

ÉTUDE DU PROFIL CYTOKINIQUE DE PATIENTS ATTEINTS D'HYDATIDOSE : UNE POSSIBLE APPLICATION EN MATIÈRE D'IMMUNOSURVEILLANCE

MEZIOUG D.* & TOUIL-BOUKOFFA C.*

Summary: CYTOKINE PROFILE IN HUMAN HYDATIDOSIS: POSSIBLE ROLE IN THE IMMUNOSURVEILLANCE OF PATIENTS INFECTED WITH *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

Hydatidosis is a severe parasitic disease caused by infection with metacystode of the tapeworms *Echinococcus granulosus*. In human, the larval forms develop into large cysts especially in the liver, lung and brain. Our aim in this study was to investigate Th1 and Th2 cytokines production in hydatid disease in order to evaluate implication of Th1/Th2 ratio in the evolution of pathology according to the cystic localization, clinical stage and clinical evolution. Interferon- γ (IFN- γ), interleukine-12 (IL-12), interleukine-16 (IL-16), interleukine-18 (IL-18), interleukine-4 (IL-4), interleukine-5 (IL-5), interleukine-10 (IL-10) and interleukine-13 (IL-13) production is determined in sera from hydatid Algerian patients (n = 177) with liver, lung, liver and lung associated, spleen, kidney, osseo, heart and multiples hydatid cyst and in sera from patients with clinical complications (calcified liver cysts; infected lung cysts; vomique lung cysts and patients who relapsed) and according clinical stage (before surgical extirpation of the cyst and after surgical extirpation of the cyst). Cytokines are evaluated by enzyme-linked immunosorbent Kits (ELISA Immunotech). The coexistence of elevated activities of IFN- γ , IL-12, IL-16, IL-18, IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 is observed in most of sera from hydatid patients. In contrast, healthy controls showed minor levels. These results support Th1 and Th2 cell subsets activation in human hydatidosis. The comparison of Th1/Th2 production shows that the induction of these mediators is related to the cystic localization, the clinical stage and clinical evolution. Collectively, our data indicates that Th1 cytokines are related to the protective immunity, in contrast Th2 cytokines are responsible to the susceptibility to disease and associated with chronicle stage, clinical complications and secondary locations.

KEY WORDS : hydatidosis, cytokine, Th1/Th2 cytokines, cystic localization, clinical stage, immunosurveillance.

MOTS CLÉS : hydatidose, cytokine, cytokines Th1/Th2, localisation kystique, stade clinique, immunosurveillance.

L'hydatidose est une affection parasitaire provoquée par le développement chez l'homme et divers mammifères de la forme larvaire d'*Echinococcus granulosus* vivant à l'état adulte dans le tube digestif de certains mammifères carnivores essentiellement le chien (Mc Manus & Smith, 1986). Les kystes engen-

Résumé :

L'hydatidose est une zoonose endémique en Algérie et dans les pays du Maghreb. L'objectif de notre travail a porté sur l'exploration des cytokines exprimées dans le parcours des réponses immunitaires au cours de l'infection par *Echinococcus granulosus*. Cette étude a été réalisée en vue de situer l'implication du rapport Th1/Th2 dans l'évolution de la pathologie en fonction de la localisation anatomique du kyste, le stade et l'évolution clinique. Un dosage de l'interféron- γ (IFN- γ), de l'interleukine-12 (IL-12), de l'interleukine-16 (IL-16), de l'interleukine-18 (IL-18), de l'interleukine-4 (IL-4), de l'interleukine-5 (IL-5), de l'interleukine-10 (IL-10) et de l'interleukine-13 (IL-13) dans les sérums de patients algériens (n = 177) porteurs de kystes hydatiques au niveau hépatique, pulmonaire, hépatique et pulmonaire associés, splénique, rénale, osseux, cardiaque et multiples a été entrepris. L'analyse du profil des cytokines a été également réalisée chez les patients présentant des formes à complication (fissuration du kyste, rupture, calcification du kyste et les patients en phase de récédive) et selon le stade clinique (pré- et post-opératoire). L'identification et l'évaluation des activités des cytokines considérées ont été réalisées par un dosage immuno-enzymatique (ELISA sandwich) selon les méthodes préconisées par immunotech (France). Des teneurs significatives en IFN- γ , IL-12, IL-16, IL-18, IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 ont été détectées dans les sérums des patients en comparaison aux sujets "contrôles" (p < 0,001), suggérant la coexistence des deux voies Th1 et Th2 dans le mécanisme de défense mis en jeu par l'homme au cours de l'évolution de la parasitose. La comparaison des niveaux de production de ces médiateurs en fonction de la localisation anatomique des kystes montre que les teneurs sériques en IFN- γ , IL-12, IL-16 et IL-18, mesurées chez les patients atteints d'hydatidose à localisations fréquentes (hépatiques, pulmonaire ou les deux localisations associées) et répondant à une évolution classique, sont nettement supérieures à celles observées chez les porteurs de localisations rares ou secondaires ou des formes "à complications", chez qui une production substantielle en cytokines marqueurs de la voie Th2, IL-4, IL-10 et IL-13 a été détectée. Ces résultats indiquent que la production des cytokines Th1 est prédictive d'un bon pronostic, celle des cytokines Th2 laisse envisager des formes d'évolution chronique ou des formes "à complications".

drés par le parasite sont sphériques et bien délimités (Sanchez *et al.*, 1993; Mc Manus, 2002), généralement retrouvés dans le foie, le poumon et les autres organes tels que les reins et les muscles, la rate et le système nerveux central, le pancréas, le cœur, la thyroïde, l'orbite, les glandes salivaires, les os. Nous pouvons toutefois affirmer qu'aucune localisation n'est impossible (Nozais *et al.*, 1985). Cliniquement le(s) kyste(s) évolu(e)nt) lentement pendant plusieurs années; la symptomatologie, quand elle existe, n'est pas spécifi-

* Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire, Faculté des Sciences biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, BP 32, El Alia, 16111, Alger, Algérie.
Correspondance : Dalila Mezioug. E-mail : mezioug_dalila@yahoo.fr

que et dépend de la localisation, du nombre et de la taille des kystes. C'est pourquoi le diagnostic est souvent délicat (Cesbron *et al.*, 1986; Poretti *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003). Ainsi, l'ablation chirurgicale reste le traitement de choix de l'infection malgré de nombreuses tentatives de thérapie médicamenteuse (Teggi *et al.*, 1993; Anadol *et al.*, 2001) et d'immuno-prévention chez l'animal (Lightowers *et al.*, 1996; Lightowers *et al.*, 1999; Urreas-Paris *et al.*, 2001). Les cytokines sont des facteurs de communication intercellulaire, agissant par le biais de récepteurs (Fukata *et al.*, 1996; Naka *et al.*, 1997) dans de véritables systèmes d'amplification et de rétrocontrôle qui relient les réponses comportementales, métaboliques cérébrales, neuroendocriniennes et immunitaires afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Ce sont des protéines, le plus souvent glycosylées, secrétées par une grande variété de cellules, généralement, après stimulation par un signal activateur (Wietzerbin *et al.*, 1997). Elles se distinguent des autres facteurs par la grande diversité des cellules qui les produisent et le grand nombre de leurs cibles potentielles, impliquant un large spectre d'action et un mode d'activité qui peut être autocrine, paracrine, voire endocrine. Elles jouent un rôle essentiel au cours du développement de la réponse immunitaire, dans la physiologie ou la pathologie de l'inflammation et de l'hématopoïèse. Elles interviennent également dans les réactions de fibrose, de résorption osseuse et de chimiotactisme. Le système monocyte/macrophage, le système dendritique folliculaire avec les lymphocytes TCD4⁺ (T helper, Th) constituent une source importante de cytokines au cours de la réponse immunitaire. Selon les cytokines qu'ils produisent, les LT CD4⁺ peuvent être classés en lymphocytes Th1 ou Th2 (Mosman *et al.*, 1986; Romagnani, 1992; Abbas *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1999). Ces clones se distinguent par des productions exclusives de cytokines : IFN- γ , IL-2, IL-18, TNF- α , pour les cellules Th1. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 pour les cellules Th2. Les lymphocytes Th1 sont les principaux effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire spécifique d'antigènes. Les lymphocytes Th2, *via* les cytokines qu'ils produisent, exercent un rôle prépondérant dans le traitement des affections immunes et leur corollaire habituel : l'inflammation chronique (Mosman & Coffman., 1989; Cox & Liew, 1992; Romagnani, 1999; Pearce *et al.*, 1991). La fréquence du kyste hydatique dans nos régions, la gravité des atteintes humaines et animales et les contraintes du diagnostic de cette pathologie nous ont amenés à étudier le rôle des cytokines dans les mécanismes immunitaires en vue de situer l'implication du rapport Th1/Th2 dans l'évolution de la pathologie en fonction de la localisation anatomique du kyste (localisations fréquentes et rares), du stade clinique et de l'immunoréactivité des patients vis-à-vis de l'antigène 5 (Bout *et al.*, 1974; Pozzioli *et al.*, 1975). Ces investigations permettront le

choix d'un marqueur efficace dans le suivi et l'orientation du pronostic des patients

MATÉRIELS ET MÉTHODES

PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE 5 À PARTIR DU LIQUIDE HYDATIQUE HUMAIN

Le liquide hydatique

Le liquide hydatique est obtenu par ponction des kystes hydatiques fertiles, prélevés chirurgicalement chez des patients atteints d'hydatidose hépatique. Il est soumis à deux filtrations successives pour éliminer les débris membranaires et les scolex. Il est centrifugé à 5000 rpm/mn pendant 15 mn à + 4 °C. Le surnageant obtenu est dialysé, caractérisé antigéniquement par immunoélectrophorèse (IEP), hémagglutination et par un dosage immunoenzymatique selon la méthode ELISA. Enfin le surnageant est lyophilisé.

Préparation de l'antigène 5

L'antigène 5 a été préparé à partir du liquide hydatique humain par filtration moléculaire sur Sephadex G200 en tampon Tris HCl 0.1M-NaCl 1M pH 8. Différents pics d'éluions sont déterminés par la mesure de la densité optique à 280 nm. Les fractions ainsi récupérées sont poolées, dialysées et analysées par immunoélectrophorèse, hémagglutination et par ELISA contre les sérums hyper immuns anti F5. L'antigène-5 a été localisé au niveau du pic II et répond à un poids moléculaire de 65 kDa.

LES PATIENTS

177 sérums sont préparés à partir de sang de patients algériens atteints d'hydatidose confirmée par chirurgie. Ces patients sont hospitalisés dans le service de chirurgie générale et le service de chirurgie thoracique et cardiovasculaire du CHU Mustapha Bacha d'Alger, Algérie. Ils ne présentent aucune autre pathologie. Ils sont suivis au stade pré- et post-opératoire. Selon la localisation, les cas testés (n = 177) sont repartis en kystes hépatiques; pulmonaires; hépatiques et pulmonaires; multiples et autres localisations (splénique, rénale, cardiaque et osseuse). 79 patients sont de sexe masculin (M) et 98 de sexe féminin (F). Leur âge s'échelonne entre quatre ans et plus de 68 ans (Tableau I). Les sérums sont immédiatement conservés à -80 °C. Tous les patients ont donné leur consentement pour les prélèvements sanguins. Les sérums contrôles ou témoins négatifs (n = 40) nous ont été aimablement fournis par le Centre de transfusion sanguine de l'hôpital Ain Naadja d'Alger.

La séroréactivité envers l'antigène majeur (F5) a été réalisée pour l'ensemble des sérums par immunoélectrophorèse, hémagglutination et par ELISA.

Localisation des kystes	Poumon	Foie	Poumon + foie	Péricarde	Os	Rate	Rein	Multiple*	Multiple**	Foie (calcifié)	Poumon (infecté)	Poumon (vomique)	Récidive	Contrôle
Nombre de sérums (N = 177)	33	49	10	06	08	07	09	13	10	06	07	08	11	40
Âge des patients (ans)	04-68	05-68	05-65	04-35	28-50	11-42	06-55	05-64	08-68	25-54	22-48	10-45	19-55	18-55

* Foie + poumon + rate + péritoine.

** Foie + poumon + cerveau + muscle.

Tableau I. – Répartition des patients en fonctions de la localisation du kyste hydatique.

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES CYTOKINES PRODUITES *IN VIVO*

L'identification et la quantification des cytokines testées dans les sérums de patients porteurs de kystes hydatiques ont été réalisées par un dosage immunoenzymatique selon les techniques préconisées par Immunotech (Immunotech, Coulter company, France). IL s'agit d'un dosage de type sandwich. Dans les puits d'une plaque de microtitration recouverts d'un premier anticorps monoclonal anti-cytokine biotinylé, sont distribués les échantillons (sérums) à doser et le standard. Après deux heures d'incubation à température ambiante et lavage, le conjugué streptavidine-peroxydase est distribué à raison de 50 µl d'anticorps biotinylé et 100 µl de conjugué streptavidine-HRP2 dans les puits. La plaque est alors incubée 30 min. à température ambiante puis lavée. La réaction enzymatique est révélée par l'addition du substrat spécifique de l'enzyme, le tétraméthylbenzidine (TMB) à raison de 100 µl par puits. La réaction chromogène se développe à l'obscurité. Elle est arrêtée avec une solution d'acide sulfurique 2N. L'absorbance est lue à 450 nm contre le blanc substrat.

ANALYSE STATISTIQUE DE DONNÉES

L'analyse des données a été réalisée en utilisant Microcal-Origin version 5.0 (Microcal.software, USA). La comparaison des moyennes a été réalisée en utilisant le test *t* de Student à un taux de risque maximum de 5 %.

RÉSULTATS

Le dosage des cytokines dans les sérums de patients atteints d'hydatidose selon les localisations kystiques – pulmonaire, hépatique, pulmonaire et hépatique associées, splénique, rénale, osseuse, cardiaque et multiples – a montré des teneurs élevées en IFN- γ , Il-12, Il-16, Il-18, Il-4, Il-5, Il-10 et Il-13 chez les sujets atteints d'hydatidose à localisations fréquentes et rares par rapport au contrôle (Tableau II). Ces résultats suggèrent la coexistence des deux voies – Th1 et Th2 – dans le mécanisme de défense mis en jeu par l'homme au cours de l'évolution de la parasitose.

Toutefois, la variation dans les teneurs selon le type de cytokines Th1 et Th2 en fonction de la localisation anatomique du kyste, du stade et du statut clinique indique l'existence probable d'une intervention concurrente des deux voies.

La comparaison des niveaux de production de ces médiateurs en fonction de la localisation anatomique des kystes montre que les teneurs sériques en IFN- γ , Il-12, Il-16 et Il-18 mesurées chez les patients atteints d'hydatidose à localisations fréquentes (hépatique, pulmonaire ou les deux localisations associées) sont nettement supérieures à celles observées chez les porteurs

Localisation des kystes	IFN- γ (UI/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-16 (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
Contrôle (n = 40)	2,45 +/- 1,35	25,42 +/- 12,5	301 +/- 1,32	96,54 +/- 42,32	12,42 +/- 4,79	8,44 +/- 34,25	17,75 +/- 11,69	11,97 +/- 3,97
Poumon (n = 33)	13,32 +/- 1,66	85,89 +/- 22,5	456,23 +/- 154,02	455,52 +/- 62,35	57,6 +/- 14,85	211,58 +/- 54,25	204,55 +/- 51,57	57,33 +/- 12,69
Foie (n = 49)	18,99 +/- 1,31	110,36 +/- 20,18	747,19 +/- 89,32	527,32 +/- 39,8	49,98 +/- 13,22	320,14 +/- 66,23	186,51 +/- 31,34	54,79 +/- 6,98
Poumon + foie (n = 10)	14,71 +/- 2,64	133,35 +/- 29,31	842,56 +/- 56,21	499,46 +/- 71,25	67,08 +/- 8,59	224,12 +/- 58,45	217,42 +/- 39,16	66,04 +/- 16,8
Péricarde (n = 06)	8,75 +/- 1,18	29,27 +/- 12,25	278,56 +/- 58,63	153,87 +/- 92,35	71,23 +/- 11,91	87,12 +/- 61,33	346,83 +/- 38,12	60,15 +/- 5,18
Os (n = 08)	7,3 +/- 1,21	33,35 +/- 19,69	210,33 +/- 87,32	109,21 +/- 24,1	76,25 +/- 12,25	43,33 +/- 39,25	197,25 +/- 47,62	48,33 +/- 6,36
Rate (n = 07)	22 +/- 1,33	57,6 +/- 15,33	301,18 +/- 49,58	253,36 +/- 86,33	55,87 +/- 10,98	135,49 +/- 69,27	125,23 +/- 28,63	31,12 +/- 12,14
Rein (n = 09)	8,36 +/- 3,2	38,25 +/- 14,22	243,1 +/- 98,75	137,97 +/- 49,88	72,91 +/- 16,54	76,49 +/- 58,21	176,48 +/- 42,15	98,57 +/- 15,97
Multiple* (n = 13)	21 +/- 2,98	168,6 +/- 31,21	612,48 +/- 62,45	375,25 +/- 81,23	60,02 +/- 10,56	265,33 +/- 96,36	215,12 +/- 25,98	72,25 +/- 9,28
Multiple** (n = 10)	15,2 +/- 1,31	92,04 +/- 28,51	580,03 +/- 72,13	318,65 +/- 54,22	72,5 +/- 8,34	218,57 +/- 58,45	248,16 +/- 52,85	85,32 +/- 10,32
Foie (calcifié) (n = 06)	4,35 +/- 2,66	-	-	-	75,55 +/- 11,32	-	-	-
Poumon (infecté) (n = 07)	6,29 +/- 2,14	-	-	-	65,45 +/- 5,46	-	-	-
Poumon (vomique) (n = 08)	5,83 +/- 1,89	-	-	-	74,32 +/- 9,45	-	-	-
Récidive (n = 11)	1,03 +/- 1,22	-	-	-	66,97 +/- 10,99	-	-	-

* Foie + poumon + rate + péritoine; ** Foie + poumon + cerveau + muscle.

Tableau II. – Teneurs en cytokines dans les sérums de patients atteints d'hydatidose au stade pré-opératoire.

de localisations rares ou secondaires. Toutefois, les teneurs sériques en cytokines mesurées chez les patients sont supérieures dans tous les cas testés aux teneurs évaluées dans les sérums contrôles.

Une production substantielle en cytokines marqueurs de la voie Th2 a été enregistrée chez les patients porteurs de kystes à localisations rares ou secondaires à l'exception de la localisation splénique. En effet, les sérums de patients porteurs de kystes spléniques expriment des titres élevés en IFN- γ ($22,00 \pm 1,33$ UI/ml). Ces taux sont trois fois supérieurs à ceux des patients porteurs de kystes osseux ($7,3 \pm 1,21$ UI/ml). Une augmentation de la production de l'IL-10 associée à une diminution de l'induction de l'IL-12 a été observée chez les patients porteurs de kystes au niveau du cœur. Cet effet est lié probablement à une régulation négative de la production de IL-12 par l'IL-10 sachant l'antagonisme réciproque de ces deux cytokines (Romagnani, 2000). La localisation rénale indique des teneurs sériques élevées en IL-13 ($98,57 \pm 15,97$ pg/ml). Pour les atteintes multiples, les résultats varient selon les localisations des kystes. Nos résultats laissent à penser que l'atteinte anatomique a des conséquences immuno-physiologiques engendrant ainsi des modifications dans les profils des cytokines produites.

L'immunoréactivité des patients à atteinte hépatique, pulmonaire, hépato-pulmonaire et multiples envers l'antigène (F5) a été positive dans les cas testés en IEP, en hémagglutination et en ELISA. Alors que les localisations rares ou secondaires, en général, ont présenté une séroréactivité négative (résultats non montrés).

Nous avons observé avec intérêt que les sujets récidivant après chirurgie radicale du kyste hépatique exhibent des activités IL-4 significatives, alors que leurs titres en IFN- γ deviennent indécélabes. De plus, ces mêmes sujets ne développent aucune immunoréactivité contre l'antigène 5. Par ailleurs, les teneurs sériques en IFN- γ mesurées chez les patients porteurs de kystes hydatiques calcifiés, infectés, fissurés ou évacués lors d'une vomique sont proches de ceux observées pour les patients porteurs de localisations rares ou secondaires. Ces résultats traduisent l'existence probable d'une relation entre la localisation du kyste, l'évolution clinique et la production des cytokines.

L'étude de la production des cytokines en fonction du stade clinique indique que les activités des cytokines sont révélées dans tous les cas avant extirpation kystique. Toutefois, après exérèse, ces titres déclinent, atteignant des valeurs non significatives après 30 jours (Tableau III) à l'exception de l'IL-12 qui persiste durant les 72 heures après chirurgie (résultats non montrés). Nous constatons que 72 heures après exérèse du kyste, la concentration en IL-12 varie de 30 à 170 pg/ml pour les sérums en phase pré-opératoire contre des concentrations allant de 90 à 220 pg/ml pour les sérums testés en phase post-opératoire.

Localisation des kystes	IFN- γ (UI/ml) pré-op	IFN- γ (UI/ml) post-op	Il-4 (pg/ml) pré-op	Il-4 (pg/ml) post-op
Contrôles (n = 40)	2,45 +/- 1,35	2,45 +/- 1,35	12,42 +/- 4,79	12,42 +/- 4,79
Poumon (n = 33)	13,32 +/- 1,66	6,14 +/- 1,54	57,6 +/- 14,85	29,8 +/- 11,74
Foie (n = 49)	18,99 +/- 1,31	8,93 +/- 1,22	49,98 +/- 13,22	26,09 +/- 9,32
Poumon + foie (n = 10)	14,71 +/- 2,64	6,32 +/- 2,33	67,08 +/- 8,59	41,75 +/- 5,83
Péricarde (n = 06)	8,75 +/- 1,18	4,98 +/- 1,1	71,23 +/- 11,91	36,85 +/- 7,65
Os (n = 08)	7,3 +/- 1,21	3,21 +/- 1,09	76,25 +/- 12,25	45,61 +/- 9,52
Rate (n = 07)	22 +/- 1,33	10,23 +/- 1,17	55,87 +/- 10,98	33,56 +/- 8,23
Rein (n = 09)	8,36 +/- 3,2	5,63 +/- 2,98	72,91 +/- 16,54	39,12 +/- 13,27
Multiple* (n = 13)	21 +/- 2,98	9,11 +/- 1,89	60,02 +/- 10,56	39,87 +/- 7,81
Multiple** (n = 10)	15,2 +/- 2,98	7,55 +/- 1,28	72,5 +/- 8,34	47,54 +/- 5,44

* Foie + poumon + rate + péritoine

** Foie + poumon + cerveau + muscle

Tableau III. – Teneurs en IFN- γ et en Il-4 dans les sérums de patients atteints d'hydatidose aux stades pré-opératoire et post-opératoire.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative de la production de cytokines Th1 et Th2 au cours de l'hydatidose humaine par rapport aux sujets sains. Ces données suggèrent l'implication des deux voies Th1 et Th2 dans la réponse anti-hydatique. Ces résultats corroborent les travaux de Rigano *et al.* (1995, 1999); Torcal *et al.* (1996); Touil-Boukoffa *et al.* (1997) et Dematteis *et al.* (1999) qui rapportent le rôle des cytokines dans la réponse immunitaire anti *Echinococcus granulosus*. Des études similaires ont mis en évidence la capacité des parasites à développer intracellulairement la synthèse de cytokines notamment dans le cas *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* ou encore *Toxoplasma gondii* (Cetre *et al.*, 1999; Donato *et al.*, 2002). Une induction de la synthèse de cytokines a été également rapportée dans le cas des pathologies dues à des bactéries en particulier dans les infections à *Chlamydia trachomatis* (Holland *et al.*, 1996) et *Salmonella typhimurium* (Mastroeni *et al.*, 1999).

L'analyse des profils cytokiniques en fonction de la localisation anatomique du kyste montre des teneurs significatives en IFN- γ , Il-12 et Il-18 pour les patients atteints d'hydatidose à localisations fréquentes : hépatiques, pulmonaires et hépato-pulmonaires et répondant à une évolution classique de l'hydatide. Une corrélation entre les cytokines marqueurs de la voie Th1 a été observée avec intérêt. Sachant le rôle important de l'Il-12 en synergie avec l'Il-18 dans la régulation positive de synthèse de l'IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1994; Trinchieri, 1998). Il est à signaler également le rôle de l'IFN- γ dans le maintien de l'expression de la chaîne β du récepteur de l'Il-12 (Abbas *et al.*, 1996) et l'inhibition de la voie Th2 (Fiorentino *et al.*, 1991; Parronchi *et al.*, 1992; Miossec, 1994; Aste-Amezaga *et al.*, 2000). L'étude de l'induction des cytokines chez les patients porteurs de kystes à localisations rares ou secondaires

et les formes à complication a révélé des teneurs faibles en cytokines Th1 et des taux significatifs en cytokines Th2, l'Il-4, l'Il-10 et l'Il-13. La différence observée dans l'induction des cytokines selon la localisation kystique serait due à la multiplicité des antigènes qui conduirait à des stimulations différentes du système immunitaire et par conséquent à des réponses hétérogènes Th1/Th2. Les teneurs relativement basses en IFN- γ et significatives en Il-4, Il-10 et en Il-13 détectées dans les sérums de patients atteints d'hydatidose osseuse corréleraient à l'immunoréactivité mesurée par ELISA et par hémagglutination contre l'antigène 5. Il faut signaler qu'aucun arc de précipitation n'a été obtenu par les techniques d'immunoélectrophorèse. Ces observations suggèrent que l'implantation du kyste au niveau de l'os serait à l'origine de la diminution de la sensibilisation des cellules immunocompétentes aux antigènes hydatiques en particulier l'antigène 5. Les titres sériques sont faibles en comparaison à ceux obtenus pour les localisations fréquentes et la localisation splénique. Il apparaît que l'ancrage du matériel antigénique dans l'os diminuerait la diffusion des molécules douées d'antigénicité. Cette observation a été rapportée pour l'IFN- γ par Touil-Boukoffa *et al.* (1997) concernant la localisation orbitaire. Nous avons porté une attention particulière pour l'atteinte splénique où les titres en IFN- γ sont les plus élevés. Cette observation corrobore les hypothèses émises par Touil-Boukoffa *et al.* (1998) et Rigano *et al.* (2001) où l'interféron- γ joue un rôle déterminant dans la phase de reconnaissance et par voie transitive dans les autres phases de la réponse immunitaire. La différence des réponses *in vivo* et selon le stade clinique montre que la phase de l'implantation de l'hydatide est l'étape inhérente à l'instauration des réponses immunitaires. Cependant, vu le caractère évolutif silencieux et lent de la pathologie portant sur la vésiculisation, depuis l'implantation du kyste jusqu'à l'augmentation maximale de la taille et sa fertilisation, il apparaît judicieux de suivre les profils cytokiniques

à un stade évolutif de la parasitose. Des modèles animaux murins nous apporteraient des orientations plus précises.

En outre, nous avons observé avec intérêt l'absence d'activité interféron dans les sérums de patients en phase de récurrence suggérant que la localisation, probablement la taille du kyste et l'évolution clinique aient une influence sur la production de l'IFN- γ .

Ces résultats constituent une donnée d'une importance capitale dans le suivi de l'évolution de la pathologie. En effet, si nous considérons les travaux de Touil-Boukoffa *et al.* (1997), de Rigano *et al.* (2001) confirmant le rôle de l'IFN- γ dans la protection immunitaire contre *Echinococcus granulosus*, nous pouvons postuler que l'inversion du rapport Th1/Th2 serait à l'origine de l'exacerbation de la parasitose. Dans ce cas, les cytokines Th1 seraient considérées comme des marqueurs potentiels dans la prédiction d'un bon pronostic. À l'opposé, les cytokines Th2 joueraient un rôle dans le suivi et la prédiction des formes d'évolution chronique ou des formes à complications (fissuration, rupture, calcification du kyste, récurrence). Par ailleurs, l'absence de la production d'IFN- γ chez les patients récidivant serait une caractéristique à considérer par sa valeur prédictive dans les mauvais pronostics tels que les phases de rechute et l'instauration des états chroniques. Nos résultats suggèrent que le parasite *Echinococcus granulosus* induit une immunosuppression par le biais des cytokines Th2; il est possible que par ce mécanisme le parasite se protège des réponses immunitaires de l'organisme qui l'héberge. Il échapperait ainsi aux réponses immunitaires.

L'évolution des titres des cytokines apparaît d'une grande utilité quant au suivi des patients. De même, la mesure des cytokines dans le cadre de l'établissement d'un immunodiagnostic pourrait éclaircir certaines ambiguïtés observées et portant sur les réactions croisées résultant de la présence de communautés antigéniques avec d'autres parasitoses (Cesbron *et al.*, 1986). Par ailleurs, les réactions sérologiques constituent le seul moyen d'affirmer la présence d'un kyste hydatique. Toutefois, elles peuvent faire défaut dans le cas des kystes pulmonaires et hépatiques, en particulier si ces derniers sont calcifiés. Cette calcification des enveloppes kystiques s'oppose à la diffusion des antigènes parasitaires, même si le kyste contient des éléments vivants (Golvan, 1983; Nozais *et al.*, 1985). Ces études nous orienteraient sur l'établissement d'un seuil pour chaque cas de cytokine pour lequel les exacerbations de la pathologie seraient à éviter et pour lequel il existerait un équilibre dans la balance Th1/Th2. Par ailleurs, dans la même optique, la recherche de récepteurs solubles circulants pour les cytokines serait un outil d'orientation dans la compréhension des mécanismes d'échappement parasitaire. Parallèlement, la recherche et l'identification de structures analogues

aux récepteurs de cytokines au niveau des scolex apparaît non négligeable. En effet, plusieurs auteurs dont Capron (1995) ont mis l'accent sur le rôle du TNF- α comme facteur de reproduction du parasite *Schistosoma* grâce à la présence d'un récepteur exprimé sur le parasite lui-même. Il apparaît donc que les cytokines peuvent non seulement être utiles en agissant dans les processus de modulation des réponses immunitaires mais également agir dans les processus de pathogénèse.

L'effet de l'extirpation kystique sur les patients a montré une réduction des activités dans les 72 heures, ces dernières devenant sensiblement identiques à celles des témoins. Ces résultats montrent que la présence du kyste influence la production des cytokines testées. La réduction de l'activité des cytokines Th1 corrélerait à la perte de l'immunoréactivité envers l'antigène majeur (antigène-5) confortant notre hypothèse quant à l'implication de cet antigène dans la réponse immunitaire *via* l'interféron- γ et donc les cytokines Th1. La réduction des activités des cytokines accompagnée de la perte d'immunoréactivité serait due au fait que l'exérèse kystique réduit la disponibilité des antigènes solubles et plus particulièrement celle de l'antigène majeur que nous avons considéré. L'effet de l'ablation du kyste sur la production des cytokines a montré une réduction appréciable des niveaux des cytokines détectable dans les 72 heures alors que l'IL-12 augmente ou persiste durant la même période, pour diminuer après 30 jours d'extirpation chirurgicale. Nous avons associé la persistance de l'IL-12 au stress opératoire induisant un effet inflammatoire. Cette observation a été également rapportée par plusieurs auteurs, dont Kishimoto (1996), lors d'une étude effectuée sur la cinétique de la production de l'IL-6 consécutive aux actes chirurgicaux. Ce profil est inversé dans le cas de complication clinique de la maladie.

Ces investigations montrent l'importance de l'étude de la balance Th1/Th2 au cours de l'infection par *Echinococcus granulosus*. En effet, ces paramètres apparaissent comme étant des outils biologiques rigoureux, capables de compléter le diagnostic clinique. De plus, ils pourraient permettre d'affiner le pronostic et leur intérêt serait non négligeable dans le suivi des patients. Ces résultats laissent présager l'utilisation des cytokines dans l'établissement d'un diagnostic précoce, le suivi thérapeutique, voire la thérapie anti-hydatique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de la Faculté des Sciences biologiques (FSB/USTHB) dans le cadre d'un accord programme CNEPRU et d'un projet ANDRS (Agence nationale pour le développement de la recher-

che en santé). Nous remercions tous les cliniciens qui ont contribué à la réalisation de cette étude, en particulier : le Pr H. Chaouche, Chef du service de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire, CHU Alger Centre; le Pr A. Hamad, Chef du service de chirurgie générale, CHU Alger Centre; le Dr M. Ardjoun, Chef de service du CTSA (Centre de transfusion sanguine) de l'hôpital Ain Naadja d'Alger; le Pr J. Dupouy-Camet, Chef du service de parasitologie-mycologie et médecine tropicale, Hôpital Cochin, Paris, pour sa relecture critique et constructive du manuscrit; le Dr J. Wietzerbin, INSERM U365, Interférons et cytokines, Institut Curie, Paris V.

RÉFÉRENCES

- ABBAS A.K., MURPHY K.M. & SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996, 383, 787-793.
- ANADOL D., OZCELIK U., KIPPER N. & GOCMEN A. Treatment of hydatid disease. *Paediatric Drugs*, 2001, 3 (2), 123-135.
- ASTE-AMEZAGA M., MA X., SARTORI A. & TRINCHIERI G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *The Journal of Immunology*, 2000, 164 (10), 5330-5344.
- BOUT D., FRUIT J. & CAPRON A. Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatique. *Annals of Immunology*, 1974, 125 C, 775-788.
- CAPRON A. Le langage moléculaire des parasites. *Médecine/Science*, 1995, 3 (11), 431-439.
- CESBRON J.Y., CAPRON M. & CAPRON A. Le diagnostic immunologique de l'hydatidose humaine. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 1986, 10, 415-418.
- CETRE C., PIERROT C., COUDE C., LAFFITE S., CAPRON A., CAPRON M. & KHALIFE J. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semipermissive rat host. *Infection and Immunity*, 1999, 67 (6), 2713-2719.
- COX F.E.G. & LIEW Y. Cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitology Today*, 1992, 8 (11), 371-374.
- DEMATTEIS S., BAZ A., ROTTENBERG M., FENANEZ C., ORN A & NIETO A. Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/C mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protozoa. *Parasite Immunology*, 1999, 21 (1), 19-26.
- FIorentino D.F., ZLOTNIK A., VIEIRA P., MOSMANN T.R., HOWARD M., MOORE K.W. & O'GARRA A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *The Journal of Immunology*, 1991, 146, 3444-3451.
- FUKATA T., HIBI M., YAMANAKA Y., TAKAHASHI-TEZUKA M., FUJITANI Y., YAMAGUCHI T., NAKAJIMA K. & HIRANO T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp 130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 1996, 5, 449-460.
- GAZZINELLI R.T., WYSOCKA M., HAYASHI S., DENKERS E.Y., HIENY S., CASPAR P., TRINCHIERI G. & SHER A. Parasite induces IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 1994, 153 (6), 2533-2542.
- GOLVAN Y.J. Éléments de parasitologie médicale. Paris : Flammarion, Médecine/Science, 1983, 119-136.
- HOLLAND M.J., BAILEY R.L., CONWAY D.J., CULLEY F., MIRANPURI G., BYRNE G.I., WHITTLE H.C. & MABEY D.C.W. T helper type-1 (Th1)/Th2 profiles of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); responses to antigens of *Chlamydia trachomatis* in subjects with severe trachomatous scarring. *Clinical & Experimental Immunology*, 1996, 105, 429-435.
- KISHIMOTO T. IL-6 family of cytokines and gp-130 biological and clinical implications. *European Cytokine Network*, 1996, 7 (3), 429.
- LIGHTOWLERS M.W., LAWRENCE S.B., GAUCI C.G., YOUNG J., RALSTON M.J., MAAS D. & HEATH D.D. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 1996, 18, 457-462.
- LIGHTOWLERS M.W., JENSEN O., FERNANDEZ E., IRIARTE J.A., WOOLLARD D.J., GAUCI C.G., JENKINS D.J. & HEATH D.D. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29, 531-534.
- MASTROENI P., CLARE S., KHAN S., HARRISON J.A., HORMAECHÉ C.E., OKAMURA H., KURIMOTO M. & DOUGAN G. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, 1999, 67, 478-483.
- MCMANUS D.P. & SMYTH J.D. Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitology Today*, 1986, 2 (6), 163-167.
- MCMANUS D.P. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 1 (96), 151-157.
- MOSMANN T.R., CHERWINSKI I.I., BOND M.W., GIEDLIN M.A. & COFFMAN R.L. Two types of murine helper T-cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 1986, 136, 2348.
- MOSMANN T.R. & COFFMAN R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 1989, 7, 145-173.
- MIOSECC P. Interleukin-4 and Interleukin-10 as antagonists of interferon- γ . *Journal of Interferon Research*, 1994, 14, 285.
- NAKA T., NARAZAKI K., HIRATA M., MATSUMOTO T., MINAMOTO S., AONO A., NISHIMOTO N., KAJITA S., TAGA T., YOSHIZAKI K., AKIRA S. & KISHIMOTO T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 1997, 387, 924-928.
- NOZAIS J.P., DANIS M., LOISY M. & GENTILINI M. Le diagnostic sérologique de l'hydatidose. *Pathologie Biologie*, 1985, 33 (4), 238-242.
- PARRONCHI P., DE CARLI M., PICCINI M.P., MACCHIA D., MAGGI E., DEL PRETE G.F. & ROMAGNANI S. IL-4 and IFNs exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *The Journal of Immunology*, 1992, 149, 2977.
- PEARCE E.J., CASPAR P., GRZYCH J.M., LEWIS F.A. & SHER A. Downregulation of Th1 cytokine production accompa-

- nies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1991, 173, 159-166.
- PORETTI D., FELLEISEN E., GRIMM F., PFISTER M., TEUSCHER F., ZUERCHER C., REICHEN J. & GOTTSTEIN B. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 60 (2), 193-198.
- POZZIOLI R., PIANTELLI M., PERUCCI C., ARRU E. & MUSIANI P. Isolation of the immunoreactive antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *The Journal of Immunology*, 1975, 115, 1459-1463.
- RIGANO R., PROFUMO E., DI FELICE G., ORTONA, E., TEGGI A. & SIRACUSANO A. *In vitro* production of cytokines by peripheral mononuclear cells from hydatid patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 1995, 99 (3), 433-439.
- RIGANO R., PROFUMO E., IOPPOLO S., NOTAGIACOMO S., TEGGI A. & SIRACUSANO A. Serum cytokine detection in the clinical follow up of patients with cystic echinococcosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 1999, 115 (3), 503-507.
- ROMAGNANI S. Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, 1999, 5 (4), 285-294.
- ROMAGNANI S. Human Th1 and Th2 subsets: double no more. *Immunology Today*, 1992, 12, 256-257.
- ROMAGNANI P., ANNUNZIATO F., PICCINNI M.P., MAGGI E. & ROMAGNANI S. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. *European Cytokine Network*, 2000, 11 (3), 510-511.
- SANCHEZ F., GARCIA J., MARCH F., CARDENOSA N., COLL P., MUNOZ C., AULADELL C. & PRATS G. Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in broodcapsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of human origin. *Parasite Immunology*, 1993, 15, 441-447.
- SINGH V.K., MEHROTRA S. & AGARWAL S.S. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines. *Immunology research*, 1999, 20, 147-161.
- TEGGI A., LASTILLA M.G. & DE ROSA F. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1993, 37, 1679-1684.
- TORCAL M., NAVARRO-ZORRAQUINO R., LOZANO L., LARRAD J.C., SALINAS J., FERRER J., ROMAN J. & PASTOR C. Immune response and *in vivo* production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 1996, 106, 317-322.
- TORRE D., SPERANZA F., GIOLA M., MATTEELLI A., TAMBIN R. & BIONDI G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002, 9 (2), 348-351.
- TOUIL-BOUKOFFA C., SANCEAU J., TAYEBI B. & WEITZERBIN J. Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1997, 17 (4), 211-217.
- TOUIL-BOUKOFFA C., BAUVOIS B., SANCÉAU J., HAMRIOUI B. & WEITZERBIN J. Production of nitric oxid (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon-g levels. *Biochimie*, 1998, 80, 739-744.
- TRINCHIERI G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *International Reviews of Immunology*, 1998, 16 (34), 365-396.
- URREAS-PARIS M. A., CASDO N., MORENO M.J. & RODRIGUEZ-CAABEIRO F. Chemoprophylactic praziquantel treatment in experimental hydatidosis. *Parasitology research*, 2001, 87 (6), 510-512.
- WEITZERBIN J., CIVAS A., GASCAN, H., VASQUEZ A., BERTOGGIO J., DY M. & THÈZE J. Interferons and cytokines: where we stand after the first joint meeting of the international cytokine society and the international society for interferon and cytokine research. *European Cytokine Network*, 1997, 8 (2).
- ZHANG W., LI J. & MCMANUS D.P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 1 (16), 18-36.

Reçu le 25 avril 2008

Accepté le 6 octobre 2008