



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE  
HOUARI BOUMEDIENE (U.S.T.H.B)

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES (FSB)

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en Biologie

Option: **Génie Biologique**

**Thème**

**ÉTUDE DE LA MODULATION DE LA  
NO SYNTHASE 2 PAR L'EXTRAIT DES  
PÉPINS DE RAISIN AU COURS DE  
L'HYDATIDOSE HUMAINE:  
IMPACT SUR LA PRODUCTION DU  
MONOXYDE D'AZOTE**

**Présenté par :** **BLIBEK KARIM**

Soutenu publiquement le 27.06.2009 devant le jury :

Mme Touil-Boukoffa C.  
Mme Mezioug D.  
Mr Ahmedi M.  
Melle Belguendouz H.  
Melle Bouaziz S.

**Présidente**  
**Promotrice**  
**Examineur**  
**Examinatrice**  
**Invité**

**Promotion 2008/2009**

# Remerciements

A Madame le professeur Touil-Boukoffa C.,  
directrice du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (B.C.M) et de l'équipe cytokines et NO Synthases à la Faculté des Sciences Biologiques (F.S.B/ U.S.T.H.B), pour nous avoir accueilli au laboratoire, pour l'intérêt qu'elle a manifesté pour ce travail et pour nous avoir fait honneur d'accepter la présidence de notre Jury de mémoire.

*Nous lui présentons notre Hommage respectueux.*

A Mademoiselle Mezioug D.,  
enseignant-chercheur en biochimie-immunologie au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire et membre de l'équipe cytokines et NO Synthases à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous suit depuis les prémices de ce travail, Avec toujours la même disponibilité et attention.

*Nous la prions de croire à notre profonde gratitude et à notre respectueux attachement.*

A Monsieur Ahmedi M.,  
chargé de cours à la Faculté des Sciences Biologiques et membre de l'équipe cytokines et NO Synthases au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de mémoire, avec la spontanéité et la gentillesse qui le caractérisent.

A Mademoiselle Belguendouz H.,  
maître assistante en biochimie-immunologie au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté des Sciences Biologiques et membre de l'équipe cytokines et NO Synthases, pour avoir accepté d'examiner notre travail.

*Nous leurs témoignons ici notre sincère reconnaissance.*

A Mademoiselle Bouaziz S.,  
assistante en biochimie-immunologie au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire et de l'équipe cytokines et NO Synthases à la Faculté des Sciences Biologiques, pour ses renseignements et orientations.

*Nous sommes heureux de vous voir participer à ce jury et vous assurons de notre gratitude.*

A toute l'équipe des cytokines et NO Synthases,  
*Ce stage a été rendu très agréable par l'ambiance que vous savez faire régner au sein de l'équipe.  
Merci pour vos précieux conseils.*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, qui n'ont cessé de m'encourager et qui ont toujours donné le meilleur d'eux même pour me voir réussir. Que dieux vous protège et vous garde à nos cotés.*

*A toute ma famille à laquelle je témoigne toute mon affection.*

*A mes amis(es) qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus universitaire.*

*A tout le personnel du centre hospitalo-universitaire de Tizi-Ouzou, qui m'ont aidé et orienté avec leurs précieux conseils.*

*A tous ceux qui ont croisé mon chemin et qui ont participé de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**Karim**

# Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

## Chapitre I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### I.A. Hydatidose

I.A.1. Définition de l'hydatidose.....	3
I.A.2. Formes du parasite.....	4
I.A.3. Cycle biologique.....	9
I.A.4. Epidémiologie et zones d'endémie.....	10
I.A.5. Antigénicité de l'hôte.....	12
I.A.6. Diagnostic radiologique et bilan biologique.....	12
I.A.7. Réponse immunitaire.....	14
I.A.8. Traitement.....	15
I.A.9. Prophylaxie.....	15

### I.B. Les cytokines

I.B.1. Caractéristiques générales des cytokines.....	17
I.B.2. Réseau des cytokines.....	21
I.B.3. Transduction du signal par les récepteurs des cytokines.....	23
I.B.4. Les cellules T auxiliaires.....	25
I.B.5. Cytokines en pathologie et en applications thérapeutiques.....	27
I.B.6. Cytokines et hydatidose.....	28

### I.C. Le monoxyde d'azote (NO)

I.C.1. Définition.....	30
I.C.2. Propriétés physico-chimiques du NO.....	31
I.C.3. Biosynthèse du NO.....	31
I.C.4. Isoformes de la NOS.....	32
I.C.5. Types de régulation des NOS.....	34
I.C.6. NO et cytokines.....	34
I.C.7. NO et systèmes immunitaires.....	35
I.C.8. Effets du NO.....	35

## Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.A. Matériels.....	36
II.A.1. Matériel non biologique.....	36
II.A.2. Matériel biologique.....	36
II.B. Méthodes.....	38
II.B.1. Test de viabilité des protoscolex.....	38
II.B.2. Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD.....	38
II.B.3. Isolement des PBMC.....	40

II.B.4. Dosage des nitrites totaux par la méthode de Griess modifiée.....42

**Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

III.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....47

III.2. Test de viabilité des protoscolex.....46

III.3. Dosage des nitrites dans les cultures des PBMC induites par les antigènes et l'extrait des pépins de raisin.....49

**Chapitre IV :CONCLUSION.....56**

**Chapitre V : BIBLIOGRAPHIE.....57**

**ANNEXES.....62**

# Abréviations

**Ac:** Anticorps.

**Adn:** Acide désoxyribonucléique

**Ag:** Antigène.

**BH4 :** (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

**BSA:** Bovin Sérum Albumin.

**CAM :** calmoduline.

**CD:** Cluster of Differentiation.

**CIS:** cytokine-inducible SH2.

**CPA:** Cellule Présentatrice d'Antigène.

**CSF:** Colony Stimulating Factors.

**DO:** Densité Optique

**ELISA:** Enzyme linked Immunosorbent Assay.

**EPO:** erythropoietin.

**FAD :** flavine adénine dinucléotide

**FMN :** flavine mononucléotide

**Foxp3:** forkhead-box p3

**G-CSF:** granulocyte colony stimulating

**Hb :** hémoglobine

**HD :** hôte définitif

**HI :** hôte intermédiaire

**ICOS:** Co-Stimulation Inductible.

**IDD:** Immunodiffusion Double

**IEP:** Immunoélectrophorèse

**IFN:** Interferon.

**Ig:** Immunoglobuline.

**IL:** Interleukine.

**iTreg:** Lymphocytes T régulateurs induites.

**JAK:** Janus Kinase

**KHF:** Kyste Hydatique du Foie

**KHP:** Kyste Hydatique du poumon

**LB:** Lymphocyte B.

**LHF :** Liquide hydatique du foie

**LHP :** Liquide hydatique du poumon

**LPS :** lipopolysaccharides.

**LT:** Lymphocyte T.

**MAP:** Mitogène-associated protein.

**NAD:** Nicotinamide adénine dinucleotide.

**NADP:** Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate.

**NK:** Natural Killer.

**NKT:** Natural Killer cell-T.

**NO:** nitric oxide.

**NOHA :** N-hydro 2-L-arginine.

**NOS :** nitric oxide synthase.

**nTreg :** Lymphocytes T régulateurs naturels.

**PARP:** poly-ADP-ribose-polymerase

**PBMC:** Peripheral Blood Mononuclear Cells

**PBS:** Phosphate Buffer Salin

**PM:** Poids Moléculaire

**qsp:** quantité suffisante pour...

**rpm:** rotation par minute.

**RPMI 1640:** Roswell Park Memorial Institut.

**SH2:** Sacrom homology 2.

**SOCS:** suppressor of cytokine signaling.

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**SVF:** Sérum de Veau Faetal.

**Tc :** T cytotoxique.

**Th:** T helper.

**TNF:** Tumor Necrosis Factor.

**Treg:** T régulateur.

**Ts:** T suppresseur.



# INTRODUCTION GENERALE

## Introduction générale

L'hydatidose est une zoonose cosmopolite qui sévit de façon endémique en Algérie. Cette parasitose est causée par la forme larvaire d'un cestode *Echinococcus granulosus*.

Elle demeure, malgré les programmes de lutte et de sensibilisation, un problème majeur de santé publique, aux répercussions économiques effroyables.

Le diagnostic de l'hydatidose orienté par les arguments cliniques et radiologiques reste largement dominé par l'immunosérologie. L'établissement d'un diagnostic de certitude est délicat, notamment en raison de la vaste communauté antigénique que constitue l'hydatide.

Dans la mesure où cette affection est souvent asymptomatique, le traitement reste essentiellement chirurgical avec risque de récurrence. La survenue de complications au cours de l'évolution de cette macroparasitose et l'apparition d'échinococcose secondaire rendent l'acte chirurgical difficile.

Dans l'optique de la recherche d'une thérapie anti-hydatique et sur la base de plusieurs travaux ayant déjà permis de mettre en évidence le rôle de certaines molécules dans la réponse immunitaire contre le parasite, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de l'extrait des pépins de raisin sur la culture des PBMC sensibilisées au liquide hydatique.

Parmi les facteurs solubles impliqués dans les mécanismes anti parasitaires, on cite le monoxyde d'azote, qui est défini comme étant un biomédiateur synthétisé par les NO synthases (NOS). C'est un messager intracellulaire et un agent effecteur de nombreuses fonctions biologiques, il a été détecté au cours de microparasitoses telles que la leishmaniose (Drapier, 1996). Ce radical hautement réactif intervenant dans l'inflammation serait impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte contre *E. granulosus* au cours de l'hydatidose (Touil et al, 1998).

La production de monoxyde d'azote (NO) est catalysée par deux types de NO synthases, les NOS constitutives représentées par l'isoforme neuronale NOS I et l'isoforme endothéliale NOS III, ainsi que la NOS inductible "iNOS" ou "NOS II" produisant de grandes quantités de NO.

Le but de ce travail permettrait d'apporter des arguments en faveur du rôle anti-inflammatoire de l'extrait des pépins de raisin sur la modulation de la sécrétion du NO au cours de l'hydatidose.

Notre travail est essentiellement porté sur les points suivants :

- Le dosage des protéines du liquide hydatique issu de patients porteurs de kystes hydatiques selon plusieurs localisations.
- Le test de viabilité des protoscolex récupérés à partir du liquide hydatique.
- l'implication *in vitro* des PBMC dans la biosynthèse du NO, stimulés par le liquide hydatique.
- L'étude *in vitro* de l'effet anti inflammatoire de l'extrait des pépins de raisin dans la variation des taux de production du NO à partir des PBMC stimulés au liquide hydatique.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### **I.A.1. Définition de l'hydatidose**

L'hydatidose est une helminthiase cosmopolite à caractère infectieux provoquée par le développement chez l'homme et divers mammifères de la forme larvaire d'un cestode de très petite taille, *Echinococcus granulosus* (Louvain, 1999).

L'être humain est atteint accidentellement par contact direct avec les chiens, ou par contamination des aliments ou de l'eau souillée.

Le cestode se présente sous trois formes :

- l'adulte qui vit fixé entre les villosités de l'intestin grêle des canidés (hôte définitif)
- l'œuf qui contient un embryon hexacanthé à six crochets.
- la larve ou kyste hydatique retrouvé chez l'homme qui est exclusivement impasse parasitaire et chez certains vertébrés comme le mouton (hôte intermédiaire).

### **Généralités sur le parasite**

*Echinococcus granulosus* est un métazoaire plathelminthe triploblastique acoelomate.

### **Systematique**

Phylum :	Plathelminthes.
Classe :	Cestoda.
Sous classe :	Eucestoda.
Ordre :	Cyclophyllidea.
Famille :	Taeniidae.
Genre :	Echinococcus.
Espèce :	Echinococcus granulosus (Ripert, 1998).

*Echinococcus granulosus* est composé partie d'un complexe de sous espèces présentant des caractères individuels remarquables sur le plan biologique, épidémiologique et du pouvoir infestant pour l'homme.

Parmi ces sous espèces :

*Echinococcus granulosus granulosus.*

*Echinococcus granulosus equinus.*

*Echinococcus granulosus canadensis.*

*Echinococcus granulosus borealis* (Gharbi, 1999).

Les sous espèces d'*E.granulosus* fonctionnant dans un cycle chien-mouton constituent les variétés les plus pathogènes pour l'homme (Gharbi et al, 1999).

## **I.A.2. Formes du parasite**

### **I.A.2.1. Forme adulte** (Figures 1 et 2)

Le ver adulte mesure 2 à 7 mm de long et possède habituellement 3 à 4 segments, mais il peut, bien que rarement, en posséder jusqu'à 6. L'avant dernier segment est mûr et porte un pore génital ouvert, comme chez le segment gravide, dans sa moitié postérieure. Le segment gravide mesure habituellement plus que la moitié de la longueur totale du ver entier. La partie antérieure ou scolex est munie d'un rostre armé de 30 à 42 crochets de taille variable et disposés en 2 couronnes dont ceux de la première mesurent 22 à 45 µm et ceux de la deuxième 18 à 38 µm. Les caractères morphologiques des crochets et leur disposition sont utilisés dans l'identification morphologique de l'espèce. L'utérus gravide présente des formations caliciformes bien développées renfermant des embryophores contenant 400 à 800 œufs (ou oncosphères) (Rousset, 1995).



Figure 1: *Echinococcus granulosus*  
(ANOFEL, 2007)  
(Lamy, 1980)

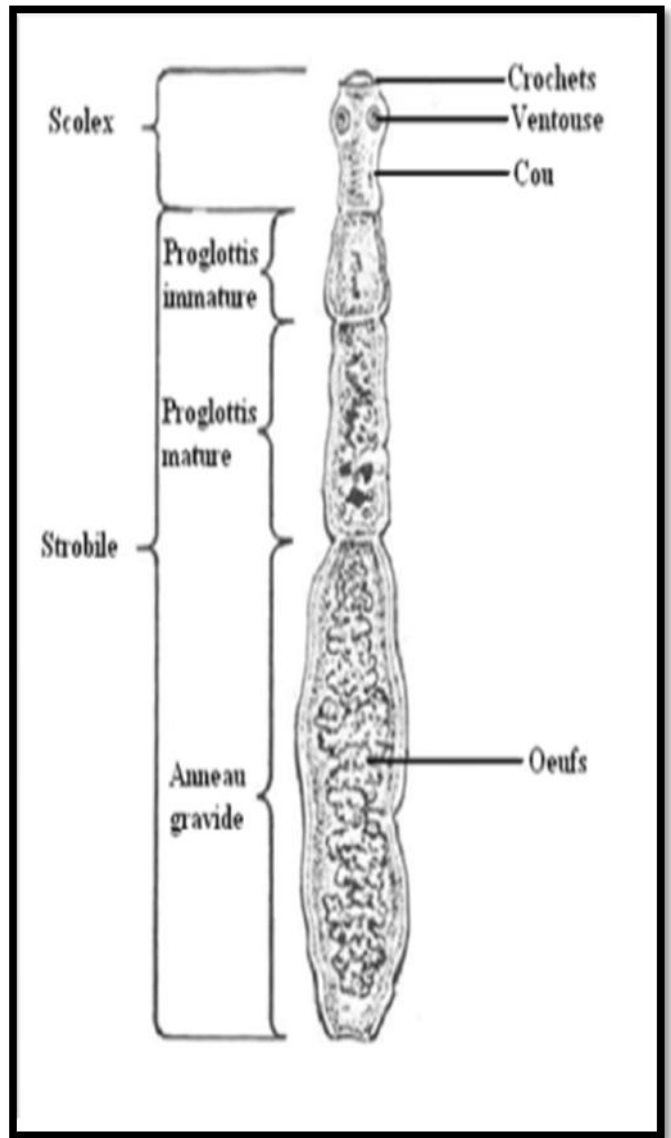


Figure 2 : Schéma de la morphologie générale d'*Echinococcus granulosus*.

### IA.2.2. Forme ovulaire

#### Les œufs (Figures 3 et 4)

Les embryophores légèrement ovoïdes, mesurent 30 à 35  $\mu\text{m}$  de diamètre, ils contiennent un embryon hexacante et sont entourés d'une membrane oncosphérique mince, et d'une membrane striée et très épaisse (Nozais et al, 1996). Une fois fixé, l'embryon perd ses crochets, subit une transformation vésiculaire qui en fera une hydatide (Larivière et al, 1987).

Les œufs peuvent survivre durant plusieurs mois dans les pâturages, dans l'eau et le sable humide pendant 3 semaines à 30°C, 225 jours à 6°C et 32 jours à 10 - 21°C. Une congélation à -18°C ne tue pas les œufs. Une cuisson à 60°C pendant 5 minutes, un passage au four même bref, suffit à écarter tout risque. Aucun antiseptique connu n'est efficace contre les œufs d'échinocoque (Elaousbi, 2004).



Figure 3 : Œufs d'*Echinococcus granulosus* (Vuitton, 2001).

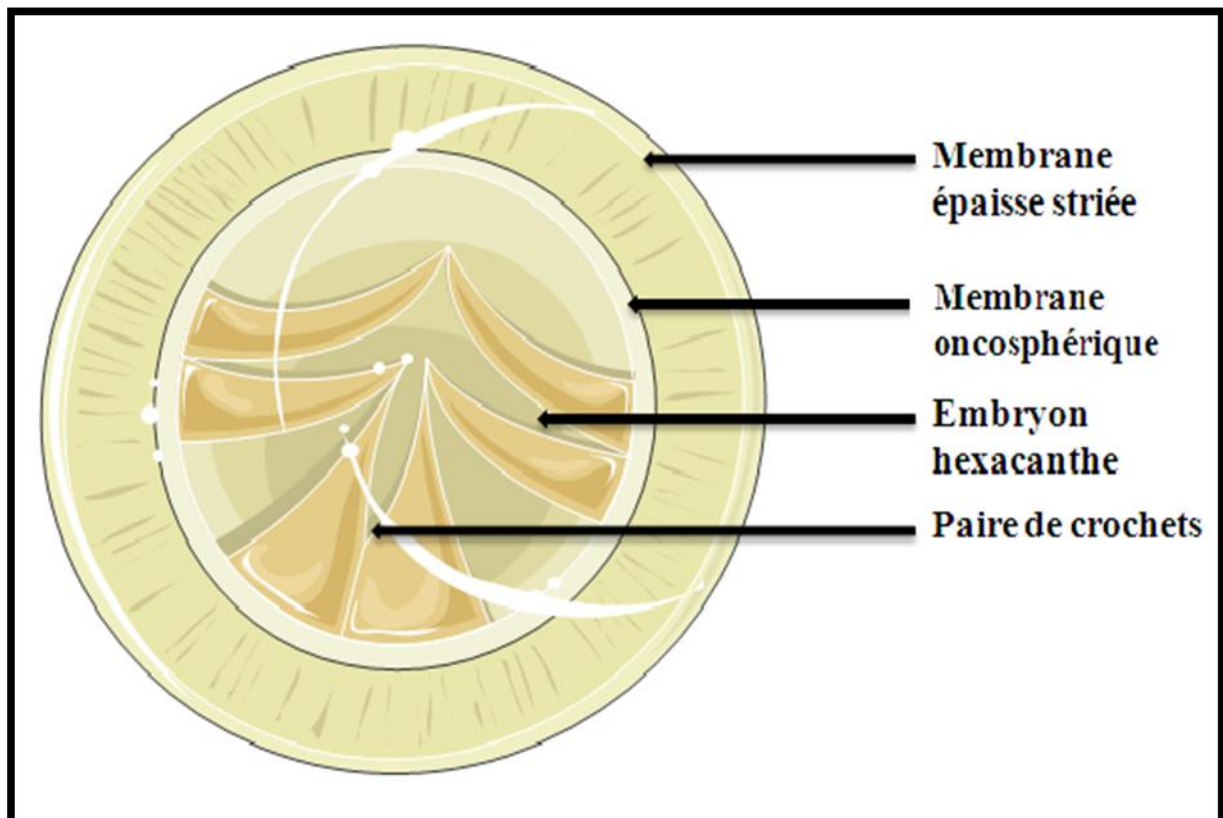


Figure 4: Morphologie générale de l'œuf d'*Echinococcus granulosus* (Servier, 2005).



### **I.A.2.3. Forme larvaire**

#### **Le kyste hydatique** (Figures 5 et 6)

Composé de l'extérieur vers l'intérieur :

#### **Membrane périkystique ou adventice**

Correspond aux tissus de l'hôte refoulés, remaniés et fibroscléreux. En vieillissant, cet adventice peut même s'imprégner de calcium sans que pour cela, le kyste soit mort.

#### **Membrane anhiste**

Couleur Blanc ivoire, de 1 à 2 mm d'épaisseur, elle est la paroi propre du kyste et la zone d'échange avec le kyste. Elle a une structure lamellaire et est dépourvu de toute cellule.

#### **Membrane proligère ou germinative**

Blanche, souple, très fragile, c'est une couche syncytiale de 20µm d'épaisseur. Elle est à l'origine des vésicules proligères et des protoscolex.

Elle limite un liquide sous tension, le liquide hydatique, eau de roche, riche en antigène.

#### **Vésicules proligères**

Ce sont des émanations de la membrane proligère, elles ont une structure et une couleur identique et forment des ballonnets flottants dans le kyste.

#### **Les protoscolex**

On les retrouve dans le liquide hydatique, aussi bien à l'extérieur que dans les vésicules proligères. Quand on laisse reposer du liquide hydatique, les protoscolex sédimentent et forment le sable hydatique.

Un protoscolex est une tête de ténia invaginée, il est composé de 4 ventouses et d'une double couronne de crochets au fond d'une fente.

Un protoscolex mesure environ 100 à 200 µm de diamètre. Chaque protoscolex absorbé par un canidé évolue en ténia adulte en six semaines environ dans l'intestin du chien.

Le protoscolex peut reformer un kyste hydatique après rupture de l'hydatide. Ces hydatides secondaires sont observées au contact du kyste (fissuration) mais surtout dans les organes proches (hydatides péritonéales), ou à distance, après migration par voie sanguine (hydatidose secondaire ou généralisés) (Rousset, 1995).

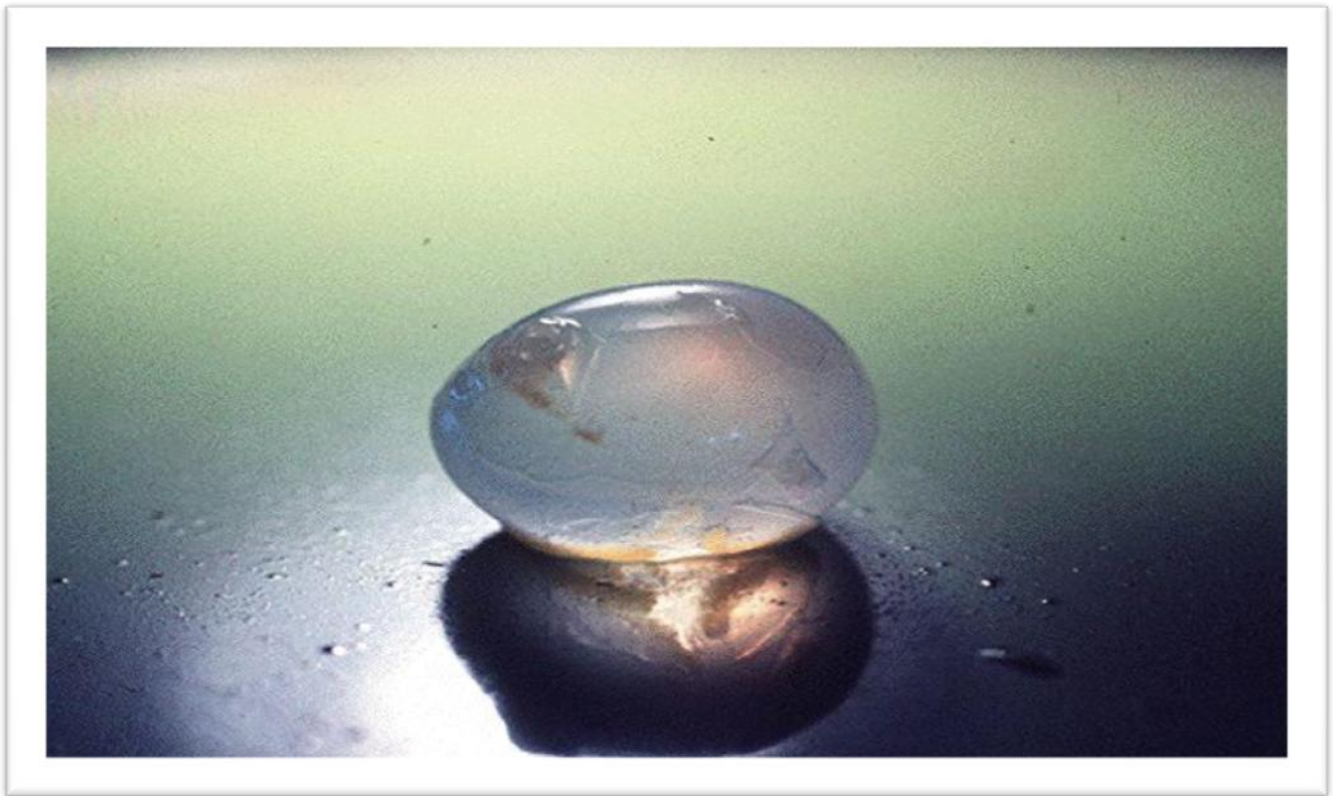


Figure 5: le kyste hydatique (Laamrani et al, 2007).

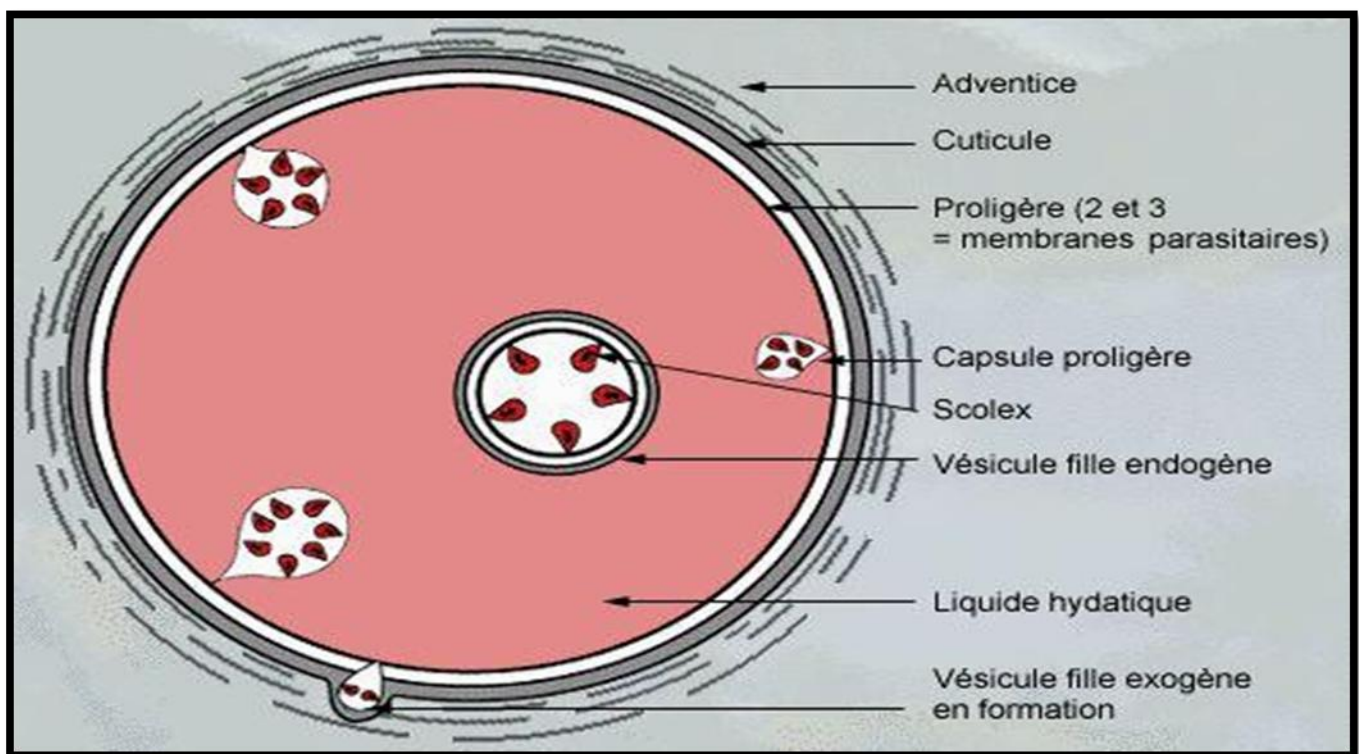


Figure 6: Schéma de la morphologie générale du kyste hydatique (Laamrani et al, 2007).

### I.A.3. Cycle biologique (Figure 7)

C'est un cycle dixéne, il comprend deux hôtes : un hôte définitif (HD) et un hôte intermédiaire (HI). Le cycle classique est le cycle domestique : chien (HD) - herbivores (HI). L'homme s'insère accidentellement dans le cycle du parasite : c'est une impasse parasitaire.

L'HI se contamine par ingestion d'œufs embryonnés (embryophores) éliminés dans le milieu extérieur par l'hôte définitif. Les embryophores éliminés dans la nature dans les fèces du chien peuvent résister plusieurs mois dans le sol, ils sont absorbés par un herbivore ou un omnivore dont l'homme. L'embryon hexacanthe libéré dans le tube digestif traverse la paroi intestinale, et gagne par voie sanguine le foie et les poumons. D'autres organes peuvent être atteints, il est arrêté dans 50% à 60% des cas par le premier filtre (filtre hépatique), puis dans 30% à 40% des cas par le deuxième filtre (filtre pulmonaire) et se retrouve dans le reste de l'organisme (os, cerveau, thyroïde, etc.) dans 10% des cas. Il s'y développe lentement et devient un kyste hydatique. Le cycle est fermé lorsque le chien dévore les viscères d'un herbivore parasité. Chaque scolex du kyste hydatique dévoré par un canidé donne naissance à un ténia échinocoque adulte dans son intestin grêle (ANOFEL, 2007).

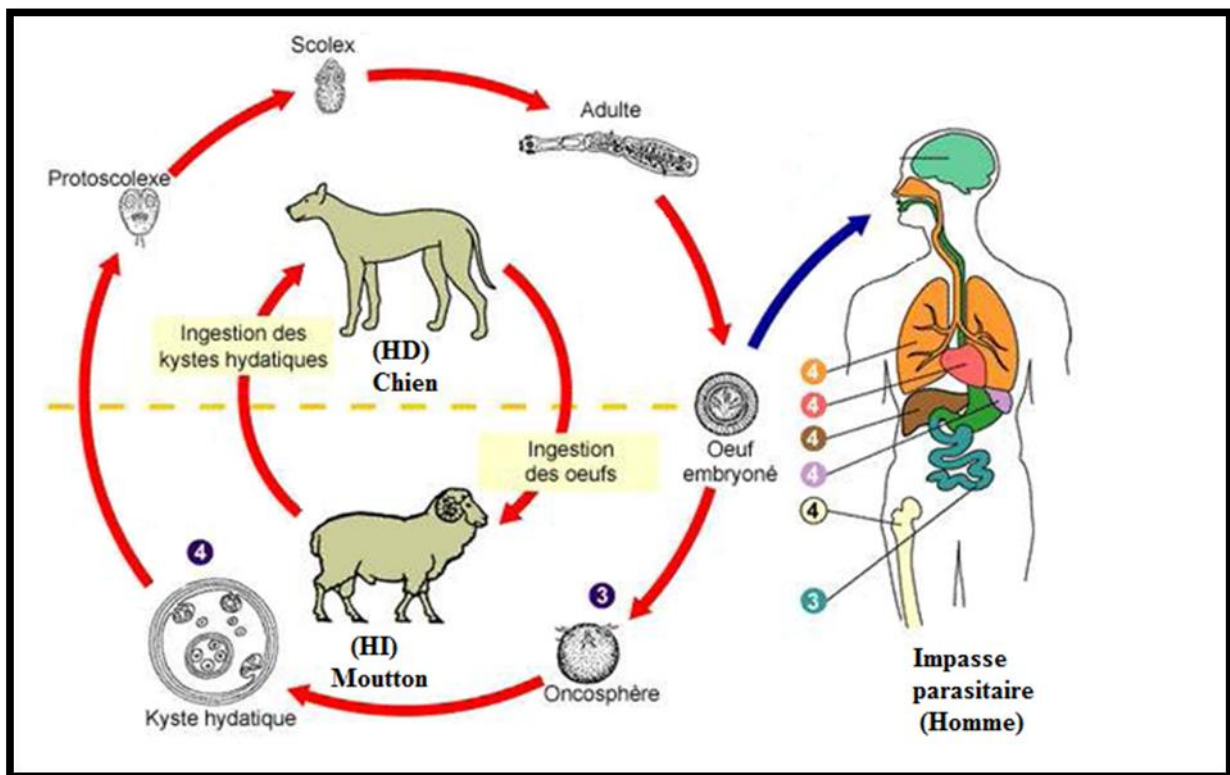


Figure 7: cycle évolutif d'*Echinococcus granulosus* (Bouzakri et al, 2004).

#### I.A.4. Epidémiologie et zones d'endémie (Figure 8)

L'hydatidose a une distribution géographique très étendue, elle sévit surtout dans les régions d'élevage, en particulier dans les régions où de grands troupeaux de montons sont gardés par des chiens, plus exactement :

- le bassin méditerranéen, Chypre, Péninsule ibérique, Sicile et pour la France, Bouches-du-Rhône et Corse.

- Amérique du Sud (Argentine, Uruguay).

- Australie, Nouvelle Zélande.

- Asie Centrale (Larivière, 1987).

Ces régions ont en commun un certain nombre de facteurs qui peuvent expliquer la fréquence de cette maladie, à savoir l'élevage de mouton, le nombre de chiens errants et l'humidité propice pour l'entretien des embryophores dans le milieu extérieur, facteurs auxquels s'ajoutent parfois les règles d'hygiène insuffisantes. (Bezzari, 1999). On constate entre les populations d'*Echinococcus granulosus* provenant de différentes régions géographiques des différences biologiques susceptibles d'avoir des répercussions importantes sur le plan épidémiologique.

En **Algérie**, cette parasitose autochtone est fréquente dans les hauts plateaux, en particulier dans les villages non contrôlés par les services vétérinaires. Le mode d'élevage dispensé dans ces régions expose le mouton à un polyparasitisme certain. Lors de l'abattage rituel du mouton (Aïd El Adha), les réservoirs du parasite (abats infectés par les kystes) laissés à la portée des chiens errants augmentent le degré de contamination et de dispersion des éléments de dissémination parasitaire dans l'environnement.

Le tableau ci-dessous montre bien les régions les plus touchées en Algérie.

Tableau I: Nombre de cas d'hydatidose recensé/an (INSP, 2004).

Année	Nombre de cas	Wilayas les plus touchées
2000	771	Saida, Mascara, Médéa, Oum el Bouagui, M'sila
2001	651	Sidi bel Abbes, M'sila, Batna, Biskra.
2002	644	Medea, M'sila, Tiaret, Relizane.
2003	686	Tiaret, Medea, Relizane, M'sila.
2004	573	Relizane, Mascara, Tiaret, M'sila.

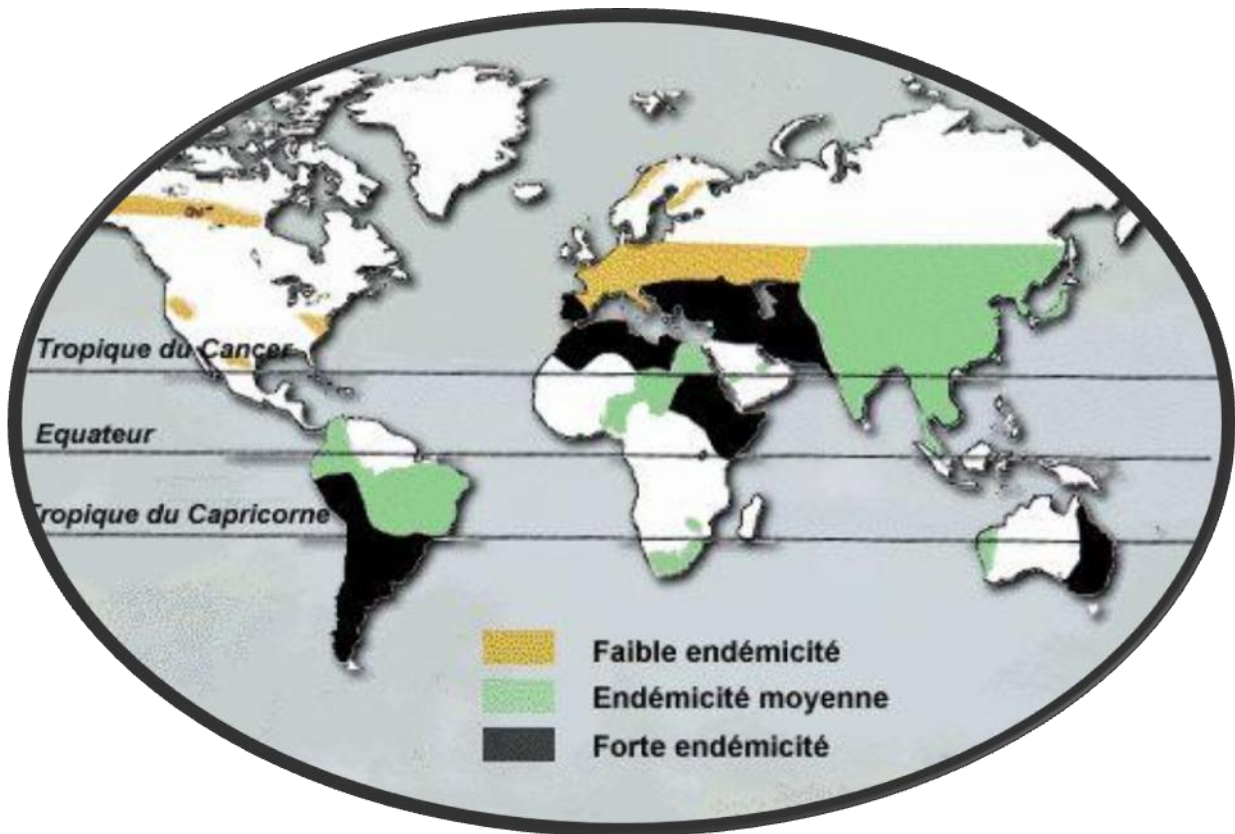


Figure 8 : Répartition géographique des hydatidoses humaines et animales ( Eckert et Deplazes, 2004).

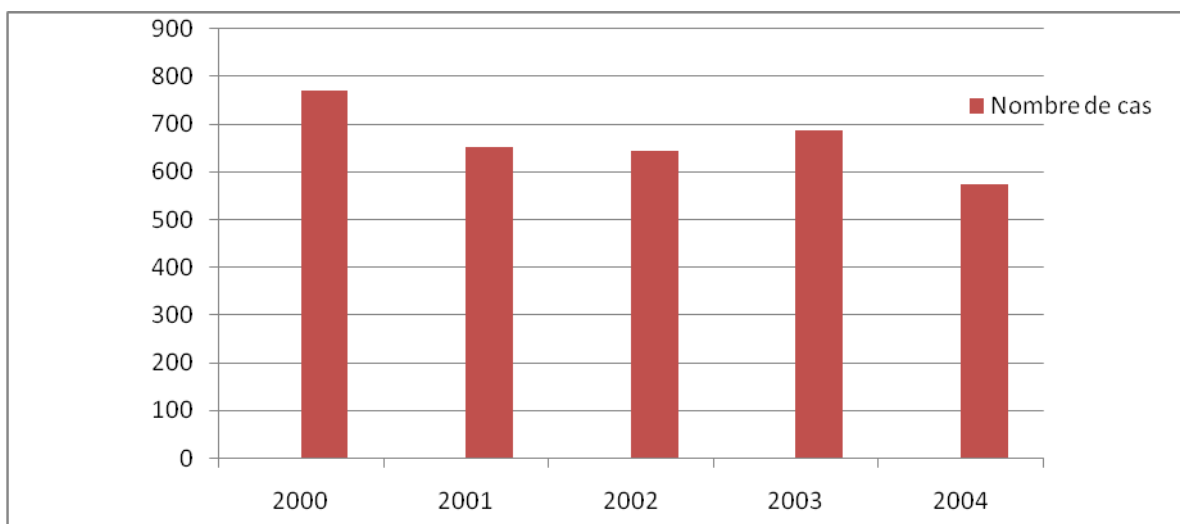


Figure 9: Graphique représentant le nombre de cas recensé en Algérie de 2000 à 2004 (INSP, 2004).

### **I.A.5. Antigénicité de l'hôte**

La présence d'un taux élevé d'anticorps dans l'organisme de l'hôte témoigne du pouvoir antigénique de l'hydatide instauré. Ce pouvoir antigénique n'est pas lié à la présence d'un antigène mais à celle d'une véritable mosaïque antigénique (Siracusano, et al, 1998).

Le kyste hydatique présente une mosaïque d'antigène, les uns spécifiques du parasite, d'autres communs avec les antigènes de l'hôte, le liquide hydatique contient en plus des antigènes, des protéines ayant diffusé à travers les membranes et propre à l'hôte intermédiaire (Kharebov et al, 1997).

L'antigène B (Ag B) et l'antigène 5 (Ag 5) sont les composants majeurs du liquide hydatique, ils ont été caractérisés par immunoelectrophorèse (Oriol et al, 1971).

#### **I.A.5.1. L'antigène B**

C'est une lipoprotéine polymérique thermostable avec un poids moléculaire de 150KDa (Siracusano, 2002). Elle est hautement immunogénique et représente 10% du contenu total du liquide hydatique. Sur SDS-PAGE et dans des conditions non réductrices, elle se dénature et conduit à la formation de trois bandes avec des poids moléculaires qui sont approximativement de 8, 12 et 24 KDa.

#### **I.A.5.2. L'antigène A**

Il possède un haut poids moléculaire d'environ 400 KDa, c'est un complexe lipoprotéinique formé de deux composants de 57 et 67 KDa. Dans des conditions réductrices, il se dissocie en sous unités de 38 et 22 KDa jusqu'à 24 KDa. C'est l'antigène le plus spécifique car il est utilisé lors de l'immunodiagnostic de l'hydatidose (Lightowers et al, 1989).

### **I.A.6. Diagnostic radiologique et bilan biologique**

Le diagnostic repose sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Parmi les examens biologiques, la sérologie apporte les éléments étiologiques les plus importants.

#### **I.A.6.a. Diagnostic radiologique**

L'objectif de l'imagerie est de visualiser le kyste hydatique, les vésicules filles et éventuellement le sable hydatique. Les techniques d'imagerie sont de nos jours nombreuses et performantes, les images obtenues sont fortement suggestives.

Au cours de l'hydatidose, l'échographie et la tomodensitométrie sont devenues les méthodes de choix, ce bilan radiologique est essentiel. Il est important de préciser exactement la localisation, la taille et le nombre de kystes avant toute intervention chirurgicale.

L'échographie est l'examen de première intention, le scanner est l'examen fondamental en cas de décision chirurgicale.

## **I.A.6.b. Bilan biologique**

### **Les examens d'orientation**

La formule de numération sanguine est le plus souvent normale. L'hypereosinophilie peut s'observer dans le cadre de la fissuration d'un kyste et peut être associée à des signes allergiques de type urticaire. La polynucléose traduit une surinfection kystique et accompagne un syndrome inflammatoire.

Ces anomalies ne sont pas spécifiques mais peuvent traduire une complication (Estève, 1998).

### **Les examens parasitologiques directs**

Il est exceptionnel de découvrir des scolex, des crochets ou des fragments membraneux dans les selles après ouverture d'un kyste dans les voies biliaires, ou dans une vomique après ouverture d'un kyste dans les bronches.

### **L'immunodiagnostic**

La sensibilité et la spécificité des tests utilisés dans l'immunodiagnostic sont variables selon la nature, la pureté et la qualité des antigènes, mais également des isotopes d'immunoglobulines produits par le patient (Gottstein, 1992).

Les tests sérologiques principaux sont l'hémagglutination passive, la technique ELISA et la recherche de l'antigène 5 spécifique à l'immunoélectrophorèse et à l'électrosynérèse (Bezzari, 1999). A cette mosaïque antigénique correspond la production par l'hôte intermédiaire d'anticorps de spécificité et de type variés, surtout les IgG, (IgG4), IgA et IgE, Les IgM apparaissent en cas de fissuration.

Le dosage des immunoglobulines IgE totales peut démontrer une élévation importante de leur taux et orienter vers une exploration des IgE spécifiques (Rigano, 1998).

Les techniques immunologiques dans l'hydatidose permettent de poser le diagnostic dans 80% à 95 % des localisations hépatiques et 40 à 65 % des localisations pulmonaires à condition de réaliser deux techniques différentes. Il est souhaitable d'utiliser une technique quantitative (IFI, ELISA, hémagglutination ) et une technique qualitative (recherche de l'arc 5).

Lorsqu'un kyste hydatique est calcifié, la réponse immunitaire est affaiblie et la sérologie est négative malgré la présence du parasite. Toutefois, une réponse immunitaire négative ne permet jamais d'exclure une hydatidose (Estève, 1998).

## **I.A.7. Réponse immunitaire**

La relation hôte-parasite se traduit par l'équilibre des interactions entre l'immunité cellulaire, humorale et tissulaire.

### **I.A.7.1. Réponse tissulaire**

L'hôte réagit à l'agression parasitaire par des réactions tissulaires qui contribuent à la formation de l'adventice périparasitaire isolant le parasite (Ripert, 1998).

### **I.A.7.2. Réponse cellulaire**

Elle se caractérise par une forte réponse lymphoprolifératrice, sous le contrôle d'un certain nombre de cytokines bien distinctes, elle-même produites par les sous populations cellulaires TCD4<sup>+</sup> de type Th1 et Th2 ( Touil-Boukoffa et al, 1997 ; Rigano et al, 2001 ; Mezioug et al, 2004).

L'ensemble des travaux réalisés par les différentes équipes de recherche montre que la réponse Th1 est associée à une protection immunitaire, alors que la réponse Th2 est associée à une susceptibilité à la progression de la maladie (Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009).

De plus, la voie du monoxyde d'azote semble avoir des retombées positives dans la mise en jeu du mécanisme antiparasitaire. Il est à noter que le NO est un médiateur cyostatique et cytotoxique synthétisé par le système monocyte/macrophage et les eosinophiles sous l'action d'effecteurs bactériens (LPS) et/ou cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) (Drapier, 1997).

Une corrélation étroite, *in vivo* et *in vitro*, entre l'induction du NO, l'immunoréactivité des patients envers l'Ag 5 et la synthèse de l'IFN- $\gamma$  a été montrée au cours de l'hydatidose par Touil-Boukoffa et al (1998).

Des antigènes issus du liquide hydatique, des membranes hydatiques et des protoscolex ont été utilisés dans la production de vaccin contre *E.granulosus*. Les antigènes d'oncophères induisent un maximum de protection chez le mouton. Une fraction de 25 KDa séparée par SDS-PAGE à partir de préparations brutes d'antigènes a montré un haut niveau de résistance (Zhang et al, 2003).

La principale innovation a été la mise au point d'un vaccin EG 95. Les recherches conduites par David Wolland Melbourne à partir de protéines recombinantes exprimées par l'embryon, mais son application se révèle lourde car si l'efficacité est satisfaisante, la durée de protection est courte et le nombre d'animaux à traiter, donc à manipuler, important (l'ensemble du cheptel pour un éleveur) (Gharbi, 1999).

On comprend aisément qu'il est urgent de trouver de nouveaux vaccins contre cette maladie. Pour cela, les chercheurs ont réalisé leurs essais chez le chien. En effet, la disparition ou la forte réduction du nombre de chiens disséminant les œufs serait un moyen d'interrompre le cycle de vie du parasite, et donc de réduire ou de supprimer la contamination du bétail et de l'homme (Petavy, 2007).



### **I.A.7.3. Réponse humorale**

A la mosaïque antigénique que constitue l'hydatide, l'hôte répond par la production d'anticorps de spécificité variable et de type essentiellement IgG et IgE et dans certains cas les IgM (cas de fissuration du kyste) et les IgA. Le type d'anticorps produits dépend de l'état du kyste et de sa localisation ( Nozais, 1996, Siracusano, 1998).

Des taux élevés d'IL-4 et IL-5, IL-6 et l'IFN- $\gamma$  sont produits in vitro par les PBMC isolés à partir de patients atteints d'hydatidose et stimulés par les antigènes du liquide hydatique (Rigano et al, 2001 ; Touil et al, 1997 ; Mezioug, 2002 ; Mezioug et al, 2004).

Le rôle majeur de l'IL-6 est l'induction de la différenciation des cellules B en plasmocytes qui contribuent au développement de la réponse humorale.

### **I.A.8. Traitement**

La chirurgie, quand elle est possible, demeure le traitement de choix de la maladie hydatique dans le cas de kystes, peu nombreux, évolutifs non encore calcifiés.

Cependant dans un grand nombre de cas atteignant jusqu'à 16% des patients pour la localisation abdominale, la chirurgie est dangereuse ou parfois impossible : quand la maladie atteint plusieurs organes, quand il y a une récurrence post-chirurgicale ou quand il y a une véritable dissémination péritonéale. Cette situation est loin d'être rare dans les pays d'endémie, due en particulier à la découverte tardive de la parasitose. Par ailleurs, le traitement médical a connu des développements intéressants dans l'utilisation d'abord du flubendazole (Fluvermal\*), puis du mébendazole (Vermox\*) et enfin de l'albendazole (Zentel\*) en plusieurs cures de 15 jours espacées par des intervalles de 10 jours. Les meilleures réussites sont obtenues au niveau du poumon, mais il s'agit d'un traitement coûteux et le taux de récurrence est élevé. Ces traitements médicaux sont intéressants pour les patients inopérables ou pour encadrer les gestes chirurgicaux ou une ponction.

La PAIR est en fait la nouvelle donnée au cours des vingt dernières années. C'est le traitement par Ponction, Aspiration, Injection et Réaspiration du kyste hydatique. Cette technique imaginée par M. Gargouri de Tunis en 1983 a été utilisée d'abord chez les moutons, puis chez l'homme. Décrite au départ, elle est aujourd'hui mondialement adoptée, puisque les dernières statistiques par le groupe de l'OMS ont recensé 2142 kystes traités jusqu'en 1998 par ponction dans le monde et dans plus de 10 pays.

### **I.A.9. Prophylaxie**

La prophylaxie reste le meilleur moyen de prévention contre l'hydatidose. Elle est double: à la fois d'ordre général, elle consiste alors à lutter contre les hôtes naturels et à contrôler l'abattage clandestin, puis d'ordre individuel par une action d'information et d'éducation sanitaire, insistant sur les modes de contamination et les mesures individuelles d'hygiène générale, à savoir:

- Eviter la promiscuité avec les chiens en zone d'endémie, conseil concernant en particulier les enfants.
- Garder les chiens éloignés des lieux de préparation ou de conditionnement des aliments, ainsi que des jardins potagers...
- Se laver soigneusement les mains après avoir touché un chien.
- Laver abondamment les fruits et les légumes consommés crus. (Louvain, 1999).

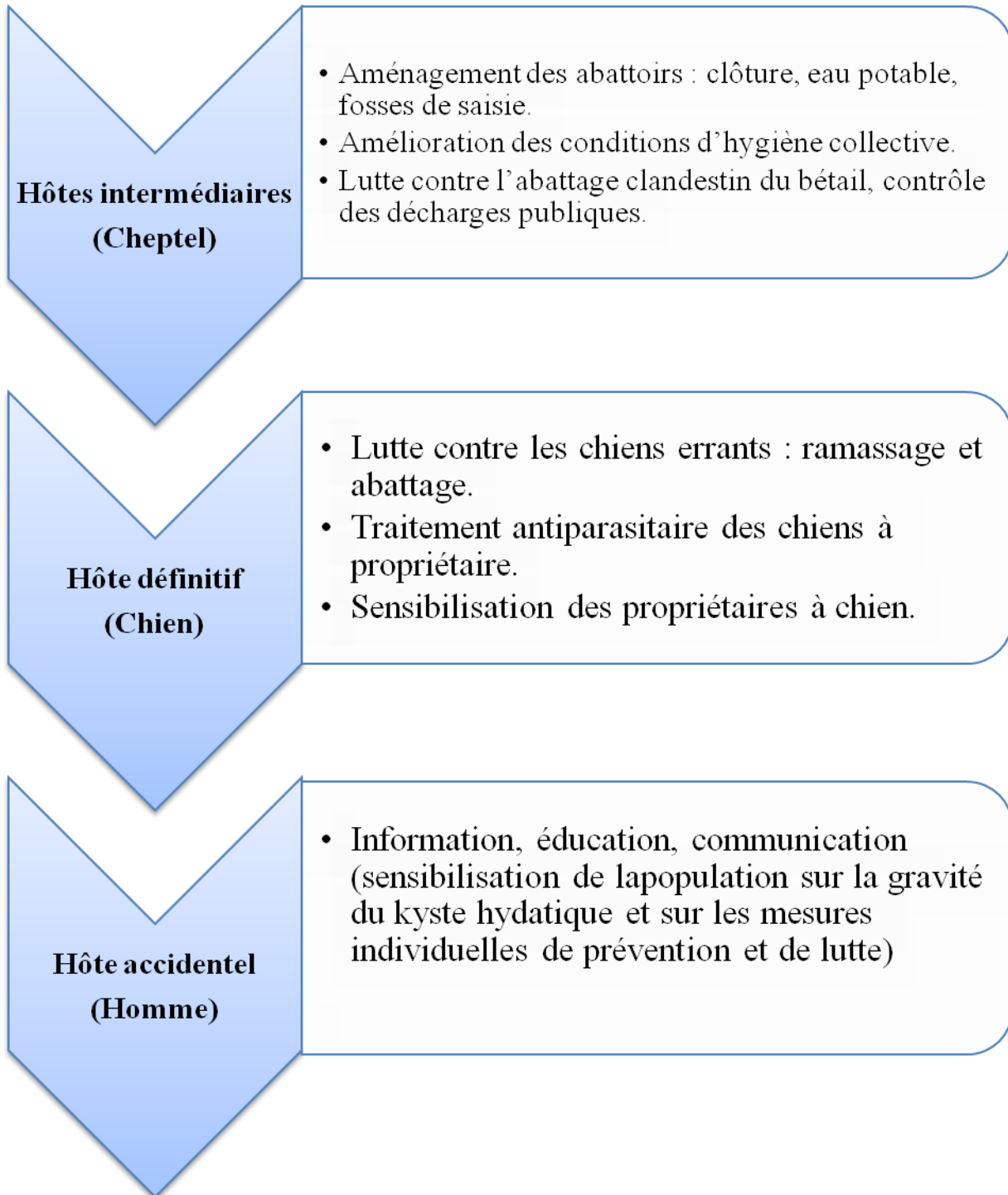


Figure 10 : Schéma des Mesures de prévention visant à interrompre le cycle biologique au niveau des hôtes et entre l'hôte définitif et les hôtes intermédiaires.

## **I.B. LES CYTOKINES**

### **I.B. Généralités sur les cytokines :**

#### **Introduction :**

Les réponses immunitaires résultent de la coopération entre sous populations cellulaires distinctes (lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages...) qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires et d'un réseau intriqué de facteurs solubles appelés «cytokines».

#### **I.B.1. Caractéristiques générales des cytokines :**

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire (8 à 50 kDa), généralement glycosylés (Théze, 1999). Elles ont pour but d'induire, de contrôler ou d'inhiber l'intensité de la durée de la réponse immunitaire, ainsi que les mécanismes d'hématopoïèse et certaines différenciations et prolifération tissulaires (Goldsby *et al.*, 2003).

Leur mode d'action peut être autocrine (action des cellules sécrétrices sur elle-même), paracrine (action sur des cellules proches) ou endocrine (sécrétion dans le sang), voire même juxtacrine (par simple contact membranaire, sans nécessiter une sécrétion). Le rôle d'une cytokine est généralement dépendant de celle d'une ou de plusieurs autres (Zdanov *et al.*, 2003).

Les affinités des cytokines avec leurs récepteurs sont fortes, de  $10^{-8}$  M à  $10^{-12}$  M (Arkin *et al.*, 2003), des concentrations picomolaires sont parfois suffisantes pour induire un effet biologique.

En se liant à des récepteurs de cellules cibles, elles déclenchent des voies de transduction de signal modifiant l'expression des gènes de ces cellules (Goldsby *et al.*, 2003).

#### **I.B.1.1. Classification des cytokines :**

Autrefois les cytokines étaient divisées en deux grands groupes : les lymphokines, produites par les lymphocytes ; et les monokines, secrétées par les macrophages.

Selon leurs caractéristiques biologiques dominantes, aujourd'hui les cytokines sont rassemblées en quatre grandes familles:

Les hématopoïétines (cytokines de classe I) : GM-CSF, IL-2 à 7, IL-11 à 13, IL-15, ...

Les Interférons (cytokines de classe II) : IL-10, INF  $\alpha$ , INF  $\beta$ , INF  $\gamma$ , ...

Les chémokines : IL-8, CCL1, ...

Les Tumor Necrosis Factor: TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , ... (Goldsby *et al.*, 2003).

#### **I.B.1.2. Les cellules productrices de cytokines :**

Les cytokines sont produites par des types cellulaires extrêmement variés qui incluent notamment les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules stromales et épithéliales des divers

organes. Les sources cellulaires principales demeurent les leucocytes dont les lymphocytes et les Monocytes/macrophages (Banchereau, 1993).

Récepteur	Principaux ligands associés	Principales cellules présentant ce type de récepteur
-----------	-----------------------------	--

### I.B.1.3. Les récepteurs de cytokines :

Les cytokines agissent sur leurs cellules cibles par un mécanisme analogue à celui des hormones peptidiques, en se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques, ce qui conduit à l'activation de seconds messagers intracellulaires et, en retour à l'induction d'une cascade biochimique qui aboutit à l'effet spécifique de la cytokine (prolifération, différenciation...) (Bach, 2002).

On distingue cinq types de récepteurs (Tableau II): (Boulanger *et al.*, 2003 ; Goldsby *et al.*,2003).

- Les récepteurs des cytokines de classe I : hématopoïétines (Figure 11)
- Les récepteurs des cytokines de classe II : interférons (Figure 12)
- Les récepteurs des TNF (Figure 12)
- les récepteurs de la super famille des immunoglobulines (Figure 12)
- Les récepteurs des chémokines (Figure 13)

Tableau II : les différents types de récepteurs et leurs localisations (Boulanger *et al.*, 2003 ; Goldsby *et al.*,2003).

Récepteurs de la superfamille des immunoglobulines	IL-1, M-CSF, C-kit.	Lymphocytes TH, B, NK. Cellules endothéliales musculaires. Macrophages et neutrophiles Hépatocytes.
Récepteurs des cytokines de classe I	IL-2 à 9 et 11 à 13, 15 GM-CSF, G-CSF, OSM, LIF, CNTF. Hormone de croissance, Prolactine.	Lymphocytes TH et Tc actives. Certaines cellules NK et TC au repos . Mastocytes.
Récepteur des cytokines de classe II	IL-10 INF $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Macrophages. Cellules présentatrices de l'antigène. Leucocytes et fibroblastes, lymphocytes TH1, Tc, cellules NK.
Récepteurs des TNF	TNF $\alpha$ et $\beta$ , CD40, Nerve growth Factor.	Cellules Nerveuses. Lymphocytes B.
Récepteurs des chémokines	IL-8.	Neutrophiles.

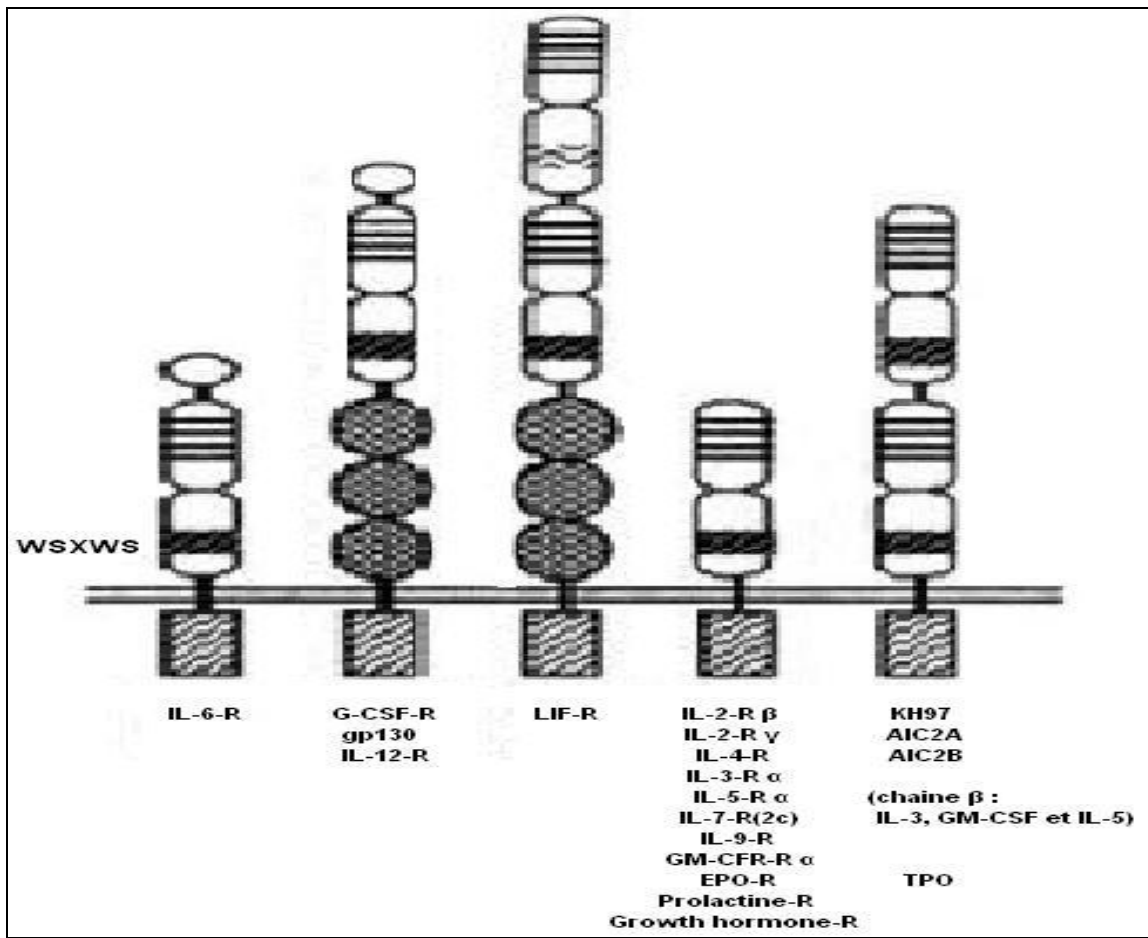


Figure 11 : les récepteurs des hématopoïétines (Type I) (Cavaillon, 1996).

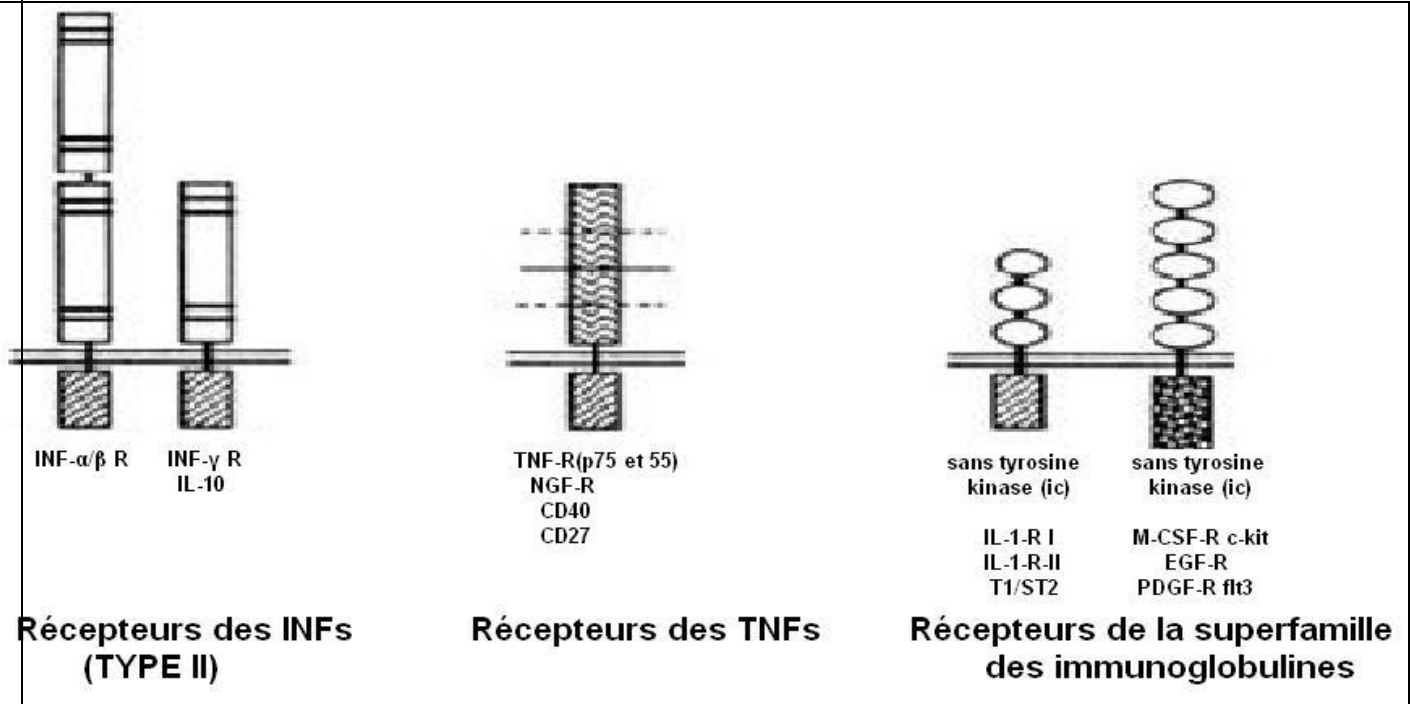


Figure 12 : Structure des récepteurs des INFs, des TNFs et de la superfamille des immunoglobulines (Cavaillon, 1996).

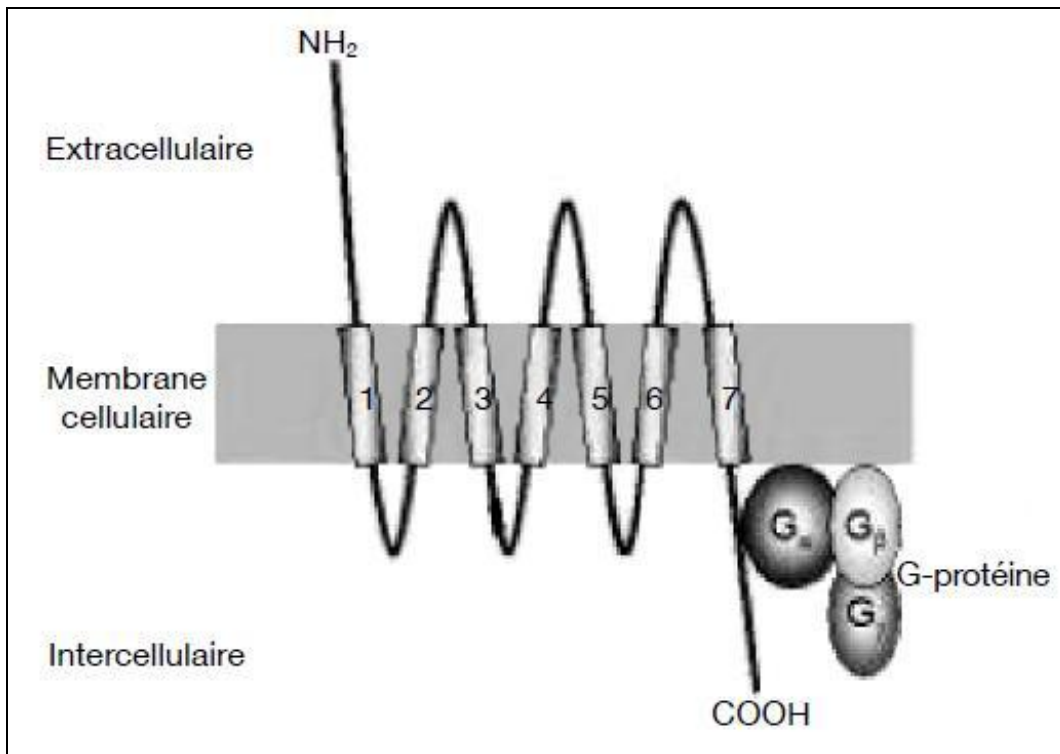


Figure 13 : Le récepteur des cytokines du type chémokine ( Burteau et *al.*, 2007).

### I.B.2. Réseau des cytokines

Le réseau des cytokines constitue un système interactif dont les acteurs sont capables d'interagir entre eux en modulant mutuellement leurs effets (effets synergiques ou antagonistes), et en induisant (ou en inhibant) leur expression ou celles de leurs récepteurs (systèmes d'amplification en cascade ou de rétrocontrôle) (Figure 14). Ainsi, les cytokines forment un vaste réseau de molécules aux effets pléiotropes et redondants, qui interagissent entre elles pour induire ou inhiber leur production et moduler leurs effets, et jouent un rôle clé dans l'établissement et la régulation de la réponse immunitaire (Théze, 1999).

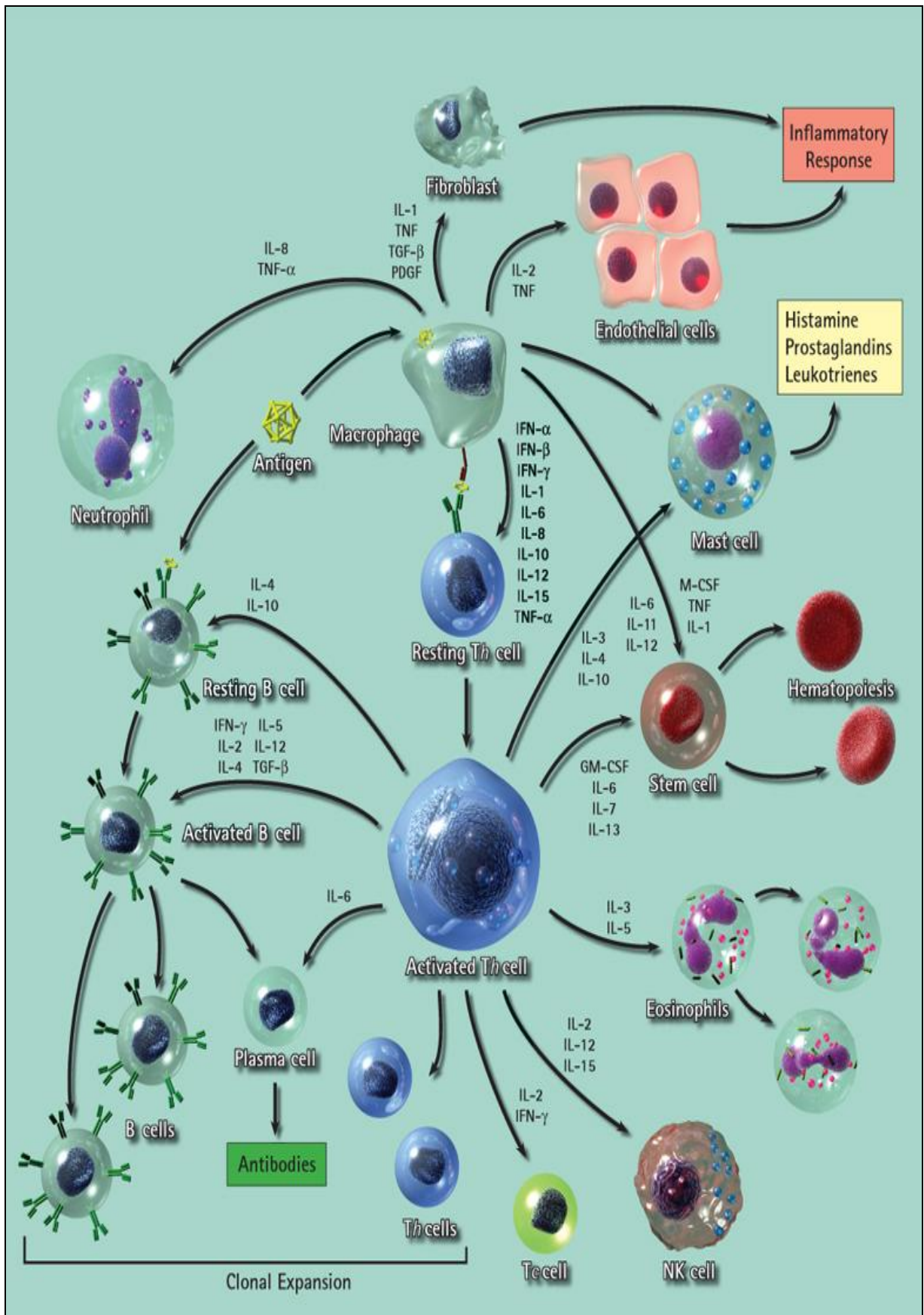


Figure 14: Schéma du réseau complexe des cytokines (Goldsby et al., 2000).



### **I.B.3. Transduction du signal par les récepteurs des cytokines**

La transduction du signal débute par l'appariement des cytokines avec leurs récepteurs membranaires spécifiques, ce qui va engendrer une cascade de réaction (phosphorylation, dimérisation) aboutissant à l'expression de différentes fonctions cellulaires.

Dans le cytosol, les sous-unités des récepteurs sont associées à des protéines JAK (kinase Janus, des tyrosines kinases), qui vont assurer la transduction du signal.

Lors de la formation du complexe dimère-ligand, les JAK sont activées par phosphorylation réciproque. Ces enzymes vont alors phosphoryler les résidus tyrosines des portions des sous-unités des récepteurs dans le cytosol.

Les tyrosines ainsi phosphorylées créent des sites d'arrimage pour les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription).

Les protéines STAT subissent une phosphorylation par les JAK, puis sont libérées du site d'arrimage. Elles vont alors pouvoir se dimériser, et pénétrer dans le noyau. Là, elles vont activer la transcription de gènes en se fixant sur leurs régions promotrices (Figure 15).

Il existe donc trois niveaux de spécificité de réponse des cytokines :

1. Le récepteur reconnaît une cytokine et va induire une voie JAK/STAT particulière.
2. L'homodimère (ou hétérodimère) STAT ne reconnaît que certains motifs de la séquence génétique et ne pourra interagir qu'avec certains promoteur de gènes.
3. Ces promoteurs sont multiples, et tous ne sont pas disponibles suivant que le gène s'exprime ou non dans la cellule-cible (Boulanger *et al.*, 2003; Goldsby *et al.*, 2003).

L'activation de cette voie de signalisation est rapidement interrompue par divers mécanismes moléculaires, soit constitutivement actifs soit inductibles (Starr et al., 1999). Le plus important implique le suppressor of cytokine signalling (SOCS), une protéine dont la synthèse est induite par l'activation de la voie JAK-STAT (Figure 16). Les protéines de la famille SOCS (SOCS 1, 2, 3) présentent une structure similaire avec un domaine SH2 central qui permet leur liaison à JAK. Leur fonction est de bloquer l'activité enzymatique de JAK, soit directement soit en induisant le recrutement de phosphotyrosine phosphatases. Leur intervention dans l'inflammation a été démontrée *in vivo* et *in vitro*. Leur fonction est de bloquer l'activité enzymatique de JAK, soit directement soit en induisant le recrutement de phosphotyrosine phosphatases (Starr et al., 1998).

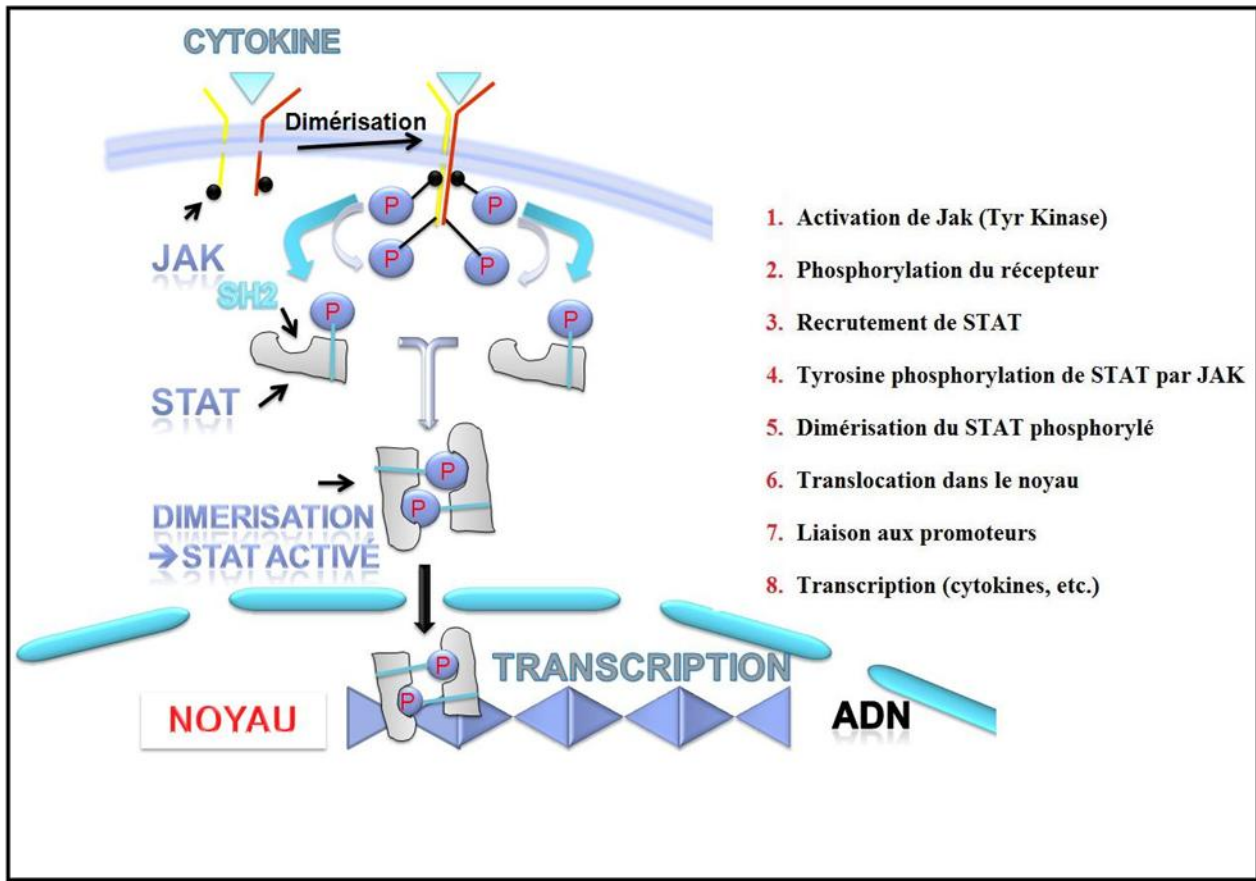


Figure 15: Schéma général de la transduction du signal des cytokines via les récepteurs membranaires spécifiques (Boulangier *et al.*, 2003).

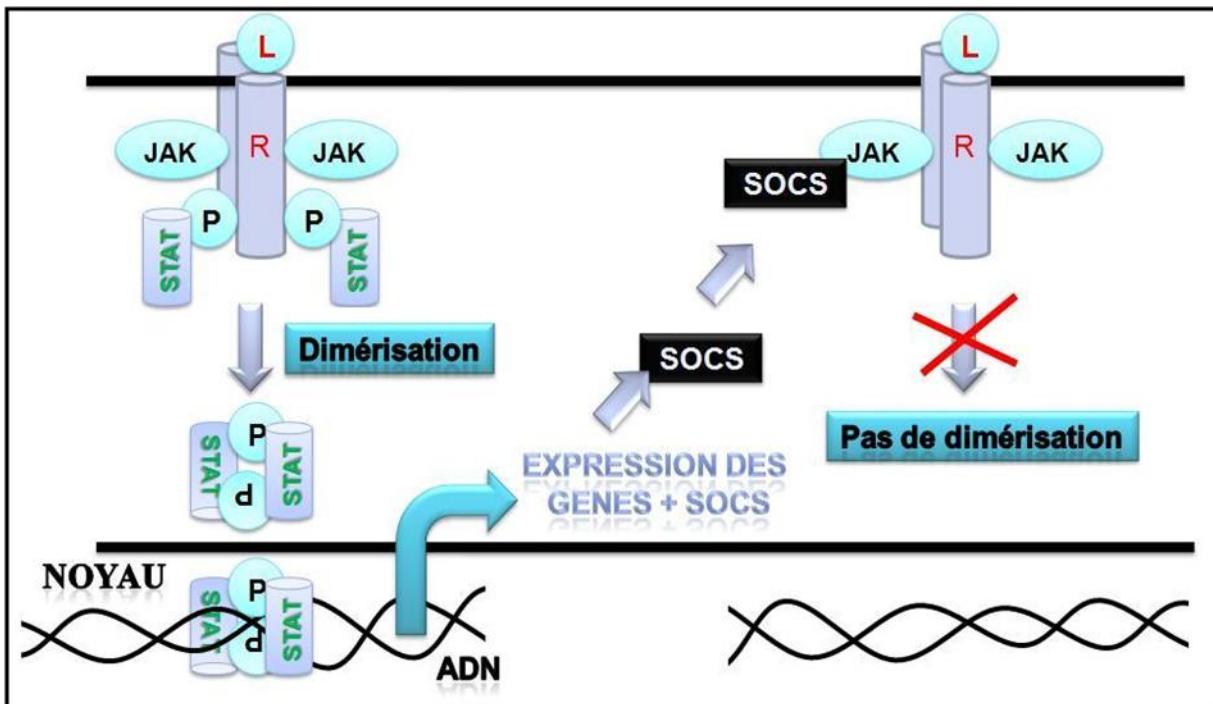


Figure 16 : Mécanismes d'interruption de la voie de signalisation JAK/STAT ( Hilton *et al.*, 1999).

#### **I.B.4. Les cellules T auxiliaires (T helper)**

En produisant des cytokines, ces lymphocytes T aident les cellules B à se diviser, à se différencier et à produire des anticorps. Ils produisent aussi des cytokines qui contrôlent le développement des cellules souches hématopoïétiques. D'autres cytokines sont nécessaires pour le développement des cellules T cytotoxiques, d'autres encore provoquent l'activation des macrophages, leur permettant de détruire les pathogènes après leur ingestion. La majorité des cellules Th sont CD4+ et reconnaissent l'antigène présenté à la surface des cellules présentant l'antigène en association avec les molécules de classe CMH II (Cavaillon, 1996; Male, 2002).

##### **I.B.4.1. Les sous populations Th0, Th1 et Th2**

Les cellules Th1 et Th2 sont des sous populations de cellules T auxiliaires qu'on peut distinguer *in vitro* en fonction du type de cytokines qu'elles produisent (Figure 17). Les cellules Th1 interagissent préférentiellement avec les phagocytes mononuclées, alors que les Th2 produisent des cytokines particulièrement importantes dans la différenciation des cellules B. Les deux types participent au développement des cellules cytotoxiques. On considère que les cellules Th1 et Th2 dérivent des cellules Th0 (Cavaillon, 1996 ; Male, 2002).

Les cellules de type Th1 produisent de l'INF  $\gamma$ , de l'IL-2, du TNF  $\alpha$  et contribuent à la fois aux réponses humorales et à médiation cellulaire: production d'anticorps d'isotype IgG2a chez la souris, activation du macrophage, cytotoxicité directe et cytotoxicité dépendante d'anticorps, hypersensibilité de type retardé.

Les cellules de type Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 et elles contribuent à la réponse humorale: elles sont impliquées dans la production d'IgE, d'IgG1, ou d'IgG4, dans l'immunité mucoale au travers de la croissance et de différenciation de mastocytes et d'éosinophiles et de la facilitation de la synthèse d'IgA (Romagnani , 1994).

Dans le modèle de la différenciation Th1/Th2, l'IL-12 est le principal facteur de différenciation Th1, tandis que l'IL-4 est essentielle à l'induction d'une réponse Th2 (O'Garra, 1998).

##### **I.B.4.2. Les sous population Th17 et Treg**

Les cellules productrices d'IL-17 sont nombreuses (lymphocytesT, neutrophiles, éosinophiles). Parmi celles-ci, une de ces populations a profondément modifié le fameux paradigme Th1/Th2 et une autre a apporté des éléments nouveaux sur les cellules iNKT. En effet, il est maintenant bien établi que les cellules CD4+ productrices d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22, maintenant dénommées Th17, constituent une nouvelle voie de différenciation des cellules T CD4+ naïves (Steinman , 2007 ; Schmidt-Weber et al., 2007).

Par ailleurs, des résultats récents mettent en évidence une relation étroite entre les cellules Th17 et les cellules Treg Foxp3+. Leurs différenciations sont sous la dépendance du TGF $\beta$  (Figure 18). La présence d'IL-6 permet la différenciation vers la voie Th17 alors que son absence aboutira à des cellules Treg (Figure 17) (Tato et al., 2006).

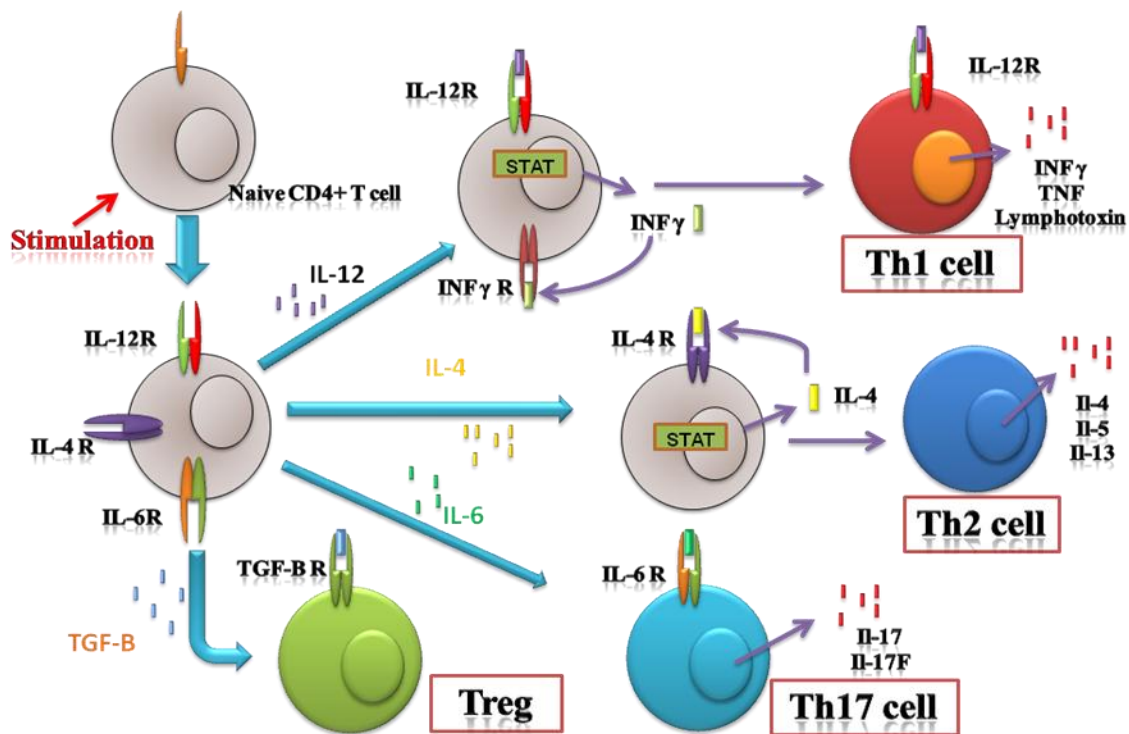


Figure 17: Intervention des cytokines dans la différenciation des lymphocytes T (Bürgler et al., 2008).

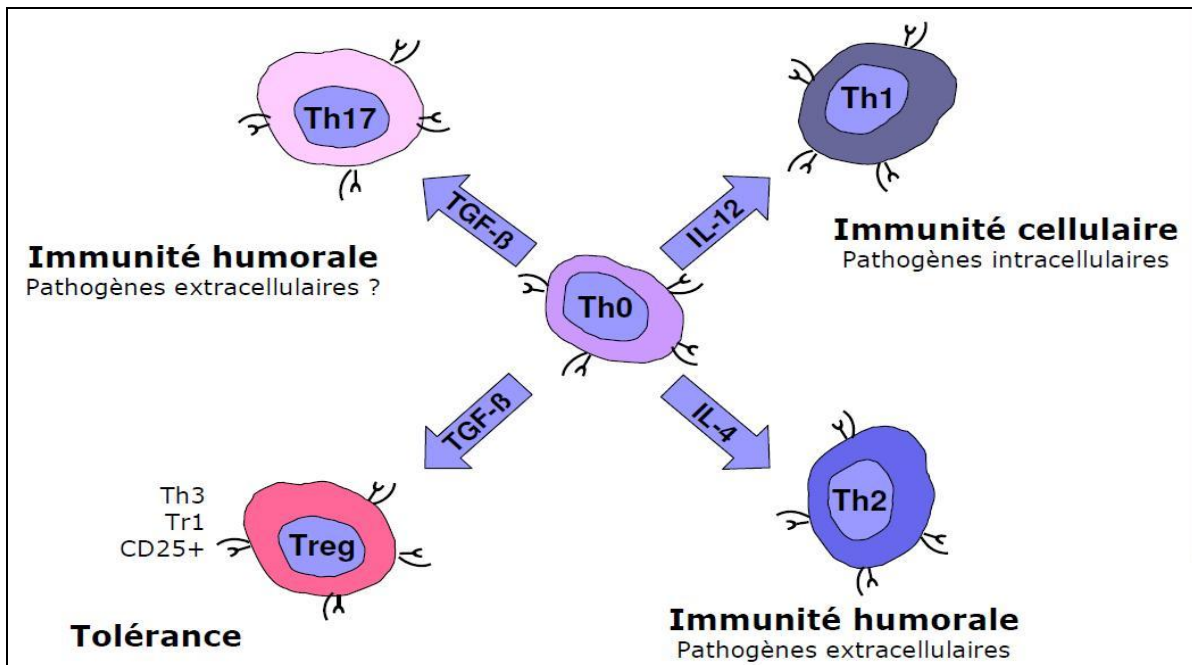


Figure 18 : Différenciation des Th0 en Th1, Th2, Th17 et Treg (Bürgler et al., 2008).

### **I.B.5. Cytokines en pathologie et en applications thérapeutiques :**

Les premiers essais cliniques étaient: d'abord l'immunothérapie anti-tumorale (Rosenberg *et al.*, 1985), en second lieu l'immunostimulation à visée vaccinale (hépatite B) chez des patients insuffisants rénaux immunodéprimés (Meuer, *et al.*, 1989).

Une dizaine de cytokines ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché et sont, dès à présent, disponibles sur prescription médicale. C'est notamment le cas de l'érythropoïétine (EPO), des interférons (IFN), des G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) et de l'IL-2 (Fradelizi, 1996).

Quelques déficits comme les infections primitives à mycobactéries ou le syndrome de Buckley ont récemment été traités par l'IFN $\gamma$ . Le syndrome d'agranulocytose congénitale est très largement corrigé par l'administration chronique de G-CSF. Ces effets bénéfiques illustrent bien le rôle crucial des cytokines dans les mécanismes de défenses, notamment contre l'infection. A cet égard, une utilisation particulièrement remarquable de l'IFN $\alpha$  est le traitement des hépatites chroniques B ou C (Degos *et al.*, 1990).

L'érythropoïétine (EPO) (Lacombe *et al.*, 1996), le G-CSF et le GM-CSF sont certainement (et de loin) les cytokines les plus utilisées en clinique (Varet, 1995). Ces trois facteurs qui stimulent la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse (cellules souches érythrocytaires pour EPO et myéloïdes pour les CSF) sont, en effet, des produits remarquables pour hâter la reconstitution hématologique en globules rouges ou en polynucléaires de patients traités par des fortes doses de chimiothérapie.

L'étude des propriétés distinctives des lymphocytes T auxiliaires de type Th2 a montré que les cytokines qu'ils sécrètent inhibent la réponse Th1 et l'inflammation. Ces résultats ont permis de démontrer dans les modèles expérimentaux l'efficacité des cytokines IL-10, IL-4 et IL-13 pour améliorer ou guérir différentes maladies auto-immunes et inflammatoires. Inspirés de ces résultats quelques essais cliniques débutent ou sont programmés notamment avec l'IL-10 (polyarthrite, maladie de Crohn), puis l'IL-4 (polyarthrite) (Russo *et al.*, 1996).

Les concentrations sériques ou plasmatiques de certaines cytokines sont augmentées au cours de l'hydatidose. Leur activité diminue après extirpation chirurgicale du kyste à part celle de l'IL-6 qui persiste ou même augmente (Touil *et al.*, 1997; Mezioug, 2002; Mezioug, 2004).

L'INF $\beta$  est efficace dans le traitement de la sclérose en plaques et permet une diminution du nombre de crises, de l'activité de la maladie et un ralentissement de la progression de la maladie (Li *et al.*, 2001).

## **I.B.6. Cytokines et hydatidose**

La production de cytokines constitue un marqueur de choix dans l'immunosurveillance et l'immunodiagnostic lors de l'hydatidose. En effet, la persistance du TNF- $\alpha$  chez les patients récidivants et pendant les phases chroniques de la maladie constitue un mauvais pronostic. Toutefois, la diminution de la production de l'IFN- $\gamma$  et du monoxyde d'azote (NO) après l'exérèse chirurgicale du kyste hydatique est le signe d'un bon pronostic (Touil-Boukoffa, 1998).

L'analyse du profil cytokinique a montré que la réponse Th1 était la véritable réponse efficace prédictive d'un bon pronostic, qui se manifestait dans les formes « abortives » d'infection, alors que des réponses de type Th2, caractérisées par une évolution chronique de la maladie, étaient à l'œuvre dans les formes « progressives » d'infection, manifestées par l'apparition de la maladie et de ses complications (Mezioug ; Toui-Boukoffa, 2009). Chez les malades, tout se passe comme si les acteurs de la réponse immunitaire cellulaire se mettaient en place autour des cellules parasitaires, mais se trouvaient, au moins partiellement, paralysés par l'intervention de cytokines « anti-inflammatoires » et d'autres médiateurs, comme le NO (Vuitton, 2001).

L'initiation de la réponse immunitaire anti-hydatidose sollicitée par l'antigène 5 présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes/macrophages) seraient sous la dépendance de lymphocyte Th1 qui synthétise l'INF $\gamma$ , et qui sous l'action simultanée de l'antigène 5 et de l'INF $\gamma$ , participent à la biosynthèse du TNF $\alpha$ , et de l'IL-6. Cette dernière joue un rôle primordial dans la différenciation finale des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps anti-F5 (Touil-Boukoffa et al., 1997).

L'implication de ces deux voies pourrait être due à l'existence d'antigènes complexes dans le liquide hydatique qui contiendrait probablement des épitopes distincts pour chaque population de cellule T (Mc Manus, 1995).

Le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$  semblent augmenter parallèlement et régresser de la même façon après extirpation du kyste. Ceci ne s'applique pas à l'IL-6 dont le taux reste élevé durant les 72 heures qui suivent l'intervention chirurgicale, et ne revient à la normale qu'après un mois (Touil et al, 1998). Cette persistance est attribuée au stress opératoire induisant un effet inflammatoire.

De plus, l'IL-12 induit la sécrétion de l'INF $\gamma$  par les cellules T et NK, et joue un rôle essentiel dans la réponse Th1, et l'inhibition de la réponse Th2 (Regnault, 1992). Le taux de cette interleukine varie en fonction du stade opératoire et semble suivre le même profil que l'IL-6 (Mezioug ; Toui-Boukoffa, 2009 2009).

L'observation de la production des interleukines : IL-4, IL-5, IL-10 et l'IL-12 produites, permettrait de situer l'intervention concurrente de la réponse Th2, chez les patients atteints d'hydatidose (Regnault, 1992).

Notons que d'autres agents comme les glucocorticoides, le TGF $\beta$  et l'IL-10 régulent négativement l'induction de la production de l'INF $\gamma$  (Sen, 1997).

Il semblerait que l'abaissement de l'interféronémie après exérèse et absence d'activité interféron chez les cas de récurrences soit dépendante de la localisation, de la taille du kyste et de l'évolution clinique du patient (Touil et *al.*, 1997).

L'absence d'INF $\gamma$  en phase de réactive suggère une inhibition de cellules Th1, se traduisant par une incapacité de répondre à la stimulation des antigènes.

## I.C. Le monoxyde d'azote (NO)

### I.C.1. Définition

Le monoxyde d'azote est un composé naturel, radical libre et instable, produit de la réduction bactériologique des nitrates et nitrites dans le sol et les eaux, et de l'oxydation enzymatique de la L-arginine chez les animaux. Il est biosynthétisé par des systèmes enzymatiques finement régulés appelés NO-synthases. C'est un médiateur biologique ubiquitaire dont les fonctions passent de fonctions physiologiques à des mécanismes pathophysiologiques (Ducrocq et *al.*, 2001).

Dans les conditions normales de température et de pression, le monoxyde d'azote (NO) est un gaz incolore à l'état pur. NO est un radical constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une double liaison (Figure 19).

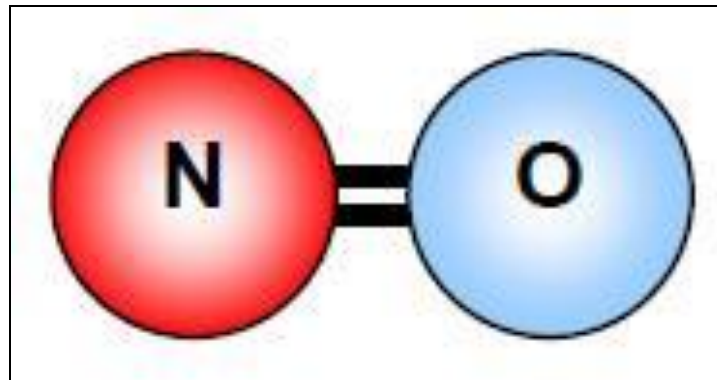


Figure 19 : structure de la molécule NO (Ghafari et *al.*, 2003).

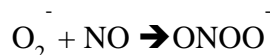
Cette molécule est simple en raison de l'aisance avec laquelle elle franchit les membranes biologiques et diffuse d'une cellule à l'autre, constituant ainsi un messenger paracrine idéal. Mais la même molécule est également complexe en raison de sa forte réactivité chimique lorsqu'il est en solution aqueuse (cas des systèmes biologiques), ainsi que de l'ubiquité et de l'ambiguïté de ses effets dans l'organisme. En effet, le NO est impliqué dans certains mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire, reproduction ou maintien du tonus vasculaire, mais aussi du développement des troubles pathologiques au cours de l'inflammation, ainsi que du choc septique ou certaines formes de neurodégénérescences (Crépel et Lamaire, 1995).



### I.C.2. Propriétés physico-chimiques du NO

Le monoxyde d'azote est un composé radicalaire réactif qui se présente sous forme gazeuse. Sa solubilité dans l'eau est comparable à la solubilité du monoxyde de carbone (CO) et de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>). La charge nulle du NO le rend soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires (Sennequier *et al.*, 1998).

Le NO réagit rapidement avec l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former l'ion peroxy-nitrique ONOO<sup>-</sup> qui possède une toxicité reconnue.



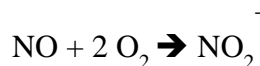
Il se couple au radical tyrosyl de la ribonucléotide-réductase.

Il peut se lier à des sites de coordination libres dans des complexes métalliques. Par exemple, il se fixe au Fe<sup>2+</sup>, retrouvé au niveau de l'hémoglobine et de la guanylate cyclase.

Le NO peut se fixer sur l'aconitase au niveau de complexes Fe-S.

Il peut également nitrosyler les sites thiols (SH) libres de protéines (réservoir à NO potentiel).

En solution aqueuse aérobie, le NO est rapidement oxydé en nitrite. La vitesse de cette oxydation n'étant pas linéaire en fonction de la concentration en NO, celui-ci peut, en faible concentration diffuser largement (Ghafari *et al.*, 2003).



### I.C.3. Biosynthèse du NO

NO provient de l'oxydation de la L-arginine par un système très complexe, appelé NO-synthase (NOS, EC 1.14.13.39). La réaction chimique est présentée sur la Figure 20.

Selon les espèces animales et dans une espèce selon le type cellulaire, il existe plusieurs isoenzymes différentes (Tableau III), présentant de nombreuses analogies au niveau de la séquence primaire de la protéine (Ghafari et Labarde, 2003).

Les NO synthases catalysent la biosynthèse de NO par deux mono-oxydations successives à partir de la L-arginine via la N<sup>G</sup>-hydroxy-L-arginine (NOHA) qui est l'intermédiaire clé de la synthèse du NO (Figure 20) (Boucher, 1993). Ce mécanisme nécessite l'intervention de plusieurs cofacteurs et groupements prosthétiques. Les NOS consomment du NADPH, la BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine), le FAD, la FMN et l'hème (protoporphérine IX de fer) (Figure 21).

#### I.C.4. Isoformes de la NOS

Plusieurs isoformes de NOS ont été identifiées représentant les produits de trois gènes distincts situés sur différents chromosomes (gènes clonés chez l'homme et chez les rongeurs). Chez l'homme, ces gènes sont localisés sur le chromosome 12, 17 et 7 codant respectivement pour les NOS I, II et III (Xu et *al.*, 1994).

La différence essentielle entre les deux types de NOS est que l'activation des NOS I et III dépend du  $\text{Ca}^{++}$ , alors que la NOS II est régulée par sa transcription (Drapier et *al.*, 1996).

Néanmoins la NOS n'est pas seulement inductible, car elle est exprimée continuellement dans l'épithélium respiratoire humain, les plaquettes sanguines, ainsi que de manière transitoire dans les vaisseaux sanguins cérébraux au cours du développement du cerveau du rat (Sennequier et *al.*, 1998).

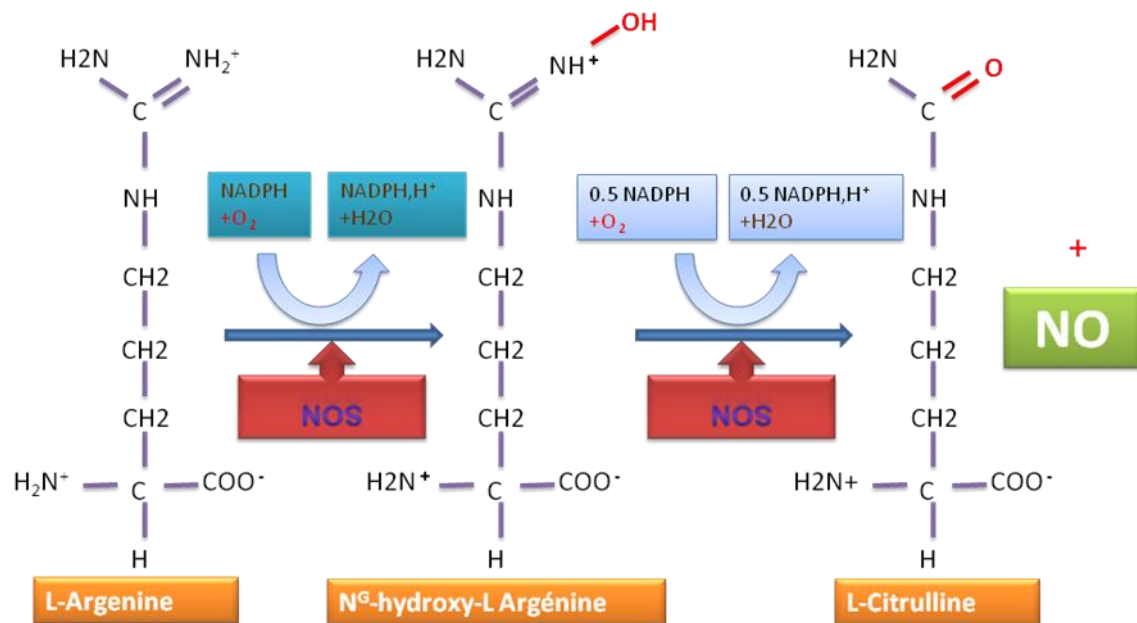


Figure 20: Mécanisme de biosynthèse du NO (Wei et *al.*, 2003) .

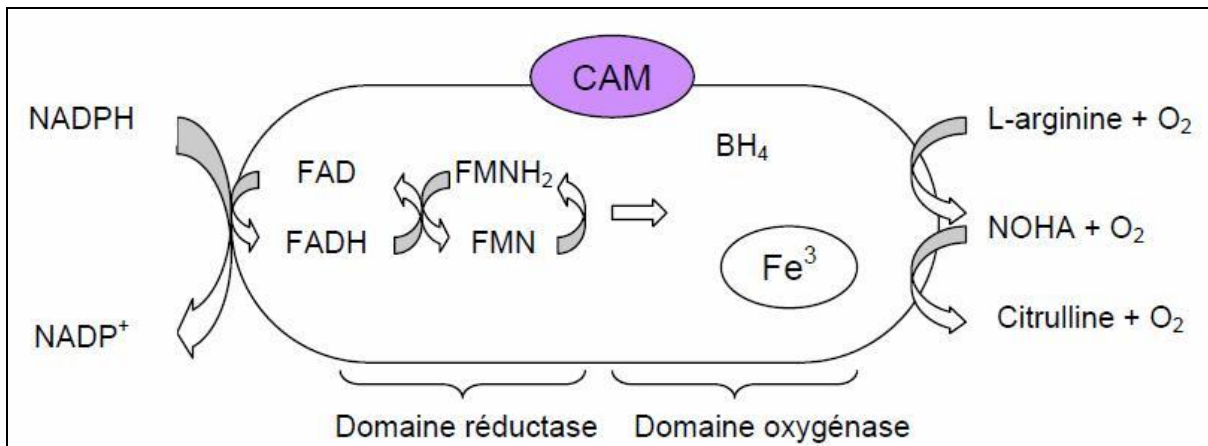


Figure 21 : Fonctionnement général des NOS (Sennequier et *al.*, 1998).

Tableau III: Caractéristiques des trois types de NO-synthase humaine (Sennequier et *al.*, 1998).

	<b>NOS-I</b>	<b>NOS-II</b>	<b>NOS-III</b>
Type	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation cellulaire	Cytosol	Cytosol	Cytosol, Membrane, Mitochondries
Masse Moléculaire en kDa	160	130	133
Localisation du gène humain	Chromosome 12, région 12q24	Chromosome 17, région 17 q11.2	Chromosome 7, région 7q35-36
Activation	Augmentation de la $[Ca^{2+}]$	Expression stimulée par cytokines et/ou endotoxines	Augmentation de la $[Ca^{2+}]$

### **I.C.5. Types de régulation des NOS**

La NOS II est régulée par l'activation de la transcription de son gène par des associations de cytokines (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1) et/ou par des molécules d'origine bactérienne (lipopolysaccharide LPS) (Devera et *al.*, 1996), l'activité de la NOS inductible (NOS II) est indépendante des ions calcium, car elle est fortement couplée à la calmoduline (Sennequier et *al.*, 1998).

L'induction est inhibée par les glucocorticoïdes, les TGF $\beta$  et les interleukines IL-4, IL-10 ou l'IL-13. L'action de l'IL-6 et de l'IL-8 semblent rester sans effet (Tenu, 1993 ; Thiemermann, 1995).

Les NOS I et III ne sont actives qu'après couplage à la calmoduline, qui intervient comme interrupteur permettant le flux d'électrons au sein de l'enzyme, ce qui explique que l'activité de ces deux isoformes soit régulée par la concentration en Ca<sup>2+</sup> qui assure le couplage à la calmoduline (Sennequier et *al.*, 1998).

La L-arginine est le substrat de la NOS II qui le converti en NO et citrulline. Des travaux ont montré une production concomitante du NO en présence de différentes concentrations de L arginine, ceci est expliqué par l'utilisation du substrat par l'arginase en produisant l'ornithine et l'urée. L'activité de l'arginase a été démontrée dans les macrophages stimulés par les LPS (chiung et al, 1998).

### **I.C.6. NO et cytokines**

Les cytokines interviennent comme inducteur, inhibiteur ou régulateur de la production du NO. L'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$  sont les plus importants inducteurs de la transcription de la NOS II. Ces deux cytokines agissent en général en synergie (Drapier et *al.*, 1992). Elles peuvent être aussi combinées aux LPS et à l'IL-1 pour engendrer un effet maximal (Nussler et *al.*, 1992).

La région promotrice de la NOS II possède de nombreux sites de régulation potentiels incluent, en particulier, deux motifs importants : une séquence de liaison de l'interferon regulatory factor 1 (IRF-1) et du NF- $\kappa$ B. Ces deux séquences sont impliquées dans la régulation par l'INF $\gamma$  et le LPS respectivement.

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, 1998 ; James, 1995). Ainsi, le TGF $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-10 modulent directement la production du NO en inhibant l'expression de la NOS II au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (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.*, 1991 ; James, 1995).

Cependant, l'IL-4 peut avoir un effet inducteur indirect sur la production du NO par l'induction de l'expression du CD23 (Dugas et *al.*, 1998), qui a un rôle fonctionnel dans l'activation rapide des NOS II (Cabrera et *al.*, 2003).

### **I.C.7. NO et systèmes immunitaires**

L'expression de la NOS II est généralement le résultat de la réponse inflammatoire localisée ou diffuse, suite à une infection ou à une altération tissulaire. Le NO produit par les NOS II, 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 les cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS II (Lowenstein et *al.*, 2004). Le NO produit peut alors agir sur les cellules tumorales, des bactéries ou des parasites intracellulaires par son action cytotatique et cytotoxique (Nathan et Hibbs, 1991 ; Moncada, 1992).

Le NO est impliqué dans d'autres fonctions du système immunitaire tel que : le chimiotactisme, l'agrégation et l'apoptose des polynucléaires neutrophiles, elles même productrices de NO (Saini et *al.*, 2006).

### **I.C.8. Effets du NO**

Les effets du NO sont variables. Dans certains cas, la production de NO a des effets bénéfiques. En effet, le NO peut prévenir le thrombose vasculaire (Yao et *al.*, 1992), les lésions inflammatoires d'origines cellulaire (Clancy et *al.*, 1992) et les lésions de reperfusion (Kubes, 1993). Produit par les macrophages, le NO est toxique pour les bactéries, les cellules tumorales et les parasites (Stuehr et *al.*, 1985 ; Sherman et *al.*, 1991).

Cependant la stimulation de la production de NO peut également entraîner des effets délétères tels que l'hypotension artérielle (Moncada et *al.*, 1991), l'inhibition de métabolismes intermédiaires (Hibbs et *al.*, 1998), l'apoptose (Albina et *al.*, 1993) et la production d'un radical oxydant-peroxynitrite-produit de réaction du NO avec l'anion superoxyde (Pryor et *al.*, 1995).

Le NO est doué d'importantes propriétés immunorégulatrices, il agit directement comme une molécule immunorégulatrice autocrine ou paracrine régulant notamment la balance Th1/Th2 (Lowenstein et *al.*, 2004).

Le NO joue un rôle soit pro-apoptotique, soit anti-apoptotique dans de nombreux types cellulaires. A faible concentrations, le NO protège les cellules de l'apoptose en activant la protéase CCP32 like et en augmentant l'expression de la protéine Bcl2. Les effets pro-apoptotique du NO font intervenir sa possibilité de réagir avec l'anion superoxyde  $O_2^-$  pour générer du peroxynitrite  $ONOO^-$  ont également été impliquées (Kolb, 2001 ; Lowenstein et *al.*, 2004).

# MATERIELS ET METHODES

## II.A. Matériel

### II.A.1. Matériel non biologique

Appareillage	Verrerie et accessoires
Agitateur magnétique	Tube Falcon
Autoclave	Cellule de Mallassez
Balance de précision	Cuve de spectrophotomètre
Centrifugeuse	Lames et lamelles
Micro centrifugeuse	Microplaque de 96 puits à fond plat
Chambre de culture	Pipette Pasteur
Microscope photonique	Eppendorf
pH mètre	Becher
Réfrigérateur	Erlen Meyer
Spectrophotomètre	Fiole
Vortex	Barreau magnétique
	Poire plastique

### II.A.2. Matériel biologique

#### Le sang

Le sang est prélevé par ponction veineuse au pli du coude dans des tubes contenant de l'héparine sur des sujets sains.

#### Les PBMC

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été préparées à partir du sang humain prélevé chez des donneurs sains (n= 8).

### **La souche *Pseudomonas aleovarans* ATCC 8062**

Il s'agit de la souche utilisée pour le dosage des nitrites totaux par la méthode de Griess modifiée, c'est une bactérie caractérisée par la propriété biochimique nitrate réductase. Elle nous a été aimablement fournie par Mr. Drapier.

### **Le milieu de culture**

Il s'agit du RPMI 1640, ce milieu est enrichie par addition de 5% de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté à +56°C pendant 30 minutes et complémenté avec 1mg/ml de glutamine, 300mg/ml de Tricine pH 7,4 et 2mM d'un mélange d'antibiotiques (40mg/ml de Gentalline et 200 000 unités/l de Penicilline, il est destiné à la culture des PBMC.

### **Le liquide hydatique**

Utilisé pour la stimulation des PBMC de sujets sains et le dosage de la concentration en protéines, le liquide hydatique du foie (LHF) est obtenu par aspiration à partir du kyste hydatique du foie, préalablement récupéré par ponction après intervention chirurgicale chez un patient atteint d'hydatidose.

Le liquide hydatique du poumon (LHP), servant au dosage de la concentration en protéines, est lui aussi obtenu par aspiration, à partir du kyste hydatique du poumon préalablement récupéré par ponction.

### **L'extrait des pépins de raisin**

L'extrait de pépin de raisin possède une structure moléculaire similaire aux composantes retrouvées dans la famille des bioflavonoïdes. Le proanthocyanidine, principe actif de l'extrait de pépin de raisin est hydrosoluble, il se fixe aux membranes cellulaires et est un puissant antioxydant. Les extraits des pépins de raisin contiennent également des polyphénols de taille moléculaire réduite appelés procyanidines oligomériques. Ils possèdent aussi des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires confirmées par de nombreuses études *in vitro*.



## **II.B. Méthodes**

### **II.B.1. Test de viabilité des protoscolex**

La viabilité des protoscolex est déterminée par observation au microscope à phase inversée de leur mobilité et par test d'exclusion des colorants vitaux : l'éosine à 0,1%. Les scolex vivants apparaissent réfringents au microscope photonique, alors que les scolex morts adopteront la couleur de l'éosine.

### **II.B.2. Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD**

#### **II.B.2.1. Principe**

C'est une technique colorimétrique basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie lors de sa fixation aux protéines. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique simple et très sensible.

#### **II.B.2.2. Préparation de la courbe étalon**

Une gamme étalon est réalisée dans des tubes à partir de concentrations croissantes d'une solution de BSA 0,1% à des doses allant de 0 à 100 µl et du PBS à un pH de 7,2 pour diluer et réajuster le volume à 100µl. 3ml du réactif de Bradford sont ajoutés à chacun des tubes pour un volume final de 3100µl. L'ensemble des tubes est mis à l'obscurité pendant 5 minutes pour permettre à la réaction chromogène de se produire. Après ça, le contenu de chaque tube est transvasé dans une cuve à spectrophotomètre, la lecture des DO s'effectue à une longueur d'onde de 595nm.

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Préparation de la courbe étalon pour le dosage des protéines.

N° tube	BSA (µl)	PBS (µl)	Bradford (ml)	BSA (µg/µl)
0	0	100	3	0,00
1	5	95	3	0,05
2	10	90	3	0,10
3	15	85	3	0,15
4	20	80	3	0,20
5	25	75	3	0,25
6	30	70	3	0,30
7	35	65	3	0,35
8	40	60	3	0,40
9	45	55	3	0,45
10	50	50	3	0,50

### II.B.2.3. Traçage de la courbe étalon

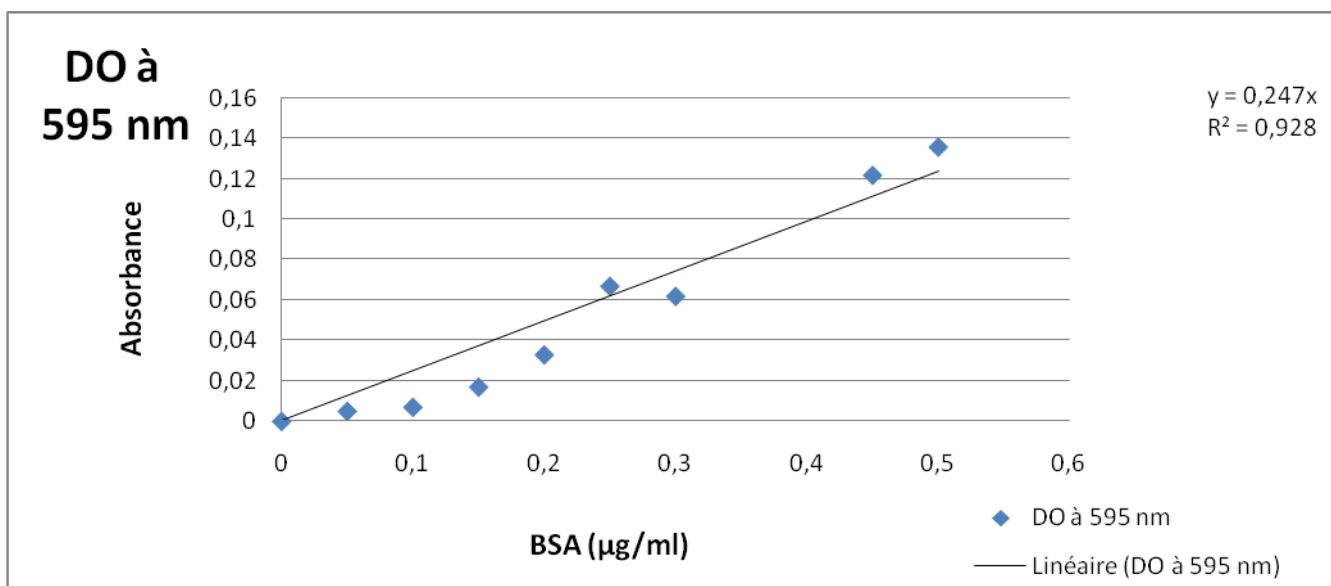


Figure 22 : Courbe étalon pour le dosage des protéines du liquide hydatique.

## II.B.2.4. Mode opératoire

100 $\mu$ l de l'échantillon du liquide LHF sont rajoutés à 3ml du réactif de Bradford puis mis par la suite en obscurité pendant 05minutes.

De la même manière, une lecture de la DO est effectuée à 595nm.

La concentration protéique est déterminée par extrapolation de la valeur de la DO sur la courbe étalon  $DO=f([BSA])$  précédemment tracée.

## II.B.3. Isolement des PBMC

### II.B.3.1. Principe

La séparation des PBMC repose sur une séparation des cellules sanguines selon un gradient de densité sur milieu liquide, le ficoll-hypaque dont la densité est supérieur à celle des lymphocytes et des mononuclées qui forment un anneau juste à l'interface du ficoll-hypaque, alors que les globules rouges et les polynucléaires dont la densité est supérieur à celle du ficoll forment le culot (Figure 23).

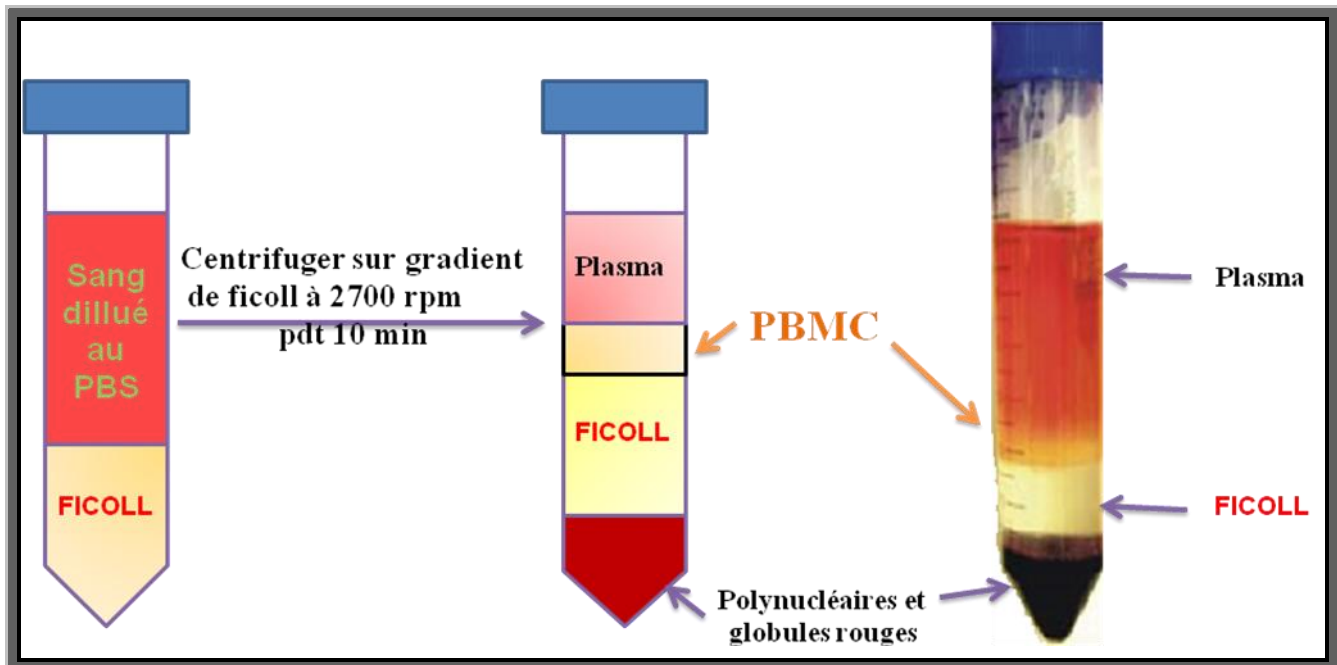


Figure 23 : Séparation des différents composants du sang.

### **II.B.3.2. Mode opératoire**

Au laboratoire dans des conditions stériles, le sang prélevé à partir de sujets sains est dilué dans du PBS stérile (volume à volume). Le sang dilué est délicatement versé dans un tube Falcon contenant un volume de ficoll-hypaque correspondant au tiers du volume total, puis centrifugé pendant 10 minutes à 2700 rpm.

Les PBMC formant un anneau blanc à l'interface sont collectées, lavées 2 fois dans du PBS stérile, à 2700 rpm pendant 10 minutes. Le culot récupéré contenant les PBMC sera suspendu dans du RPMI et les cellules seront comptées au microscope optique.

### **Evaluation de la préparation**

#### **Test de viabilité au bleu de trypan**

##### **Principe**

Le principe est basé sur la différence de perméabilité vis-à-vis d'un colorant vital (bleu de Trypan). Ce dernier pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes ayant perdu leur fonction membranaire alors que les cellules vivantes l'excluent et apparaissent réfringentes sous le microscope optique.

##### **Mode opératoire**

La suspension cellulaire est diluée dans du bleu de trypan (0,2%) puis déposée sur cellule de Malassez. L'observation s'effectue au microscope photonique. Le dénombrement est effectué sur cinq champs choisis au hasard, la moyenne des cellules est déterminée selon la formule suivante :

**Densité cellulaire [cellules/ml] =  $2,5 \times 10^5 \times M/d$ .**

**M** : Moyenne de cellules pour les cinq champs.

**d** : Facteur de dilution.

#### **II.B.3.4. Mise en culture et induction des PBMC**

Après leur mise en culture dans du RPMI-1640, une série d'expérience est effectuée sur les PBMC de sujets sains :

1/- Les PBMC des sujets sains sont exposés à des concentrations croissantes de l'extrait de pépins de raisin (5, 10, 20, 50, 100) dans des microplaques de 96 puits à fonds ronds. Tout en laissant un témoin pour chaque échantillon, les cellules sont stimulées avec du LHF 3 heures après l'induction à l'extrait des pépins de raisin.

2/- Les PBMC des sujets sains sont exposés à des doses croissantes (5, 10, 20, 50, 100µg/ml) de l'extrait des pépins de raisin suivi immédiatement d'une stimulation antigénique au LHF.

3/- Les PBMC des sujets sains sont stimulés au LHF puis exposés après 20 heures d'incubation à des doses croissantes (5, 10, 20, 50, 100µg/ml) de l'extrait des pépins de raisin.

Après une incubation de 20heures en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, les suspensions cellulaires seront récupérées et centrifugées à 12000 rpm pendant 3 minutes. Les surnageants seront conservés à (- 45°C) en vue des dosages ultérieurs du monoxyde d'azote, les culots seront observés au microscope photonique.

#### **II.B.4. Dosage des nitrites totaux par la méthode de Griess modifiée**

La production du NO dans les surnageants de culture des PBMC stimulées est estimée par dosage des produits de son oxydation en nitrites et nitrates. La concentration des nitrites totaux (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) est déterminée par la méthode de Griess modifiée.

##### **II.B.4.1. Principe**

Le réactif de Griess révèle la présence des nitrites par une réaction de diazotation qui aboutit à la formation d'un chromophore absorbant à 543 nm.

Le NO étant un composé instable, sa mesure se fait par l'intermédiaire de l'un de ses dérivés qui est le nitrite à partir des surnageants des PBMC induits au LHF et traités à l'extrait des pépins de raisin.

Le dosage s'effectue par réduction des nitrates en nitrites sous l'action de la nitrate réductase présente chez la souche *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062).

#### II.B.4.2. Préparation de la souche

La préparation de la suspension bactérienne s'effectue par l'ensemencement de la souche en phase exponentielle sur gélose nutritive. Après une nuit d'incubation sous agitation à 37°C, des colonies sont prélevées et suspendues dans un bouillon nutritif. Après une nuit d'incubation sous agitation à 37°C, la suspension est centrifugée à 1500 rpm pendant 20 min à +4°C, puis lavée 3fois au PBS stérile à pH 7,4. Le culot est remis en suspension dans du PBS stérile à raison de 1g/10ml. La suspension bactérienne peut être conservée à (- 45°C) en présence d'un agent cryoprotecteur qui est le glycérol à 10%.

#### II.B.4.3. Mode opératoire

50µl de l'échantillon est mis en incubation pendant 90 min à 37°C en présence de 25µl de la suspension bactérienne dans 25µl de PBS stérile pour la réduction des nitrates en nitrites. A la fin de l'incubation, une centrifugation à 2000 rpm pendant 5minutes est réalisée pour séparer les bactéries du surnageant. 100µl de celui-ci sont rajoutés à 100µl des réactifs de Griess (50µl de Griess A + 50µl Griess B), puis une dilution est réalisée dans 800µl d'eau distillée. L'incubation s'effectue à l'obscurité pendant 20min à température ambiante avant la lecture de la DO à 543 nm.

La détermination de la concentration des nitrites se fait par extrapolation de la valeur de DO obtenue sur la courbe étalon  $DO=f([NaNO_2])$  (Figure 24).

#### II.B.4.4. Courbe d'étalonnage des nitrites

Une gamme étalon est préparée à partir des volumes croissants des nitrites de sodium sur un intervalle croissant allant de 0 à 20µl, puis ce volume est ajusté à 100µl par l'ajout de PBS stérile. 50µl de chacun des réactifs de Griess sont additionnés à la solution puis le volume est complété à 1ml avec de l'eau distillée. L'incubation s'effectue à l'obscurité à température ambiante pendant 20min suivi de la lecture de DO à une longueur d'onde de 543 nm (Tableau V).

Tableau V : préparation de la courbe étalon pour le dosage des nitrites.

Numéro	PBS (µl)	Na NO <sub>2</sub> (µM)	Griess A (µl)	Griess B (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)
1	100	00	50	50	800
2	98	02	50	50	800
3	96	04	50	50	800
4	94	06	50	50	800
5	92	08	50	50	800
6	90	10	50	50	800
7	88	12	50	50	800
8	86	14	50	50	800
9	84	16	50	50	800
10	82	18	50	50	800
11	80	20	50	50	800

### II.B.4.5. Traçage de la courbe étalon DO=f ([NaNO<sub>2</sub>]).

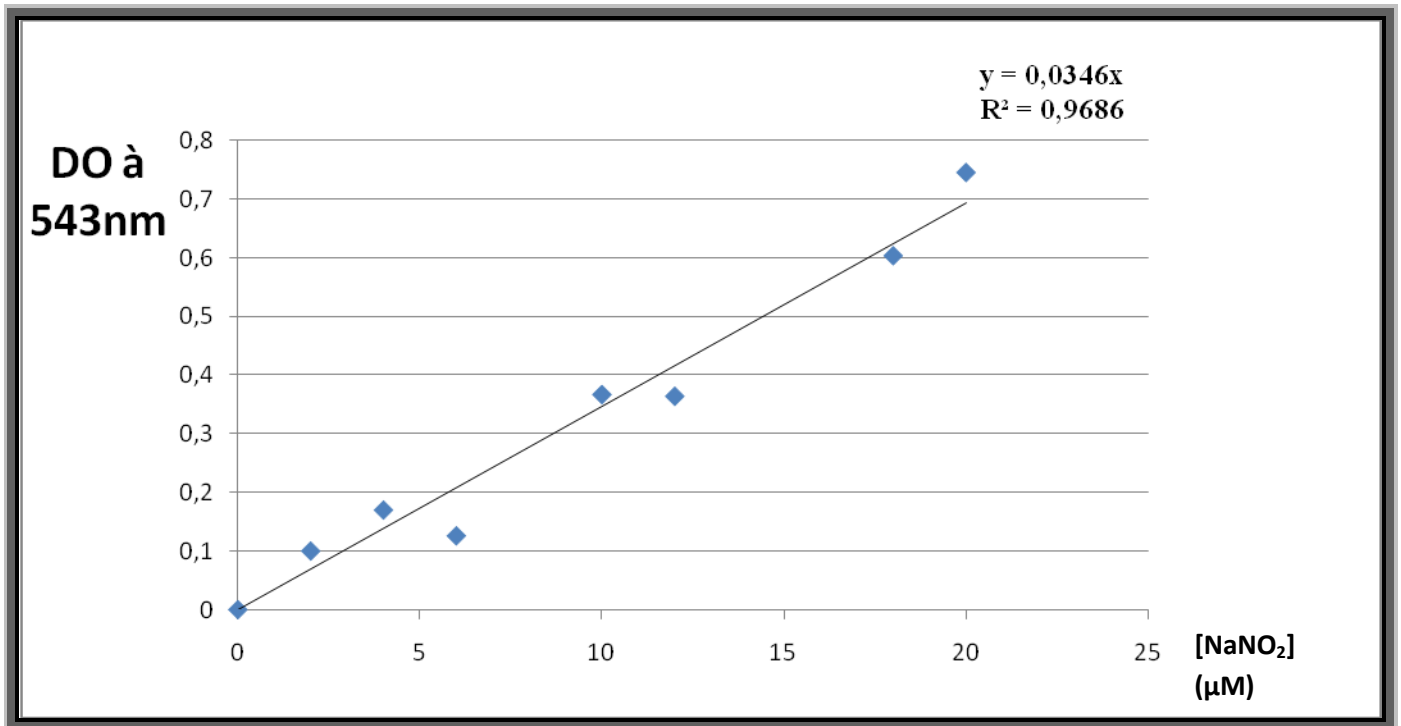


Figure 24 : Courbe étalon du dosage des nitrites par la méthode de Griess modifiée.

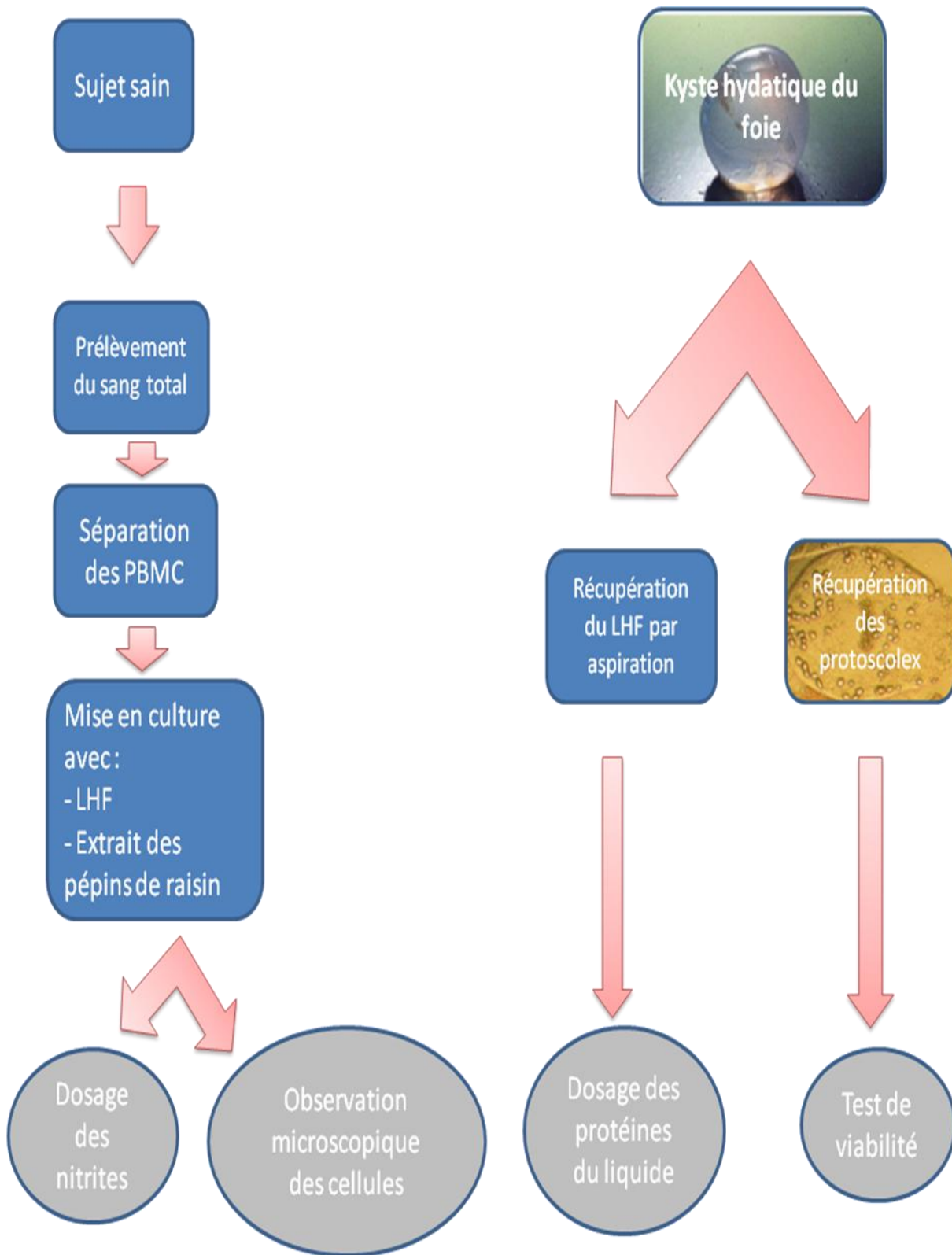


Figure 25: Démarche expérimentale.



# RESULTATS ET DISCUSSIONS

### **III. Résultats et discussion**

#### **III.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

Le dosage des protéines des liquides hydatiques humains montre bien que la concentration protéique totale contenu dans le LHF (1,16mg/ml) est supérieur à celle du LHP (0,60mg/ml).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Vidor et *al.* (1986), qui montrent que les protéines totales sont en très faible quantité dans le liquide hydatique humain.

Cette richesse en protéines des kystes hépatiques semble être liée à la perméabilité des kystes (Vidor et *al.*, 1986). Ainsi, il a été montré qu'une partie des protéines retrouvées dans le liquide hydatique est d'origine parasitaire et une autre partie provient de l'hôte.

#### **III.2. Test de viabilité des protoscolex**

Le test de viabilité est réalisé avec un colorant vital, l'éosine à 0,1%. Ce colorant a la propriété de diffuser à travers la membrane du protoscolex mort qui devient ainsi coloré en orange (Figure 26). Par contre, lorsque le protoscolex est vivant, sa membrane est imperméable au colorant et apparaît réfringente au microscope photonique. De même, les protoscolex vivants sont mobiles et présentent une intégrité et une régularité de la structure membranaire et de la double couronne de crochets (Figure 27 et 28) par rapport au protoscolex morts qui sont immobiles et montrent une altération de la double couronne de crochets et une irrégularité de la membrane.

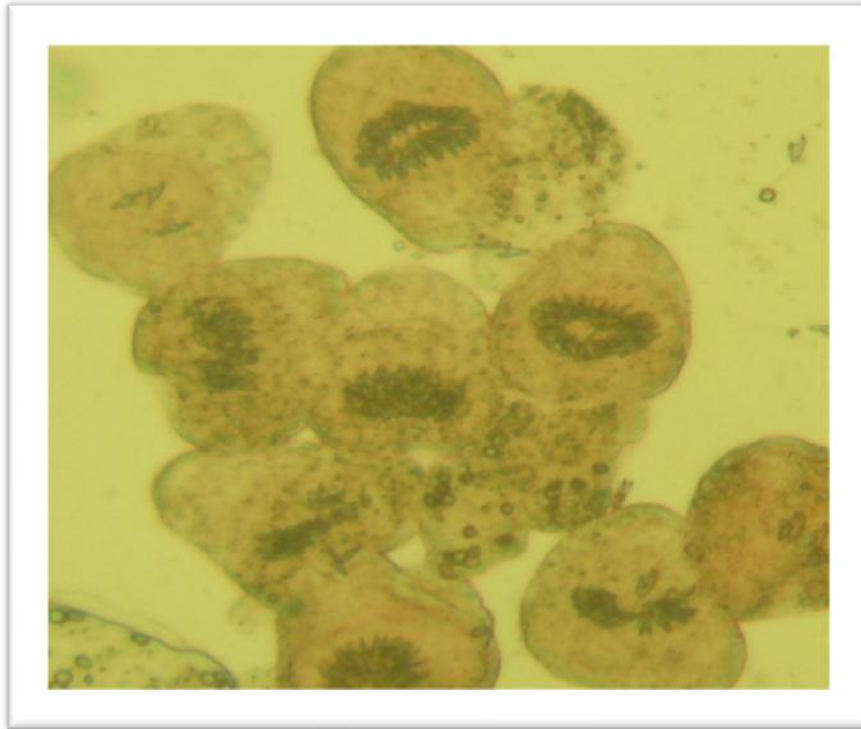


Figure 26 : Protoscolex morts (G×20).

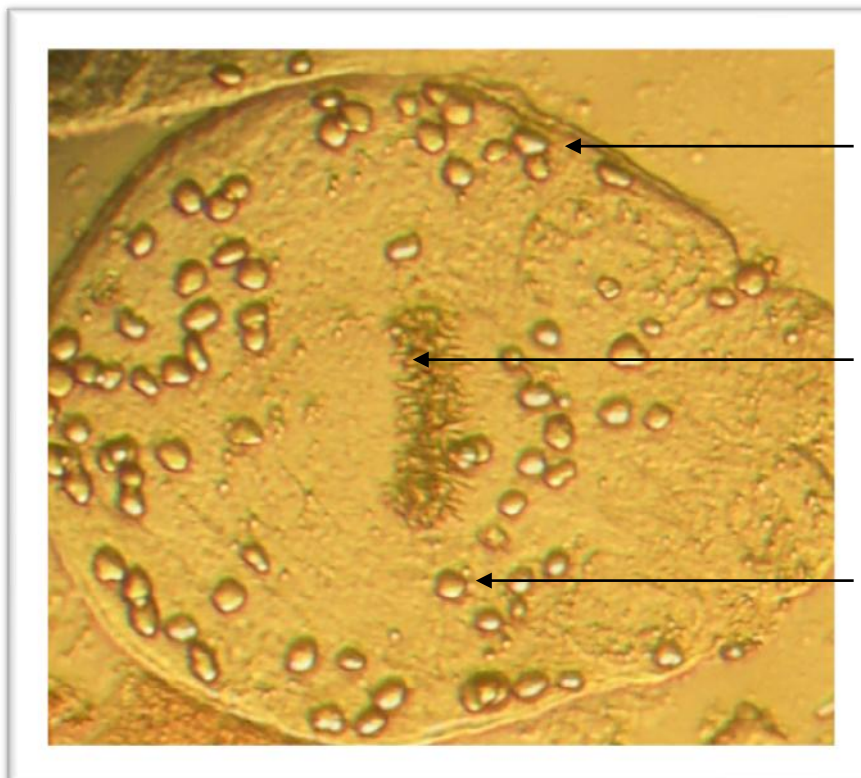


Figure 27: Protoscolex vivant invaginé (G×40).

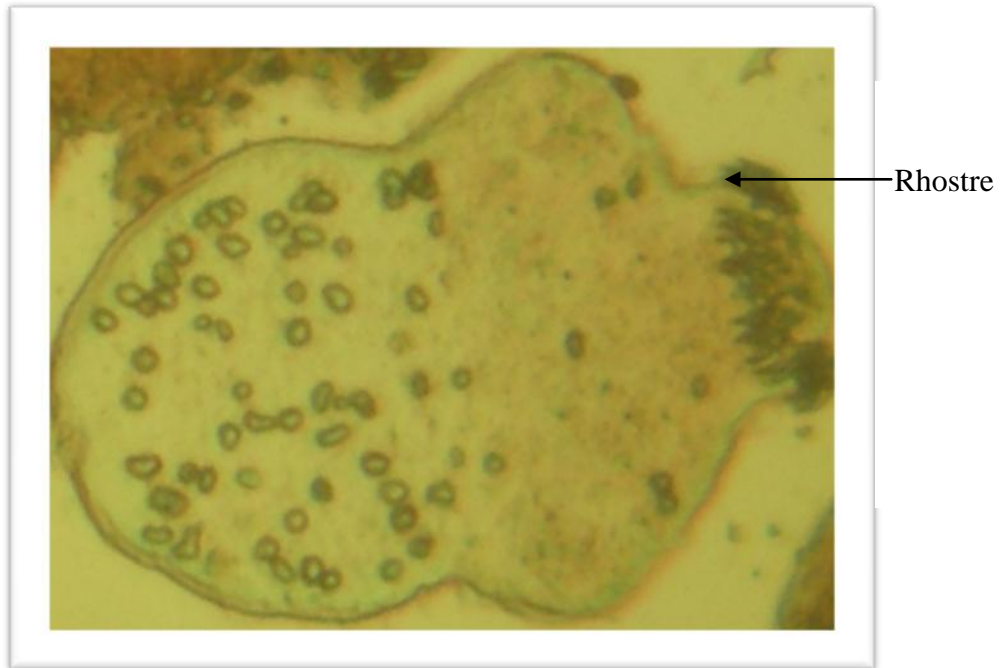


Figure 28: Protoscolex vivant dévaginé (G×40).

### III.3. Dosage des nitrites dans les cultures des PBMC induites par les antigènes et la molécule anti-inflammatoire :

#### Production des nitrites totaux

L'étude *in vitro* a porté essentiellement sur les PBMC des sujets sains induits par LHF et à l'extrait des pépins de raisin avant et après stimulation au LHF.

Après 20 heures d'incubation à 37°C, à 5% de CO<sub>2</sub>, les différentes cultures sont récupérées puis centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants ont été utilisés pour doser le NO par la méthode de Griess, alors que les culots ont été analysés au microscope photonique afin d'évaluer la prolifération cellulaire.

La stimulation antigénique des PBMC par le LHF montre un état d'activation et de multiplication des cellules caractérisé par une augmentation de la densité, de la taille des cellules et un virage du milieu de culture lors de l'addition de l'effecteur antigénique (Figure 31). Les résultats du dosage du NO dans les surnageants de culture indiquent une production substantielle par rapport au PBMC des sujets sains non stimulés (Figure 29), ceci suggère l'implication du NO dans la réponse anti-hydrique. Nos résultats corroborent avec ceux de Touil et *al.* (1998), qui ont montré l'implication du NO dans le mécanisme de défense mis en jeu par l'hôte au cours de l'échinococcose humaine.

La production du NO a été révélée dans le cadre de parasitoses à développement intracellulaire telles que *Plasmodium falciparum* (Anstey et al, 1996), *leishmania donovani*, *leishmania major*. En effet, la quantité de NO produite augmente parallèlement à une hausse de l'activité antiparasitaire. D'autres parasitoses notamment celles causées par *trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondi* sont également associées à l'expression de la NOS II (Nussler et al, 1994 ; Riches et al, 1998 ; Das et al, 2001).

Les taux élevés de NO retrouvés chez les sujets sains induits au LHF seraient dus à la régulation positive de la NOSII sous l'action de l'IFN- $\gamma$  et de la TNF- $\alpha$  produite par le système monocyte/macrophage.

De nombreux travaux ont été menés dans ce sens dont ceux de Kleinert et *al* (2003), qui ont montré que les inducteurs de la NOS II les plus fréquents sont des cytokines inflammatoires (IL1 $\beta$ , INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), les prostaglandines (PGE2) et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif.

Drapier (1997) a montré à son tour que la NOS II est inductible dans les macrophages murins par les LPS et certaines cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1. Elle génère de grandes quantités de NO.

La production élevée du NO serait donc liée à l'activité d'une NOS II inductible (iNOS) présente dans les macrophages. Cette isoforme aurait alors un rôle clés dans la cytotoxicité médiée par les macrophages en produisant du NO en réponse à un stimulus.

L'apport exogène de l'extrait des pépins de raisin (5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml) aux cultures des PBMC avec le LHF a montré une diminution significative du taux du NO (Figure 29), ce qui suggère que cette molécule induit une régulation négative sur la NOS II.

Au microscope, les cellules ont une forme arrondie mais apparaissent plus petites, la prolifération est moins dense que pour le témoin induit au LHF (Figures 32, 33 et 34).

La diminution des taux du NO lors de l'ajout de la molécule à des concentrations de 5, 10 et 20µg/ml serait associée à une régulation négative de la NOSII par l'extrait des pépins de raisin qui activerait la voie Th2 productrice de l'IL-10 et l'IL-4. En effet, il a été montré par Drapier et al (1997) que les cytokines de la voie Th2 à savoir l'IL-4 et l'IL-10, possèdent un effet inhibiteur sur la iNOS.

De même, Kleinert et al (2003) ont montré que les inhibiteurs de la production du NO sont des cytokines, anti-inflammatoires, telles que l'IL4, l'IL10, l'IL13, le TGFβ et les corticoïdes qui suppriment l'expression de l'iNOS à un stade transcriptionnel ou post-transcriptionnel, cela se traduit par la réduction de la production du NO par les macrophages.

D'autres études menées par Gonzalez et *al.*, ont montré de l'extrait de *Polypodium leucotomos* avait un effet modulateur sur la balance Th1/ TH2 *in vitro*. Ainsi, cette molécule phytothérapeutique inhibe partiellement les cytokines Th1 (IL-2, IFN-γ et TNF-α) après stimulation des PBMC, contrairement aux cytokines Th2 qui ont significativement augmentés. Ce qui explique son rôle immunosuppresseur et anti-inflammatoire.

A des concentrations de 50 µg/ml et 100 µg/ml de l'extrait des grains de raisin, on observe à nouveau une augmentation du taux du NO (Figure 29), une augmentation qui peut être due à la cytotoxicité provoquée par les fortes doses de l'extrait des pépins de raisin.

Au microscope, les cellules stressées sont dans un état rétrécis et parfois amorphe (Figures 35, 36).

La cytotase des PBMC est due à l'hyper production du NO qui inhiberait la ribonucléotide réductase et la synthèse de l'ADN, l'ADN-alkyltransférase et la réparation de l'ADN, d'où une inhibition de la prolifération cellulaire (Lepoivre et al, 1990).

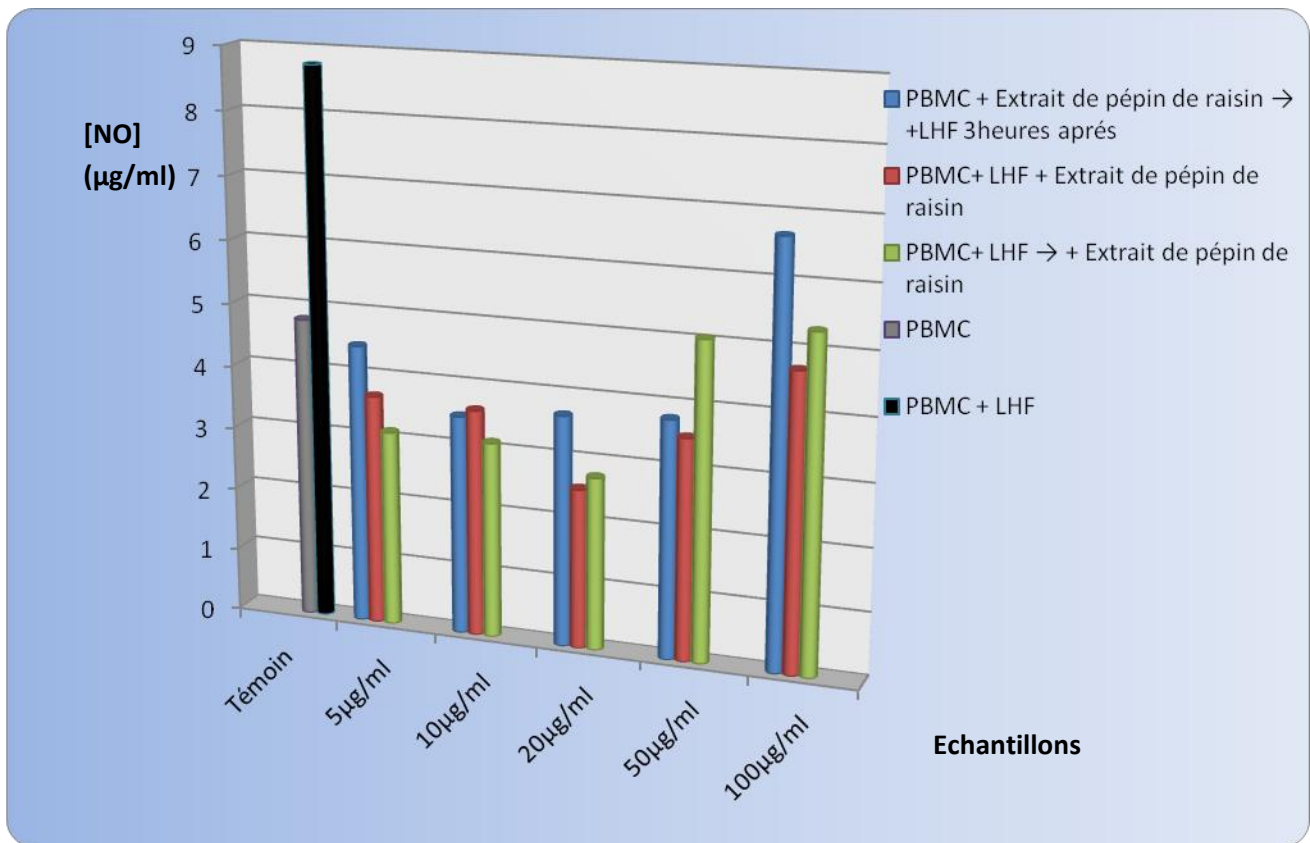


Figure 29 : Résultat du dosage des nitrites/nitrates.

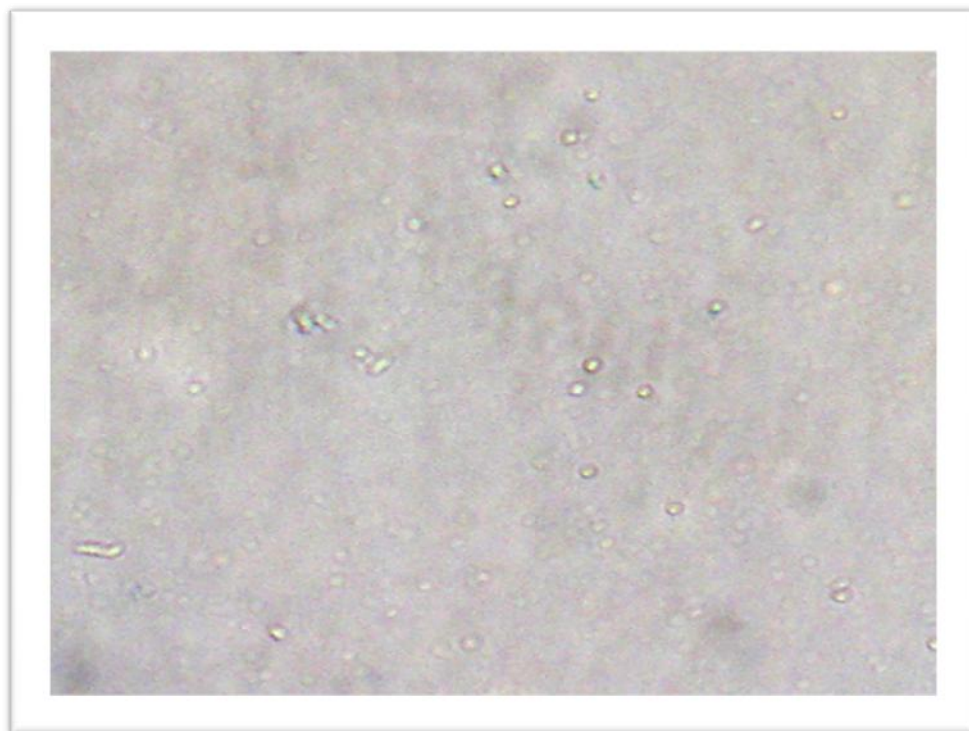


Figure 30 : Témoin PBMC (G×20).

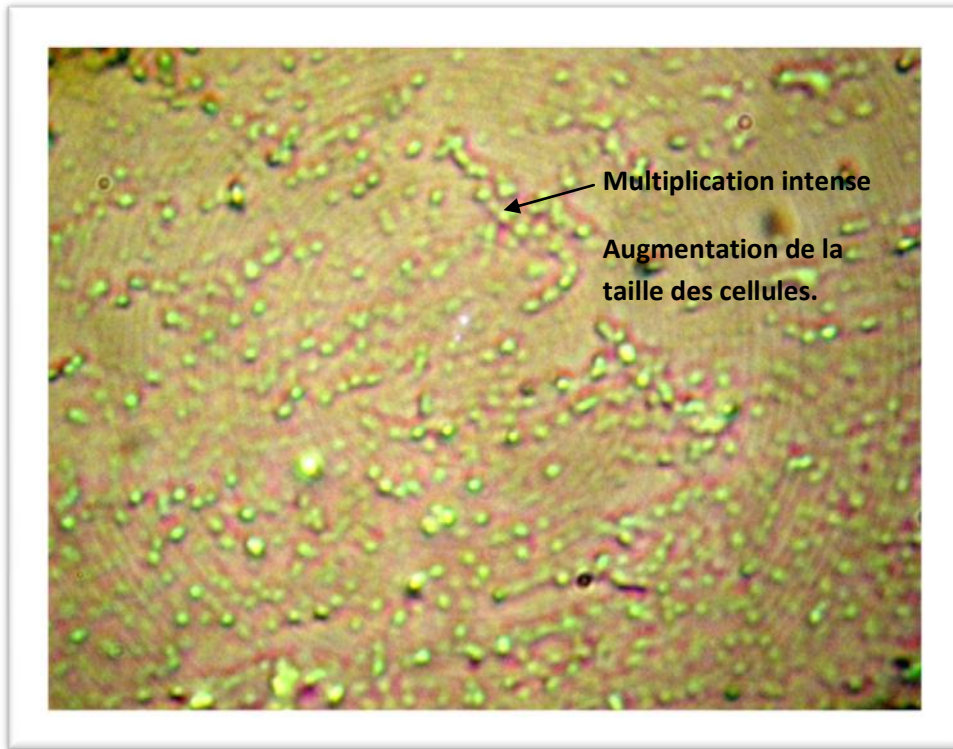


Figure 31 : PBMC + Antigène (G×20).

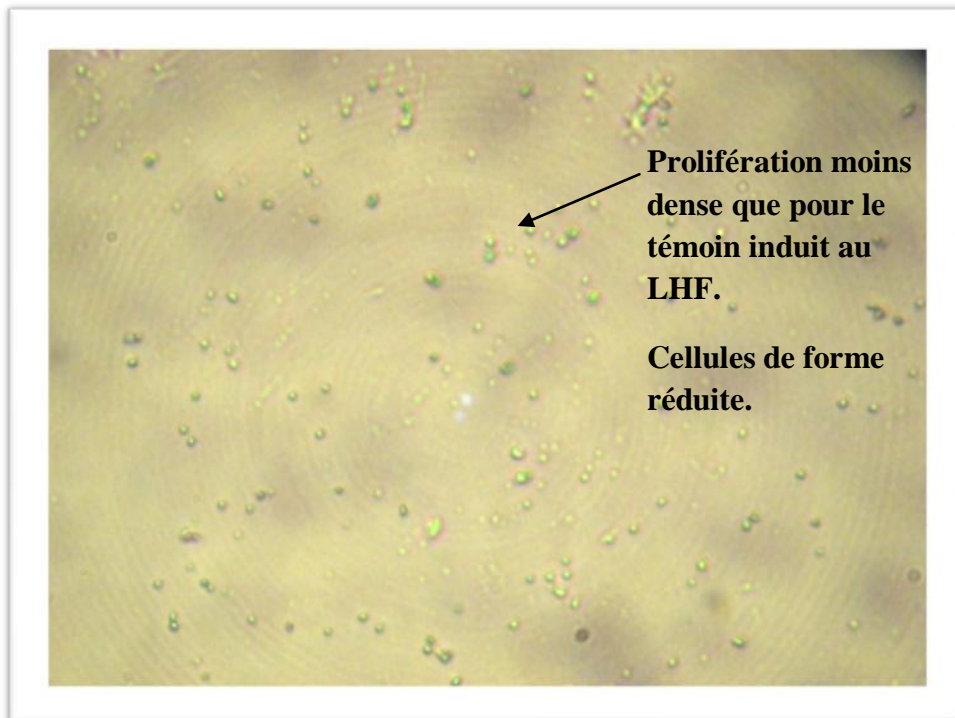


Figure 32 :  
 PBMC +  
 Antigène  
 Extrait des  
 pépins de  
 raisin  
 (5µg/ml)  
 (G×20).

+



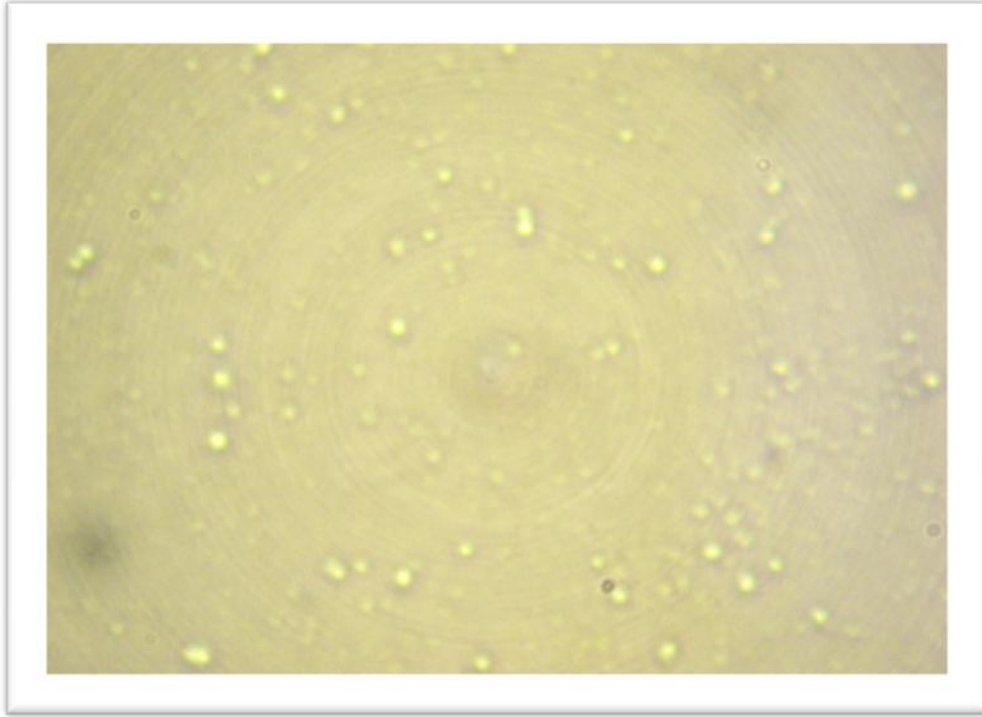


Figure 33 : PBMC + Antigène + Extrait des pépins de raisin (10 $\mu$ g/ml) (G $\times$ 20).

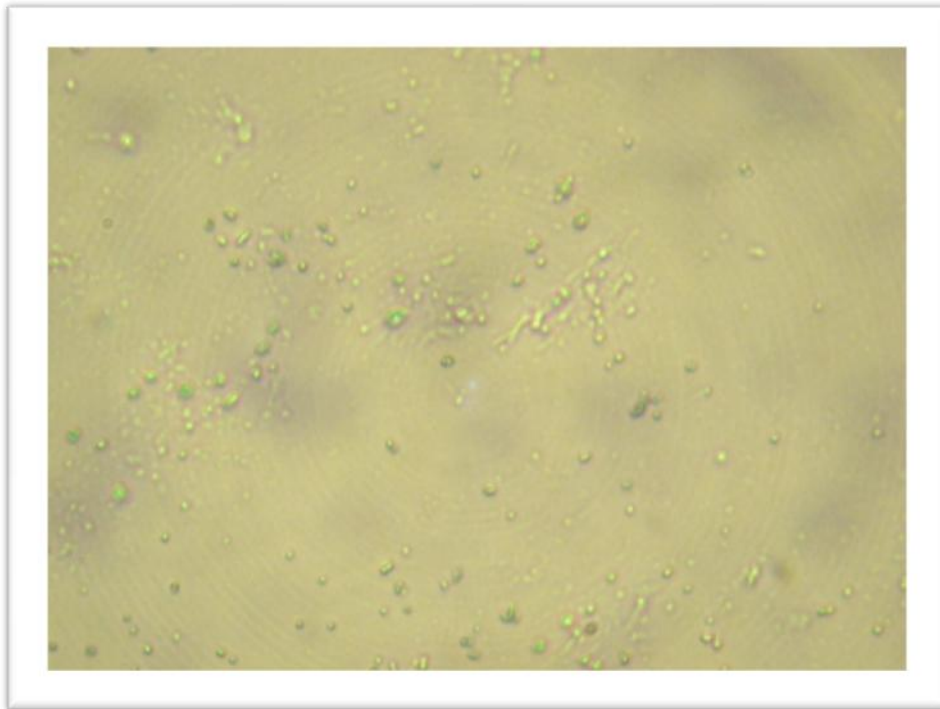


Figure 34 : PBMC + Antigène + Extrait des pépins de raisin (20 $\mu$ g/ml) (G $\times$ 20).



Figure 35 : PBMC + Antigène + Extrait des pépins de raisin (50 $\mu$ g/ml) (G $\times$ 20).

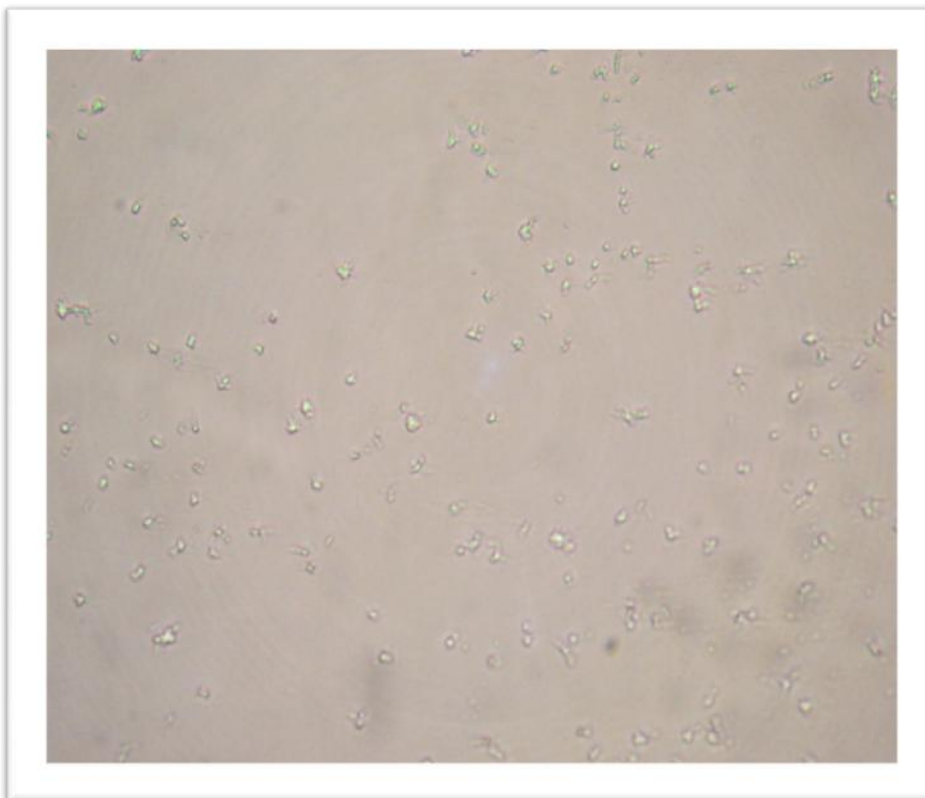


Figure 36 : PBMC + Antigène + Extrait des pépins de raisin (100 $\mu$ g/ml) (G $\times$ 20).

**CONCLUSION**

## CONCLUSION

Notre étude a montré l'action d'une molécule anti-inflammatoire; l'extrait des pépins de raisin, sur la production du NO lors de l'hydatidose.

Les tests *in vitro* ont montré que l'extrait des pépins de raisin aurait un effet modulateur négatif sur la production du NO.

Une corrélation positive a été rapportée entre l'expression de la NOS II et le taux de NO produit. Cette expression serait négativement corrélée par l'effet inhibiteur de l'extrait des pépins de raisin à une dose inférieure à 20 µg/ml.

Cette molécule anti-inflammatoire pourrait avoir un effet souhaitable lors d'une bithérapie anti-hydatique, dans le sens où elle modulerait la sécrétion du NO et éviterait ainsi son effet cytotoxique.

Vu les critères intéressants de cette molécule, il serait judicieux de poursuivre les recherches. Ainsi, l'étude *in vivo* sur modèle animal approprié serait indispensable pour déterminer les doses seuils de l'extrait des pépins de raisin responsables de cet effet modulateur.

L'élargissement de l'échantillonnage et la mise au point d'un protocole thérapeutique utilisant l'extrait des pépins de raisin comme molécule anti-inflammatoire modulatrice, seraient une ouverture vers une thérapie prometteuse.

Il serait aussi intéressant d'étudier la balance NOS II/arginase via cette molécule, en vue de situer son implication dans la modélisation de la réponse immunitaire au cours de l'hydatidose.

Par ailleurs, l'étude de l'index mitotique apporterait plus d'orientation quant à l'action de l'extrait des pépins de raisin sur les cellules.

# BIBLIOGRAPHIE

## -A-

**Albina J.E., Cui S., Mateo R.B., Reichter J.S.** Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1993, **150** : 5080-5. 1993

**ANOFEL : Association des enseignants et des praticiens hospitalier titulaires de parasitologie et mycologie médicale** –Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Masson édition, 2007.

**Arkin M. A., Randal M., Delano W. L., Hyde J., Luong T. N., Oslob J. D., Raphael D. R., Taylor L., Wang J., Wells J. A., Mcdowell R. S., Wells J. A., Brasted A. C.**: *Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface.* Proc.Nat.Acad.Sci.USA, **100**, pp. 1603 (2003)

**Assdullah K., Sterry w., Volk H. D.** (2003). Interleukin-10 Therapy – Review of a Approach. *pharmacological Review*, **55**, 2, pp. 241-269.

## -B-

**Bezzari M., G. Bigaignon, J. Nachega, K. Laasou JF. Gigot, A. Ayadi.** L'hydatidose : Echinococcose d'imporatation en Belgique. 1999 - **118**, 64-71

**Bencherau J.**, The cytokines club. Rev Biofutur, 21-28.

**Bogdan et Nathan**, 1998 ;Modulation of macrophages functions by TGF- $\beta$ , IL-4 and IL-10. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **685**: 713-739.

**Boucher JL, Custot J, Vadon S, et al.** N-omega-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; **203** : 1614-21.

**Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E., Garcia, K. C.** (2003) Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6 Alpha-Receptor/Gp130 Complex. *Science*, **300**, p.2101

**Burgler S., Ouaked N., Bassin C., Basinski T., Mantel P., Siegmund K., Meyer N., Akdis C., Schmidt-Weber C.**

Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 123, Issue 3, Pages 588-595.

## -C-

**Cabrera M., Rodriguez O., Monslave I., Tovar R. Hagel I., 2003.** variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of american cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. **88**: 145-151.

**Cavaillon J-M.** : *Les cytokines*, Ed. Masson, 2<sup>ème</sup> édition (1996) :1, 406,407.

**Catherine Burteau, Luc Willems, Richard Kettmann.** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2007 **11** (2), 141–150

**Chamekh M.**- << Identification, caractérisation moléculaire et valeur diagnostique d'un épitope protéique immunogène de l'antigène 5 d'*Echinococcus granulosus*>> .Thèse pour l'obtention du doctorat d'état. Université de Lille 1.

**Chang CI, Liao JC, Kuo L.** Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 43:H342-8.

**Clancy R.M., Leszezynska-PPiziak J. & Abramson S.B.:** Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 1992 ; **90** : 1116-21.

**Cohen.G** -Les maladies parasitaires,Elsevier Masson,2000, 221 pp.

**Crépel F. et Lamaire G.,** 1995, le monoxyde d'azote. *Med./sci.*, 11, 1639, 1642 .

**-D-**

**Degos F, Benhamou J.** Le traitement des hépatites chroniques. *médecine/sciences* 1990 ; **6** : 117-24

**Devera E.M. ,Shapiro R.A., Nussler A.K., Mudgett J.S., Simmons R.L., Morris S.M., Billiar T.R., Geller D.A.** Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS II) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 1054-1059.

**Didier Fradelizi.** Les cytokines ont 20 ans: de la culture cellulaire aux applications thérapeutiques. *Médecine/sciences* 1996 ; **12** : 447-50

**Drapier J.C.**- Monoxyde d'azote et macrophage. *Path. Biol*, 1997, p 110-114.

**Ducrocq C., Servy C., Cudic M., Blanchard B.,** 2001. Intervention du monoxyde d'azote, NO, et de ses dérivés oxydés, particulièrement chez les mammifères. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* **79(2)** : 95-102.

**Dugas N., Palacios-Calander M., Dugas B., Riveros-Moreno V., Delfraissy J.F., Kolb J.P., Moncada S.,** 1998. Regulation by endogenous interleukin-10 of the expression of nitric oxide synthase induced after ligation of CD23 in human macrophages. *Cytokine* ; **10** : 680-689.

**Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, et al.** Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 660-6.

**-E-**

**Elaoubsi Y.**- << Contribution à l'étude de l'impact socio-économique de l'hydatidose chez l'homme

et les ruminants domestiques dans la province de Khénifra>> thèse pour l'obtention du doctorat vétérinaire, institut agronomique et vétérinaire Hassan 2, juillet 2004.

**-h-**

**Émilie D, Russo-Marie F.** Nouvelles perspectives des recherches sur la polyarthrite rhumatoïde. *médecine/sciences* 1995 ; **11**: 1577-80

**Hibbs J.B. Jr., Tainor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M..** Nitric oxid: a cytooxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, **157**: 87-94.

**Esteve V.** -Développement et santé.n 137, 1998.

**-G-**

**-J-**

**Ghafari Y. et Labarde G.,** 2003, Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines , DESS IST.

**Jaffrey SR, Snyder SH.** PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1996; 274 : 774-7.

**Gharbi H.A.-** Apport de la radiologie dans la maladie hydatique: l'essentiel et le nouveau. Publication 1999.

**James L.S.,** 1995. Role of nitric oxyde in parasitic infections. *Microbiological Reviews.*, **59(4)**: 533-547.

**Goldsby R.A., Kind T.J., Osdborne B.A.** *Les cytokines.* In: Immunologie: le cours de Janis kuby. Editions Duniod, Paris, 2003. ISBN : 2-10-007396-6.

**-K-**

**Golvan Y.J.** - Eléments de Parasitologie médicale. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 4ème éd., 1983,571 pp.

**Kharebov A., Kahmias J. & El On J.** – Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *Echinococcus granulosus* purified antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1997,p 619-625.

**Gottstein B.** – Molecular and immunological diagnostic of *Echinococcosis*. *Clinical microbiology review.*

**Kolb J.P., 2001.** Rôle pro et anti-apoptotique du monoxyde d'azote, **NO**. *Life sciences* ; **324** : 413-424.



**Kubes P.** : Ischemia-reperfusion in feline small intestine : a role for nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 1993. **264** : G143-9.

**-L-**

**Laamrani et al.**- Lutte contre l'hydatidose/echinococcose. Publication 2007, p 11.

**Lacombe C, Mayeux P.** L'érythropoïétine. *médecine/sciences* 1995 ; 11 : 947-55

**Lariviere M.** – Parasitologie médicale . Ellipses édition, 1987, 172 pp.

**Lepoivre M, Chenais B, Yapo A, Lemaire G, Thelander L, Tenu JP.** Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitritegenerating pathway in adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 14143-9.

**Li D.K., Zhao G.J., Paty D.W.**(2001). Randomised controlled trial of interferon-beta-la in secondary progressive MS : MRI results. *Neurology*

**Liew F.Y., Li Y., Moss D., Parkinson C., Rogers M.V., Moncada S., 1991.** resistance to leishmania major infection correlates with induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur. J. immunol.*, **21**: 3009-3014.

**Lightowers M.W., D.YLiu A., Haralambous A. and Rickard M.D.**- Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol.bioche;.parasitol* , 1989, p 37.

**Liu ZB, Yang XH.** [Effects of different manipulation methods of acupuncture at usanli (ST 36) on signal transduction pathway of STAT5 in human PBMC]. *Zhongguo Zhen Jiu.* 2006 Feb; **26(2)**:120-2.

**Louvain MED.**, 1999, 64-71pp.

**-M-**

**Male.** 2002, Immunologie, aide mémoire illustré. Edition De Boeck université.3ème Edition : 4-7.

**Meuer SC, Dumann H, Meyer zum Büschenfelde KH, Köhler H.** Low dose IL-2 induces systemic immune response against HBsAg in immunodeficient non-responders to hepatitis B vaccination. *Lancet* 1989; **1**: 15-7

**Mezioug D.:** Etude de la production in vivo et in vitro des cytokines marqueurs de la voie Th1et Th2 au cours de l'hydatidose, 2002, Thèse de magister en Biochimie-Immunologie (FSB, USTHB). 04/2002-M/S.N.

**Mezioug D., Ait Aissa S., Bouhaded A., Touil-Boukoffa C.** – Cytokines Th1/Th2 et monoxyde d'azote dans l'hydatidose, 2004, *J.A.M*, **13(2)**, p 66-72.

**Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.:** Nitric oxide: physiology, pathophysiology & pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 1991. **43**: 109-42.

**-O-**

**Moncada S.**, 1992. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acad. Physiol. Scand.*, **145**: 201-227.

**O'Garra A.** Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998 ; **8** : 275-83

**Moncada S. & Higgs A., 1995.** Molecular mechanisms and strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*, **9**: 1319-1330.

**Oriol R et al.**, Purification of lipoprotein antigens of echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. *American journal of tropical medicine and hygiene*, (1971), 20:569-574.

**-N-**

**Noriko Kodama, Yukihito Murata, Hiroaki Nanba.** *Journal of Medicinal Food*. June 2004, 7(2): 141-145. Administration of a Polysaccharide from *Grifola frondosa* Stimulates Immune Function of Normal Mice.

**Ortona E., Rigano R, Buttari B :** An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Tropica* 2003, p 85.

**Nozais JP, Datry A, Danis M.** *Traité de parasitologie médicale*. Paris : Editions Pradel, 1996.

**-P-**

**Nussler A.K., Renia L., Paschetto V., Miltgen F., Matile H. & Mazier D.,** 1992. 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.

**Petavy-** novel vaccines for treating or preventing infections by parasites of the family taenidae and in particular of the genus Echinococcus, 2007.

**-R-**

**Rapport de l'OMS-** Lutte contre l'hydatidose dans les pays méditerranéens, 1980, 5 pp.

**Rigano R., Profumo E., Bruschi F., Carulli G., Azzara A., Loppolo S., Buttari B., Ortona E., Margutti P., Teggi A. et Siracusano A.** – Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun.* p 288-296.

**Ripert C.**- Epidémiologie des maladies parasitaires. Helminthoses. Tome II. 3<sup>ème</sup> Ed : EM

international, 1998, p 277-309.

**Romagnani S.** – Lymphokine production by human T cells in disease states, *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, **12**: 227-257

**Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C, Reichert CM.** Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and

recombinant IL-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 ; **313** : 1485-92

**Rousset J.J.** – les maladies parasitaires. Masson édition, 1995, 90-93 pp.

**Pryor W.A., Squadrito G.L.**; The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. Physiol.* 1995. **286**: L699-722.

**Saini R., Patel S., Saluja R., Sahasrabudhe A.A., Singh M.P., Habib S., Bajpai V.K.,**

**Dishit M.**, 2006. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular and biochemical studies. *J. Leukoc. Biol.* **79**: 512-528.

**Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA.** TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**:247–54.

**Sen GC,** The Interferons cytokines and infectious diseases, 1997. 199-204, Ed: Daniel, G. Remick.

**Sennequier N, Vadon-Le-Goff S;** biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): Mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/sciences*, 1998. **14**, 1185-95.

**Sherman M.P., Loro M.L., Wong V.S., Taskin D.P.;** Cytokine and pneumocystis carinii-induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J. Protozool.*, 1991. **38**: S234-6.

**Siracusano A., Ortona E., Rigano R.**- Molecular and cellular tool in human cystic echinococcosis. *Current drug Endocrine and metabolic disorders*, p 235-245.

**Starr R, Hilton DJ.** Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *BioEssays*, 1999; **21**: 47-52.

**Steinman L.** A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Med* 2007; **13**:139–45.

**Stockinger B, Veldhoen M.** Differentiation and function of TH17 T cells. *Cur Opin*

*Immunol* 2007;**19**:281–6

**Stuehr D.J. et al., 1985, Marletta M.A. (1985)**  
Mammalian nitrate biosynthesis ; mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985 ; **82** : 7738-42.

**-T-**

**Tato C.M., O'Shea J.J.** What does it mean to be just 17? *Nature* 2006; 441:166–8.

**Tenu J.P.,** NO synthases constitutives et NO inductibles chez les mammifères. *Forum pluridisciplinaire du club NO.* 1993, Chimie et biochimie.

**Théze J.,** The cytokine network and immune functions. Oxford University Press, Inc, New York, 1999, 373.

**Thiemermann C.**Inhibition des NO synthases dans la défaillance circulatoire, effet bénéfique ou délétère. *Médecine/sciences*, 1995, **11**, 1643-51.

**Touil-Boukoffa,** production et purification de l'INF $\gamma$  humain, 1996. , Thèse de magister (FSB, USTHB)

**Touil-Boukoffa C., Sancéau J., Taibi B., Wietzerbin J.** Relationship among circulating interféron, tumornecrosis factor $\alpha$  and interleukin 6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *J. interferon and cytokine res*, 1997, **17**: 211-217.

**Touil-Boukoffa C. –** Etude du système interféron et cytokines au cours de l'hydatidose humaine. Implication de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et du NO dans la réponse immunitaire anti-anigène 5. Thèse de doctorat en sciences/ bioch. Immunopat.1998. FSB-USTHB.

**-V-**

**Varet B.** L'érythropoïétine, quel avenir ? *médecine/sciences* 1995 ; **11** : 943-5

**Vidor, E; Piens, M.A; Abbas, M et Pettavy, A.F (1986).** Biochimie du liquide hydatique, influence de la localisationsur la perméabilité des kystes. *Ann Parasitol. Hum. Comp* ; 61 (3): 330-340.

**Villeneuve A. –** Les zoonoses parasitaires, l'infection chez l'homme et chez les animaux, 2003, PUM edition,186 pp.

**Vuitton DA, Seillès E, Saas P.** Immunologie. Rueil-Malmaison : Pradel, coll. Simplissime!, 2009, Wolters Kluwer France.

**-W-**

**Wei C-C, Crane B.R., Stuehr D.J.**  
Tetrahydrobiopterin radical enzymologie. Chem. Rev. 2003, **103**, 2365-2383.

**-Z-**

**Zdanov A., schalk-hihi C., Wlodawer A.:** *Crystal Structure of human Interleukin-10 at 1.6 Å resolution and a Model of a Complex with its Soluble Receptor Protein* sci. **5** pp. 1955 (1996).

**Zhang W., LI J. and Mc Manus D.P.** - Concepts in Immunology and diagnosis of hydatid disease. Clinical microbiology reviews, 2003, p 18-36.

## ANNEXES

### Préparation des solutions de laboratoire

#### Tampon phosphate (PBS)

NaCl.....	8 g
Kcl.....	0.2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g
Eau distillée .....	qsp 1000 ml

#### Gel agarose dans l'eau distillée

Agarose.....	1g
Eau distillée .....	qsp 1000ml

#### Réactif de Bradford

Bleu de comassie G250.....	100 mg
Acide ortho phosphorique.....	100 ml
Ethanol à 95% .....	50 ml
Eau distillée.....	qsp 1000 ml

#### Sérum albumine bovine (BSA)

BSA.....	0.1g
Eau distillée.....	qsp 100 ml

#### Eau physiologique

NaCl.....	9g
Eau distillée .....	qsp 1000ml

**Réactif de Griess I : 0,5%**

Naphtyl éthylène diamine dichloride.....0,5 g  
HCl à 20%.....100 ml

**Réactif de Griess II : 5%**

Sulfamilamide.....5 g  
HCl à 20%.....100 ml