parasités. Les œufs seront ainsi ramassés sur les babines, sur la langue et la gueule de l'animal qui pourra ensuite les déposer sur sa fourrure en se léchant (Nozais, 1997).

III - LA TRANSMISSION A L'HÔTE INTERMEDIAIRE :**a) Les œufs (embryophores) :**

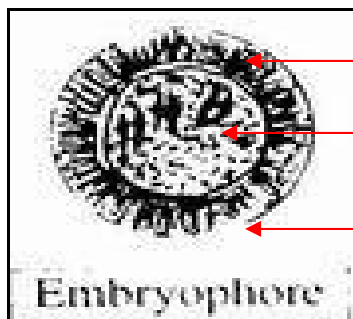
Les œufs sont très résistants et peuvent survivre de quelques semaines à quelques mois selon les conditions climatiques (AFEP, 1997). Ils restent infestant après 16 jours dans l'eau et un séjour de 11 jours en atmosphère sèche ou 11 jours à -1°C (Golvan, 1983). Ils sont légèrement ovoïdes et mesurent 38 µm sur 35µm. Ils contiennent un embryon hexacante muni de 6 crochets larvaires provisoires. L'ensemble est entouré par une membrane interne épaisse et striée transversalement et une membrane externe mince (Golvan, 1983 ; Nozais, 1997) (Fig. 1B).

b) L'infestation et l'évolution larvaire :

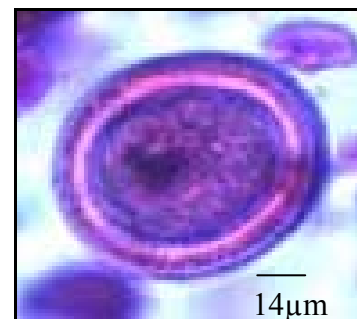
La plupart des mammifères herbivores (les moutons essentiellement mais aussi les bœufs, les chevaux, les chèvres, les porcs, les antilopes, les dromadaires, ...) sont susceptibles de s'infester par ingestion de ces œufs (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997) (Fig. 2). Parvenu à l'estomac, la coque de l'embryophore est dissoute par les enzymes protéolytiques du suc gastrique. Libéré, l'embryon hexacante se lie à la paroi du tube digestif par ses crochets. Il traverse cette paroi grâce à des mouvements musculaires rythmés impliquant le corps et les crochets aidé par les sécrétions des glandes. L'oncosphère entre par la suite dans le système veineux ou lymphatique et par une veinule porte arrive au foie (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997) qui constitue un premier filtre d'arrêt. Si ce filtre est franchi, elle peut également passer par le cœur droit et gagner les poumons.



- A -



Membrane interne striée
Crochets
Membrane externe



- B -

Figure 1 : Morphologie d'*Echinococcus granulosus*. A : Forme adulte, B : Embryophore (Moulinier, 2003 ; Ghaffar, 2004).

Elle pourra emprunter la voie du cœur gauche pour être disséminée dans tous l'organisme grâce à la circulation artérielle (Gottstein, 2001 ; Khuroo, 2002; Zhang et *al.*, 2003). Elle peut également dans certains cas tomber dans une veine du système cave et aboutir directement au poumon sans traverser le foie (Golvan, 1983).

Arrivé dans l'organe où il va s'établir, l'embryon est dès la 60^{ème} heure au centre de la genèse d'un granulome inflammatoire sous forme d'une petite masse protoplasmique multinuclée. Cette masse se vacuolise vers le 4^{ème} jour et devient complètement vésiculaire à partir du 7^{ème} jour. Elle se développe de 1 à 5 cm par an (Golvan, 1983).

IV - L'EVOLUTION LARVAIRE CHEZ L'HOMME :

a) Le mode d'infestation :

L'homme constitue dans ce cycle une impasse et ne représente donc qu'un hôte intermédiaire (Fig. 2). Comme les hôtes intermédiaires normaux (herbivores), il s'infeste par ingestion d'embryophores émis par l'hôte définitif directement en portant ses mains à sa bouche après un contact avec le chien. Il semble que c'est le mode de contamination le plus courant, en particulier chez l'enfant ou dans le cadre de professions plus particulièrement exposées (Bergers, bouchers, éleveurs, vétérinaires, ...). La contamination indirecte par ingestion d'aliments ou d'eau souillés par les excréments de chiens parasités est une éventualité beaucoup plus rare (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997).

b) La forme larvaire du parasite :

Quelque soit l'organe parasité, la larve prend une forme de vésicule sphérique pleine d'un liquide claire « eau de roche » (Golvan, 1983) de moins 1 cm à plus de 10 cm de diamètre (jusqu'au volume d'une tête d'enfant) (Nozais, 1997).

L'hydatide est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de (Fig. 3 A):

- **L'adventice (périkyste)** est une formation qui n'appartient pas à l'hydatide. Elle est constituée par le parenchyme de l'organe hôte refoulé par la croissance de la larve. Elle est plus ou moins remaniée et fibro-scléreuse en fonction de l'âge et de la taille du kyste. Il n'y a pas de plan de clivage entre ce parenchyme altéré et le parenchyme sain (AFEP, 1997).
- **La membrane anhiste (cuticule)** est une membrane blanche nacré ou ivoire, opaque et d'épaisseur variable selon l'âge du kyste (de 0,5 à 2 mm) (Rippert, 1998 ; Moulinier, 2003). Elle est formée de couches concentriques emboîtées les unes dans les autres. Elle est de nature lipidique, protéinique et mucopolysaccharidique (proche de la chitine). Douée d'une certaine élasticité, elle assure l'intégrité du kyste et se comporte comme un filtre vis-à-vis des grosses molécules et des microorganismes. Par ailleurs, elle laisse passer dans les deux sens des cristoïdes, certains peptones dégradés, et des molécules de taille réduite (protéines, glucides et certains lipides) (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Moulinier, 2003).

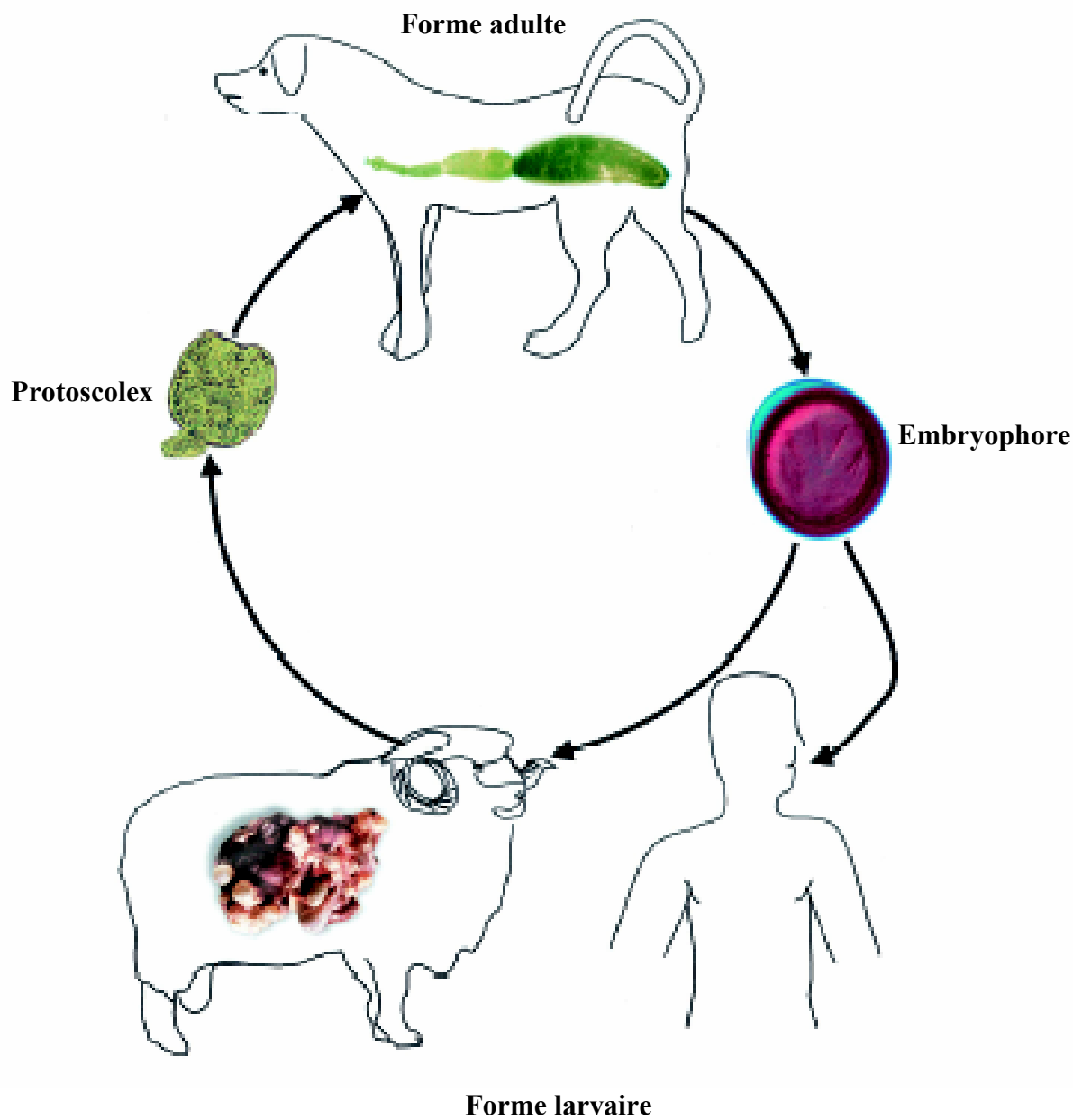
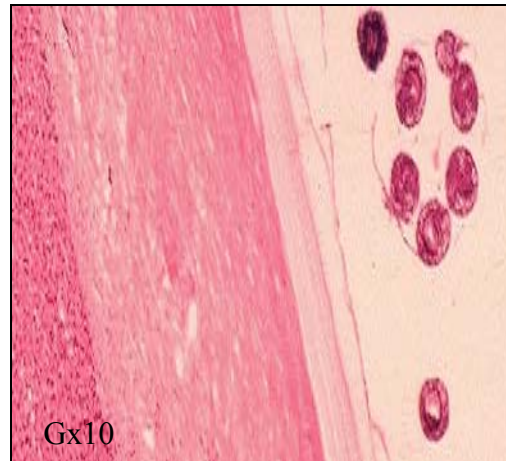
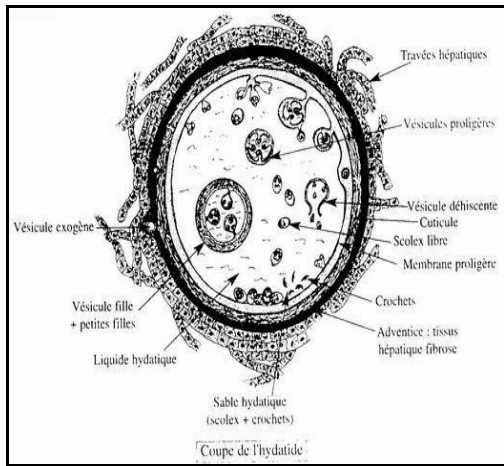


Figure 2 : Cycle biologique d'*Echinococcus granulosus* (Zhang et al., 2003)

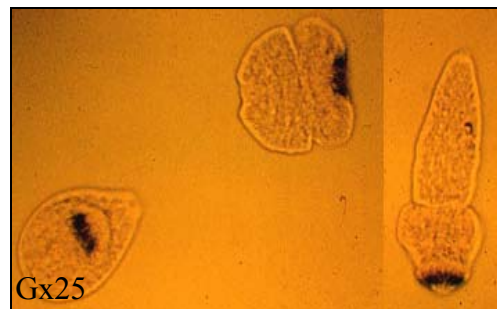
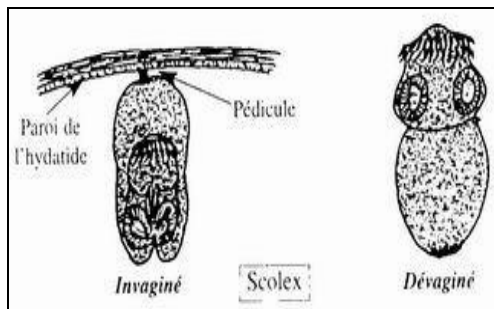
- **La membrane germinale (proligère)** est une membrane fine, fragile, molle et blanche. Elle est constituée par une couche cellulaire syncytiale de 10 à 20 μm d'épaisseur (Golvan, 1983 ; Nozais, 1997). C'est la membrane fertile de l'hydatide (AFEP, 1997) qui donne naissance à tous les autres éléments de la larve (Rippert, 1998). Elle fonctionne comme un filtre hautement sélectif en laissant passer vers l'organisme parasité certains composants tel que les molécules antigéniques (Moulinier, 2003).
- **Les capsules proligères** se forment plusieurs mois voire plusieurs années après l'infestation. La membrane proligère forme sur sa face interne des bourgeons qui se vésiculisent et constituent des vésicules proligères (300 à 800 μm) liquidiennes sans paroi cuticulaire. Ces dernières restent appendues à la membrane germinative par un fin pédicule syncytial. Dans chaque vésicule vont prendre naissance par bourgeonnement les **protoscolex** (10 à 30 en moyenne) généralement invaginés, ovoïdes et munis de 30 à 40 crochets (mesurant de 50 à 150 μm) (Fig. 3B). Elles peuvent se détacher à la moindre secousse et flotter dans le liquide hydatique. Elles peuvent aussi se fissurer ou se rompre et libérer des protoscolex dans le liquide hydatique (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997 ; Rippert, 1998 ; Khuroo, 2002 ; Moulinier, 2003).
- **Les vésicules filles** peuvent être d'origine **endogène** et provenir de la vésiculation des protoscolex libres dans le liquide hydatique. Elles sont alors constituées d'une cuticule anhiste et d'une membrane germinative sur laquelle sont appendus de nombreux protoscolex. Elles peuvent aussi être d'origine **exogène** en se formant à partir de la membrane proligère insérée dans la cuticule et gagnent progressivement l'adventice. Elles se vésiculisent à leur tour, s'entourant d'une cuticule et produisant des protoscolex (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997 ; Rippert, 1998 ; Khuroo, 2002 ; Moulinier, 2003).
- **Le liquide hydatique** est normalement limpide « eau de roche » sauf en cas de surinfection du kyste. Il remplit et maintient sous tension l'hydatide, les capsules proligères et les vésicules filles. Il a une composition différente selon le degré de fertilité et l'intégrité de la paroi, en particulier l'absence de fistule biliaire ou de surinfection. Les molécules composant le liquide hydatique proviennent d'une part de la synthèse propre du parasite, d'autre part de l'hôte (Sels de sodium et de calcium, phospholipides, glucose, protéines, enzymes et substances toxiques) (Golvan, 1983 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997 ; Rippert, 1998 ; Khuroo, 2002 ; Moulinier, 2003).

V - LE POUVOIR ANTIGENIQUE DU PARASITE :

En tant qu'hôte intermédiaire d'*Echinococcus granulosus*, l'homme est exposé à une variété de déterminants antigéniques. Plus de 10 antigènes sont présents dans le liquide hydatique. Il est admis selon plusieurs équipes que l'**Ag A** et l'**Ag B** exhibent la plus haute réactivité envers les sérums des patients (Capron *et al.*, 1967, Oriol *et al.*, 1971, Siracusano *et al.*, 2002).



- A -



- B -

Figure 3 : Morphologie d'*Echinococcus granulosus*. **A** : Forme larvaire, **B** : Protoscolex (Moulinier, 2003; Ghaffar, 2004)

a) L'antigène A :

Il est très immunogène et détermine l'apparition précoce et quasi constante d'anticorps lors de l'infection parasitaire (Capron et *al.*, 1967 ; Oriol et *al.*, 1971 ; Bout et *al.*, 1974 ; Cesbron et *al.*, 1986 ; Hamrioui et *al.*, 1986). C'est une lipoprotéine oligomérique complexe et thermolabile. Elle est composée de 2 sous unités de 65 et 55 kDa qui se dissocient en 2 sous unités de 38/39 et 20 kDa dans les conditions réductrices en SDS-PAGE (Di Felice et *al.*, 1977 ; Lightowlers et *al.*, 1989 ; Lightowler et Goststein, 1995 ; Poretti et *al.*, 1999 ; Gonzalez-Sapienza et *al.*, 2000 ; Siracusano et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2003).

La plus large sous unité de 38/39 kDa peut être responsable d'un manque de spécificité qui trouve son expression dans les réactions croisées obtenues fréquemment avec les sérums de patients infectés avec d'autres métacestodes et trématodes (Sheperd et McManus, 1987 ; Ortona et *al.*, 2000). Cette faible spécificité est partiellement due à des épitopes phosphoryle choline très ubiquitaires (Zhang, 1996).

Parmi les nombreuses activités enzymatiques explorées, seules les activités α et β carboxyl-estérasique se révèlent très nettement positives au niveau de l'Ag A (Bout et *al.*, 1975).

Cet antigène est localisé également au niveau de la couche interne de la membrane germinative et le parenchyme des protoscolex (Kong et *al.*, 1989).

b) L'antigène B :

C'est une lipoprotéine thermostable de 120 kDa qui se dissocie en 3 sous unités principales de 8, 16 et 20/24 kDa en SDS-PAGE sous les conditions réductrices et non réductrices (Oriol et Oriol, 1975 ; Leggatt et *al.*, 1992 ; Poretti et *al.*, 1999 ; Siracusano et *al.*, 2002) suggérant que ce sont tous probablement des polymères de la sous unité de 8 kDa (Gonzalez et *al.*, 1996).

L'antigène B est également localisé dans les téguments des protoscolex et la membrane germinative du métacestode (Yarzabal et *al.*, 1977 ; Siracusano et *al.*, 2002).

Il est généralement admis que l'Ag B et en particulier la plus petite sous unité de 8/12 kDa offre une plus grande spécificité que l'Ag A. Cependant, ni l'Ag B ni l'Ag A ne sont spécifiques de l'espèce d'*Echinococcus granulosus* (Lightowler et *al.*, 1989 ; Ito et *al.*, 1999).

VI - LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE :

Dans toutes les régions d'endémie, l'hydatidose est essentiellement une maladie rurale liée à la présence simultanée de troupeaux d'herbivores domestiques et de chiens. Le cosmopolitisme et la dispersion sous tous les climats et dans toutes les régions caractérisent cette macroparasitose (Rippert, 1998).

Ses aires d'élection sont le bassin méditerranéen (avec l'Algérie), le moyen orient, l'Amérique du sud (surtout l'Uruguay et l'Argentine), l'Australie, plusieurs pays de l'Afrique (surtout le Kenya), le sud et le centre de la Russie et la Chine (Euzeby, 1977 ; Golvan, 1989 ; AFEP, 1997 ; Baron, 1999 ; Chrieki, 2002 ; Moulinier, 2003).

L'incidence actuelle des infections humaines dans ces régions d'endémie varient largement d'une région à une autre (en moyenne 220 par 100.000 habitants et par an) (Jenkins, 1998 ; Gottstein, 2001 ; Khuroo, 2002). Cependant les taux de fréquence fournis par le ministère de la santé du pays d'endémie sont toujours une sous estimation de la fréquence réelle de la maladie humaine (Nozais, 1997).

A l'heure actuelle, l'affection a été éliminée de plusieurs pays du monde (l'Islande, la Nouvelle Zélande) grâce aux moyens de contrôle mis en œuvre.

VII - SYMPTOMATOLOGIE ET LOCALISATIONS :

a) La symptomatologie :

La symptomatologie du kyste hydatique dépend étroitement de l'organe parasité ainsi que du stade de développement du parasite. Cependant, quelque soit sa localisation l'hydatide a une croissance lente. Elle n'exerce pratiquement, tant qu'elle est intacte, qu'une action mécanique par compression des organes. Elle demeure donc pendant des années cliniquement muette (Amman, 1996 ; Chrieki, 2002; Frider, 2001; Roberts, 2001).

Les manifestations pathologiques sont dues aux complications qui finissent par jalonnent inévitablement le développement du parasite (compression, fissuration, rupture dans les cavités du corps et infection, obstruction occasionnelle et réaction allergique voire choc anaphylactique). Le test positif est fourni dans la grande majorité des cas occasionnellement lors d'un examen de routine (Garcia, 2001 ; Chrieki, 2002 ; Milicevic, 1994 ; Khuroo, 2002; Johsep et Smith, 2003).

b) Les localisations :

Le kyste hydatique siège dans la majorité des cas au niveau du foie (65 %) et assez fréquemment au niveau des poumons (25%). Toutes les autres localisations (rein, muscle, rate, cerveau, os) ne totalisent que 10 % des cas d'hydatidose (Rippert, 1998 ; Elton, 2000 ; Siles-Lucas et Gottstein, 2001; Khuroo, 2002).

VIII - LE DIAGNOSTIC :

Un diagnostic précoce de la pathologie est important d'autant plus que la chirurgie reste la meilleure thérapeutique. Le diagnostic clinique est difficile car les signes et les symptômes de la maladie varient largement (Siracusano et *al.*, 2002). Traditionnellement le diagnostic repose pour une large part sur l'imagerie (Tableau I) (Jouini et *al.*, 1996 ; Roberts-Gangneux, 1998). Cependant, il est parfois difficile de différencier les kystes des tumeurs et des abcès.

Orienté par les signes cliniques et les examens radiologiques, l'immunodiagnostic peut confirmer la présence du kyste hydatique soutenu par l'examen des pièces d'exérèse (Tableau I). Cependant, les kystes non fissurés étant très à l'abri du système immunitaire, les résultats de la sérologie sont donc parfois décevants avec des titres d'anticorps peu élevés et des discordances possibles entre les techniques d'où les réactions de fausse négativité. Il est donc nécessaire de disposer de technique de confirmation sensible et spécifique (Roberts, 2001).

Tableau I : Les différentes méthodes utilisées dans le diagnostic de l'hydatidose.

Le Diagnostic Radiologique	Le Diagnostic Sérologique
<p>-La radioscopie et la radiographie simple (Golvan, 1983).</p> <p>-La radiographie après opacification (Golvan, 1983).</p> <p>-L'échographie (Golvan, 1983).</p> <p>-L'angiographie (Altintas, 1998 ; Khuroo 2002).</p> <p>-La scintigraphie hépatique (Altintas, 1998 ; Khuroo, 2002).</p> <p>-La TDM (Siles-Lucas et Gottstein, 2001)</p> <p>-L'ultrasound (WHO, 1998; Roberts, 2001; Siracusano et al., 2002).</p> <p>-La ERCP (Wattal et al., 1986; Khuroo, 2002).</p> <p>-Les RX (Siracusano et al., 2002).</p>	<p>La détection des antigènes somatiques brut (Liquide hydatique et extrait de protoscolex) :</p> <p>- L'IDD ou l'ES (Wattre et al., 1980 ; Rippert, 1998 ; Graig et al., 1997 ; Siracusano et al., 2002)</p> <p>-L'IHA (Tribouley et al., 1974 ; Rippert, 1998, Ray, 2002)</p> <p>-L'ELISA (Lightowlers et Gottstein, 1995 ; Roberts, 2001 ; Siracusano et al., 2002)</p> <p>-L'ELIEDA (Nozais, 1997)</p> <p>-L'IB (Ito et al., 1999)</p> <p>-L'IFI (Golvan, 1990)</p>
	<p>La détection des antigènes circulants dans les sérums ou les urines par ELISA (Graig, 1986 ; Siles-Lucas et Gottstein, 2001 ; Siracusano et al., 2002)</p>

L'immunodiagnostic n'est pas seulement utile pour le diagnostic primaire mais aussi pour le suivi des patients après la chirurgie ou le traitement pharmacologique ou les deux (Rickard et al., 1986 ; Polowski et al., 2001 ; Siracusano et al., 2002).

Les nouvelles stratégies de l'immunodiagnostic :

Les recherches récentes se focalisent maintenant sur les outils moléculaires pour l'immunodiagnostic de l'hydatidose. Les deux méthodes les plus prometteuses impliquent l'utilisation d'**antigènes natifs** ou **recombinants** (Zhang et al., 2003 ; Li et al., 2004) ou de **peptides synthétiques** (Gonzalez-Sapienza et al., 2000) pour la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de patients infectés. La deuxième méthode implique la production d'**anticorps monoclonaux** pour la détection des antigènes parasitaires dans les échantillons cliniques (Barbieri et al., 1998 ; Siles-Lucas et Gottstein, 2001 ; Siracusano et al., 2002).

Les antigènes natifs et recombinants ont la même sensibilité pour l'immunodiagnostic. Cependant, ils présentent des avantages et des inconvénients (Tableau II). Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouveaux antigènes spécifiques pour palier au problème de réactions croisées avec d'autres antigènes parasitaires dans les régions endémiques (Ortona et al., 2000). L'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM) offre plusieurs avantages (Tableau II). Deux types d'AcM sont utilisés (Di Felice et Siracusano, 1987 ; Siles-Lucas et Gottstein, 2001 ; Siracusano et al., 2002):

- Des AcM dirigés contre les antigènes parasitaires communs avec d'autres parasites. Ceci permettra d'éliminer les antigènes responsables des réactions croisées et des réactions de fausse positivité.
- Des AcM utilisés pour la purification des antigènes majeurs spécifiques à *E.g.*

Les travaux de Touil-Boukoffa et al et ceux de Rigano et al (Rigano et al., 1999a) ont démontré que la production des **cytokines** constitue un marqueur de choix dans l'immunosurveillance et l'immunodiagnostic de l'hydatidose. En effet, la persistance du TNF- α au niveau des patients récidivants et pendant les phases chroniques de la maladie constitue un mauvais pronostic (Touil-Boukoffa et al., 1997 ; Touil-Boukoffa, 1998). Toutefois, la diminution de la production de l'IFN- γ et du NO après l'exérèse kystique est un signe de bon pronostic (Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et al., 1998 ; Mezioug et al., 2004). Ces données sont confirmées par un suivi des patients en phase de récurrence.

IX - LA THERAPIE :

La guérison par involution spontanée ou évacuation totale de la vésicule hydatique par les voies naturelles est exceptionnelle. Il est une règle admise par tous : tout kyste hydatique diagnostiqué doit être traité.

a) La thérapie chirurgicale :

Le traitement a substantiellement changé durant les 20 dernières années. Cependant il demeure à l'heure actuelle essentiellement chirurgical (WHO, 1996 ; Taghavi, 2001). Le kyste hydatique, sauf contexte particulier (patients âgés, femmes enceintes, patients avec d'autres maladies sévères, polykystoses, kystes difficiles d'accès) est toujours justifiable d'une exérèse chirurgicale (Horton, 1989, Léo et al., 1996 ; Safioeas et al., 1999; Roberts, 2001 ; Kammerer et Schantz, 1993 ; Chrieki, 2002 ; Josheph et Smith, 2003).

Tableau II : Comparaison des stratégies nouvelles préconisées dans l'immunodiagnostic.
(Ortona *et al.*, 2000 ; Siracusano *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003)

	Les Antigènes Natifs	Les Antigènes Recombinants	Les Anticorps Monoclonaux
Les Avantages	<ul style="list-style-type: none"> -L'extraction se fait de plusieurs sources. -L'utilisation se fait dans chaque laboratoire. 	<ul style="list-style-type: none"> -La préparation est commerciale. -La distribution se fait aux centres de diagnostic. -La qualité antigénique est élevée. 	<ul style="list-style-type: none"> -Il n'y a pas de réaction croisée (ou très peu). -La standardisation et la reproductibilité sont bonnes.
Les Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> -La disponibilité est limitée. -Ils ne peuvent pas être standardisés avec une qualité antigénique élevée. -Il y a un manque de spécificité. 	<ul style="list-style-type: none"> -Le coût est élevé. -Il y a un manque de spécificité. 	<ul style="list-style-type: none"> -Le coût est élevé. -Il y a une faible sensibilité.

Toutefois, la fragilité des membranes kystiques et leur rupture peuvent donner lieu à des récurrences (échinococcose secondaire) ou entraîner la mort à brève échéance (choc anaphylactique) (Léo et *al.*, 1996 ; Di Matteo et *al.*, 1996 ; Taghavi, 2001 ; Sayek et *al.*, 1980 ; Khuroo, 2002 ; Josheph et Smith, 2003).

b) La chimiothérapie :

Elle est indiquée dans le traitement des patients inopérables ou dans le cas d'une thérapie pré chirurgicale en vue de réduire la viabilité des kystes. Elle peut également être indiquée lors d'une thérapie post chirurgicale pour réduire le risque de rechute (Daeger, 1999 ; Moris, 1998 ; Gottstein, 2001 ; Echerts et Deplazes, 199 ; Chrieki, 2002). Ce traitement dépend de la taille, de la localisation et de l'épaisseur du kyste. Il dépend également de la symptomatologie et de la réponse des patients à la chimiothérapie (Wen et *al.*, 1995 ; Roberts, 2001 ; Davis et *al.*, 1989 ; Siracusano et *al.*, 2002 ; Josheph et Smith, 2003). La chimiothérapie fait appel à 3 benzimidazoles (le mébendazole, le flubendazole et l'albendazole) et à un dérivé isoquinolone (le praziquantel). Elle demeure décevante en raison du pourcentage élevé de rechutes et d'effets indésirables (Tableau III).

c) La ponction évacuatrice des kystes (PAIR) :

Autrefois proscrite en raison des risques encourus (Choc, essaimage à distance), la ponction aspiratrice connue sous le nom de PAIR (ponction, aspiration, injection et réaspiration) est actuellement rendue possible grâce au guidage échographique et à la couverture antihelminthique associée. Elle consiste à ponctionner le kyste, à aspirer rapidement le contenu, et à injecter un agent scolicide (tels que l'eau oxygénée (Djillali, 1986), le méthanol ou l'éthanol à 70-95 %, le cetrimide, le sérum hypertonique à 15-20 %, le peroxyde d'hydrogène et le chlorhexidine (Besim et *al.*, 1998 ; Roberts, 2001)). Ces agents ont pour effet de faciliter la séparation de l'endokyste et de désactiver les protoscolex (Kaan Karayalcin, 1999). L'agent scolicide est ensuite réaspiré (Gargoni et *al.*, 1990 ; Khuroo, 1993 et 1997 ; Amman, 1996 ; Léo et *al.*, 1996 ; Taghavi, 2001). Cette technique expérimentale a montré une haute efficacité chez les malades cachectiques et chez les patients porteurs de polykystose (WHO Document, 1997 ; Rippert, 1998 ; Daeger, 1999).

Toutefois, elle ne peut être utilisée lorsque le kyste est inaccessible, calcifié ou logé en profondeur dans l'organe. Elle n'est également jamais sans risque même pour les patients ne présentant aucune contre indication à son utilisation (Tableau III).

X - LA PROPHYLAXIE :

La prophylaxie du kyste hydatique cherche à interrompre le cycle biologique naturel d'*Echinococcus granulosus*, évoluant successivement chez le chien et le mouton avec passage accidentel chez l'homme. La lutte doit donc être menée à trois niveaux. L'éducation sanitaire des populations dans les pays de forte endémicité est nécessaire. (Golvan, 1983 ; WHO, 1996 ; AFEP, 1997 ; Nozais, 1997 ; Rippert, 1998 ; Gottstein, 2001 ; Chrieki, 2002 ; Joseph et Smith, 2003).

Tableau III : les avantages/Inconvénients et les effets secondaires de la chimiothérapie et de la PAIR (Golvan, 1983 ; Léo et *al.*, 1996 ; WHO, 1996; Rippert, 1998 ; Gottstein, 2001 ; Roberts, 2001 ; Taghavi, 2001 ; Khuroo, 2002)

	Les Avantages d'utilisation	Les Inconvénients d'utilisation	Les Effets secondaires
Le Flubendazole		-La cure est prolongée. -Les doses sont élevées. -L'activité kysticide est décevante	-Ils interfèrent avec l'organisation des tubulines en se liant aux β -tubulines libres.
Le Mébendazole		-Il est Faiblement absorbé. -Les doses sont élevées. -Il est rapidement métabolisé dans le foie en dérivés inactifs.	-Ils sont hépatotoxiques. -Ils causent des neutropénies, des thrombocytopénies, et des alopecies. -Ils sont parfois embryotoxiques et tératogènes.
L'Albendazole	-Il est bien absorbé. -Les doses sont plus faibles. -Il est métabolisé rapidement en dérivés actifs (ABZ sulfoxyde).		-Ils causent aussi des douleurs abdominales et des diarrhées.
Le Praziquantel	-Il augmente l'effet des imidazoles.		-Il cause des nausées et des douleurs abdominales

XII - LA VACCINATION :

EG95 est un vaccin qui a été élaboré pour prévenir l'infection chez les hôtes intermédiaires (moutons, chameaux, ...). Il a été préparé à partir d'une protéine de l'oncosphère exprimée chez *Escherichia coli*. L'immunisation avec EG95 permet de réduire l'infection chez les moutons. De plus, cette immunité protectrice persiste une année complète après deux immunisations (Lightowers et *al.*, 1996 et 1999 ; Heath et Lawrence, 1996 ; Lightowers, 1999). Les recherches entreprises par Holeman en 1997 (Zhang et *al.*, 2003) ont également montré la transmission de cette protection aux progénitures.

L'utilisation de ce vaccin avec les mesures de contrôle des chiens et les programmes d'information et d'éducation pourrait augmenter l'efficacité des campagnes de contrôle. En effet, elle permettrait de réduire la transmission du parasite et indirectement de réduire l'incidence de la maladie chez l'homme. Sachant que la biologie de l'infection est très similaire chez l'homme et l'animal, il est fort probable que EG95 pourrait être utilisé chez l'homme.

Cependant, les résultats ne sont pas encore très concluants. En effet, seulement 50% des animaux vaccinés non pas de kystes viables après deux immunisations (Heath et Lawrence, 1996; Lightowers et *al.*, 1996 et 1999).

XIII - LES REPONSES IMMUNITAIRES DE L'HOTE:

L'hydatidose partage avec d'autres helminthiases trois réponses typiques : des réactions d'hypersensibilité immédiate, une production élevée d'IgE/IgG₄, une éosinophilie et une mastocytose (Rigano et *al.*, 2001). Ces réponses sont sous le contrôle de cytokines distinctes produites par deux populations de cellules TCD₄⁺ : Th1 et Th2 (Mezioug et *al.*, 2004). La réponse immunitaire de l'hôte est donc une série très complexe d'interactions qui font intervenir des mécanismes immunologiques diverses (Fig. 4):

a) La réponse tissulaire :

Une première ligne de défense de l'hôte constituée par une atrophie du parenchyme de l'organe infecté est mise en place afin d'isoler le parasite (Gottstein, 2001). Elle se traduit par une infiltration cellulaire, impliquant les lymphocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles et les fibroblastes (Riley et *al.*, 1985 ; Rigano et *al.*, 1996 ; Fotiadis et *al.*, 1999; Diaz et *al.*, 2000).

b) La réponse cellulaire :

Elle se caractérise par une forte réponse lymphoprolifératrice, qui est sous le contrôle d'un certain nombre de cytokines bien distinctes, elles même produites par les sous populations cellulaires TCD₄⁺ de type : Th1 et Th2. (Rigano et *al.*, 1995 à 2001 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et *al.*, 2000 et 2002 ; Mezioug et *al.*, 2004)

En 1986, Touil-Boukoffa a mis en évidence une activité IFN de type α/β au cours de l'hydatidose. Il a été également rapporté la présence *in vivo* et *in vitro* du TNF- α , l'IL-6 (Touil-Boukoffa et *al.*, 1991, 1995 et 1997), l'IFN- γ , le NO (Touil-Boukoffa et *al.*, 1996, 1997, 1998 et 1998* ; Ait Aissa, 2002 ; Mezioug et *al.*, 2004), l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-12 (Touil-Boukoffa et *al.*, 2000 ; Mezioug et *al.*, 2004)

Les travaux menés par d'autres équipes, ont montré des résultats convergents avec ceux de notre équipe en particulier sur la production *in vitro* de l'IL-4, l'IL-10 (Rigano et al., 1995a-b), l'IL-5 et l'IL-6 (Rigano et al., 1996). *In vivo*, il a été rapporté la présence de l'IL-1, l'IL-4 (Navarro-Zorraquin et al., 1991 ; Torcal et al., 1996), l'IL-2, le TNF- α (Torcal et al., 1996), l'IL-10 et l'IFN- γ (Rigano et al., 1999a). A la différence, la nature des effecteurs antigéniques utilisés par ces derniers est d'origine ovine et porte sur l'antigène total.

Les résultats obtenus aux cours de cette dernière décennie par les différentes équipes de recherches, suggèrent que l'équilibre de la relation hôte -parasite est justifiée par la coexistence des deux voies. Ainsi la voie Th1 est probablement associée à l'immunité protectrice (ou la résistance à l'infection). Alors que la déviation vers la voie Th2 reflète la susceptibilité à la maladie. Ces deux voies sont donc bénéfiques pour l'hôte et le parasite respectivement. Cet aspect apparaît être utile dans l'immunosurveillance et l'immunothérapie de la maladie (Touil-Boukoffa et al., 1997 et 1998 ; Gottstein, 2001 ; Margutti et al., 2002 ; Siracusano et al., 2002 ; Zhang et al., 2003).

c) La réponse humorale :

A la mosaïque antigénique du liquide hydatique correspond la production d'anticorps variés incluant les IgE (Afferini et al., 1984 ; Navarro-Zorraquino et al., 1991 ; Rigano et al., 1995a-b), les IgG (Rigano et al., 1995a-b ; Grimm et al., 1998 ; Sterla et al., 1999), les IgM, et les IgA. Le type d'anticorps est souvent lié à l'état du kyste et à sa localisation. Ainsi, une prédominance des IgA est le signe d'une localisation pulmonaire, alors que la présence des IgM indique la présence d'un kyste fissuré (Biava et al., 1990). Toutefois, la réponse en IgG demeure la plus importante et persiste pendant plusieurs années après l'exérèse chirurgicale (Freire-Cartucho et al., 1996 ; Grimm et al., 1998) avec une prédominance des sous classes IgG₁ et IgG₄ (Margutti et al., 2002). Les travaux de Wen et al en 1994 puis Ioppolo et al en 1996 ont démontrés que les IgG₁ et les IgG₄ reconnaissent fortement la fraction 5 et l'Ag B respectivement. Cet aspect pourrait être utile dans l'immunodiagnostic de la maladie et l'étude des mécanismes de survie du parasite (Sterla et al., 1999 ; Siracusano et al., 2002 ; Zhang et al., 2003).

Par ailleurs, l'existence d'une relation entre la production des IgE/IgG₄ et celle *in vitro* des cytokines : l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-10 (Touil-Boukoffa, 1998 ; Rigano et al., 2001) et l'IL-5 (Rigano et al., 1998) supporte une régulation positive des réponses humorales par ces cytokines au cours de l'hydatidose.

XV - LES MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT :

La principale caractéristique de la relation hôte – parasite est la coexistence d'une infection chronique avec des réponses humorales et cellulaires contre le parasite. Cette adaptation étroite et durable du parasite à son hôte implique la mise en place de stratégies complexes et évolutives, lui permettant d'éviter ou de contrecarrer les mécanismes de rejet par le système immunitaire (Rickard et Williams, 1982 ; Capron, 1995 ; Damian, 1997 ; Rigano et al., 2001).

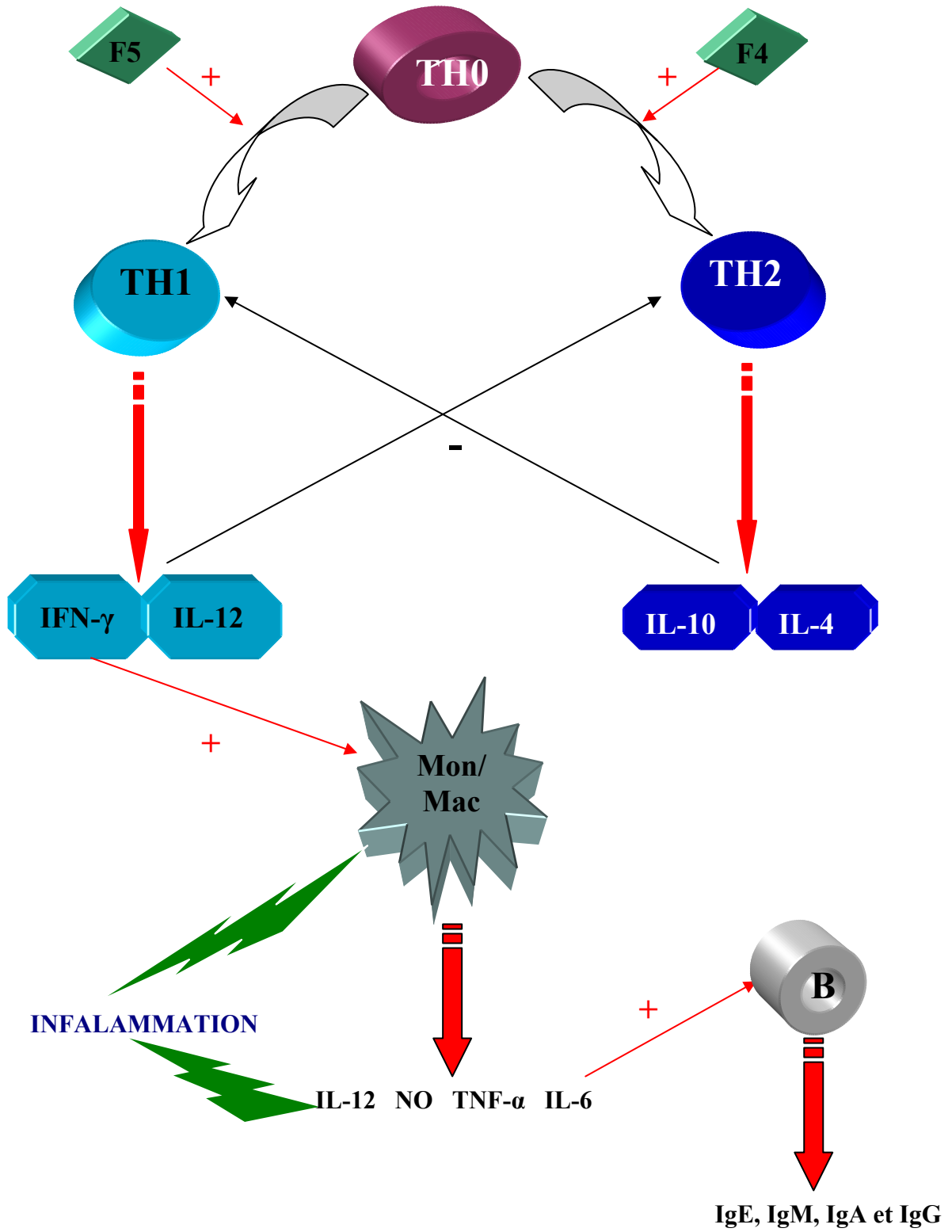


Figure 4: Implication des réponses immunitaires & inflammatoires au cours de l'échinococcose humaine (Touil-Boukoffa *et al.*, 1998 ; Rigano *et al.*, 2001; Mezioug,2002; AitAissa,2002)

La capsule fibreuse constitue à elle seule une première ligne de défense de la larve contre l'attaque immunitaire de l'hôte (Mackenzie, 1984 ; Thompson, 1995 ; Rigano et *al.*, 2001 ; Siracusano et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2003).

Outre cette barrière physique, le parasite peut avoir recours à plusieurs stratégies d'invasion au cours de son évolution à l'intérieur de l'organisme (Siracusano et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2003), on peut citer :

- Le masquage antigénique par les protéines de l'hôte (Frosch et *al.*, 1991 ; Rigano et *al.*, 2001 ; Zhang et *al.*, 2003).
- Le mimétisme moléculaire (Dixon, 1997 ; Zhang et *al.*, 2003).
- Le polymorphisme de l'ADN ou des antigènes (Shepherd et *al.*, 1991 ; Zhang et *al.*, 1998 ; Chow et *al.*, 2001 ; Zhang et *al.*, 2003).
- La production de protéases telles que la cathepsine K (Diaz et *al.*, 2000).
- L'interférence avec l'activité du complément (Ferreira et *al.*, 2000).
- L'altération des fonctions des macrophages et des leucocytes (Rakha et *al.*, 1997 ; Zhang et *al.*, 2003).
- L'altération architecturale des organes lymphoïdes (Ali-Khan, 1978; Richard et Williams, 1982; Riley et Dixon, 1984).
- La déplétion des lymphocytes T (Touil-Boukoffa, 1998 ; Zhang et *al.*, 2003).
- L'immunosuppression (Dixon, 1997 ; Siracusano et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2003).
- L'altération de la réponse en anticorps (Baz et *al.*, 1997 ; Zhang et *al.*, 2003).
- L'antigène B (ou sa plus faible sous unité de 8/12 kDa) a un rôle direct dans l'évasion du parasite par inhibition des protéases et du chimiotactisme des neutrophiles (Rosenvit, 1997 ; Shepherd et *al.*, 1991 ; Siracusano et *al.*, 2002). Il a également un rôle indirect par l'induction préférentielle des cytokines de la voie Th2 ; voie non protectrice associée la chronicité de la maladie (Touil-Boukoffa et *al.*, 2000; Rigano et *al.*, 2001 ; Mezioug et *al.*, 2004).

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL :

1- Les Sérums :

Les échantillons sanguins sont prélevés sur des tubes héparinés (**0,5mg/ml**) chez des patients porteurs de kystes hydatiques confirmés par la chirurgie et ne présentent aucune autre pathologie. D'autres prélèvements sont réalisés chez des donneurs sains. Les plasmas sont recueillis après centrifugation à **2000 rpm** pendant **10 mn** puis aliquotés et conservés à **-45°C**.

70 échantillons sériques de sujets hydatiques ont été ainsi obtenus et répartis selon la localisation kystique en **6** cas de kystes hépato- pulmonaires, **20** cas de kystes hépatiques, **40** cas de kystes pulmonaires et **4** cas de kystes du cœur. Les sérums témoins sont au nombre de **15**.

Selon le stade clinique, nous avons **40** sérums au stade pré- opératoire et **30** autres au stade post- opératoire.

Cet échantillonnage correspond à une population de **40%** hommes et **60%** femmes de **4** à **70 ans**.

2 – Les cellules :

Les PBMC sont préparées à partir du sang humain prélevé sur des tubes héparinés chez des donneurs sains (**n=17**) et malades atteints d'hydatidose confirmée par la chirurgie (**n=35**).

3 – Les kystes et liquides hydatiques :

Les liquides hydatiques sont obtenus par ponction de **33** kystes ni surinfectés, ni vomiqués, ni rompus et de localisation essentiellement pulmonaire et hépatique. Les kystes sont différents par leur taille (**de 2 mm à 15 cm**) et par leur degré de fertilité.

Ces différents échantillons de sang, de liquide et de kyste hydatique ont été collectés au niveau de plusieurs services hospitaliers d'Alger :

- Le Service de Chirurgie Thoracique et Générale du CHU Mustapha Bacha.
- Le Laboratoire de Parasitologie du CHU Mustapha Bacha.
- Le Service de Chirurgie Générale du CHU Salim Zmirli.
- Le Service de Chirurgie Générale du Secteur Sanitaire de Ain Taya
- Le Service de Chirurgie Générale du CHU Parnet.
- Le Centre de Transfusion Sanguine du HCA Ain Nadja.
- Institut Pasteur.

4 – Les tissus :

Les tissus pulmonaires sains d'origine bovine ont été obtenus au niveau de l'abattoir de la commune de Staoueli.

5 – Les milieux de culture :**a – Le RPMI-1640 :**

Ce milieu est enrichi par l'addition de **10%** de Sérum de Veau Fœtal préalablement décomplémenté à **+56 °C** pendant **30 mn** et complémenté de 1 mg/ml de L-Glutamine, de 300 mg/l de Tricine pH 7.4 et 2 mM d'un mélange d'antibiotiques (40 mg/l de Gentalline et 200.000 unités/l de Pénicilline). Il est destiné à la culture des PBMC et des Protoscolex.

b – Le DMEM :

Ce milieu est enrichi de la même façon que le milieu RPMI-1640. Il est destiné à la mise en route et à l'entretien de la survie des fragments de tissus pulmonaires.

6 – L'interféron de référence :

L'IFN- γ humain recombinant d'une activité spécifique de **10⁶ UI/ml**, est produit par Roussel Uclaf (Romain ville, France). Il nous a été aimablement offert par le Dr Wietzerbin, J. Directeur de recherche à l'institut Curie de Paris. Il est utilisé pour les inductions des PBMC en culture.

7 – La souche *Pseudomonas oleovorans* ATCC 8062 :

C'est une bactérie utilisée pour le dosage des nitrites par la méthode de "Griess modifiée" pour sa capacité à réduire les nitrates en nitrites. Elle nous a été aimablement fournie par le Dr Drapier, J. C Directeur de l'unité de recherche biosynthèse du NO et signalisation au CNRS, Gif-sur-Yvette, Paris, France.

8 - Les réactifs Coulter Beckman :

Ils sont utilisés pour le dosage de l'IL-8 et de l'IL-12 dans les échantillons de sérum, de surnageants de culture et de liquides hydatiques.

B - METHODES :**I – Préparation et caractérisation des deux entités antigéniques soluble : le LHT et figurée : les PSC :****1 – Préparation des deux antigènes :**

Le liquide hydatique prélevé stérilement d'un kyste en bon état est soumis à une filtration sur de la gaze, puis centrifugé à **5000 rpm** pendant **30 mn** à **+4 °C**.

Le surnageant obtenu est dialysé. Un dosage des protéines est réalisé par la suite par la méthode de Bradford pour tous les échantillons de liquide hydatique recueillis (**n=33**).

Les liquides hydatiques subiront une caractérisation biochimique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et par chromatographie d'affinité sur ConA-Ultrogel. L'antigénicité sera évaluée par immunoélectrophorèse, immunodiffusion double, ELISA et immunoblot. L'échantillon exprimant le degré d'antigénicité le plus élevé sera sélectionné pour la purification des fractions majeures du liquide hydatique.

Le culot contenant les éléments figurés du kyste subit plusieurs lavages dans du tampon PBS **pH 7,4** stérile. Cette opération est suivie systématiquement d'un test de viabilité à l'éosine (**1%**) et une numération entre lame et lamelle. Les échantillons dont la viabilité est inférieure à **90%** ne sont pas sélectionnés pour les inductions de culture de PBMC.

Les échantillons de protoscolex seront analysés par SDS-PAGE, IEP, IDD et IB (**Fig. 1**).

2- Caractérisation antigénique et biochimique des échantillons de LHT et de PSC :**a - Caractérisation biochimique :****a1 – Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) :**

Il s'agit d'une méthode d'analyse basée sur la migration électrophorétique des molécules en fonction de leur PM.

La migration des échantillons (LH et PSC) se fait sur un gel discontinu de polyacrylamide de **13%** et **5%** d'acrylamide. Dans les conditions réductrices, les échantillons sont d'abord dilués au demi (V/V) dans le tampon échantillon additionné de **10%** (V/V) de β -mercaptoéthanol, puis incubé **5mn** à **100°C**.

La migration s'effectue à un voltage constant (**70V** pour le gel supérieur et **100V** pour le gel inférieur). Elle se fait en présence d'un tampon glycine **pH8,3** et utilise le bleu de bromophénol comme indicateur de migration.

Le gel est ensuite coloré avec du bleu de coomassie **r250** pendant une nuit puis décoloré par des lavages successifs dans une solution à **10%** d'acide acétique.

Enfin, le PM des différentes bandes protéiques est obtenu par extrapolation du Rf (rapport frontal) de chaque bande sur une courbe étalon ($\text{Log PM} = f(\text{Rf})$) établie en utilisant le déplacement des protéines marqueurs.

a2 - Par Chromatographie d'affinité sur Concanavoline A-Ultrogel :

Un ligand, la Concanavoline A présentant une affinité pour les résidus α manopyranosyl des glycoprotéines, est fixé d'une façon covalente à la matrice d'un gel ; l'agarose. Seuls les composants présentant une affinité pour ce ligand sont adsorbés sur la matrice du gel tandis que les autres sont éliminés hors de la colonne. La désorption est obtenue par une modification des interactions de type hydrophobe.

Un échantillon de **0,5ml (50 mg/ml)** est déposé sur le lit du gel dans une colonne (Type Pharmacia 0,9x10cm) équilibré au préalable avec un tampon PB **0,02M, pH7,4, NaCl 1M**. Après un premier lavage avec ce tampon, une deuxième élution est effectuée avec un tampon PB **0,02M pH7,4-NaCl 1M-Saccharose 0,1M**, à un débit de **18 ml/cm²/h** et à raison de **3 ml/tube**. La lecture de la densité optique est effectuée à 280nm.

b - Caractérisation antigénique :**b1 – Par Immunoelectrophorèse :**

C'est une technique qui associe une migration électrophorétique des antigènes selon leurs charges, sous l'action d'un champ électrique, et la diffusion des anticorps perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique. La formation de complexe Ag-Ac se traduit par l'apparition d'arcs de précipitation.

Après une migration électrophorétique des antigènes (LHT et PSC) pendant **2h30mn** sous un potentiel de **25V** pour chaque lame et dans un tampon véronal sodique **pH8,2**, un sérum fortement positif de patients hydatiques est déposé.

Au bout de **48h** de diffusion (**24h** à **+4°C** puis **24h** à T° ambiante), les lames sont immergées dans un bain de citrate à **5%** pendant **1h** à **3h**, puis dans plusieurs bains de NaCl à **9%** pendant **3 jours**. Les lames vont subir par la suite une déminéralisation avec du papier wattman n°1 à **37°C** jusqu'à la déshydratation complète du gel.

Les lames sont enfin colorées avec de l'amidoschwartz pendant **7mn** puis décolorées dans une solution acide/alcool. Seuls les arcs de précipitation restent colorés, indiquant ainsi la présence de complexes immuns Ag-Ac.

b2 – Par immunodiffusion double :

Cette technique permet la comparaison directe de différentes préparations d'Ag et d'Ac, et l'observation de réactions d'identité ou de non identité voire même de réactions croisées donnant lieu à la formation d'arcs de précipitation. Le nombre et la projection de ces arcs fournissent une évaluation des systèmes précipitants en cause.

La diffusion est réalisée en chambre humide pendant **48h**. La suite des opérations (lavage, déminéralisation, coloration et décoloration) se faisant suivant le même protocole décrit par la technique de Grabar et Williams.

Des tests complémentaires en présence de sérums négatifs sont nécessaires.

b3 – Par E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) :

Ce test immuno-enzymatique permet de mettre en évidence et de quantifier une réaction immunologique spécifique constituée par l'union d'un Ag et l'Ac correspondant. Elle consiste à associer une réaction immunologique à une réaction enzymatique.

Une microplaque est sensibilisée avec l'Ag (LHT à **6µg/ml**) pendant **1h** à **37°C** puis une nuit à **+4°C**. Après une série de lavages, les sites non spécifiques sont saturés avec du PBS-lait écrémé à **5%** pendant **2h** à **37°C**.

Après une seconde série de lavages, une gamme de dilution croissante de sérum de patients hydatiques dilué au **1/100^{ème}** est préparée puis répartie. Suite à une incubation de **1h** à **37°C** et une nuit à **+4°C**, et un autre lavage, le conjugué (Anti-IgG humaine marquée à la peroxydase), dilué au **1/500^{ème}**, est réparti.

Après **1h** à **2h** d'incubation à **37°C** et un dernier lavage, la réaction immuno-enzymatique est révélée par l'addition du substrat chromogène soit **4mg** de DAB (Dinitroaminobenzène) dilué dans **10ml** de tampon tris **50mM-pH7,6** additionné de **10µl** de H₂O₂ à **30% (V/V)**. La réaction est arrêtée après à une incubation de **15mn** à l'obscurité, par addition de **50µl** d'HCl **5N** /puit.

La lecture de la densité optique est effectuée à **405nm** sur lecteur ELISA (Labysystems Multiscan) dans la demie heure qui suit. Le titre en Ac est établi comme étant l'inverse de la dilution maximale à laquelle la réaction immuno-enzymatique peut être détectée.

b4 – Par Immunoblot :

Cette technique permet d'identifier le nombre et la taille des fractions contenues dans un mélange antigénique reconnues par un Ac spécifique après immunoprécipitation, en combinant à la fois une électrophorèse, un électrotransfert et un immunoblot.

Les protéines du LHT et de PSC soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de **0,22µm**. L'électrotransfert sera réalisé pendant **1h30mn** à **400mA** et à **+4°C** dans un tampon de transfert glycine **150mM**, Tris-HCl **25mM** et méthanol **20%**. Il s'ensuit l'étape de l'immunoblot, où la membrane est d'abord saturée avec une solution de PBS-lait écrémé (**5%**) à température ambiante pendant **1h**.

Après une série de lavages, la membrane est incubée avec un sérum dilué au **1/100^{ème}** pendant **1h** à **37°C** puis une nuit à **+4°C**. Elle est ensuite lavée puis incubée avec le conjugué anti-IgG humaine lié à la peroxydase dilué au **1/500^{ème}** pendant **1h** à **37°C**.

Après un dernier lavage, la réaction est révélée par addition du substrat chromogène pendant **30 mn** à l'obscurité. La membrane est enfin rincée à l'eau distillée pour arrêter la réaction.

II – Identification des différentes fractions du liquide hydatique pulmonaire humain par gel filtration sur Séphadex G200 :

C'est une méthode de séparation des molécules en fonction de leur PM par effet de tamassage sur des billes poreuses. La séparation s'effectue dans un ordre décroissant des PM, avec une relation linéaire entre le V_e (volume d'éluion) et le Log du PM.

Un étalonnage préalable de la colonne est réalisé grâce à une série de marqueurs de PM (Bleu dextran, Albumine, Ovalbumine, Ribonucléase A et le Cytochrome C). La colonne équilibrée et étalonnée, est utilisée par la suite pour la filtration du LHP humain (**5ml, 100 mg/ml**). L'éluion commence avec un tampon Tris-HCl **0,1M**- NaCl **1M pH8**. Les éluas de la colonne sont recueillis à raison de **3,5 ml/tube** à un débit constant de **10 ml/cm²/h**.

La densité optique de chaque tube est ensuite lue à **280nm**. Le PM de chaque fraction (pic) est obtenu par extrapolation de la valeur des V_e sur la courbe étalon $V_e=f(\text{Log PM})$.

Enfin, les différentes fractions ainsi récupérées sont poolées, dialysées et concentrées. Elles sont ensuite testées pour la caractérisation de leur PM, leur contenance en résidus glucidiques, leur pouvoir antigénique selon les techniques décrites ci-dessus (SDS-PAGE dans les conditions non réductrices, Chromatographie d'affinité sur Con A-Ultrogel) et (IDD, IES, ELISA et IB) respectivement.

III – Mise en culture des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et inductions.**1 - Préparation des PBMC :**

C'est une séparation sur gradient de densité utilisant le Ficoll hypaque d'une densité égale à **1,077**. Après une centrifugation, les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles passent à travers le Ficoll et forment un agrégat au fond du tube, tandis que les cellules mononuclées (PBMC) restent à l'interface du milieu Ficoll.

Un volume égal de sang (**V**) et de milieu RPMI-1640 à **10%** de SVF (**V**) est mélangé puis déposé sur le Ficoll hypaque. Après une centrifugation à **2800rpm** pendant **15mn**, les cellules mononuclées sont récupérées par aspiration de l'interface puis lavées deux fois aux PBS **0,1M-pH7,2** stérile pendant **10mn** à **1500rpm**. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans un volume minimum de RPMI-1640 à **10%** de SVF.

Un test de viabilité et une numération cellulaire sont réalisés systématiquement sur lame Malassez avec du bleu de Trypan à **0,2%**. La densité cellulaire est alors ajustée par dilution à **10⁶ cellules/ml**, concentration pour laquelle nous obtenons une induction optimale des cytokines et du monoxyde d'azote (Touil-Boukoffa, 1998).

Les PBMC des sujets sains et malades aux stades pré et post- opératoire sont mises en culture dans du RPMI-1640 à **10%** de SVF dans des microplaques de 96 puits à fond plat. En prenant soin de laisser un témoin pour chaque échantillon, les cellules sont stimulées avec les différents effecteurs. Elles sont alors incubées à **37°C** pendant **20h** en atmosphère humide et à **5%** de CO₂. Une observation de l'état des cellules avant et après stimulation est réalisée.

2 - Etude de l'effet de l'antigène 5 et de la P 50 purifiés du liquide hydatique et/ou de l'IFN- γ sur la production de l'IL-12, de l'IL-8 et du NO sur culture de PBMC.

Les PBMC sont stimulées par l'addition de **10 μ g/ml** de F5 et/ou de deux titres d'IFN- γ (**10UI/ml** et **100UI/ml**). Les mêmes stimulations sont réalisées simultanément pour la deuxième fraction purifiée la P50.

Après incubation, les différentes préparations sont centrifugées à **10.000rpm** pendant **15 mn** puis conservées à **-45°C** en vue de dosages ultérieurs des deux cytokines (l'IL-8 et l'IL-12) et du monoxyde d'azote.

3 - Etude de l'effet de concentrations croissantes de LHT et de PSC sur la production de NO. Impact sur la viabilité des cellules et des PSC.

Les PBMC sont mises en culture en présence de concentrations croissantes de liquide hydatique pulmonaire humain (**0- 5- 10- 15- 20- 30- 40** et **50 μ g/ml**) et de protoscolex (**0- 100-200- 400** et **800 PSC/ml**).

Après une centrifugation à **1500rpm** pendant **5mn**, des tests de viabilité au bleu de Trypan à **0,2%** et à l'éosine à **1%** sont effectués afin d'estimer respectivement le taux de viabilité des PBMC et des PSC.

Les surnageants de culture sont conservés à **-45°C** pour un dosage ultérieur des nitrites totaux.

4 - Etude de l'effet de l'IFN- γ sur la production de NO sur culture de PBMC. Impact sur la viabilité des PSC.

Les PBMC sont mises en culture en présence ou en absence de **100UI/ml** d'IFN- γ et/ou de PSC (**200 PSC/ml**). Après une centrifugation à **1500rpm** pendant **10mn**, un test de viabilité des PSC à l'éosine (**1%**) est réalisé.

Les surnageants de culture sont conservés à **-45°C** pour un dosage ultérieur des nitrites totaux.

IV – Dosage *in vivo* et *in vitro* de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO.

La détermination quantitative du taux d'IL-12, d'IL-8 et de NO est effectuée *in vivo*, dans les sérums de sujets sains et de sujets hydatiques aux stades pré et post- opératoire et dans les liquides hydatiques humains. Le dosage *in vitro* sera réalisé dans les surnageants de culture des PBMC.

1 - Dosage des cytokines.

Le dosage est réalisé par la méthode ELISA sandwich selon les recommandations de Coulter, Beckman. Dans les puits d'une microplaque de microtitration recouverte d'un premier anticorps monoclonale anti-cytokine sont incubés les différents échantillons à doser et les standards. Il s'en suit l'incubation d'un deuxième anticorps biotinylé puis le conjugué streptavidine-HRP2. L'activité enzymatique est révélée par l'addition du substrat chromogène (le TMB). La réaction

est enfin arrêtée et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de cytokine présente dans l'échantillon ou le standard à doser.

Elle est quantifiée par la lecture des DO à **405nm** dans un lecteur ELISA (Labsystem). L'extrapolation des valeurs de DO des échantillons se fait grâce à une courbe étalon DO=f [standard].

2 - Dosage du monoxyde d'azote.

Le dosage de la production de NO est réalisé par la quantification de deux métabolites physiologiquement stables du NO, les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-). Après réduction des nitrates en nitrites par une souche de *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062) nitrate réductase, les nitrites totaux sont quantifiés par un dosage colorimétrique à **543nm** par l'addition du réactif de Griess modifié. Ce dernier donne une coloration rose plus ou moins intense selon la concentration en nitrites.

50µl du milieu à analyser sont mélangés avec **25µl** de la suspension bactérienne et **25µl** de tampon PBS **pH7,2**. Après une incubation à **37°C** pendant **90mn**, la préparation est centrifugée pendant **2mn** à **1200rpm**. Les surnageants sont par la suite mélangés **V/V** avec les réactifs du Griess (**50µl** de Naphthyl-éthylène diamine dichloride à **0,5%** dans du **HCl à 20%** + **50µl** de sulfanilamide à **5%** dans du **HCl à 20%**) et **800µl** d'eau distillée. Après **20mn** d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture des DO est effectuée au spectrophotomètre à **543nm**.

La concentration en nitrites totaux des échantillons est déterminée par extrapolation de la valeur des DO sur la courbe étalon DO=f [NaNO_2^-] établie préalablement à partir d'une gamme de NaNO_2^- allant de **0** à **300µM**.

IIV – Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur :

1 - L'hydatide :

Cinq kystes hydatiques de taille différentes prélevés au niveau du muscle d'un patient, sont mis en survie dans du DMEM à **10%** de SVF en présence de concentrations croissantes de NaNO_2^- (**0- 1- 5- 10- 20- 30- 40- 50- 100- 200- 300- 400** et **500µM**) et dans une atmosphère humide à **5%** de CO_2 et à **37°C** pendant **3 jours**. Ces kystes sont contrôlés, avant la mise en culture, sous microscope inversé. Ne sont retenus que les kystes en bon état qui présentent une membrane intacte et un liquide hydatique sous tension.

Les cultures sont régulièrement observées au microscope à phase inversée sous différents grossissements et ce pour mieux apprécier les changements qui s'opèrent sur la structure et la morphologie de l'hydatide. Des prises de photographie sont réalisées aux différents temps d'observation et le nombre de kystes viables est déterminé à chaque étape. Un dosage des nitrites intra-kystiques est effectué après **24h** d'incubation.

2 - Le tissu pulmonaire bovin (étude histologique) :

Des fragments de tissus pulmonaires fraîchement obtenus à partir de bovins sains (de **1cm²** et **2mm** d'épaisseur) sont mis en survie dans des microplaques 24 puits contenant du DMEM à **10%** de SVF en présence de concentrations croissantes de NaNO_2^- (**0- 50- 100- 200- 300** et **400µM**) pendant **24h** à **37°C** dans une atmosphère humide à **5%** de CO_2 .

Les cultures sont par la suite destinées à l'étude histologique après une fixation des fragments de tissus dans du formol tamponné à **10%**. Cette étude se déroule en plusieurs étapes :

Les fragments de tissus sont d'abord déshydratés par passage dans une succession de bains d'alcool de degré croissant (**70°-90°** et **100°**) suivi de trois bains de toluène. Ils sont ensuite plongés dans un bain intermédiaire constitué de toluène et de paraffine (**V/V**) puis deux bains de paraffine. Après la préparation des blocs, des coupes de **7µm** d'épaisseur sont réalisées puis étalées à chaud sur des lames de verre contenant de l'eau gélatinée à **0,4%** et placées à **37°C**. Les lames subissent par la suite un déparaffinage par la chaleur et deux bains de toluène suivi d'une hydratation dans des bains d'alcool de degré décroissant. La coloration associe un colorant du noyau : l'hématoxyline et un colorant du cytoplasme : l'éosine. Les coupes colorées, sont déshydratées puis plongées dans deux bains de toluène. Elles sont enfin montées entre lame et lamelle à l'aide du baume de Canada puis placées à **37°C**. L'observation des coupes histologiques a été effectuée au microscope photonique (Zeiss).

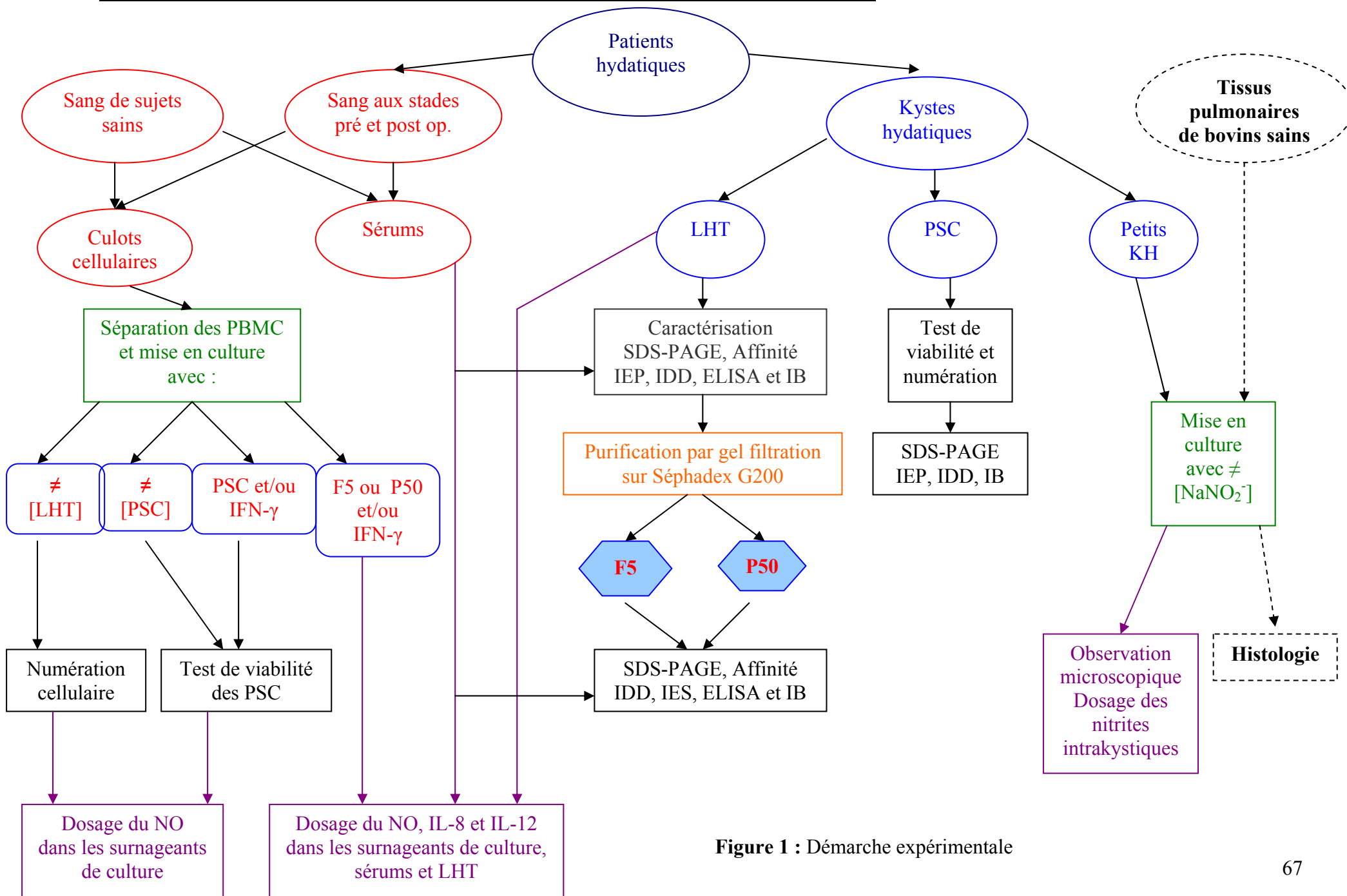


Figure 1 : Démarche expérimentale

RESULTATS ET DISCUSSION

I - PREPARATION DE L'ANTIGENE SOLUBLE TOTAL: LE LIQUIDE HYDATIQUE :

Avant de procéder à la séparation des fractions antigéniques du liquide hydatique, une caractérisation biochimique (par un dosage de Bradford, une SDS-PAGE et une chromatographie d'affinité) et antigénique (par IEP, IDD, ELISA et IB) sont effectuées sur les différents liquides recueillis afin de sélectionner celui exprimant le plus haut pouvoir antigénique.

1 - Caractérisation biochimique des liquides hydatiques :

Les résultats obtenus par le **dosage de Bradford** montrent des concentrations protéiques différentes selon le type de liquides hydatiques étudiés. Elles sont de **0.33 ± 0.11 mg/ml** et de **0.17 ± 0.07 mg/ml** pour les liquides hydatiques hépatiques (**n=12**) et pulmonaires (**n=20**) respectivement. D'après ces résultats, il semblerait que les liquides hydatiques hépatiques soient plus riches en protéines. Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs (Hamrioui, 1986 ; Vidor *et al.*, 1986). En effet, ces derniers estiment que les kystes hépatiques présentent une perméabilité plus importante et par conséquent permettent une diffusion plus accrue des protéines de l'hôte à l'intérieur des kystes (Coltorti, 1986 ; Hustead et Williams, 1977 ; D'Amelio *et al.*, 1985). La variabilité des valeurs observées au sein même d'une même catégorie de liquide hydatique (avec un intervalle allant de **0.04 mg/ml** à **0.27 mg/ml** pour les liquides pulmonaires) peut être expliquée par une variabilité du degré de fertilité pour les kystes considérés.

Les deux types de liquides hydatiques (hépatiques et pulmonaires) ont été soumis à une **analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant**. Le profil de migration obtenu révèle la présence de **18** bandes protéiques de PM variant entre **12 kDa** et **97 kDa**. Deux bandes majeures se distinguent. Elles sont représentées par les protéines de poids moléculaire égale à **67 kDa** et **12 kDa** (**Fig. 1**). Ces dernières correspondent probablement aux antigènes majeurs de l'hydatide : la F5 (Hamrioui, 1986, Touil-Boukoffa, 1998) et la F4 (Mezioug *et al.*, 2004). Nous avons noté avec intérêt la présence fréquente d'une protéine de **50 kDa** dans tous les échantillons testés. Cette observation a été également rapportée par plusieurs auteurs (Di Felice *et al.*, 1986 ; Lightowlers *et al.*, 1989 ; Park *et al.*, 2000 ; Taherkhani et Rogan, 2000 ; Vargas *et al.*, 2001). A la différence, nous avons utilisé un liquide hydatique humain.

Les deux types de liquides hydatiques sont également soumis à **une chromatographie d'affinité utilisant comme ligand la Concanavaline A**, sachant la haute affinité exprimée par les résidus glycosylés envers cette lectine. Le profil chromatographique obtenu montre la présence dans les deux cas, de **5 pics** (dont 3 majeurs et 2 d'amplitude non significative) après élution avec le tampon PB 0,02 M, NaCl 1 M, pH 7,4-Saccharose 0,1 M. Après lavage, un seul pic est obtenu pour les deux échantillons (**Fig. 2 et 3**). Ces résultats indiquent la présence d'au moins **5** glycoprotéines au niveau du liquide hydatique représenté notamment par l'antigène A et B (Capron *et al.*, 1967, Oriol *et al.*, 1971 ; Oriol et Oriol, 1975 ; Leggatt *et al.*, 1992 ; Poretti *et al.*, 1999 ; Siracusano *et al.*, 2002)

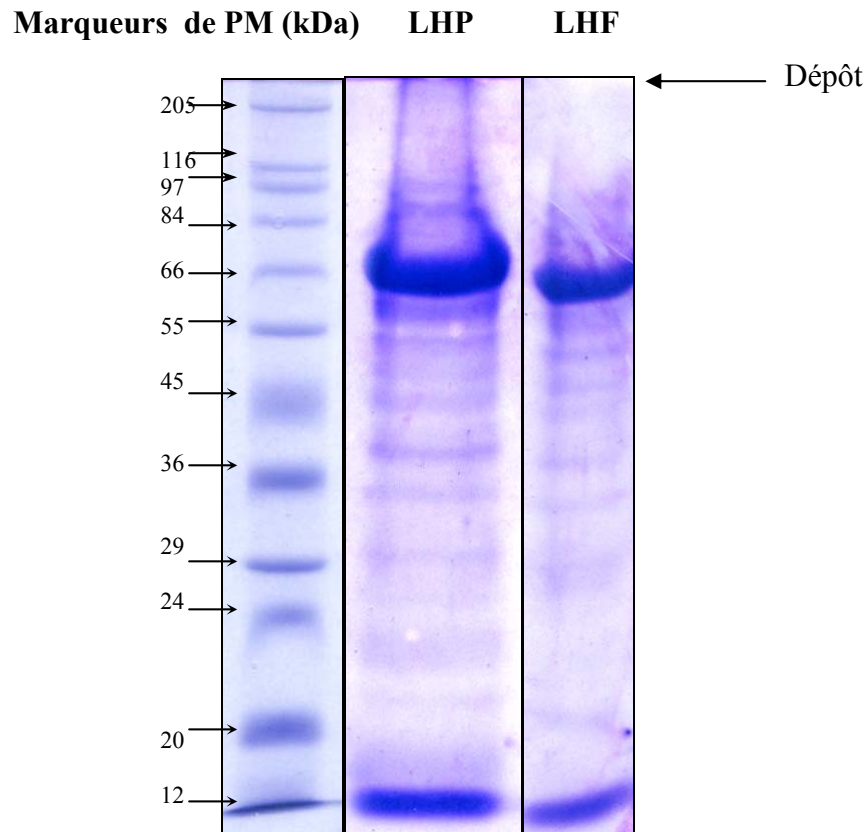


Figure 1 : Caractérisation protéique des protéines des liquides hydatiques du poumon et du foie humains par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et en milieu dénaturant.

LHP : Liquide hydatique pulmonaire, **LHF** : Liquide hydatique hépatique.

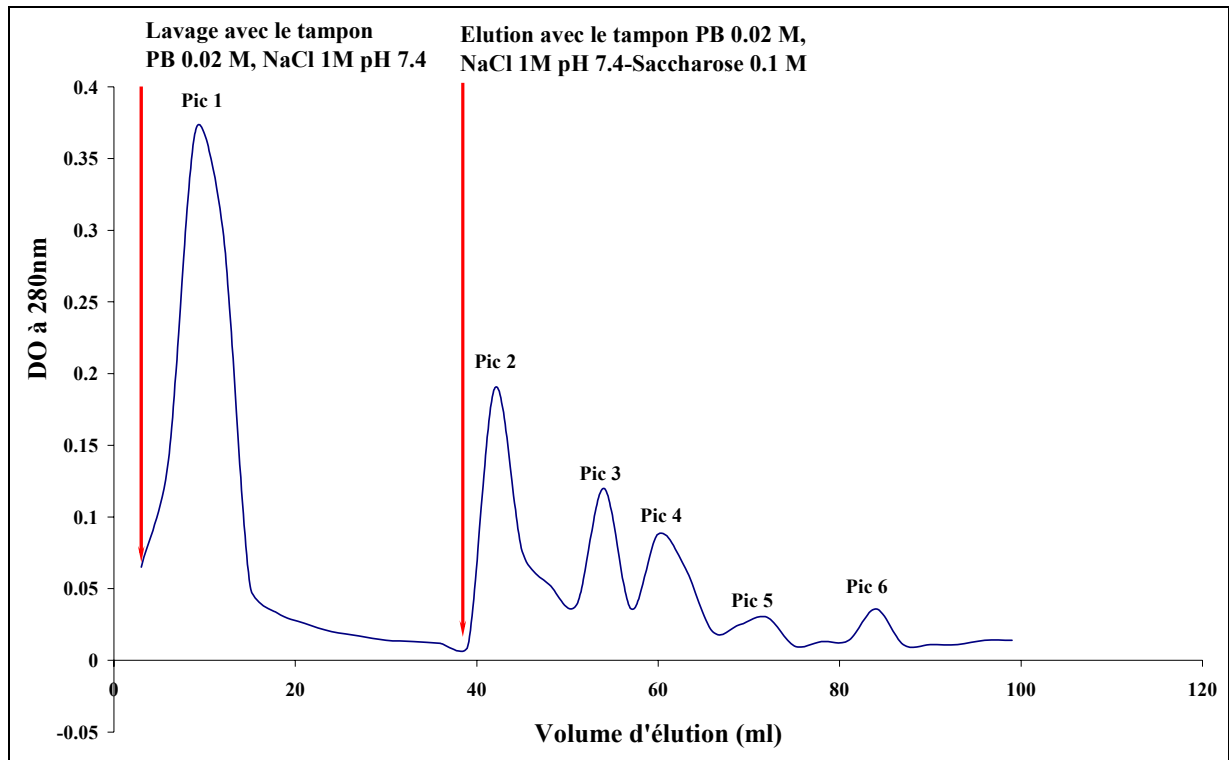


Figure 2 : Profil chromatographique du liquide hydatique du poumon humain sur Concanavaline A-Ultrogel. Débit 18 ml/cm²/h. Nous retrouvons un pic (pic 1) après lavage et 5 pics dont 3 majeurs (pics 2, 3 et 4) après élution.

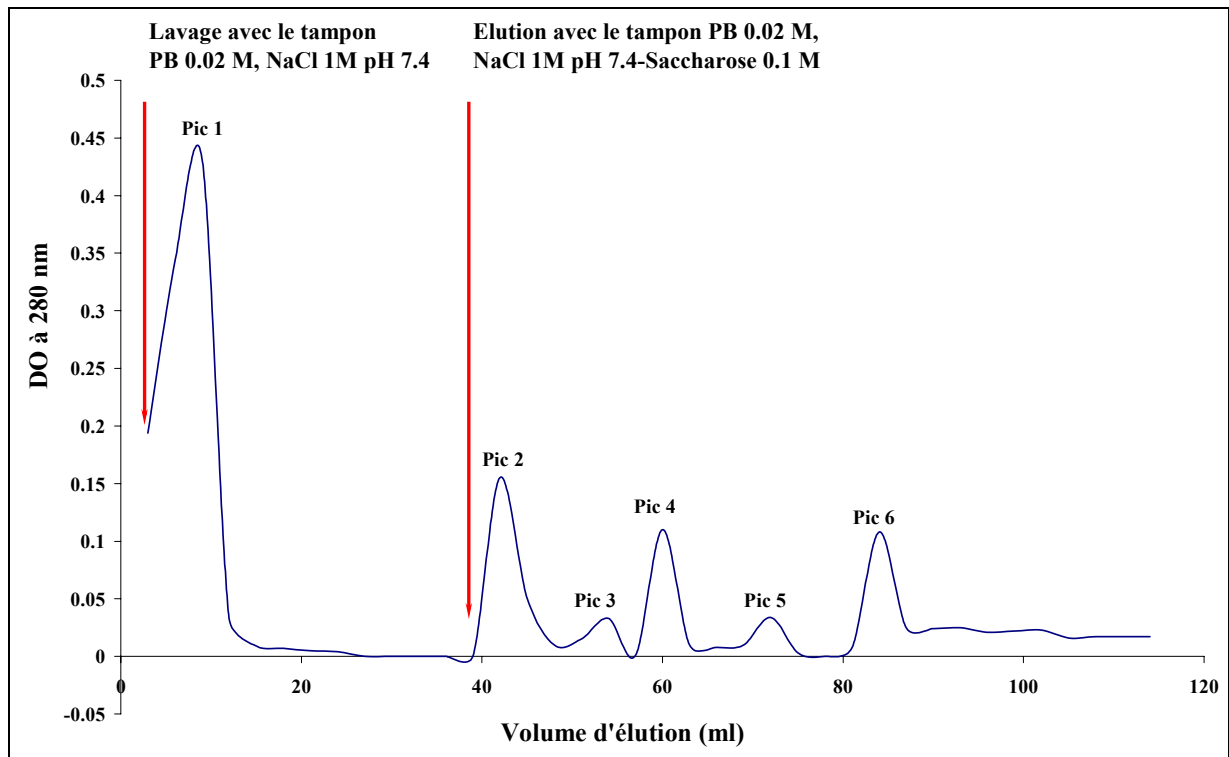


Figure 3 : Profil chromatographique du liquide hydatique du foie humain sur Concanavaline A-Ultrogel. Débit 18 ml/cm²/h. Nous retrouvons un pic (pic 1) après lavage et 5 pics dont 3 majeurs (pics 2, 4 et 6) après élution.

2 - Caractérisation antigénique des liquides hydatiques :

L'évaluation de l'antigénicité des différents liquides hydatiques (pulmonaires et hépatiques) en **immunoélectrophorèse** contre les sérums de sujets atteints d'hydatidose confirmée par la chirurgie révèle la présence de **5 arcs** de précipitation dans les deux cas. Toutefois, l'intensité de ces arcs se révèle plus importante au niveau de l'échantillon hépatique (**Fig. 4A**). Ces résultats seraient liés à l'hypothèse émise par Cesbron et *al* en 1986 selon laquelle les kystes hépatiques fourniraient des antigènes de meilleure qualité antigénique. Le même résultat est observé par la méthode d'Ouchterlony (**Fig. 4B**). En effet, **3 à 5 arcs** de précipitation sont obtenus pour les liquides hydatiques pulmonaires et hépatiques. La différence notée au niveau du même type de liquide hydatique serait le résultat d'une variabilité du degré de fertilité des différents kystes. Signalons que les kystes peu ou non fertiles ne donnent aucun arc de précipitation en IEP et en IDD. Nous avons également observé une réaction de forte identité entre les différents liquides hydatiques testés attestant de la présence d'au moins **5 épitopes communs**.

Les titres relatifs aux différents liquides hydatiques totaux testés en **ELISA**, varient en fonction de la localisation du kyste hydatique. En effet, les valeurs les plus élevées s'observent avec les localisations hépatiques (**409600 et 25600**) (**Fig. 5**). Ces données sont dépendantes de la qualité antigénique en relation avec la localisation du kyste, le degré de fertilité ainsi qu'à d'autres facteurs (taille, âge, ...).

En **immunoblot**, l'apparition de plusieurs bandes traduit la présence d'une mosaïque antigénique (**15 bandes**) de PM variant entre **12 kDa** et **100 kDa**. Cette dernière est représentée notamment par les antigènes majeurs du liquide hydatique : l'antigène 5 (de **67 kDa**) et la fraction 4 (de **12 kDa**). Nous avons également observé la présence de la protéine de **50 kDa** dans les différents échantillons testés. Cette dernière exprime une immunoréactivité à l'égard des sérums de patients hydatiques. Cette observation a été également rapportée par plusieurs auteurs (Kong et *al.*, 1989 ; Gadea et *al.*, 2000). Notons que le même profil de migration est obtenu pour les deux types de liquides hydatiques : hépatique et pulmonaire, avec cependant des intensités de coloration légèrement différentes (**Fig. 6**). Cette observation atteste de la présence des mêmes entités antigéniques dans les différents échantillons de liquide hydatique à des concentrations différentes selon la fertilité du kyste.

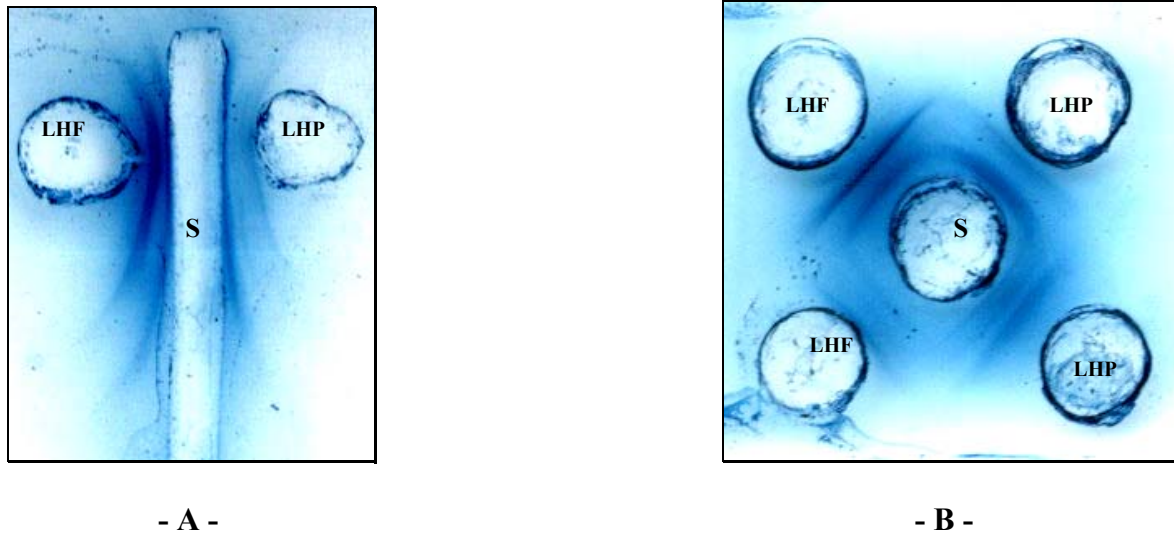


Figure 4 : Etude de l'antigénécité des différents liquides hydatiques humains (pulmonaires et hépatiques) par Immunoélectrophorèse (A) et Immunodiffusion double (B).

LHP : Liquide hydatique pulmonaire, LHF: Liquide hydatique du foie (ces liquides présentent différents degrés de fertilité), S : Sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée par chirurgie.

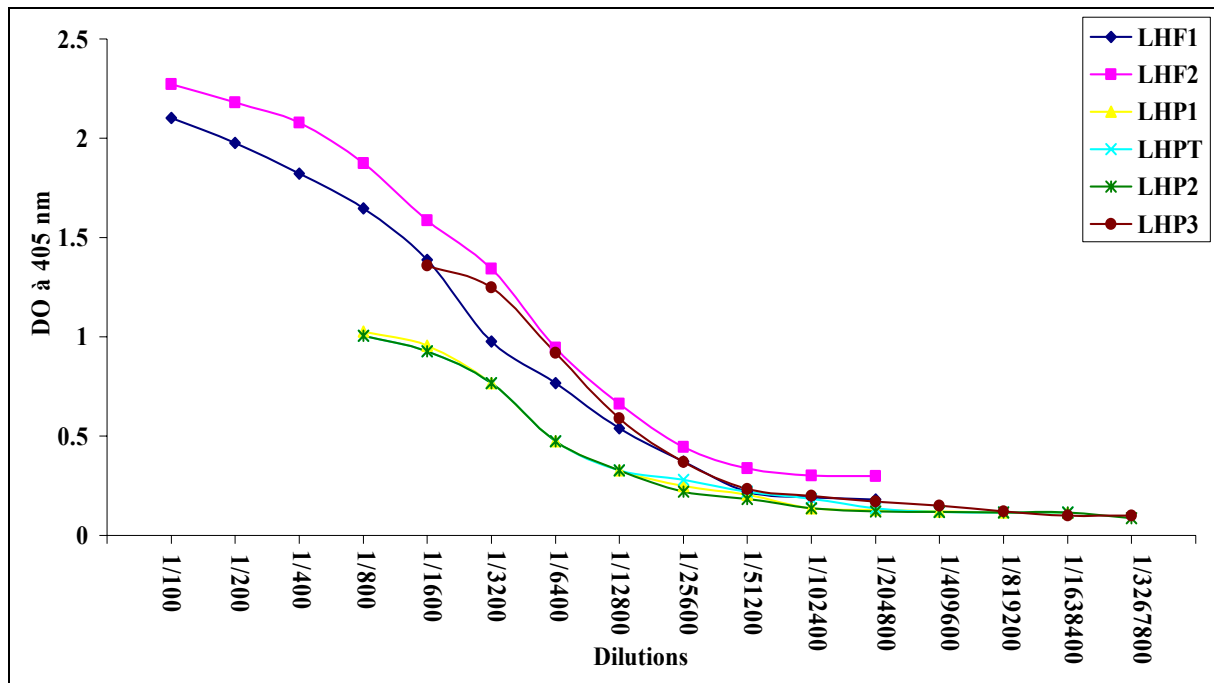


Figure 5 : Résultats du test ELISA portant sur 6 différents liquides hydatiques du foie et du poumon humain. Test réalisé avec le sérum d'un patient atteint d'hydatidose hépatique (titre=128000)

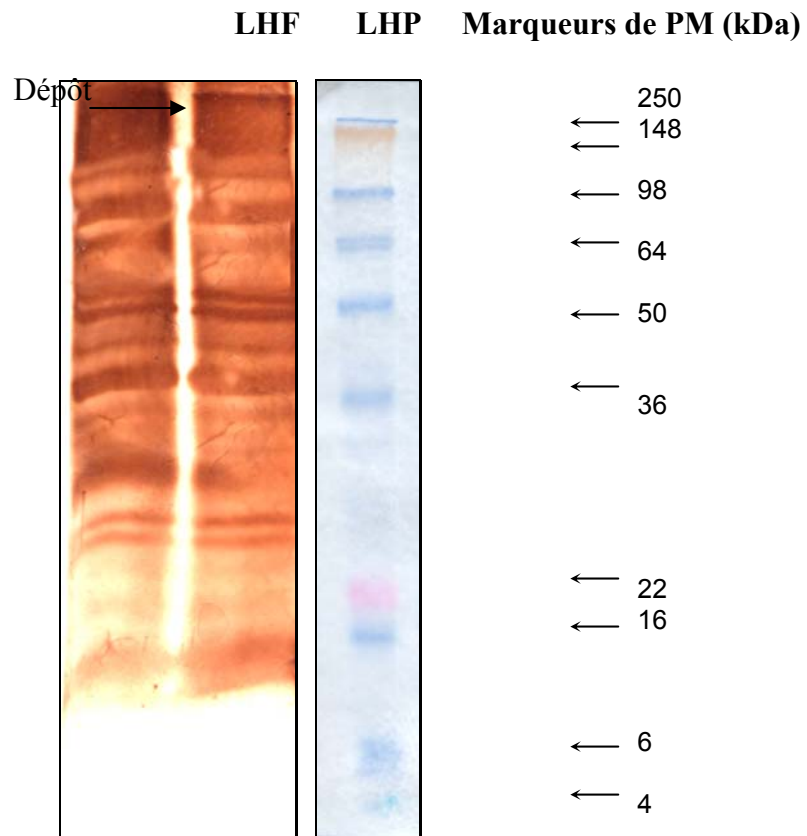


Figure 6 : Etude de l'immuno-réactivité des liquides hydatiques pulmonaires et hépatiques à l'égard du sérum de patients atteints d'hydatidose par Immunoblot.

LHP : Liquide hydatique pulmonaire, **LHF** : Liquide hydatique hépatique.

II - PREPARATION DE DEUX FRACTIONS ANTIGENIQUES DU LIQUIDE HYDATIQUE : L'ANTIGENE 5 (F5) ET LA PROTEINE DE 50 kDa (P50) :

La préparation des fractions antigéniques pour l'étude des systèmes d'inductions sur culture de PBMC est réalisée à partir d'un liquide hydatique pulmonaire. Ce dernier est prélevé chez l'homme à partir d'un kyste fertile, ni fissuré et ni surinfecté. Il présente une concentration protéique de **270 µg/ml**. Cet échantillon a été sélectionné sur la base de sa concentration, du volume disponible, mais essentiellement sur la base de son degré d'antigénicité. En effet, il présente **5** arcs de précipitation et un titre de **102400**. Ces résultats attestent de son haut pouvoir antigénique.

Le profil de la filtration moléculaire sur gel Séphadex G200 de l'antigène total en tampon Tris-HCl 0.1M- NaCl 1M pH8, indique une séparation en **4** pics majeurs bien distincts (**Fig. 7**). Ces derniers sont précédés par un premier pic de très faible amplitude correspondant probablement au pic d'exclusion. Chacun de ces pics correspond à une fraction protéique du liquide hydatique dont le poids moléculaire a été évalué grâce à une courbe d'étalonnage réalisée précédemment avec des protéines marqueurs de PM. Les résultats obtenus montrent que les pics 2 et 3 ont un PM de **67 kDa** et **50 kDa** respectivement.

Sur la base des travaux effectués antérieurement (Bout et al, 1974 ; Yarzarbal et al., 1977 ; Hamrioui, 1986 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et al, 2000) qui définissent le poids moléculaire relatif à la fraction 5 (F5) entre 60 à 68 kDa, nous pouvons considérer que le pic 2 correspond à la fraction 5.

Nous nous sommes également intéressés dans notre étude à la purification d'une autre fraction du liquide hydatique, douée d'une immuno-réactivité certaine envers les sérums de patients atteints d'hydatidose. En effet, la présence et l'immunoréactivité d'une protéine répondant à un poids moléculaire de 50 kDa a déjà été établie précédemment par SDS-PAGE et Immunoblot. Cette fraction est localisée au niveau du pic 3 du profil chromatographique. Elle est considérée d'après plusieurs auteurs comme étant une sous unité de l'antigène A, au même titre que la Fraction 5 (F5) (Di Felice et al., 1977 ; Lightowler et al., 1989 ; Lightowler et Gosttein, 1995 ; Poretti et al., 1999 ; Gonzalez-Sapienza et al., 2000 ; Siracusano et al., 2002 ; Zhang et al., 2003).

Les pics 2 et 3 ainsi obtenus, sont poolés, dialysés puis concentrés. Ils sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dans les conditions non réductrices) pour la détermination de leur PM et par immunodiffusion double, électrosynérèse, ELISA et immunoblot pour la détermination de leur degré d'antigénicité.

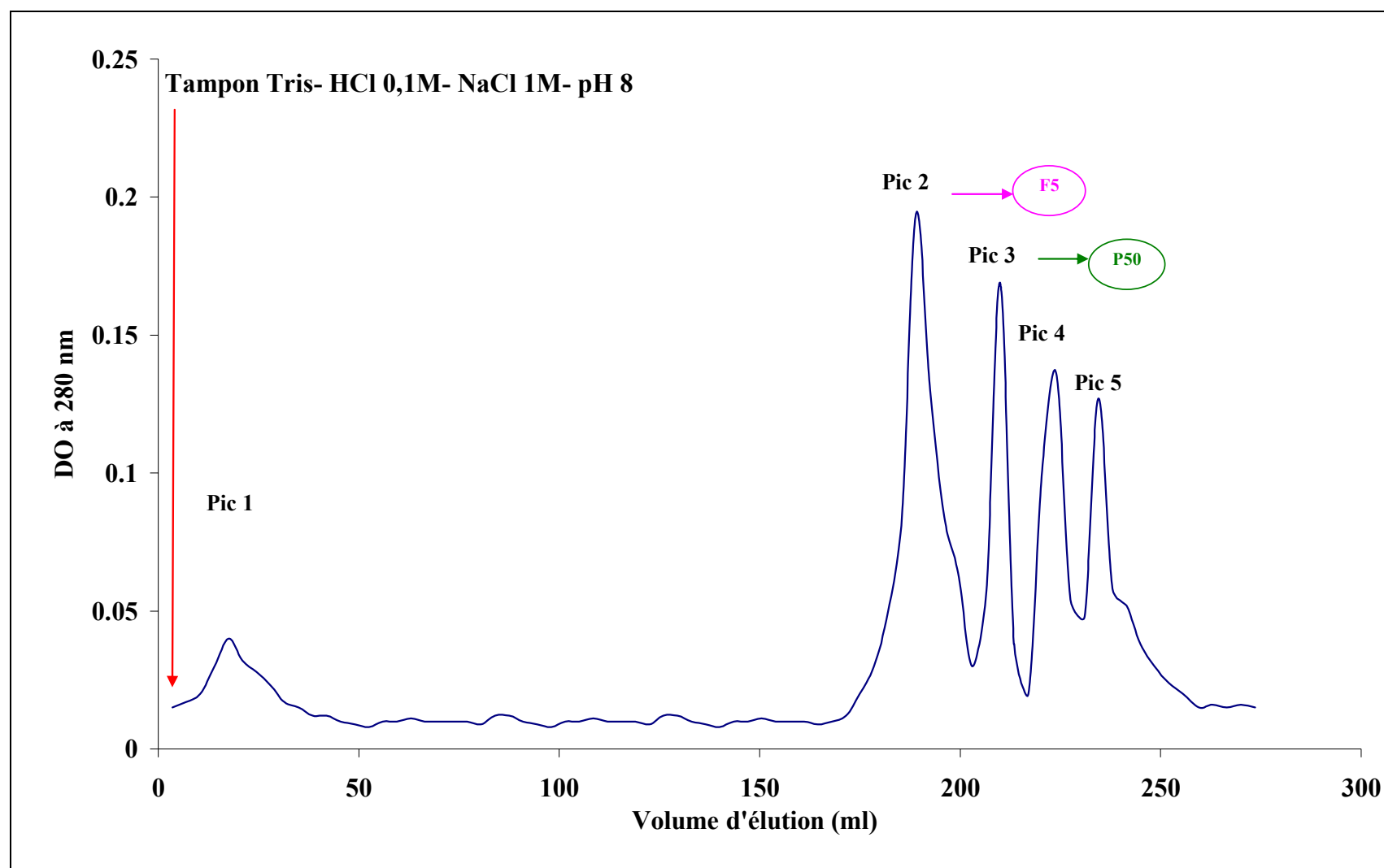


Figure 7 : Profil chromatographique de l'antigène hydatique pulmonaire humain total sur Séphadex G200. Tampon d'élution: Tris-HCl 0.1 M. NaCl 1 M. pH 8. Débit 10 ml/cm²/h.

1 - Caractérisation biochimique des deux fractions sélectionnées :

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et dans les conditions non réductrices, la migration des deux fractions sélectionnées révèle l'apparition d'une bande proche de **66 kDa** pour la **F5** et une autre proche de **50 kDa** pour la **P50** (**Fig. 8**). Ce résultat confirme le poids moléculaire estimé par l'exclusion moléculaire. De plus, l'unicité des bandes obtenues renseigne sur l'homogénéité des fractions.

Les deux fractions F5 et P50 sont soumises à une **chromatographie d'affinité** utilisant comme ligand la Concanavaleine A. Le profil chromatographique obtenu montre la présence dans les deux cas, d'un seul pic majeur après élution avec le tampon PB 0,02M, NaCl 1M, pH7,4- Saccharose 0,1M. Après lavage, deux pics d'amplitude non significative sont obtenus pour la F5 (**Fig. 9**) (Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et *al.*, 2000a) et un seul pour la P50 (**Fig. 10**). Ces résultats démontrent d'une part, que les deux fractions ont été purifiées et d'autre part, qu'elles sont de nature glycoprotéique. Nos résultats sont conformes à la notion selon laquelle l'antigène A, formé de deux sous-unités de 68 kDa et 50 kDa serait de nature glycoprotéique.

2 - Caractérisation antigénique de la F5 et de la P50 :

Les résultats obtenus en **Immunodiffusion double** contre les sérums de patients hydatiques, montrent la présence d'**un seul** arc de précipitation pour chacune des deux fractions : la F5 et la P50. Cependant, l'intensité de l'arc se révèle plus importante pour la F5 (**Fig.11A**). Le même résultat est observé avec l'électrosynérèse (**Fig. 11B**). Nos résultats attestent de la présence d'au moins un déterminant antigénique unique pour chacune des deux fractions antigéniques.

Le titre obtenu en **ELISA** relative aux complexes sérums-F5 (**51200**) est supérieur à celui observé pour la P50 (**25600**). Ces résultats confirment ceux obtenus pour les deux fractions en immunodiffusion double et en électrosynérèse. Toutefois, ces titres demeurent en deçà de celui enregistré pour le liquide hydatique total (**204800**) (**Fig. 12**).

Selon nos résultats, la différence notée relative à l'intensité des arcs de précipitation ainsi qu'à la valeur des titres en anticorps, laisse suggérer une différence dans le degré du pouvoir antigénique exprimé par les deux antigènes du liquide hydatique. En effet, la fraction 5 semble être plus antigénique que la P50. De plus, la différence relative au degré d'antigénicité observée entre l'antigène total et les fractions purifiées serait associée à la multiplicité des épitopes antigéniques présents dans le liquide hydatique. Cette mosaïque antigénique a été déjà mise en évidence par les techniques classiques d'immuno-précipitation, par immunoblot et par plusieurs équipes (Capron et *al.*, 1967, Oriol et *al.*, 1971, Siracusano et *al.*, 2002).

L'**immunoblot** a révélé l'apparition d'une **seule** bande de **67 kDa** et de **50 kDa** pour la F5 et la P50 respectivement (**Fig. 13**). Ce résultat vient conforter nos observations relatives au poids moléculaire trouvé par l'exclusion moléculaire et la SDS-PAGE. Il confirme également l'immunoréactivité testée par les techniques classiques d'immuno-précipitation (IDD et IES) et par ELISA.

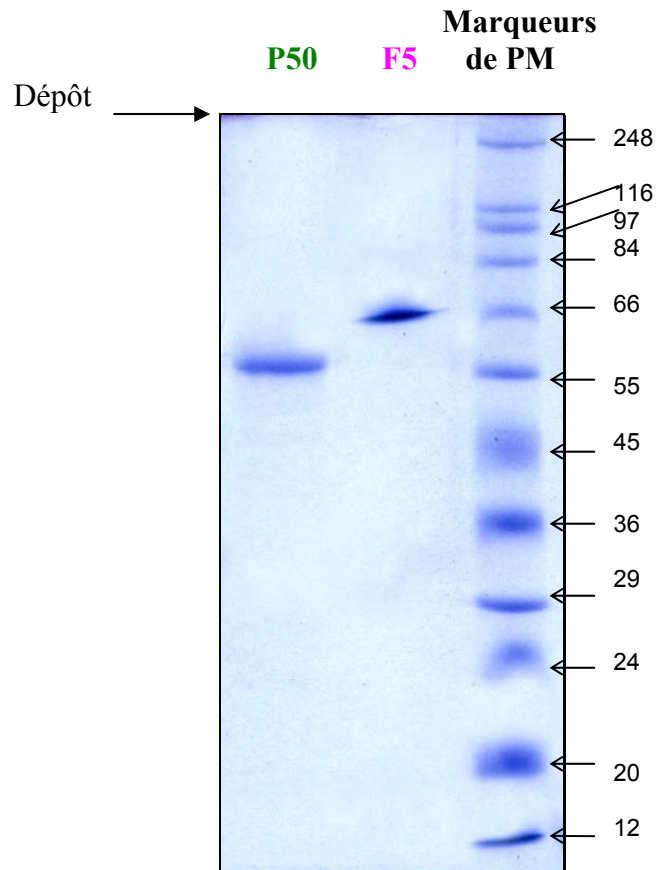


Figure 8 : Caractérisation protéique des deux fractions isolées par filtration moléculaire du liquide hydatique du poumon humain par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et en milieu non dénaturant.

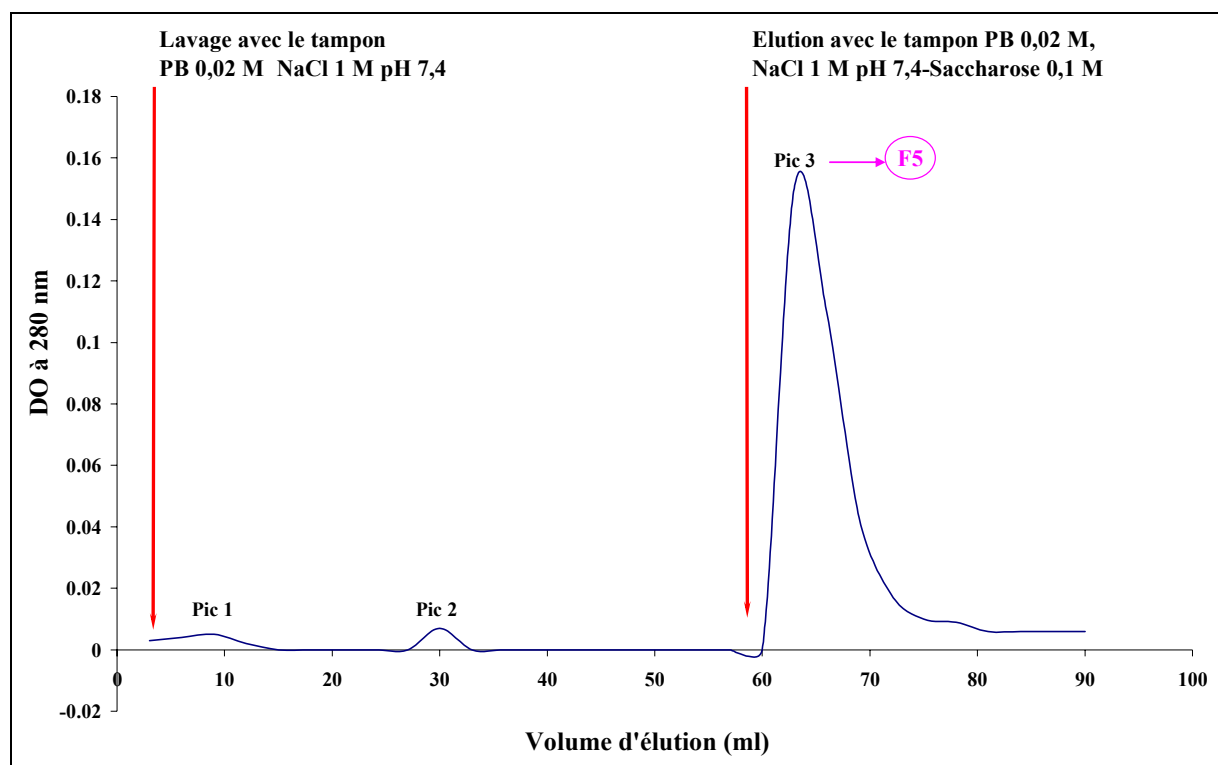


Figure 9 : Profil chromatographique de la Fraction 5 sur ConA-Ultrogel. Débit 18 ml/cm²/h. Nous retrouvons un seul pic majeur après élution alors que deux pics d'amplitude non significative sont obtenus après lavage.

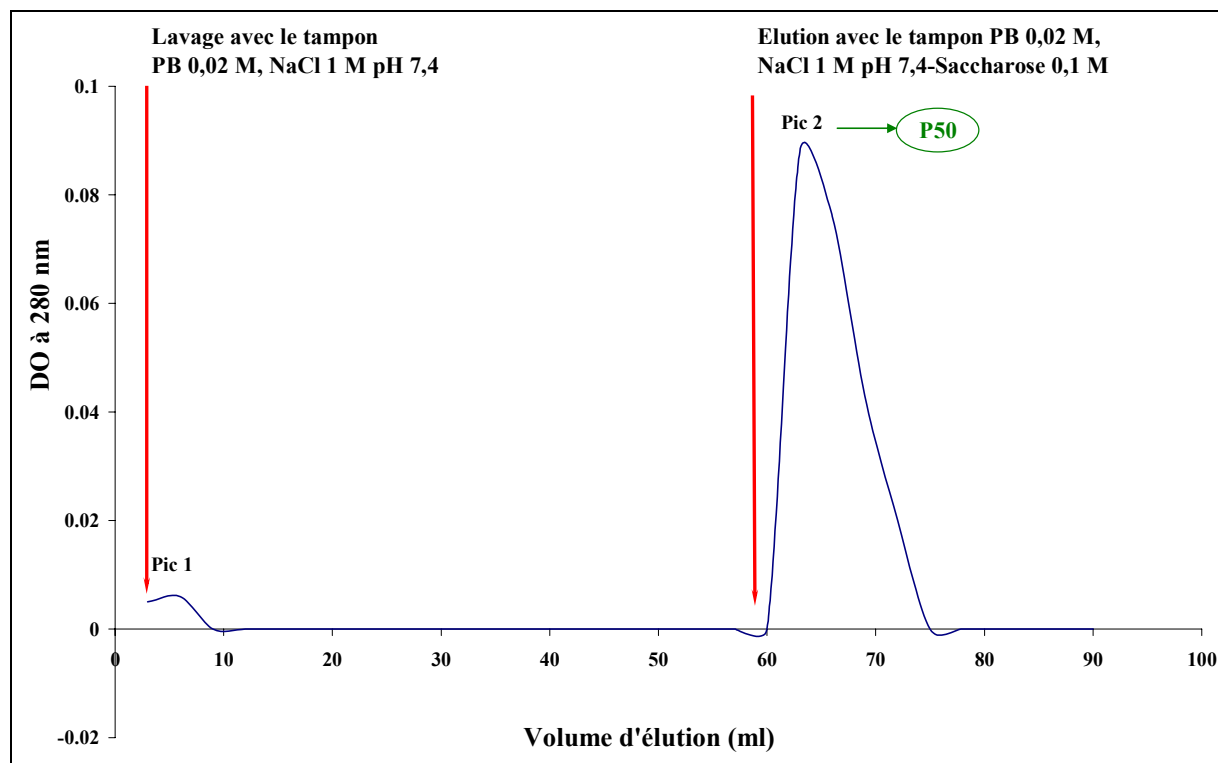


Figure 10 : Profil chromatographique de la Fraction P50 sur ConA-Ultrogel. Débit 18 ml/cm²/h. Nous retrouvons un seul pic majeur après élution et un autre d'amplitude non significative après lavage.

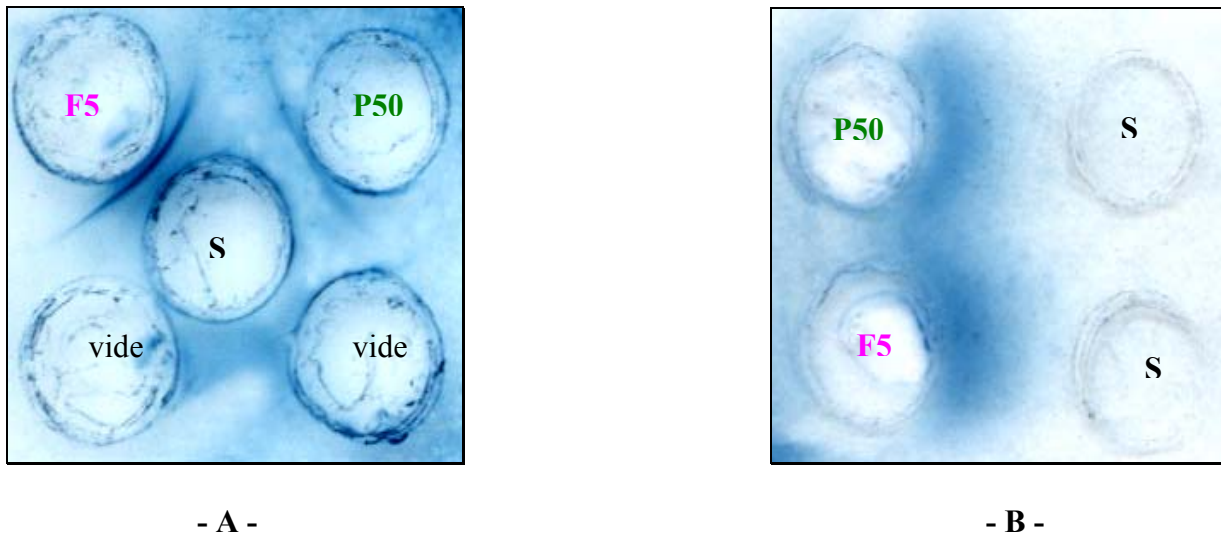


Figure 11 : Etude de l'antigénicité des deux fractions protéiques F5 et P50 par Immunodiffusion double (A) et électrosynérèse (B).

S : Sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée par chirurgie.

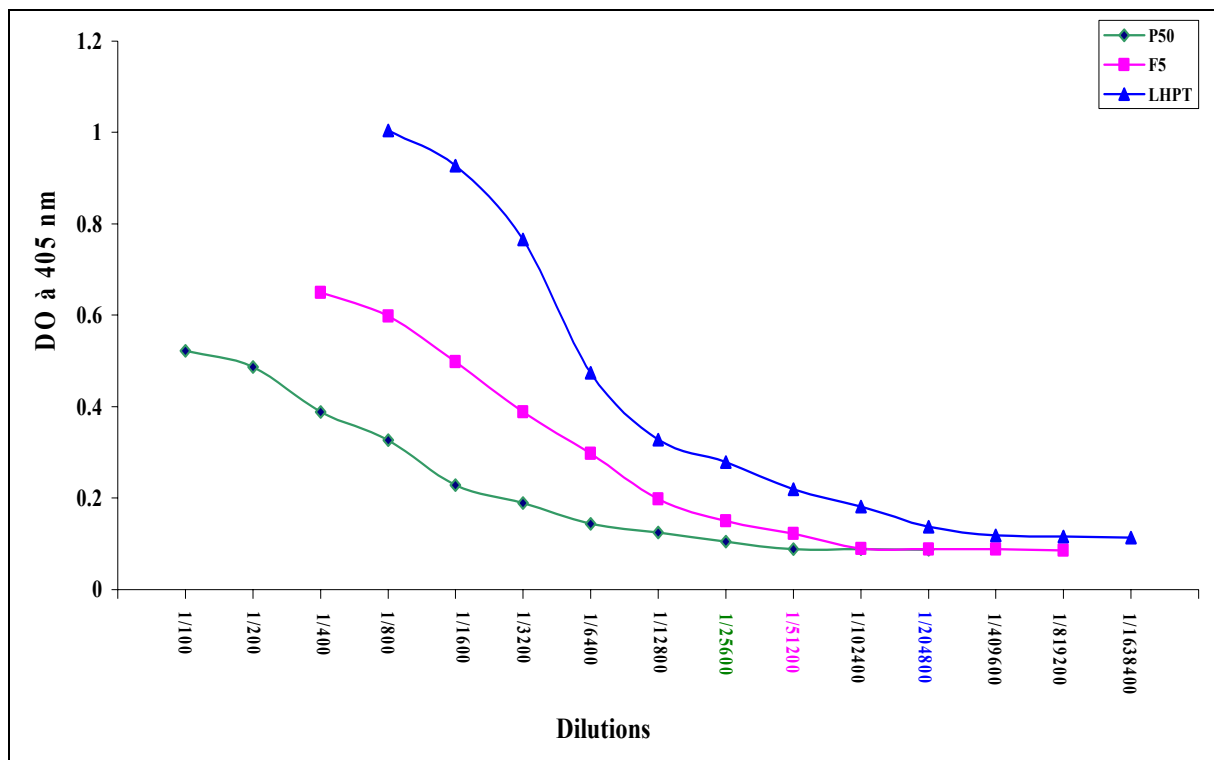


Figure 12 : Résultats du test ELISA effectué sur la P50, la F5 et le liquide hydatique pulmonaire total (LHPT). Test réalisé avec le sérum d'un patient atteint d'hydatidose hépatique (titre=128000).

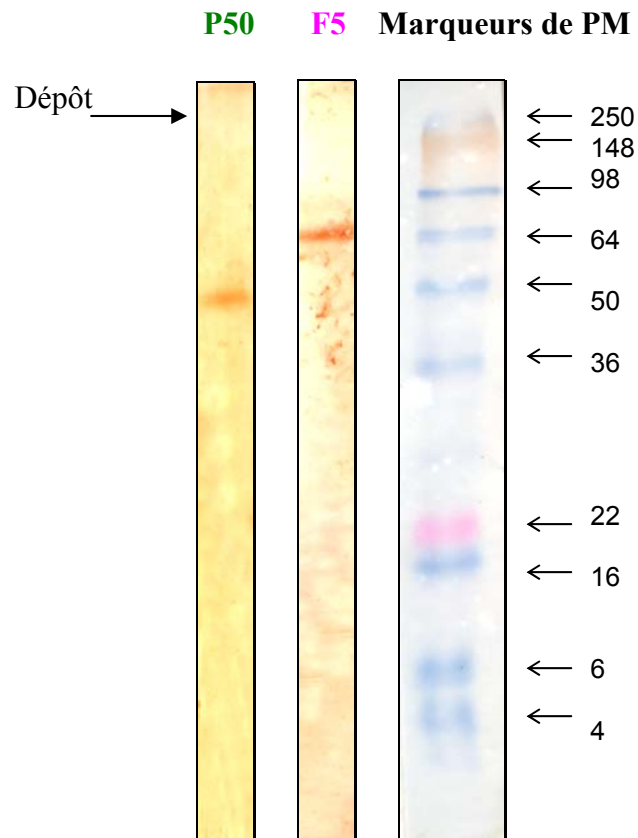


Figure 13: Etude de l'immuno-réactivité des deux fractions protéiques F5 et P50 à l'égard du sérum de patients atteints d'hydatidose par Immunoblot.

III - PREPARATION DE L'ANTIGENE FIGURE : LES PROTOSCOLEX :

III - 1 - Evaluation de la viabilité des protoscolex par :

III – 1 a - Le Test d'exclusion de l'éosine à 1 % :

La viabilité des protoscolex a été évaluée en utilisant un colorant vital : l'éosine (1%). Ce dernier nous a permis de distinguer les protoscolex vivants. En effet, contrairement aux PSC morts qui incorporent l'éosine, les PSC vivants sont imperméables au colorant (Fig. 14) et apparaissent réfringents.

D'autres critères dénotent de la viabilité des PSC. En effet, les figures **14 A** et **14B** montrent deux formes vivantes du protoscolex : invaginée et évaginée. La première forme immature (**Fig. 14A**) présente une double couronne de crochets internalisée et conservée, une membrane de structure régulière et intègre. Elle présente également une répartition homogène des corpuscules calcaires et des granules cytoplasmiques. La forme mature du protoscolex (**Fig. 14B**) présente les mêmes caractéristiques morphologiques avec toutefois un rostre et des ventouses saillants.

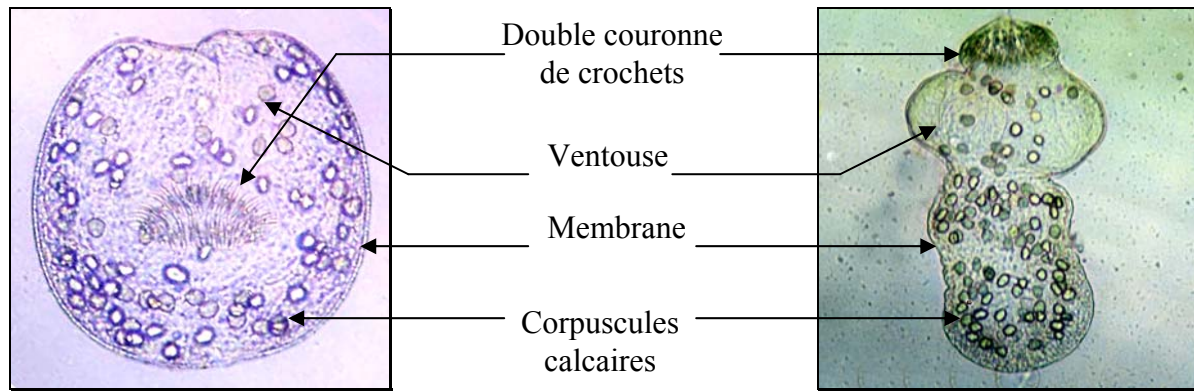
Les formes intermédiaires entre les deux états de protoscolex (invaginée et évaginée) présentent une évagination des ventouses et du rostre. Etant vivant, tous les critères de viabilité cités précédemment sont bien évidents (**Fig. 14C**).

Les protoscolex morts présentent un état de dégénérescence graduelle. Ce processus débute par une désorganisation structurale de la membrane, une extériorisation du contenu cytoplasmique, une désorganisation de la double couronne de crochets ainsi que l'incorporation du colorant. Ces critères sont les mêmes pour les deux formes de protoscolex invaginée (**Fig. 15A**) et évaginée (**Fig. 15B**). Un état de dégénérescence extrême se traduit par la disparition des crochets, la diminution du nombre de corpuscules calcaires et une coloration complète du protoscolex (**Fig. 15C**).

En outre, nous avons également constaté que les protoscolex se trouvant à un stade primitif de leur évolution, peuvent incorporer de l'éosine. Cet effet serait probablement lié à une charpente membranaire partiellement définie ou incomplète (**Fig. 16**).

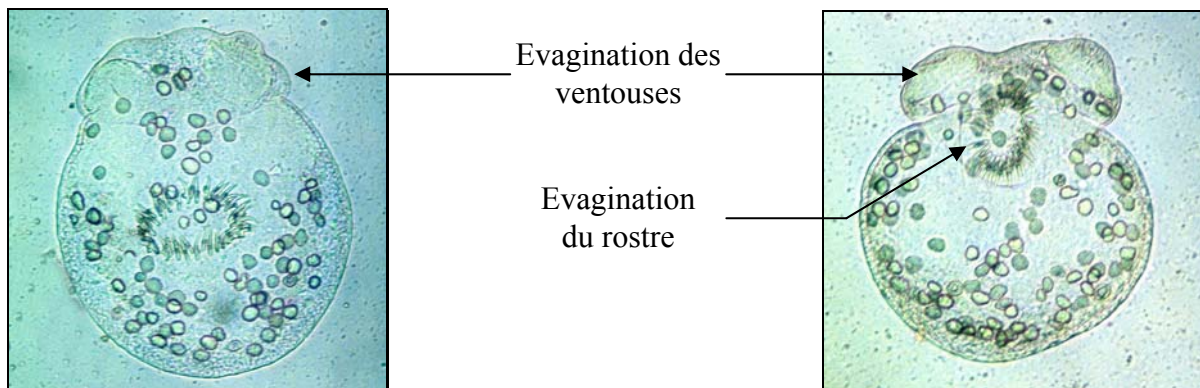
III – 1 b - Le Test de mobilité :

La mobilité est un critère de sélectivité critique qui dénote de l'état de viabilité des protoscolex. Elle se traduit par un changement de forme résultant d'un mouvement en flamme des protoscolex. Ce dernier implique des mouvements du rostre et de la membrane appuyés par le déplacement des ventouses (**Fig. 17A**). Il peut également se traduire par une invagination ou une évagination du rostre (**Fig. 17B**). Cette donnée est très utile particulièrement pour l'évaluation de la viabilité des protoscolex mis en culture (**Fig. 17C**).



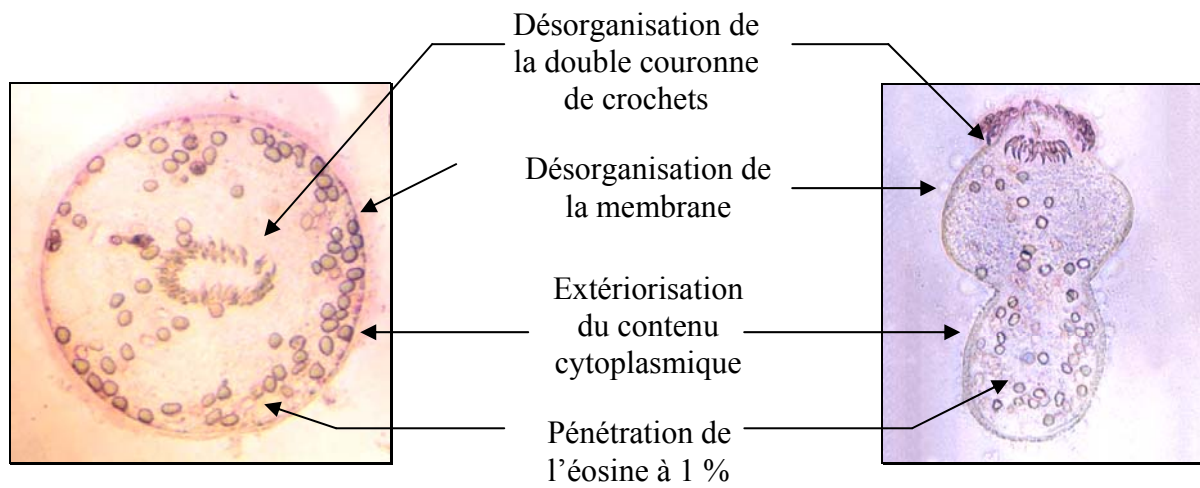
A : PSC invaginé vivant

B : PSC dévaginé vivant



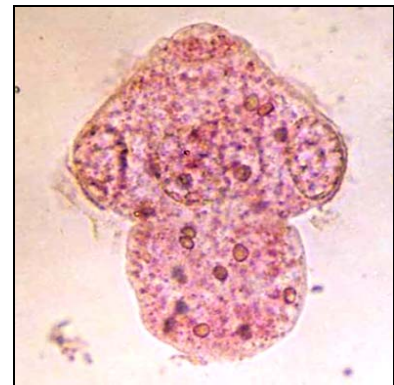
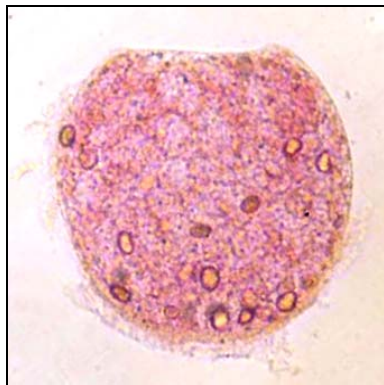
C: Formes intermédiaires entre le PSC invaginé et dévaginé vivant

Figure 14 : Evaluation de la viabilité des protoscolex par test d'exclusion de l'éosine à 1% sur lame et au microscope photonique.
Caractéristiques des PSC vivants. A, B et C : G x 268.75.



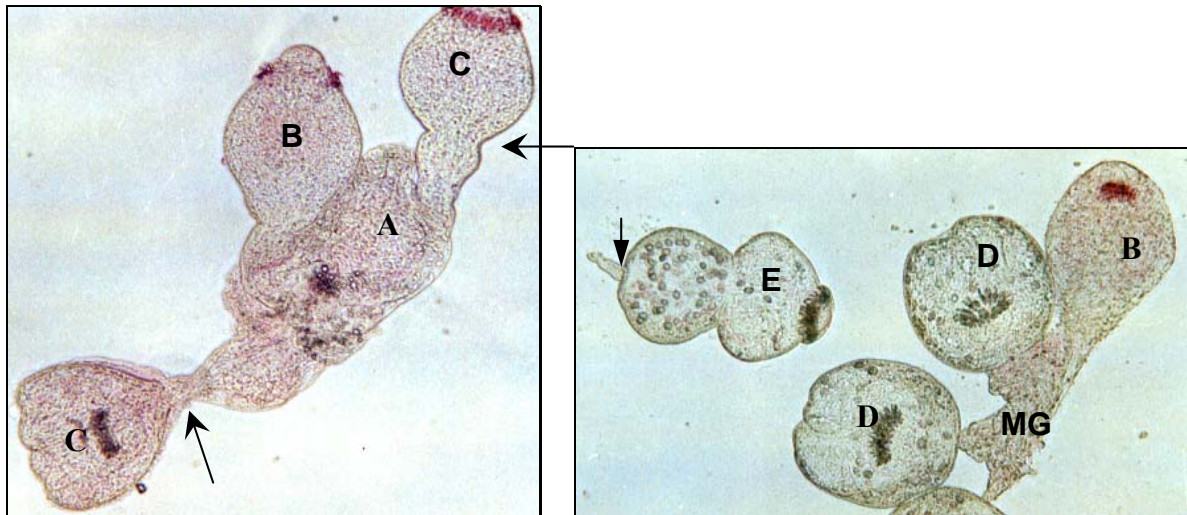
A : PSC invaginé mort

B : PSC dévaginé mort



C : PSC dégénéral (absence des crochets, diminution du nombre des corpuscules calcaires et coloration complète)

Figure 15 : Evaluation de la viabilité des protoscolex par test d'exclusion de l'éosine à 1% sur lame et au microscope photonique. Caractéristiques des PSC morts. A, B et C : G x 268.75,



- A** : Premier stade du développement : corps rond sans structure définie.
B : Deuxième stade du développement : apparition de la tête et d'une ébauche de crochets.
C : Troisième stade du développement : formation de la tête, des crochets et des ventouses.
 Stade final du développement des protozoaires : **D** : forme invaginée attachée à la membrane kystique, **E** : forme dévaginée libre.
MG : Membrane germinale des vésicules filles.
 → : Etranglement de la membrane kystique
 → : Pédicule

Figure 16 : Différents stades du développement des protozoaires (Test de viabilité à l'éosine 1%). G x 107.5.

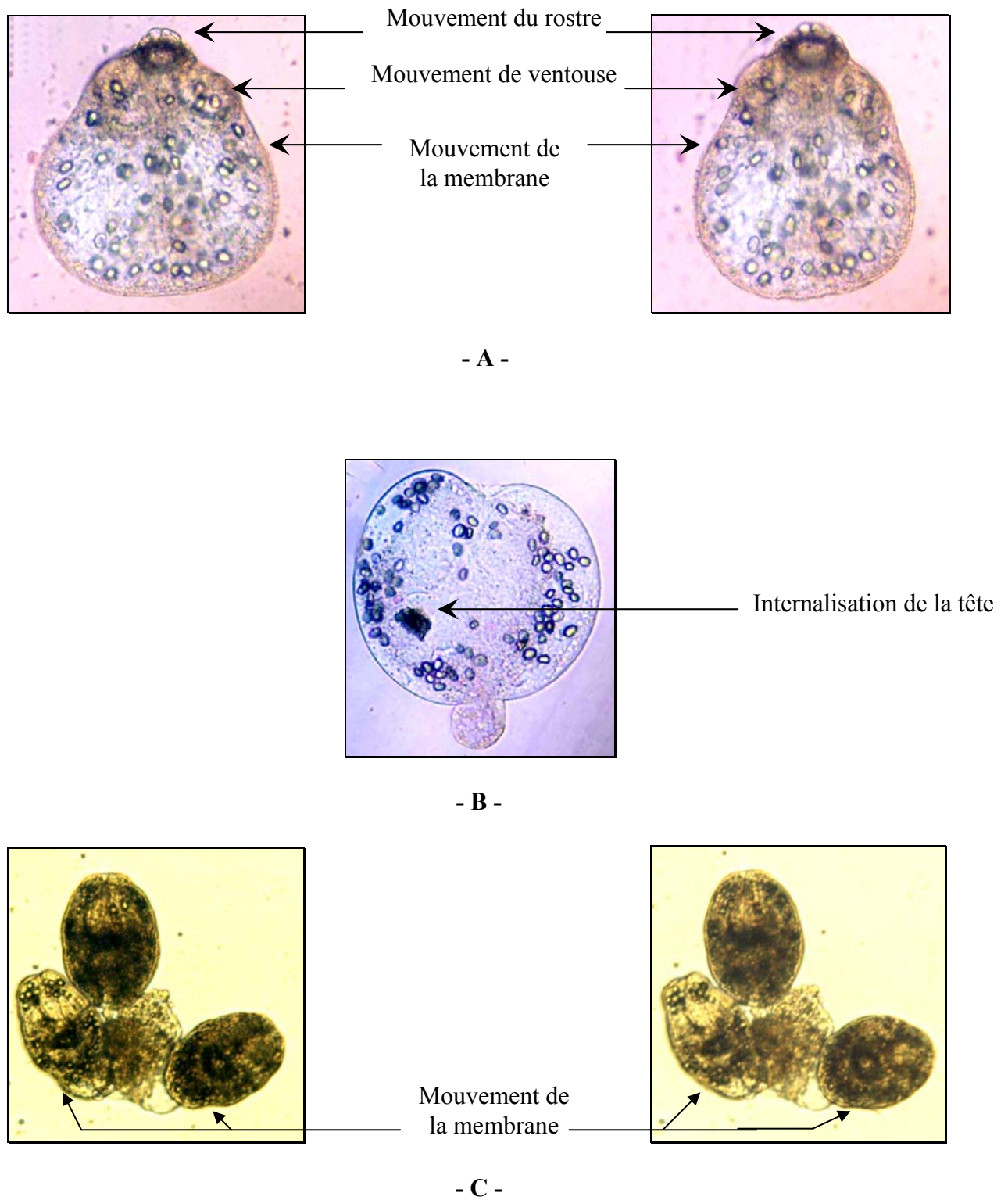


Figure 17 : Evaluation de la viabilité des protoscolex par le test de mobilité au microscope photonique sur lame (A et B) et en culture dans du RPMI-1640 à 10% de SVF (C). A, B et C : G x 268.75.

III- 2 - Caractérisation biochimique des échantillons de protoscolex (Etude comparative avec le liquide hydatique) :

L'analyse électrophorétique de l'échantillon de protoscolex dans les conditions réductrices a révélé la présence d'une mosaïque protéique. Cette dernière se matérialise par **25** bandes de poids moléculaire variant entre **12** et **160 kDa** avec une bande majeure à **67 kDa**. Notons également la présence de la fraction 4 (de **12 kDa**) et la P50 (de **50 kDa**) dans tous les extraits de protoscolex (**Fig. 18**).

Nous avons relevé la présence d'une bande de **29 kDa**. Cette dernière serait selon certaines études un épitope majeur de l'antigène 5 (Gonzalez et *al.*, 2000).

Nous avons noté avec intérêt que toutes les bandes protéiques du liquide hydatique apparaissent également dans l'extrait de protoscolex. Cette observation atteste de la présence de protéines communes entre les deux types d'antigènes, soluble et figuré. En effet, ces derniers sont le produit de sécrétion et de bourgeonnement d'une même entité antigénique : la membrane germinative. De plus selon Kong et *al* 1989, l'antigène A (formé des sous unité de 67 et 50 kDa) est localisé au niveau de la couche interne de la membrane germinative et le parenchyme des protoscolex. L'antigène B (formé de sous unités de 8 kDa) est également localisé dans la membrane germinative et les téguments des protoscolex (Yarzabal et *al.*, 1977 ; Kanwar et Kanwar, 1994 ; Siracusano et *al.*, 2002). Toutefois, il semblerait selon le profil de migration obtenu que l'extrait de protoscolex soit plus riche en protéines.

III- 3 - Caractérisation antigénique des échantillons de protoscolex (Etude comparative avec le liquide hydatique) :

L'évaluation de l'antigénicité des différents extraits de protoscolex en **immunoélectrophorèse** contre les sérums de sujets atteints d'hydatidose révèle la présence de **4** arcs de précipitation (**Fig. 19**). L'**Immunodiffusion double** indique l'existence de **4 à 3** arcs de précipitation (**Fig. 20**). De plus, elle met en évidence l'existence d'une réaction d'identité partielle entre les épitopes antigéniques du liquide hydatique et des protoscolex. Ce résultat atteste de la présence d'épitopes communs et non communs entre les deux types d'extrait antigéniques. Il confirme les résultats obtenus par SDS-PAGE.

En **immunoblot**, l'apparition de plusieurs bandes traduit la présence d'une mosaïque antigénique (**22** bandes) de PM variant entre 7 kDa et 100 kDa (**Fig. 21**). Notons également l'apparition des antigènes majeurs du liquide hydatique : l'antigène 5 (de 67 kDa), la fraction 4 (de 8 à 12 kDa) ainsi que l'antigène de 50 kDa dans les différents extraits. Ces observations viennent conforter ceux de la SDS-PAGE et des techniques d'immunoprécipitation.

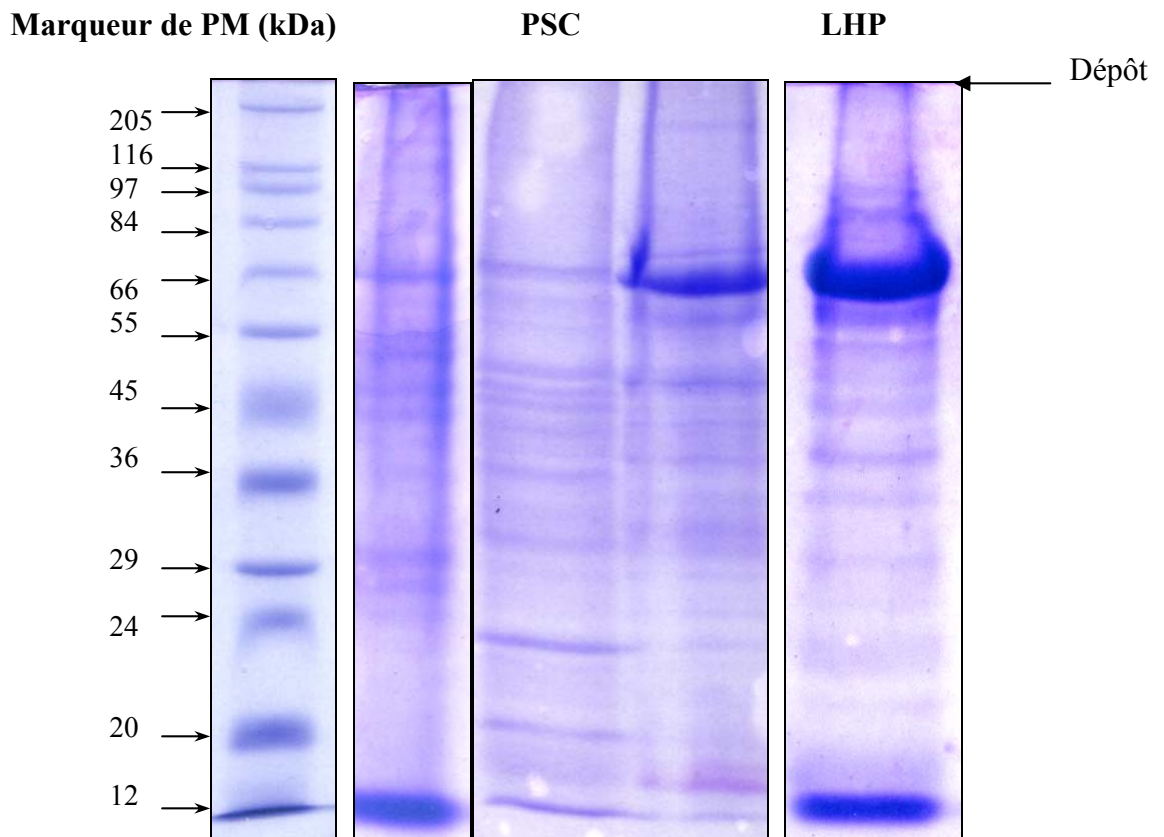


Figure 18 : Caractérisation protéique des protéines de protoscolex par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et en milieu dénaturant. PSC : Protoscolex, LHP : Liquide hydatique pulmonaire.

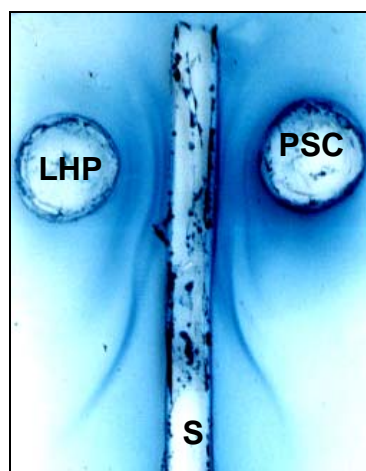


Figure 19 : Comparaison de l'antigénicité des deux échantillons antigéniques : soluble (liquide hydatique) et figuré (protoscolex) par Immunoélectrophorèse.

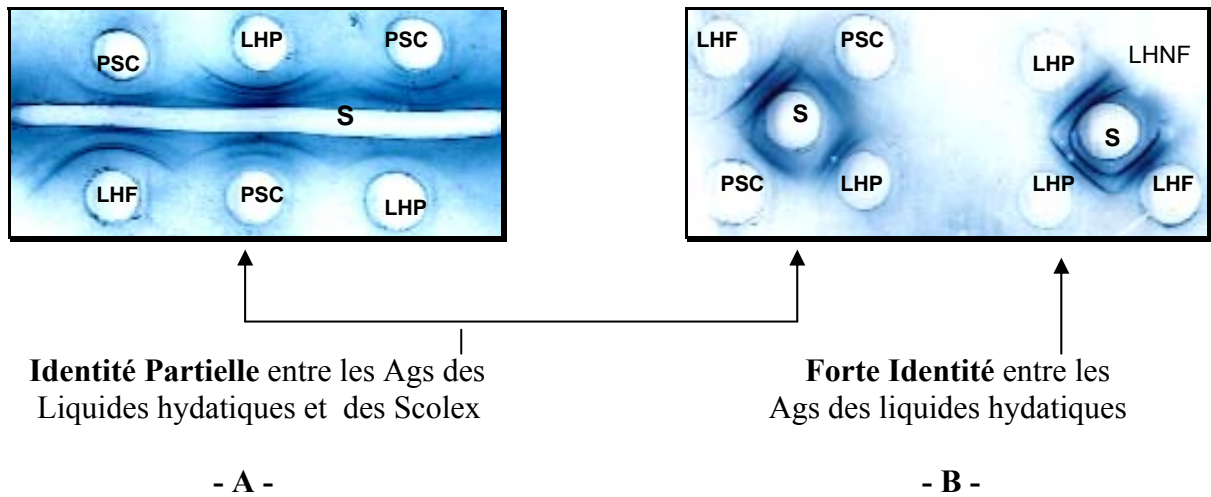


Figure 20 : Etude de l'identité antigénique entre le liquide hydatique et les protoscolex par Immunodiffusion double.

LHP : Liquide hydatique pulmonaire, **LHF**: Liquide hydatique du foie, **LHNF** : Liquide hydatique non fertile, **PSC** : Protoscolex d'origine humaine, **S** : Sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée par chirurgie.

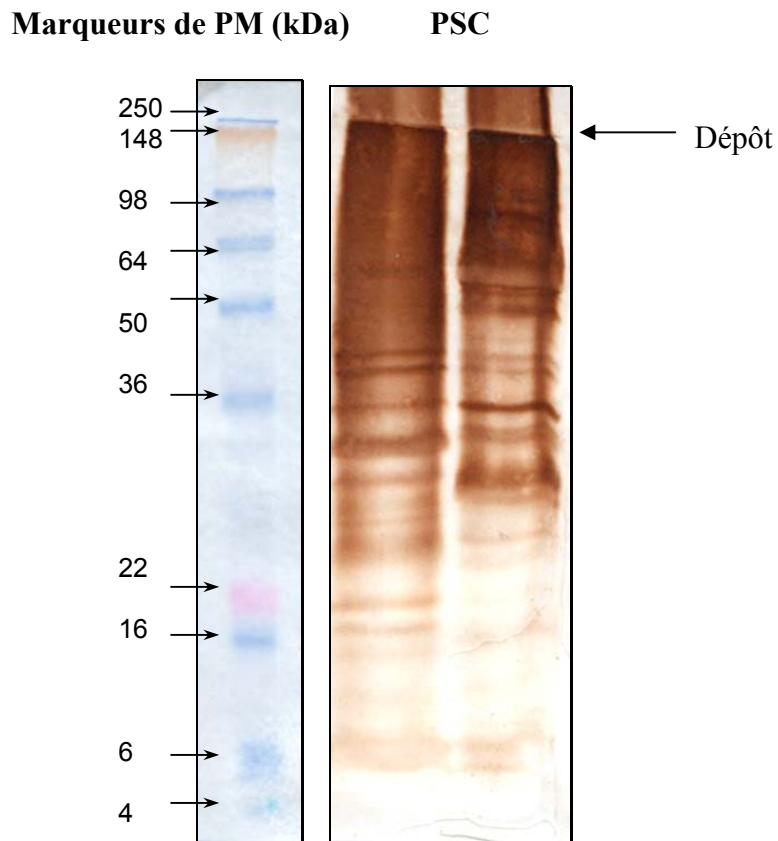


Figure 21 : Etude de l'immuno-réactivité des extraits de protoscolex à l'égard du sérum de patients atteints d'hydatidose par Immunoblot.

PSC : Protoscolex.

IV- DOSAGE *IN VIVO* DES CYTOKINES (L'IL-8 ET L'IL-12) ET DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LES SERUMS ET LES LIQUIDES HYDATIQUES DE PATIENTS ATTEINTS D'HYDATIDOSE :

IV-1- DOSAGE SÉRIQUE DE L'IL-12, DE L'IL-8 ET DU NO :

IV-1a- Dosage cytokinique :

La sérothèque que nous avons établie est relative à des patients porteurs de kystes de localisations diverses aux deux stades pré et post-opératoire. L'étude a été complétée par l'évaluation des activités cytokiniques au niveau des sérums de sujets sains.

- **Production de l'IL-8 et de l'IL-12 par les individus pathologiques et sains :**

Les teneurs sériques en IL-8 et en IL-12 mesurées chez les patients dans tous les cas testés (toutes localisations confondues) sont plus élevées en comparaison aux sujets contrôles (avec des médianes respectivement égales à **70.19 pg/ml** et **47.5 pg/ml** dans les sérums des individus pathologiques) (**Tableau I et II**).

- **Production des deux cytokines selon la localisation kystique :**

Les résultats de ce dosage révèle également des teneurs significatives en IL-8 et en IL-12 en particulier pour les patients porteurs de kystes hépato-pulmonaires, hépatiques et pulmonaires et répondant à une évolution classique de l'hydatide. Les patients porteurs de kystes à localisation rare ou secondaire montrent les teneurs les plus faibles.

En effet, les sérums de patients porteurs de kystes aux niveau du foie et du poumon prédominent par leurs teneurs en IL-8 et IL-12 sériques (avec pour les sérums prélevés au stade pré-opératoire **79.5 ± 0.71 pg/ml** et **52 ± 2.83 pg/ml** respectivement). Le taux correspondant est **1.10** fois supérieur aux cas de localisations hépatiques pour l'IL-8 (**Fig. 22**). Concernant l'IL-12, il est de l'ordre de **1.09** fois plus élevé (**Fig. 23**).

La localisation pulmonaire vient en troisième position avec des taux allant de **51 à 98 pg/ml** et de **23 à 43 pg/ml** pour l'IL-8 et l'IL-12 respectivement.

Les teneurs en IL-8 et en IL-12 enregistrées pour les localisations rares ou secondaires sont respectivement **6.22** fois et **1.38** fois plus faibles que celles enregistrées pour les localisations principales comme le poumon. Toutefois, il faut signaler que ces teneurs demeurent supérieures à celles enregistrées pour les sujets contrôles.

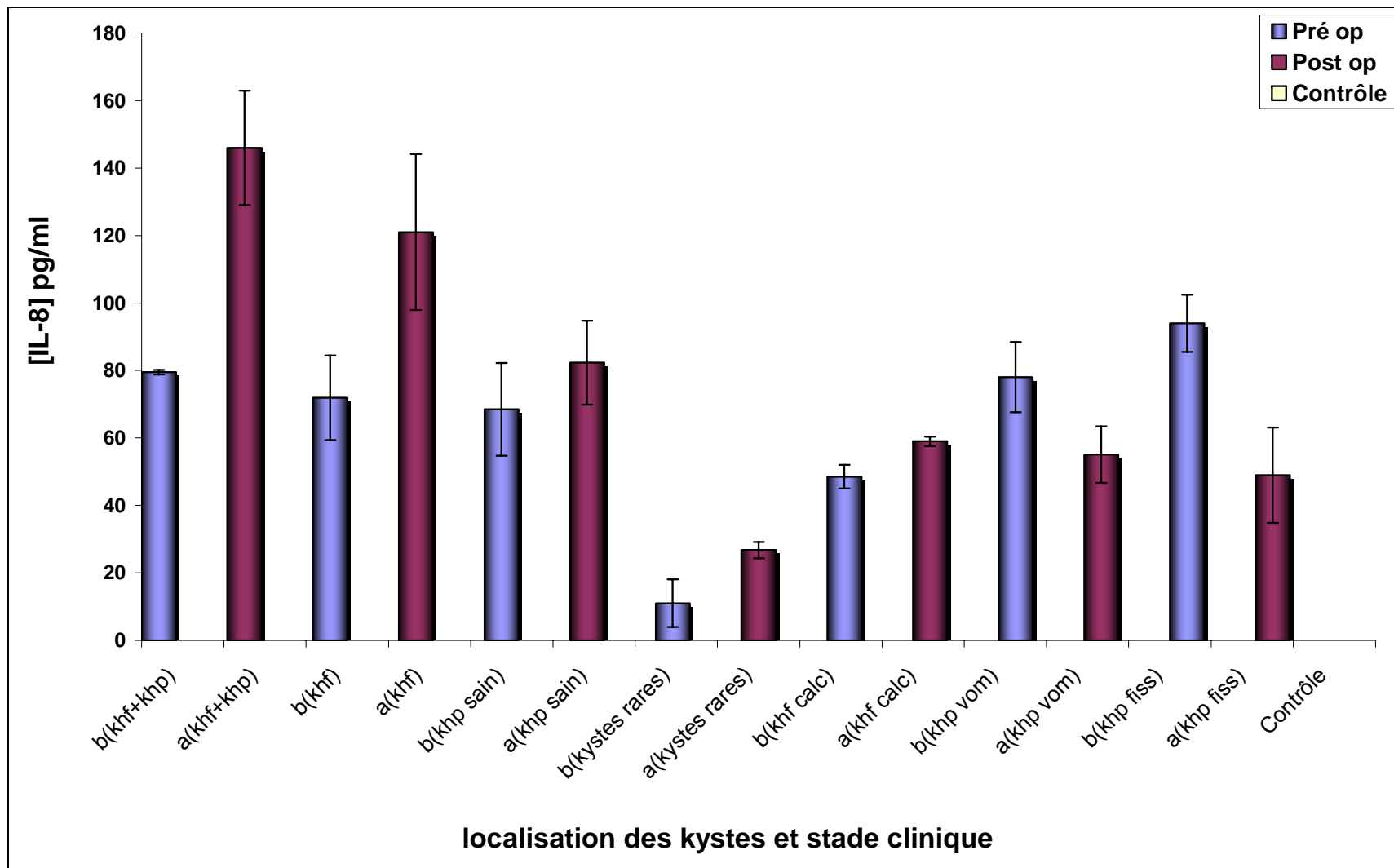


Figure 22: Teneurs en IL-8 dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10) en fonction de la localisation kystique et du stade clinique. b: avant la chirurgie, a: après la chirurgie.

Tableau I : Teneurs en IL-8 dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10).

Localisations des kystes et Catégories	Patients hydatiques (n=64)					
	Stade Pré-opératoire n=32			Stade Post-opératoire n=32		
	n	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml	n	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml
Foie + Poumon	3	79-80	79.5 ± 0.71	3	134-158	146 ± 16.97
Foie	5	60-80.1	71.89 ± 12.55	5	100-141	121 ± 23.14
Poumon « kystes sains »	10	51-98	68.5 ± 13.74	10	68-101	82.3 ± 12.44
Localisations rares ou secondaires (cœur)	2	06-16	11 ± 7.07	2	25-28.5	26.75 ± 2.47
Kystes partiellement calcifiés du foie	2	46-51	48.5 ± 3.53	2	58-60	59 ± 1.41
Kystes vomiqués	8	68-92	78 ± 10.39	8	44-60	55.07 ± 8.32
Kystes fissurés	2	88-100	94 ± 8.48	2	39-59	49 ± 14.14
Contrôles	10	Rang pg/ml		Moyenne ± SD pg/ml		
		-		0		

- **Production des deux cytokines selon le stade clinique :**

Le stade clinique semble influencer de manière concordante la production sérique d'IL-8 et d'IL-12. En effet, les teneurs enregistrées pour les deux cytokines sont plus élevées en phase post-opératoire pour tous les sérums de patients porteurs de kystes « sains » (ni vomiqués, ni fissurés et ni rompus). Ce profil est inversé lorsque les kystes sont vomiqués ou fissurés (**Fig22 et 23**).

Nous remarquons également que le taux d'IL-8 et d'IL-12 persiste pendant les **48 à 72 h** après l'ablation kystique. Cette évolution suit celle de l'interleukine 6 dont le taux augmente après l'acte chirurgical et persiste à une valeur de **32-500 U/ml** pendant les **72 h** qui font suite à la chirurgie (Touil-Boukoffa et *al.*, 1997 ; Touil-Boukoffa, 1998). Cette observation a été également rapportée pour l'IL-12 sérique (Mezioug, 2002).

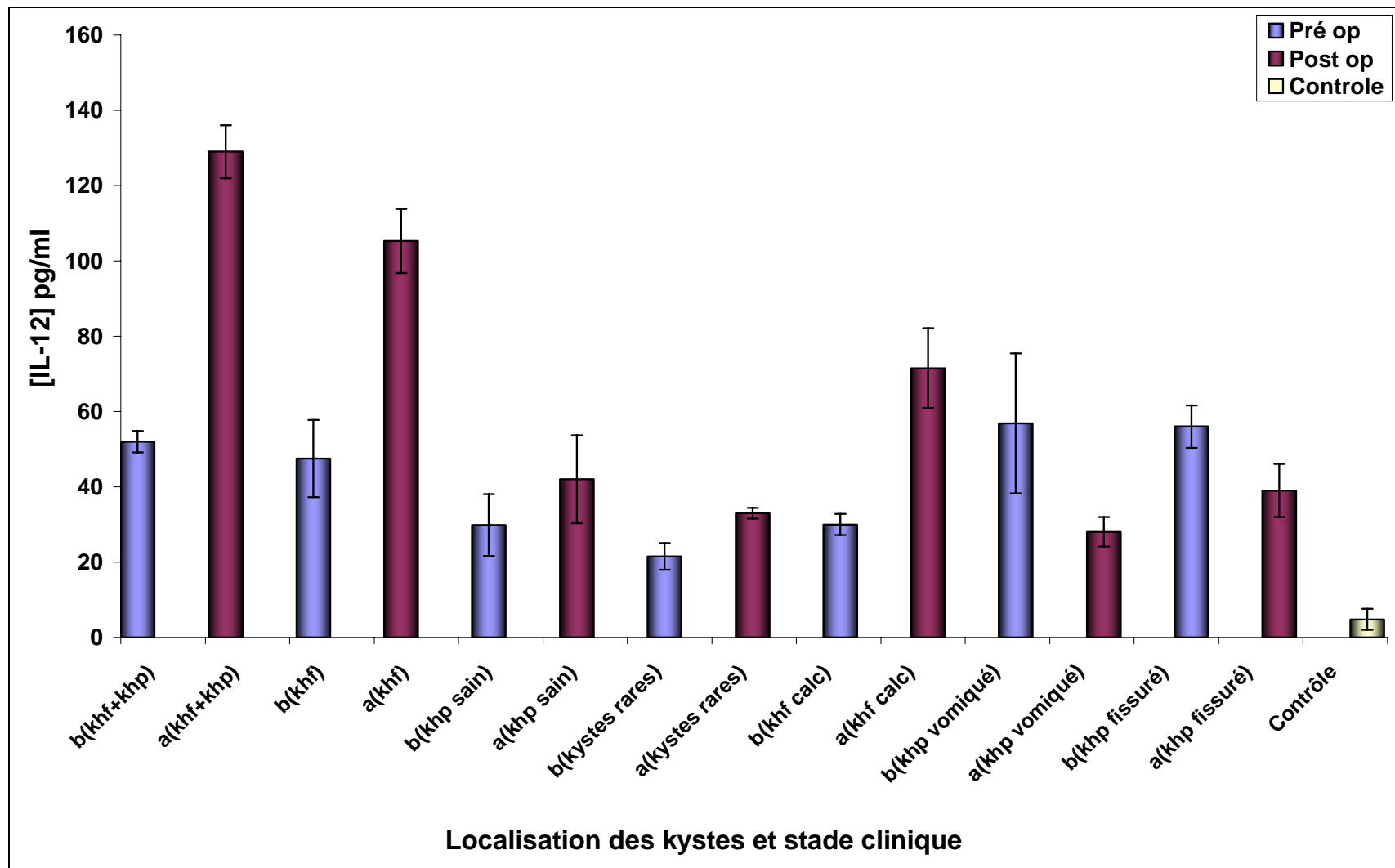


Figure 23 : Teneurs en IL-12 dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10) en fonction de la localisation kystique. b : avant la chirurgie, a: après la chirurgie.

Tableau II : Teneurs en IL-12 dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10).

Localisations des kystes et Catégories	Patients hydatiques (n=64)					
	Stade Pré-opératoire n=32			Stade Post-opératoire n=32		
	n	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml	n	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml
Foie + Poumon	3	50-54	52 ± 2.83	3	124-134	129 ± 7.07
Foie	5	40-50	47.5 ± 10.25	5	90-115	105.25 ± 8.54
Poumon « kystes sains »	10	23-43	29.85 ± 8.21	10	27-60	42 ± 11.68
Localisations rares ou secondaires (cœur)	2	19-24	21.5 ± 3.53	2	32-34	33 ± 1.41
Kystes partiellement calcifiés du foie	2	28-32	30 ± 2.83	2	64-79	71.5 ± 10.61
Kystes vomiqués	8	42-79	56.86 ± 18.62	8	21-32	28.07 ± 3.9
Kystes fissurés	2	52-60	56 ± 5.66	2	34-44	39 ± 7.07
Contrôles	10	Rang pg/ml		Moyenne ± SD pg/ml		
		3.5-6.25		4.8 ± 2.8		

IV-1b- Dosage sérique du NO :

L'évaluation du NO sérique a été réalisée par la mesure des nitrites totaux (nitrites+nitrates : deux métabolites physiologiquement stables du NO). L'échantillonnage correspond à 74 sérums répartis respectivement en 64 et 10 sérums de patients hydatiques et de sujets sains.

- **Production du NO au niveau des patients et des sujets sains:**

Le dosage de NO a montré la présence de ce radical dans les sérums de patients atteints d'hydatidose (toutes localisations confondues) suggérant l'implication du NO au cours des processus de défense contre l'hydatide. En effet, les résultats obtenus révèlent que les sujets pathologiques expriment des taux 1.91 fois plus élevés en NO (avec une médiane de 66.93 μM) en comparaison aux contrôles (avec une médiane de 35 μM). Ce résultat confirme les résultats antérieurs (Touil-Boukoffa, 1998 ; Ait Aissa, 2002).

- **Production du NO en fonction de la localisation kystique:**

Nous avons observé avec intérêt une différence dans les teneurs en NO mesurées dans les sérums des patients hydatiques selon la localisation, l'état du kyste et la présence de récurrence (Fig. 24, Tableau III).

Le taux le plus élevé en NO correspond à la localisation hépato-pulmonaire aux deux stades cliniques ($147.5 \pm 17.68 \mu\text{M}$ pour le stade pré-opératoire et $120 \pm 21.21 \mu\text{M}$ pour le stade post-opératoire). La localisation hépatique vient en seconde position avec des taux allant respectivement de 100 à 145 μM et de 75 à 99.25 μM pour les stades pré et post-opératoire.

Les taux de production de nitrites totaux chez les patients porteurs de kystes pulmonaires (qui arrivent en troisième position) sont 1.75 fois plus faibles aux cas de kystes hépatiques.

Les localisations rares ou secondaires présentent des valeurs proches de celles observées pour les patients porteurs de calcification partielle d'un kyste du foie. Par ailleurs, ces taux sont plus élevés (1.39 fois) que ceux des témoins ou des récidivants.

L'état de récurrence semble conférer aux patients un profil en nitrites ($39.5 \pm 8.5 \mu\text{M}$) proche de celui des donneurs sains ($39.5 \pm 15.85 \mu\text{M}$) et surtout bien en deçà de celui des patients contractant pour la première fois cette pathologie. Ces résultats semblent impliquer une relation entre le statut clinique et la production de NO.

- **Production du NO selon le stade clinique :**

Le même profil de production sérique d'IL-8 et d'IL-12 en fonction de la localisation kystique est observé pour la production du NO. A l'inverse, cette dernière décline après exérèse kystique. En effet, les valeurs enregistrées sont 1.55 fois plus faibles au stade post-opératoire dans tous les cas. Cependant, elles demeurent au dessus (1.54 fois plus élevées) des valeurs enregistrées pour les sujets contrôles (Fig. 24, Tableau III).

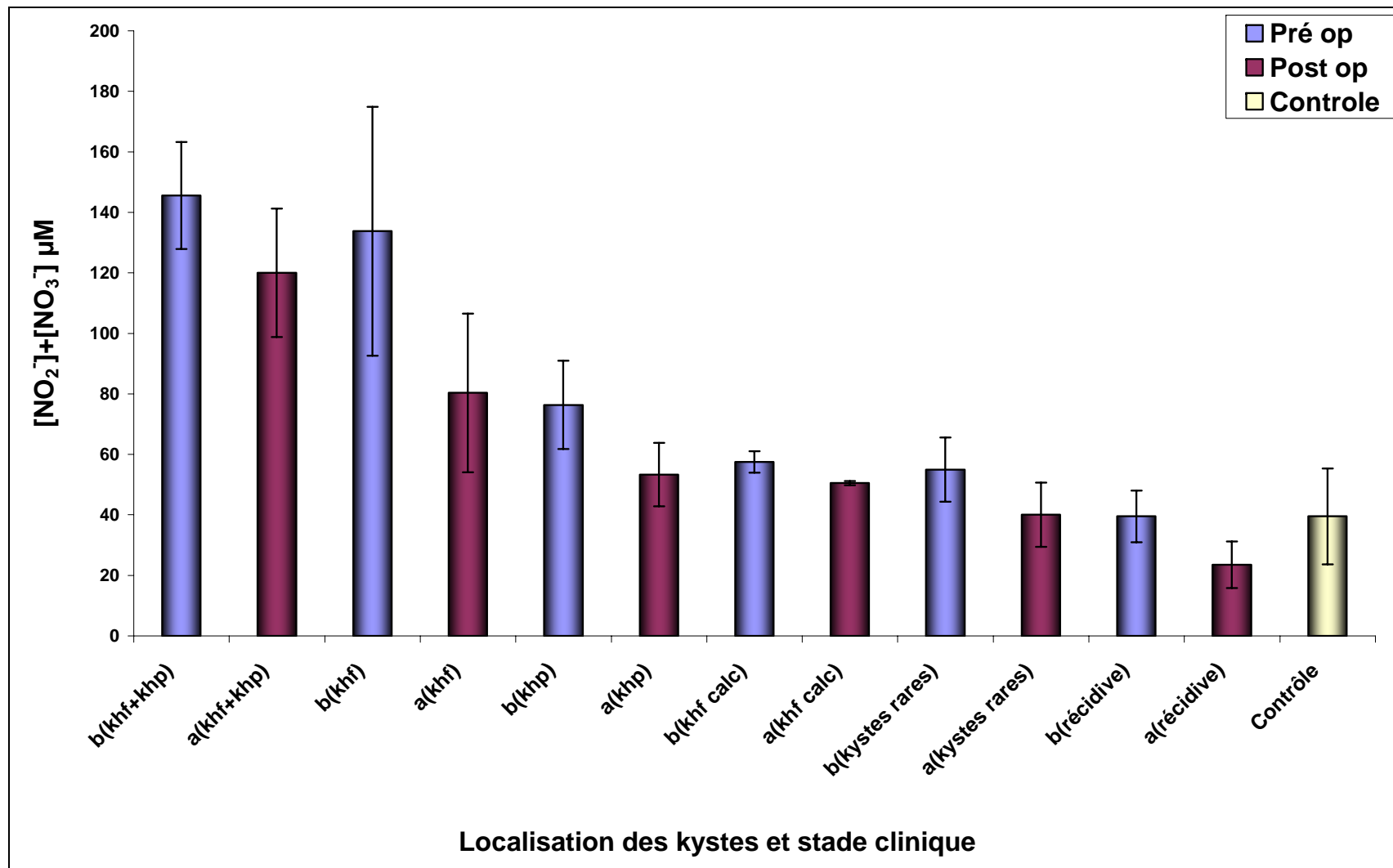


Figure 24 : Teneurs des nitrites totaux dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10) en fonction de la localisation kystique. b : pré-opératoire, a: post-opératoire

Tableau III : Taux des nitrites totaux dans les sérums de patients hydatiques (n=64) et sains (n=10).

Localisations des kystes et Catégories	Patients hydatiques (n=64)					
	Stade Pré-opératoire n=32			Stade Post-opératoire n=32		
	n	Rang μM	Moyenne \pm SD μM	n	Rang μM	Moyenne \pm SD μM
Foie + Poumon	3	135-160	147.5 \pm 17.68	3	105-135	120 \pm 21.21
Foie	8	100-145	133.75 \pm 41.15	8	75-99.25	80.31 \pm 26.23
Poumon	12	78-92	76.37 \pm 14.59	12	35-70	53.33 \pm 10.46
Localisations rares ou secondaires (cœur)	2	47.5-62.5	55 \pm 10.61	2	32.5-47.5	40 \pm 10.61
Kystes partiellement calcifiés du foie	2	55-60	57.5 \pm 3.53	2	50-51	50.5 \pm 0.71
Récidives	5	27.5-51	39.5 \pm 8.5	5	12.5-32	23.5 \pm 7.66
Contrôles	10	Rang μM		Moyenne \pm SD μM		
		25 – 57.5		39.5 \pm 15.85		

IV-1c- Dosage du NO sérique et immunoréactivité :

Nous avons analysé le niveau de production du NO sur une série de **36** prélèvements sériques de patients hydatiques. Ces échantillons présentent des titres allant de **160** à **128000**. L'immunoréactivité a été testée par hémaagglutination passive avec un seuil de positivité de **160**.

Il est intéressant de noter que les taux en nitrites totaux dans les sérums de patients hydatiques diminuent avec les titres en anticorps (**Fig. 25, Tableau IV**). En effet, pour un titre maximum de **128000**, nous retrouvons un taux de production de **167.5 ± 10.61 µM**. Par ailleurs, un taux plus faible de **13.17 ± 1.61 µM** est enregistré pour un titre seuil de **160**. Ces résultats confirment ceux de Ait Aissa quant à l'existence d'une relation proportionnelle entre les teneurs significatives en NO et les titres les plus élevés (Ait Aissa, 2002).

Nous avons observé avec intérêt une corrélation selon une progression logarithmique (**R²=0.8337**) entre cette production sérique de NO et l'immunoréactivité des patients hydatiques (**Fig. 26**). Cette donnée suggère une sollicitation de l'antigène parasite dans la production du NO et dans les réponses immunitaires de l'hôte. Ces résultats sont en accord avec ceux de Touil-Boukoffa qui a montré l'existence d'une corrélation entre le taux de nitrites sériques et l'immunoréactivité testée par immunoelectrophorèse et par immunoblotting (Touil-Boukoffa, 1998).

L'ensemble de ces données confirme l'action non négligeable des antigènes parasites dans la production de NO.

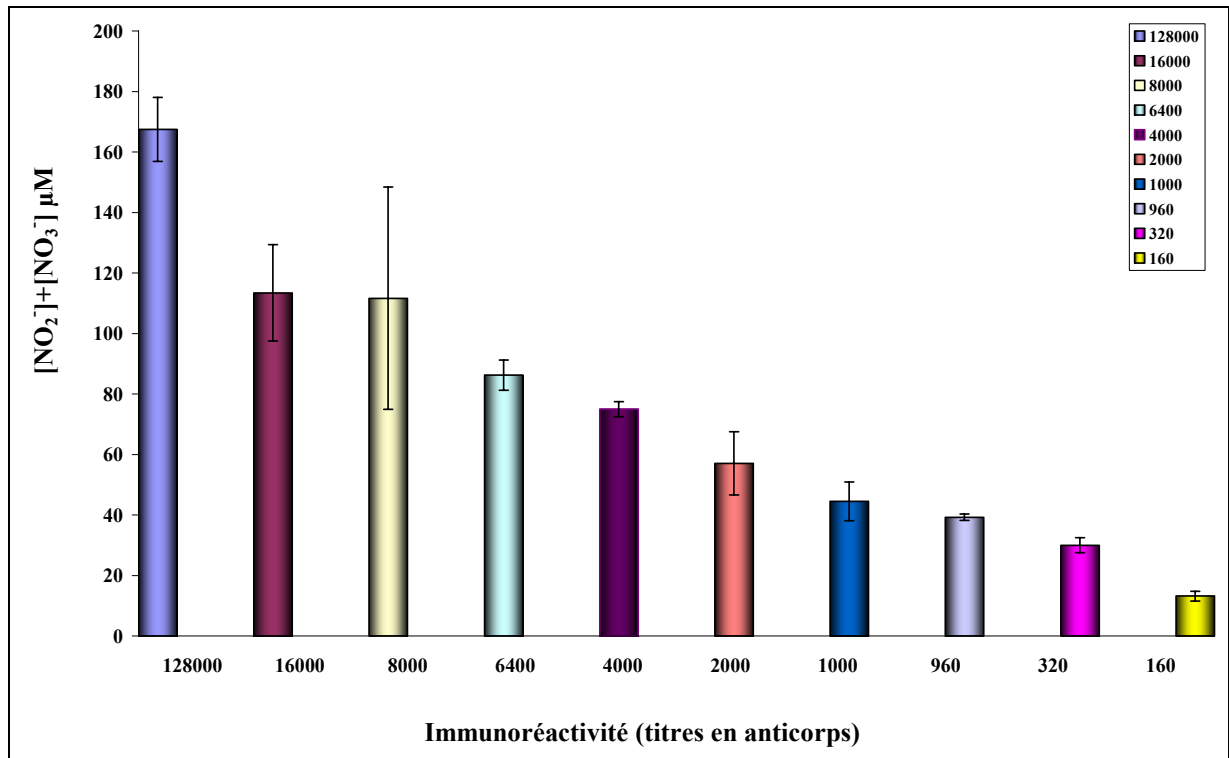


Figure 25 : Taux des nitrites totaux dans les sérums de patients hydatiques (n=36) en fonction de l'immunoréactivité testée par hémaagglutination passive.

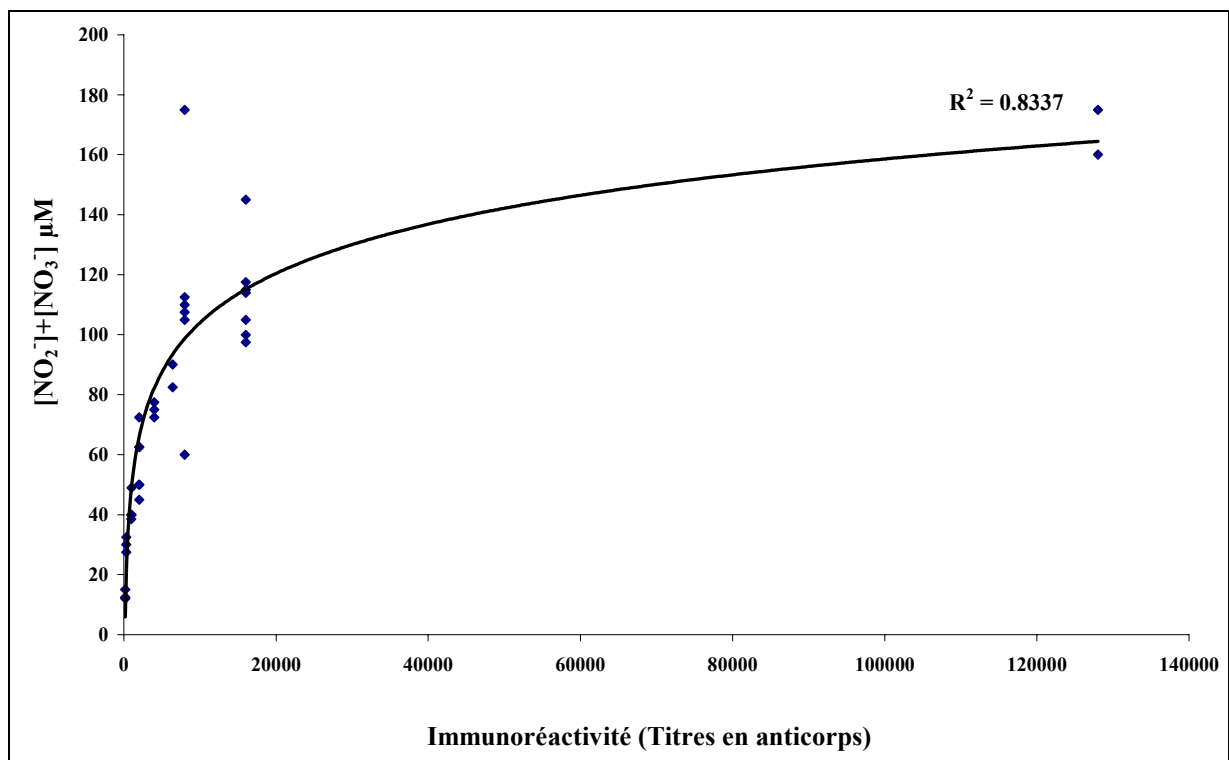


Figure 26 : Corrélation entre le taux de NO sérique et l'immunoréactivité des patients hydatiques testée par hémaagglutination passive (n=36).

Tableau IV : Taux des nitrites totaux dans les sérums de patients atteints d'hydatidose (n=36) en fonction de l'immunoréactivité (testée par hémaagglutination passive).

Titre en anticorps	n	Rang μM	Moyenne \pm SD μM
128000	2	160-175	167.5 \pm 10.61
16000	7	97.5-145	113.43 \pm 15.92
8000	6	60-175	111.67 \pm 36.73
6400	2	82.5-90	86.25 \pm 5.30
4000	3	72.5-77.5	75 \pm 2.5
2000	6	45-72.5	57.08 \pm 17.99
1000	2	40-49	44.5 \pm 6.36
960	2	38.5-40	39.25 \pm 1.06
320	3	27.5-32.5	30 \pm 2.5
160	3	12-15	13.17 \pm 1.61

IV-2- DOSAGE DES CYTOKINES (L'IL-8 ET L'IL12) ET DU NO DANS LES LIQUIDES HYDATIQUES DE PATIENTS ATTEINTS D'HYDATIDOSE :

Compte tenu de la présence de cytokines et de NO dans les sérums de patients et de la perméabilité des kystes hydatiques, il nous a semblé intéressant de rechercher la présence de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO dans les différents échantillons de liquides hydatiques.

Nous avons noté avec intérêt une différence dans les teneurs de cytokines et de NO mesurées dans les liquides hydatiques selon la localisation du kyste (Fig. 27) et la fertilité en protoscolex (Fig. 28).

- **Production de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO selon la localisation kystique :**

Des teneurs significatives en été enregistrées en particulier, pour les patients porteurs de kystes hépatiques et pulmonaires. Les patients porteurs de kystes à localisation rare ou secondaire (ovaire et cuisse) montrent des teneurs plus faibles. Cette donnée suggère une perméabilité des kystes hydatiques aux différentes protéines de l'hôte notamment aux cytokines (IL-8 et IL-12) et aux radicaux libres (NO).

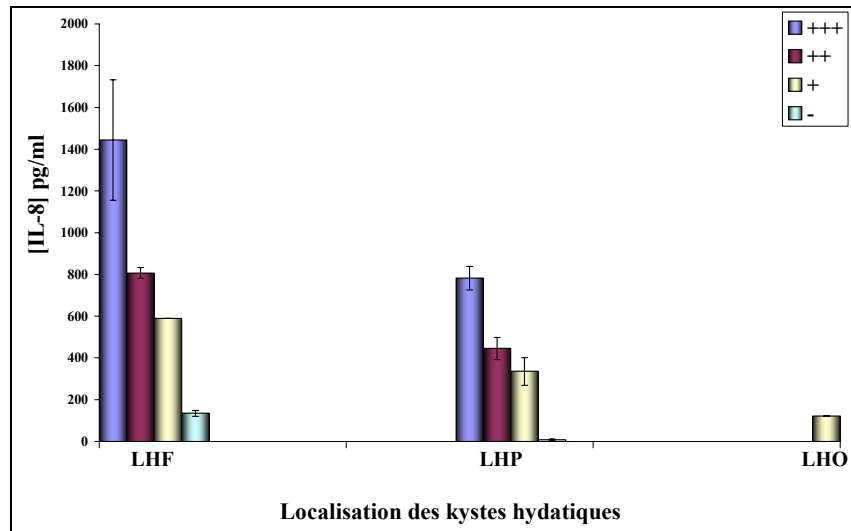
Ces résultats sont en accord avec ceux de Touil-Boukoffa en 1998 relatifs à la présence dans les liquides hydatiques hépatiques de nitrites totaux (**34.12-38.24 μM**), de nitrites (**30.28-34.3 μM**) et d'une activité TNF- α (**32-1000 U/ml**). Toutefois aucune activité IL-6 et IFN n'a été révélée. Notons cependant que les activités des différentes cytokines ont été évaluées par bio-essais.

Le taux moyen d'IL-8, d'IL-12 et de NO enregistré dans les liquides hépatiques est nettement supérieur en comparaison aux autres localisations (avec respectivement une médiane de **698.25 pg/ml**, **87.75 pg/ml** et **61.04 μM**). De ce fait, il semblerait que les kystes du foie soient plus perméables que ceux du poumon ce qui est en accord avec l'hypothèse de Hamrioui et Vidor et *al* en 1986. Ces résultats confirment les taux trouvés dans les sérums de patients porteurs de kystes hépatiques. En effet ces derniers, arrivent en deuxième position quant à la production des trois biomolécules dans les sérums (après la localisation hépatopulmonaire) (Fig. 27 A, B et C).

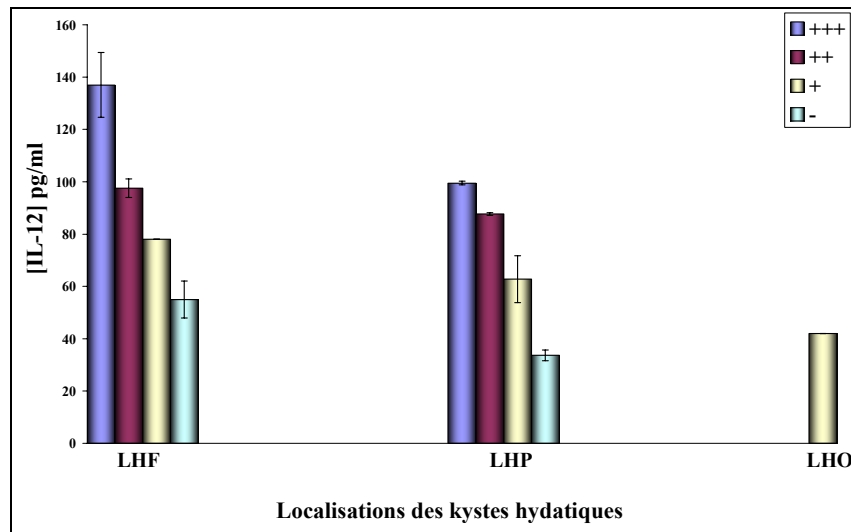
Les liquides pulmonaires arrivent en deuxième position quant à leur contenance en cytokines et en NO avec des médianes égales respectivement à **391 pg/ml**, **75.21 pg/ml** et **25.62 μM** pour l'IL-8, l'IL-12 et le NO. Ces valeurs sont **2** fois plus faibles à celles enregistrées dans les liquides hépatiques sauf pour l'IL-12.

Au niveau du liquide hydatique de l'ovaire, les teneurs en cytokines sont les plus faibles (**122 pg/ml** et **42 pg/ml** pour l'IL-8 et l'IL-12 respectivement) (Tableau V et VI). Les mêmes observations sont enregistrées pour le taux de monoxyde d'azote trouvé au niveau d'un kyste localisé dans le muscle de la cuisse (**23.75 μM**) (Tableau VII).

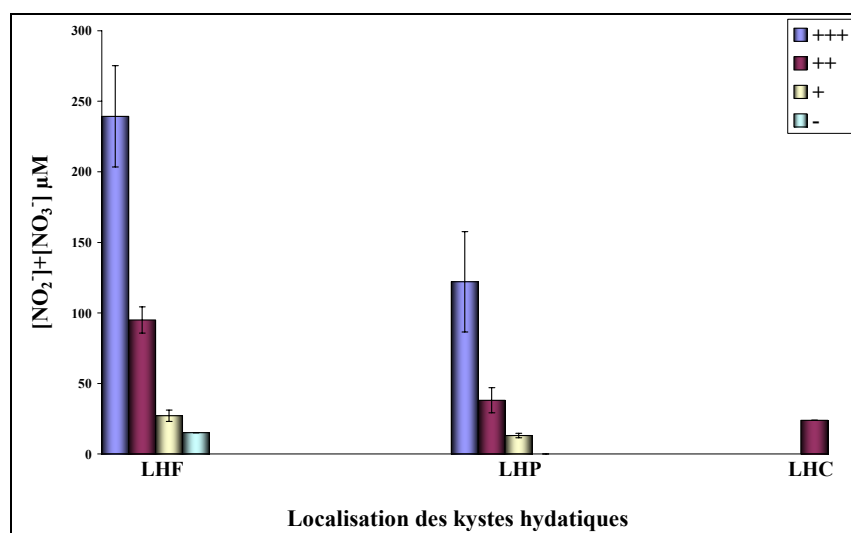
L'ensemble de ces résultats n'exclue pas une éventuelle source *in situ* de ce radical, avoisinant le parasite, capable en théorie de diffuser de part et d'autre des membranes biologiques.



- A -



- B -



- C -

Figure 27 : Teneurs en IL-8 (A), en IL-12 (B) et en NO (C) dans différents liquides hydatiques humains en fonction de la localisation kystique (n=22 pour l'IL-8 et l'IL-12, n=33 pour le NO).

+++ : Très fertile, ++ : Moyennement fertile, + : Faiblement fertile, - : Non fertile

Tableau V : Teneurs en IL-8 dans différents liquides hydatiques humains (n=22) en fonction de la localisation kystique et du degré de fertilité.

Localisations des kystes hydatiques	n	Degré de fertilité en protoscolex	n	Rang pg/ml	Moyenne \pm SD pg/ml
LHF	9	+++	4	1010-1600	1443.5 \pm 289.15
		++	2	788-825	806.5 \pm 26.16
		+	1	-	590
		-	2	125-145	135 \pm 14.14
LHP	12	+++	2	742-822	782 \pm 56.57
		++	3	413-507	446 \pm 52.89
		+	4	248-388	336 \pm 66.52
		-	3	04-11	8.33 \pm 3.78
LHO	1	++	1	-	122

+++ : Très fertile.

++ : Moyennement fertile.

+ : Faiblement fertile.

- : Non fertile.

Tableau VI : Teneurs en IL-12 dans différents liquides hydatiques humains (n=22) en fonction de la localisation kystique et du degré de fertilité.

Localisations des kystes hydatiques	n	Degré de fertilité en protoscolex	n	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml
LHF	9	+++	4	120-148	137 ± 12.38
		++	2	95-100	97.5 ± 3.53
		+	1	-	78
		-	2	50-60	55 ± 7.07
LHP	12	+++	2	99-100	99.5 ± 0.71
		++	3	87-88	87.67 ± 0.58
		+	4	50-70	62.75 ± 8.99
		-	3	32-36	33.67 ± 2.08
LHO	1	++	1	-	42

+++ : Très fertile.

++ : Moyennement fertile.

+ : Faiblement fertile.

- : Non fertile.

Tableau VII : Teneurs en NO dans différents liquides hydatiques humains (n=33) en fonction de la localisation kystique et du degré de fertilité.

Localisations des kystes hydatiques	n	Degré de fertilité en protoscolex	n	Rang μM	Moyenne $\mu\text{M} \pm \text{SD}$
LHF	12	+++	3	215-280.5	239.33 \pm 35.85
		++	3	81.25-100	95 \pm 9.38
		+	5	22.5-32.5	27.08 \pm 4.12
		-	1	-	15
LHP	20	+++	7	82.5-185	122.05 \pm 35.56
		++	7	30.25-51.67	38.12 \pm 8.88
		+	3	11.87-15	13.12 \pm 1.65
		-	3	-	0
LHC	1	++	1	-	23.75

+++ : Très fertile.

++ : Moyennement fertile.

+ : Faiblement fertile.

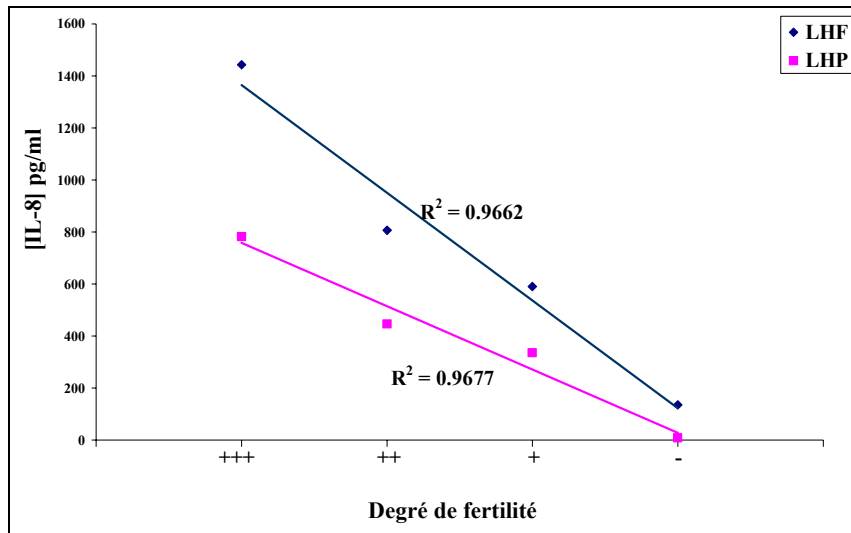
- : Non fertile.

- **Production des trois biomolécules en fonction de la fertilité des liquides hydatiques:**

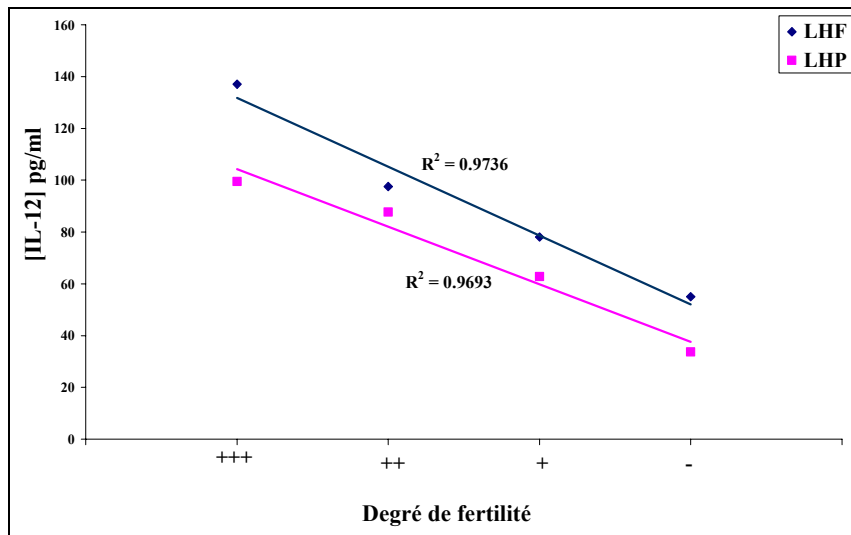
Nous avons également noté une variabilité dans les taux (de NO, d'IL-12 et d'IL-8) enregistrés selon la fertilité des kystes en protoscolex. En effet, il semble exister une relation directe entre la fertilité évaluée selon la densité en protoscolex. Cette fertilité est également en relation avec beaucoup d'autres facteurs tels que la taille du kyste, la concentration protéique dans le liquide hydatique et l'immunoréactivité à l'égard de sérums de patients hydatiques (testée par IEP et IDD). Nous avons établi selon ces paramètres quatre niveaux de fertilité (du très fertile (+++) au non fertile (-)).

La concentration des trois biomolécules diminue proportionnellement (selon une corrélation linéaire) avec le degré de fertilité des kystes hépatiques et pulmonaires (avec des coefficients de corrélation allant de **0.8487** à **0.9736**) (**Fig. 28A, B et C**). En effet, les teneurs en IL-8 passent respectivement de **1443.5 ± 289.15 pg/ml** à **135 ± 14.14 pg/ml** dans des liquides hépatiques très fertiles et non fertiles. Elles subissent donc une réduction de l'ordre de **10.5** fois.

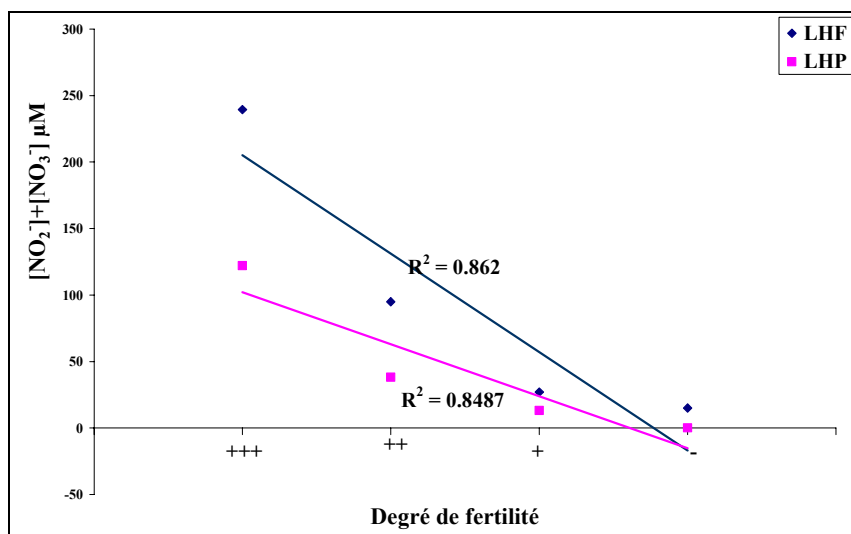
L'ensemble de ces données suggère que la diffusion des trois biomolécules à l'intérieur des kystes ne serait pas le fait d'une sélection aléatoire sans aucun critère de limitation. Elle serait régie par des paramètres anatomiques et physiologiques (interaction hôte -parasite) dont ceux de la localisation et de la fertilité kystique.



- A -



- B -



- C -

Figure 28 : Relation entre la concentration en IL-8 (A), en IL-12 (B), en NO (C) et le degré de fertilité des différents liquides hydatiques (du foie et du poumon humain).

+++ : Très fertile, ++ : Moyennement fertile, + : Faiblement fertile, - : Non fertile

V- ETUDE DE LA PRODUCTION *IN VITRO* DE L'IL-8, DE L'IL-12 ET DU NO AU NIVEAU DES CULTURES DE PBMC INDUITES AVEC LES DEUX ANTIGENES F5 ET P50 :

L'étude *in vitro* a porté sur l'aptitude des cellules mononuclées circulantes à produire de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO sous l'action de deux effecteurs antigéniques : la **F5** et la **P50** (à **10 µg/ml**). Les PBMC ont été préparées à partir de sang de patients atteints d'hydatidose hépatique et pulmonaire (avant et après extirpation chirurgicale) (**n=15**) et de donneurs sains (**n=7**).

- **Observation microscopique des cultures cellulaires :**

L'observation microscopique montre une différence nette entre les cultures cellulaires préparées à partir du sang de sujets pathologiques et sains. En effet, dans le premier groupe la culture montre une densité et une taille cellulaire plus importante en comparaison aux cultures témoins (contrôles).

Il apparaît également que la densité cellulaire ainsi que le nombre de cellules en division augmentent après induction (de 2/3). Cet état est plus accentué dans les cultures induites par la F5. Signalons toutefois, que la P50 induit un état prolifératif plus important en comparaison au système non induit (**Fig. 29**).

- **Production de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO au niveau des patients et des sujets sains:**

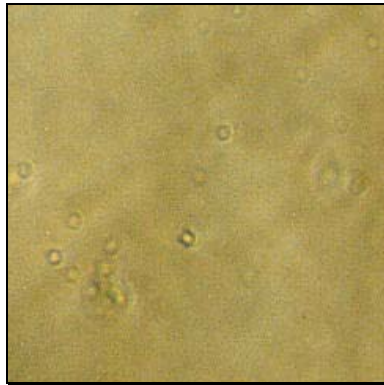
Toutes les cultures réalisées avec les PBMC de patients hydatiques ont montré une production significative d'IL-8, d'IL-12 et de NO. De plus, les teneurs de ces trois biomolécules n'atteignent en aucun cas des valeurs substantielles au niveau des cultures de PBMC de donneurs sains. En effet, les teneurs enregistrées en IL-8 relatives aux PBMC de patients (au stade pré-opératoire) sont **33.14** fois supérieures à celles relatives aux contrôles. Pour l'IL-12 et le NO, elles sont respectivement de l'ordre de **4.75** fois et **2.77** fois plus élevées (**Tableau VIII, IX et X**).

- **Production des trois biomolécules selon le stade clinique :**

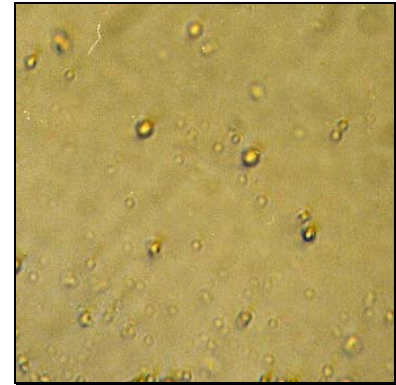
L'intensité de production des trois biomolécules semble également être associée au stade clinique. En effet, elle est en faveur du stade post-opératoire pour la production cytokinique (avec respectivement des moyennes de l'ordre de **998.5 ± 106.3 pg/ml** et de **138.09 ± 26.6 pg/ml** pour l'IL-8 et l'IL-12) (**Fig 30A et B, Tableau VIII et IX**).

Le taux de production de monoxyde d'azote est atténué après exérèse kystique. En effet, il passe de **64.76 ± 14.54 µM** à **48.28 ± 14.48 µM** au stade post-opératoire (**Fig. 30C, Tableau X**).

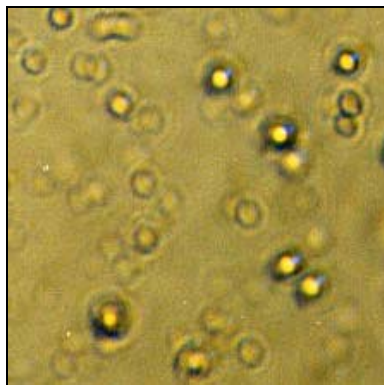
Les profils obtenus *in vitro* pour les trois biomolécules en fonction du stade clinique corroborent les résultats obtenus *in vivo* (**Fig.22-24 et Tableau I-III**).



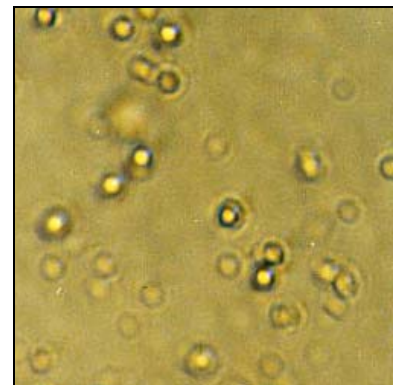
A : Avant incubation



B : Après 20h d'incubation
(sans induction)



C : Après incubation avec la F5



D : Après incubation avec la P50

Figure 29: Aspect morphologique sous microscope photonique des PBMC de sujets hydatiques mises en culture en absence et en présence de 10 µg/ml de F5 ou de P50 (G x 430).

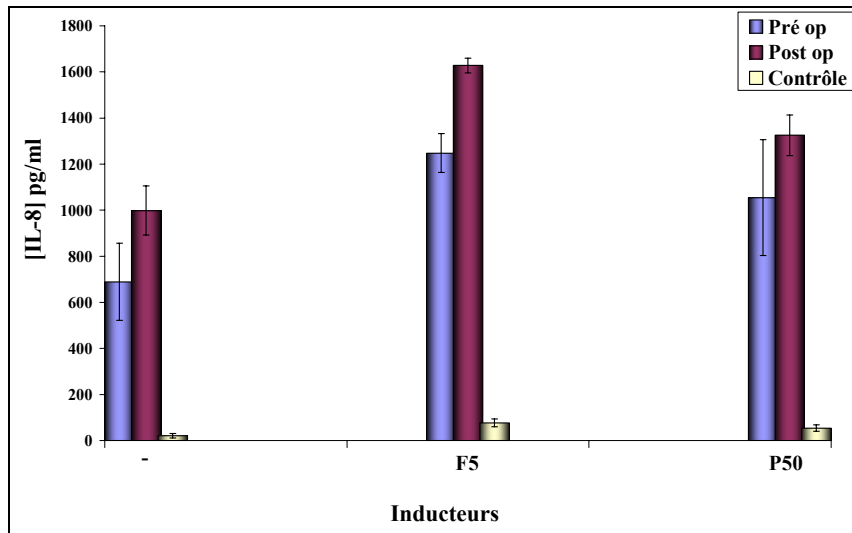
- Effet de la F5 et de la P50 sur la production *in vitro* des trois biomolécules :

Les deux agents inducteurs ont un effet positif dans l'induction des trois biomolécules. Toutefois cette production est enregistrée, à des taux différents selon la nature de l'antigène inducteur.

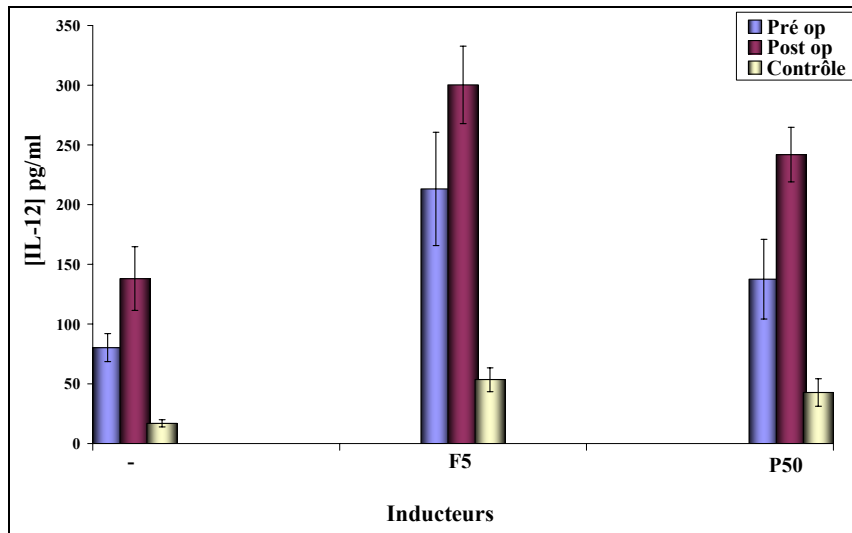
L'**antigène 5** est un meilleur agent inducteur pour les cytokines et le NO (**Fig. 31**). En effet, il engendre des concentrations substantielles des trois médiateurs (avec des taux allant de **1140 pg/ml** à **1321 pg/ml** pour l'IL-8, de **170.28 pg/ml** à **285.71 pg/ml** pour l'IL-12 et de **80 µM** à **135 µM** pour le NO).

Bien que l'antigène 5 induise les taux de production les plus élevés, nous avons noté avec intérêt les teneurs particulièrement importantes en cytokines et en NO induites par la **P50** (**Fig.31**). En effet ces valeurs demeurent largement supérieures à celles enregistrées pour les systèmes non induits (**Fig. 30**). La moyenne des valeurs enregistrées après stimulation par cette fraction est respectivement de l'ordre de **1054.25 ± 251.48 pg/ml**, de **137.62 ± 33.34 pg/ml** et de **91.9 ± 12.92 µM** pour l'IL-8, l'IL-12 et le NO. Ces valeurs sont respectivement **1.18** fois, **1.55** fois et **1.26** fois inférieures à celles mesurées dans les surnageants de cultures de PBMC stimulées par la F5. De même, elles sont **1.52** fois, **1.71** fois et **1.41** fois supérieures à celles enregistrées pour les cultures non induites (**Tableau VIII-X**).

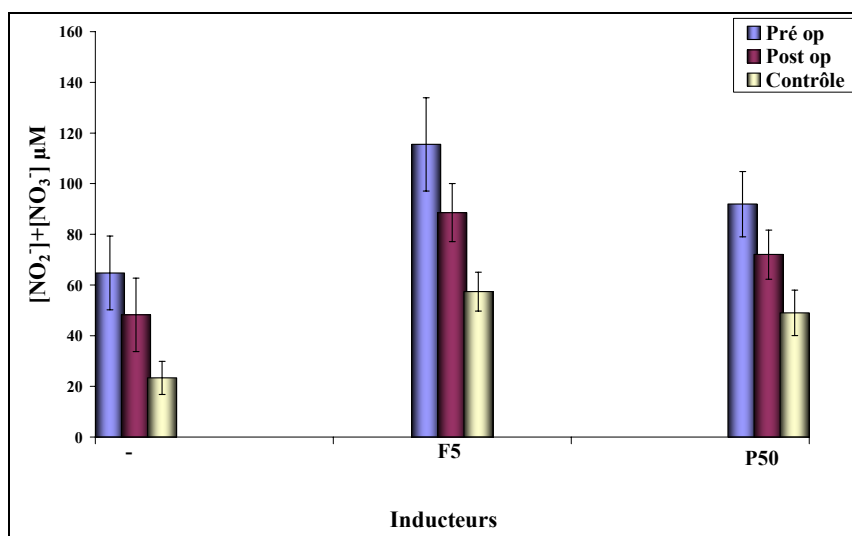
Signalons toutefois, que les mêmes observations sont rapportées pour les surnageants correspondants au stade post-opératoire et aux tests « contrôles ».



- A -

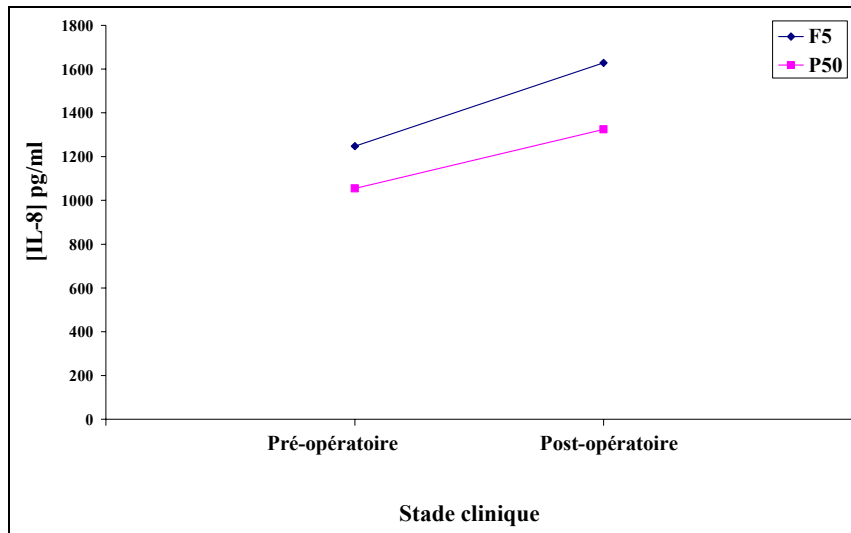


- B -

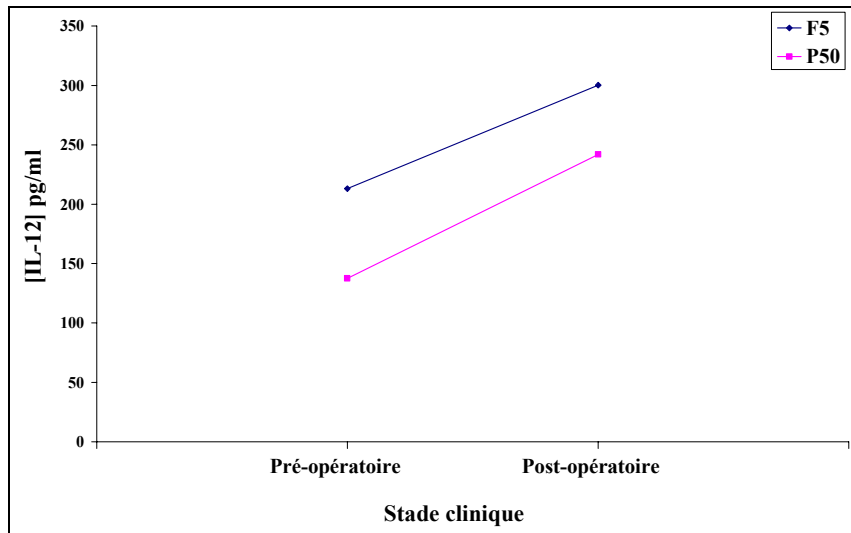


- C -

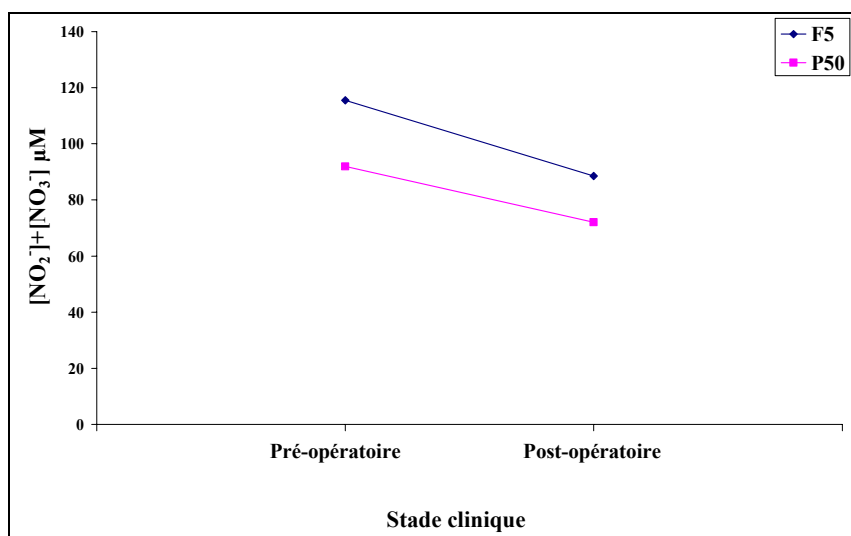
Figure 30 : Teneurs en IL-8 (A), en IL-12 (B) et en NO (C) dans les surnageants de culture des PBMC de patients hydatiques et de sujets sains induites avec la F5 et la P50.



- A -



- B -



- C -

Figure 31 : Rapport F5/P50 et teneurs en IL-8 (A), en IL-12 (B) et en NO (C) dans les surnageants de culture de PBMC de sujets hydatiques avant et après exérèse kystique.

VI- ETUDE DE L'EFFET DE L'IFN- γ (10 et 100 UI/ml) SUR LA PRODUCTION *IN VITRO* DE L'IL-8, DE L'IL-12 ET DU NO AU NIVEAU DES CULTURES DE PBMC INDUITES AVEC LES 2 ANTIGENES F5 ET P50 :

Compte tenu du rôle que joue l'IFN- γ dans l'induction de la production d'IL-8 (Matsushima et *al.*, 1988), d'IL-12 (Trinchieri, 1995) et de NO (Drapier et *al.*, 1988b) et des titres relativement élevés en IFN- γ enregistrés au niveau des sérums et des surnageants de culture de PBMC de sujets hydatiques (Touil-Boukoffa et *al.*, 1998 ; Mezioug, 2002 ; Ait Aissa, 2002), il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de l'IFN- γ sur la production des trois biomolécules. Cette étude a été complétée par l'utilisation simultanée des antigènes solubles de l'hydatide (F5 et P50) et de l'IFN- γ afin d'évaluer une éventuelle relation entre les deux systèmes inducteurs (antigénique et cytokinique).

- **Effet de l'IFN- γ sur la production *in vitro* des trois biomolécules :**

Comme pour tous les systèmes d'induction précédemment établis, les teneurs mesurées pour les trois biomolécules sont plus élevées au niveau des surnageants de culture de PBMC de sujets pathologiques (**Tableau VIII-X**). Il apparaît également que le stade clinique influence toujours la production des deux cytokines (**Fig. 32A-B et 33A-B**) et du NO (**Fig. 32 et 33C**).

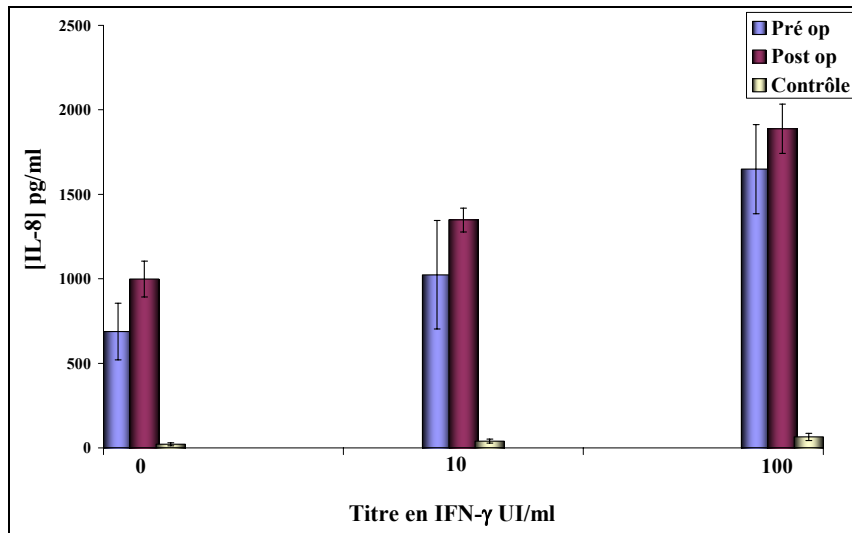
Par ailleurs, il semble que la production des trois biomolécules suit une progression linéaire après induction par des concentrations croissantes d'IFN- γ (**0- 10 et 100 UI/ml**) (avec des coefficients de corrélation allant de **0.9704** à **0.9996**) (**Fig. 33**). En effet, les valeurs enregistrées pour l'IL-8 augmentent respectivement de **1.48** fois et de **2.39** fois après induction par **10 UI/ml** et **100 UI/ml** d'IFN- γ . La même hausse est observée avec les deux autres biomolécules (avec respectivement des rapports de **1.47** et **1.75** pour l'IL-12 et de **1.88** et **2.82** pour le NO).

- **Effet de l'adjonction simultanée d'un effecteur cytokinique (l'IFN- γ) et antigénique (F5/P50) sur la production *in vitro* des trois biomolécules :**

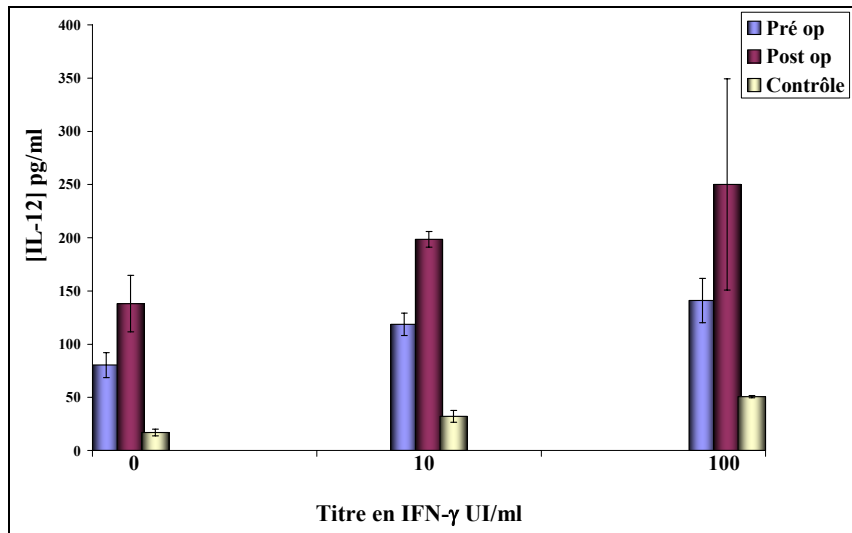
L'induction simultanée des PBMC par l'IFN- γ et la F5 ou la P50 augmente dans tous les cas la production des trois biomolécules initialement induites par l'effecteur cytokinique ou antigénique seul (**Fig. 34-36**). Pour la production d'IL-8, cette hausse est de l'ordre de **1.08** fois en moyenne après induction par les deux effecteurs (F5 et IFN- γ à **100 UI/ml**) en comparaison des cultures induites par la F5 seule (**Tableau VIII**).

Nous avons noté avec intérêt les mêmes hausses pour la production d'IL-12 et de NO (**Tableau IX, X et XI**).

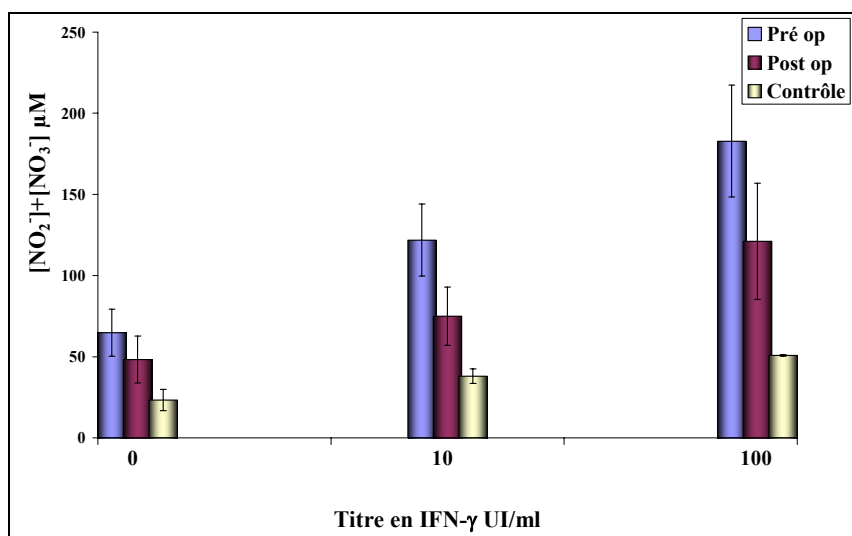
Par ailleurs, il faut signaler que ces observations ont été rapportées également pour les inductions réalisées avec la P50 et l'IFN- γ à **10 UI/ml** (seul ou en combinaison avec la F5 ou la P50). Elles sont perçues aussi bien au niveau des deux stades cliniques que des contrôles.



- A -

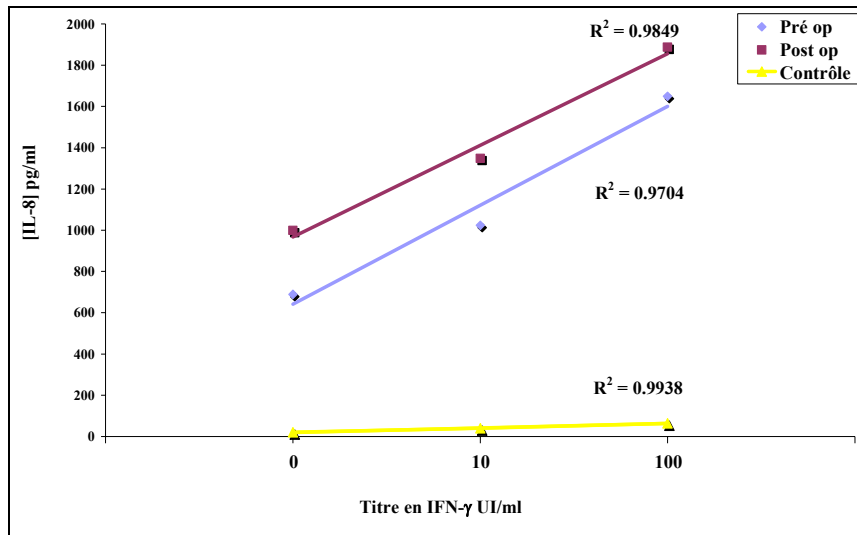


- B -

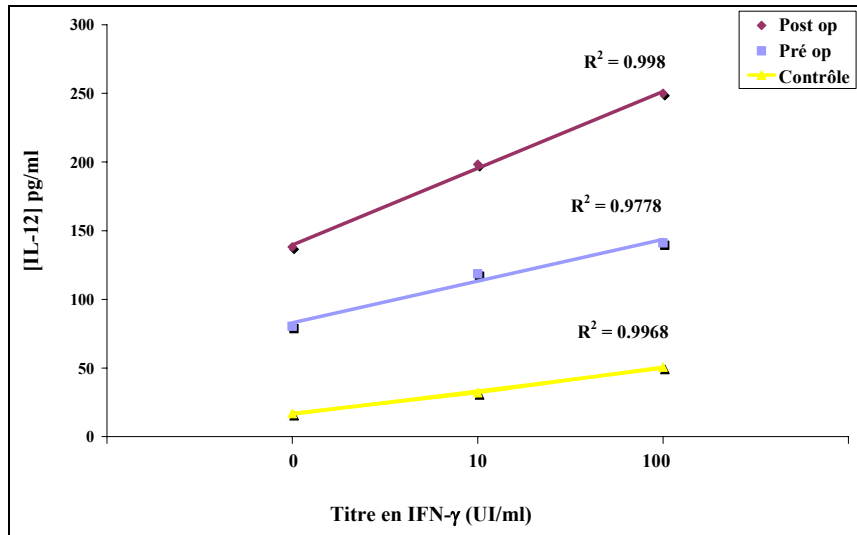


- C -

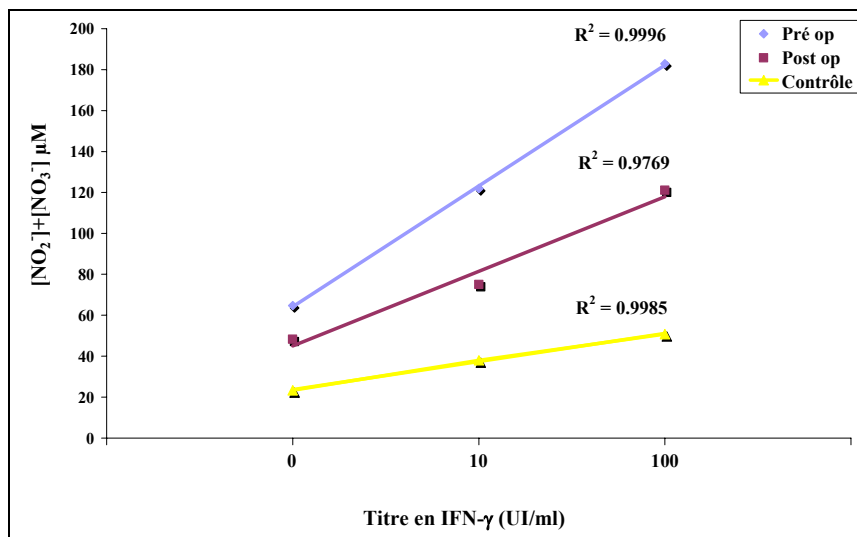
Figure 32 : Teneurs en IL-8 (A), en IL-12 (B) et en NO (C) dans les surnageants de culture de PBMC (de sujets hydatiques et sains) induites avec l'IFN- γ (10 UI/ml et 100 UI/ml)



- A -

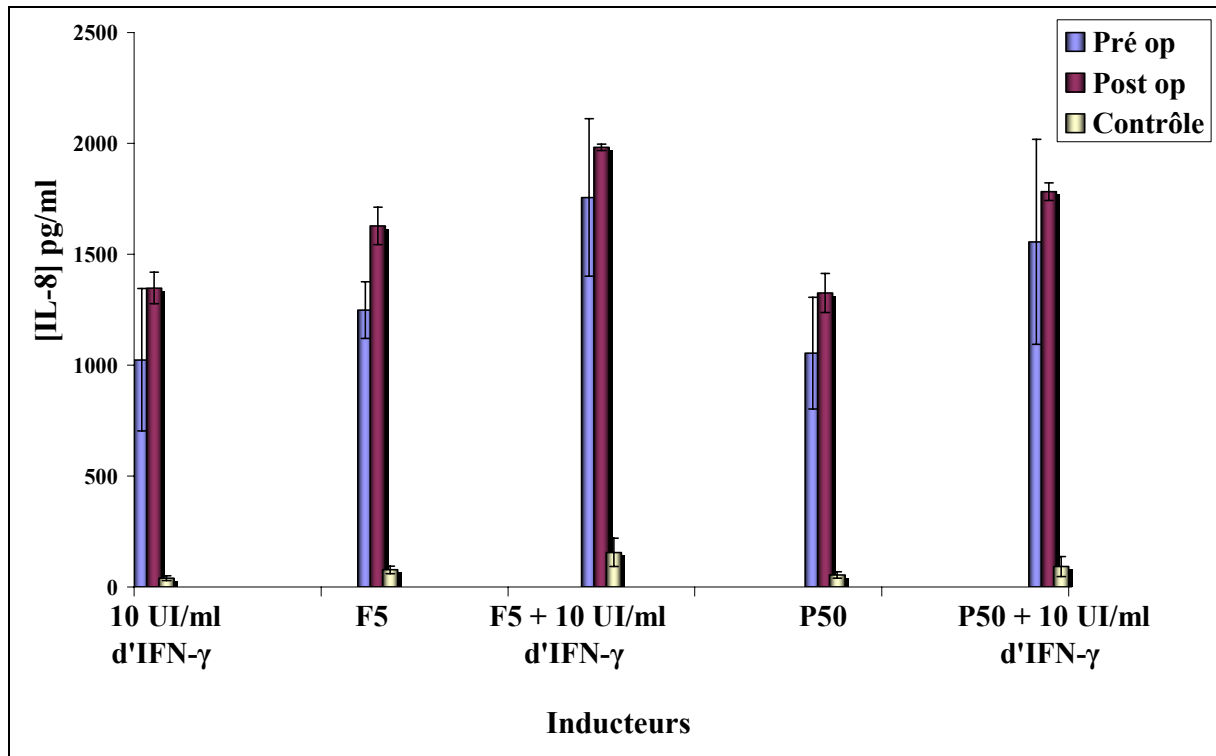


- B -

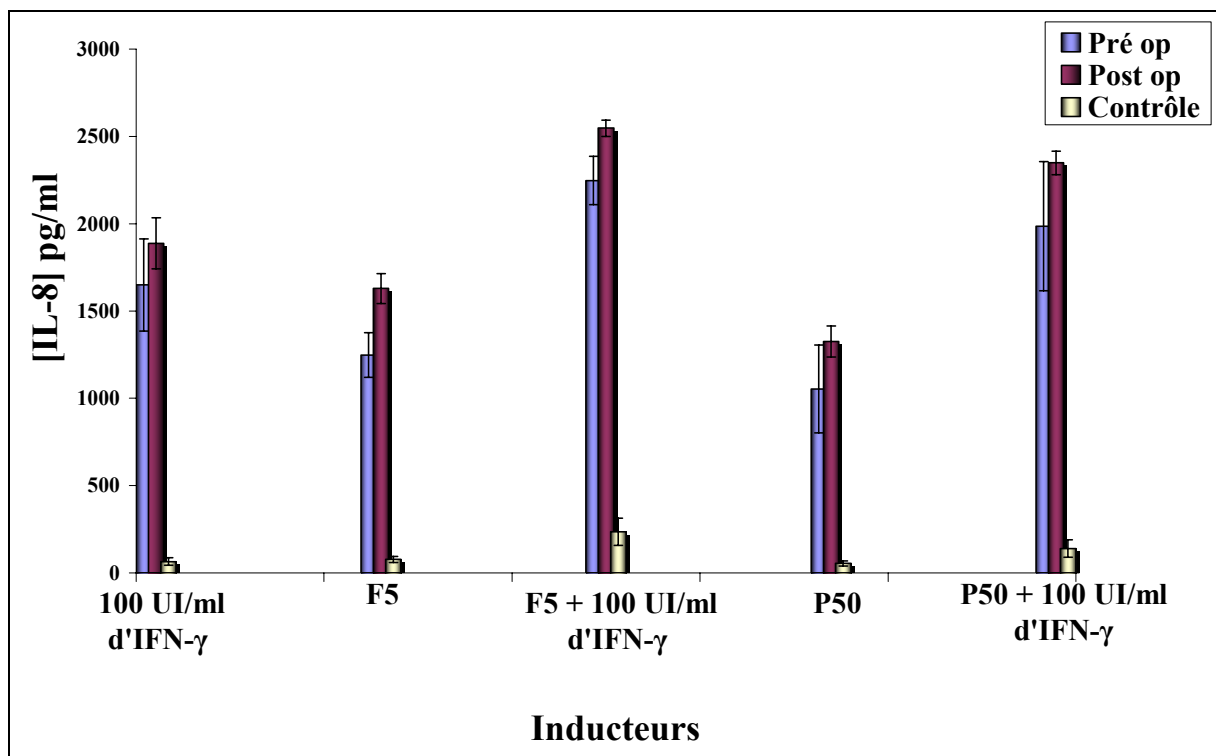


- C -

Figure 33 : Relation entre la production d'IL-8 (A), d'IL-12 (B) et de NO (C) et les titres d'IFN-γ utilisés pour l'induction des cultures de PBMC (de sujets hydatiques et sains).



- A -

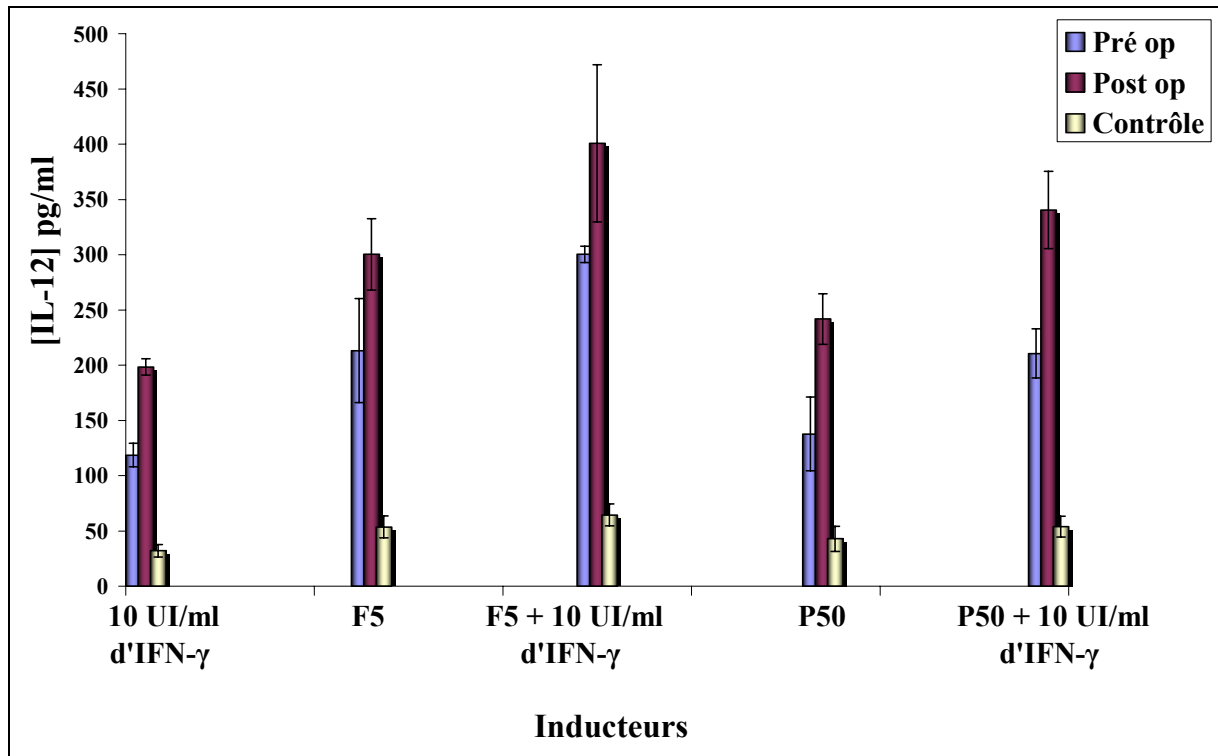


- B -

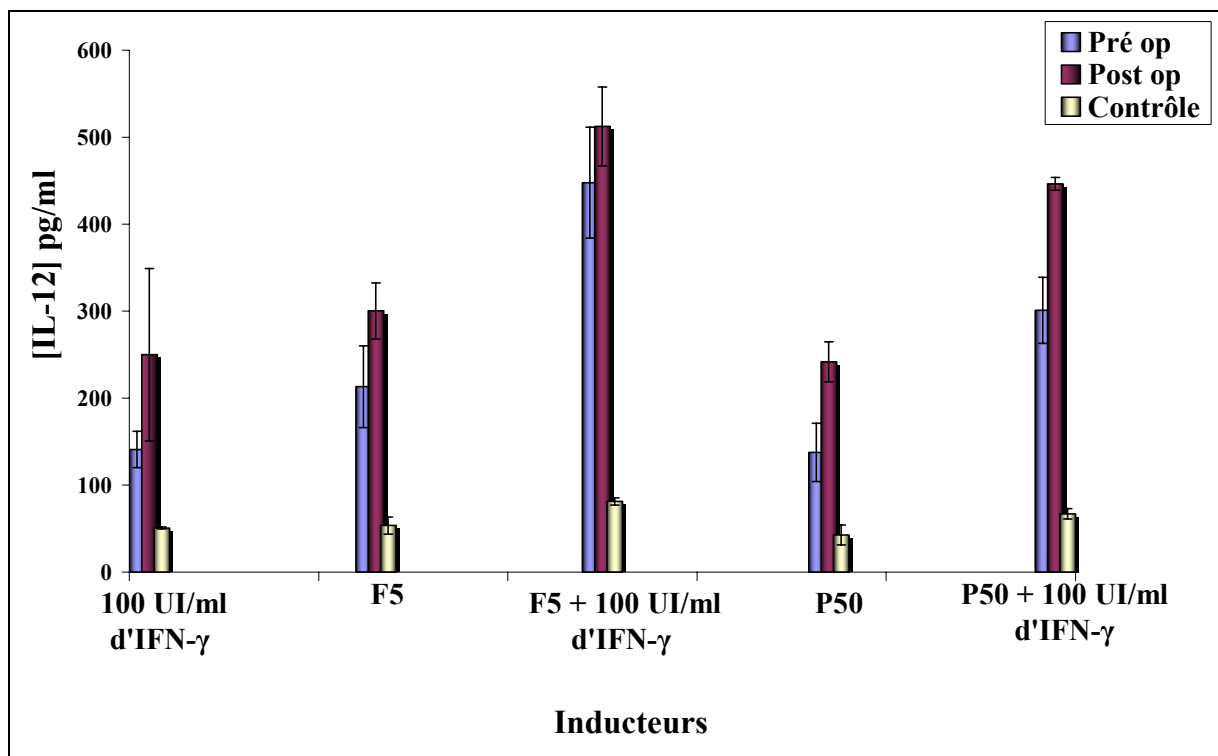
Figure 34 : Teneurs en IL-8 dans les surnageants de culture de PBMC (de patients hydatiques et sains) induites par la F5 et la P50 et/ou l'IFN-γ à 10 UI/ml (A) et à 100 UI/ml (B).

Tableau VIII : Production de l'IL-8 au niveau des PBMC de sujets sains et hydatiques stimulées par la F5 et la P50 (10 µg/ml) et/ou l'IFN-γ (10 UI/ml et 100 UI/ml).

Stimulation	Patients atteints d'hydatidose				Donneurs sains n=7	
	Stade Pré-opératoire n=15		Stade Post-opératoire n=15		Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml
	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml		
-	517-754	689.23 ± 167.56	860.5- 1010.5	998.5 ± 106.3	10.5- 35.75	20.8 ± 9.46
+ 10 UI/ml d'IFN-γ	850-1345	1024 ± 320.85	1300- 1400.25	1348 ± 70.71	20.5- 50.5	39.49 ± 11.31
+ 100 UI/ml d'IFN-γ	1414.75- 1789	1649 ± 264.28	1754-1938	1888 ± 146.42	50.5-101	64.1 ± 21.74
+ F5	1140-1321	1248 ± 127.96	1585-1705	1628 ± 84.85	55-98	77.05 ± 17.04
+ F5 + 10 UI/ml d'IFN-γ	1487-1987	1756.25 ± 354.44	1989- 2010.5	1982.25 ± 13.89	101- 261.66	155.08 ± 63.97
+ F5 + 100UI/ml d'IFN-γ	2149.25- 2344.25	2246.75 ± 137.88	2511.75- 2580	2547.12 ± 46.84	141.75- 324.25	235.48 ± 21.74
+ P50	854-1200	1054.25 ± 251.48	1287- 1405.75	1325 ± 88.39	30-69	54.1 ± 14.48
+ P50 + 10 UI/ml d'IFN-γ	1224-1824	1556.23 ± 462.27	1723-1800	1782.25 ± 38.89	49.25- 164.25	91.64 ± 44.79
+ P50 + 100UI/ml d'IFN-γ	1723- 2246.55	1984.77 ± 370.2	2300.5- 2395	2347.75 ± 66.82	66.75- 186.66	138.98 ± 50.4



- A -

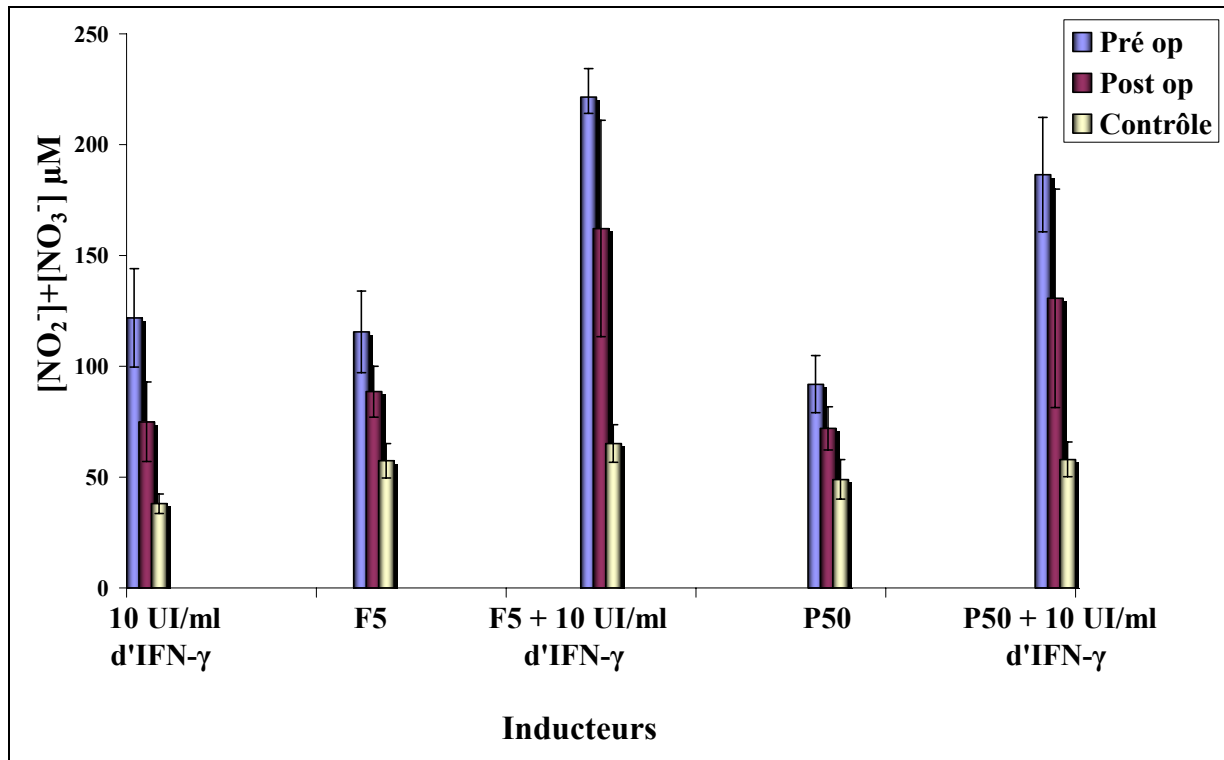


- B -

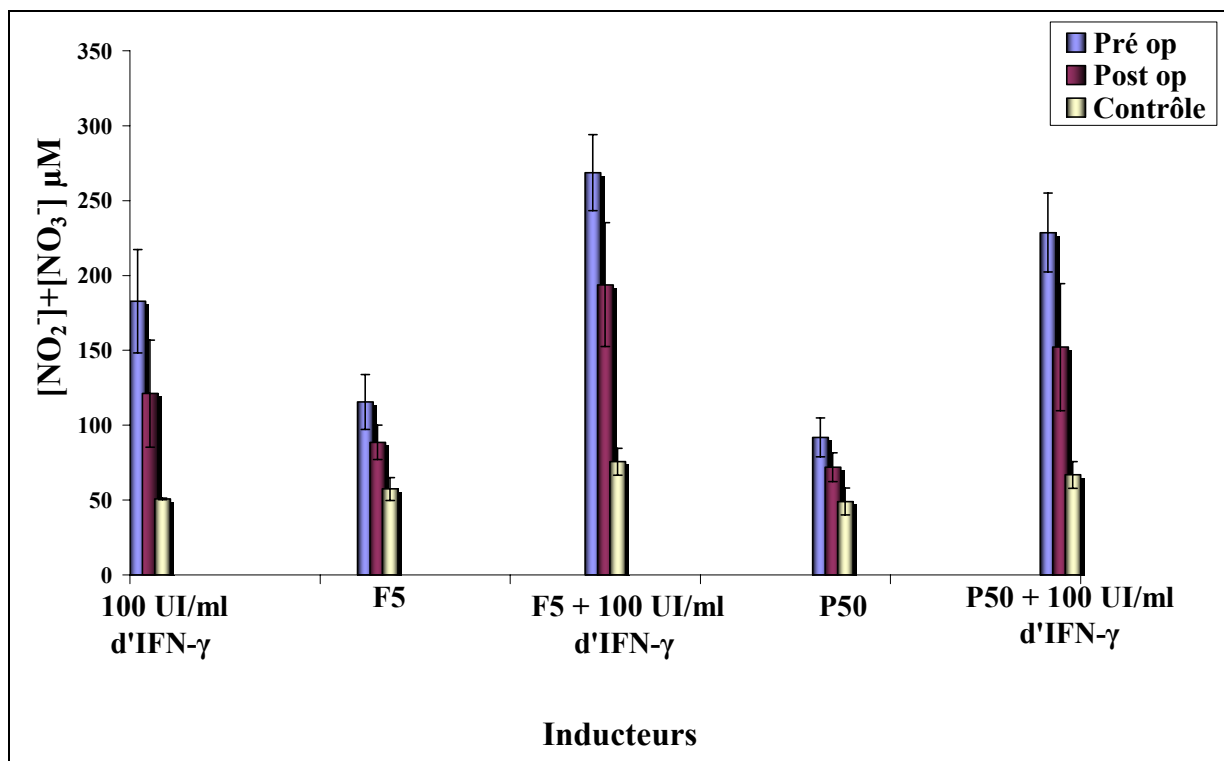
Figure 35 : Teneurs en IL-12 dans les surnageants de culture de PBMC (de patients hydatiques et sains) induites par la F5 et la P50 et/ou l'IFN- γ à 10 UI/ml (A) et à 100 UI/ml (B).

Tableau IX : Production de l'IL-12 au niveau des PBMC de sujets sains et hydatiques stimulées par la F5 et la p50 (10 µg/ml) et/ou l'IFN-γ (10 UI/ml et 100 UI/ml).

Stimulation	Patients atteints d'hydatidose				Donneurs sains n=7	
	Stade Pré-opératoire n=15		Stade Post-opératoire n=15		Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml
	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml	Rang pg/ml	Moyenne ± SD pg/ml		
-	71.43- 100.28	80.25 ± 11.71	114.28- 171.43	138.09 ± 26.6	12.5-20	16.9 ± 3.09
+++++ 10 UI/ml d'IFN-γ	114.28-140	118.57 ±10.5	128.57- 142.86	198.33 ±7.38	25-40	32.1 ± 5.57
+ 100 UI/ml d'IFN-γ	128.57-180	141.04 ± 20.85	142.86- 357.14	250 ±99.28	49-52	50.6 ± 1.14
+ F5	170.28- 285.71	213.16 ±47.02	235-314.28	300.25 ±32.36	37.5-61	53.5 ± 9.96
+ F5 + 10 UI/ml d'IFN-γ	242.86- 257.14	300.25 ±7.37	271.43- 428.57	400.86 ±71.14	50-75	64.4 ±9.91
+ F5 + 100UI/ml d'IFN-γ	400-514.28	447.62 ± 63.67	420.12- 528.57	512.49 ±45.5	76-87.5	81.1 ± 1.14
+ P50	85.71- 185.71	137.62 ±33.34	225.57- 271.43	241.85 ±22.94	25-44	42.8 ± 9.96
+ P50 + 10 UI/ml d'IFN-γ	157.14-200	210.56 ± 22.13	200-285.71	340.45 ±34.99	37.5-60	53.7 ± 9.39
+ P50 + 100UI/ml d'IFN-γ	357.14- 457.14	300.98 ± 38.06	442.86-460	446.43 ±7.43	60-75	67.1 ±5.94



- A -



- B -

Figure 36 : Teneurs en NO dans les surnageants de culture de PBMC (de patients hydatiques et sains) induites par la F5 et la P50 et/ou l'IFN- γ à 10 UI/ml (A) et à 100 UI/ml (B).

Tableau X : Production de NO au niveau des PBMC de sujets sains et hydatiques stimulées par la F5 et la P50 (10 µg/ml) et/ou l'IFN-γ (10 UI/ml et 100 UI/ml).

Stimulation	Patients atteints d'hydatidose				Donneurs sains n=7	
	Stade Pré-opératoire n=15		Stade Post-opératoire n=15			
	Rang µM	Moyenne ± SD µM	Rang µM	Moyenne ± SD µM	Rang µM	Moyenne ± SD µM
-	50-85	64.76 ± 14.54	30-70	48.28 ± 14.48	15-30	23.33 ± 6.56
+ 10 UI/ml d'IFN-γ	90-140	121.86 ± 22.23	55-95	75 ± 18.03	30-40	38 ± 4.47
+ 100 UI/ml d'IFN-γ	150-250	182.86 ± 34.5	80-170	121.14 ± 35.74	50-51	50.8 ± 0.45
+ F5	80-135	115.47 ± 18.38	70-105	88.57 ± 11.44	49-67	57.4 ± 7.7
+ F5 + 10 UI/ml d'IFN-γ	200-235	221.43 ± 12.82	95-205	162.14 ± 48.81	54-75	65.2 ± 8.53
+ F5 + 100UI/ml d'IFN-γ	250-310	268.57 ± 25.45	140-250	193.86 ± 41.52	60-82	75.6 ± 8.99
+ P50	65-100	91.9 ± 12.92	60-88	72 ± 9.68	40-60	49 ± 8.94
+ P50 + 10 UI/ml d'IFN-γ	140-205	186.43 ± 25.77	90-185	130.71 ± 49.28	49-70	58 ± 7.84
+ P50 + 100UI/ml d'IFN-γ	200-270	228.57 ± 26.41	105-215	152.14 ± 42.51	55-75	66.8 ± 9.01

Tableau XI: Effet additif de l'IFN- γ (100 UI/ml) sur la production de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO induite par l'effecteur antigénique seul (F5 ou P50).

Stimulation	Patients atteints d'hydatidose						Donneurs sains n=7		
	Stade Pré-opératoire n=15			Stade Post-opératoire n=15			IL-8 pg/ml	IL-12 pg/ml	NO μ M
	IL-8 pg/ml	IL-12 pg/ml	NO μ M	IL-8 pg/ml	IL-12 pg/ml	NO μ M			
+ 100 UI/ml d'IFN- γ	1649 \pm 264.28	141.04 \pm 20.85	182.86 \pm 34.5	1888 \pm 146.42	250 \pm 99.28	121.14 \pm 35.74	64.1 \pm 21.74	50.6 \pm 1.14	50.8 \pm 0.45
+ F5	1248 \pm 127.96	213.16 \pm 47.02	115.47 \pm 18.38	1628 \pm 84.85	300.25 \pm 32.36	88.57 \pm 11.44	77.05 \pm 17.04	53.5 \pm 9.96	57.4 \pm 7.7
+ F5 + 100UI/ml d'IFN- γ	2246.75 \pm 137.88	447.62 \pm 63.67	268.57 \pm 25.45	2547.12 \pm 46.84	512.49 \pm 45.5	193.86 \pm 41.52	235.48 \pm 21.74	81.1 \pm 1.14	75.6 \pm 8.99
+ P50	1054.25 \pm 251.48	137.62 \pm 33.34	91.9 \pm 12.92	1325 \pm 88.39	241.85 \pm 22.94	72 \pm 9.68	54.1 \pm 14.48	42.8 \pm 9.96	49 \pm 8.94
+ P50 + 100UI/ml d'IFN- γ	1984.77 \pm 370.2	300.98 \pm 38.06	228.57 \pm 26.41	2347.75 \pm 66.82	446.43 \pm 7.43	152.14 \pm 42.51	138.98 \pm 50.04	67.1 \pm 5.94	66.8 \pm 9.01

VII- ETUDE DE L'EFFET DU LIQUIDE HYDATIQUE ET DES PROTOSCOLEX SUR LA PRODUCTION *IN VITRO* DE NO. IMPACT SUR LA VIABILITE DES CELLULES ET DES PROTOSCOLEX :

Dans ce volet de notre travail, l'étude a porté essentiellement sur l'effet de l'antigène total soluble (liquide hydatique) et figuré (protoscolex) sur la production du NO par les PBMC de sujets hydatiques et sains.

VII-1 – Effet de concentrations croissantes de liquide hydatique sur la production de NO. Impact sur la viabilité des cellules :

La **figure 37** montre le résultat du dosage du NO produit par les PBMC stimulées avec des concentrations croissantes (**0 à 50 µg/ml**) de liquide hydatique.

Ces résultats révèlent le même profil de production des nitrites totaux pour les sujets malades en phase pré et post-opératoire et les donneurs sains. Ainsi, le maximum de production en NO est atteint pour une concentration de LH égale à **10µg/ml**. Au delà de cette concentration, une diminution progressive est signalée (avec une moyenne respectivement de **205 ± 64.16 µM** et de **121.25 ± 35.68 µM** pour le stade pré et post-opératoire) (**Fig. 37, Tableau XII**).

Par ailleurs, les taux enregistrés dans le cas des sujets malades (avant et après la chirurgie) sont plus élevés en comparaison aux contrôles (pour le stade pré-opératoire ils sont **3.52** fois plus élevés). De plus, il semblerait que le stade pré-opératoire soit en faveur de la production du NO (avec des taux qui sont **1.2** fois plus élevés avant l'exérèse kystique). Ces données sont toujours en faveur des résultats relatifs à la production du NO *in vitro* (au niveau des cultures de PBMC) et *in vivo* (au niveau sérique).

Afin d'estimer l'effet de l'addition du liquide hydatique sur la viabilité des cellules mononuclées et d'apporter une interprétation du profil de production de NO obtenu, nous avons pris soin d'évaluer le taux de viabilité des PBMC pour chaque culture cellulaire. Le profil représenté au niveau de la **figure 38** montre une augmentation rapide du nombre de cellules vivantes pour des concentrations en LH allant de **0 à 10 µg/ml**. Au delà de cette concentration, la densité cellulaire augmente légèrement entre chaque dose de LH pour être presque constante aux concentrations les plus élevées (**50 µg/ml**).

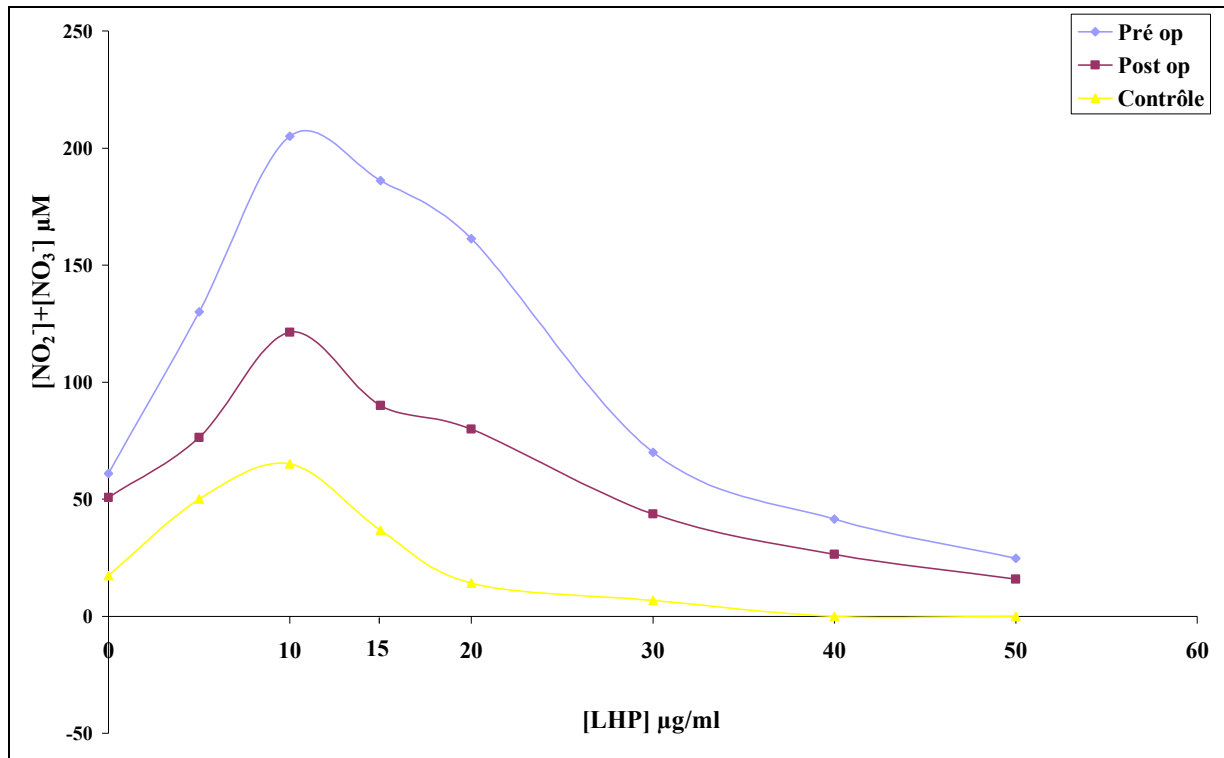


Figure 37 : Taux des nitrites totaux dans les surnageants de culture de PBMC induites par des concentrations croissantes de liquide hydatique du poumon humain.

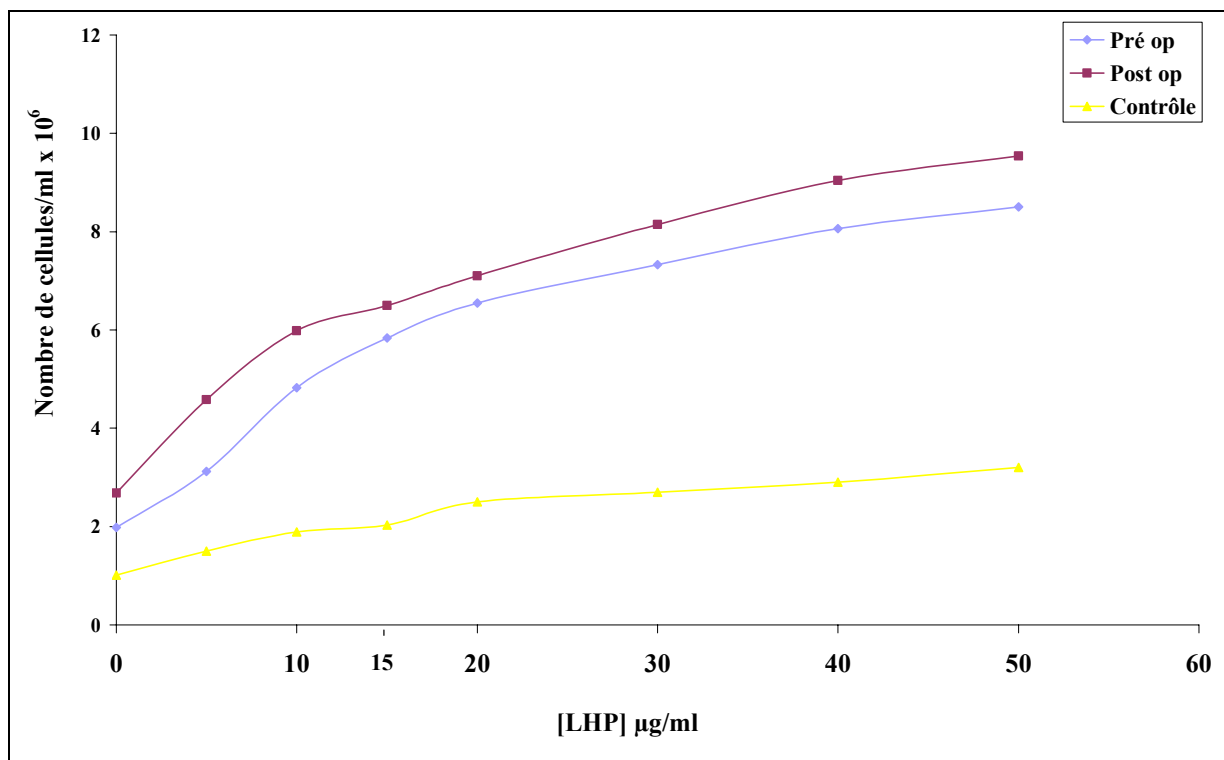


Figure 38 : Evolution de la concentration cellulaire (PBMC) sous l'action de concentrations croissantes de liquide hydatique du poumon humain.

Tableau XII : Production du NO au niveau des PBMC de sujets hydatiques et sains induites par des concentrations croissantes de liquide hydatique du poumon humain.

[LHP] µg/ml	Patients atteints d'Hydatidose				Donneurs sains n=5	
	Stade Pré-opératoire n=10		Stade Post-opératoire n=10		Rang µM	Moyenne µM ± SD
	Rang µM	Moyenne µM ± SD	Rang µM	Moyenne µM ± SD		
0	50-69	61 ± 8.2	40-60	50.62 ± 9.65	14-21	17.33 ± 2.52
5	120-150	130 ± 13.54	55-95	76.25 ± 17.5	40-55	50 ± 8.66
10	140-280	205 ± 64.16	85-170	121.25 ± 35.68	65	65 ± 0
15	130-264	186 ± 59.75	55-120	90 ± 26.77	30-45	36.67 ± 7.64
20	125-215	161.25 ± 39.45	50-110	80 ± 24.49	10-17.5	14.17 ± 3.82
30	60-90	70 ± 14.14	35-40	43.75 ± 7.5	05-08	6.83 ± 1.61
40	36-50	41.5 ± 5.97	25-27.5	26.37 ± 1.11	0	0
50	20-28	24.75 ± 3.4	15-17	15.75 ± 0.96	0	0

VII-2 – Effet de concentrations croissantes de protoscolex sur la production de NO. Impact sur la viabilité des PSC :

La mise en culture des PBMC de sujets sains et malades, en présence de concentrations croissantes de protoscolex (**100, 200, 400 et 800 PSC/ml**), révèle une augmentation dose dépendante pour la production des nitrites totaux (**Fig. 39 et 40, Tableau XIII**). En effet, il semble exister une relation entre le taux de NO produit et la concentration initiale en PSC. Cette corrélation suit une progression linéaire (avec des coefficients de corrélation allant de **0.9096 à 0.9745**) (**Fig. 40**).

Par ailleurs, la **figure 41** montre que le pourcentage de viabilité des PSC diminue progressivement pour des concentrations en NO allant de **93.75 ± 9.46 µM** à **210 ± 35.59 µM** (pour le stade pré-opératoire). Ces taux correspondent à un nombre de PSC entre **100 et 400 PSC/ml**. Au delà de ces concentrations, le pourcentage de viabilité augmente sensiblement. Ce dernier demeure toutefois inférieur à la viabilité initiale (**90%**).

De plus, nous avons noté avec intérêt l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre les taux de production de NO et la viabilité des protoscolex. En effet, la **figure 42** montre que la diminution de la concentration du NO est accompagnée d'une augmentation concomitante de la viabilité des PSC.

Il semble également que le niveau de production de NO soit associé à la pathologie et au stade clinique (**Fig. 39 et 40**).

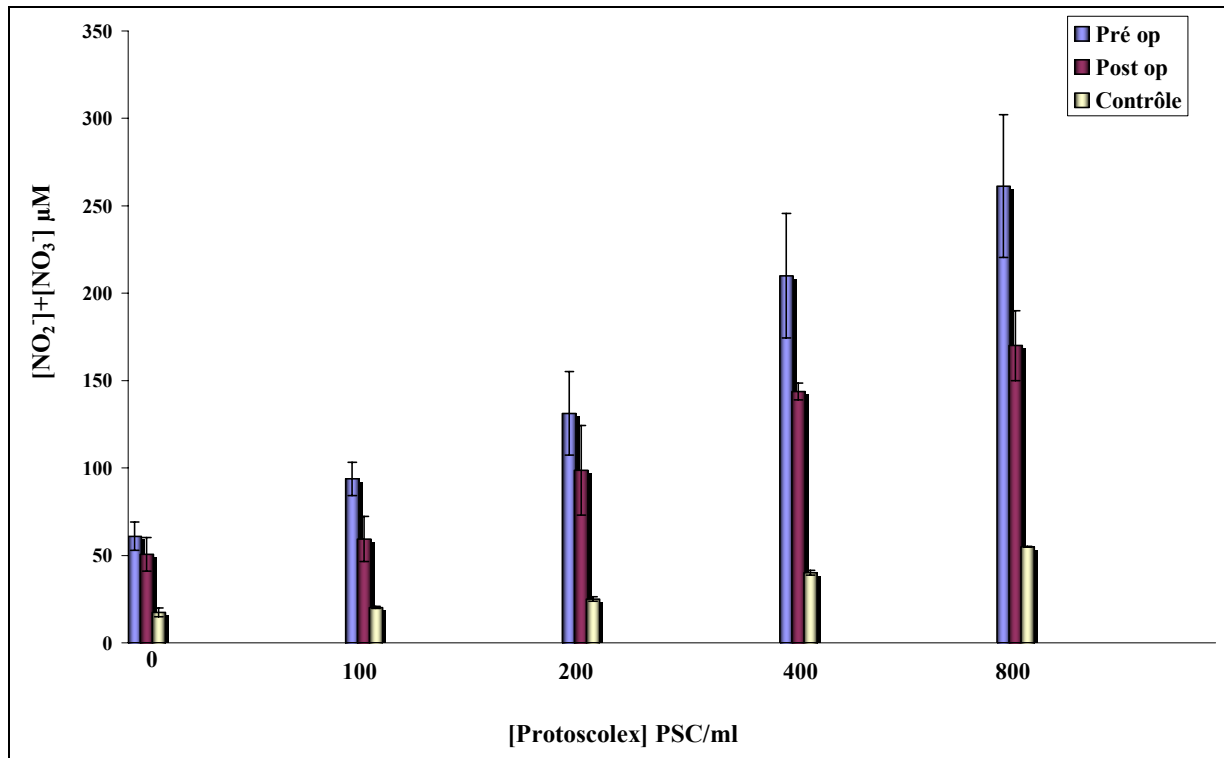


Figure 39 : Taux des nitrites totaux dans les surnageants de cultures de PBMC en présence de concentrations croissantes de protoscolex.

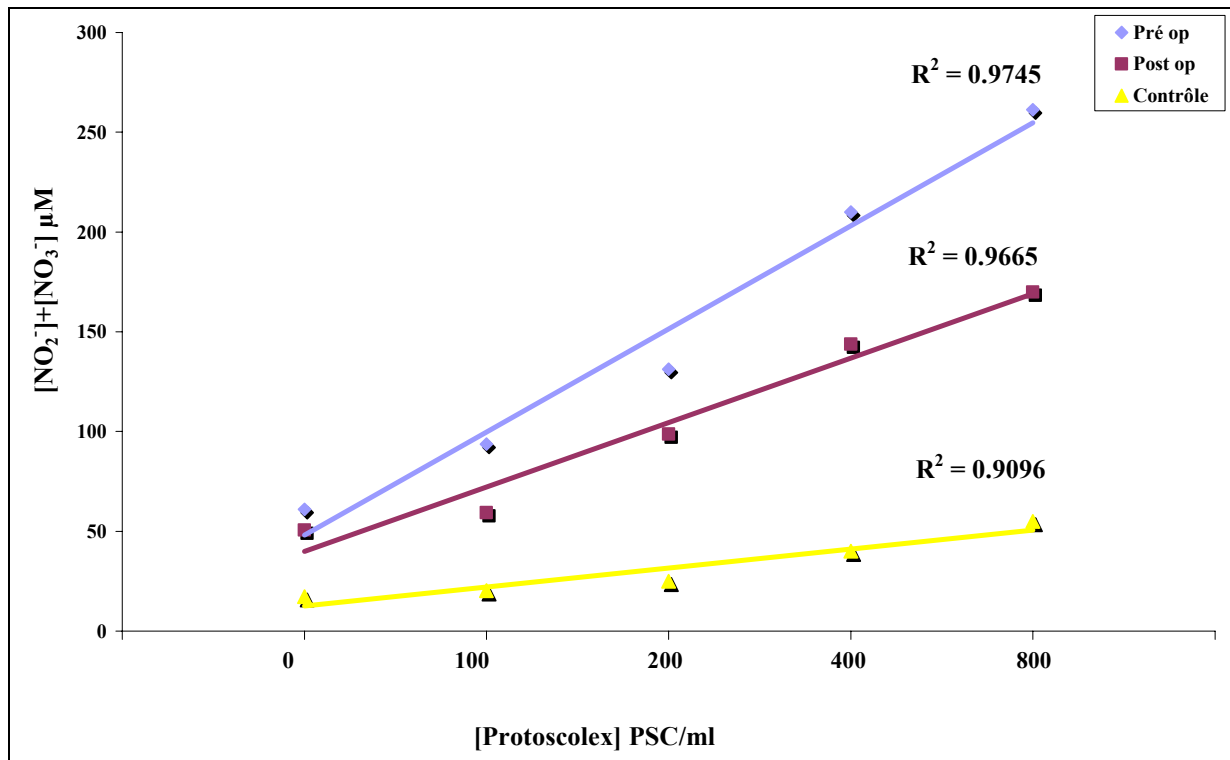


Figure 40 : Relation entre l'induction de la production de NO et la concentration initiale de protoscolex (PSC).

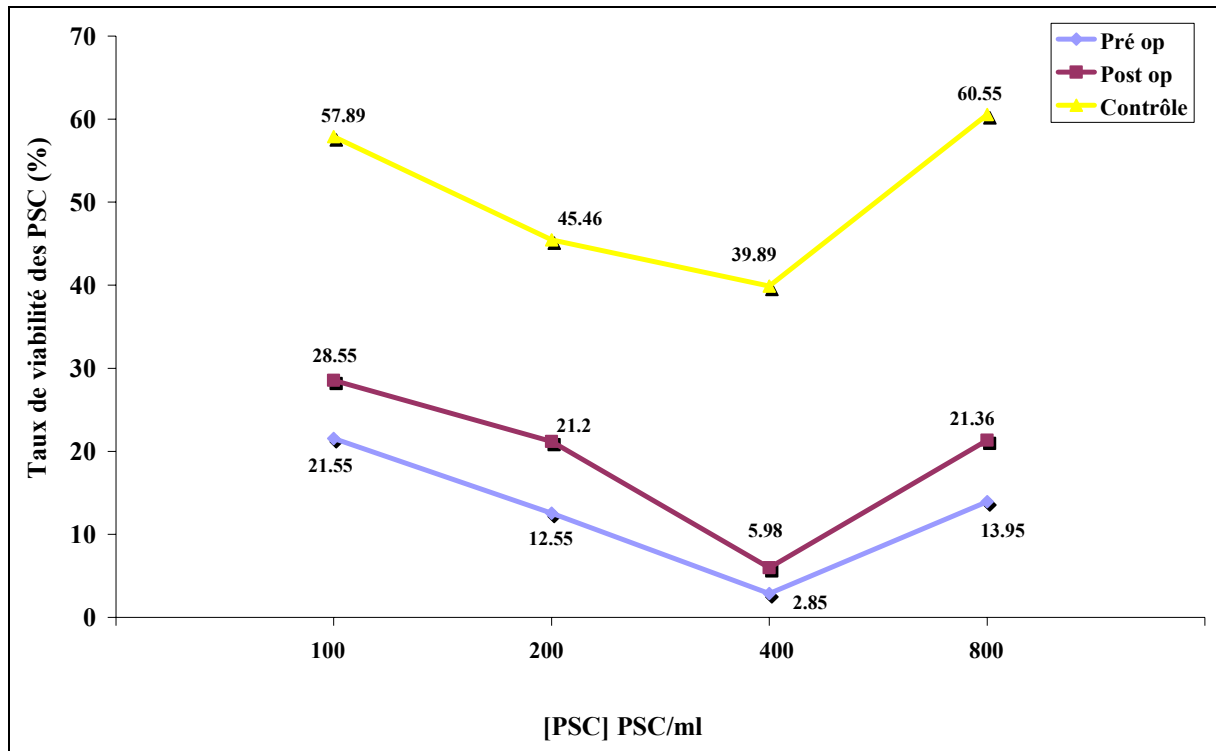


Figure 41 : Taux de viabilité (%) des protozoaires dans les cocultures de PBMC en fonction de la concentration initiale en PSC. Le pourcentage de viabilité initiale des PSC est de 90 %.

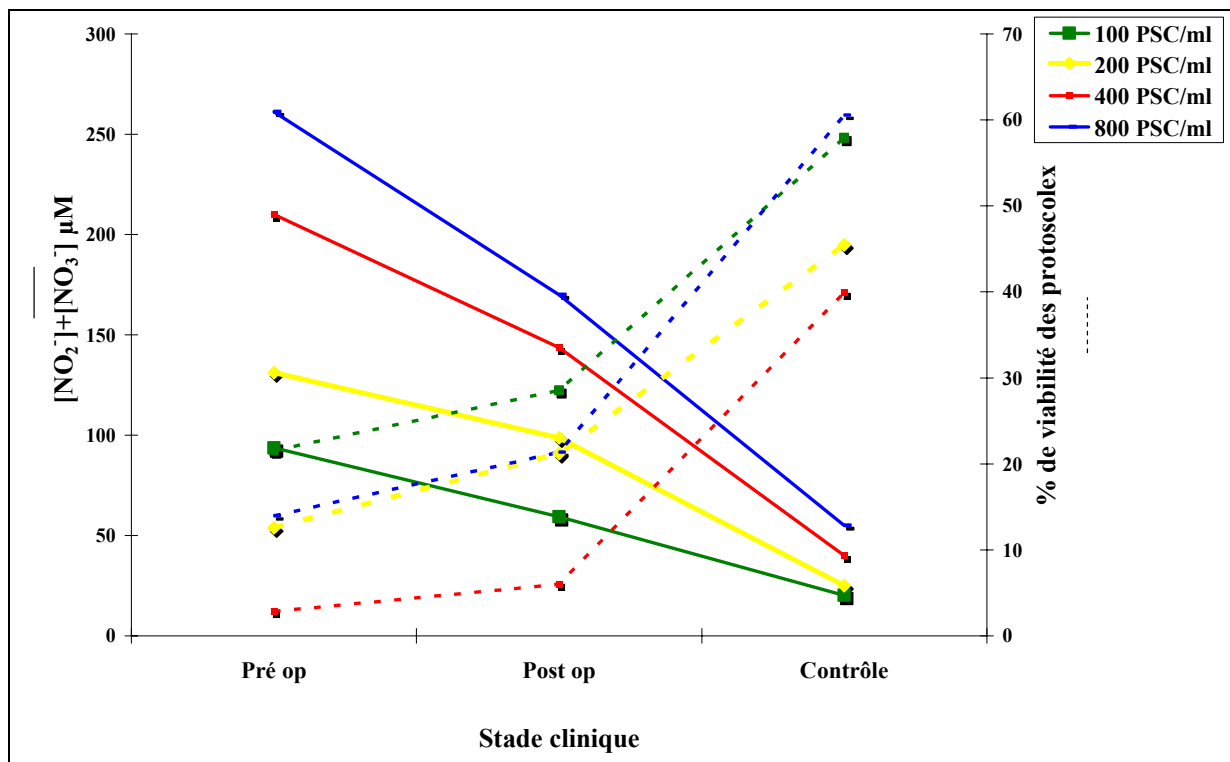


Figure 42 : Corrélation entre la production de NO et le pourcentage de viabilité des protozoaires mis en coculture avec les PBMC. Le pourcentage de viabilité initiale des PSC est de 90 %.

Tableau XIII : Production du NO au niveau des PBMC de sujets hydatiques et sains en présence de concentrations croissantes de protoscolex.

[PSC] PSC/ml	Patients atteints d'Hydatidose				Donneurs sains n=5	
	Stade Pré-opératoire n=10		Stade Post-opératoire n=10		Rang µM	Moyenne µM ± SD
	Rang µM	Moyenne µM ± SD	Rang µM	Moyenne µM ± SD		
0	50-69	61 ± 8.2	40-60	50.62 ± 9.65	14-21	17.33 ± 2.52
+ 100 PSC/ml	80-100	93.75 ± 9.46	50-77.5	59.37 ± 12.97	18-22.5	20.25 ± 0.57
+ 200 PSC/ml	100-150	131.25 ± 23.93	70-125	98.75 ± 25.62	25-30	25 ± 1.24
+ 400 PSC/ml	180-260	210 ± 35.59	140-150	143.75 ± 4.79	35-44.5	40 ± 1.35
+ 800 PSC/ml	225-310	261.25 ± 40.9	160-200	170 ± 20	50-55	55 ± 0.24

VIII- ETUDE DE L'EFFET DE L'IFN- γ SUR LE VIABILITE DES PROTOSCOLEX MIS EN COCULTURE AVEC LES PBMC DE SUJETS HYDATIQUES. ROLE POTENTIEL DU NO :

Les travaux antérieurs ayant révélé l'implication de l'interféron- γ dans la réponse immunitaire anti-hydatique (Touil-Boukoffa, 1998, Touil-Boukoffa et *al.*, 2000a), nous ont incité à rechercher l'effet de l'IFN- γ sur la viabilité des protoscolex mis en coculture avec des PBMC et à quantifier l'un des produits de son induction : le monoxyde d'azote.

Après addition de l'IFN- γ , nous avons noté avec intérêt l'augmentation (de $131.25 \pm 23.93 \mu\text{M}$ à $256.25 \pm 37.47 \mu\text{M}$ pour le stade pré-opératoire) de la production du NO initialement induite par l'effecteur antigénique (protoscolex) seul (**Fig.43, Tableau XIV**). Cette observation est accompagnée d'une diminution concomitante de la viabilité des protoscolex (de 12.5% à 5.66% pour le même stade) (**Fig. 44**).

La relation précédemment observée entre l'augmentation du taux de production de NO et la diminution de la viabilité des protoscolex (**Fig. 42**) est vérifiée. En effet, la **figure 44** révèle l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre les taux de production de NO et la viabilité des protoscolex.

L'effet de l'adjonction de l'IFN- γ , à une coculture de PSC et de PBMC montre une action scolicide engendrant l'augmentation du nombre de protoscolex en état de souffrance (**1/10**) (**Fig. 45B et 46A**) et de dégénérescence (**9/10**) (**Fig. 46B et C**). L'état de souffrance se traduit par une turgescence, un flétrissement et une mobilité réduite ou nulle. La dégénérescence fait suite à la désorganisation de la membrane et de la double couronne de crochets et à l'extériorisation du contenu cytoplasmique. Toutefois, il est à signaler que bien que tous les constituants du PSC soient réduits à de simples débris, les crochets restent intacts dans le milieu de culture.

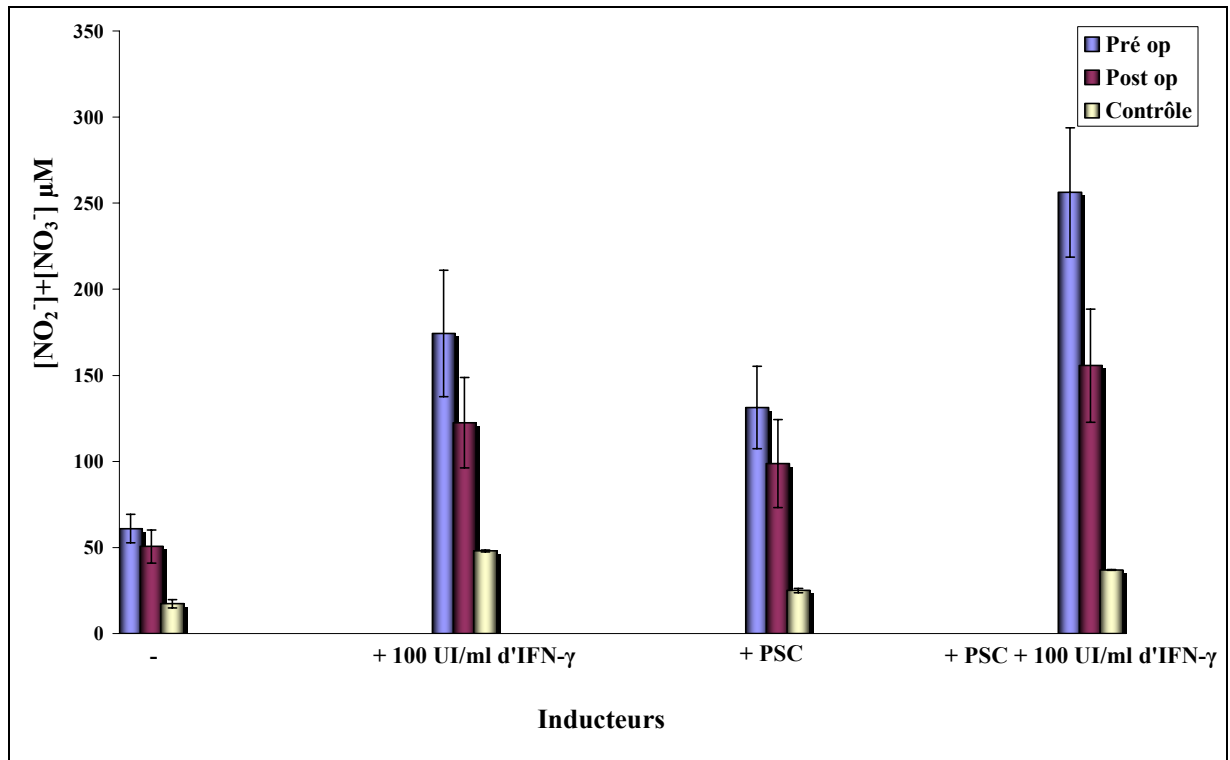


Figure 43 : Taux des nitrites totaux dans les surnageants de culture de PBMC en présence d'IFN-γ (100 UI/ml) et/ou de PSC (200 PSC/ml).

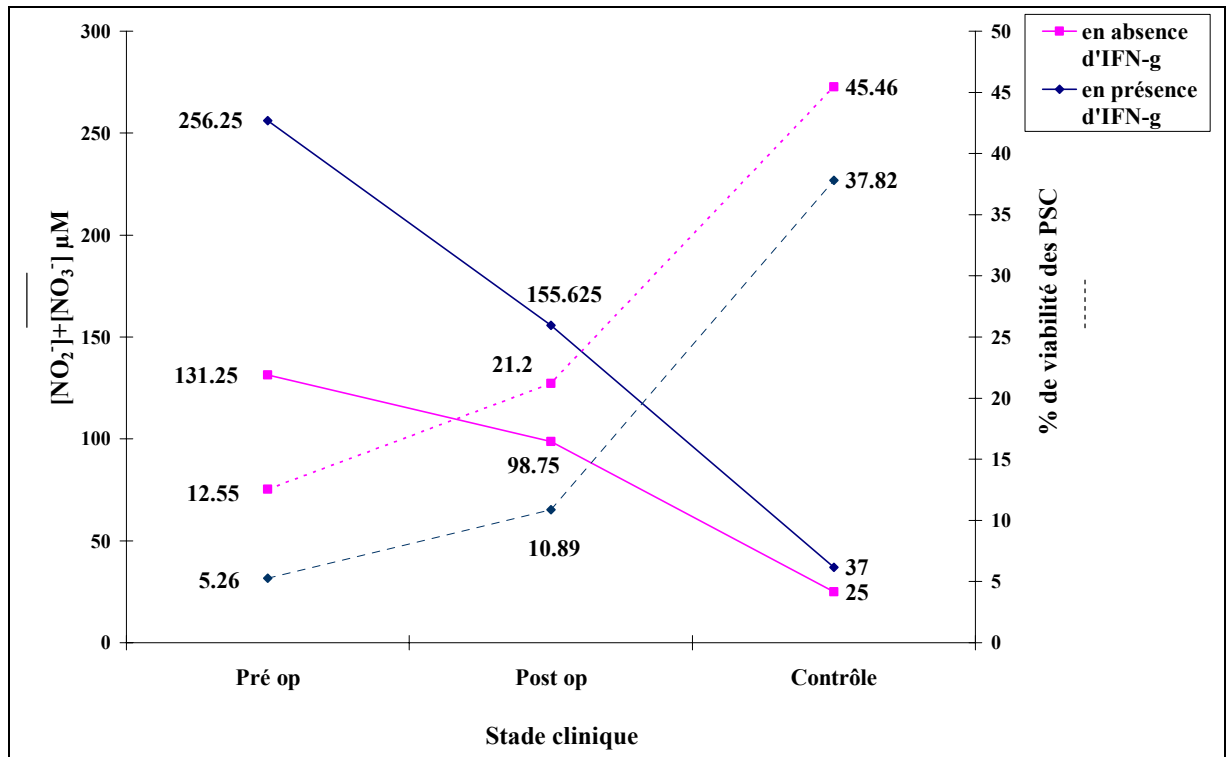
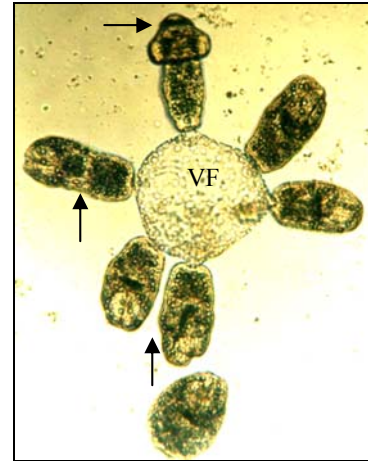
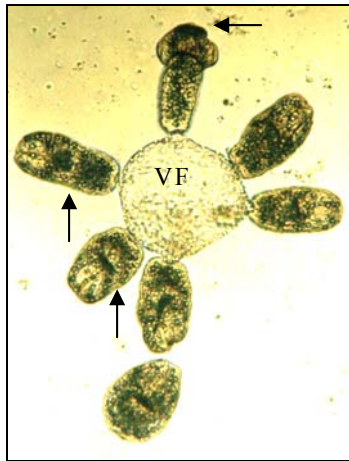


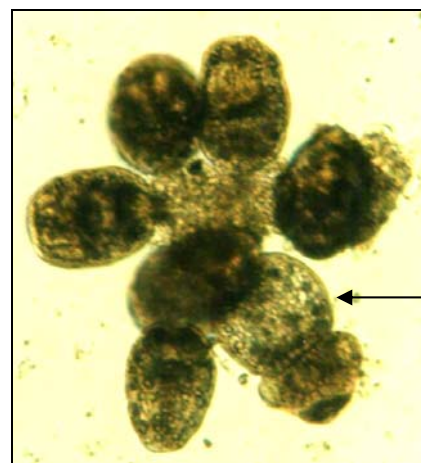
Figure 44 : Corrélation entre la production de NO et le pourcentage de viabilité des protoscolex mis en coculture avec des PBMC en absence et en présence d'IFN-γ (à 100 UI/ml). Le pourcentage de viabilité initial des PSC est de 90 % ([PSC]=200 PSC/ml).

Tableau XIV : Production du NO au niveau des PBMC en présence d'IFN- γ (100 UI/ml) et/ou de protoscolex (200 PSC/ml).

Stimulation	Patients atteints d'Hydatidose				Donneurs sains n=5	
	Stade Pré-opératoire n=10		Stade Post-opératoire n=10			
	Rang μM	Moyenne μM \pm SD	Rang μM	Moyenne μM \pm SD	Rang μM	Moyenne μM \pm SD
-	50-69	61 \pm 8.2	40-60	50.62 \pm 9.65	14-21	17.33 \pm 2.52
+IFN- γ	125-210	174.37 \pm 36.76	95-145	122.5 \pm 26.3	40-58	48 \pm 0.54
+PSC	100-150	131.25 \pm 23.93	70-125	98.75 \pm 25.62	25-30	25 \pm 1.24
+PSC +IFN- γ	195-295	256.25 \pm 37.47	125-190	155.62 \pm 32.94	36-39	37 \pm 0.23



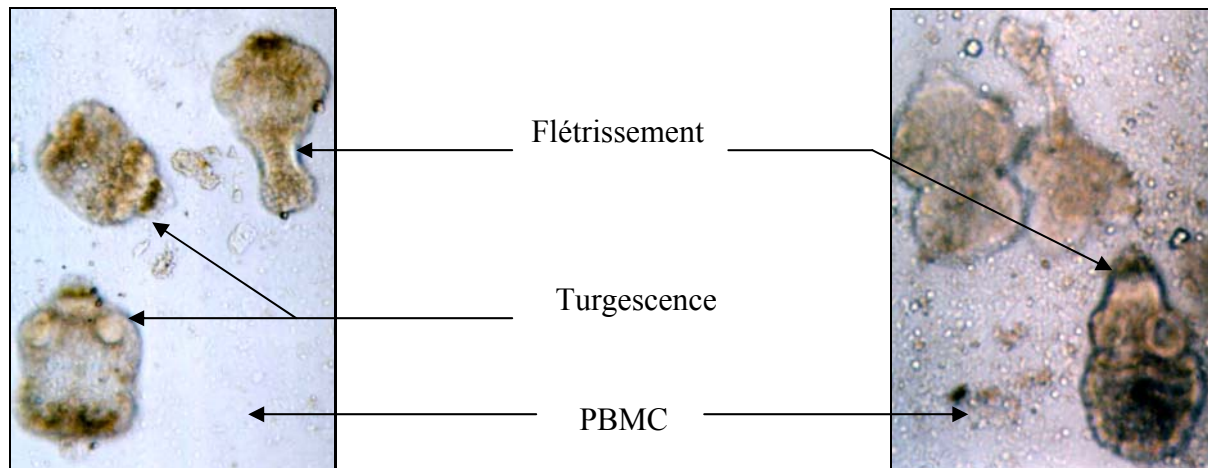
A : Avant incubation



B : Après 20h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂

Figure 45 : Etat des PSC mis en coculture avec des PBMC dans du RPMI 1640 à 10 % de SVF avant et après 20h incubation. G x 268.75.

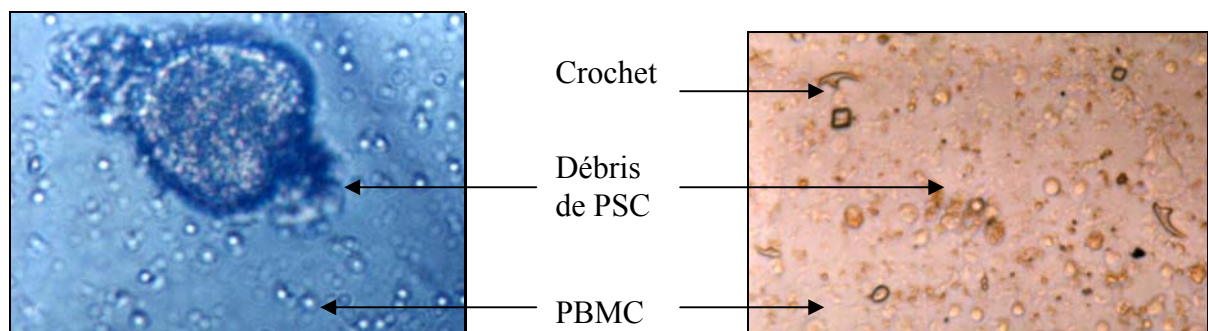
→ : Mobilité
 VF : Vésicule fille



- A -



B : Extériorisation du contenu



- C -

Figure 46 : Etat de souffrance et de dégénérescence des PSC mis en coculture avec des PBMC. A : G x 268.75, B et C : G x 430.

IX– ETUDE DE L’EFFET DU NO SUR L’HYDATIDE ET LE TISSU PULMONAIRE BOVIN:

IX-1– Etude de l’effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur l’hydatide :

Nous avons souhaité étudier l’effet des nitrites sur la viabilité de la forme larvaire du parasite et plus particulièrement sur la membrane kystique.

- **Effet des nitrites sur la morphologie des kystes hydatiques :**

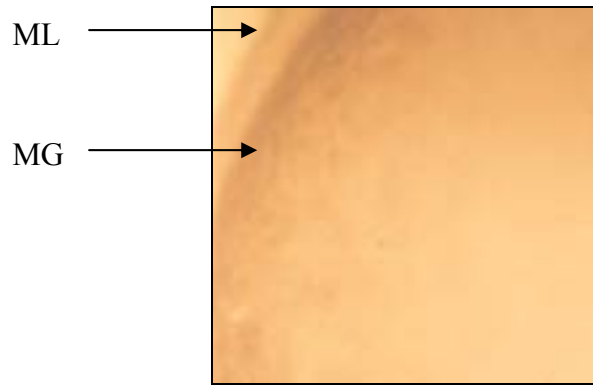
La **figure 47** montre l’effet des nitrites de sodium sur la membrane des kystes hydatiques. Cet effet se traduit par des modifications morphologiques des membranes germinatives (MG) et lamellaires (ML).

En absence de NaNO_2^- , les kystes demeurent intacts pendant une durée de **3 jours**. Au bout de cette période, les kystes dégénèrent graduellement.

L’intégrité des kystes se traduit par l’instauration d’une pression au niveau du kyste et une liaison étroite entre la membrane germinative et lamellaire. De plus, ces deux membranes présentent un aspect homogène et intact (**Fig. 47A**).

L’état de dégénérescence débute par un noircissement graduel de la MG (**Fig. 47B-C**) suivi par la perte de la pression exercée par le liquide hydatique sur la membrane du kyste (**Fig. 47D-E**). Ces remaniements sont suivis par une dislocation de la ML (**Fig. 47F**) qui reste toutefois intacte dans le milieu sous forme de trois à quatre couches liées (**Fig. 47F’**). Enfin, la MG se dégrade et se détache de plus en plus de la ML (**Fig. 47G-J**).

Ces observations morphologiques ont été effectuées pour les différentes concentrations de NaNO_2^- (de **1-5-10-20-30-40-50-100-200-300-400-500 μM**) et à différents temps d’incubation. Les résultats montrent que plus le temps d’incubation augmente plus l’état de dégénérescence est important. De plus, cet effet commence avec les kystes les plus petits et les concentrations les plus élevées en NaNO_2^- .

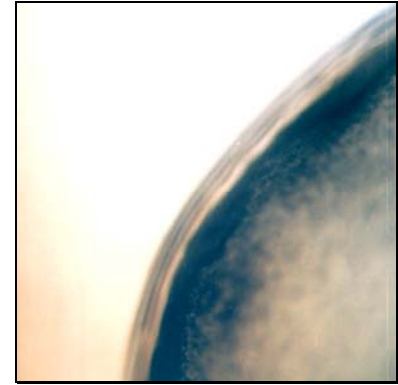


- A -

Témoin sans nitrites de sodium. La structure est conservée avec :
Une MG et une ML étroitement liées et de structure homogène.
Le liquide hydatique est sous pression.

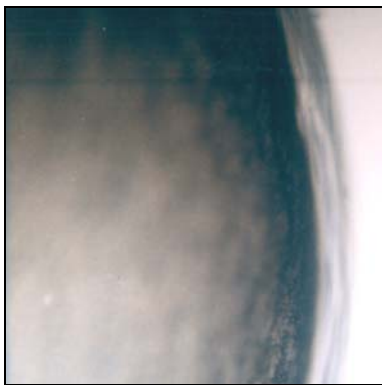


- B -

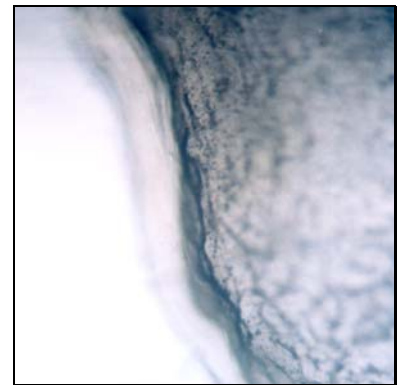


- C -

La membrane proligère se noircit de plus en plus

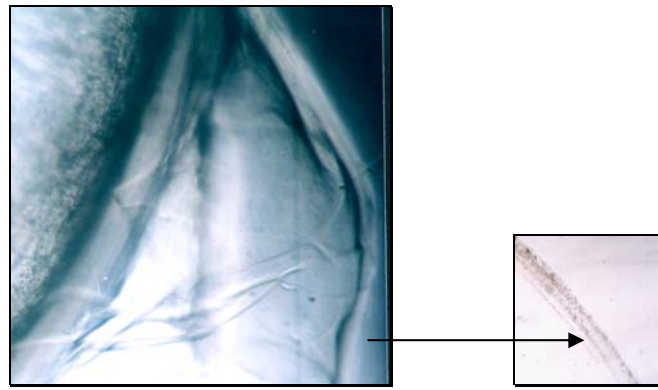


- D -



- E -

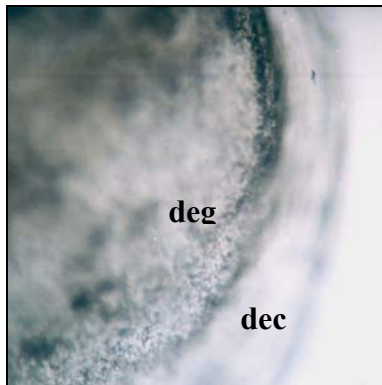
Le kyste n'est plus sous pression



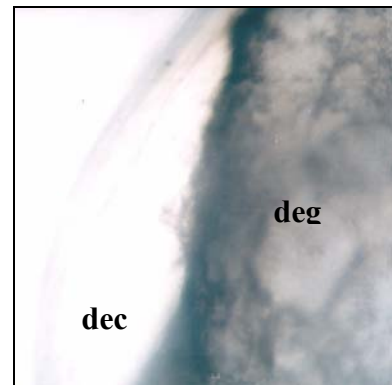
- F -

- F' -

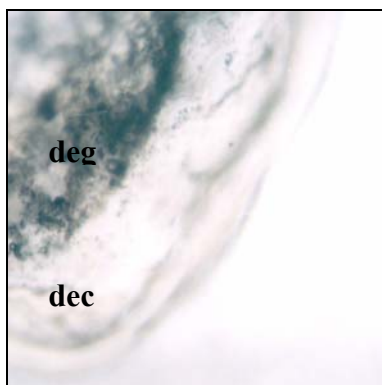
Décollement des couches lamellaires



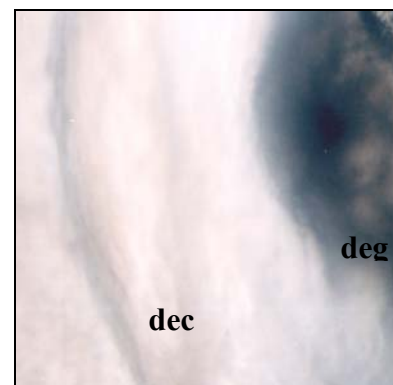
- G -



- H -



- I -



- J -

Décollement (dec) et dégradation (deg) de la membrane prolifère

Figure 47: Observation microscopique de l'effet du NaNO_2^- sur la viabilité des kystes hydatiques mis en survie dans du RPMI-1640 à 10 % de SVF.

A : G x 107.5, B-E et G-J : G x 53.75, F' : G x 268.75.

MG : membrane germinative (ou prolifère), ML : membrane lamellaire (ou stratifiée).

- **Effet des nitrites sur le liquide hydatique contenu dans les kystes :**

Il apparaît également une diffusion intrakystique des nitrites exogènes engendrant une augmentation de la concentration en nitrites à l'intérieur du kyste, dans le liquide hydatique (**Fig. 48-49**).

Nous avons noté avec intérêt qu'il existait une relation étroite entre la concentration en NaNO_2^- dans le milieu d'incubation et le taux de nitrites dans les liquides hydatiques (**Fig. 48A**). Cette relation suit une progression linéaire (avec un coefficient de corrélation de **0.9144**) (**Fig. 48B**).

En effet, les kystes mis en incubation en absence de nitrites de Na ne présentent pas de nitrites au sein de leur liquide hydatique. Pour des concentrations de **1** et **5 μM** de NaNO_2^- , les teneurs en nitrites intrakystiques sont légèrement plus élevées. Au delà de **10 μM** de NaNO_2^- , elles augmentent pour atteindre des valeurs maximales et presque constantes pour les concentrations les plus élevées en NaNO_2^- (**20- 30 et 40 μM**) (**Fig. 48A**).

Pour les kystes de taille réduite, une estimation qualitative (intensité de la coloration) des teneurs en nitrites intrakystiques a été réalisée (**Fig. 49**). Les résultats observés corroborent à ceux observés et représentés au niveau de la **figure 48**.

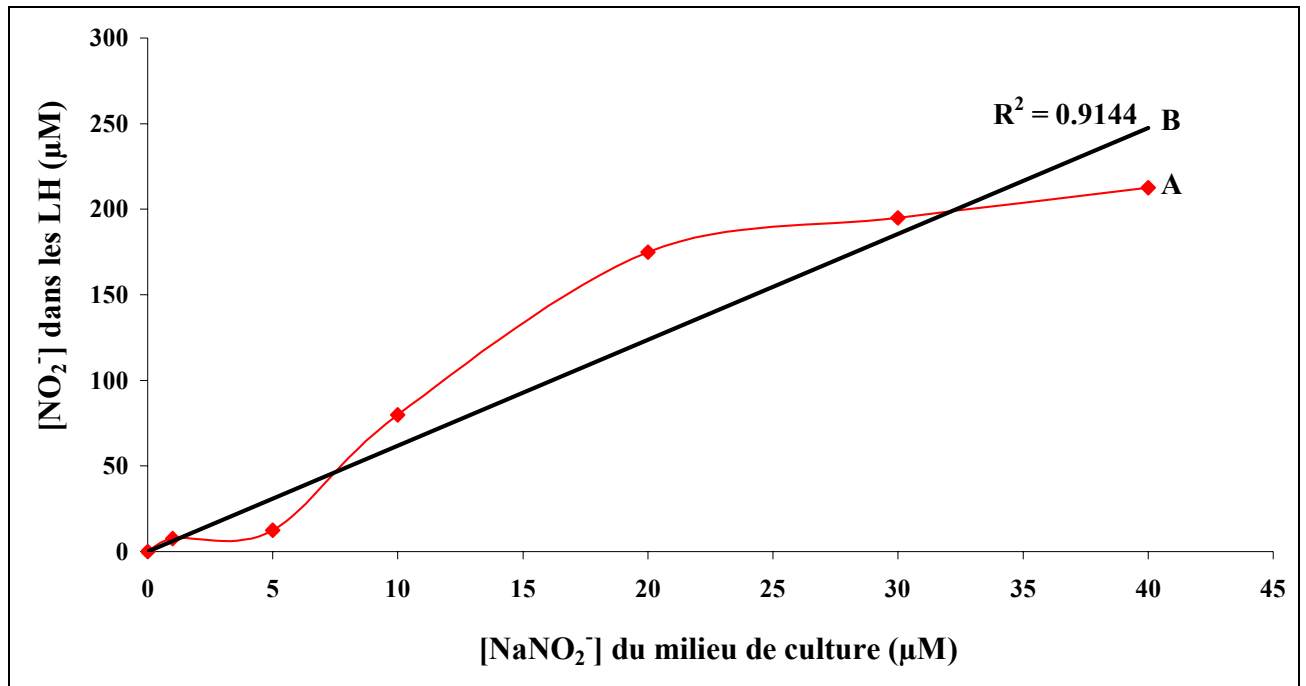


Figure 48: (A) : Teneurs en nitrites dans les kystes hydatiques (de 5 mm) mis en survie en présence de concentrations croissantes de nitrites de sodium après 20 h d'incubation. (B) : Corrélation entre ces deux paramètres.

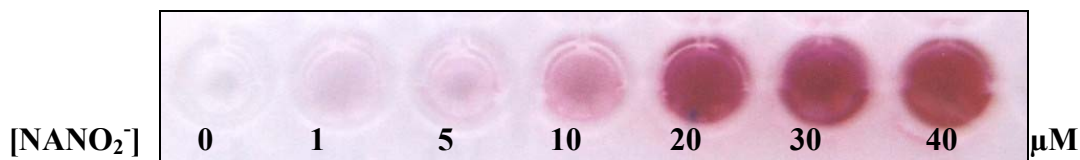


Figure 49: Evaluation qualitative (intensité de la coloration) des teneurs en nitrites dans les kystes hydatiques (2 mm) mis en survie en présence de concentrations croissantes de nitrites de sodium après 20 h d'incubation.

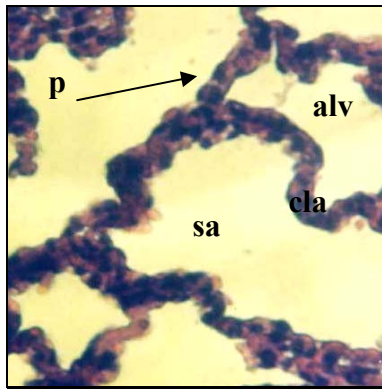
IX-2 – Etude de l'effet de concentrations croissantes de NaNO_2^- sur le tissu pulmonaire bovin (étude histologique) :

Afin d'estimer le degré de cytotoxicité du NO sur les tissus de l'hôte, une étude histologique a été réalisée sur des biopsies de tissus pulmonaires (de bovins sains) mis en incubation en présence de concentrations croissantes de nitrites de sodium (allant de **0** à **400 μM**).

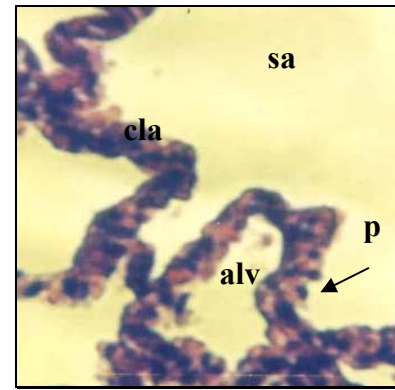
Il apparaît une haute conservation de l'architecture du parenchyme pulmonaire (intégrité des cloisons inter-alvéolaires) pour une concentration en nitrites égale à **50 μM** (**Fig. 50**).

L'atteinte tissulaire est observée à partir de **100 μM** . Elle se traduit par un épaissement de la paroi inter- alvéolaire qui a pour conséquence un rétrécissement des sacs alvéolaires. Cet effet serait probablement engendré par l'augmentation de la taille et du nombre de pneumocytes.

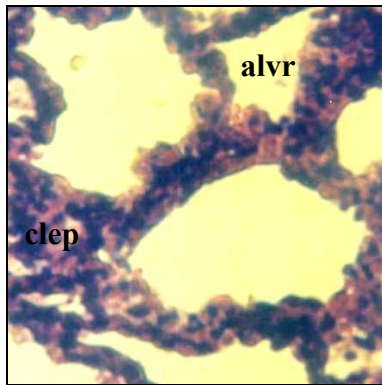
Selon nos observations, la concentration de **200 μM** constitue la valeur seuil pour la destruction tissulaire. Cette dernière se manifeste par une fragmentation des cloisons et une individualisation cellulaire (**Fig. 50**).



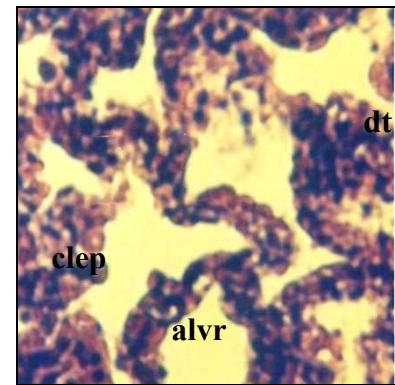
A : Témoin
Poumon sain



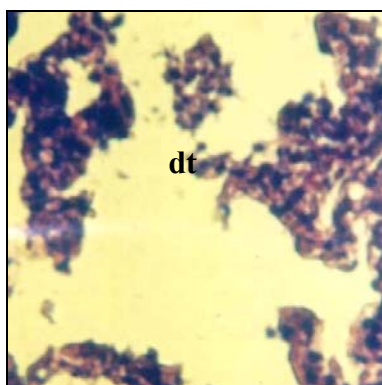
B : 50 μM de NaNO_2^-
Structure conservée



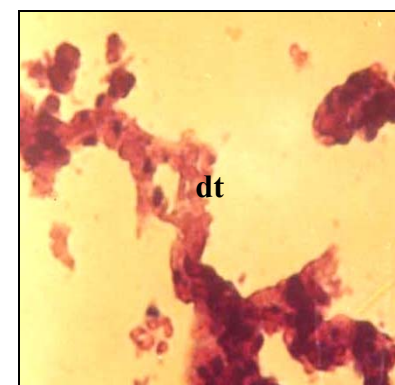
C : 100 μM de NaNO_2^-
Début de l'épaississement des cla



D : 200 μM de NaNO_2^-
Début de la destruction tissulaire



E : 300 μM de NaNO_2^-
Destruction tissulaire plus importante



F : 400 μM de NaNO_2^-

Figure 50 : Observation microscopique des coupes histologiques effectuées sur des tissus pulmonaires de bovins sains mis en survie en présence de concentrations croissantes de NaNO_2^- . Coupe transversale et coloration à l'Hématexiline-Eosine. G x 430.

sa : sac alvéolaire, alv : alvéole, p : pneumocyte, cla : cloison interalvéolaire, clep : cloison interalvéolaire épaissie, alvr : alvéole rétrécie, dt : destruction tissulaire.

DISCUSSION GENERALE

➤ Production d'IL-8, d'IL-12 et de NO *in vivo* :

Les teneurs relativement élevées en IL-8, en IL-12 et en NO enregistrées au niveau des sérums de sujets hydatiques soulignent l'implication de ces trois biomolécules dans les réponses immuno-inflammatoires traduisant la défense anti-hydatique de l'hôte.

La production de l'IL-8, une chémokine à caractère pro-inflammatoire a été pour la première fois estimée au niveau des sérums de sujets atteints d'hydatidose essentiellement hépatique et pulmonaire. Cette production a été également relevée dans le cadre d'autres pathologies à caractère inflammatoire telles que la pneumonie ou le syndrome de stress respiratoire (Chollet et *al.*, 1993 ; Andrew et Luster, 1998).

Nos résultats relatifs à la production du NO et de l'IL-12 concordent avec ceux obtenus par Touil-Boukoffa et ses collaborateurs (Touil-Boukoffa et *al.*, 1997, Touil-Boukoffa, 1998 ; Ait Aissa, 2002 ; Mezioug et *al.*, 2004).

Dans ce contexte, la production du NO a été également rapportée chez l'homme dans le cadre d'autres parasitoses à multiplication intra-cellulaire occasionnées par *Plasmodium falciparum* (Anstey et *al.*, 1996 ; Perkins et *al.*, 1999 ; Chiwakata et *al.*, 2000 ; Craig et *al.*, 2003), *Leishmania major* (Piedrafita et Liew, 2003 ; Serarslan et *al.*, 2005), *Leishmania donovani* (James, 1995) et *Trypanosoma cruzi* (Fuentes et *al.*, 1998). De plus, l'activité NOS2 a été mise en évidence dans le sérum de patients infectés par des parasites à multiplication extracellulaire tels que *Brugia malayi* (Winkler et *al.*, 1998).

La production d'IL-12 a également été mise en évidence dans d'autres infections parasitaires de l'homme telles que les leishmanioses (Ribeiro-de-Jesus et *al.*, 1998), les schistosomioses (Mountford et *al.*, 1998) et le paludisme (Chaisavaneeyakorn et *al.*, 2003).

Toutefois, les titres relativement élevés obtenus dans le cadre de notre modèle d'étude en comparaison aux autres parasitoses, seraient le fait du caractère extracellulaire d'*Echinococcus granulosus*. Ce développement implique probablement l'intervention d'autres sources cellulaires supplémentaires localisées dans les tissus avoisinants le kyste hydatique. Dans ce contexte, il a déjà été révélé par Ait-Aissa en 2002 la présence de la NOS2 dans le cytoplasme des hépatocytes au cours de l'hydatidose.

L'étude comparative de la production sérique des trois biomolécules en fonction de la localisation kystique, indique que les titres les plus élevés correspondent à la localisation hépato-pulmonaire. Ces teneurs élevées seraient probablement associées à la présence de deux kystes au niveau de deux organes dont la fonction est stratégique sur le plan de la physiologie et des réponses immuno-inflammatoires.

La localisation hépatique vient en deuxième position quant à la production des cytokines et du NO. En effet, le foie reste un site privilégié pour les processus inflammatoires et par conséquent impliquerait une sollicitation antigénique plus importante et une réponse immunitaire accrue chez les patients porteurs de kystes au niveau du foie.

Cette production est plus faible chez les patients atteints d'hydatidose pulmonaire. Signalons toutefois que ces valeurs restent largement supérieures par comparaison aux autres localisations et aux contrôles. Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs. En effet, les kystes pulmonaires sont détectés plus précocement. Ce fait serait lié à une tolérance amoindrie à la compression sachant que le temps de doublement du kyste est plus long dans le foie que dans le poumon où le parenchyme plus lâche permettrait une croissance plus rapide et plus importante du kyste. De plus, les nombreuses complications liées à cette localisation (fissuration ou rupture du kyste) engendrent des problèmes respiratoires.

Par ailleurs, selon Cesbron et *al* les kystes pulmonaires fourniraient des antigènes de qualité antigénique moins importante (Cesbron et *al.*, 1986). Ceci est bien visible à travers nos résultats de l'IEP, l'IDD et l'ELISA. Enfin, il faut également signaler que les kystes hydatiques hépatiques sont plus perméables que les kystes pulmonaires (Vidor et *al.*, 1986). Cette différence ferait que l'échange hôte-parasite serait plus important dans les cas d'hydatidose hépatique.

Considérée comme une localisation secondaire dans l'hydatidose, le cœur est un site moins privilégié pour les processus inflammatoires en comparaison au poumon. En effet, ce dernier renferme notamment les macrophages alvéolaires l'une des sources principales de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-8 et l'IL-12) et de NO. Cette donnée conforte l'hypothèse émise portant sur l'implication supplémentaire du processus inflammatoire, sachant le rôle clé des monocytes (cellules sources des deux cytokines) dans ce phénomène.

Les faibles teneurs enregistrées au niveau des patients porteurs de kystes hépatiques calcifiés confirment l'implication supplémentaire des antigènes présents dans le kyste. En effet, la calcification des kystes empêche partiellement ou totalement (selon le degré de calcification) la diffusion des antigènes solubles dans l'environnement proche du kyste.

Le cas des récurrences est particulièrement intéressant dans le sens où la production de NO chez ces patients est très faible. En effet, les valeurs atteignent parfois un taux basal ou encore un niveau plus bas en comparaison aux contrôles. Ce profil serait associé à une déplétion accrue en CD4⁺ et en IFN- γ chez les patients récidivants (Touil-Boukoffa et *al.*, 1998), sachant le rôle de l'IFN- γ dans l'induction de la production de NO. Selon ces mêmes auteurs, la déplétion en CD4⁺ pourrait être le résultat d'une hyperproduction initiale de NO. Ce dernier aurait des effets apoptotiques notamment sur les cellules TH (Drapier, 1997). Ces résultats confortent l'hypothèse émise portant l'importance du dosage du NO dans le diagnostic prédictif des rechutes.

La mise en évidence de la présence des trois biomolécules dans les différents liquides hydatiques testés indique une diffusion intrakystique importante de ces médiateurs. Cette observation est confortée sachant la perméabilité des membranes du kyste à plusieurs molécules de l'hôte (telles que l'albumine, les anticorps, ...), faisant du liquide hydatique une mosaïque protéique renfermant des protéines de l'hôte et du parasite.

Par ailleurs, les cytokines et le NO, peuvent avoir pour origine les cellules circulantes et/ou une production locale au niveau des tissus avoisinants le kyste.

Si l'on se base sur la nature du liquide hydatique selon la localisation du kyste, il apparaît que le profil des concentrations intrakystiques va dans le sens de nos résultats relatifs aux dosages sériques. Ces données confortent l'hypothèse selon laquelle la localisation anatomique des kystes influence la production d'IL-8, d'IL-12 et de NO.

La fertilité des kystes en protoscolex aurait également une incidence sur le taux de production de cytokines et de NO. En effet, nous avons noté avec intérêt une relation proportionnelle entre les taux intrakystiques (en IL-8, IL-12 et en NO) et le degré de fertilité des kystes. Cette relation souligne l'implication des protoscolex dans l'induction de la production des trois médiateurs. Cette donnée est confortée d'une part par la présence de l'antigène majeur du liquide hydatique (F5) dans les extraits de protoscolex (Kong et al 1989 ; Yarzabal et al., 1977 ; Siracusano et al., 2002 et Fig. 18). D'autre part, il faut signaler le rôle de cet antigène dans l'induction de la production de NO (Touil-Boukoffa et al., 1998 ; Ait Aissa, 2002) et d'IL-12 (Mezioug et al., 2004).

Pour les patients présentant une évolution clinique conventionnelle, la production cytokinique augmente après exérèse kystique. Cet effet, serait probablement lié à l'inflammation due au choc opératoire sachant que la source essentielle de l'IL-12 et de l'IL-8 est le système monocyte/macrophage. Ce profil est inversé dans le cas de complications cliniques de la maladie. En effet, la fissuration ou la rupture des kystes induit une augmentation de la production sérique d'IL-8 et d'IL-12 avant l'exérèse kystique. Ces données traduisent l'implication directe des antigènes hydatiques et l'instauration d'un environnement physiologique propice à l'activation des cellules productrices d'IL-8 et d'IL-12.

La diminution de la production de NO après la chirurgie serait liée à l'absence de la sollicitation des antigènes solubles par les cellules régulatrices de la production de NO. Cette observation souligne l'implication directe des antigènes hydatiques dans la stimulation des cellules Th et du système monocyte-macrophage. Ces résultats sont confortés par la mise en évidence d'une relation proportionnelle entre le taux de production de NO sérique et l'immunoréactivité des patients (testée par hémaagglutination passive).

➤ Production d'IL-8, d'IL-12 et de NO *in vitro* :

Le profil de production de l'IL-8, de l'IL-12 et du NO *in vitro* conforte nos dosages *in vivo*. En effet, les titres obtenus dans le cas des PBMC préparées à partir du sang des donneurs sains sont largement inférieurs à ceux des patients (aux deux stades opératoires). Cette donnée supplémentaire permet d'étayer notre hypothèse selon laquelle la production accrue des trois biomolécules chez l'hôte constituerait l'un des mécanismes de défense contre l'hydatide.

Par ailleurs, les résultats de ce dosage considérés selon le stade clinique demeurent en parfaite corrélation avec les dosages sériques.

Après stimulation par les fractions antigéniques F5 et P50 (purifiées par gel filtration puis caractérisées), nous avons noté avec intérêt une augmentation de la production des trois biomolécules. Ces observations soulignent l'engagement d'une sensibilisation *in vivo* vis-à-vis des deux antigènes F5 et P50.

De plus, signalons que la structure des deux fractions semble être favorable à l'induction de la production des trois biomolécules. En effet, La F5 a fait l'objet de nombreux travaux démontrant sa nature glycosylée (Hamrioui, 1986 ; Touil-Boukoffa, 1998). Nous l'avons nous mêmes démontrés pour les deux fractions à travers les résultats de la chromatographie d'affinité sur concanavoline A, sachant la haute affinité de cette lectine pour les résidus glycosylés (Fig. 9-10).

Notre étude est en parfait accord avec celle de Rigano et son équipe (Rigano et *al.*, 1998 et 2001). En effet, ces derniers ont montré l'aptitude des PBMC (préparées à partir du sang de patients atteints d'hydatidose) stimulées par l'antigène hydatique total à produire de l'IL-12. A la différence, nous avons utilisé deux fractions antigéniques purifiées à partir du liquide hydatique humain (F5 et P50).

Cependant, la hausse enregistrée est plus prononcée dans le cas des cultures induites par la F5. Ces résultats était prévisible sachant que plusieurs auteurs considèrent la F5 (de 68 kDa) comme étant l'antigène le plus antigénique du liquide hydatique (Hamrioui et *al.*, 1986 ; Touil-Boukoffa, 1998 ; Mezioug, 2002). Nous l'avons nous même rapporté à travers les tests d'antigénicité réalisés par immuno-diffusion double, par immuno-électrosynérèse et par ELISA (Fig. 11-12).

De plus, il a été déjà démontré l'implication de l'antigène 5 dans l'induction de la production de taux élevés de NO (Touil-Boukoffa, 1998 ; Touil-Boukoffa et *al.*, 1998 ; Ait Aissa, 2002) et d'IL-12 (Mezioug, 2002 ; Mezioug et *al.*, 2004).

Toutefois, bien que la F5 soit l'effecteur antigénique majeur de la cette production, la P50 apparaît également agir dans le sens de l'induction de ces biomolécules. En effet, elle induit la production de taux très importants d'IL-8, d'IL-12 et de NO au niveau des cultures de PBMC.

Parallèlement à cette étude, nous avons souhaité établir l'effet de l'addition simultanée d'IFN- γ et de F5/P50 sur la production des trois biomolécules. Les résultats obtenus montrent que l'IFN- γ (à 10 et 100 UI/ml) seul induit la production de taux très significatifs d'IL-8, d'IL-12 et de NO. Après l'addition simultanée d'IFN- γ et de F5/P50, les taux enregistrés sont supérieurs à ceux obtenus après stimulation par l'effecteur antigénique ou cytokinique seul.

A la lumière de ces données, il semble exister un effet additionnel des deux fractions antigéniques solubles (F5 et P50) et de l'IFN- γ sur la production d'IL-8, d'IL-12 et de NO sur culture de PBMC. Cet effet serait associé à une régulation positive exercée par l'IFN- γ exogène. Elle se traduit probablement par une orientation préférentielle des cellules Th0 vers une sous population Th1 (Constant et Bottomly, 1997 ; Murphy et *al.*, 2000 ; Szabo et *al.*, 2003). Elle impliquerait également une activation accrue du système monocyte-macrophage sous l'action de l'interféron- γ (un puissant activateur de ce système) et par conséquent à l'induction de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (en particulier l'IL-12 et l'IL-8) et du NO. L'IL-12 par un effet de boucle paracrine, exercerait ses effets sur les cellules cibles et productrices d'IFN- γ (Cellules CD4⁺, CD8⁺ et NK) (Kobayashi et *al.*, 1989 ; Chan et *al.*, 1991 et 1992) pour l'amplification de sa propre synthèse et de celles de l'IL-8 et du NO.

Ces données corroborent à ceux de plusieurs auteurs impliquant la voie TH1 (voie induite notamment par l'IL-12 et l'IFN- γ) dans l'immunité protectrice (ou la résistance à l'infection), sachant que la déviation vers la voie Th2 reflète la susceptibilité à la maladie (Touil-Boukoffa *et al.*, 1997 et 1998 ; Margutti *et al.*, 2002 ; Siracusano *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003).

➤ **Effet de l'IFN- γ sur la viabilité des protoscolex *in vitro*. Implication du monoxyde d'azote :**

L'addition du liquide hydatique à des concentrations allant de 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ a engendré une hausse de la production de NO. Toutefois, une diminution progressive est notée à partir de 15 $\mu\text{g/ml}$. Ces observations nous ont amené à émettre deux hypothèses. La première serait en faveur d'un effet cytotoxique probable du LH sur les PBMC. La deuxième hypothèse impliquerait la présence dans le LH de facteurs limitant la production de NO. Ces effets seraient tributaires de la concentration en LH. Celle-ci serait effective au delà de 10 $\mu\text{g/ml}$ de liquide hydatique.

Deux données sont en faveur de la deuxième hypothèse. En effet, la prolifération cellulaire n'est pas inhibée en présence du liquide hydatique (Fig. 38). Cette observation indique que le liquide hydatique n'exerce pas d'effet cytotoxique aux concentrations utilisées. De plus, la mise en évidence de la présence dans le liquide hydatique d'IL-8 et d'IL-12 n'exclue pas la diffusion intra- kystique d'autres cytokines anti- inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10. Signalons que ces dernières sont impliquées dans la régulation négative de la production de NO (Oswald *et al.*, 1992 ; Bogdan et Nathan, 1993 ; James, 1995).

Les résultats obtenus après la mise en culture des PBMC en présence de **concentrations croissantes de protoscolex** indiquent que la production du NO serait associée à la charge parasitaire initiale. En effet, la production de NO augmente avec la concentration de protoscolex utilisée initialement (100- 800 PSC/ml).

Ces données confirment notre hypothèse traduisant la capacité des protoscolex à induire la production de NO chez les patients atteints d'hydatidose. En effet, nous avons nous même rapporté l'incidence de la concentration en protoscolex (fertilité) sur les taux intra- kystiques de NO (Fig. 28C).

Selon les travaux de Cardozo *et al* en 2002, l'effet des protoscolex sur l'activation et la prolifération des PBMC de patients hydatiques semble être attribué aux fractions riches en carbohydrates. Ces dernières incluent particulièrement la fraction E4+ dont l'effet hautement immunogénique a été mis en évidence (Sterla *et al.*, 1999 ; Dematteis *et al.*, 2001).

Par ailleurs, nous avons noté avec intérêt l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre les taux de production de NO et la viabilité des protoscolex après 20 h d'incubation. En effet, la viabilité des protoscolex est atténuée par l'augmentation de la production de NO. Cette relation traduit un effet cytotoxique du NO sur les protoscolex.

Plusieurs études ont établi *in vitro* l'effet cytotoxique du NO sur des parasites à multiplication intracellulaire tels que *Trypanosoma* (Vespa *et al.*, 1994), *Leishmania* (Romao *et al.*, 1999) et *Plasmodium* (Rokett *et al.*, 1991 ; Gobert *et al* en 2000). L'effet parasiticide du NO touche également les protozoaires extracellulaires (*Entamoeba*) et les helminthes (*Schistosoma*) (James, 1995 ; Clark et Rokett, 1996 ; Brunet, 2001 ; Colasanti *et al.*, 2002).

En présence d'IFN- γ (à 100 UI/ml), nous avons noté avec intérêt deux effets concomitants impliquant une diminution de la viabilité des PSC mis en coculture avec les PBMC (de patients hydatiques) et l'augmentation de la production du NO.

Nos résultats suggèrent que l'IFN- γ exogène (100 UI/ml) module positivement la production de NO par les PBMC en coculture avec les protoscolex. Il a un effet scolicide indirect résultant probablement de l'induction de la NOS2 et aboutissant à une production accrue de NO ($256.25 \pm 37.47 \mu\text{M}$).

En effet, selon Gantt et *al* en 2001 l'expression des iNOS augmente *in vitro* au niveau des macrophages humains infectés par *Leishmania chagasi* en présence d'IFN- γ .

De plus, selon plusieurs travaux l'IFN- γ joue un rôle clé dans l'activité cytotoxique des macrophages vis à vis des parasites à multiplication intracellulaire *in vivo* et *in vitro* (Murray, 1994b). Cette activité cytotoxique est due à la production de superoxyde et de NO (Drapier et *al.*, 1988 ; Piedrafita et Liew, 1998; Szabo et *al.*, 2003).

En effet, les macrophages activés par l'IFN- γ sont capables d'éliminer 62 % des amibes via la production de NO (Lin et Chadee, 1992). Dans le cas de *Leishmania major*, une diminution du nombre de promastigotes est associée à une augmentation des teneurs en nitrites dans les surnageants de cultures de macrophages activés par l'IFN- γ (Liew et *al.*, 1990). Toutes ces données suggèrent que NO agit dans le mécanisme effecteur de la cytotoxicité des macrophages activés par l'IFN- γ contre les parasites.

A la lumière de ces données, l'IFN- γ et le NO semblent avoir *in vitro* un effet anti-hydatique. La question reste posée sur l'inefficacité de ce mécanisme de défense *in vivo* malgré les teneurs très significatives en IFN- γ et en NO retrouvées au niveau des sérums de sujets hydatiques.

Selon Paolo Ascenzi et ses collaborateurs, l'hémoglobine, la myoglobine et la neuroglobine peuvent protéger *Plasmodium* et *Trypanosoma* des effets anti-parasitaire du NO (Ascenzi et *al.*, 2002). Les membres d'une autre équipe ont également suggéré que la survie de *schistosomula* dépend de la présence d'hémoglobine et d'hémocyanine (Taylor-Robinson, 1998 ; Gow et *al.*, 1999). Ces hypothèses se basent sur le fait que ces transporteurs d'oxygène facilitent l'oxydation du NO dans les conditions aérobieques. En effet, il est généralement accepté que les dérivés de l'hémoglobine réagissent rapidement et irréversiblement avec le NO. Cette réaction induit la formation de peroxy-nitrite qui s'isomérisent rapidement en nitrate et hémoglobine férique oxydée (met- hémoglobine). Cette dernière est ensuite réduite par la met- hémoglobine réductase en forme physiologiquement active. Sachant que les anémies sont associées de manière fréquente aux parasitoses, la concentration d'hémoglobine oxygénée apparaît être très insuffisante pour intercepter le NO (Couture et *al.*, 1999 ; Ascenzi et *al.*, 2001).

L'évolution de l'hydatidose est également accompagnée chez les malades d'une forte anémie, ces hypothèses émises principalement par l'équipe d'Ascenzi peuvent se rapporter à notre modèle d'étude de macroparasitose.

➤ **Effet cytotoxique du NO sur l'hydatide et sur le tissu pulmonaire :**

Les résultats portant sur l'étude de l'effet des nitrites de sodium sur l'hydatide et le tissu pulmonaire ont révélé un effet cytotoxique des nitrites (métabolite physiologiquement stable du NO). Cet effet se traduit dans les deux cas par une désorganisation tissulaire suivie par une destruction du tissu testé.

Dans le cas de l'hydatide, les travaux de Steers et *coll* ont démontré l'effet toxique des nitrites sur la membrane de kystes mis en coculture avec des macrophages (de souris infectées par *E.g.*) stimulés par l'IFN- γ (Steers et *al.*, 2001). Ces mêmes auteurs ont constaté une diffusion intra- kystique des nitrites, ce qui est en accord avec nos propres résultats. En effet, nous avons noté une augmentation de la concentration des nitrites dans le liquide hydatique en fonction de la concentration de nitrites de Na dans le milieu d'incubation. Cette donnée conforte également nos résultats relatifs à une diffusion intra- kystique du NO chez les patients porteurs de kystes pulmonaires et hépatiques

Par ailleurs, nous avons également noté avec intérêt que la membrane lamellaire est restée intacte pendant une longue période dans le milieu d'incubation, à l'inverse, la membrane prolifère se désintègre très rapidement. Cette donnée va dans le sens des observations de Kausch et *coll* et Lanier et *coll* en 1987. En effet, ces derniers ont constaté que la membrane lamellaire reste à l'intérieur du tissu infecté de l'hôte pendant une longue période, même après la mort spontanée du métacestode (Kausch et *al.*, 1987 ; Lanier et *al.*, 1987). Ces observations démontrent la haute résistance de la membrane lamellaire à la dégradation par les molécules effectrices de la réponse immunitaire au cours de l'hydatidose.

Dans le cas des atteintes du tissu pulmonaire, il a été déjà démontré l'effet de l'inhalation d'une forte dose de NO₂ sur le poumon. Cet effet se traduit par des oedèmes et des hémorragies quelques jours après l'inhalation (Archer, 1993).

Les travaux de Guénane en 2002, ont également démontré un effet cytotoxique dose dépendante de la concentration en nitrites sur la rétine de bœuf (Guénane, 2002)..

A la lumière de toutes ces données concernant l'effet du NO sur deux composantes de l'hydatide (la membrane kystique et les protoscolex) et sur le tissu pulmonaire, il apparaît que le NO présente une dualité fonctionnelle. Cette dernière serait à la fois bénéfique et délétère pour l'hôte. En effet, il peut être aussi bien cytotoxique pour le parasite infestant que pour les cellules ou les tissus avoisinants (Voire Fig. 51).

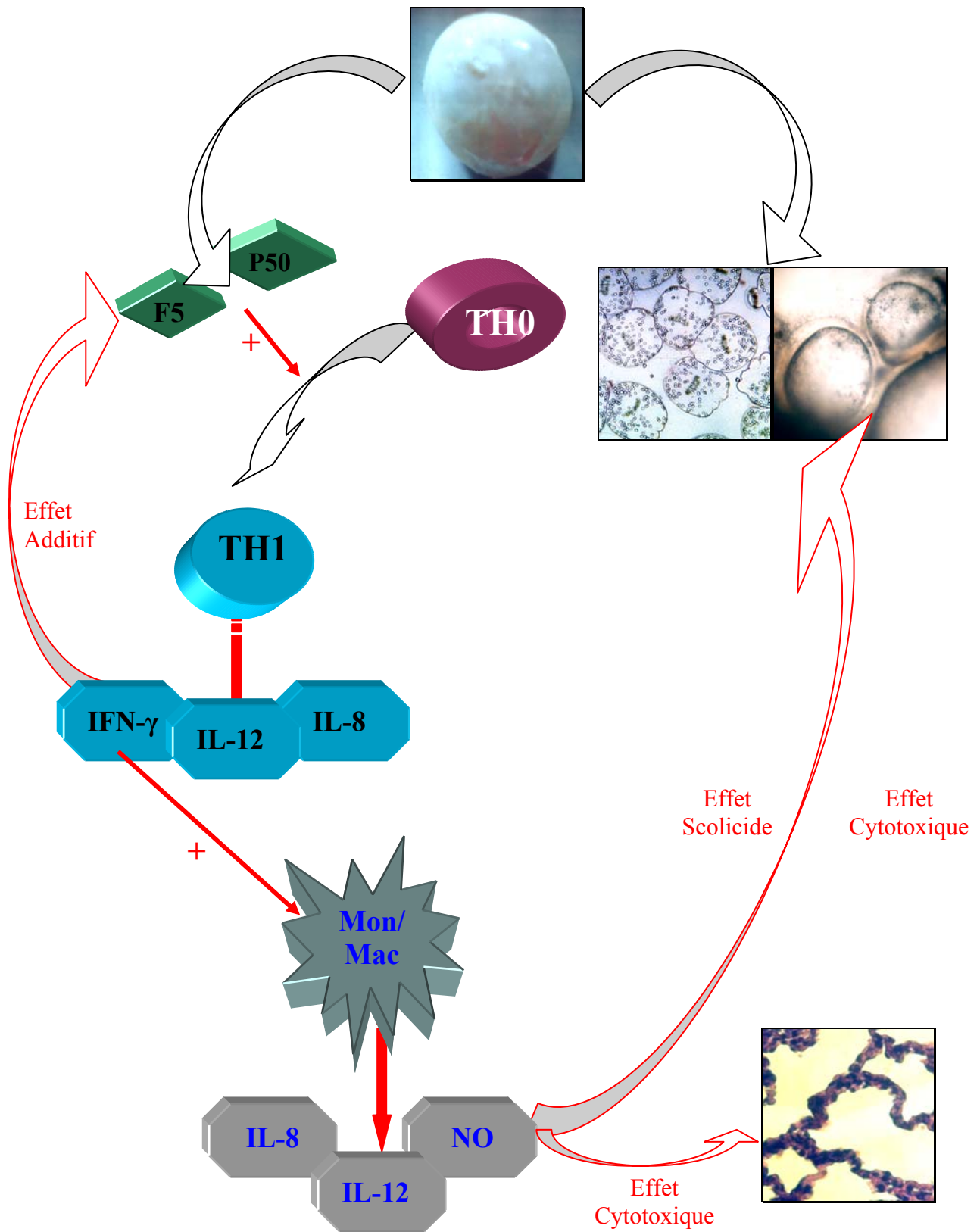


Figure 51 : Implication des réponses immuno- inflammatoires dans les défenses de l'hôte contre *Echinococcus granulosus*. Rôle scolicide et cytotoxique du NO.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'apporter une modeste contribution aux résultats rapportés par l'équipe de Touil-Boukoffa depuis 1986. Elle a permis de mettre en évidence et ce pour la première fois la production de l'IL-8 *in vivo* et *in vitro* au cours de l'hydatidose.

Nous avons également purifié une nouvelle protéine antigénique du liquide hydatique la P50 non étudiée jusqu'à l'heure actuelle. Cette fraction semble exhiber une haute immunoréactivité vis-à-vis des sérums de patients hydatiques. Toutefois, la F5 reste l'antigène majeur de l'hydatide et l'inducteur essentiel de la production des trois biomolécules (IL-8, IL-12 et NO).

Au terme de notre étude utilisant un modèle d'infection par un macro-parasite, parasite à développement extracellulaire, il en ressort comme dans beaucoup d'autres parasitoses que l'IL-8, l'IL-12 et le NO ont un rôle non négligeable dans l'initiation et la modulation de la réponse immunitaire et dans l'inflammation au cours de l'hydatidose humaine hépatique et pulmonaire. Ces mécanismes seraient induits majoritairement par la F5 et la P50.

Nos résultats montrent également que les deux effecteurs antigéniques utilisés (F5 et P50) associés à l'IFN- γ , engendrent un effet additionnel sur la production des trois biomolécules.

Ces marqueurs pourraient constituer un outil précieux dans le suivi et l'immunosurveillance des patients ainsi que dans le diagnostic précoce de cette pathologie.

De plus, l'action scolicide de l'IFN- γ a été observée pour la première fois en coculture de protoscolex et de PBMC. Cet effet serait médié par la production du NO.

Le NO aurait un effet cytotoxique aussi bien sur l'hydatide (les protoscolex et la membrane kystique) mais également sur le tissu pulmonaire.

Il reste cependant à situer un équilibre physiologique entre les deux effets bénéfiques et délétères du NO sur l'hôte. Ces données seront utiles dans l'établissement d'un protocole d'action parasiticide efficace du NO ou de son inducteur l'IFN- γ avec des effets secondaires minimes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AFEP (1997). Association Française des Enseignants de parasitologie-Mycologie. ANOFEL ; 6^{ème} édition.

Aguet, M., Dembic, Z. & Merlin, G. (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-g receptor. *Cell.*, **55** : 273-280.

Ahmed, K., Al-Matrouk, K.A., Martinez, G., Oishi, K., Rotimi, V. O. & Nagatake, T., (1999). Increased serum levels of IFN- γ and IL-12 during human Brucellosis. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **61** (3) : 425-427.

Ahuja, S.K. & Murphy, P.M. (1996). The CXC chemokines growthregulated oncogene (GRO), GRO, GRO, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J. Biol. Chem.*, **271**: 20545–20550.

Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N. & Matsushima, K. (1997). Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.*, **65**: 3218–3224.

Alcorn, M.J., Booth, J.L., Coggeshall, K.M. & Metcalf, J.P. (2001). Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J. Virol.* **75**: 6450– 6459.

Ali-Khan, Z. (1978). Pathological changes in the lymphoreticular tissues of Swiss mice infected with *Echinococcus granulosus* cysts. *Z. Parasitenkd.*, **58**:47–54.

Anstey, N.M., Weinberg, J.B. & Hassanali, M.Y. (1996). Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: Inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J. Exp. Med.*, **184**: 557-567.

Aragane, Y., Riemann, H. & Bhardwaj, R.S. (1994). IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol.*, **153**:5366-5372.

Archer, S. (1993). Measurement of iitric oxide in. biological models. *FASEBJ.* **7**: 349-360.

Ascenzi, P., Salvati, L., & Brunori, M. (2001) Does myoglobin protect *Trypanosoma cruzi* from the antiparasitic effects of nitric oxide?. *FEBS Lett.*, **501** : 103–105.

Ascenzi, P. & Gradoni, L. (2002) Nitric oxide limits parasite devel-opment in vectors and in invertebrate intermediate hosts. *IUBMB Life.*, **53** : 121–123.

Aste-Amezaga, M., D'Andrea, A. & Kubin, M. (1994). Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cellassociated molecules in human T and NK cells. *Cell. Immunol.*, **156**: 480-492.

Atkins, M.B., Robertson, M. & Gordon, M.S. (1996). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 (rhIL-12) in patients with advanced malignancies. *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.*

B

Bacon, C.M., McVicar, D.W. & Ortaldo, J.R. (1995). Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J. Exp. Med.*, **181**: 399-404.

Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 75–705.

- Baldwin, E.T., Weber, I.T., St. Charles, R., Xuan, J.C., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Edwards, B.F., Clore, G.M., Gronenborn A.M, & Wlodawer, A.** (1991). Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 502–506.
- Barbieri, M., Fernandez, V., Gonzalez, G., Luaces, V.M. & Nieto, A.** (1998). Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.*, **20**: 51–61.
- Barnes, P.J.** (1995). Nitric oxid and Asthma. *Res. Immunol.*, **146** : 698-702.
- Bauvois, B., Rouillard, D. & Wietzerbin, J.** (1992). IFN- γ and transforming factor β 1 differently regulate fibronectin an laminin receptors of human differentiating cells. *J. Immunol.*, **148** : 3912-3919.
- Bazan, J.F.** (1990). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and Il-6 receptors, and the p75 Il-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164** : 788-795.
- Bellone, G. & Trinchieri, G.** (1994) Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J. Immunol.*, **153**: 930-937.
- Benblidia, S.** (2002). Contribution à l'étude de l'induction de la NOS II au cours de l'hydatidose humaine ; rôle de l'INF- γ et de l'IL-4 sur la production du NO. Thèse de magister en Biochimie-Immunologie. *FSB- USTHB*.
- Besim, H., Karayalçin, K., Hamamci, O., Güngör, S. & Korkmaz, A.** (1998). Scolicidal agents in hydatid cyst surgery. *HPB Surgery*, **10** : 347-351.
- Biava, M.F. & Kures, L.** (1990). Diagnostic biologique des échinococcoses. *Rev. Prat.*, **40** (3) : 201-204.
- Bogdan, C. & Nathan, C.** (1993). Modulation of macrophage functions by TGF- β , IL-4 and IL-10. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **685** : 713-739.
- Bout, D., Fruit, J. & Capron, A.** (1974). Purification d'un antigène spécifique du liquide hydatique. *Ann. Immunol.*, **125** : 775-788.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H.** (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87** : 682-685.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R. & Snyder, S. H.** (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450.
- Briscoe, J., Rogers, N.C., Witthuluhn, B.A., Watling, D., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Stark, G.R., Ihle, J.N. & Kerr, I.M.** (1996). Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J.*, **15** : 799-809.
- Browning, D., Prossnitz, P. Z. & Ye, R. D.** (1997). Cell type and developmental stage- specific activation of NF- κ B by fMLP in myeloid cells. *J. Biol. Chem.*, **272** :7995-8001.
- Browning, D., Diehl, W. C., Hsu, M., Schraufstatter, I. U. & Ye, R. D.** (2000). Autokrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **279** : 1129-1136.
- Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Hague, G., Bailish, E. & Moore, M. W.** (1996). Involvement of IL-8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells *in vivo*: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J. Exp. Med.*, **184** :1826-1832.
- Brunda, M. J. & Gately, M. K.** (1994). Antitumor activity of interleukine – 12. *Clin. Immunol. Immunopath.*, **71** (3) : 253-255 .
- Brunda, MJ. & Gately, MK.** (1995). Interleukin-12: potential role in cancer therapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Important Advances in Oncology.*, :3-18.
- Brunet, L. R.** (2001) Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.*, **1** : 1457–1467.

Buckberg, GD., Matheis, G., Sherman, MP., Haybron, DM. & Ignarro, LJ. (1992). Myocardial reoxygenation injury after ischaemia is mediated by the L-arginine: nitric oxide pathway. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higgs EA, eds. *The biology of nitric oxide*. 1. London: Portland Press, 1992 : 52-4.

Burger, M., Burger, JA., Hoch, RC., Oades, Z., Takamori, H. & Schraufstatter, IU. (1999). Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J. Immunol.*, **163**: 2017–2022.

Burke, F., Balkwill, F.R. & Kossodo, S.C. (1997). Cytokines and cancer. P: 565-567. *Cytokines in health and disease*. 2nd Ed: Daniel, G. Remick.

Burns, AR., Simon, SI., Kukielka, GL., Rowen, JL., Mendoza, LH., Brown, ES., Entman, ML. & Smith, CW. (1996). Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. *J. Immunol.*, **156**: 3389–3401.

Burrows, SD., Doyle, ML., Murphy, KP., Franklin, SG., White, JR., Brooks, I., McNulty, DE., Scott, MO., Knutson, JR., Porter, D., Young, PR. & Hensley, P. (1994). Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer at physiological concentrations. *Biochemistry.*, **33**: 12741–12745.

Bussolino, F., Sironi, M., Bocchietto, E. & Mantovani, A. (1992). Synthesis of platelet-activating factor by polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-8. *J. Biol. Chem.*, **267**: 14598–14603.

C

Capron, A., Vernes, A., & Biguet, J. (1967). Le diagnostic immunoelectrophorétique de l'hydatidose-le kyste hydatique du foie. *Simep. Paris*: 27-40.

Capron, A. (1995). Le langage moléculaire des parasites. *Med/Sci*, **3(11)** : 431-439.

Carson, WE., Ross, ME. & Baiocchi, RA. (1995). Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, **96**: 2578-2582.

Carveth, HJ., Bohnsack, JF., McIntyre, TM., Baggiolini, M., Prescott, SM. & Zimmerman, GA. (1989). Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res. Commun.*, **162**: 387–393.

Casola, A., Garfalo, RP., Jamulddin, M., Vlahopoulos, S. & Brasier, AR. (2000). Requirement of a novel upstream response element in respiratory syncytial virus-induced IL-8 gene expression. *J. Immunol.* **164**: 5944–5951.

Cesano, A., Visonneau, S. & Clark, SC. (1993). Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. *J. Immunol.*, **151**: 2943-2957.

Cesbron, JY. & Capron, A. (1986). Diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. *Gastroentérol. Clin. Biol.*, **10** : 415-418.

Chaisavaneeyakorn, S., Othoro, C., Shi, YP., Otieno, J., Sansanee, C. Chaiyaroj, Lal, AA. & Udhayakumar, V. (2003). Relationship between Plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 Levels and Severe Malarial Anemia in an Area of Holoendemicity in Western Kenya *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10(3)** : 362–366.

Chan, SH., Kobayashi, M. & Santoli, D. (1992). Mechanisms of IFN- γ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12): role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.*, **148**: 92-98.

- Chan, SH., Perussia, B. & Gupta, JW.** (1991). Induction of interferon γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.*, **173**: 869-879.
- Chang, CI., Liao, JC. & Kuo, L.** (1998). Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol.*, **274**: H342-H348.
- Charreire, J. & Alimi, E.** (1998). Cytokines et auto-immunité. *Ann. Inst. Past. Paris*; **9(2)** : 163-179.
- Chebath, J., Benech, P., Revel, M. & Vigneron, M.** (1987). Constitutive expression of 2'-5' oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature*, **330** : 587-588.
- Chehimi, J., Valiante, NM. & D'Andrea, A.** (1993). Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1826-1830.
- Chehimi, J., Starr, S., Frank, I., D'Andrea, A., Ma, X., Mac Gregor, R.R., Sennelier, J. & Trinchieri, G.** (1994). Impaired interleukin-12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Exp. Med.*, **179** : 451-7.
- Chertov, O., Michiel, DF., Xu, L., Wang, JM., Tani, K., Murphy, WJ., Longo, DL., Taub, DD. & Oppenheim, JJ.** (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **271**: 2935-2940.
- Chiwakata, CB., Christoph, J., Hemmer, & Dietrich, M.** (2000). High Levels of Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA Are Associated with Increased Monocyte Counts in Blood and Have a Beneficial Role in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect. Immun.*, **68 (1)**: 394-399.
- Chizzonite, R., Truitt, T, & Desai, BB.** (1992). IL-12 receptor: I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts. *J. Immunol.*, **148**: 3117-3124.
- Cho, HJ., Xie, QW., Calaycay, J., Mumford, RA., Swiderek, KM., Lee, TD. & Nathan, C.** (1992) Calmodulin as a tightly bound subunit of calcium-, calmodulin-independent nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, **176** : 599-604
- Chreiki, M.** (2002). Echinococcosis-An emerging parasit in the immigrant population.//A: \Hds %20 population % 20 immigrant. Htm.
- Chua, AO., Chizzonite, R. & Desai BB.** (1994). Expression cloning of a human IL-12 receptor component: a new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J. Immunol.*, **153**: 128-136.
- Clark, IA. & Rockett, KA.** (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* **37**: 1-56.
- Colasanti, M., Gradoni, L., Mattu, M., Persichini, T., Salvati, L., Venturini, G. & Ascenzi, P.** (2002). Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (review). *Intern. J. Mol. Med.*, **9**: 131-134.
- Coltorti, EA. (1986). Standardization and evaluation of an enzyme immuno assay as a screening test for sero epidemiology of human hydatidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyd.*, **35** : 1000-1005.
- Constantinescu, C S., Hondowicz, B D., Elloso, M M., Wysocka, M., Trinchieri, G. & Scott, P.** (1996). The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, **28 (7)** : 2227-33.
- Cook, JR., Emanuel, SL., Donnelly, RJ., Soh, J., Mariano, TM., Schwartz, B., Rhee, S. & Pestka, S.** (1994). Sublocalization of the human interferon- γ receptor accessory factor gene and characterization of accessory factor activity by yeast artificial chromosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.*, **269** : 7013-7018.

Couture, M., Yeh, S.R., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Ouellet, Y. & Rousseau, D.L. (1999). A cooperative oxygen-binding haemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 11223–11228.

Cox, F.E.G. & Liew, E.Y. (1992). Tcell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitology today.*, **8(11)** : 371-374.

Craig, P.S. (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunol.*, **8** : 171–188.

Craig-Boutlis, S., Tjitra, E., Maniboey, H., Misukonis, M.A., Saunders, J.R., Suprianto, S., Weinberg, J.B. & Anstey, M.N. (2003). Nitric Oxide Production and Mononuclear Cell Nitric Oxide Synthase Activity in Malaria-Tolerant Papuan Adults. *Infect. Immun.*, **71 (7)** : 3682–3689.

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

Cristol, J.P. & Toreille, J. (1994). Mesure du NO et système biologique. *Ed.Sciences-Medecine.*, **317** : 549-555.

D

D'Amelio, R., Pontesilli, O., Dayal, R., De Rosa, F., Barnet, M., Teggi, A., Brighthouse, G. & Lambert, P. H. (1985). Characterisation of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Med. Microbiol. Immunol.* **174**: 43-50.

D'Andrea, A., Rengaraju, M. & Valiante NM. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, **176**: 387-1398.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M. & Valiante NM. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon-gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, **178**: 1041-1048.

Dahinden, CA., Kurimoto, Y., De Weck, A.L., Lindley, I., Dewald, B. & Baggolini, M. (1989). The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin-3-primed basophils. *J. Exp. Med.*, **170**: 1787–1792.

Darnell, 1994

Burgner, D., Rockett, K., Kwiatkowski, D. (1999). Nitric oxide and infectious diseases. *Arch. Dis. Child.*, **81**: 185–188.

De Sanctis, G.T., MacLean, J.A., Qin, S., Wolyniec, W.W., Grasemann, H., Yandava, C.N., Jiao, A., Noonan, T., Stein-Streilein, J., Green, F.H. & Drazen, J.M. (1999). Interleukin-8 receptor modulates IgE production and B-cell expansion and trafficking in allergen-induced pulmonary inflammation. *J. Clin. Invest.*, **103**: 507–515.

Dematteis, S., Baz, A., Rottenberg, M., Fernandez, C., Orn, A. & Nieto, A. (1999). Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite Immunol.*, **21**: 19–26.

Denis, M. (1991) Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leukocyte Biol.*, **49** : 380-387.

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

Desai, B.B., Quinn, P.M. & Wolitzky, A.G. (1992). IL-12 receptor: II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.*, **148**: 3125-3132.

Detmers, P.A., Lo, S.K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M. & Cohn, Z.A. (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J. Exp. Med.*, **171**: 1155–1162.

Di Felice, G., Pini, C., Afferini, C. & Vicari, G. (1986). Purification and partial characterization of major antigen (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **20** :133-137.

DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R. & Prince, A. (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J. Clin. Invest.* **96**: 2204–2210.

Diaz, A., Willis, A.C. & Sim, R.B. (2000). Expression of the proteinase specialized in Bone Resorption, Cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Molecular Medecine.*, **8**: 648-659.

Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J. & Srimal, S. (1990). Macrophage deactivation factor and transforming growth factors--1, -2, and -3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon- γ . *J. Immunol.*, **145**, 940-944.

Dixon, J. B. (1997). Echinococcosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **20**: 87–94.

Djeu, J.Y., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Shiotsuki, K. & Blanchard, D.K. (1990). Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/ IL-8. *J. Immunol.*, **144**: 2205–2210.

Djillalli, G., Mahrour, A., Oussedik, T., Abad, M., Bouguerra, T., Nekrouf, G., Belkaid, M. & Soullamas, F. (1983). L'eau oxygénée dans la chirurgie du kyste hydatique. *La presse medicale.*, **12(4)** : 235-237.

Douglas, M.R., Morrison, K.E., Salmon, M. & Buckley, C.D. (2002). Chemokine nomenclature. Expert review in mol. med.

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

Drapier, J.C. (1997). Monoxyde d'azote et Macrophage. *Pathol.Biol.*, **45(2)**, 110-114.

Duegar, E.L., Moro, L.P. & Gilman, H.R. (1999). Oxfendazole treatment of sheep with Naturally Acquired Hydatid disease. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.*, **43(9)** : 2263-2267.

Dugas, B., Debre, K. & Moncada, S. (1995). Nitric oxide, a vital poison inside the immune response and inflammatory network. *Res. Immunol.*, **146** : 664-670.

E

Eckert, J., Deplazes, P., Craig, P.S, Gemmell, M., Gottstein, B., Heath, D., Jenkins, D.J., Kamiya, M. & Lightowers, M. (2001). Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment, p. 72–99. *In* J. Eckert, M. A. Gemmell, F.-X. Meslin, and Z. S. Pawlowski (ed.), WHOI/OIE anual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

EGWUAGU, SZTEIN, J., MAHDI, R.M., LI, W., CHAO HAN C., SMITH J.A., CHARUKAMNOETKANOK P., CHEPELINSKY A.B., (1999) - IFN-gamma increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats. *J. Immunol.*, **162** : 510-517.

Eng, V.M., Car, B.D. & Schnyder, B. (1995). The stimulatory effects of interleukin (IL)-12 on hematopoiesis are antagonized by IL-12- induced interferon-gamma *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **181**: 1893-1898.

Erger, R.A. & Casale, T.B. (1998). Interleukin-8 plays a significant role in IgE-mediated lung inflammation. *Eur. Respir. J.*, **11**: 299–305.

Euzeby, J. (1977). Diagnostic experimental des helminthiases. Ed. Vigot.

Evans, T.G., Thai, L., Granger, D.L., Hibbs, Jr, J.B. (1993). Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J. Immunol.*, **151**: 907-915.

F

Falcoff, E., Bernabo, J. & Botasso, O. (1993). L'interféron γ transforme le pronostic des patients atteints de leishmaniose chimiorésistante. *Med. Sci.*, **9**: 1214-1217.

Falcoff, E., Taranto, N. J., Remondegui, C. E., Dedet, J. P., Canini, L. M., Ripoli, C. M., Dimier- David, L., Vagas, F., Gimenez, L. A., Bernabo, J. G. & Botasso, O. A. (1994). Clinical healing of antimony resistance following the combined administration of Interferon and pentavalent antimony compounds. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **88**: 95-97.

Falcoff, R. (1972). Some properties of virus and immune induced human lymphocyte interferons. *J. Gen. Virol.*, **16**: 251-253.

Fang, F.C. (1997). Mechanisms of Nitric oxide-related Antimicrobi Activity. *J. Clin. Invest.*, **99(12)**: 2818-2825.

Finkelman, F.D., Pearce, E.J., Urban, J.F. & Sher, Jr, A. (1991). Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol. Today* **12**: A62–A66.

Forstermann, U. (1986). Properties and mechanisms of production and action of endothelium-derived relaxing factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8 (10)**: S45-S51.

Fotiadis, C., Sergiou, C., Kirou, J., Troupis, G.T.H., Tselentis, J., Doussaitou, P., Gorgoulis, V.G. & Sechas, M.N. (1999). Experimental Echinococcus infection in the mouse model : Pericyclic cellular immunity reaction and effects on the lymphoid organs of immunocompatent and thymectomized mice. *in vivo.*, **13**, 541-543.

Fountoulakis, M., Lahm, H.W., Maris, A., Friedlein, A., Manneberg, M., Stueber, D. & Garotta, G. (1991). A 25-kDa Strech of the extracellular domain of the human interferon γ receptor is required for full ligand binding capacity. *J. Biol. Chem.*, **266**: 14970-14977.

Fradelizi, D. (1998). Les cytokines : facteurs solubles de la communication cellulaire.

Freize-Cartucho, D.J., Gouveia, A., Margo, J., Loureiro, A. & Santos, P. (1996). National Congress of Hyadtidology, 27-28.

Frosch, P.M., Frosch, M., Pfister, T., Schaad, V. & Bitter-Suermann, D. (1991). Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **48**: 121– 130.

Fujimura M, Myou S, Nomura M, Mizuguchi M, Matsuda T, Harada A, Mukaida N, Matsushima K, and Nonomura A. Interleukin-8 inhalation directly provokes bronchoconstriction in guinea pigs. *Allergy* **54**: 386–391, 1999.

Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*, **288**: 373-376.

G

Galanaud, P. (1993). Les cytokines. *Rev. Prat.*, **43 (5)**: 533-535.

- Gantt, K.R., Todd, L., Goldman, M.L., McCormick, Miller, E.A., Jeronimo, S.M.B., Nascimento, E.T., Britigan, B.E. & Wilson, M.A.** (2001). Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, **167**: 893–901.
- Garthwaite, J.** (1991). Glutamate, nitric oxide, and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neuro. Sci.*, **14** : 60-67.
- Gately, M.K., Wolitzky, A.G. & Quinn, P.M.** (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell. Immunol.*, **143**:127-142.
- Gately, M.K., Warrier, R.R. & Honasoge, S.** (1994). Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN- γ *in vivo*. *Int. Immunol.*, **6** : 157-167.
- Gately, M.K., Youwu, C. & Faherty, D.A.** (1997). IL-12: A heterodimeric cytokine that promotes cell – mediated immunity. 2nd éd : Daniel, G. Remick.
- Gately, M., Renzetti, M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U. & Presky, H.** (1998) The IL-12/IL-12R system : Role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16** : 495-521.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G. & Sher, A.** (1994). Parasite induces IL – 12. *J. Immunol.*, **153** (6): 2533-2542.
- Gearing, D.P. & Cosman, D.** (1991). Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell.*, **66** : 9-10.
- Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I. & Baggiolini, M.** (1993). The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **268**: 15419–15424.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone M.A., Jr, Luster, A.D., Luscinskas, F.W. & Rosenzweig, A.** (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**: 718–723.
- Gollob, J.A., Li, J. & Reinherz, E.L.** (1995). CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12. *J. Exp. Med.*, **182**: 721-731.
- Golvan, J.Y.** (1983). Atlas de parasitologie medicale. Schémas explicatifs d'épidémiologie. Ed : Le Leopard d'or.
- Golvan, J.Y.** (1990). Elements de parasitologie medicale. 4^{ème} Ed. Flammarion Medecine-sciences.
- Gonzalez, G., Nieto, A., Fernandez, C., Orn, A., Wernstedt, C. & Hellman, U.** (1996). Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.*, **18**: 587–596.
- Gonzalez, G., Spinelli, P., Lorenzo, C., Hellman, U., Nieto, A., Willis, A. & Salinas, G.** (2000). Molecular characterization of P-29 a metacestode-specific component of *Echinococcus granulosus* which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **105**: 177–184.
- Gottstein, B.** (2001). Major tropical syndromes by body system : systemic infections Hydatid disease.
- Gray, P.W. & Goeddel, D.V.** (1983). Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** : 5842-5846.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R.** (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**: 131-138

Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J. & Schreiber, R.D. (1995). Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity*, **2** : 677-687.

Gubler, U., Chua, A.O. & Schoenhaut, D.A. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 4143-4147.

Guénane, H. (2002). Immunoréactivité des patients (isotype IgG) et recherche de cytokines marqueurs (Th1, Th2) et de NO au cours des manifestations ophtalmiques du syndrome du Beçhet. FSB-USTHB.

H

Hamrioui, B. (1986). Etude des composantes du liquide hydatique : leur apport hydatidologique. . Thèse de doctorat en sciences médicales – Alger.

Hamrioui, B., Ovlaque, G., Belkaid, M. & Capron, A. (1988). Caractères physico-chimiques de la Fraction 5 du liquide hydatique. *Arch. Inst. Past. Alg.*, **56**,124-129.

Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, Harada, K., Ishihara, M. & Taniguchi, T. (1993). Anti- oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factor-1 and 2. *Science.*, **259**: 971-974.

Heath, D.D. & Lawrence, S.B. (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunol.*, **18**: 347–357.

Hebert, C.A., Luscinskas, F.W., Kiely, J.M., Luis, E.A., Darbonne, W.C., Bennett, G.L., Liu, C.C., Obin, M.S., Gimbrone, M.A .Jr, & Baker, J.B. (1990). Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J Immunol.*, **145**: 3033–3040.

Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R. & Vavrin, Z. (1987). Macro-phage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.*, **235**: 473-476.

Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. & Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157** : 87-94.

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, and Wymann MP. (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase in inflammation. *Science.*, **287**: 1049–1053.

Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C. & Wood, W.I. (1991). Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.*, **253**: 1278–1280.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E. & Tripp, C.S. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.*, **260**: 547-549.

Hsu, M.H., Wang, M., Browning, D.D., Mukaida, N. & Ye, R.D. (1999). NF-B activation is required for C5a –induced IL-8 gene expression in mononuclear cells. *Blood.*, **93**: 3241-3249.

Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd III, R.F. & Weiss, S.J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.*, **254**: 99–102.

Hunter, C.A., Candolfi, E., Subauste, C., Van Cleave, V. & Remington, J.S. (1995). Studies on the role of IL-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology.*, **84** : 16-20.

I

Ignarro, L.J. (1991). Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels.*, **28**: 67-73.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **84** : 9265-9269.

Ijzermans, J.N.M. & Marquet, R.L. (1989). Interferon gamma: A review. *Immunology.* **179** : 456-473.

Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Profumo, E., Franchi, C., Ortona, E., Rigano, R. & Siracusano, A. (1996). Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.*, **18**: 571-578.

Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. The interferon. *Proc. R. Soc.*, **147** : 1-258.

Ischiropoulos, H., Zhu, L. & Beckman, J. (1992). Peroxynitrite formation from macrophage derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298** : 446-451.

Ito, A., Liang, M.A., Schantz, P.M., Gottstein, B., Liu, Y.H., Chai, J.J., Abdel-Hafez, S.K., Altintas, N., Joshi, D., Lightowers, W. & Pawlowski, Z.S. (1999). Differential sérodiagnostic for cystic and alveolar échinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (Antigen B) and *E. multicularis* protoscolex (EM 18). *Am. J. Med. Hyg.*, **60** (2) : 188-192 .

J

Jacobson, N.G., Szabo, S.J. & Weber-Nordt, R.M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activation of transcription (Stat) 3 and Stat4. *J. Exp. Med.*, **181**:1755-1762.

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

Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E. & Baeuerle, P.A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor-B. *Free. Radic. Biol. Med.*, **28**: 1317-1327.

Jinquan, T., Moller, B., Storgaard, M., Mukaida, N., Bonde, J., Grunnet, N., Black, F.T., Larsen, C.G., Matsushima, K. & Thestrup-Pedersen, K. (1997). Chemotaxis and IL-8 receptor expression in B cells from normal and HIV-infected subjects. *J. Immunol.*, **158**: 475-484.

Johnson, V. & Maack, T. (1977). Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone. *Am. J. Physiol.*, **233**: F185-F196.

Johnston, S.L., Papi, A., Monick, M.M. & Hunninghake, G.W. (1997). Rhinoviruses induce interleukin-8 mRNA and protein production in human monocytes. *J. Infect. Dis.*, **175**: 323-329.

Jones, S.A., Wolf, M., Qin, S., Mackay, C.R. & Baggiolini, M. (1996). Different functions for the interleukin-8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**: 6682-6686.

K

Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Grewal, A.S. & Vinayak, V. K. (1994). Significance of detection of immune-complexed 8 kDa hydatid-specific antigen for immunodiagnosis of hydatidosis. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, **9**: 231-236.

Karayalcin, K., Besim, H., Sonisik, M., Erverdi, N., Korkmaz, A. & Aras, N. (1999). Effect of hypertonic Saline and alcohol on viability of daughter cysts in hepatic Hydatid Disease. *Eur. J. Surg.*, **165**, 1043-1044.

Katae, M., Miyahira, Y., Takeda, K., Matsuda, H., Yagita, H., Okumura, K., Takeuchi, T., Kamiyama, T., Ohwada, A., Fukuchi, Y. & Aoki, T. (2002). Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infec. Immunity.*, **70**(9) : 4833-4840.

- Kelker, H.C., Yip, Y.K., Anderson, P. & Vilcek, J.** (1983). Effects of glycosidase treatment on the physiochemical properties and biological activity of human interferon-gamma. *J. Biol. Chem.*, **258** : 8010-8013.
- Kelm, M., Feelisch, M., Grube, R., Motz, W. & Strauer, B.E.** (1992). Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higgs EA, eds. The biology of nitric oxide. Vol. 1. London: Portland Press, 1992 : 319-22.
- Khabar, K.S., Al-Zoghaibi, F., Al-Ahdal M.N., Murayama, T., Dhalla, M., Mukaida, N., Taha, M., Al-Sedairy, S.T., Siddiqui, Y., Kessie, G., & Matsushima, K.** The chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon-g. *J. Exp. Med.*, **186**: 1077–1085, 1997.
- Kharebov, A., Nahmias, J. & EL-ON, J.** (1997). Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients of *Echinococcus granulosus* purified antigens. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, **57** (5) : 619-625.
- Khuroo, M.S.** (2002). Hydatid disease: Current status and recent advances. *Annals of Saudi Medecine.*, **22**(1) : 56-64.
- Kilbourn, R.G. & Bellone, I.** (1990). Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **82** : 772-776
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Lindley, I. & Mikawa, H.** (1992). Interleukin 8 (IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. *J. Exp. Med.*, **176**: 1227–1231.
- Kimata, H., Lindley, I. & Furusho, K.** (1995). Selective inhibition of spontaneous IgE and IgG4 production by interleukin-8 in atopic patients. *Blood.*, **85**: 3191–3198.
- Knall, C., Young, S., Nick, J.A., Buhl, A.M., Worthen, G.S. and Johnson, G.L.** (1996). Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogenactivated protein kinase pathway in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **271**: 2832–2838.
- Kobayashi, M., Fitz, L. & Ryan, M.** (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **170**: 827-845.
- Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., & Strieter., R.M.** (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.*, **258**: 1798–1801.
- Kolb, J.P., Paul-Eugène, N., Damais, C., Yamaoka, K., Drapier, J.C. & Dugas, B.** (1994). Interleukin-4 stimulates cGMP production by IFN-g activated human monocyte. Involvement of the nitric oxide synthase pathway. *J. Biol. Chem.*, **269** : 9811-9816.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumar, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. & Pestka, S.** (1995). Interaction between the components of the interferon-g receptor complex. *J. Biol. Chem.*, **270** : 20915-20921.
- Kreil, T.R. & Eibl, M.M.** (1996). Nitric oxide viral infection: no antiviral activity against a flavivirus *in vitro*, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection *in vivo*. *Virology.*, **219**: 304-306.
- Kubin, M., Chow, J.M. & Trinchieri, G.** (1994). Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor- α , and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood.*, **83** : 1847-1855.
- Kunz, M., Hartmann, A., Flory, E., Toksoy, A., Koczan, D., Thiesen, H.J., Mukaida, N., Neumann, M., Rapp, U.R., Brocker, E.B. & Gillitzer, R.** (1999). Anoxia-induced upregulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *Am. J. Pathol.*, **155**: 753–763.

Kupper, R.W., Dewald, B., Jakobs, K.H., Baggiolini, M. & Gierschik, P. (1992). G-protein activation by IL-8 and released cytokines in human neutrophil plasma membranes. *Biochem. J.*, **282** : 429-434.

Kwon, N.S., Stuehr, D.J. & Nathan, C.F. (1991). Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **174** : 761-768.

L

Lamont, A.G. & Adorini, L. (1996). IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol. Today.*, **17** (5) : 214-217.

Langford, M., Weigent, G., Georgiades, J., Johnson, H. & Staton, J. (1981). Antibody to staphylococcal enterotoxine A- induced human interferon (IFN- γ). *J. Immunol.*, **126** : 1620-1623.

Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J. & Matsushima, K. (1989). The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science.*, **243**: 1464-1466.

Lee, J., Horuk, R., Ricc, G. C. Bennett, G. L., Camerato, T. & Wood, W. T. (1992). Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.*, **267** : 16283-16287.

Lefer, A.M. (1992). Cytoprotective actions of nitric oxide donors in ischaemia-reperfusion injury. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higgs EA, eds. *The biology of nitric oxide.* London: Portland Press, **1** :55-6.

Leggatt, G.R., Yang, W. & McManus, D.P. (1992). Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**:189-192.

Lepage, C., Sancéau, J. & Wietzerbin, J. (1997). Mécanismes d'actions des Interférons. *Hématologie.*, **3** : 309-318.

Lepage, C., Genin, P., Barnes, M. G. & Hiscott, J. (2000). Interferon activation and innate immunity. *Rev. Immunogenet.*, **2** (3) : 374-386.

Lepoivre, M., Fieschi, F, Coves, J., Thelander, L. & Fon-tecave, M. (1991). Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochern. Biophys. Res. Commun.*, **179**: 442-448.

Lepoivre, M., Flaman, J.M. & Henry, Y. (1992). Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **267**: 22994-23000.

Levy, D.E. (1995). Interferon induce of gene expression trouhg the jak-STAT pathway. *Semin. Virol.*, **6** : 181-189.

Li, L., Young, D., Wolf, S.F., Sung Choi, Y. (1996). Interleukine 12 stimulates B cell growth by inducing IFN- γ . *Cellular. Immunol.* , **168** (2) : 133-140.

Li, J., Zhang, W.B. & McManus, D.P. (2004). Recombinant antigens for immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Biol. Proced. Online.*, **6** (1) :67-77.

Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, and Wu D. (2000). Roles of PLC-₂ and -₃ and PI3K in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.*, **287**: 1046-1049.

Liance, M., Ricard-Blum, S., Emery, I., Houin, R. & Vuitton, D.A. (1998). *Echinococcus multilocularis* infection in mice: in vivo treatment with a low dose of INF- γ decreases metacestodes growth and liver fibrogenesis. *Parasite.*, **5**, 231-237.

Liew, F.Y., Millolt, S., Parkinson, C., Palmer, J. & Moncada, S. (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasit in vivo is mediated by nitric oxid from L.Argenine. *J. immunol.*, **144** (12) : 4794-4797.

Liew, F.Y., Li, Y., Moss, D., Parkinson, C., Rogers, M.V. Moncada, S. (1991). Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **21**: 3009-3014

- Lightowers, M.W., Liu, D.Y., Haralambous, A. & Rickard, M.D.** (1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **37**: 171–182.
- Lightowers, M.W. & Gottstein, B.** (1995). Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis, p. 355–410. In R. C. A. Thompson and A. J. Lymbery (ed.), *The biology of Echinococcus and hydatid disease*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Lightowers, M.W., Lawrence, S.B., Gauci, C.G., Young, J., Ralston, M.J., Maas, D. & Heath, D.D.** (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite immunology.*, **18**: 457-462.
- Lightowers, M.W., Jensen, O., Fernandez, E., Iriarte, J.A., Woollard, D.J., Gauci, C.J., Jenkins, D.J. & Heath, D.D.** (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int. J. Parasitol.*, **29** : 531–534.
- Lin, J.Y. & CHADEE, C.** (1992). Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.*, **148 (12)** : 3999-4005.
- Ling, P., Gately, M.K. & Gubler, U.** (1994). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.*, **154** : 116-127.
- Luster, A.D.** (1998). Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, **338**: 436–445.
- Lusti-Narasimhan, M., Chollet, A., Power, C.A., Allet, B., Proudfoot, A.E.I. & Wells, T.N.C.** (1996). A molecular switch of chemokine receptor selectivity. *J. Biol. Chem.*, **271 (6)** : 3148-3153.
- Ma, X., Chow, J. M., Gri, G., Carra, F., Gerosa, S. F., Wolf, R., Dzialo, & Trichieri, G.** (1996). The IL-12 P40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.*, **183** : 147.
- Ma, X., Sun, J., Papasavvas, E., Riemann, H., Robertson, S., Marshall, J., Bailer, R., Moore, A., Donnelly, R., Trichieri, G. & Montaner, J.** (2000). Inhibition of IL-12 production in human monocyte-Derived macrophages by TNF. *J. Immunol.*, **164** : 1722-1729.
- Ma, X. & Trinchieri, G.** (2001). Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv. Immunol*, **79**, 55-92.
- Mackenzie, C.D.** (1984). Sequestration—beneficial to both host and parasite. *Parasitology.*, **88** : 593–595. 175.
- Marco, M. & Nieto, A.** (1991). Metalloproteinases in the larvae of *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Parasitol.*, **21**: 743–746.
- MacMicking, J.D., Nathan, C. & Hom, G.** (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.*, **81**: 641-650.
- Mahe, Y., Mukaida, N., Kuno, K., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K. & Murakami, S.** (1991). Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor κ B and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J. Biol. Chem.*, **266**: 13759–13763.
- Manetti, R., Parronchi, P. & Grazia, M.** (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12 [IL-12]) induces T helper 96 IL-12 and Cancer Treatment type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.*, **177**: 1199-1204.
- Mannick, J.B., Assano, K., Isumi, K., Kleff, & Stamler, J.S.** (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein virus reactivation. *Cell.*, **79** : 1137-1146.

M

- Margutti, P., Profumo, E., Buttari, B., Delunardo, F., Ioppolo, S., Ortona, E., Rigano, R., Teggi, A., Vaccari, S. & Siracusano, A.** (2002). Role of the immune response in human cystic Echinococcosis. *Recent Res. Devel. Microbiology*, **6** : 395-401.
- Marletta, M.A.** (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.*, **14** : 488-492
- Marletta, M.A.** (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, **78**: 927-930.
- Mathieson, P.W. Gillespie, K.M.** (1996). Cloning of partial c-DNA for rat interleukine-12 (IL-12) and analysis of IL-12 expression *in vivo*. *Scand. J. Immunol* , **44** : 11-14 .
- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, HF., Leonard, E.J. & Oppenheim, J.J.** (1988). Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **169** : 1485-1490.
- Mattner, F., Fischer, S. & Guckes, S.** (1993). The interleukin-12 subunit *p40* specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur. J. Immunol.*, **23** : 2202-2208.
- Mc Kaness, G.B.** (1969). The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **129**, 973-992.
- Mellouk, S., Hoffman, S.L., Liu, Z.Z., De La Vega, P., Billiar, T.R. & Nussler, A.K.** (1994). Nitric oxide-Mediated antiplasmodial activity in human and murin hepatocytys induced by gamma interferon and the parasit itself: enhancement by exogenous tetrahydrobiopterin. *Infect. And Immun.*, 4043-4046.
- Merberg, D.M., Wolf, S.F. & Clark, S.C.** (1992). Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol. Today.*, **13** : 77-78.
- Mezioug, D.** (2002). Etude de la production *in vivo* et *in vitro* des cytokines marqueurs de la voie TH₁ et TH₂ au cours de l'hydatidose humaine. Thèse de Magister, Biochimie-Immunologie. FSB-USTHB.
- Mezioug, D., Ait Aissa, S., Amri, M., Bouhadeh, A. & Touil-Boukoffa, C.** (2004). Cytokines Th21/Th2 et monoxyde d'azote dans l'hydatidose. *J. A. M.*, **13 (2)** : 66-72.
- Michel, T & Feron, O.** (1997). Nitric oxide synthetases : wich, where, how and why ?. *J. Clin. Invest.*, **100 (9)** : 2146-2152.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E. & Rot, A.** (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*. **91**: 385- 395.
- Minty, A.J.** (1991). Une nouvelle famille de cytokines inflammatoires. *Medecine/sciences*, **7(6)** : 578-88.
- Moncada, S.** (1992). The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta. Physiol. Scand.*, **145** : 201-227
- Moncada, S. & Higgs, E.A.** (1993). The L arginine-nitric-oxide pathways. *N. Engl. J. Med* , **329** : 2002-2012.
- Moncada, S. & Higgs, A.** (1995). Molecular mechanisms and strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*, **9** : 1319-1330.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. & Higgs, E.A.** (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, **38**:1709-1715
- Mori, N., Mukaida, N., Ballard, D.W., Matsushima, K. & Yamamoto, N.** (1998). Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates human interleukin 8 gene through acting concurrently on AP-1 and nuclear factor-B-like sites. *Cancer Res.*, **58**: 3993-4000.

- Moulinier, C.** (2003). Elements de morphologie et de biologie. Editions Medicales Internationales Lavoisier : 415-422.
- Mountford, A.P., Shires, V.L. & Anderson, S.** (1998). Interleukin-12 and protective immunity to schistosomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 163-169
- Mukaida, N., Harada, A., Yasumoto, K. & Matsushima, K.** (1992). Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8), and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF). *Microbiol. Immunol.*, **36**: 773-789.
- Mukaida, N.** (2000). Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int. J. Hematol.*, **72**: 391-398.
- Mul, F.P., Zuurbier, A.E., Calafat, J., van Westering, S., Hiemstra, P.S., Roos, D. & Hordijk, P.L.** (2000). Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.*, **68**: 529-537.
- Munoz- Fernandez, M. A. & Fresno, M.** (1992). Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide- dependent mechanism. *Immunol. Lett.*, **33** : 35-40.
- Murayama, T., Kuno, K., Jisaki, F., Obuchi, M., Sakamuro, D., Furukawa, T., Mukaida, N. & Matsushima, K.** (1994). Enhancement of human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *J. Virol.*, **68**: 7582-7585.
- Murdoch C.** (2000). CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.*, **177**: 175-184.
- Murdoch, C. & Finn, A.** (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.*, **95** (10) :3032-3042.
- Murphy, P.M.** (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**: 593-633.
- Murphy, P.M. & Tiffany, H.L.** (1991). Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science.*, **253** : 1280-1283.
- Murphy, E.E., Terres, G. & Macatonia, S.E.** (1994). B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon γ production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J. Exp. Med.*, **180** : 223-231.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J. & Power, C.A.** (2000a). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52** : 145-176.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, and Power CA.** (2000b). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **52** : 145-176.
- Murray, H.W.** (1994 a). Interféron-gamma and host antimicrobial défense : current and future clinical application . *Am. J. Med.*, **97** : 453-467.
- Murray, H.W.** (1994 b). Cytokines in the treatment of leishmaniosis. *Bailers. Clin. Infect. Dis.*, **1** : 127-143.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y. & Rothernel, C.D.** (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine/ stimulated human phagocyte. Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. *J. Clin. Invest.*, **72** :1506-1510.

N

- Nakagawa, H., Hatakeyama, S., Ikesue, A. & Miyai, H.** (1991). Generation of interleukin-8 by plasmin from AVLPR-interleukin- 8, the human fibroblast-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS. Lett.*, **282** : 412-414.

Nastala, C.L., Edington, H.D. & McKinney, T.G. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J. Immunol.*, **153** : 1697-1706.

Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, **6** : 3051-3064

Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.*, **158** : 670-689.

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

Naume, B., Gately, M. & Espevik, T.A. (1992). Comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. *J. Immunol.*, **148** : 2429-2436.

Naume, B., Gately, M.K. & Desai, B.B. (1993). Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. *Cytokine.*, **5** : 38-46.

Nibbering, P.H., Pos, O., Stevenhagen, A. & Van Furth, R. (1993). Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. *Infect. Immun.*, **61**: 3111-3116.

Nozais, J.P., Datry, A. & Danis, M. (1997). *Traité de parasitologie médicale*. P : 67-78 ; 595-623. Ed : Pradel.

Nussler, A.K., di Silvio, M., Bilhiar, T.R., Hoffman, R.A., Geller, D.A., Selby, R., Madariaga, J. & Simmons, R.L. (1992) Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.*, **176** : 261-266.

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

O

Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N. & Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**: 617-648.

Oriol, R., Williams, J.F., Perez, M.V., Esandi, & Oriol, C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **20** : 569-574.

Oriol, C. & Oriol, R. (1975). Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24** : 96-100.

Ortona, E., Rigano, R., Margutti, P., Notargiacomo, S., Ioppolo, S., Vaccari, S., Barca, S., Buttari, B., Profumo, E., Teggi, A. & Siracusano, A. (2000). Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.*, **22** : 553-559.

Ouaaz, F., Sola, B., Issaly, F., Kolb, J.P., Davi, F., Mentz, F., Arock, M., Paul-Eugene, N., Korner, F., Dugas, B., Debré, P. & Mossalayi, M.D. (1996). Growth arrest and terminal differentiation of Leukemic myelomonocytic cells induced through the ligation of CD23 antigen. *Blood.*, **84** : 3095-3104.

Oury, T.D., Ho, Y.S., Piantadosi, C.A. & Crapo, J.D. (1992). Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89** : 9715-9719.

P

Padrines, M., Wolf, M., Walz, A. & Baggiolini, M. (1994). Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.*, **352**: 231–235.

Palmer, R.M. J., Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)*, **327** : 524-526

Paolini, J.F., Willard, D., Conslor, T., Luther, M. & Krangel, M.S. (1994). The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J. Immunol.*, **153**: 2704–2717.

Paul-Eugène, N., Mossalayi, D., Sarfati, M., Yamaoka, K., Aubry, J.P., Bonnefoy, J.Y., Dugas, B. & Kolb, J.P. (1995). Evidence for a role of FcR2/CD23 in the IL-4-induced nitric oxide production by normal human mononuclear phagocytes. *Cell. Immunol.*, **163** : 314-318.

Pe' Rez-fuentes, R., Maria Del Carmen, S.A., Nchez-Guille, S.A., Carlos-Gonza, N., Lez-Alvarez, Moneto, V.M., Reyes, P.A. & Jose' Rosales-Encina, L. (1998). Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58(6)** : 715–720

Pellegrini, S. & Schindler, C. (1993). Early events in signalling by interferons. *Trends Biochem. Sci.*, **18** : 338-342.

Pelletier, L., Bellon, B. & Druet, P. (1993). Cytokines et réponse immune. *Rev. Prat.*, **43.5** : 536-545.

Perkins, D.J., Kremsner, P.G., Schmid, D., Misukonis, M.A., Kelly, M.A. & Weinberg, G.B. (1999). Blood Mononuclear Cell Nitric Oxide Production and Plasma Cytokine Levels in Healthy Gabonese Children with Prior Mild or Severe Malaria. *Infect. Immun.*, **67 (9)** : 4977–4981.

Petros, A., Bennett, D. & Vallance, F. (1991). Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet.*, **338** : 1557-1558.

Piedrafita, D. & Liew, F.Y. (1998). Nitric oxide and infection: a protective or pathogenic molecule?. *Reviews in Medical Microbiology.*, **9(4)**: 179-189.

Plata, F., Garcia -Ponds, F. & Wietzerbin, J. (1984). Immune resistance to *Trypanosoma cruzi* : synergism of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.*, **138** : 397-415.

Polyak, S.J., Khabar, K.S., Rezeiq, M. & Gretch, D.R. (2001). Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J. Virol.*, **75** : 6209–6211.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, C.Z., Reichen, J. & Gottstein, B. (1999). Differential immunodiagnosis between cystic and hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *Trop. Med. Hyg.*, **60 (2)** : 193-198.

R

Raisanen-Sokolowski, A., Glysing-Jensen, T., Koglin, J. & Russel, M.E. (1998). Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon-gamma knockout recipients. *Am. J. Pathol.*, **152** : 359-365.

Rajan, T., Porte, P., Yates, J., Keefer, L. & Shutz, L. (1996). Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite *Brugia malayi*. *Infect. Immun.*, **64** : 3351-3353.

Ribeiro-de-Jesus A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O. & Carvalho, E.M. (1998) Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 143-148.

Rickard, M. D. & Williams, J.F. (1982). Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.*, **21**: 229– 296.

- Rickard, M. D. Lightowers, M.** (1986). Immunodiagnosis of hydatid disease, p. 217–249. In R. C. A. Thompson (ed.), *The biology of Echinococcus and hydatid disease*. George Allen and Unwin, London, United Kingdom.
- Rigano, R.; Profumo, E; Di Felice, G; Ortona, E; Teggi, A et Siracusano, A** (1995a). *In vitro* production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. *Clin. Exp. Immunol.*, **99**: 433-439.
- Rigano, R., Profumo, E., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Ortona, E., Teggi, A. & Siracusano, A.** (1995b). immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **102**: 281-285.
- Rigano, R., Profumo, E., Teggia, A. & Siracusano, A.** (1996). Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, **105**: 456-459.
- Rigano, R., Profumo, E., Buttari, B., Teggi, A. & Siracusano, A.** (1999a). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis. *Chin. Exp. Immunol.*, **118**: 95-101.
- Rigano, R., Profumo, E., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Teggi, A. & Siracusano, A.** (1999b). Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcoses. *Clin. Exp. Immunol.*, **115**: 503-507.
- Rigano, R., Profumo, E., Bruschi, F., Carulli, G., Azzara, A., Ioppolo, S., Buttari, B., Ortona, E., Margruti, A. & Siracusano, A.** (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun.*, **69**(1): 288-96.
- Riley, E.M., Dixon, J.B., Kelly, D.F. & Cox, D.A.** (1984). Immune response to *Echinococcus granulosus* : histological and immunocytochemical observations. *Annals of tropical medicine and parasitology.*, **78** (3) : 210-212.
- Riley, E.M., Dixon, J.B., Kelly, D.F. & Cox, D.A.** (1985). The immune response to *Echinococcus granulosus*: sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early murine infection. *J. Comp. Pathol.*, **95**:93–104.
- Ripert, C.** (1998). Epidémiologie des maladies parasitaires. P: 277-309. Tome II: Helminthoses. 3ème Ed: EM international.
- Robertson, M.J. & Ritz, J.** (1996). Interleukin 12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment. *The Oncologist.*, **1**: 88-97.
- Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. & Clark, I.A.** (1991). Killing of *Plasmodium falciparum in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect. Immun.*, **59** : 3280-3283.
- Romagnani, S.** (1996). The TH1/ TH2 Paradigm in human disease. *Eur. Cyt. Netw.*, **7**(3) : 435.
- Romao, P.R., Fonseca, S.G., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q.** (1999). Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology.*, **118**, 559-566.
- Rozenzvit, M.C., Zhang, L.H., Kamenetzky, L., Canova, S.G., Guarnera, E.A. & McManus, D.P.** (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology.*, **118**:523–530.

S

- Salcedo, T.W., Azzoni, L. & Wolf, S.F.** (1993). Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J. Immunol.*, **151**:2511-2520.

- Samanta, A.K., Oppenheim, J.J. & Matsushima, K.** (1990). Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **265**: 183–189.
- Sancéau, J., Merlin, G. & Wietzerbin, J.** (1992). Tumor Necrosis Factor- α and IL-6 up regulate IFN- γ receptor gene expression in human monocytic THP1 cells by Transcriptional and post transcriptional mechanisms. *J. Immunol.*, **149** : 1671-1675.
- Schoenhaut, D.S., Chua, A.O. & Wolitzky, A.G.** (1992). Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.*, **148** : 3433-3440.
- Schreck, R., Rieber, F. & Baeuerle, F.A.** (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used second messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, **10** : 2247-2258.
- Schroder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E. & Christophers, E.** (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.*, **139**: 3473–3483.
- Schroder, J.M.** (1989). The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate- 5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J. Exp. Med.*, **170**: 847–863.
- Scott, P.** (1991). IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, **147** : 3149-3155.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R. & Sher, A.** (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon- γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90** : 10188-10192.
- Sen, C.** (1997). The interferon. Cytokine and infection diseases. Ed. Remick D. G.: 199-204.
- Sennequier, N. & Vadon Le-Goff, S.** (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Medecine-Sciences.*, **14** : 1185-95.
- Serarslan, G., Yilmaz, H.R. & Söüt, S.** (2005). Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Derm.*, **30** : 267.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W. & Bourne, H.R.** (2000). Polarization of chemoattractant receptor signalling during neutrophil chemotaxis. *Science.*, **287**: 1037–1040.
- Shepherd, J.C. & McManus, D.P.** (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **25** : 143–154.
- Shepherd, V.L. & Abdohasilina, R.** (1997). Cytokines réceptors. P: 265-266; 270-271; 273-274. Cytokines in health and disease. 2nd Ed. Ed: Daniel. G, Remick.
- Shepherd, J.C., Aitken, A. & McManus, D.P.** (1991). A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **44** : 81–90.
- Siles-Lucas, M.M. & Gottstein, B.B.** (2001). Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Trop. Med. Int. Health.*, **6** : 463–475.
- Singh, V.K., Mehrotra, S. & Agarwal, S.S.** (1999). The paradigm of TH₁ TH₂ cytokines its relevance to autoimmunity and allergy. *Immun. Res.*, **20**: 147-161.
- Siracusano, A., Teggi, A., Quintieri, S., Notargiacomo, S., De Rosa, F. & Vicari, G. (1988). Cellular immune responses of hydatid patients to *Echinococcus granulosus* antigen 5. *Clin. Exp. Immunol.*, **72** : 400-405 .
- Siracusano, A., Ortona, E. & Rigano, R.** (2002). Molecular and cellular tool in human cystic Echinococcosis. Current drug targets-Immune, *Endocrine & metabolic disorders.*, **2**, 235-245.

- Smith, D.R., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Burdick, M.D., Wilke, C.A. & Strieter, R.M.** (1994). Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J. Exp. Med.*, **179**: 1409–1415.
- Smith, J.F.** (2003). Echinococcoses. \ A : \ généralités.htm
- Soh, J., Donnelly, R.J., Kotenko, S., Mariano, T.M., Cook, J.R., Wang, N., Emanuel, S., Schwartz, B., Miki, T. & Pestka, S.**, (1994). Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell.*, **76** : 793-802.
- Steers, N.J., Rogan, M.T. & Heath, S.** (2001). *In-vitro* susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol.*, **23**, 411-417.
- Sterla, S., Sato, H. & Nieto, A.** (1999). *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. *Parasite Immunol.*, **21**:27–34.
- Stern, A.S., Podlaski, F.J. & Hulmes, J.D.** (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 6808-6812.
- Stuehr, D.J. & Marletta, M.A.** (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82** : 7738-7742
- Szabo, S.J., Jacobson, N.G. & Dighe, A.S.** (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity.*, **2** :665-675.
- Takayama, K., Garcia-Gardena, G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A. & Libby, P.** (2002). PGE2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 Receptor. *J. Biol. Chem.*, **277** (46) :44147-44154.
- Tare, N.S., Bowen, S. & Warriner, R.R.** (1995). Administration of recombinant interleukin-12 to mice suppresses hematopoiesis in the bone marrow but enhances hematopoiesis in the spleen. *J. Interferon Cytokine Res.*, **15** :377-383.
- Taylor-Robinson, A.W.** (1998). Nitric oxide can be released as well as scavenged by haemoglobin: relevance to its antimalarial activity. *Parasite Immunol.*, **20**, 49–50.
- Torcal, M., Navarro-Zorruguino, M., Dozano, R., Larrad, L., Salinas, J.C., Ferrer, J., Roman, L. & Pastor, C.** (1996). Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **106** : 317-322.
- Touil-Boukoffa, C.** (1986). Production, purification de l'INF- γ humain naturel. Thèse de magister en biochimie-Immunologie-ISN-USTHB.
- Touil-Boukoffa, C.** (1998). Etude du système interféron et cytokines au cours de l'hydatidose humaine : implication de l'INF- γ , du TNF- α , de l'IL-6 et du NO dans la réponse immunitaire anti-fraction 5. Thèse de Doctorat d'Etat en Biochimie-Immunologie-ISN-USTHB.
- Touil-Boukoffa, C., Wietzerbin, J., Sancéau, J. & Tayebi, B.** (1991). Détection et caractérisation d'une activité Interféron (Type β) et de deux cytokines Le TNF- α et l'IL-6 au cours de l'hydatidose humaine. *J. A. M.*, **1** : 18-20
- Touil-Boukoffa, C., Wietzerbin, J., Sancéau, J. & Tayebi, B.** (1995). Interféron, Tumor, Necrosis, Factor- α and Interleukin-6 production correlates with immunoreactivity against parasitic Antigen in human Hydatid disease. *J. Interferon Cytokine Res.*, **15** : 206.

T

- Touil-Boukoffa, C., Sanceau, J., Bauvois, B. & Wietzerbin, J.** (1996). Presence of nitric in sera of patients with hydatidosis correlates with circulating cytokine levels. *Eur. Cytokine Network.*, **7** (3) : 205.
- Touil-Boukoffa, C., Sanceau, J., Bauvois, B., Hamrioui, B. & Wietzerbin, J.** (1997). Production of Interferon γ and Nitric oxide (NO) by peripheral Leukocytes from Hydatid patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **17**(2), 113.
- Touil-Boukoffa, C., Sanceau, J., Tayebi, B. & Wietzerbin, J.** (1997b). Relationship Among Circulating, Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-6 and Serological Reaction Against Parasitic Antigen in Human Hydatidosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, **17** (4) : 211-217.
- Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sanceau, J., Hamrioui, B. & Wietzerbin, J.** (1998). Production of Nitrite Oxide (NO) in Human Hydatidosis. Relationship between Nitrite and IFN- γ levels. *Biochimie.*, **80**, 739-744.
- Touil-Boukoffa, C., Sanceau, J., Bauvois, B., Hamrioui, B. & Wietzerbin, J.** (1999a). Production de l'interféron G et Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), de l'interleukine 6 (IL-6) et du monoxyde d'azote (NO) dans la réponse immunitaire anti-Ag5
- Touil-Boukoffa, C., Chabane, N. & Wietzerbin, J.** (1999b). Production of Interleukine-12 (IL-12) in Human Hydatidosis. Relationship between IFN-g production and IL-12 levels. *J. Interferon. Cyt. Res.*, **19** : 155.
- Touil-Boukoffa, C., Mezioug, D., Ait Aissa, S. et Chabane, N.** (2000a). Induction de l'IFN- γ sur culture de cellules périphériques mononuclées circulantes de patients atteints d'hydatidose sous l'influence de l'antigène 5. *Sciences & Technologie.*, **14**, 103-109.
- Touil-Boukoffa, C., Chabane, N., Mézioug, D., Benblidia, S., Ardjou & Wietzerbin, J.** (2000b). Levels of IFN- γ , IL-12, IL-4 and IL10 are determined in sera and supernatants of PBMC Cultures from Hydatid Patients. *Eur. Cyt. Netw.*, **11**, 286.
- Trinchieri, G.** (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol. Today.*, **14** : 335-338.
- Trinchieri, G.** (1994). Interleukin-12: a cytokine produced by antigenpresenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood.*, **84** : 4008-4027.
- Trinchieri, G.** (1995). Interleukin-12 a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptative immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, **13** : 251-272.
- Trinchieri, G. & Perussia, B.** (1985). Immune interferon- α pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today.*, **6**, 131-138.
- Tripp, C.S., Wolf, S.F. & Unanue, E.R.** (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor- α are costimulators of interferon-g production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90** : 3725-3729.
- Turco, J. & Winkler, H.H.** (1993). Role of the nitric oxide synthase pathway in inhibition of growth of interferon-sensitive and interferon-resistant *Rickettsia prowazekii* strains. *Infect. Immun.*, **61**: 4317-4325.

V

- Van Damme, J., De Ley, M., Claeys, H., Billiau, A., Vermylen, C. & De Sommer, P.** (1981). Interferon induced in human leukocyte by concanavaline A : isolation and characterization of α and β type component. *Eur. J. Immunol.*, **11** : 937-942.

- Van Damme, J., Decock, B., Conings, R., Lenaerts, J.P., Opdenakker, G. & Billiau, A.** (1989a). The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur. J. Immunol.*, **19** : 1189–1194.
- Van Damme, J., Van Beeumen, J., Conings, R., Decock, B. & Billiau, A.** (1989b). Purification of granulocyte chemotactic peptide/interleukin-8 reveals N-terminal sequence heterogeneity similar to that of α -thromboglobulin. *Eur. J. Biochem.*, **181**: 337–344.
- Van Damme, J., Rampart, M., Conings, R., Decock, B., Van Osselaer, N., Willems, J. & Billiau, A.** (1990). The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and α -thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of amino-terminally processed forms. *Eur. J. Immunol.*, **20**: 2113–2118.
- Van Weyenbergh, J., Silva, M. P., Bafica, A., Cardoso, S., Wietzerbin, J. & Barral-Netto, M.** (1998). IFN- β and TGF- β differentially regulate IL-12 activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett.*, **75** (2) : 117-122.
- Vargas, D., Bonet, R., Campano, S., Chacon, T. & Vidal, M.** (2001). Evaluación epidemiológica de las técnicas de ELISA y electroinmunotransferencia en el diagnóstico de la hidatidosis ovina en la XI región de Chile. *Parasitol. Dia.*, **25** (3-4).
- Vespa, G.N.R., Cunha, F.Q. & Silva, J.S.** (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. Immun.*, **62**: 5177-5182.
- Vidor, E., Piens, M. A., Abbas, M. & Pettavy, A. F.** (1986). Biochimie du liquide hydatique, influence de la localisation sur la perméabilité des kystes. *Ann. Parasitol. Hum. Com.*, **61** (3) :333-340.
- Vincendeau, P., Alain, P., Gobert, Dauloue, S., Moynet, D. & Mossalayi, M.D.** (2003). Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology.*, **19** (1).
- Vouldoukalis, I., Riverosmoreno, V., Dugas, B., Ouaz, F., Becherel, P., Debre, P., Moncada, S. & Mossalayi, M.D.** (1995). The killing of leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92** : 7804–7808.

W

- Warringa, R.A., Koenderman, L., Kok, P.T., Kreukniet, J. & Bruijnzeel, P.L.** (1991). Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood.*, **77**: 2694–2700.
- Watson, J.B., Getzler, S.B. & Mosher, D.F.** (1994). Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.*, **94** : 261–268.
- Wei, X., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G., Huang, F., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. & Liew, F.Y.** (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.*, **375**: 408-411.
- Wen, H. & P.S. Craig.** (1994). Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**: 741–748.
- Wen, H., Craig, P.S. & Itos, A.** (1995). Immunoblot evaluation of IgG and IgG subclass antibody responses for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **89** : 485-95.
- Wheelock, E.F.** (1965). Interferon like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohaemagglutinin. *Science.*, **149**, 310-311.
- WHO Informal working group on Echinococcosis (1996).** Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Bull. World health organ.*, **74** :231-42.

Wietzerbin, J., Kolb, J.P., Senik, A., DerStepani, L., Andrew, G. & Falcoff, R. (1984). Studies of purification of human gamma interferon: chromatographic behavior of accompanying IL-2 and B-cell helper activity. *J. Interferon. Res.*, **4** : 141-151

Wietzerbin, J., Civas, A., Gascan, H., Vasquez, A., Bertoglio, J., Dy, M. & Theze, J. (1997). Interferons and Cytokines. Where we stand the first joint meeting of the international society for Interferon and Cytokine Research (geneva, October, 6-10, 1996). *Eur. Cyt. Netw.*, **8** (2) : 215-219.

Williams, B.R.G., Jurkovich, G.J. & Maier, R.V. (1993). Interferon-g : a key immunoregulatory lymphokine. *J. Surg. Res.*, **54** : 79-93.

Winkler, S., EL-Menyawi, I., LINNAU, K.F. & Graninger, W. (1998). Short report : Total serum levels of the nitric oxide derivatives nitrite/nitrate during microfilarial clearance in human filarial disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**(4) : 523-525.

Wizel, B., Nunes, M. & Tarleton, R. L. (1997). Identification of Trypanosoma cruzi trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 response. *J. Immunol.*, **159** : 6120-6130.

Wolf, S.F., Temple, P.A. & Kobayashi, M. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.*, **146** : 3074-3081.

Y

Yarzabal, L. A., Bout, D. T., Naquira, F. R. & Capron, A. R. (1977). Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.*, **63** : 495-499.

Yip, Y.K., Barrowglouch, S.B., Urban, C. & Vilcek, I. (1982). Purification of two subspecies of human- γ immune interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** : 1820-1824.

Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J. & Leonard, E.J. (1987). Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 9233-9237.

Yoshimura, T., Robinson, E.A., Appella, E., Matsushima, K., Showalter, S.D., Skeel, A. & Leonard, E.J. (1989). Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence. *Mol. Immunol.*, **26**: 87-93.

Z

Zhang, L.H., & McManus, D.P. (1996). Purification and N-terminal amino acid sequencing of *Echinococcus granulosus* antigen 5. *Parasite Immunol.* **18**:597-606.

Zhang, L., Eslami, A., Hosseini, S.H. & McManus, D.P. (1998). Indication of the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**:171-174.

Zhang, W., Li, J. & McManus, D.P. (2003). Concepts in Immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Micro. Rev.*, **16**(1), 18-36.

Zlotnik, A. & Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.*, **12**: 121-127.

Zou, L., Burmeister, L.A. & Sperling, M.A. (1997). Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone gene receptor. *Endocrinology.*, **138** : 1771-1774.

RESUME

L'hydatidose est une helminthiase, médicalement et socialement grave, très endémique en Algérie. Elle est provoquée par le développement chez l'homme et divers mammifères de la forme larvaire d'un tænia: *Echinococcus granulosus*. Le pouvoir antigénique de ce parasite est lié à l'existence d'une véritable mosaïque antigénique impliquant les antigènes solubles du liquide hydatique, figurés des protoscolex et de la membrane kystique.

Dans une première étape, nous nous sommes intéressés à la purification de l'antigène majeur du liquide hydatique humain : l'antigène 5 ou F5 (de 67 kDa) et d'une nouvelle protéine douée d'activité antigénique et répondant à un poids moléculaire de 50 kDa (P50). Après caractérisation biochimique et immunologique, les deux fractions sont utilisées pour l'étude de la production de deux cytokines à caractère pro-inflammatoire : l'interleukine 12, une chémokine l'IL-8 et le monoxyde d'azote (NO) sur culture de PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) de patients hydatiques. Cette étude a été complétée par l'évaluation de l'effet additionnel ou synergique de l'IFN- γ exogène et/ou des deux fractions antigéniques sur la production des trois biomolécules. Un dosage *in vivo* de cette production a été également entrepris. **Dans le deuxième volet de notre étude**, la viabilité des protoscolex (PSC) a été testée sur des cocultures de PSC et de PBMC de patients hydatiques en présence d'IFN- γ . Un dosage du NO a été entrepris dans chaque cas.

Selon nos observations, il apparaît que l'intensité de production de l'IL-12, de l'IL-8 et du NO soit associée à la nature de l'antigène inducteur. En effet, bien que les deux fractions antigéniques F5 et P50 induisent l'augmentation de la production des trois biomolécules, la F5 serait l'effecteur antigénique le plus important. Nos résultats montrent, comme dans beaucoup d'autres parasitoses que l'IL-12, l'IL-8 et le NO jouent un rôle dans l'initiation, la modulation de la réponse immunitaire et dans l'inflammation au cours de l'échinococcose humaine hépatique et pulmonaire.

Nous avons observé avec intérêt qu'en présence d'IFN- γ la viabilité des PSC est atténuée. Cette observation est accompagnée d'une augmentation de la production du NO. Cet effet lié à l'induction de la production de NO par l'IFN- γ se traduit par une action scolicide résultant de la présence de métabolites dérivants du NO. Il apparaît donc que l'IFN- γ induise la destruction du parasite à travers la voie de synthèse du NO dans le système monocytaire.

Au regard global de nos résultats, les biomolécules testées *in vivo* et *in vitro* apparaissent des marqueurs potentiels dans le suivi et l'immunosurveillance des patients. L'action scolicide de l'IFN- γ ouvre de nouvelles perspectives dans la thérapie anti-hydatique.