

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

REPUBLIQUE ALGERIENNE  
DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

## ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

### DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

**Mémoire en vue de l'obtention d'une thèse de Magister en  
Biotechnologie**

### THEME

**DOSAGE DES CYTOKINES PAR METHODE ELISA :  
INTERET ET APPLICATION EN BIOLOGIE CLINIQUE**

**Etude réalisée par : Melle Chérif Baya Lamia**

### **JURY:**

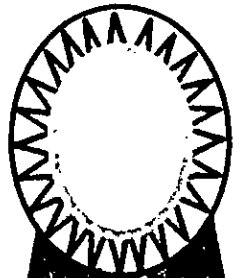
**Président : Pr KERBACHI R.**  
**Rapporteur : Pr ARDJOUN F/Z.**  
**Rapporteur : Dt ARDJOUN M.**  
**Rapporteur : Pr MAMERI N.**  
**Examinatrice : Mme C.TOUIL (Docteur d'état)**  
**Examinatrice : Mme ABDI N.(chargé de cours)**  
**Examineur : Mr GRIB H.(chargé de cours)**

**Soutenance septembre 1999**

## DEDICACES

*Je dédie, comme preuve d'amour et de reconnaissance ce mémoire aux personnes qui me sont les plus chères.*

- Tout d'abord à la mémoire de mon regretté père.*
- A ma mère pour ces encouragements et ces conseils.*
- A mon frère RAHIM que je respecte beaucoup.*
- A ma sœur SALIMA pour sa compréhension.*
- A mon frère MOHAMED pour sa gentillesse*
- A notre adorable petite sœur IMENE que j'adore.*
- A AHMED SALAH pour son aide inestimable.*
- ET à tous ceux que j'aime.*





المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

## REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude a été rendue possible par un grand nombre de personnes qu'elles veuillent trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens cependant à remercier plus Particulièrement.

Mon rapporteur  
Madame F.Z.ARDJOUN.  
Professeur en HEMATOLOGIE.  
Chef de service d'Hématologie.  
Hôpital Central de l'armée.

Cette étude n'aurait pu être menée sans votre précieuse collaboration concernant les sérums de myélomes diagnostiqués au laboratoire d'hématologie que vous avez aimablement accepté de me les fournir.

Vive reconnaissance pour toute votre aide.

Mon rapporteur  
Monsieur M.ARDJOUN.  
Pharmacien, Hémobiologiste.  
Chef de service Transfusion Sanguine (CTS).  
Hôpital Central de l'Armée.

Pour votre entière disponibilité et toute l'aide apportée à la réalisation de mon travail, pour vos précieux conseils, pour les multiples moyens mis à ma disposition et surtout pour votre extrême gentillesse.



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier également :

Mon rapporteur  
Monsieur N.MAMERI.  
Professeur en Biotechnologie.  
Chef de département Biotechnologie/Génie de l'Environnement.  
Ecole Nationale Polytechnique d'El-Harrach

Pour votre aide et votre disponibilité durant toute ma formation.

Reconnaissance éternelle.

Je tiens à remercier également :

Madame S CHAIB, maître assistante au CTS, pour sa grande sympathie.

Tous le personnel du CTS et l'unité de sérologie en particulier :

Madame N.DJIDER.  
Madame Z.BENABDELBAKI.  
Monsieur M.BENKAILA.  
Monsieur L.BOUKOFFA.



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

## REMERCIEMENTS

Pour leur aide inestimable et leur disponibilité durant tout mon travail.

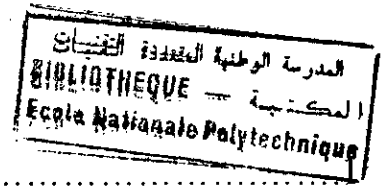
Je n'oublie pas de remercier Monsieur CHERGUI pour son dévouement.

Madame M.MATALLAH pour ses précieux conseils.

Très sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.



# SOMMAIRE

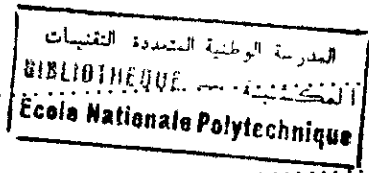


<b>Introduction</b> .....	
<b>Chapitre I :            Partie Théorique</b>	
1-Historique.....	3
1-1-Les cytokines.....	3
1-2-Propriétés importantes des cytokines.....	5
1-3-Propriétés des cytokines permettant de comprendre leur rôle dans certaines situations pathologiques.....	6
1-3-1-Cytokines et réponse immune.....	7
1-3-1-1-Rôle des cytokines dans la présentation de l'antigène.....	10
1-3-1-2-Rôle des cytokines dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes TCD4+.....	14
1-3-1-3-Fonctions effectrices et régulatrices des lymphocytes.....	16
1-3-2-Cytokines et inflammation.....	20
1-3-2-1-Nature des cytokines impliquées dans l'inflammation.....	22
1-3-2-2-Détection de cytokines au sein des foyers inflammatoires.....	22
1-3-2-3-Induction de médiateurs lipidiques.....	23
1-3-2-4-Induction de radicaux libres.....	24
1-3-2-5-Induction des protéines de la phase aiguë.....	24

1-3-2-6-Modulation des fonctions des cellules endothéliales.....	26
1-3-2-7-Chimiotactisme.....	26
1-3-2-8-Coagulation.....	28
1-3-2-9-Catabolisme.....	28
1-3-2-10-Activité au niveau du système nerveux central.....	30
1-3-2-11-Cytokines amplificatrices.....	31
1-3-2-12-Cytokines inhibitrices.....	31
1-3-2-13-Cicatrisation.....	32
1-3-3-Cytokines et hématopoïèse.....	33
1-3-3-1-Mécanismes de l'hématopoïèse.....	33
1-3-3-2-Colony stimulating factors.....	37
1-3-3-3-Autres facteurs de régulation de l'hématopoïèse.....	40
1-3-3-4-Récepteurs de facteurs de croissance.....	43
1-3-4-Cytokines et sepsis graves.....	44
1-3-4-1-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ .....	44
1-3-4-2-Interleukine-1.....	46
1-3-4-3-Interféron- $\gamma$ .....	47
1-3-4-4-Autres cytokines.....	49

1-3-5-Cytokines et Sida.....	50
1-3-5-1-VIH et Monokines.....	52
1-3-5-2-VIH et Interleukine-2.....	54
1-3-5-3-VIH et Interférons.....	55
1-3-5-4-VIH et GM-CSF.....	56
1-3-5-5-Cytokines et complications de l'infection par le VIH.....	56
1-3-6-Cytokines et Hépatites.....	58
1-3-7-Cytokines et Hémopathies malignes.....	59
1-3-8-Cytokines et Tumeurs solides.....	60
1-3-9-Cytokine et Transfusion Sanguine.....	61
1-3-10-Anti-cytokines et anti-récepteurs de cytokine.....	62
1-3-10-1-Interleukine 2 et récepteur de l'interleukine-2.....	62
1-3-10-2-Autres anti-cytokines et anti-récepteurs de cytokines.....	65
1-4-Caractéristiques des différentes cytokines.....	67
1-4-1-Les interleukines.....	67
1-4-1-1-Interleukine-1.....	67
1-4-1-2-Interleukine-2.....	69
1-4-1-3-Interleukine-3.....	71
1-4-1-4-Interleukine-4.....	72
1-4-1-5-Interleukine-5.....	74





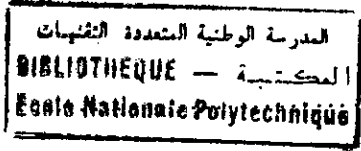
1-4-1-6-Interleukine-6.....	75
1-4-1-7-Interleukine-7.....	77
1-4-1-8-Interleukine-8.....	78
1-4-1-10-Interleukine-10.....	79
1-4-1-12-Interleukine-12.....	79
1-4-1-13-Interleukine-13.....	80
1-4-2-Les Interférons.....	80
1-4-2-1-Introduction.....	80
1-4-2-2-Les différentes formes moléculaires.....	81
1-4-2-3-Interféron- $\gamma$ .....	83
1-4-3-La chachectine ou TNF- $\alpha$ .....	83
1-4-4-Le GM-CSF.....	84
1-4-5-Interleukine-2 et récepteur de l'interleukine-2.....	85
1-5-Dosage des cytokines.....	86
1-5-1-Dosage de cytokines : dans quels fluides?.....	86
1-5-2-Dosage de cytokines : quelle méthode?.....	87
1-5-3-Limites du dosage des cytokines en pratique clinique.....	88
1-5-4-Intérêt du dosage des cytokines en pratique clinique.....	89
1-6-Coût des cytokines.....	91



## Chapitre II : Matériel et méthodes

1-Principe général de l'ELISA.....	94
1-1-Technique (Diagnostics Pasteur et Innostest Diagnostics).....	94
1-1-1-Principe.....	94
1-1-2-Appareillage et réactifs.....	94
a)-Appareillages.....	94
b)-Verreries et autre matériel.....	94
c)-Réactifs.....	96
1-1-3-Prélèvement et conservation des échantillons.....	96
1-1-3-1-Technique de prélèvement.....	96
1-1-3-2-Préparation des échantillons.....	96
1-1-3-3-Conservation et transport des échantillons.....	98
1-1-4-Mode opératoire.....	98
1-1-4-1-Protocole-1 (Diagnostics Pasteur).....	98
A)-IL-6.....	98
B)-TNF- $\alpha$ .....	101
C)-IFN- $\gamma$ .....	103
1-1-4-2-Protocol-2 (Diagnostics Innostest).....	105
A)-IL-6.....	105
B)-IL-8.....	106

C)-IL-2Ra.....	107
D)-TNF- $\alpha$ .....	108
E)-GM-CSF.....	109
3-Méthode d'exploitation des résultats : .....	110
3-1-Spectrophotomètre simple, première génération : .....	110
Lecture manuelle.....	
3-2-Spectrophotomètre avec logiciel intégré deuxième génération : ...	110
Lecture automatique.	
4-Méthodes statistiques utilisées.....	111
5-Populations étudiées.....	113
5-1-Groupes témoins.....	113
5-1-1-Groupes de donneurs de sang (DDS).....	113
5-1-1-1-DDS en équipe mobile (EM).....	113
5-1-1-2-DDS en cabine fixe (CF).....	113
5-2-Groupes de patients.....	113
5-2-1-Malades d'hématologie.....	113
5-2-2-Infection HIV.....	119
5-2-3-Malades d'hémodialyse.....	119
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	
1-Résultat de la technique ELISA.....	121
1-1-Répétabilité.....	121



1-2-Reproductibilité.....121

1-3-Etude des échantillons.....121

2-Résultats et discussion des populations témoins et malades.....121

2-1-Population de témoins.....133

2-1-1-Donneurs de sang (DDS).....133

2-2-Cytokines en pathologie.....133

**CONCLUSION**

**BIBLIOGRAPHIE**

**ANNEXE**

**GLOSSAIRE**

## ABREVIATIONS UTILISEES

ABREVIATION	CORRESPONDANCE
AA	Acide aminé
Ac	Anticorps
ACE	Antigène Carcino Embryonnaire
ACTH	Hormone Adréno-Corticotrope
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
BNA	Néphélomètre Analyseur Behring
[C]	Concentration
°C	Degré Celcius
CD25	Lymphocyte T25
CD34	Lymphocyte T34
CD4+	Lymphocyte T4
CD8+	Lymphocyte T8
CF	Cabine fixe
CL-I	Classe I
CL-II	Classe II
CMH	Complexe Majeur D'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CRP	Protéine-C-Réactive
CRF	Corticotropin Relating Factor
CPA	Cellule Présentant l'Antigène
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTS	Centre de Transfusion Sanguine
CSIF	Cytokine Synthesis Inhibitory Factor
CV	Coefficient de variation

## ABREVIATIONS UTILISEES

ABREVIATION	CORRESPONDANCE
Da	Dalton
DDS	Donneur de Sang
DO	Densité Optique
DR	Donneur de reins
EDTA	5-éthyl isoamyl-barbituric A
EGF	Epidermal growth factor
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
EM	Equipe Mobile
ETAf	Cell Thymocyte Activating Factor
Fc	Fragment C des Immunoglobulines
FGF	Fibroblast growth factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
G0	Phase G0
G1	Phase G1
H	Heure
HBS	Hépatite B de Surface
HCA	Hôpital Central de l'Armée
HCV	Hépatite C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyt Antigen
HTLV	Human T Leukemia Lymphoma Virus
IgA	Immunoglobuline A

## ABREVIATIONS UTILISEES

ABREVIATION	CORRESPONDANCE
IgD	Immunoglobuline D
IgE	Immunoglobuline E
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IDR	Immuno Dermo Reaction
Ic	Index Cinétique
ICAM-1	Intracellular Cell Adhesion Molécule-1
IL-1	Interleukine-1
IL-2	Interleukine-2
IL-3	Interleukine-3
IL-4	Interleukine-4
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-8	Interleukine-8
IL-10	Interleukine-10
IL-12	Interleukine-12
IL-13	Interleukine-13
IL-2ra	Interleukine-2 Receptor Antagonist
IFN- $\alpha$	Interféron- $\alpha$
IFN- $\beta$	Interféron- $\beta$
IFN- $\gamma$	Interféron- $\gamma$
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
Kd	Kilodalton
Km	Kilomètre
LAK	Lymphocyte Activated Killer
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LED	Lupus Erythémateux Disséminé
LIF-HILDA	Leukemia Inhibitory Factor Humain Interleukin For DA Cells
LNH	Lymphome non Hodgkinien

## ABREVIATIONS UTILISEES

ABREVIATION	CORRESPONDANCE
LNR	Laboratoire National de Référence
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	Long Terminal Repeat
LS	Liquide Synovial
LX	Latex
M	Moyenne
MAF	Macrophage Activating Factor
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1
MDH	Maladie d'Hodgkin
MM	Myélome multiple
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1
N	Noyau
ng	Nanogramme
NK	Natural Killer
NKSF	Natural Killer Stimulating Factor
NF- $\kappa$ B	Facteur cellulaire
NAP-2	Neutrophil Activating Peptide-2
NO	Monoxyde d'Azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAF	Platelet Activating Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PF-4	Platelet Factor-4
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pro-B	Cellules les plus immatures (qui n'a pas réarrangé les gènes codant pour les immunoglobulines)
Pré-B	Cellules qui ont subi le réarrangement
POD	Peroxydase
Réc-T	Récepteur T
R-IL-2	Récepteur de l'interleukine-2



## ABREVIATIONS UTILISEES

ABREVIATION	CORRESPONDANCE
SA	Sérum Albumine
SCF	Stem Cell Factor
SD	Déviation Standard
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
t	test student
TCR	T-Cell-Antigen Receptor
T CTL	T Cellules Cytotoxiques
TGF- $\beta$	Transforming Granulocyte Factor- $\beta$
TGF	Transforming granulocyte factor
TH1	T Helper-1
TH2	T Helper-2
THp	Cellules Naïves
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molécule-1
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VS	Vitesse de Sédimentation
WB	Western-Blot

\*\*\* LISTE DES FIGURES \*\*\*

Figure N°	TITRE	PAGE
1	Cytokine et réponse immune	8
2	Rôle des cytokines dans la différenciation des lymphocytes B	9
3	Rôle des cytokines dans la différenciation des lymphocytes T	11
4	Rôle des cytokines dans l'inter-régulation entre cellules TH1 et TH2	17
5	Place des cytokines dans l'orchestration des processus inflammatoires	21
6	Modulation par l'IL-1 et le TNF des fonctions et des molécules de surface des cellules endothéliales	27
7	Cytokines et séquence régulatrices du VIH	53
8	Différentes types de techniques du test ELISA.	93
9	Principe de la technique ELISA.	95
10	Modèle de distribution de standards et d'échantillons d'une plaque de microtitration ELISA.	100
11	Population étudiées	114

❁ ❁ ❁ LISTE DES FIGURES ❁ ❁ ❁

Figure N°	TITRE	PAGE
12	Distribution des différents malade par service	115
13	Distribution de la population témoin	116
14	Les différents diagnostics des malades du service d'hématologie	117
15	Service d'hématologie "SEX RATIO"=1.96	118
16	Service d'hémodialyse "SEX RATIO"=1.96	120
17	Courbe standard de l'IL-6 (INNOTEST)	129
18	Courbe standard de l'IL-2R (INNOTEST)	130
19	Courbe standard du TNF- $\alpha$ (INNOTEST)	131
20	Courbe standard de l'IFN- $\gamma$ (DIAGNOSTICS PASTEUR)	132
21	Valeurs de l'IL-6 dans les différentes pathologies	140
22	Valeurs de l'IL-8 dans les différentes pathologies	141
23	Valeurs de l'IL-2R dans les différentes pathologies	142
24	Valeurs du TNF- $\alpha$ dans les différentes pathologies	143

\*\*\* LISTE DES FIGURES \*\*\*

Figure N°	TITRE	PAGE
25	Les valeurs de la moyenne chez les malades d'hématologie et les DDS suivant les différentes cytokines	144
26	Les valeurs de la moyenne chez les malades d'hémodialyse et les DDS suivant les différentes cytokines	145
27	Les valeurs de la moyenne chez les infections HIV et les DDS suivant les différentes cytokines	146
28	Les valeurs de la moyenne chez les DDS suivant les différentes cytokines	147
29	Les valeurs de la moyenne chez les myélomes multiples et les DDS suivant les différentes cytokines (DIAGNOSTICS PASTEUR)	148

\*\*\* LISTE DES TABLEAUX \*\*\*

TABLEAU N°	TITRE	PAGE
1	Caractéristiques de certaines cytokines	12
2	Rôle des interleukines dans la prolifération et la différenciation des cellules B	13
3	Les propriétés de l'interleukine-1 (IL-1), de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$ en relation avec l'inflammation	25
4	Principales cytokines modulant la myélopoïèse	34
5	Facteurs de croissance de la myélopoïèse	38
6	Effets biologiques du tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) et de l'interleukine-1 impliqués dans la pathogenèse du syndrome septique	48
7	Effet du VIH sur la production des cytokines	51
8	Principaux types d'interférons humains	52
9	Données générales sur la méthode	110
10	Intra Essai : valeurs de la densité optique des standards de l'IL-6 ( <b>Innotest</b> )	122
11	Intra Essai : valeurs de la densité optique des standards de l'IL-2R ( <b>Innotest</b> )	123
12	Intra Essai : valeurs de la densité optique des standards du TNF- $\alpha$ ( <b>Innotest</b> )	124

\*\*\* LISTE DES TABLEAUX \*\*\*

TABLEAU N°	TITRE	PAGE
13	Inter Essai : valeurs de la densité optique des standards de l'IL-6 ( <b>Innotest</b> )	125
14	Inter Essai : valeurs de la densité optique des standards de l'IL-8 ( <b>Innotest</b> )	126
15	Inter Essai : valeurs de la densité optique des standards de l'IL-2R ( <b>Innotest</b> )	127
16	Inter Essai : valeurs de la densité optique des standards du TNF- $\alpha$ ( <b>Innotest</b> )	128
17	Résultats des différentes cytokines ( <b>Innotest</b> ) chez les DDS (PRP)	134
18	Résultats des différentes cytokines ( <b>Innotest</b> ) chez les DDS (EM)	134
19	Résultats des différentes cytokines ( <b>Innotest</b> ) du service d'hématologie	136
20	Résultats des différentes cytokines ( <b>Innotest</b> ) du service d'hémodialyse	136
21	Résultats des différentes cytokines ( <b>Innotest</b> ) chez les infections HIV	137
22	Résultats des différentes cytokines (Diagnostics Pasteur) chez les DDS (EM)	139
23	Résultats des différentes cytokines (Diagnostics Pasteur) du service d'hématologie	139

# CHAPITRE I

## PARTIE THEORIQUE

## I-INTRODUCTION :

Les cytokines sont des médiateurs glycoprotéiques intervenant dans les interactions à courte distance entre les cellules. Elles agissent sur leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires qui sont également des glycoprotéines. Chaque année, grâce au génie génétique, plusieurs nouvelles molécules de cette famille (cytokines, récepteurs de cytokines et antagonistes naturels de certaines cytokines) sont caractérisées. Les découvreurs des premières cytokines les ont qualifiées d'hormones, mais, la différence des hormones, les cytokines ne sont pas sécrétées par un tissu organisé en glande endocrine comme le pancréas, l'hypophyse ou même le foie. Ce sont des cellules isolées qui produisent les cytokines. D'abord, se furent des globules blancs : lymphocytes et monocytes, qui fournirent 2 sous-familles de cytokines, les lymphokines et les monokines, termes utiles mais trompeurs car, contrairement à ce qui signifiait l'étymologie, ils désignent non pas la cellule qui est excitée, mais celle qui excite. Bien vite, cependant, nous avons appris qu'en fait toutes les cellules ou presque sécrètent des cytokines pour parler à leurs voisines. Quand les réceptrices sont proches, on parle de «**paracrine**» si elles sont d'autres nature et d'«**autocrine**» si elles sont de même nature. Quand les réceptrices sont distantes et que le sang sert de véhicule, on parle d'«**endocrine**» et nous voici retombés dans l'ambiguïté entre cytokine et hormone. Le territoire des cytokines est déjà très vaste, incluant l'inflammation, l'immunité, l'infection et la croissance cellulaire. Tous ces néologismes indispensables déroutent encore beaucoup de médecins. Ils forment un nouveau langage en rapide évolution. Nous devons l'apprendre et le comprendre : c'est celui que les cellules parlent entre elles.

Le but de notre travail est la mise en place au Centre de Transfusion Sanguine de l'Hôpital Central de l'Armée en 1994 d'une technique **ELISA** de dosage de cytokines ( IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ). Ce dosage a été pratiqué sur des donneurs de sang des 2 sexes (population témoin) pour l'établissement de normes Algériennes, des malades d'Hématologie de l'Hôpital Central de l'Armée en particulier des Myélomes Multiples.

Notre travail dans un premier temps va consister à étendre ce dosage (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) à différentes Pathologies à savoir :



\* Autres maladies Hématologiques (Lymphomes, Leucémies, Maladies d'Hodgkin).

\* Maladies Rhumatologiques (Spondylarthrite Ankylosante, Polyarthrite, Behcet, Lupus).

\* Maladies Virales (Hépatites Virales B et C, infection HIV à partir de maladies chroniques et donneurs de sang positifs pour les marqueurs Ag/HBS, Ac HCVet Ac HIV).

\* En Transfusion Sanguine : rôle des cytokines dans la conservation du sang

Dans un 2eme temps, dosage d'autres cytokines (IL-2, IL-8, IL-2Rs et le GM-CSF).

## 1-HISTORIQUE:

### 1-1- LES CYTOKINES:

Les cytokines sont des médiateurs peptidiques solubles libérés par les cellules activées au cours des processus inflammatoires ou immunitaires [1].

Ces molécules diffèrent des médiateurs majeurs de l'immunité, les immunoglobulines, par deux caractères essentiels: elles ne présentent aucune spécificité pour les antigènes et elles exercent leur action biologique à des concentrations beaucoup plus faibles c'est-à-dire dans le domaine des concentrations des hormones endocriniennes.

Bien que certains classent les cytokines parmi les hormones, elles s'en distinguent par le fait que souvent elles agissent localement et plus particulièrement sur les cellules voisines (effet paracrine ); c'est ainsi qu'elles permettent aux cellules de communiquer entre elles.

Le développement des techniques de génie génétique et de production d'anticorps monoclonaux ont permis de caractériser au niveau moléculaire de nombreuses cytokines.

Chaque cytokine peut être produite dans de multiples circonstances, physiologique ou pathologiques, et peut exercer des fonctions diverses. Les cytokines fonctionnent en réseau, chacune d'entre elles pouvant influencer sur la production ou les effets de ses partenaires: ainsi, les effets d'une cytokine sur une même fonction peuvent-ils être différents, voire opposés selon le contexte. On commence à expliquer ces interactions, notamment par le fait que certaines cytokines utilisent des récepteurs et des messagers intracellulaires en partie commun. Le résultat: beaucoup d'incertitudes, pour les chercheurs, les développeurs de monographie. On peut néanmoins proposer quelques lignes directrices pour définir la personnalité de chacune des principales cytokines impliquées dans le processus de défense.

\*-Interleukines (IL) TH1: IL-2 et interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$  ), produites par Les lymphocytes T4 (CD4+) de type TH1 activés par l'antigène. elles sont les pivots de l'immunité à médiation cellulaire (réponse cytotoxiques et hypersensibilité retardée ).

\*-Interleukines TH2: IL-4, IL-5 et IL-10. Produites par les lymphocytes T4 de type TH2 activés par l'antigène, elles sont les principales interleukines de

la production des anticorps. L'IL-4 oriente la réponse anticorps vers la production des immunoglobulines (IgE). L'IL-5 amplifie la production des IgA.

\* Antagonisme TH1/TH2. L'IFN  $\gamma$  supprime la production des immunoglobulines E et constitue donc un facteur essentiel de régulation négative de l'hypersensibilité immédiate alors que l'IL-4 et l'IL-10 suppriment les réactions d'hypersensibilité retardée.

\* Cytokines pro-inflammatoires: tumor necrosis factor TNF, IL-1, IL-6 et l'IL-8 produites par les monocytes-macrophages mais aussi selon les cas par de multiples autres cellules (lymphocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, cellules mésangiales, synoviales...). Leur intervention est déclenchée par toute agression, directement (traumatisme, toxine microbienne ...) ou par l'intermédiaire d'une réponse immunitaire (les interleukines TH1 sont stimulantes, les TH2 suppressives de leur production par les macrophages). Elles exercent un spectre d'effets en partie communs, et se potentialisent mutuellement. Elles renforcent les réponses immunitaires, modulent l'hématopoïèse et déclenchent les réactions inflammatoires (fièvre, recrutement et activation des neutrophiles, dégâts endothéliaux ou articulaires, production des protéines amyloïde, cachexie). Ces effets sont ambivalents, contribuant à la défense de l'organisme, mais pouvant être néfastes (libération explosive lors du choc septique ou prolongée dans les cancers et les états infectieux chroniques). Aussi, certaines d'entre elles (IL-1, TNF), sont-elles dotées d'inhibiteurs naturels, chargés d'exercer une rétrorégulation négative. On retiendra: que le TNF est le plus agressif (choc septique, cachexie, mais aussi les myélomes et proliférations lymphoïdes; que l'IL-8 recrute et active les neutrophiles.

\* Les interférons de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) ont des effets antiviraux partagés avec l'IFN $\gamma$ ) et antitumoraux.

\* Les facteurs de croissance hématopoïétique sont produits par les cellules du microenvironnement médullaire, mais aussi pour certains d'entre eux par les lymphocytes T4 (granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), IL-3, IL-5) et les macrophages (GM-CSF) en réponse aux agressions.

Ils agissent respectivement sur les lignées: myéloïde et monocyttaire (GM-CSF), monocyttaire (M-CSF), neutrophile (G-CSF), basophile (IL-3), éosinophile (IL-5), lymphoïde (IL-7).

## 1-2- Propriétés importantes des cytokines:

L'étude des cytokines est d'un intérêt incontestable pour plusieurs motifs:

\*- Ces molécules jouent un rôle très important au cours de nombreuses situations pathologiques (inflammation, auto-immunité, rejet d'un greffon, relation d'un organisme avec une tumeur) [2].

\*- Ces molécules peuvent souvent être dosées au moyen de réactifs radio-immunologiques ou immuno-enzymologiques disponibles commercialement

\*- Ces molécules peuvent être utilisées en thérapeutique (du fait de leur production sous forme recombinante).

\*- Les effets de ces molécules peuvent être inhibés spécifiquement (par l'utilisation d'anticorps ou de récepteurs solubles, faisant l'objet de nombreux développements actuels).

Cependant, une exploration rationnelle et une compréhension précise du rôle des cytokines sont limitées par de très nombreuses difficultés, qu'il convient de rappeler du fait de leur importance en ce qui concerne l'interprétation des dosages:

\*- D'une part, nous l'avons souligné, il existe de très nombreuses cytokines, et la liste des éléments connus de cette famille s'accroît régulièrement.

\*- Chaque cytokine a plusieurs cibles (pléiotropie). En particulier, une cytokine peut moduler les fonctions de la population cellulaire qui la secrète (autocrinie). Cette propriété pourrait mener à un abord thérapeutique de certaines proliférations malignes [3].

\*- Les cytokines ont souvent une durée de vie brève et une action locale, ce qui complique l'interprétation des dosages sanguins.

\*- Les cytokines n'ont pas une action indépendante. Par exemple, l'activation d'une population cellulaire peut nécessiter plusieurs signaux successifs. D'autre part, les récepteurs de différentes cytokines sur une peuvent comporter des éléments communs (chaîne  $\beta$  des récepteurs du GM-CSF, l'IL-3 et de l'IL-5), ce qui pourrait conduire à une compétition entre leurs effets.

\*- De plus, les cytokines peuvent mutuellement moduler leur production. Par exemple, parmi l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-alpha une induction mutuelle a été décrite.

Réciproquement, l'inhibition de la production d'IL-2 par l'IL-10 constitue un phénomène important sur lequel nous reviendrons. Il est ainsi facile de comprendre qu'une propriété d'une cytokine ait pu être attribuée à une autre molécule, de découverte antérieure. Si l'IL-1 induit la synthèse d'IL-6, on peut envisager qu'une propriété attribuée à la première de ces molécules soit en fait due à la seconde dont la production aurait été stimulée [4].

\*- Enfin, on sait maintenant que l'activité des cytokines est régulée par la production de nombreux inhibiteurs solubles ainsi que de précurseurs inactifs, ce qui conduit à l'existence de discordances importantes entre les résultats de dosages effectués par des techniques biologiques et immunologiques.

### 1-3- PROPRIETES DES CYTOKINES PERMETTANT DE COMPRENDRE LEUR RÔLE DANS CERTAINES SITUATIONS PATHOLOGIQUES :

1-3-1-Cytokines et Réponse immune.

1-3-2-Cytokines et Inflammation.

1-3-3-Cytokines et Hématopoïèse.

1-3-4-Cytokines et Sepsis graves.

1-3-5-Cytokines et Sida.

1-3-6-Cytokines et Hépatites.

1-3-7-Cytokines et Hémopathies Malignes Leucémies et Greffe de moelle osseuse.

1-3-8-Cytokines et Tumeurs solides

1-3-9-Cytokines et transfusion sanguine.

1-3-10-Anti-cytokines et anti-récepteurs de cytokine.

### 1-3-1.CYTOKINES ET RÉPONSE IMMUNE:

On distingue depuis longtemps une immunité "humorale", se traduisant par la production d'anticorps, et une immunité "cellulaire", dont les effecteurs sont en particulier les phagocytes mononucléés. Certaines expériences suggéraient que ces deux modes de réponse étaient en quelque sorte "concurrents", même s'ils ne s'excluaient pas mutuellement. Plus récemment, il a été possible d'identifier chez la souris deux populations de lymphocytes T, appelées TH1 et TH2 (pour: "T helper 1" et "T helper 2") qui différaient par la nature des cytokines qu'ils sécrétaient après activation.

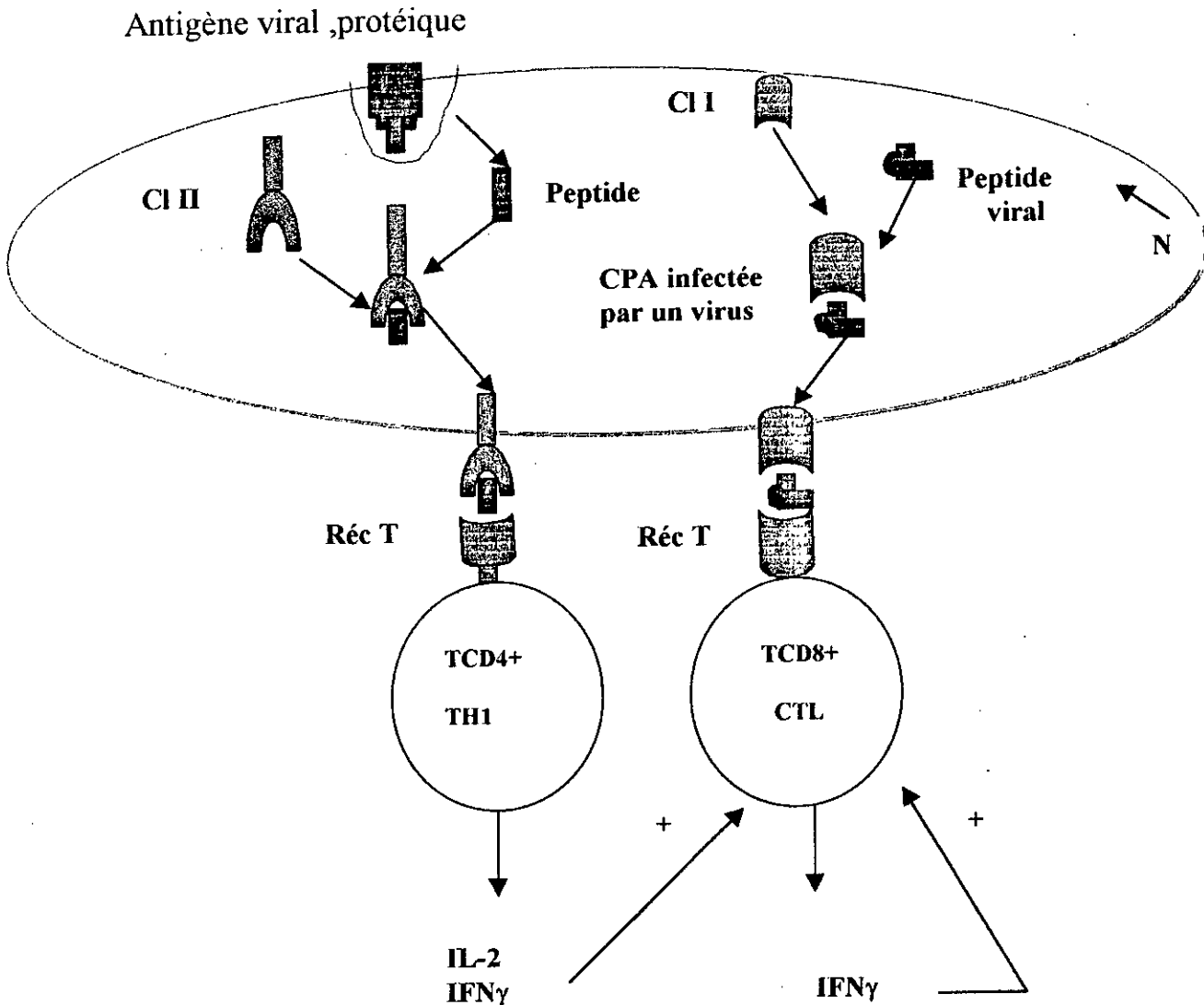
- Les TH1 sécréteraient essentiellement l'IL-2, l'interféron gamma, le TNF. Ils induiraient surtout une immunité de type cellulaire (activation des macrophages par l'interféron gamma-encore appelé MAF, ou macrophage activating factor, développement de lymphocytes T cytotoxiques en partie par l'interleukine 2, activation des "natural killers" par l'interféron gamma). D'autre part, ces TH1 inhibent le développement de la fonction TH2.

- Les lymphocytes TH2 sécrètent essentiellement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10. Ils favorisent surtout la production d'anticorps, en particulier d'IgE (IL-4), l'IL-5 est un stimulant privilégié du développement des éosinophiles. L'IL-10 va inhiber les réponses allergiques.

Les cellules du système immunitaire communiquent de deux façons: par des contacts cellulaires qui vont aboutir à la délivrance d'un signal activateur ou suppresseur intracellulaire et par des médiateurs polypeptidiques ou cytokines à action souvent localisée. Les contacts intercellulaires mettent en jeu, d'une part, un récepteur pour l'antigène et un peptide dérivé de l'antigène présenté par une cellule présentatrice (fig 1) [5].

1-Voie exogène

2-Voie endogène



**Figure 1 : Cytokines et réponse immune .**  
 [ Rev Prat (Paris) 1993 [L.PELLETIET, B.BELLON, P.DRUET] ]

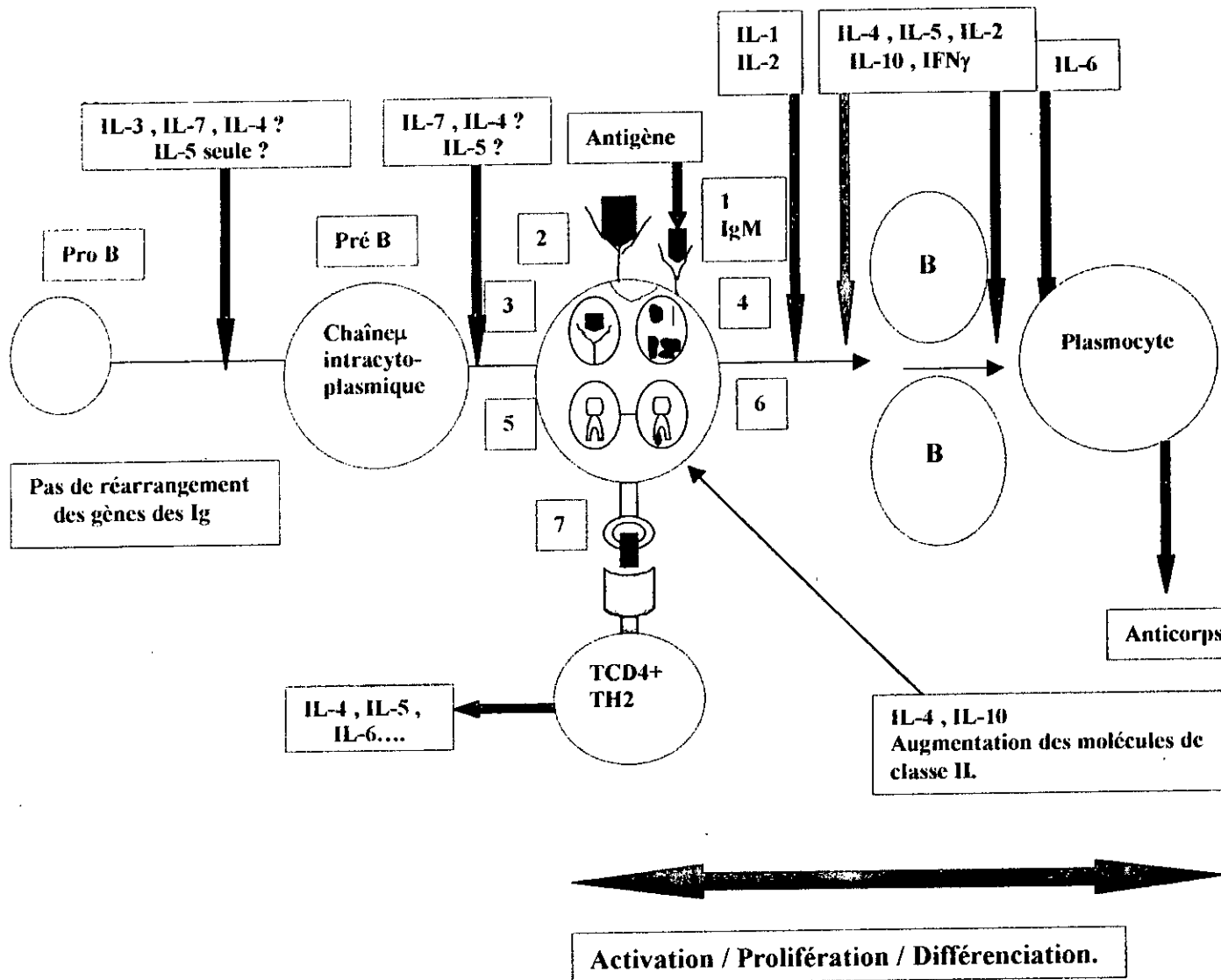
Réponse immune contre un virus .

L'antigène viral dans cet exemple ,peut être présenté selon deux voies ,exogène (1) et endogène (2) .

1) - L'antigène extérieur est capté par la cellule présentant l'antigène (CPA) et ingéré. Il se trouve dans des lysosomes où il est dégradé en peptides .La CPA synthétise des molécules de classe II (CI II) qui sont présentes dans des endosomes (E) . E et L fusionnent et un peptide se fixe sur une molécule de classe II .Ce complexe est exposé sur une membrane de la CPA et est reconnu par une cellule TCD4+ de type TH1 par son récepteur (Réc T) .Ainsi activée , la cellule T produit de l'IL-2 et de l'interféron γ (IFNγ).

2) - Un antigène viral (Ag) codé par le génome viral intégré dans celui de la cellule-hôte est clivé en peptides qui sont transportés dans le réticulum endoplasmique .Le peptide s'y associe aux molécules de classe I (CI I) .Ce complexe est exposé sur la membrane de la CPA et peut être reconnu par une cellule TCD8+ de type CTL par son récepteur (Réc T). Ainsi activée , la cellule T produit de l'IFNγ .L'IL-2 produite par la TH1 et l'IFNγ produit par la CTL et la TH1 vont permettre la différenciation de la CTL en cellule qui va tuer la CPA infectée .

N : noyau



**Figure 2 : Rôle des cytokines dans la différenciation des lymphocytes B .**  
 [ Rev Prat (Paris) 1993 [ L.PELLETIET, B.BELLON, D.DRUET] ]

Une des cellules les plus immatures de la lignée B (pro B) est une cellule qui n'a pas réarrangé les gènes codant pour les immunoglobulines. Une des premières étapes est le réarrangement et la production de la chaîne lourde de l'IgM (μ) qui s'accumule dans le cytoplasme (cellule pré B). La chaîne légère s'associe ensuite à la chaîne lourde et l'IgM est exprimée à la surface de la cellule B où elle peut fixer spécifiquement son antigène (1). Le complexe IgM-antigène est alors intériorisé (2,3) et l'antigène est dégradé en peptides dans les lysosomes (4). L'endosome (contenant) les molécules de classe II fusionne avec le lysosome (5) et un peptide se fixe sur les classes II (6). Le complexe est exposé sur la membrane (7) et est reconnu par le récepteur d'un lymphocyte T, plutôt de type TH2, qui s'active et produit des interleukines intervenant à leur tour dans l'activation, la prolifération et la différenciation en plasmocytes qui produisent des anticorps. Ce schéma ne représente pas les étapes (commutation isotypique) conduisant une cellule B à sécréter une classe d'immunoglobuline particulière (IgA, IgG et IgE) à partir de la cellule ayant des IgM de surface.



Les cytokines interviennent à tous les niveaux de la réponse immunitaire: ontogenèse, activation, prolifération et différenciation des cellules immunes; amplification ou, au contraire inhibition de la réponse immunitaire: et dans les phénomènes de réparation tissulaire et apparition de fibrose.

Les figures 2 et 3 schématisent les étapes de la maturation des lymphocytes B et des lymphocytes TCD4+ et CD8+: en effet. Les cytokines peuvent agir sur une ou plusieurs de ces étapes comme cela sera vu plus loin. Des travaux récents ont montré que les cellules CD4+ peuvent être subdivisées en plusieurs populations selon la nature des cytokines qu'elles produisent (fig .3) [6].

Nous aborderons le rôle des cytokines dans la présentation de l'antigène, dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes TCD4+, ainsi que dans les phases effectrices et régulatrices des lymphocytes. Nous décrivons la place des cytokines dans les manifestations d'hypersensibilité, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, dans l'induction de la cytotoxicité exercée par des cellules CTL, dans celle de l'activité naturel killer et dans les phénomènes de suppression exercée par les cellules T.

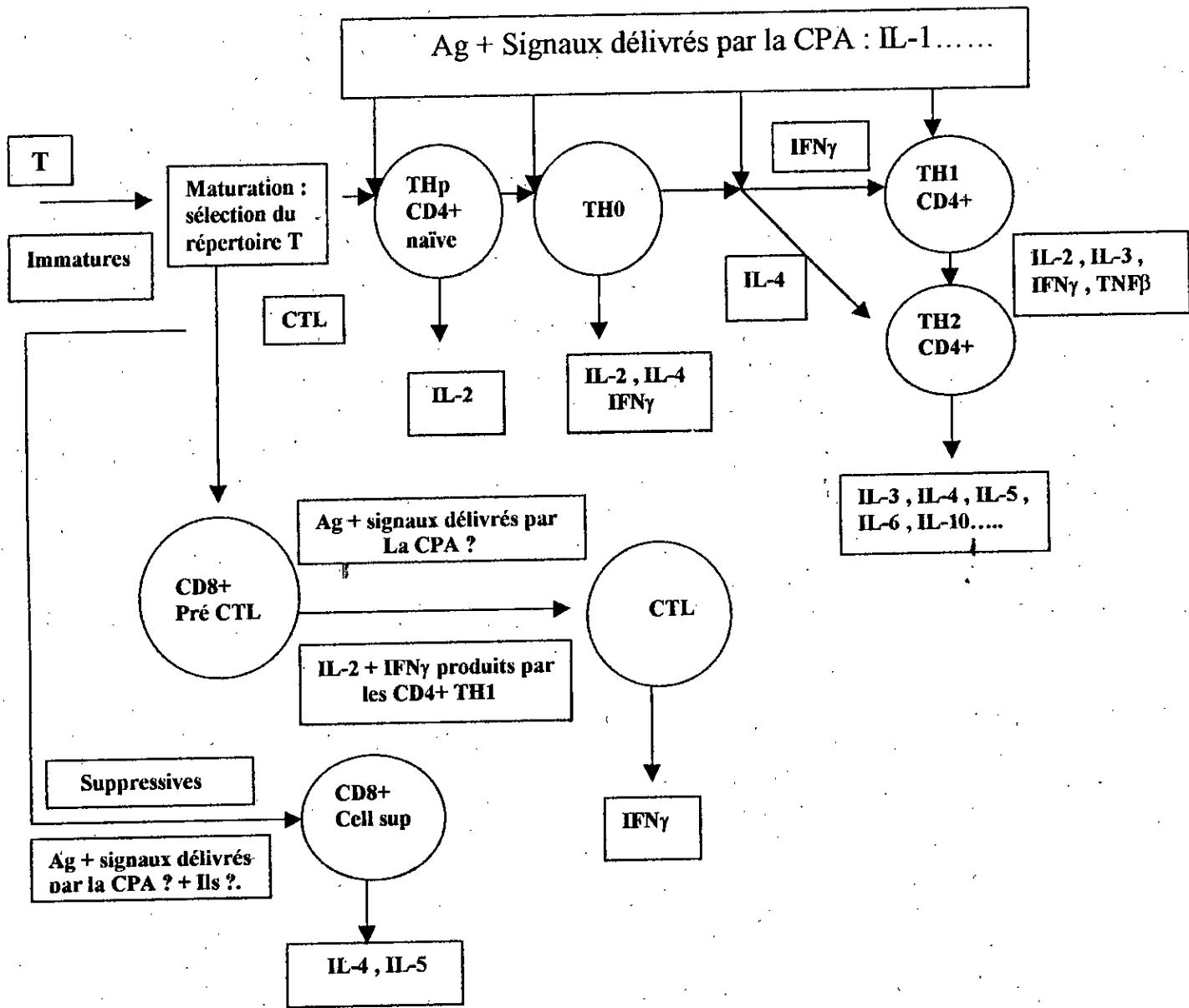
### 1-3-1-1. RÔLE DES CYTOKINES DANS LA PRESENTATION DE L'ANTIGÈNE :

L'antigène est capté soit par des cellules non spécialisées comme les macrophages qui sont capables de capter tous les antigènes soit par des cellules spécialisées comme les lymphocytes B qui captent l'antigène soluble natif à l'aide d'un récepteur spécifique ou immunoglobuline de surface [7]. Dans les deux cas l'antigène est intériorisé et dégradé en peptides (fig,1 et 2). Les peptides dérivés d'antigènes extérieurs s'associent aux molécules de classe II du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) et les complexes ainsi formés sont exprimés à la surface de la cellule présentatrice. Les peptides endogènes comme ceux dérivés de virus sont présentés associés aux molécules de classe I du CMH.

Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont tous deux un récepteur capable de reconnaître à la fois le peptide dérivé de l'antigène et une molécule du CMH: la cellule CD4+ reconnaît le complexe peptide-classe I (fig.1).

Différenciation des lymphocytes T CD4+



Différenciation des lymphocytes T CD8+

**Figure 3 : Rôle des cytokines dans la différenciation des lymphocytes T.**

[ Rev Prat (Paris) 1993 [ L.PELLETIET, B.BELLON, P.DRUET ] ]

La première étape de maturation des cellules T a lieu dans le thymus sous l'influence de nombreuses cytokines et conduit à la sélection du répertoire de reconnaissance des lymphocytes T. Les cellules T sélectionnées vont sortir du thymus et représentent les cellules T naïves CD4+ (THp) ou CD8+ qui donneront naissance à des cellules cytotoxiques (CTL) ou suppressives (cell-sup). Le rôle des cytokines dans les différentes étapes de maturation des cellules CD4+ et CD8+ est détaillé dans le texte.

**TABLEAU 1****Caractéristiques de certaines cytokines.**

Cytokines	Structure	Cellules productrices	Fonctions
IL-1	G153-9AA	-Nombreux types Cellulaires	-Activation des cellules T et B, chimiotactisme, fièvre, inflammation, stimulation des hématopoïétiques
IL-2	G133AA	-TH0 et TH1	Activation des cellules T, B, CTL et NK
IL-3	G133AA	-T, basophile/mastocyte	-Hématopoïétique, prolifération des cellules B
IL-4	G129AA	-TH2, basophile/mastocyte	-Activation et différenciation des cellules T et B, présentation de l'antigène par les cellules B, différenciation des polynucléaires éosinophiles, basophiles et mastocytes, phases effectrices de la réponse immune -Prolifération et différenciation des Cellules B et des polynucléaires éosinophiles.
IL-5	G115AA	-TH2, basophile/mastocyte	-Inflammation, différenciation des cellules B, cofacteur de l'hématopoïèse
IL-6	G184AA	-Nombreux types cellulaires	-Développement des cellules T et B (stade précoce)
IL-7	G152AA	-Cellules stromales de la moelle osseuse	-Chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles.
IL-8	P70-80AA	-Nombreux types cellulaires	-Prolifération des cellule T (quelques clones), Hématopoïèse.
IL-9	G129AA	- T	-Ontogenèse des cellules T immatures, régulation des mastocytes et des cellules TH1, présentation de l'antigène par les cellules B et les macrophages .
IL-10	G64AA	-TH2, B, macrophages	-Hématopoïèse et prolifération des plasmocytes.
IL-11	P199AA	-Cellules stromales de la moelle osseuse	-Hématopoïèse et différenciation des cellules NK.
IL-12	P70KD	-Cellules stromales de la moelle osseuse	-Présentation de l'antigène, différenciation des cellules T, B, CTL et NK, antiviral, antitumoral.
IFN $\gamma$	G143AA	-TH1, CTL, NK	-Antiviral, antitumoral, présentation de l'antigène, maturation des CTL.
IFN $\alpha, \beta$	P166AA	-Nombreux types cellulaires	-Antitumoral, prolifération des cellules T et B, inflammation, cachexie, résorption osseuse...
TNF $\alpha, \beta$	G157-71AA	-Nombreux types Cellulaires	-Anti-prolifération, immunosuppression, production d'IgA.
TGF $\beta$	G157-71AA	-Nombreux types cellulaires	

**TABLEAU 2****Rôle des interleukines dans la prolifération et  
différenciation des cellules B.**

[ L.Pelletier et al.,1993 ]

Interleukines	Prolifération/Différenciation	Isotype
IL-2.	+	IgM , IgG , IgA .
IL-4.	+ (« commutation »).	IgG1, IgE.
IFN $\gamma$	+ (« commutation »).	IgG2a .
IL-5.	+ (cellules IgAs+).	IgA.
TGF $\beta$ .	+ (« commutation »).	IgA.
IL-6.	+ (cellules préplasmocytaires).	IgM, IgG, IgA.
IL-7.	+(prolifération et non différenciation).	IgM.
IL-10	+(prolifération).	IgM.

«commutation» : processus conduisant une cellule potentiellement capable de sécréter plusieurs isotypes à sécréter un seul isotype .

Les macrophages présenteraient préférentiellement l'antigène aux cellules TH1 tandis que les cellules B le présenteraient plutôt aux cellules TH2. L'interféron- $\gamma$  augmente l'expression des molécules de classe II et de classe I à la surface de cellules qui ne les expriment pas de façon constitutive.

Ces cellules pourraient alors se comporter comme des cellules présentatrices de l'antigène: mais il n'a pas été montré que l'antigène présenté par ces cellules soit capable d'activer le lymphocyte T spécifique.

L'IL-4 et L'IL-10 augmentent l'expression des molécules de classe II à la surface des lymphocytes B, ce qui favoriserait la présentation de l'antigène par ces types cellulaires. L'IL-10, en outre diminuerait l'expression des molécules de classe II à la surface des macrophages, défavorisant ainsi la présentation de l'antigène aux cellules TH1 [8].

### **1-3-1-2 RÔLE DES CYTOKINES DANS L'ACTIVATION, LA PROLIFERATION ET LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES TCD4+ :**

L'activation de la cellule CD4+ résulte de la reconnaissance du peptide dérivé de l'antigène à la surface de la cellule présentatrice par le récepteur T. Néanmoins, des signaux délivrés par la cellule présentatrice jouent probablement un rôle capital pour permettre de proliférer et se différencier. Ces signaux sont de deux ordres: cytokines et contacts physiques entre molécules d'adhérence exprimées par la cellule T et la cellule présentatrice. L'IL-1 est une molécule dont le rôle dans l'activation des lymphocytes CD4+ a été démontré, au moins pour certaines sous populations de cellules CD4+. Le rôle exact de l'IL-1 dans les phénomènes initiaux de l'activation est difficile à préciser car la cellule T activée elle même potentialise la synthèse d'IL-1 par la cellule présentatrice. Les cellules présentatrices (macrophages ou lymphocytes B ) au repos ne synthétisent pas constitutivement d'IL-1 et les ARN messagers correspondants ne peuvent pas y être mis en évidence.

Certains antigènes dérivés de micro-organismes sont capables d'induire directement la synthèse d'IL-1 par les macrophages, alors que pour d'autres, comme les antigènes protéiques solubles, la synthèse d'IL-1 nécessite que le lymphocyte T spécifique de l'antigène considéré ait reconnu le peptide présenté par la cellule présentatrice.

Enfin, le lymphocyte T stimulé produit du TNF (tumor necrosis factor) qui est inducteur d'IL-1. En ce qui concerne les lymphocytes B.

L'IL-1 ne participe pas à l'activation de tous les lymphocytes T mais plutôt à celle des cellules naïves THp et à celle des TH2 [9].

L'IL-1 permettrait la transcription de gènes [IL-2, récepteur à l'IL-2 (R-IL-2), gène codant pour la chaîne légère des immunoglobulines], impliqués dans l'activation T (ou B) (fig.4) [10] en activant des facteurs protéiques capables de se lier à des séquences de régulation de transcription sur l'ADN et en permettant leur passage du cytosol dans le noyau. L'IL-6 agirait en synergie avec l'IL-1 dans l'induction du gène codant pour le R-IL-2.

L'IL1 et L'IFN $\gamma$  peuvent augmenter l'expression de certaines de ces molécules. L'IL-2 est l'interleukine responsable de la prolifération des lymphocytes T. Récemment la subdivision de lymphocytes T en populations THp, TH1 et TH2 a permis de montrer que L'IL-2 permet la prolifération de toutes ces sous-populations. L'IL-4 produite par les TH2 est capable d'assurer leur propre prolifération. En présence d'IL-4, ces dernières ne sont donc pas dépendantes de l'IL-2.

L'interféron  $\gamma$  agirait de même sur les cellules TH1. Les cytokines produites par les cellules TH1 et TH2 sont responsables de régulations entre ces deux sous-populations.

L'interféron  $\gamma$  produit par les cellules TH1 exerce des effets inhibiteurs sur la prolifération des cellules TH2 induite par l'IL-2 ou l'IL-4. L'IL-4 a des effets antagonistes sur la différenciation des lymphocytes B et des cellules NK, induite par le couple IL-2, IFN $\gamma$ . L'IL-10 produite par les cellules TH2 diminue l'expression des molécules de classe II du CMH sur les macrophages et, par voie de conséquence, diminue la présentation de l'antigène aux cellules TH1.

L'IL-10 et L'IL-4 augmentent toutes les deux l'expression des molécules de classe II sur les lymphocytes B favorisant ainsi la présentation de l'antigène aux cellules TH2 [11].

### 1-3-1-3 FONCTIONS EFFECTRICES ET REGULATRICES DES LYMPHOCYTES: PLACE DES CYTOKINES:

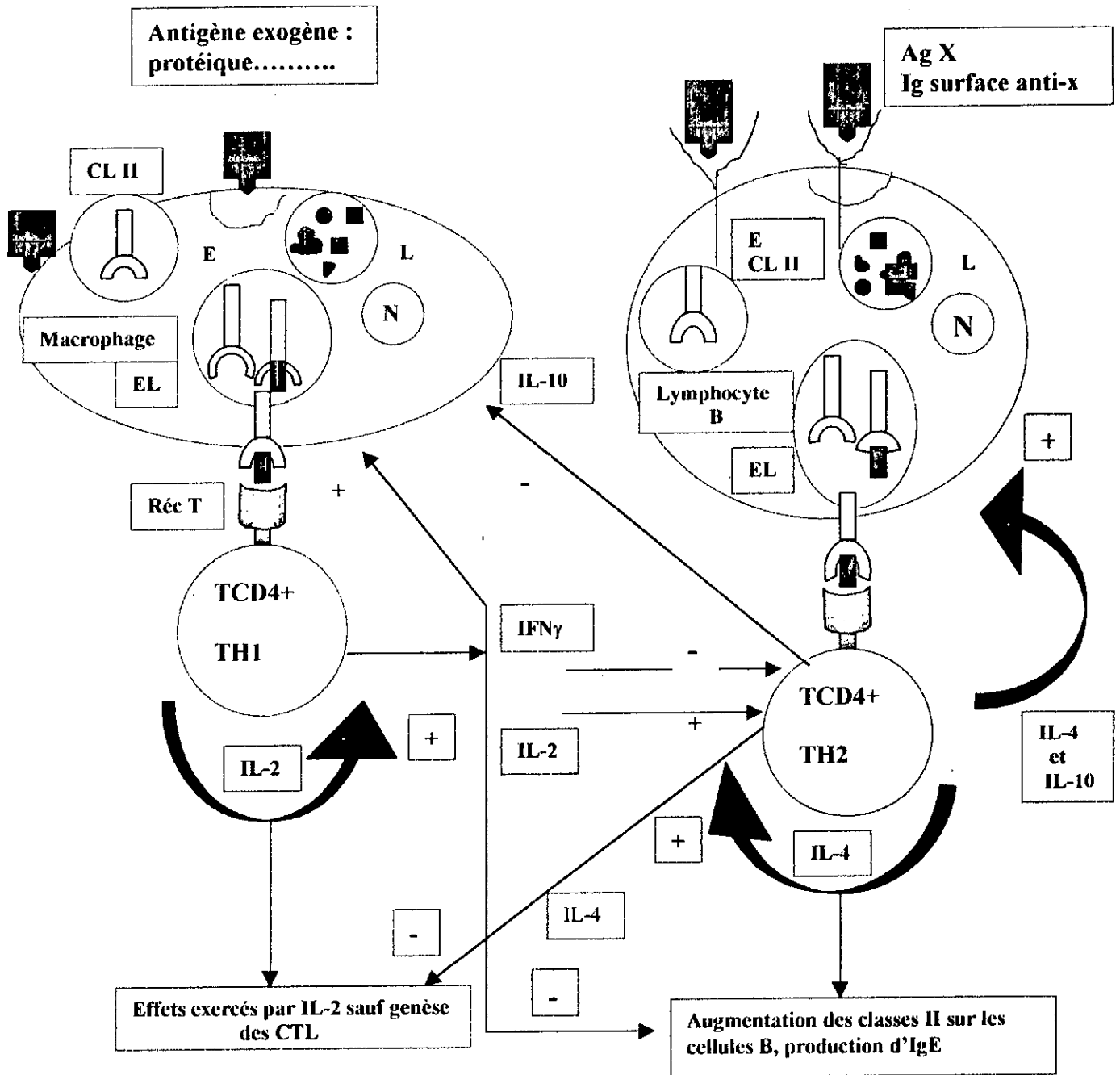
#### A/ Rôle des TH1 dans les manifestations d'hypersensibilité retardée

L'hypersensibilité retardée est une réaction spécifique contre un antigène extérieur dépendant des cellules T. La réaction à la tuberculine en est le meilleur exemple. Elle est la conséquence d'une activation des macrophages qui vont se transformer en cellules géantes et s'organiser en granulomes comprenant ces cellules et des cellules TCD4+ [12]. Les cellules de l'infiltrat tuberculique expriment les ARN messagers de l'IFN $\gamma$  et l'IL-2, cytokines produites par les cellules TH1. La dermatite de contact est une autre forme d'hypersensibilité retardée due à un agent chimique qui se fixe de façon covalente aux protéines de la peau. Les cellules qui en sont responsables sont les cellules TH1 [13].

Ainsi, chez la souris, un agent chimique responsable d'une dermatite de contacte n'affecte pas la concentration des IgE sériques mais induit la production d'anticorps spécifique de type IgG2a, anticorps sous la dépendance des cellules TH1. Chez l'homme des clones de cellules TCD4+ ont été produits à partir des cellules du sang périphérique ou de lésions cutanées de patients ayant une dermatite de contact provoquée par le nickel. Ces clones reconnaissant spécifiquement le nickel produisent surtout de l'interféron  $\gamma$  ce qui suggère qu'il s'agit de clones de type TH1. L'interféron est probablement le médiateur crucial dans l'activation locale des macrophages qui vont alors sécréter les facteurs de l'inflammation et, par là participer à la constitution du granulome.

#### B/ Rôle des cytokines dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.

Les principales cytokines intervenant dans les étapes de la maturation des cellules B avant qu'elles n'expriment le récepteur pour l'antigène c'est-à-dire l'immunoglobuline de surface est reconnue comme une interleukine capable d'induire sans autre signal la prolifération des lymphocytes B activés par l'antigène et l'IL-2 en particulier sera responsable de la différenciation des cellules B en cellules produisant IgM, IgA et IgG [14].



**Figure 4 : Rôle des cytokines dans l'interrégulation entre cellules TH1 et TH2**  
 [ Rev Prat (Paris) 1993 [ L.PELLETIET, B.BELLON, P.DRUET ] ]

Les macrophages présentent les peptides dérivés d'antigènes exogènes associés aux classes II, plutôt qu'aux cellules TH1 tandis que les lymphocytes B les présenteraient plutôt aux cellules TH2. La présentation de l'antigène est décrite dans les figures 1 et 2. Le rôle des cytokines est détaillé dans le texte.



L'IL-4 produite par les cellules TH2 jouerait un rôle important aussi bien dans les étapes précoces de la maturation des lymphocytes B que dans leur différenciation en cellules productrices d'anticorps de type IgE (chez l'homme et la souris), IgG1 (chez la souris) et IgG4 (chez l'homme). L'IL-4 agirait, en outre, indirectement en augmentant l'expression de la molécule CD23 à la surface des lymphocytes B. Cette molécule qui est le récepteur de faible affinité pour l'IgE, serait relarguée et agirait alors comme un facteur de prolifération des lymphocytes B et comme un modulateur de la différenciation des lymphocytes B. D'autres interleukines: IFN $\gamma$  et TGF $\beta$  interviennent également dans la production de certains isotypes l'IL-5 induirait la production d'IgA en agissant sur des cellules déjà programmées pour produire de l'IgA. L'IL-6, elle, induit la prolifération des cellules préplasmocytaires, ce qui expliquerait l'hyper-immunoglobulinémie observée chez les patients atteints de myxomes de l'oreille gauche, situation dans laquelle il y a une forte sécrétion d'IL-6. Cette dernière joue probablement un rôle important dans l'évolutivité des myélomes ce qui a conduit à proposer des traitements par des anticorps anti-IL-6.

### C/ Rôle des cytokines dans l'induction des cellules T-CTL

Les CTL classiquement CD8<sup>+</sup> ont un récepteur T pour l'antigène et reconnaissent les peptides en particulier viraux exposés par les molécules de classe I à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Toute cellule infectée par un virus est capable de présenter des peptides dérivés du virus associés aux molécules de classe I et pourra donc être tuée par la CTL. On ne sait pas si la cellule présentatrice délivre un cosignal analogue à celui donné par l'IL-1 aux cellules CD4<sup>+</sup> Il est admis que la différenciation des cellules CD8<sup>+</sup> est sous le contrôle de l'IL-2 et de l'interféron  $\gamma$ . Ce dernier produit par les CTL aurait un rôle autocrine : les CTL dépendraient de l'IL-2 produite par les cellules CD4<sup>+</sup> car elle n'en produisent que peu ou pas. L'IL-2 est requise tout au long de la différenciation alors que l'IFN $\gamma$  n'est nécessaire qu'au début de l'activation. L'IL-4 est aussi capable d'induire la différenciation des CTL: elle agirait en synergie avec l'IL-2. La stimulation de la CTL par l'antigène en l'absence d'IL-2 conduirait à la paralysie de la CTL. Il a été proposé que la tolérance aux allogreffes induite par l'irradiation lymphoïde total relève de ce mécanisme. De plus, dans ce cas, ajouter de l'IL-2 exogène ne restaure pas l'alloréactivité [15].

### **D/ Rôle des cytokines dans l'induction de l'activité natural killer (NK).**

Les cellules NK sont des cellules capables de lyser certaines cibles en particulier tumorales en l'absence de toute immunisation préalable. Les cellules NK ne reconnaissent pas leur cible de façon restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité et n'expriment pas de récepteur T pour l'antigène. Il semble néanmoins, chez l'homme, qu'il existe un répertoire, une cellule reconnaissant un certain lot d'alloantigènes, différent de celui reconnu par une autre cellule. Quant les cellules NK sont activées par l'IL-2 elles deviennent capables de tuer un plus grand nombre de cibles et sont dénommées pour cette raison LAK (lymphocyte activated killer), cette capacité est utilisée en thérapeutique dans le traitement de certains cancers. L'IFN  $\gamma$  et surtout l'IL-2 apparaissent comme les cytokines impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules NK [16]. L'IL-7 pourrait aussi être impliquée. L'IL-4, elle, inhibe la genèse des LAK induite par l'IL-2. Récemment le NKSF (natural killer stimulating factor) ou IL-2 a été décrit comme un facteur de prolifération et surtout de différenciation des cellules NK.

L'IL-2 et l'IL-12 sont capables d'augmenter l'expression des molécules d'adhérence impliquées dans la fonction NK. Néanmoins ces interleukines agissent de façon différente. L'IL-12 peut inhiber la prolifération induite par l'IL-2; par contre, l'IL-12 induit la différenciation des cellules NK préactivées par l'IL-2 pour des doses 1000 fois moindres que les cellules NK de patients infectés par le virus de l'immuno-déficience humaine sont également sensibles à l'IL-12 [17].

### **E/ Rôle des cytokines dans la suppression exercée par les cellules T.**

Les cellules T impliquées dans les phénomènes de suppression peuvent être CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> et sont intégrées dans un réseau qui classiquement comprend:

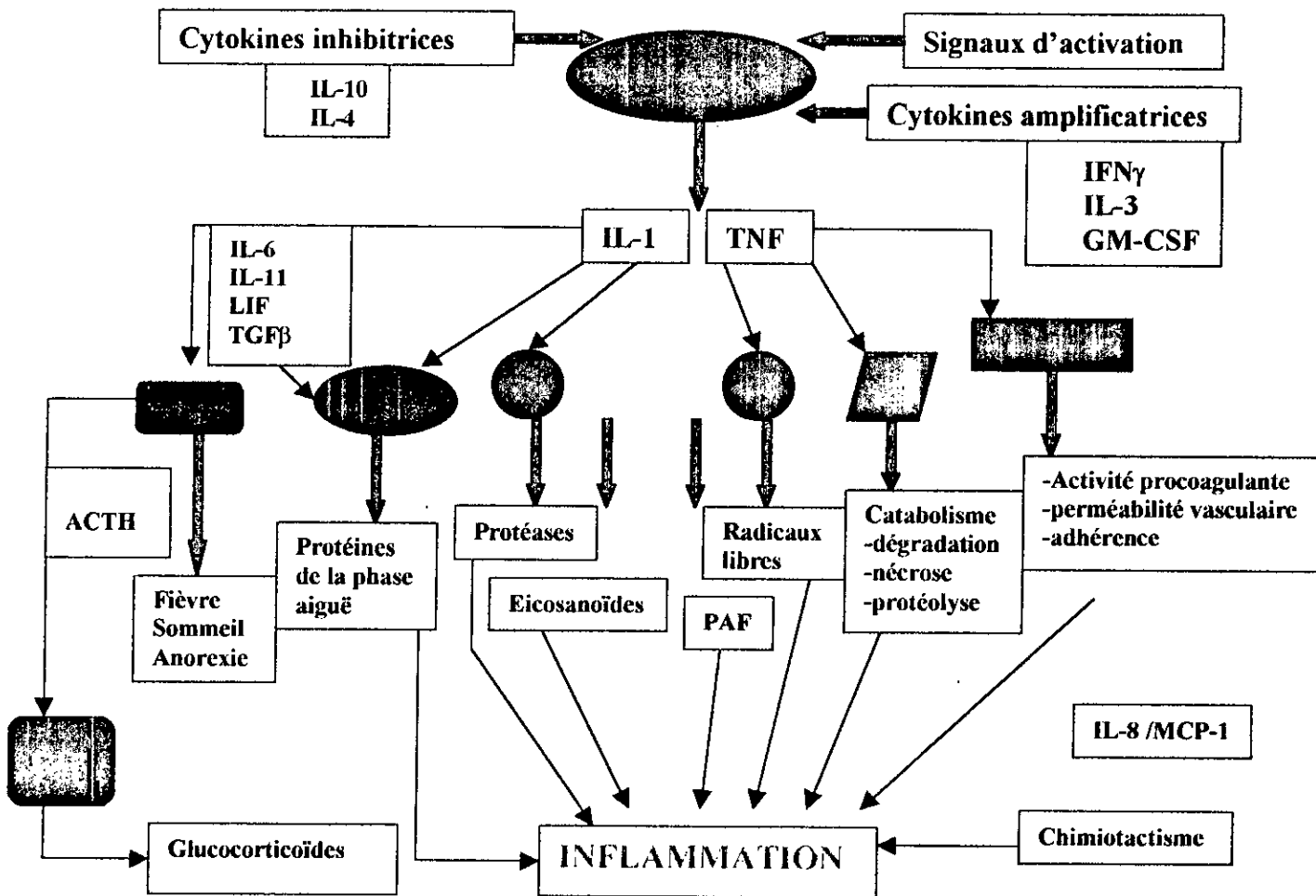
\* les cellules inductrices de cellules suppressives, qui sont en fait des lymphocytesauxiliaires CD4<sup>+</sup> classiques spécifiques de l'antigène, sécrétant soit de l'IL-2 soit de l'IL-4.

\* des cellules CD4+ ou CD8+ reconnaissant un déterminant (idiotype) du récepteur de la cellule T inductrice de cellules suppressives et capables de la paralyser.

\* des cellules CD8+ reconnaissant un peptide spécifique de l'antigène, responsables d'une inhibition de la réponse à cet antigène [18]. Il a été possible d'obtenir des clones de cellules CD8+ spécifiques d'un antigène de la lèpre (la lépromine) à partir de lymphocytes de patients souffrant de lèpre lépromateuse, maladie caractérisée par une immuno-suppression. Ces clones correspondaient au 3ème type de cellules suppressives. L'analyse des cytokines produites par ces clones et la comparaison à celles produites par des cellules CD8+ CTL spécifiques d'un alloantigène ont révélé que les clones suppresseurs produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et relativement peu d'IFN $\gamma$  tandis que les clones CTL produisent de l'IFN $\gamma$  et pas d'IL-4. L'activité suppressive des clones de cellules TCD8+ spécifiques de la lépromine est en partie due à l'IL-4 puisque bloquée par des anticorps anti-IL-4. Enfin, par le biais de la sécrétion de leurs interleukines, les cellules CD8+ pourrait conditionner les réponses CD4+ TH1 ou TH2. Les clones CTL favoriseraient les réponses CD4+ TH1 et les Cellules suppressives les réponses TH2 [19].

### 1-3-2- CYTOKINES ET INFLAMMATION :

L'inflammation est la réponse physiologique normale et immédiate à toute agression, mécanique ou infectieuse. Consistant dans un premier temps en une réponse locale, elle peut être suivie d'une réponse systémique. De nombreux schémas cherchant à regrouper les différents acteurs de L'inflammation et à en résumer les nombreux mécanismes ont été régulièrement proposés. Les événements principaux sont: coagulation, exsudation plasmatique, activation du système du complément, diapédèse et migration leucocytaire, activation des cellules mononucléées et des polynucléaires, production de médiateurs. C'est ce dernier point qui a connu au cours des dernières connaissances. Il fut ainsi établi que certaines cytokines jouent un rôle important dans l'orchestration des mécanismes qui contribuent à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Ces cytokines peuvent, soit agir directement, soit être à l'origine d'une production en cascade d'autres médiateurs essentiels à l'enclenchement et à l'entretien d'un état inflammatoire [20].



**Figure 5 : Place des cytokines dans l'orchestration des processus Inflammatoires.**

[ Rev Pra (Paris) 1993 [J.M.CAVAILLON, N.HAEFFNER] ]

L'activation des macrophages aboutit à la production de nombreuses cytokines dont l'interleukine 1 (IL-1) et le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Cette production peut être modulée par d'autres cytokines (interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ; IL-3 ; granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ; IL-4 et IL-10). IL-1 et le TNF agissent sur de nombreuses cellules-cibles qui produisent alors des médiateurs lipidiques, ou des enzymes, ou des radicaux libres directement impliqués dans le processus inflammatoire. L'IL-1 et le TNF possèdent aussi des propriétés directement cytotoxiques pour certains tissus. La cellule endothéliale, cible privilégiée de l'IL-1 et du TNF favorise la coagulation, l'adhérence des cellules circulantes et leur margination en réponse à des signaux chimiotactiques comme l'IL-8 ou le MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1). L'IL-1 et le TNF, agissant au niveau du système nerveux central induisent la fièvre, la phase lente du sommeil et une anorexie. De plus, ces cytokines induisent la production d'hormone adrénocorticotrope qui est à l'origine de la production de glucocorticoïdes par les surrénales. L'IL-1 et le TNF, tout comme de nombreuses autres cytokines (IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )) induisent la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes. Ces dernières, tout comme les glucocorticoïdes, tendent à limiter le processus inflammatoire.

### 1-3-2-1- Nature des cytokines impliquées dans l'inflammation :

Au regard du grand nombre d'activités induites par l'interleukine 1 (IL-1) et le tumor necrosis factor (TNF), il est possible de considérer ces deux molécules comme les principales cytokines impliquées dans les mécanismes inflammatoires. Elles sont surtout produites par les monocytes-macrophages, mais d'autres cellules sont capables d'en sécréter. Partageant de nombreuses activités communes, l'IL-1 et le TNF agissent souvent en synergie [21].

Des cytokines comme l'interleukine 6 (IL-6) et l'IL-8 jouent un rôle plus « focal » au cours des phénomènes inflammatoires. L'IL-8 concerne plus particulièrement les polynucléaires neutrophiles: elle est chimiotactique, facilitant leur margination et leur recrutement sur le site inflammatoire, et en active les fonctions. L'IL-6 et l'IL-8, tout comme l'IL-1 et le TNF, sont pyrogènes. Leur production exacerbée est à l'origine des effets délétères de la réponse inflammatoire. Cet excès de production a permis de détecter les cytokines dans les liquides pathologiques au cours des réactions inflammatoires.

D'autres cytokines peuvent amplifier la réponse inflammatoires en augmentant la production des cytokines précipitées. C'est le cas de l'interféron  $\gamma$  (IFN)  $\gamma$ , l'IL-3, le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ou le M-CSF, capable d'accroître la production des cytokines par les macrophages.

Au contraire, certaines cytokines contribuent à réduire l'intensité de la réaction inflammatoire. Ainsi l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production des cytokines produites les macrophages, et le TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) s'oppose à certains des effets pro-inflammatoires des cytokines.

### 1-3-2-2- Détection de cytokines au sein des foyers inflammatoires :

La possibilité de détecter la présence de cytokines dans les liquides biologiques reflète, d'une part, une saturation des sites récepteurs à la surface des cellules ou une diminution de leur expression. Le fluide gingival et le liquide synovial furent les premiers liquides biologiques environnant un foyer inflammatoire où la présence de cytokines fut évoquée, et ce dès 1982.

L'IL-1 fut détectée dans le fluide gingival par son activité biologique d'épidermal cell thymocyte activating factor (ETAFA). La présence d'IL-1 $\beta$ , plus fréquente que celle d'IL-1 $\alpha$ , fut confirmée par des dosages immunoenzymatiques dans le fluide gingival de malades atteints de parodontites [22].

Ces mêmes cytokines et le TNF $\alpha$  furent trouvés dans les tissus environnants. Le liquide synovial prélevé chez les patients atteints de pathologies articulaires inflammatoires contient également une activité IL-1 dont la nature fut confirmée par des dosages immunochimiques. De même, les présences de TNF $\alpha$ , de GM-CSF, d'IL-6, d'IL-8, de TGF $\beta$ , de TNF $\beta$ , d'interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  ont été détectées dans les liquides synoviaux de patients présentant différents types d'arthrites. L'IL-1 est non seulement observée dans l'environnement immédiat de l'inflammation mais aussi de façon systémique; ainsi par exemple est-elle détectable dans le plasma au cours des arthrites rhumatoïdes.

Les mécanismes qui régulent la fibrose et l'inflammation pulmonaire mettent également en jeu la participation de cytokines telles que l'IL-1 ou de TNF $\alpha$  lors des états inflammatoires. C'est en particulier le cas de patients en hémodialyse chronique, de femmes souffrant d'endométriose ou au cours des maladies inflammatoires du tube digestif. Au cours des colites aiguës expérimentales, les entérocytes produisent de l'IL-1, et le TNF $\alpha$  est retrouvé dans les selles d'enfants souffrant d'inflammation intestinale.

### 1-3-2-3- Induction de médiateurs lipidiques :

Bien des effets de d'IL-1 et du TNF $\alpha$  sont le fruit d'une forte induction de prostaglandines.

Ainsi peut-on contrecarrer les effets néfastes (hypotension, leucopénie, anorexie) de l'IL-1 avec des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase tout en conservant ses propriétés bénéfiques (résistance aux infections, radioprotection). De nombreuses cellules sont capables de produire des prostaglandines sous l'action de l'IL-1 et du TNF $\alpha$ .

Cette production est souvent le reflet de l'induction de la néosynthèse de la phospholipase et de la cyclo-oxygénase. Ces prostaglandines produites sous l'effet de l'IL-1 contribuent aux propriétés algiques de cette cytokine. D'autres produits dérivant de l'activation de ces enzymes tels que les thromboxanes sont également produits en présence d'IL-1.

De plus, une activation de la voie de la lipooxygénase a également été rapportée, aboutissant à la libération de leucotriènes. Enfin la production de platelet activating factor (PAF) est une autre illustration de la production de médiateurs lipidiques aux forts potentialités inflammatoires en présence d'IL-1 et de TNF $\alpha$ . C'est ainsi qu'il a été montré que l'action combinée de prostaglandines et de PAF est à l'origine de l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'IL-1 [23].

#### **1-3-2-4- Induction de radicaux libres :**

La production de radicaux libres au cours du stress oxydatif a été démontrée lors de l'activation (ou priming) par l'IL-1 ou le TNF de nombreuses cellules. Or la quasi-totalité des molécules biologiques est susceptible d'être altérée par les radicaux libres: par exemple, la peroxydase des acides gras insaturés. Entrant dans la composition des phospholipides membranaires entraîne une altération de la fluidité et de la perméabilité des membranes qui s'accompagne d'une libération des constituants cytoplasmiques; l'oxydation des acides aminés induit une altération des protéines. La production de ces dérivés de l'oxygène au sein des cellules phagocytaires contribue aux activités microbicides de ces cellules, mais libérés, ils peuvent exercer une agression sur les tissus environnants. L'activation de la NO synthétase transformant la L-arginine en L-citrulline et en monoxyde d'azote (NO) a également été observée avec des monocytes-macrophages, des fibroblastes ou des cellules endothéliales activées par l'IL-1 ou le TNF.

#### **1-3-2-5- Induction des protéines de la phase aiguë :**

De nombreuses cytokines agissent au niveau de l'hépatocyte pour accroître la production d'un certain nombre de constituants plasmatiques, les protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Bien que la fonction exacte de la plupart de ces protéines soit inconnue, il est généralement admis qu'elles sont importantes dans la limitation de l'inflammation.

L'IL-6 possède l'un des plus grands spectres d'activation de la synthèse des protéines de la phase aiguë, que cela soit in vivo ou in vitro [24]. L'IL-1 et le TNF enclenchent la réponse complète des protéines in vivo, mais agissent sur un nombre plus limité de gènes in vitro. Souvent l'IL-1 et le TNF agissent soit de façon additive, soit en synergie avec l'IL-6.

**TABLEAU 3****Les propriétés de l'interleukine 1 (IL-1), de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF en relation avec l'inflammation.**

[ J.M.Cavaillon et al., 1993 ]

caractéristiques (forme mature)	IL-1 $\alpha/\beta$	TNF $\alpha/\beta$	IL-6	IL-8
Poids moléculaires KDa	17.5	17	26	8.4
Nombre acides aminés	159/153	157/171	184	72 (77)
Glycosylation	-/-	-/+	+	-
Chromosome	2	6	7	4
Nombre d'exons	7	4	5	4
Clonée en	1985/1984	1984/1984	1980	1988
Forme active	monomère	trimère	monomère	dimère
Homologies	$\alpha$ vs $\beta$ :28%	$\alpha$ vs $\beta$ :28%	G-CSF:18%	MCP-1:24%
Nature des récepteurs kDa	type 1:80 type 2:65	type 1:55 type 2:75	type 1:80 type 2:+130	type 1:67 type 2:+59
<b><u>ACTIVITES EN RELATION AVEC L'INFLAMMATION</u></b>				
Fièvre	+	+	+	+
Induction des protéines				
Phase aiguë	+	+	+	-
Augmentation de la perméabilité				
Vasculaire	+	+	-	+
Activation des Neutrophiles	+	+	-	+
Induction prostaglandines	+	+	-	-
Induction de PAF	+	+	-	-
Induction de protéase	+	+	-	-
Dégradation tissulaire	+	+	-	-
Inhibition de la lipoprotéine				
Lipase	+	+	-	-
Activation des cellules Endothéliales	+	+	-	-
(Induction adhérence ; activité procoagulante)				



Au contraire, les synthèses d'albumine et de transferrine par les hépatocytes sont diminuées sous l'effet de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF. D'autres cytokines comme le TGF $\beta$  et l'IL-11, sont capables d'induire la production accrue des protéines de la phase aiguë.

#### **1-3-2-6- Modulation des fonctions des cellules endothéliales :**

Les cellules endothéliales vasculaires forment l'interface séparant le sang circulant des tissus. Dans cette position stratégique, ces cellules sont amenées à jouer un rôle clé dans le développement de la réponse inflammatoire, en favorisant l'adhérence des cellules circulantes et leur passage vers les foyers inflammatoires.

Le recrutement cellulaire requiert une première phase d'adhérence des cellules circulantes, puis un passage transendothélial en réponse à des stimulus chimiotactiques élaborés au sein du foyer inflammatoire par de nombreuses cellules sanguines s'effectue à la suite de l'action du TNF et de l'IL-1, favorisant l'expression à la surface des cellules endothéliales des molécules d'adhérence [25].

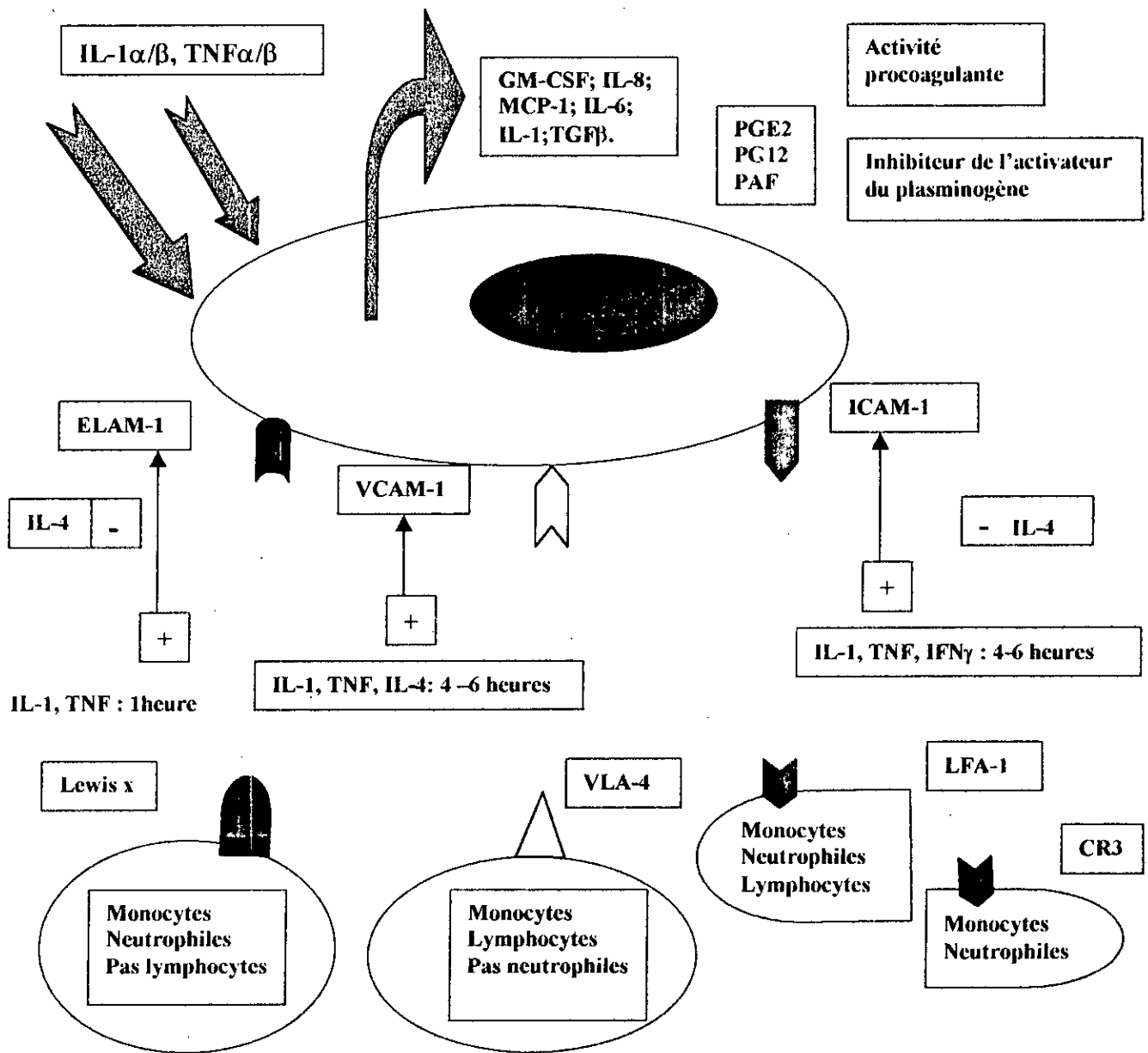
D'autres cytokines peuvent agir sur les cellules endothéliales. Ainsi, l'IL-4 et l'IFN $\gamma$  favorisent l'adhérence des lymphocytes et agissent de façon additive avec l'IL-1 et le TNF.

Sous l'effet de l'IL-1, de l'IL-8 et du TNF, l'altération de la perméabilité vasculaire, permet une extravasation des protéines plasmatiques.

Les neutrophiles contribuent à cette augmentation de la perméabilité en produisant du thromboxane A<sub>2</sub> et du PAF. L'IFN $\gamma$  peut agir à ce niveau, en synergie avec le TNF $\alpha$ . De plus, le passage trans-endothélial des leucocytes « piégés » à la surface des cellules endothéliales est également favorisé. Le recrutement des cellules sanguines est également amplifié par la présence des signaux chimiotactiques au sein du foyer inflammatoire.

#### **1-3-2-7- Chimiotactisme :**

Une famille de molécules possède en commun un pouvoir chimiotactique vis-à-vis des cellules circulantes. Les homologues au sein de cette famille sont importantes.



**Figure 6 : Modulation par l'IL-1 et le TNF des fonctions et des molécules de surface des cellules endothéliales.**

[ Rev Prat (Paris) 1993 [ J.M.CAVAILLON, N.HAEFFNER ] ]

Sous l'action de l'IL-1 et le TNF, la cellule endothéliale produit de nombreuses autres cytokines et des médiateurs qui participent au processus inflammatoire. De plus, toujours sous l'effet de l'IL-1 et du TNF, la cellule endothéliale exprime plus ou moins rapidement (1 à 6h) des molécules d'adhésion (endothélium leucocyte adhésion molécule-1 (ELAM-1) ; vascular cell adhésion molécule-1 (VCAM-1); intercellular adhésion molécule-1 (ICAM-1). Ces molécules permettent alors l'adhérence des cellules circulantes qui possèdent les ligands correspondants. L'apparition d'ELAM-1 et d'ICAM-1 est inhibée par l'IL-4, alors que l'IL-4, peut contribuer à l'expression de VCAM-1.

L'IL-8 comme les molécules  $\alpha/\beta/\gamma$  (growth related). NAP-2 (neutrophil activating peptide-2), PF-4 (platelet factor-4) et MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1) sont chimiotactiques de MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1), et PF-4. Ces molécules participent au recrutement cellulaire et peuvent activer les cellules.

Ainsi l'IL-8, Gro, NAP-2 et MIP-1 stimulent le stress oxydatif des neutrophiles libérant des médiateurs favorisant l'état inflammatoire. Les basophiles répondent aussi aux signaux chimiotactiques de l'IL-8 et dégranulent sous l'effet de MCP-1. Certaines cytokines (MIP-1, IL-8, IL-3, IL-4) sont également capables de favoriser la migration des lymphocytes.

#### 1-3-2-8- Coagulation :

L'IL-1 et le TNF favorisent l'expression d'une activité procoagulante par les cellules endothéliales [25] et interfèrent dans la fibrinolyse en induisant la production par ces cellules de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène tant in vitro qu'in vivo. In vivo, l'injection de TNF induit une apparition précoce et de courte durée de facteur X activé, suivie d'une augmentation graduelle et prolongée du fragment F1+2 de la prothrombine.

#### 1-3-2-9- Catabolisme :

##### ■ Lésion vasculaire :

Le TNF et l'IL-1 peuvent à l'origine d'une réponse hémorragique. Les neutrophiles et les éosinophiles participent à cette toxicité à l'égard de l'endothélium vasculaire. Sous l'effet du TNF, ces cellules sont capables de libérer des enzymes hydrolytiques et des radicaux libres de l'oxygène dont on connaît le pouvoir lésionnel. D'autres signaux peuvent agir conjointement; ainsi l'association de produits bactériens, de l'anaphylatoxine C5a et de TNF contribue à la nécrose hémorragique de tissus normaux.

##### ■ Dégradation du cartilage :

L'IL-1, autrefois nommée entre autres catabolin-1, possède du cartilage.

D'une part, l'IL-1 est capable d'induire des enzymes qui, comme les métallo-métalotéoglycanases produites par les chondrocytes, sont à l'origine du catabolisme des protéoglycanes.

D'autre part, cette même cytokine inhibe la synthèse de protéoglycanes. L'IL-1 contribue donc activement aux mécanismes érosifs observés lors des pathologies articulaires inflammatoires.

#### ■ Ostéolyse :

L'IL-1, nommée autrefois ostéoclast activating factor [26] et le TNF sont à l'origine de l'ostéolyse. Cette résorption osseuse est le fruit de l'activation des ostéoclastes par ces cytokines, et également la conséquence de la production de prostaglandines. A concentrations identiques, l'IL-1 apparaît plus active que le TNF, et les deux cytokines agissent en synergie. Les parodontites sont un exemple de l'action ostéolytique de l'IL-1 et du TNF.

#### ■ Protéolyse :

Le TNF est capable d'induire une protéolyse musculaire et de diminuer des chaînes protéiques de la myosine [27]. L'injection d'IL-1 n'induit pas par elle-même de protéolyse musculaire, mais l'IL-1 peut néanmoins agir en synergie avec le TNF.

#### ■ Cytotoxicité vis-à-vis des cellules $\beta$ des îlots de Langerhans :

L'IL-1 est directement cytotoxique vis-à-vis des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas [28]. Cette activité s'associe à une inhibition de la production d'insuline et de glucagon en présence de glucose. Cependant, il semble que de faibles concentrations d'IL-1 puissent au contraire augmenter la production d'insuline. Le TNF est essentiellement sans activité sur cellules  $\beta$  des îlots.

### 1-3-2-10- Activité au niveau du système nerveux central :

#### ■ Fièvre :

L'élévation de température est sans doute un mécanisme primitif favorisant la lutte contre l'infection bactérienne et virale: d'une part, la multiplication et la réplication de ces pathogènes sont amoindries à des températures élevées; d'autre part, de nombreuses fonctions du système immunitaire sont accrues à des température supérieures à 37°C. On sait depuis 1948 que la fièvre est induite par un facteur pyrogène.

C'est le cas de l'IL-1, du TNF et de l'IL-6: leur pouvoir pyrogène est associé à leur capacité à induire la production de prostaglandines au niveau de l'hypothalamus[29].

D'autres cytokines telles que le MIP-1 et l'IL-8 semblent également pouvoir induire de la fièvre, mais indépendamment de la production de prostaglandines.

#### ■ Sommeil :

L'IL-1 et le TNF sont capables d'accroître la phase lente du sommeil. Ces observations sont à rapprocher des perturbations du sommeil observées lors des états inflammatoires et infectieux . L'IL-6 est dépourvue de fonctions modulant le sommeil.

#### ■ Axe neuro-endocrinien :

Sous l'effet de l'IL-1, l'IL-6 et du TNF, l'hypothalamus produit le corticotropin releasing factor (CRF) qui agit au niveau des cellules de l'hypophyse pour leur faire produire l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Cette dernière, agissant au niveau des surrénales, est responsable de la production des glucocorticoïdes, puissants inhibiteurs de la production des cytokines. Ainsi, ces cytokines sont-elles à l'origine d'une boucle de rétro-inhibition impliquant l'axe neuro-endocrinien.

### **1-3-2-11- Cytokines amplificatrices et autres signaux potentialisateurs :**

La production des interleukines 1, 6, 8 et du TNF est seulement placée sous l'égide de signaux extérieurs mais également sous celle des cytokines elles-mêmes.

Ainsi, l'IL-1 et le TNF peuvent induire ces quatre médiateurs. D'autres cytokines, comme l'IL-2, l'IL-7 ou le GM-CSF, correspondant à ce qu'autrefois on nommait macrophage activating factor, sont capables d'agir en synergie avec des signaux d'activation exogènes tels que l'endotoxine des bactéries à Gram négatif (lipopolysaccharide, LPS) [30] pour amplifier la production de cytokines par les monocytes/macrophages. D'autres signaux tels que les anaphylatoxines, libérées lors de l'activation du système du complément, peuvent aussi augmenter la production d'IL-1 et de TNF. Certains médiateurs peuvent augmenter ou diminuer l'activité des cytokines en fonction des cellules-cibles. Ainsi, le TGF $\beta$  en synergie avec l'IL-1 et le TNF pour amplifier la production de PGE<sub>2</sub>, accroît la résorption osseuse induite par l'IL-1, mais inhibe la dégradation du cartilage et la prolifération des lymphocytes T. L'IL-4 induit la production d'IL-6 par les cellules endothéliales, et les lymphocytes B, alors qu'elle inhibe la production d'IL-6 et des autres cytokines par les macrophages.

### **1-3-2-12- Cytokines inhibitrices et autres signaux anti-inflammatoires :**

Outre ces activités inhibitrices sur la production d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF par les monocytes-macrophages activés, l'IL-4 peut contrecarrer certaines de leurs activités comme l'induction des molécules ELAM-1 à la surface des cellules endothéliales [31].

Une autre cytokine également produite par les lymphocytes T et les macrophages eux-mêmes, l'interleukine 10, est capable d'inactiver les macrophages et d'inhiber leur production d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF. Bien qu'augmentant l'expression des gènes de l'IL-1 et du TNF, le TGF $\beta$  inhibe aussi la production de ces deux cytokines par les macrophages activés par le LPS ainsi que la production d'IL-6 induite par l'IL-1. Le TGF $\beta$  est

capable de diminuer le nombre de récepteurs pour l'IL-1 et, comme l'IL-4, induire la production de l'IL-1 receptor antagonist (IL-1ra). Cette molécule qui partage une certaine homologie avec l'IL-1, se fixe sur les mêmes récepteurs, mais n'est capable d'induire aucune des fonctions induites par l'IL-1, entrant ainsi en compétition avec l'IL-1 pour contrecarrer ses signaux d'activation au niveau des cellules-cibles. L'existence des formes solubles des récepteurs, et en particulier celles du TNF, est un paramètre important à prendre en considération dans l'équilibre des signaux « pro » et « anti » inflammatoires.

De nombreux inhibiteurs naturels du TNF ont été identifiés comme étant la forme soluble du récepteur pour le TNF. Des cellules comme les neutrophiles peuvent sous l'égide de certains signaux d'activation, libérer ces récepteurs de leur surface.

Les glucocorticoïdes sont des agents naturels anti-inflammatoires qui inhibent la production des cytokines produites par les macrophages activés.

Les prostaglandines inhibent la production de TNF  $\alpha$  mais ne modifient pas la libération d'IL-1 et d'IL-6 [32].

### 1-3-2-13- Cicatrisation :

L'étape de cicatrisation est la conclusion heureuse de l'inflammation au cours de laquelle certains médiateurs sont amenés à jouer un rôle déterminant. Les facteurs de croissance tels que l'epidremal growth factor (EGF), le fibroblast growth factor (FGF), le transforming growth factor (TGF) et le platelet derived growth factor (PDGF) concourent à la restauration de l'intégrité tissulaire. Ainsi par exemple le TGF $\beta$  est à l'origine d'un recrutement de fibroblastes, augmente la production de fibronectine, de procollagène, inhibe la synthèse des protéases. Le PDGF est capable d'induire la production de TGF $\beta$  et participe à la prolifération des fibroblastes. De plus le PDGF est, avec l'EGF, le FGF et l'IL-1, un des acteurs de l'angiogenèse bien que des cytokines comme le TNF et l'IFN $\gamma$  s'opposent à cette réparation.

### 1-3-3- CYTOKINES ET HÉMATOPOÏÈSE :

L'identification et la purification des facteurs de régulation de l'hématopoïèse ont permis d'en mieux comprendre les mécanismes de contrôle. Le clonage et l'expression des gènes correspondants ont montré que la majorité des activités observées correspondent à des glycoprotéines spécifiques produites par des cellules de nombreux tissus, dont celles du stroma cellulaire et du système immunitaire. Ces cytokines activent les cellules répondantes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques exprimés sur leur membrane.

Elles exercent un contrôle précis de l'hématopoïèse au sein d'un réseau constitué de facteurs capables de synergie ou d'antagonisme. L'identification précise de leurs activités biologiques, associée à la possibilité de les produire en grande quantité par recombinaison génétique a déjà permis leur utilisation thérapeutique avec dans certains cas une efficacité remarquable.

#### 1-3-3-1- Mécanismes de l'hématopoïèse :

Toutes les cellules du tissu sanguin, qu'elles soient d'origine myéloïde au sens large, ou lymphoïde proviennent d'un pool de cellules souches hématopoïétiques. Ces progéniteurs aux potentialités de différenciation multiples (d'où leur dénomination de cellules souches pluri-, multi- ou totipotentes ) se trouvent chez l'adulte dans la moelle osseuse et, en faible quantité, dans le sang périphérique. Au cours de la vie fœtale et embryonnaire elles sont d'abord retrouvées dans le sac vitellin, le foie fœtale et, ensuite dans la moelle osseuse et le sang périphérique [33].

##### ■ Cellules souches :

Les cellules souches les plus primitives sont capables à la fois d'auto-renouvellement qui permet le maintien et éventuellement l'expansion du pool et de différenciation vers les différentes lignées du sang. A l'origine de celles-ci, les techniques de culture in vitro ont permis d'identifier les progéniteurs engagés dans une voie de différenciation mais ayant perdu leur capacité de prolifération et de production de cellules matures.



**TABLEAU 4****Principales cytokines modulant la myélopoïèse.**

[P.MANNON, 1993]

Facteur	Masse moléculaire (kDa)	Nbre d'acides aminés	Localisation Chromosomique	Récepteur		
				Masse (kDa)	Expression	Nbre Sites/cellules
IL-1 $\alpha$	13-17	271	2q	80 et 65	Ubiquiste	200-5000
IL-1 $\beta$		269				
IL-3	28	152	5q	$\alpha=70$ $\beta=120$	Lignée myélomonocytaire Leucémies myéloïdes	50-5000
IL-4	15-19	153	5q	140	Ubiquiste	100-2500
IL-5	20-45	134	5q	$\alpha=60$ $\beta=120$	Lignée de cellules B Lignée d'éosinophiles	100-5000
IL-6	23-30	212	7q	$\alpha=80$ $\beta=130$	Ubiquiste	100-20 000
IL-7	20-28	177	8q	75	Cellules pré-B et T Monocytes/macrophages	500-2500
GM-CSF	23	152	5q	$\alpha=80$ $\beta=120$	Lignée myélomonocytaire Leucémies myéloïdes Neutrophiles	100-5000
G-CSF	20	207-204	17q	150	Lignée neutrophiles Leucémies	100-3000
M-CSF	45-70	554-256	1q	165	Lignée monocytaire Leucémies myéloïdes	3000-50 000
EPO	34	193	7q	85-100	Précurseurs érythroïdes Erythroleucémies	300-100
SCF	17-30	273	4q	145	Cellules hématopoïétiques	20 000

Ils sont mis en évidence in vitro par des tests clonogéniques en milieu semi-solide. Sous l'effet de facteurs de croissance solubles une cellule progénitrice est ainsi induite à proliférer et à se différencier, ce qui entraîne la formation d'une colonie morphologiquement identifiable. La présence de colonies mixtes associant des cellules de plusieurs lignées (érythroïde, myéloïde et mégacaryocytaire) témoigne de la présence de progéniteurs multipotents. Par contre les tests de détection des cellules souches totipotentes capables d'auto-renouvellement sont beaucoup plus complexes et cherchent à démontrer que ces cellules sont capables à la fois de se multiplier (amplification) sans différenciation et d'engendrer secondairement toutes les lignées du sang [34].

Ces cellules peuvent aussi être identifiées par l'expression de certains antigènes de surface dont l'antigène CD34 qui marque l'ensemble de la population des cellules souches hématopoïétiques. Au cours de la différenciation l'expression de cet antigène décroît progressivement contrairement à celle des antigènes de différenciation qui augmente progressivement.

#### ■ Cytokines :

Si les mécanismes de régulation de l'autorenouvellement et de l'engagement des progéniteurs vers une lignée spécifique sont toujours controversés, la régulation de la prolifération des cellules souches dans une voie de différenciation est aujourd'hui clairement attribuée à des facteurs solubles ou membranaires regroupés sous le terme de cytokines.

Les cytokines sont des glycoprotéines actives à des concentrations extrêmement faibles de l'ordre de  $10^{-11}$  à  $10^{-13}$  molaire. Elles sont produites par des cellules de nombreux tissus dont celles du micro-environnement ou stroma médullaire, par certaines cellules immunocompétentes (lymphocytes T activés, monocytes) ce qui les classe également parmi les lymphokines, médiateurs chimiques des réponses immunitaires [35].

Les cytokines stimulent ou inhibent les fonctions de prolifération et de différenciation des cellules souches et de leur progéniture par fixation sur des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules [tableau n°4].

La liste des cytokines influençant directement la production de cellules hématopoïétiques ne cesse de s'allonger et inclut les facteurs hématopoïétiques classiques appelés CSF (colony stimulating factors): GM-CSF (G:granulocyte; M:macrophage), G-CSF, CSF-1 (ou M-CSF) des interleukines (IL), l'IL3 ou multi-CSF, l'IL-4, l'IL-5 et l'érythropoïétine. Récemment, a été identifié un facteur appelé stem cell factor, (SCF), qui agit en synergie avec la majorité des facteurs hématopoïétiques en amplifiant leur activité [36] [tableau n°5].

Certaines cytokines n'ont pas, isolément, d'activité directe sur la production des cellules hématopoïétique: IL-1, IL-6, les TNF (tumor necrosis factors)  $\alpha$  et  $\beta$ , les interférons, les TGF  $\beta$  (transforming growth factors  $\beta$ ).

Cependant, elles peuvent moduler l'effet de CSF ou d'autres cytokines, et aussi induire la synthèse de facteurs par les cellules du stroma médullaire.

De cette manière elles peuvent exercer une régulation positive ou négative de l'hématopoïèse en fonction de la présence d'autres cytokines dans le milieu médullaire.

De plus, les activités de ces facteurs s'intègrent dans le cadre d'un réseau formé par la présence de molécules ayant des effets additifs, synergiques ou antagonistes [37]. Le fait que certaines cytokines soient capables d'activer des cellules du stroma à produire d'autres facteurs entraîne une activation en cascade.

La spécificité d'action qui en résulte dépend probablement des concentrations relatives de ces différentes hormones, et de la présence des cellules-cibles exprimant les récepteurs correspondants. Les facteurs produits sont excrétés par la cellule et sont présentés aux cellules répondantes, soit sous forme membranaire, liée à la membrane de la cellule productrice, soit sous forme liée aux protéines de la matrice extracellulaire par des liaisons héparine-sulfates. Ces observations expliquent ainsi la possibilité de maintenir au niveau du tissu médullaire des concentrations relativement élevées des facteurs nécessaires à la myélopoïèse. Enfin, la présence de molécules d'adhérence et de leurs ligands spécifiques, à la fois sur les cellules stromales et sur les progéniteurs hématopoïétiques, constitue un élément supplémentaire de la reconnaissance mutuelle des cellules du tissu hématopoïétique résultant ainsi en activation spécifiquement ciblée [38].

Ces interactions s'effectuent principalement sur un mode paracrine, les facteurs de régulation de l'hématopoïèse étant synthétisés par des cellules différentes de celles qu'elles activent. Cela n'exclut cependant pas la possibilité d'une régulation autocrine par laquelle une cellule peut sécréter un facteur régulant sa prolifération et sa différenciation propres.

### **1-3-3-2- Colony stimulating factors et facteurs hématopoïétiques :**

Historiquement, le terme de CSF (colony stimulating factor) a été défini par l'induction de colonies de cellules obtenues *in vitro* à partir de suspensions cellulaires de la moelle osseuse. Ainsi, lorsque la majorité des colonies obtenues avaient des caractéristiques granulocytaires et monocytaires, le terme de GSF-GM pour granulocytes-macrophages était retenu. La présence exclusive de colonies granulocytaires ou monocytaires a permis de définir l'activité G-CSF et M-CSF respectivement [39].

Ces activités ont été définies à partir de surnageants de cultures de lymphocytes activés ou de lignées fibroblastiques ou tumorales. Sur ces bases fonctionnelles, les protéines responsables ont été purifiées et ultérieurement séquencées, permettant ainsi le clonage et l'expression des gènes correspondants. Le gène du GM-CSF humain a été cloné en 1985, et ensuite ceux du G-CSF et de l'IL-3. L'obtention de protéines produites par recombinaison génétique a permis de confirmer et de préciser l'ensemble de ces résultats, et plus récemment de les utiliser en thérapeutique [40].

Le GM-CSF est un des facteurs les plus importants de la myélopoïèse et peut être choisi comme modèle d'étude. Il agit à la fois sur les progéniteurs et des cellules plus différenciées, seul, ou en synergie avec d'autres facteurs.

Le GM-CSF humain est une glycoprotéine de 144 acides aminés, sécrétée, sous forme monomérique par les macrophages, les cellules endothéliales et fibroblastiques et, après activation, par les lymphocytes T.

La première activité du GM-CSF est de maintenir la survie et de stimuler la prolifération et la différenciation de progéniteurs engagés dans les lignées neutrophiles et monocytaires. Mais, comme l'IL-3, le GM-CSF permet également la différenciation terminale des lignées myéloïdes; monocytaire, neutrophile, éosinophile et mégacaryocytaire .

**TABLEAU 5****Facteurs de croissance de la myélopoïèse.**

Facteur	Cellules sécrétrices	Activités dans le système hématopoïétique	Autres activités
IL-1 $\alpha$	Leucocytes	Développement des progéniteurs immatures	Pléiotrope
IL-1 $\beta$	Fibroblastes et lymphocytes	Induction de la des CSFs	Réaction inflammatoire
IL-3	Lymphocytes T activés	Développement des progéniteurs Myéloïdes et érythroïdes	Réponse immune
IL-4	Lymphocytes T activés	Synergie avec CSFs dans la génération des neutrophiles et basophiles	Développement des Lymphocytes T et B
IL-5	Lymphocytes T CD4+ basophiles, mastocytes activés	Développement des progéniteurs Eosinophiles	- Activation éosinophiles matures - Activation - Différenciation cellules B.
IL-6	Leucocytes, cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques.	- Modulation des effets des CSFs sur le développement des progéniteurs - Induction de la production de CSFs	Pléiotrope
IL-7	Cellules stromales	Développement des cellules pro et pré-B et thymocytes	Réaction inflammatoire
GM-CSF	Cellules endothéliales, lymphocytes T, monocytes activés	Développement de l'ensemble des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes Prolifération de leucémies myéloïdes	Prolifération lymphocytes T
G-CSF	Cellules endothéliales, lymphocytes T.	Développement des progéniteurs granulocytaires	Activation neutrophiles, monocytes, éosinophiles
EPO	Cellules périrubulaires du rein, cellules de Kupfer	Développement des progéniteurs érythrocytaires	Activation neutrophiles
SCF/SCF	Cellules fibroblastiques	Synergie avec CSFs et Ils : progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes B	Développement germinal et mélanocytaires
M-CSF	Cellules stromales, monocytes, lymphocytes activés	Développement des progéniteurs monocytaires	Développement placentaire

Le GM-CSF recrute également des progéniteurs multipotentiels, il agit en synergie avec d'autres facteurs hématopoïétiques favorisant le développement de différents types cellulaires. Le GM-CSF pourrait être impliqué dans un processus autocrine dans certains cas de leucémie aiguë myéloblastique. En plus de ces activités sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques normaux et leucémiques, le GM-CSF stimule fortement les fonctions des neutrophiles, macrophages et éosinophiles.

Par souci de clarté on peut essayer de schématiser le rôle de ces facteurs dans la production des lignées granulocytaires et monocytaires. L'interleukine 3 et le GM-CSF sont actifs sur des progéniteurs engagés dans la lignée myéloïde mais gardant des possibilités de multipotentialité. En présence de G-CSF la majorité des cellules produites appartiennent au lignage granulocyttaire donnant finalement naissance aux polynucléaires neutrophiles.

La présence d'IL-4 ou d'IL-5 favorise la différenciation en basophiles ou en éosinophiles respectivement [41]. Enfin chez la souris, l'addition de CSF1 ou M-CSF favorisera la différenciation monocyttaire. Le schéma est loin d'être aussi clair au niveau de la régulation physiologique in vivo. Ainsi il est maintenant clairement établi que des facteurs comme le CSF-1 ou le G-CSF sont capables d'intervenir au niveau des progéniteurs plus primitifs en favorisant leur expansion et leur mobilisation. À l'inverse ces facteurs sont capables d'agir en «bout de chaîne» en activant les fonctions de cellules complètement différenciées comme les monocytes-macrophages ou les neutrophiles. Ce pléiotropisme du G-CSF est mis à profit en thérapeutique, où il permet d'induire la prolifération de la lignée granulocyttaire, la mise en circulation de nombreux progéniteurs identifiés par l'expression de l'antigène CD34 et l'activation des cellules granuleuses [42].

D'autres facteurs, seuls ou en synergie, sont capables d'agir au niveau des cellules souches multi-ou totipotentes. Progressivement il a été montré que l'IL-1  $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-6, l'IL-7 et, plus récemment le *stem cell factor* (SCF) sont capables d'induire en synergie avec d'autres molécules, la prolifération de cellules souches plus primitives. Le gène du SCF isolé par plusieurs équipes en 1991 est un exemple de l'apport de la génétique inverse. En effet ce gène, muté dans une lignée murine (mutation steel) connue pour présenter un déficit de l'hématopoïse, a été cloné à partir d'une lignée dérivée du stroma médullaire.

Il apparut rapidement comme étant le ligand d'un récepteur de type tyrosine kinase produit de l'oncogène. Bien qu'agissant à un niveau précoce et capable de synergie avec la majorité des CSF, il n'apparaît cependant pas comme le véritable SCF, capable d'amplifier un pool de progéniteurs non différenciés. Son activité s'exerce cependant au niveau de progéniteurs relativement pluripotents puisqu'il est capable d'amplifier la prolifération de cellules pré-B (en synergie avec l'IL-7) et de la majorité des progéniteurs myéloïdes en association avec l'IL-3, les CSF et l'érythropoétine. Ainsi, la quête pour le facteur de croissance de la cellule souche primitive totipotente reste ouverte [43].

Il est intéressant de noter que des facteurs comme l'IL-1 et l'IL-6, capables d'agir sur des progéniteurs très précoces, sont aussi actifs sur des cellules très différenciées comme les lymphocytes B matures et les plasmocytes respectivement.

En 1989 une équipe australienne et française identifiait et clonait le gène du LIF-HILDA (*leukemia inhibitory factor-human interleukin for DA cells*). Cette molécule qui permet in vitro d'induire la prolifération des cellules embryonnaires souches (*ES cells*) dans un état indifférencié, a de nombreux effets pléiotropiques [44]. Au niveau de l'hématopoïèse, il semble avoir un effet discret sur la prolifération de progéniteurs primitifs en association avec d'autres facteurs comme le SCF, l'IL-6 et l'IL-3.

Les facteurs responsables de la prolifération de progéniteurs lymphoïdes sont moins clairement identifiés. Il est maintenant établi que l'IL-7 et l'IL-4 favorisent l'engagement et la prolifération des lignées lymphoïdes en association avec d'autres cytokines, dont le SCF.

### 1-3-3-3- Autres facteurs de régulation de l'hématopoïèse :

Plusieurs facteurs à activité pléiotropique sont aussi impliqués dans la régulation positive ou négative de l'hématopoïèse. Il s'agit par exemple des tumor necrosis factors (TNF $\alpha$  et  $\beta$ ) des interférons ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) des transforming growth factors  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

**■ TNF :**

Le TNF $\alpha$ , mis en évidence par l'induction de la nécrose de certaines tumeurs *in vivo* joue un rôle important dans la défense anti-infectieuse, est un médiateur de l'inflammation, et possède des activités cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales. Il a aussi un rôle très important dans l'activation et la prolifération des cellules T. Au niveau de l'hématopoïèse, le TNF $\alpha$  a un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse, mais stimule en synergie avec le GM-CSF et l'IL-3 la croissance de progéniteurs myéloïdes. Récemment, il a été montré qu'il permet la production *in vitro* de cellules dendritiques à partir des progéniteurs de la moelle osseuse. Le TNF $\alpha$  a aussi un effet sur l'induction de différenciation, l'expression d'antigènes HLA sur la surface des cellules répondantes [45].

**■ Interférons :**

Les interférons représentent une famille hétérogène de cytokines aux fonctions multiples. Les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  exercent des activités antiproliférantes relativement non spécifiques, expliquant l'inhibition *in vitro* de la prolifération de la majorité des progéniteurs par l'IFN  $\alpha$  et  $\beta$ . Par contre, l'IFN $\gamma$  en association avec le GM-CSF exerce une certaine synergie en terme de prolifération, suivie ultérieurement d'une différenciation vers la lignée monocytaire. Cette action de différenciation est amplifiée en présence de TNF $\alpha$ .

**■ TGF $\beta$  :**

Les molécules de la famille du TGF $\beta$  ont clairement *in vitro* une action de régulation négative des progéniteurs hématopoïétiques. L'activité physiologique de ces inhibiteurs *in vivo* n'est pas un mécanisme autocrine.

**■ Interleukines 9 et 2 :**

La liste des interleukines s'est récemment allongée.



L'IL-9 synthétisée par les lymphocytes CD4<sup>-</sup> activés est surtout active sur les thymocytes, mais favorise aussi la prolifération de progéniteurs érythrocytaires soit directement, soit par l'intermédiaire des cellules du stroma médullaire.

L'IL-10 appelée initialement CSIF (*cytokine synthesis inhibitory factor*) exerce essentiellement un contrôle de l'activation lymphocytaire T en inhibant par exemple leur synthèse d'interféron  $\gamma$ . Cette lymphokine induit la prolifération de thymocytes en association avec IL-2 et IL-4 et, in vitro, apparaît comme un facteur de prolifération et de différenciation des cellules B et des plasmocytes.

L'IL11 a été identifiée comme un facteur de prolifération de cellules plasmocytaires. Son implication dans l'hématopoïèse est suggérée par sa capacité d'inhiber in vitro la différenciation des cellules stromales en adipocytes, caractéristique partagée avec l'IL-6 et le LIF-HILDA. De plus cette interleukine augmente la prolifération des progéniteurs de la lignée plaquettaire seule ou, sous certaines conditions, en présence d'IL-3. Comme le G-CSF, l'IL-6 et le LIF, l'IL11 est capable de raccourcir la phase G0 du cycle cellulaire des progéniteurs, expliquant leur amplification.

L'IL-12 est identique au NKSF, facteur de stimulation des cellules (natural killer) et par cet intermédiaire pourrait exercer des effets indirects sur l'hématopoïèse.

#### ■ Cytokines hybrides :

Une seconde génération de cytokines apparaît actuellement. Il s'agit de molécules hybrides artificielles obtenues par recombinaison génétique. Ainsi une équipe a synthétisé une molécule appelée hybride PIXY, produit des ADN complémentaires du GM-CSF et de l'IL-3. Cette molécule apparaît in vitro plus active que l'association de GM et d'IL-3 en stimulant notamment les progéniteurs mégacaryocytaires. Cette observation ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques notamment pour la reconstitution hématopoïétique effectuée à partir de cellules souches purifiées [46].

#### 1-3-3-4- Récepteurs de facteurs de croissance :

L'activité fonctionnelle des cytokines s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs exprimés à la des cellules répondantes. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne une cascade d'événements intracellulaires secondaires à l'activation des protéines intermédiaires appelées seconds messagers, porteuses des signaux de transduction. L'aboutissement intracellulaire de ces événements est l'activation ou l'inhibition de gènes contrôlant la prolifération, la différenciation et certains aspects de l'activation cellulaire.

Les récepteurs appartiennent à une «super famille de récepteurs hématopoïétiques» dont la structure comporte un domaine extracellulaire responsable de la fixation du ligand, un domaine transmembranaire et intracytoplasmique responsable de l'enclenchement de la transduction du signal.

La majorité des récepteurs se présente sous forme dimérique (homo-ou hétérodimère). Dans certains cas, une des 2 chaînes de l'hétérodimère peut être commune à plusieurs récepteurs. Ainsi, les récepteurs à l'IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF sont chez l'homme constitués par une chaîne  $\alpha$  spécifique de chaque ligand ( $\alpha$ GM,  $\alpha$ -IL-3,  $\alpha$ -IL-5) et d'une chaîne commune  $\beta$  de 20 Kd commune pour les 3. Cette chaîne commune est en fait liée au récepteur  $\beta$  lors de la fixation du facteur spécifique. Cela explique la compétition possible entre les facteurs et représente un niveau de régulation dans l'engagement de différenciation. En effet, la fixation première de l'un d'entre eux mobilise la chaîne  $\beta$ , qui n'est plus disponible pour l'association avec une autre chaîne  $\alpha$ . Ainsi, même en présence d'autres facteurs, la cellule restera « engagée » selon le premier stimulus [47].

Dans d'autres cas, comme celui du récepteur du G-CSF ou de l'érythropoïétine une seule chaîne a été identifiée et semble suffisante pour transmettre le signal après fixation du facteur.

Des exemples de récepteurs homodimériques sont constitués par le récepteur du CSF1, du SCF et d'une famille de récepteur à activité tyrosine kinase dont tous les ligands ne sont pas encore identifiés. En règle générale l'expression des récepteurs est associée à la possibilité d'activer spécifiquement ces cellules par les cytokines spécifiques.

Un autre niveau de complexité est créé par la présence de récepteurs solubles (IL-6, IL-2 par exemple), dont l'expression est modulée non seulement par leur ligand spécifique mais aussi par d'autres cytokines. Ainsi, le TNF $\alpha$  induit une modulation positive du récepteur au GM-CSF, expliquant ainsi la synergie TNF $\alpha$ -GM-CSF [48].

#### 1-3-4- Cytokines et sepsis graves :

Au cours d'un état septique grave, pratiquement tous les gènes qui codent pour des cytokines sont activés. Le but primaire est de monter une réponse inflammatoire pour combattre l'infection, mais il arrive qu'une activation anarchique des signaux échappe aux contrôles de l'organisme. Les raisons de cet emballement sont peu claires car les mécanismes complexes de régulation des cytokines sont encore mal connus. Les effets métaboliques des cytokines, leur capacité à induire la synthèse de molécules d'adhérence endothéliale et à activer les neutrophiles, peuvent aboutir au tableau du choc septique. Les cytokines jouant un rôle majeur dans ce contexte sont le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF) et l'interleukine-1 (IL-1), dont l'injection peut produire un choc létal dans des modèles expérimentaux. Il est difficile de dissocier les effets de ces 2 protéines, car elles exercent de nombreux effets biologiques identiques, l'une peut induire la synthèse de l'autre, et elles sont puissamment synergiques. L'interféron  $\gamma$ , qui stimule les cellules de la lignée monocyttaire et qui augmente l'expression des récepteurs au TNF, pourrait également participer à la pathogenèse de ce syndrome en amplifiant la réponse inflammatoire. La contribution des autres cytokines est encore insuffisamment étudiée. Des études cliniques sont en cours avec des anticorps monoclonaux anti-TNF et avec un antagoniste du récepteur de l'IL-1 [49].

##### 1-3-4-1- TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$ :

À faible concentration, le TNF est bénéfique au niveau du site infectieux en orchestrant l'inflammation locale. Il semble particulièrement important dans la défense contre les pathogènes intracellulaires tels que *Listeria monocytogenes*. Cependant, de nombreuses études l'impliquent comme un facteur défavorable dans le pronostic du syndrome septique. On pense généralement que c'est de sa production exagérée que naissent la destruction tissulaire et le choc létal.

## ■ Rôle du TNF dans le syndrome septique à bactéries à Gram négatif :

Il y a au moins 3 types d'arguments qui plaident pour un rôle central du TNF dans ce syndrome

### \* Induction de TNF in vitro et in vivo par l'endotoxine :

Expérimentalement, du TNF est produit in vitro par les cellules de la lignée monocytaire, ainsi que par d'autres cellules, en réponse à une exposition au lipopolysaccharide (LPS) ou endotoxine, du TNF apparaît dans le sérum avant toute autre cytokine chez l'animal et chez l'homme. Le TNF est détectable déjà après 30 minutes, avec un maximum après 1 à 2 heures. La concentration plasmatique diminue ensuite rapidement, et le TNF n'est plus détectable après 4 à 6 heures. L'IL-1 et l'IL-6 apparaissent un peu plus tardivement (fig n°6).

### \* Effets biologiques de l'infection de TNF :

L'injection de TNF chez l'animal et chez l'homme imite en bien des aspects les événements observés au cours du choc septique. L'injection de TNF recombinant humain à des rats ou à des chiens en quantité semblable à celle qui est produite en réponse à l'endotoxine s'accompagne d'une hypotension, d'une acidose métabolique, d'une hémocoagulation et d'une issue fatale en quelques heures. Lorsque le TNF recombinant a été administré à des malades dans le cadre de traitements anticancéreux, on a pu observer des symptômes et des réponses métaboliques semblables à ceux qui sont induits par l'administration d'endotoxine [50]. Ces approches directes impliquent le TNF comme un médiateur pathogène du syndrome septique.

### \* Effets protecteur des anticorps anti-TNF dans des modèles de choc septique à bacilles à Gram négatif :

Les anticorps anti-TNF protègent de manière très nette contre les conséquences fatales de l'injection d'endotoxine chez la souris ou le lapin. Ils protègent également des effets mortels d'une courte perfusion intraveineuse d'*Escherichia coli* chez le babouin. Ces expériences constituent l'argument le plus fort en faveur d'un rôle central du TNF dans le syndrome septique. Cependant, il faut remarquer que les modèles utilisés s'éloignent considérablement de la situation des malades en choc septique.

En effet, l'injection en bolus d'endotoxine ou de bactéries produit un pic transitoire très élevé de TNF (fig n°7), atteignant plusieurs dizaines de ng/ml. Dans ces modèles, l'issue fatale survient habituellement après ce pic, alors que le TNF n'est généralement plus détectable dans le sérum. Au contraire, chez les malades en choc septique, à l'exception peut être des méningococcémies fulminantes, le TNF n'apparaît pas en pic, mais persiste dans le sérum de manière prolongée à des concentrations habituellement inférieures à 1 ng/ml [51].

#### ■ Rôle du TNF dans les infections à coque à Gram positif :

Les bactéries à Gram positif ne synthétisent pas d'endotoxine, mais les manifestations qu'elles induisent sont très semblables à celles des bactéries à Gram négatif il apparaît aujourd'hui que de nombreux constituants du coque à Gram positif, tels les peptidoglycane, sont capables d'induire la production de TNF par les macrophages. Les études récentes suggèrent que le TNF est un médiateur d'un choc létal produit par des bactéries à Gram positif aussi bien les modèles expérimentaux que chez l'homme.

#### 1-3-4-2- Interleukine-1 :

Dans les maladies causées par des bactéries intracellulaires, l'IL-1 se comporte comme le TNF, participant clairement à la défense. Dans le syndrome septique, les arguments concernant le rôle du TNF peuvent être repris pratiquement intégralement pour l'IL-1. En effet, les macrophages mis en présence d'endotoxine sécrètent de l'IL-1 et l'injection de LPS ou de bactéries déclenche la libération d'IL-1 in vivo [52]. Les organismes à Gram positif, particulièrement les streptocoques, stimulent également la production d'IL-1 comme de TNF, en particulier par leurs exotoxines. Presque toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser de l'IL-1, l'injection d'IL-1 recombinante à des animaux produit une hypotension, une diminution des résistances systémiques vasculaires et augmentation du débit cardiaque. Ces résultats ne constituent pas à proprement dire une surprise, si l'on compare la liste impressionnante des effets biologiques de ces deux cytokines (tableau n°6). En outre, une cytokine peut induire la synthèse de l'autre au niveau du macrophage. Comme la plupart des cellules possèdent des récepteurs pour les 2 cytokines, il est extrêmement difficile de dissocier leurs actions individuelles, et le plus souvent on assiste à un synergisme entre les deux. La raison d'être d'une telle redondance n'est pas établie.

Contrairement à ce qui est observé pour le TNF, il n'est pas facile d'obtenir des anticorps monoclonaux capables de bloquer l'activité biologique de l'IL-1. Cependant, il existe des inhibiteurs naturels détectables notamment dans le sérum de volontaires humains après injection d'endotoxine, et dans l'urine de patients fébriles. Un de ces inhibiteurs, appelé *IL-1 receptor antagonist* (IL-1ra), a été purifié à partir d'urine de patients atteints de leucémie monocyttaire. La protéine recombinante bloque la liaison de l'IL-1 à son récepteur et ne possède pas d'effet agoniste propre [53]. L'IL-1ra s'est montré efficace dans des modèles de choc induit par le LPS ou par des injections intraveineuses d'*Escherichia coli*.

#### 1-3-4-3- Interféron- $\gamma$ :

L'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) appartient à une famille de protéines impliquées dans la défense contre les infections virales. Il joue également un rôle bien établi dans l'élimination des bactéries et des parasites intra-cellulaire. Cette cytokine, produite essentiellement par les lymphocytes T et les cellules NK (*natural killer*), possède une moins bonne activité antivirale (10 à 100 fois moindre) mais une meilleure activité immuno-modulatrice (100 à 10000 fois supérieure) que les interférons  $\alpha$  et  $\beta$ . Bien que le stimulus majeur paraisse être l'antigène présenté à la cellule T dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité, il semble que des molécules bactériennes non encore identifiées pourrait stimuler *in vivo* et *in vitro* les cellules NK à produire de l'IFN- $\gamma$ . Le monocyte étant la cible privilégiée de l'IFN- $\gamma$ , celui-ci intervient sur la cascade des cytokines d'origine monocyttaire. Des macrophages traités par de l'IFN- $\gamma$  produisent plus de TNF que des macrophages naïfs lorsqu'on les stimule avec du LPS. En outre, l'IFN- $\gamma$  augmente l'expression des récepteurs au TNF. L'IFN- $\gamma$ , s'il n'est généralement pas considéré en soit comme un médiateur pro-inflammatoire, peut donc produire un synergisme puissant avec le TNF [54].

Un des effets biologiques les plus délétères de l'endotoxine est son activation des phénomènes de la coagulation. Cet effet classique a été décrit il y a bien des années par Shwartzman, qui a établi un modèle expérimental qui porte maintenant son nom. Dans la réaction de Shwartzman dite locale, une première dose d'endotoxine est injectée dans le derme, puis une seconde dose est administrée par voie intraveineuse 12 à 18 heures plus tard.

**TABLEAU 6****Effets biologiques du tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) et de l'interleukine-1 (IL-1) impliqués dans la pathogenèse du syndrome septique.**

[ J.D.Baumgartner et al., 1993 ]

Activité biologique	IL-1	TNF
Pyrogène endogène	-	+
Activation des monocytes	-	+
Adhésivité des cellules endothéliales	-	+
Induction de <i>colony-stimulating factors</i>	+	+
Résistance non spécifique à l'infection	+	+
Induction de l'IL-1, TNF, IL-6 et l'IL-8	+	+
Induction de protéines hépatiques de phase aiguë	+	+
Induction de la cyclo-oxygénase	+	+
Lipolyse-cachexie	+	+
Réaction de Shwartzman	+	+
Neutrophilie	+	+
Induction d'états de choc	+	+
Libération de corticotrophine hypothalamique (ACTH)	+	-
Libération d'ACTH et de glucocorticoïdes surrénaux	+	-
Production d'insuline	+	-
Stimulation des précurseurs hématopoïétiques	+	-
Différenciation des précurseurs hématopoïétiques	-	+
Activation des neutrophiles	-	+

En quelque heures, une zone de nécrose hémorragique se produit au site cutané préparé par l'injection intradermique. Cette réaction est très semblable au purpura qu'on observe dans les méningococcémies fulminantes. Le mécanisme de cette réaction n'est encore que partiellement connu mais il est certain que des cytokines et des molécules d'adhérence induites sur les cellules endothéliales par l'injection intradermique d'endotoxine jouent un rôle important. On a montré récemment que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle aggravant dans la réaction de Shwartzman induite par le LPS chez la souris [55], de même que dans d'autres modèles d'endotoxémie où l'addition d'IFN- $\gamma$  sensibilise au LPS et accroît la mortalité, alors que des anticorps neutralisant l'IFN- $\gamma$  protègent [56]. Nous avons retrouvé des résultats similaires dans un modèle de bactériémie à *Escherichia coli* induite par une péritonite chez la souris [G, Zanetti et al]. Cette observation que la survie peut être améliorée en bloquant l'IFN- $\gamma$  peut être importante, car le blocage du TNF n'apporte aucune amélioration dans ce même modèle [56].

#### 1-3-4-4- Autres cytokines :

Outre le TNF, l'IL-1 et l'IFN $\gamma$ , d'autres cytokines jouent également un rôle non négligeable dans le syndrome septique [57]. L'interleukine-6 (IL-6) est produite par de nombreuses cellules après une stimulation bactérienne. Elle déclenche la production de protéines de phase aiguë par l'hépatocyte, l'IL-6 en soi ne semble pas toxique pour l'organisme et son rôle exact dans le syndrome septique reste à définir. On peut la considérer comme un marqueur du pronostic aussi valable que le TNF.

Par leurs propriétés pro-inflammatoires, les cytokines de la famille des médiateurs Chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes (l'IL-8 et ses dérivés apparentés) interviennent dans les syndromes septiques. Ces facteurs sont synthétisés par de très nombreuses cellules incluant les macrophages et les cellules endothéliales, en réponse au LPS mais également au TNF et à l'IL-1 [58]. Ces molécules stimulent la migration des neutrophiles et leur dégranulation in vivo, phénomènes bien étudiés dans le syndrome de détresse respiratoire qui accompagne souvent le choc septique. S'il est évident que les neutrophiles ont une position essentielle dans les mécanismes de défense, l'infiltration leucocytaire et le relargage de produits toxiques jouent un rôle certain dans la physiopathologie du syndrome septique.



Il reste à mentionner l'existence d'autres cytokines, primitivement anti-inflamma-toires, telles l'interleukine-4, l'interleukine-10 ou le TGF $\beta$  (*transforming growth factor*), qui ont toutes une action inhibitrice du TNF ou de l'IL-1. En ce qui concerne le syndrome septique, ce champ d'investigation reste totalement ouvert.

### 1-3-5- Cytokines et sida :

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est à l'origine d'anomalies de production des cytokines.[59]. Certains d'entre elles (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , interférons  $\alpha$  et  $\gamma$ ) sont produites en quantité accrue in vivo, tandis que la production d'IL-2 est inhibée. Cette dernière anomalie joue certainement un rôle important dans le déficit immunitaire. Certaines cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) stimulent la multiplication du VIH in vitro, tandis que d'autres (les interférons) l'inhibent. L'effet des cytokines sur la propagation virale in vivo reste cependant très mal connu. Les cytokines pourraient également être des médiateurs impliqués dans le développement des manifestations cliniques du sida. L'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  pourrait induire les lésions tissulaires accompagnant les infections opportunistes et l'encéphalopathie liée au virus.




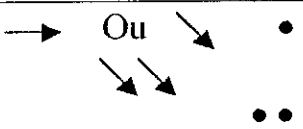


Des cytokines, et principalement l'IL-6, pourraient stimuler la croissance des cellules tumorales au cours des sarcomes de Kaposi et des lymphomes. La meilleure connaissance du rôle des cytokines au cours de l'infection par le VIH permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques utilisant soit des cytokines recombinantes, soit des antagonistes spécifiques, dans le but de limiter à la fois la propagation du virus et les manifestations cliniques de l'infection.

Les interactions existant entre le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) et le système immunitaire sont de deux ordres. D'une part, la multiplication du VIH au sein de l'organisme infecté est à l'origine d'une réponse immunitaire dont le but ultime est de limiter la propagation de l'agent infectieux. D'autre part, le VIH est responsable d'une destruction progressive de ce système immunitaire. Cette dualité se retrouve au niveau des interactions entre le VIH et les cytokines, qui sont les médiateurs majeurs du système immunitaire. Les cytokines sont en effet impliquées dans les mécanismes de défense antivirale et leur production est altérée du fait de l'immuno-déficience induite par le virus (tableau n°7) [60].

**TABLEAU 7**

**Effet du VIH sur la production de cytokines**

[ D.EMILLE, P.GALANAUD.,1993 ]

Cytokine	Effet du VIH	Principales cellules productrices
IL-1		Cellules endothéliales et macrophages
IL-6		Cellules endothéliales et macrophages
TNF- $\alpha$		Macrophages
IL-2		Lymphocytes T auxiliaires
IFN- $\gamma$		Lymphocytes T auxiliaires Lymphocytes T cytotoxiques
IFN- $\alpha$		Multiplès

• : Stade précoce de l'infection (I-III de la classification CDC)

•• : Stade IV de la classification CDC

De plus, les cytokines pourraient jouer un rôle dans le développement de certaines des complications de l'infection par le VIH.

### 1-3-5-1- VIH et Monokines :

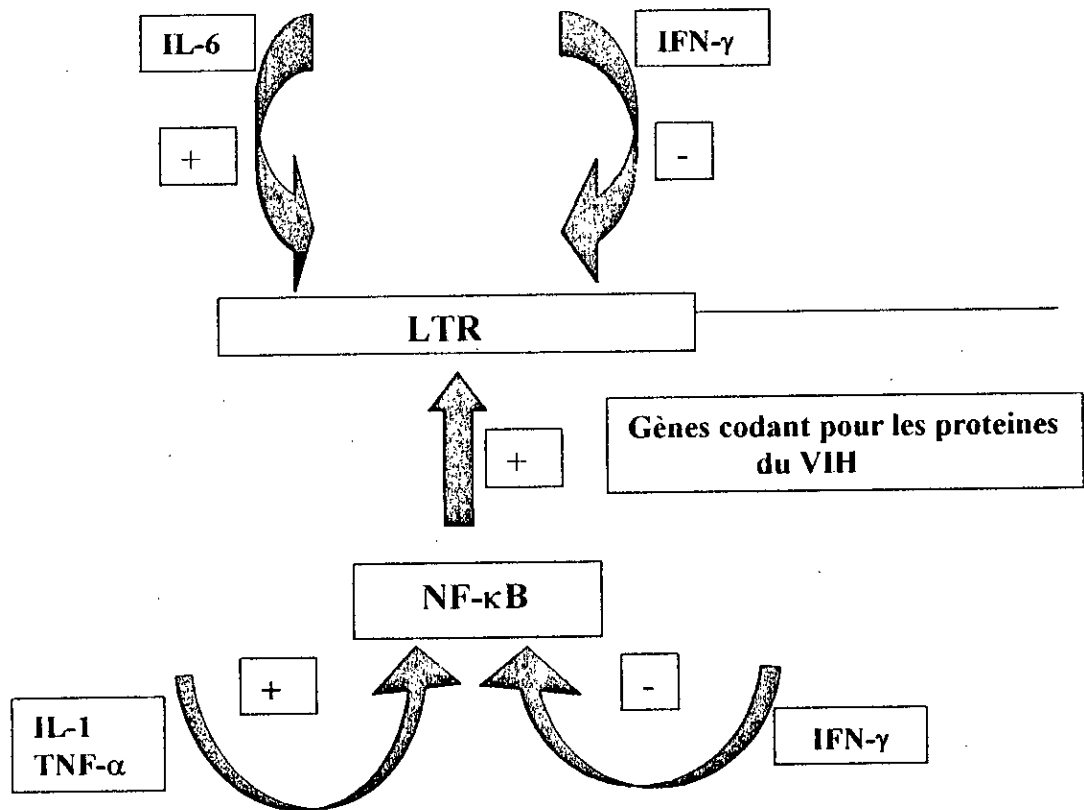
#### ■ VIH et production de monokines :

In vitro, le VIH stimule la production des 3 principales cytokines des monocytes (monokines) : l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6 et le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Des monocytes sanguins de sujets normaux produisent des quantités plus élevées de monokines lorsqu'ils sont cultivés en présence du VIH. Cet effet est relayé par la protéine d'enveloppe du virus. Qui interagit avec la molécule CD4 présente à la surface des monocytes.

Les monocytes provenant de patients séropositifs produisent des quantités élevées des 3 monokines lorsqu'ils sont cultivés in vitro, ce qui reflète leur préactivation in vivo par le VIH. De même, les concentrations circulantes de monokines sont plus élevées chez des patients séropositifs que chez des sujets témoins [61]. Des expériences d'hybridation in situ ont montré que les monocytes-macrophages et les cellules endothéliales sont responsables de cette production in vivo. Ce fait n'est nullement spécifique de l'infection par le VIH, car il est retrouvé au cours de la plupart des infections virales. Cela indique que, à côté de l'interaction spécifique des protéines d'enveloppe du VIH et de CD4, il doit exister d'autres mécanismes de stimulation de la production de monokines, mécanismes communs quel que soit l'agent viral impliqué.

#### ■ Monokines et multiplication du VIH :

Les trois monokines stimulent la multiplication du VIH in vitro par des mécanismes différents. L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  activent un facteur cellulaire appelé NF- $\kappa$ B. Ce dernier stimule l'expression des gènes viraux en se fixant sur des séquences régulatrices d'ADN contenues au niveau du LTR ( *long terminal repeat* ) du virus (fig n°7). L'IL-6 agit à la fois en stimulant la production d'ARN viral et en prolongeant sa demi-vie. Cet effet potentiateur des monokines sur la multiplication du VIH in vitro n'est cependant pas dans tous les modèles expérimentaux. Le rôle réel, in vivo, des monokines sur la multiplication du VIH reste à préciser.



**Figure 7 : Cytokines et séquences régulatrices du VIH**  
 [ Rev prat (Paris) 1993 [ D.EMILLE, P.GALANAUD ] ]

■ Monokines et hyperactivation lymphocytaire B :

L'infection par le VIH se caractérise par une hyperactivation lymphocytaire B, responsable d'une hyper-gamma-globulinémie polyclonale, de manifestations auto-immunes par auto-anticorps et de syndromes lymphoprolifératifs B. Des lymphocytes B venant de patients séropositifs et cultivés in vitro produisent des quantités anormales d'immunoglobulines. Cette hyperactivité lymphocytaire B est en grande partie secondaire à la production accrue d'IL-6 par les monocytes des patients [62].

L'IL-6 produite en excès in vivo au cours de l'infection pourrait donc être à l'origine de certaines des manifestations cliniques de l'infection, comme le suggère également l'existence d'une corrélation positive entre les concentrations sériques d'IL-6 et d'immunoglobulines chez les patients séropositifs.

### 1-3-5-2- VIH et interleukine-2 :

#### ■ VIH et production d'IL-2 :

Il existe in vitro un déficit de production d'IL-2 par les lymphocytes T auxiliaires des patients séropositifs. Ce déficit a 2 origines. D'une part, il traduit la diminution du nombre de lymphocytes T auxiliaire, exprimant le marqueur CD4+, à un stade relativement avancé de la maladie. D'autre part, il est lié à des anomalies fonctionnelles de ces mêmes lymphocytes, qui apparaissent beaucoup plus précocement. Le déficit des lymphocytes T auxiliaires touche principalement les lymphocytes T mémoires (reconnaissant des antigènes ayant déjà été en contact avec l'organisme), ce qui reflète probablement l'infection préférentielle de ces mêmes lymphocytes T mémoires par le virus. Cela pourrait rendre compte du caractère sélectif du déficit immunitaire à un stade précoce de l'infection, affectant principalement les réactions cutanées d'hypersensibilité retardée, à la tuberculine par exemple. A l'inverse, la production in situ d'IL-2 n'est pas significativement diminuée au cours des syndromes polyadénopathiques liés au VIH, par comparaison avec d'autres adénopathies infectieuses. Ainsi, le déficit de la production d'IL-2 par les lymphocytes T auxiliaires est à la fois dépendant du stade de la maladie et de l'antigène en cause, affectant initialement un nombre limité de réponses immunitaires avant de devenir global. Dans les 2 cas, ce déficit joue un rôle majeur dans les manifestations de déficience immunitaire caractéristiques de la maladie.

#### ■ Rôle de l'IL-2 dans le déficit immunitaire et la multiplication du VIH :

L'IL-2 est en effet, par son rôle amplificateur des réponses immunitaires, l'intermédiaire obligé pour la quasi-totalité des mécanismes de défense immunitaire. La stimulation de la réponse immunitaire de patients séropositifs par administration d'IL-2 recombinante en vue d'améliorer les défenses anti-infectieuses et antitumorales, a été envisagée par différents groupes.

Une telle approche doit tenir compte du risque théorique d'une multiplication accrue du VIH. In vitro, le virus se réplique en effet d'autant mieux que les lymphocytes qui l'hébergent sont activés. Il apparaît cependant que la stimulation lymphocytaire T induite par l'IL-2 ne favorise pas la multiplication du VIH, au contraire de la stimulation transmise par le récepteur pour l'antigène. Des résultats préliminaires indiquent que des faibles doses d'IL-2 administrées par voie sous-cutanée restaurent les réactions cutanées, tout en n'augmentant pas la multiplication du VIH. De même, le niveau de multiplication du VIH ne serait pas sensiblement modifié au cours des traitements de syndromes lymphoprolifératifs associant Zidovudine (rétrovir) et fortes doses d'IL-2.

### 1-3-5-3- VIH et interférons :

#### ■ VIH et interféron- $\gamma$ :

L'interféron- $\gamma$  peut être produit soit par les lymphocytes T CD4+, soit par les lymphocytes T CD8+. Dans le premier cas, l'interféron- $\gamma$  semble surtout jouer un rôle dans les mécanismes de défenses contre les agents pathogènes à développement intracellulaire (mycobactéries en particulier), et contre les infections virales dans le second cas. Comme pour la production d'IL-2, le VIH inhibe la production d'interféron- $\gamma$  in vitro par les lymphocytes T CD4+. En revanche, il existe une élévation de concentrations sériques d'interféron- $\gamma$  chez les patients. Ce paradoxe reflète l'existence d'une vigoureuse réponse immunitaire anti VIH où les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques occupent une place prépondérante et produisent de l'interféron- $\gamma$  au contact des cellules infectées. Cette production accrue disparaît au stade ultime de la maladie, lorsque s'effondre la réponse immunitaire antivirale.

L'interféron- $\gamma$  a in vitro un effet inhibiteur direct sur la multiplication du VIH. Le mécanisme de cet effet est complexe. Il associe d'une part une inhibition de la production des protéines virales, due à un effet antagoniste de l'interféron- $\gamma$  sur la transactivation du LTR viral (fig n°1), par la protéine du virus et d'autre part une inhibition de la fusion entre les cellules infectées et les cellules CD4+ non infectées. Des études préliminaires suggèrent que l'administration à des fins thérapeutiques d'interféron- $\gamma$  pourrait entraîner chez certains patients une diminution de la charge virale, tout en diminuant la fréquence des infections opportunistes [63].

### ■ VIH et interférons- $\alpha$ et $\beta$ :

L'effet inhibiteur de l'interféron- $\alpha$  sur la multiplication du VIH est à souligner. En effet, l'interféron- $\alpha$  est à ce jour la seule cytokine dont l'administration in vivo chez des patients séropositifs s'est clairement accompagnée d'une inhibition de la production virale. Des essais thérapeutiques sont actuellement en cours pour situer la place de l'interféron- $\alpha$  par rapport aux autres substances antivirales. En particulier l'interféron- $\alpha$  pourrait avoir un effet synergique avec les analogues des nucléosides comme l'AZT, la DDC et la DDI. Cet effet serait principalement observé pour les patients traités précocement, ayant plus de 300 lymphocytes CD4+ circulants par mm<sup>3</sup>. Le mécanisme inhibiteur de l'interféron- $\alpha$  sur la multiplication du virus est unique. L'interféron- $\alpha$  agit tardivement au cours du cycle viral, en inhibant l'association des différents composants viraux lors de la formation de la particule virale. Cet effet pourrait varier selon les types d'interféron- $\alpha$  (il en existe plus de 20 différents). L'interféron- $\alpha$ 2b (intron A) serait de ceux ayant la plus forte activité anti-VIH in vitro. Outre cet effet tardif sur le cycle de multiplication du VIH, un effet plus précoce a été observé, et fait intervenir une inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B (fig n°1). L'interféron- $\beta$  aurait les mêmes propriétés anti-VIH que l'interféron- $\alpha$ .

### 1-3-5-4- VIH et GM-CSF :

Le GM-CSF par lui-même stimule la multiplication du VIH in vitro dans des macroPhages. Cependant, cet effet disparaît lorsque la culture cellulaire est réalisée en présence de Zidovudine. En effet, le GM-CSF augmente la transformation intra-cellulaire de la Zidovudine, précurseur inactif, en composé actif. In vivo des résultats préliminaires indiquent que, chez des patients traités par AZT, l'administration de GM-CSF à des posologies stimulant l'hématopoïèse n'augmente pas la réplication du VIH [63].

### 1-3-5-5- Cytokines et complications de l'infection par le VIH :

Les cytokines jouent un rôle dans le développement des diverses complications émaillant l'évolution de l'infection par le VIH.

### ■ Infections opportunistes :

La multiplication d'un agent infectieux *in vivo* entraîne une stimulation de la production de monokines par les macrophages. Ces monokines jouent un rôle dans le développement de lésions tissulaires, comme cela a été montré au cours des syndromes de détresse respiratoire aiguë. Un tel phénomène pourrait expliquer les perturbations de la membrane alvéolocapillaire observées au cours des pneumopathies à *Pneumocystis carinii*, qui s'accompagnent d'une importante production *in situ* de monokines.

### ■ Encéphalopathie VIH :

Le VIH se multiplie dans les cellules microgliales *in vivo*, et des cellules microgliales infectées *in vitro* produisent des monokines. Le rôle pathogène de la production intra cérébrale de cytokines (monokines et interféron- $\gamma$ ), démontré au cours d'encéphalopathies expérimentales chez l'animal et suspecté au cours de la sclérose en plaques, pourrait intervenir au cours de l'encéphalopathie induite par le VIH.

### ■ Sarcome de Kaposi :

Des lignées cellulaires obtenues à partir de sarcomes de Kaposi produisent un grand nombre de cytokines, dont certaines pourraient jouer un rôle dans la croissance de ces cellules, selon un mode autocrine. Cette hypothèse a principalement été évoquée pour l'IL-6 et pour l'oncostatine M ces 2 médiateurs se fixant sur une même protéine membranaire des cellules tumorales, gp 130. La production de ces cytokines *in situ* au cours des sarcomes de Kaposi et leur rôle dans la croissance des cellules tumorales *in vivo* restent cependant à démontrer. Par ailleurs, l'interféron- $\alpha$  induit une régression des lésions disséminées de sarcome de Kaposi dans 24 à 42 % des cas, la fréquence de cette régression dépendant avant tout du stade de la maladie VIH. L'interféron- $\gamma$  aurait le même effet.

### ■ Lymphomes :

L'interleukine-6 est un puissant facteur de prolifération des lymphocytes B tumoraux. Or une production massive d'IL-6 est observée *in situ* au cours des lymphomes immuno-blastiques du Sida. Elle a pour origine les cellules non tumorales de tissu lymphomateux, et principalement les cellules endothéliales et les macrophages infiltrant la tumeur.



De plus, les cellules tumorales expriment le récepteur de l'IL-6, ce qui suggère que ce médiateur est effectivement impliqué dans la croissance des cellules lymphomateuses. Un tel mécanisme permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques visant à interrompre cette boucle de croissance, et justifiées par le pronostic fréquemment mauvais des lymphomes du Sida traités par chimiothérapie. En revanche, les lymphomes de Burkitt du Sida pourrait croître du fait d'une production autocrine d'IL-10, un autre facteur de croissance des lymphocytes B tumoraux.

### 1-3-6- Cytokines et hépatites :

Le traitement des infections chroniques du foie par le virus B et C est représenté actuellement par l'interféron. L'utilisation de cette cytokine est une avancée majeure dans le traitement des infections chroniques liées au virus B puisqu'on observe une disparition de la multiplication virale dans 30 à 40 % des cas. L'interféron est actif dans le traitement des infections chroniques par le virus C dans 60 à 70 % des cas, avec une normalisation des transaminases, mais cet effet disparaît après l'interruption du traitement et un effet durable n'est observé que dans 20 % des cas. Ces résultats démontrent la nécessité d'études cliniques pour préciser les indications de ce traitement.

#### ■ Cytokines utilisées et leurs effets physiologiques :

Les interférons sont des protéines qui possèdent une activité antivirale, antiproliférante et des effets modulateurs de l'immunité. L'interféron  $\alpha$  est produit par les monocytes et les cellules B en réponse à une infection virale. Il s'agit de protéines hétérogènes de masse moléculaire comprise entre 16 et 27 Kilodaltons (Kda). On connaît au moins 15 gènes d'interférons  $\alpha$  fonctionnels, tous situés sur le chromosome 9. Actuellement sont disponibles des interféron  $\alpha$  lymphoblastoïde purifié (wellféron).

L'interféron  $\beta$  est sécrété par les fibroblastes; il est le produit d'un seul gène situé sur le chromosome 9, et a une masse moléculaire de 20kDa. Il est induit par des polyribo-nucléotides ou une infection virale. L'homologie des gènes de l'interféron  $\alpha$  est de 85 à 98 %, et celle des interférons  $\alpha$  et  $\beta$  de 45%.

À l'inverse, l'interféron  $\gamma$  est produit par un seul gène situé sur le chromosome 12 qui comporte 3 introns. La production d'interféron  $\gamma$  par les cellules T est induite par des antigènes et des mitogènes divers.

Les récepteurs des interférons  $\alpha$  et  $\beta$  sont identiques, leur gène est situé sur le chromosome 21. Par contre le gène du récepteur de l'interféron  $\gamma$  est situé sur le chromosome 6.

Les interférons mis en présence de cellules induisent la production de multiples protéines qui relaient leurs effets immuno-modulateur et antiviral. Les mieux caractérisées sont 2'-5' oligo-adenylate synthétase, et une protéine kinase. Ces deux enzymes sont impliquées dans l'action antivirale de l'interféron. L'interféron induit aussi la production des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA) et des facteurs épidermiques de croissance comme les *transforming growth factors* (TGF)  $\alpha$  et  $\beta$  et le facteur nécrosant des tumeurs (*tumor necrosis factor*, TNF  $\alpha$ ).

La sécrétion de ces différentes protéines est responsable de l'effet immuno-modulateur de l'interféron, et leurs effets biologiques sont l'objet d'études au cours des traitements par l'interféron [64]. L'effet immuno-modulateur de l'interféron  $\gamma$  semble primer sur son effet antiviral, alors que l'effet antiviral des interférons sont très fréquents : syndrome pseudo-grippal, insuffisance médullaire, phénomènes auto-immuns comme la production d'auto-anticorps et des atteintes thyroïdiennes auto-immunes; la fréquence des infections, favorisées par la leucopénie est augmentée, et des effets psychiatriques de type dépressif sont décrits. La thymosine qui est un extrait de thymus purifié, a pour rôle de favoriser la maturation des lymphocytes, et de ce fait d'induire la sécrétion naturelle d'interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  et d'interleukine-2; elle est donc susceptible de diminuer l'importance de la cytotoxicité à médiation cellulaire, et d'augmenter la production d'interféron  $\gamma$  par les cellules mononucléés; de plus elle serait dotée d'action antivirale propre [65].

### 1-3-7- Cytokines et hémopathies malignes : leucémies et greffe de moelle osseuse :

Les cytokines font désormais partie de l'arsenal thérapeutique moderne des hémopathies Malignes.

Les facteurs de croissance hématopoïétique, essentiellement leucocytaires (G-CSF ; GM-CSF ; interleukine 3), réduisent la morbidité infectieuse associée à la neutropénie profonde et prolongée induite par les conditionnements myélo-ablatifs des greffes de moelle osseuse autologues ou allogéniques et invitent à l'extension de leurs indications. Les réticences à leur utilisation dans la chimiothérapie des leucémies aiguës myéloïdes sont amoindries par la conservation du taux de réponses complètes et par la diminution de la durée de neutropénie qu'elles permettent d'obtenir. De plus, leur activité de modificateurs de la réponse biologique leucémique permet l'augmentation de la cytotoxicité de certains médicaments, ouvre de nouvelles voies dans la lutte contre la résistance leucémique [66].

Les cytokines immuno-modulatrices (interférons  $\alpha$  et  $\gamma$ , interleukine 2) agissent par des mécanismes encore mal définis : activité antitumorale, modulation des réponses biologiques, immuno-activation. Néanmoins, l'interféron  $\alpha$  a bouleversé le traitement des leucémies à tricholeucocytes et des leucémies myéloïdes avec l'obtention de 70 % de rémission. La rareté des réponses complètes (10 % des leucémies à tricholeucocytes) ou cytogénétiques (20 % des leucémies myéloïdes chroniques) justifie la combinaison de stratégies (chimiothérapie et immunothérapie) pour améliorer le taux de guérison. L'activité antileucémique de l'interleukine 2 observée en situation de rechute réfractaire aboutit à 33 % de réponses dont 10 % sont complètes et invite à tester l'impact de l'immunothérapie sur le contrôle de la maladie résiduelle leucémique en adjuvant de la rémission complète au cours d'études randomisées.

#### 1-3-8- Cytokines et tumeurs solides :

Les différentes cytokines pouvant être utilisées dans le traitement des tumeurs solides sont présentées. Ce sont des facteurs de prolifération ou de différenciation de l'hématopoïèse ou de l'immunopoïèse ; elles stimulent les cellules effectrices de la réponse antitumorale. Les différentes étapes permettant le développement préclinique et clinique d'une cytokine dans le domaine de la cancérologie sont développées en prenant l'exemple de l'interleukine 2 (IL-2). Les résultats des essais cliniques rapportés (essentiellement avec les interférons et l'IL-2) sont présentés et discutés [67].

#### 1-3-9- Les cytokines et transfusion sanguine :

Au cours des dernières années, les performances des techniques de

déleucocytation ont considérablement évolué, rendant à la fois beaucoup plus accessible à la pratique transfusionnelle et beaucoup plus performantes. Dans la même période, la progression des connaissances sur les effets secondaires des leucocytes présents dans les produits sanguins cellulaires a bouleversé les arguments en faveur de l'extension de la déleucocytation.

Les leucocytes provoquent indirectement des lésions de conservation des globules rouges ou des plaquettes en raison de leurs besoins énergétiques et leur lyse progressive. Cette destruction cellulaire aboutit à la libération de cytokines, à l'origine de réactions d'intolérance de type frissons-hyperthermie.

#### ■ Déleucocytation et réactions fébriles post-transfusionnelles :

Le syndrome frisson-hyperthermie, ou réaction fébrile non hémolytique est définie comme une élévation thermique de 1°C ou plus, survenant en même temps que la transfusion, ou à son décours immédiat, après que les autres étiologies de fièvre aient été exclues.

Des études menées dans les années cinquante avaient établi une très forte corrélation entre les réactions de type frisson-hyperthermie à la suite de transfusion de sang total et la présence d'anticorps dirigés contre les leucocytes.

Il est bien établi aujourd'hui que les réactions de frisson-hyperthermie sont non seulement corrélées avec la présence d'anticorps anti-HLA ou anti-granuleux, et donc dans ce cas à la lyse des leucocytes présents dans les produits sanguins, mais qu'elles sont au moins aussi souvent présentes en dehors de toute immunisation. De données plus récentes ont établi une forte corrélation, bien démontrée dans le cas des produits plaquettaires, n'est pas établie avec autant de certitude dans le cas des CGR.

#### ■ Déleucocytation et lésions de conservation :

La déleucocytation, à condition d'être pratiquée précocement après le prélèvement de sang du donneur, permet de diminuer les lésions de stockage des globules rouges. L'influence de la présence de leucocytes sur les lésions de conservation des plaquettes a également été démontrée : l'étude de CP ayant des contenus croissants en leucocytes a montré une forte corrélation entre la concentration leucocytaire et la chute du PH, la consommation de glucose, la production de lactate, et le relargage de LDH au cours de la conservation.

Des travaux plus récents ont montré que la présence de leucocytes est corrélée avec l'accumulation de cytokines d'origine leucocytaire, dans les CP et également dans le surnageant des CGR.

### 1-3-10-Anti-cytokines et anti-récepteurs de cytokine :

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans la réponse immune. Parmi elles, l'interleukine 2 et ses récepteurs spécifiques sont les mieux connus. Les anticorps monoclonaux antirécepteurs de l'interleukine 2 ont tout d'abord permis de caractériser ce récepteur, puis ils ont confirmé le rôle majeur de cette cytokine dans la réponse immune se montrant efficaces dans de nombreux modèles animaux comme la réaction d'allogreffe la réaction d'hypersensibilité retardée et certaines maladies auto-immunes expérimentales. Ces résultats confirmés chez l'homme, surtout en transplantation rénale (mais aussi en transplantation de moelle) encourageant à développer de nouveaux bioréactifs (anticorps chimères, anticorps « humanisés » et protéines de fusion). Certains de ces réactifs sont déjà en cours d'évaluation clinique en transplantation rénale. Les principes de ces bioréactifs, issus de la biologie moléculaire, sont transposables à d'autres cytokines impliquées dans les mécanismes immuno-pathologiques de certaines maladies comme par exemple l'interleukine 6 et son rôle dans le développement du myélome. Les données de l'immuno-intervention dirigée contre d'autres cytokines restent encore trop préliminaires mais de nombreuses cibles potentielles émergent (interleukines 1 et 4, tumor necrosis factor  $\alpha$ , interféron  $\gamma$ ).

#### 1-3-10-1- Interleukine 2 et récepteur de l'interleukine 2 :

Le rôle central de l'IL-2 de son récepteur (RIL2) dans le rejet d'allogreffe, dans la réaction du greffon contre l'hôte et dans de nombreuses maladies auto-immunes est bien établi. Le RIL2 de haute affinité est composé d'au moins deux chaînes polypeptidiques liées de façon non covalente, la chaîne  $\alpha$ , ou p55 (récepteur d'affinité intermédiaire). L'interaction de l'IL-2 avec ce complexe P55-P75 déclenche la différenciation et l'expansion clonale de la réponse immune. Seule la chaîne P55 est inductible après une stimulation des lymphocytes T (par des lectines, des antigènes, etc.). Elle représente uniquement sur des lymphocytes T activées.

### ■ Protéines de fusion anti-RIL2 :

Des techniques récentes de biologie moléculaire ont permis de réaliser la fusion du gène codant pour l'IL-2 humaine et de celui codant pour l'IL-2 humaine et de celui codant pour une toxine d'origine bactérienne (le segment codant pour le domaine de fixation membranaire de la toxine étant remplacé par le gène de l'IL-2).

Deux molécules de fusion sont à l'étude ; l'IL-2-toxine diphtérique (DAB486-IL-2) et l'IL-2 exotoxine A du *Pseudomonas aeruginosa* (IL-2-PE40). Ces molécules appelées IL-2-toxines sont capables de reconnaître spécifiquement les cellules exprimant le RIL-2 et de les tuer grâce à l'action de la toxine après internalisation du complexe RIL-2/IL-2 toxine et clivage endosomal du fragment à activité enzymatique qui libère la toxine dans le cytoplasme et entraîne une inhibition de la synthèse protéique et la mort cellulaire. In vitro, ces protéines conservent les caractéristiques d'affinité de l'IL-2 pour ses récepteurs (RIL-2 de haute affinité notamment) et tuent sélectivement les cellules RIL-2-positives. In vivo, les IL-2-toxines inhibent la réaction d'hypersensibilité retardée, augmentent la survie des greffes cardiaques et des îlots pancréatiques. Les IL-2-toxines présentent cependant deux inconvénients qui risquent de limiter leur utilisation chez l'homme. D'une part, elles sont fortement immunogènes bien que la réponse immune de l'hôte dirigée contre la partie toxinique ne semble pas inhiber in vivo l'efficacité de la molécule, comme le démontrent les résultats de traitement par DAB486-IL-2 de souris pré-immunisées par la toxine diphtérique. D'autre part, elles s'accompagnent d'une importante toxicité aspécifique, quand elles sont utilisées à doses suprathérapeutiques chez l'animal : toxicité rénale, hépatique, pulmonaire et oculaire pour la DAB486-IL-2 et essentiellement hépatique pour l'IL-2-PE40 [69].

Un autre type de construction génétique issu de la biologie moléculaire a récemment été décrit. Il s'agit de l'assemblage de chaîne lourdes d'IgG ou d'IgM humaines où les parties variables sont remplacées par des molécules d'IL-2. Cette molécule artificielle, polymérique, permettrait de ponter les RIL-2 à la surface cellulaire, de tuer la cellule cible par l'activation du complément et d'avoir théoriquement une interaction de haute affinité avec le RIL-2. De plus, cette molécule entièrement humaine n'entraînerait pas d'immunisation.

### 1-3-10-2- Autres anti-cytokines et anti-récepteurs de cytokines :

#### ■ Interleukine 6 :

L'IL-6 est une cytokine produite après stimulation (par l'antigène, l'IL-1, l'IL-3, le *tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ , le *platelet derived growth factor*, le *granulocyte-monocyte colony stimulating factor* par un grand nombre de cellules (endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, macrophages, lymphocytes T et B). Ses récepteurs sont ubiquistes (haute et basse affinité) répartis essentiellement sur les cellules épithéliales, les fibroblastes, les hépatocytes, les lymphocytes T et B et les cellules myélomateuses. L'IL-6 est une cytokine importante de la réponse immune, des phases aiguës de l'inflammation et de l'hématopoïèse. Elle a été identifiée comme un facteur central de la prolifération des cellules plasmocytaires malignes in vitro, seule, mais aussi en synergie avec d'autres cytokines « hématopoïétiques » (IL-3, GM-CSF, G-CSF, érythropoïétine, HILDA/LIF. Par exemple, l'interféron  $\gamma$  est capable d'inhiber la prolifération myélomateuse dépendante de l'IL-6, mais l'interféron  $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  stimulent, in vitro, cette prolifération par le biais d'une production autocrine d'IL-6. Un anticorps monoclonal dirigé contre IL-6 administré un jour avant l'injection de cellules myélomateuses à des souris est capable de prévenir l'apparition de la tumeur chez plus de la moitié des animaux et de retarder l'apparition de celle-ci pour les animaux respectants. Chez l'homme, l'augmentation de la concentration d'IL-6 est retrouvée chez les patients souffrant de myélome multiple. Les concentrations les plus élevées sont constatées chez les patients en phase terminale ou avec une leucémie. L'injection d'anticorps anti-IL-6 à des patients en phase terminale de myélome multiple permet de supprimer transitoirement la prolifération myélomateuse, de réduire les concentrations sanguines de protéine C réactive, d'améliorer significativement l'hypercalcémie et d'annuler les concentrations d'IL-6 sanguines. Une protéine de fusion, d'IL-6-exotoxine du *Pseudomonas aeruginosa* s'est avérée spécifique et hautement cytotoxique pour des cellules myélomateuses et les cellules hépatocytaires. Ces résultats préliminaires laissent envisager une immuno-intervention dans les myélomes et les hépatocarcinomes.

### ■ Autres cytokines :

De nouvelles intervention immunitaires utilisant d'autres cytokines se développent dans le domaine de la transplantation, bien que les résultats ne soient pas encore nombreux. Malgré une concentration circulante élevée de TNF- $\beta$  et  $\alpha$  au cours du rejet aiguë, des monoclonaux anti-cytokines n'ont que très peu d'effets dans des modèles de transplantation d'animaux (transplantation de peau chez le singe). Cela serait essentiellement expliqué par l'effet local de ces cytokines. Par contre, l'injection intraveineuse de TNF- $\alpha$  accélère le rejet chez le rat. Le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), cytokine pléiotrope, a été utilisé dans des modèles de xénotransplantation d'îlots de pancréas avec un certain succès.

Deux types de traitements ont été décrits. L'un traitant le receveur non pré-immunisé par TGF- $\beta$  a retardé l'apparition du rejet. L'autre, traitant in vitro les cellules du donneur par TGF- $\beta$  et le receveur par monoclonal anti-interféron  $\gamma$ , a montré une action immunosuppressive effective alors que le traitement par un seul de ces réactifs n'entraînait qu'un effet très modéré.

### ■ Récepteurs solubles de cytokines :

Bien que leur structure ait été caractérisée, leur rôle, in vivo, est encore peu connu mais pourrait s'exercer dans la régulation des cytokines ; ils pourraient servir de molécules porteuses. Ces récepteurs sont soit codés par des transcrits différents des récepteurs membranaires (IL-4, IL-7), soit vraisemblablement issus d'un clivage protéolytique du récepteur membranaire (TNF, IL-2). Le récepteur soluble de l'IL-4, capable in vitro d'inhiber les activités de l'IL-4 inhibe, in vivo, la réaction d'hypersensibilité retardée et augmente la survie des transplantations. Les mêmes propriétés ont été attribuées au récepteur soluble de l'IL-1 dans un modèle de transplantation de cœur fœtal chez la souris [70].

### ■ Antagonistes de cytokines :

L'IL-1Ra est un antagoniste naturel de l'IL-1 (sécrété par les monocytes), capable de se fixer sur le récepteur de l'IL-1 sans produire d'effet agoniste (*IL-like*). L'IL-1Ra est capable de bloquer les mécanismes de l'inflammation et ne diffère de l'IL-1 que par une substitution d'acide aminé (en position 145) ouvrant la voie de l'étude d'autres analogues de cytokines.



## 1-4- CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES CYTOKINES :

1-4-1- Les interleukines.

1-4-2- Les interférons.

1-4-3- Le TNF (Tumor necrosis factor alpha)

1-4-4- Le GM-CSF ( granulocyte macrophage colony stimulating factors)

1-4-5- Les récepteurs des cytokines.(RIL-2)

### 1-4-1- Les interleukines :

#### 1-4-1-1- Interleukine 1 (IL-1 ou pyrogène ou LAF : lymphocyte activating factor) :

Cette interleukine a été découverte en 1972 [71] qui ont mis en évidence un facteur promoteur de la prolifération des thymocytes de souris, issus de culture de cellules adhérentes du sang humain. Elle est produite essentiellement par les macrophages mais aussi les cellules endothéliales, épithéliales, hématopoïétiques et lymphoïdes normales ou cancéreuses. Le macrophage produit l'IL-1 en réponse à une grande variété de stimuli : cellules T activées, immuns-complexes, lipopolysaccharides bactériens (LPS), produits bactériens divers, levures, virus à ARN bicatenaire, lectines...

C'est une molécule de PM 17 KD, le gène est localisé en 2 q 13-21. Elle existe sous deux types A et B qui ont un faible degré d'homologie (25%) tout en ayant les mêmes propriétés biologiques et les mêmes récepteurs cellulaires. Ces deux types moléculaires agissent soit sous forme libre en solution soit sous forme du peptide précurseur lié à la membrane de la cellule productrice. Ceci permettrait l'établissement de ponts intercellulaires. Un récepteur a été cloné (PM : 80 Kd) sur les lymphocytes T. Il peut fixer le type A de l'IL-1 sous forme du peptide précurseur mais ne peut fixer le type B que sous sa forme mature (donc libre).

Il possède une structure en 3 domaines analogue à ceux des immunoglobulines. La transduction du signal n'est pas élucidée car la portion cytoplasmique est différente de celle des tyrosine-kinases. Au total l'existence des deux types d'IL-1 et surtout l'aptitude du récepteur à discriminer forme libre et forme liée à une cellule, peut faire jouer à l'IL-1 un rôle de médiateur inter-cellulaire à très courte portée comme un rôle hormonal traditionnel.

### ■ IL-1-Propriétés fonctionnelles :

Elle exerce une action pléiotrope sur les cellules lymphocytaires et non lymphoïdes.

#### ✱ Dans le système immunitaire :

- Stimule les lymphocytes et induit leur prolifération et en conséquence la synthèse d'autres lymphokines (IL-2, IF...).

- Stimule accessoirement la croissance de la sous-population lymphocytaire TH2 qui fabrique IL-4, IL-5, et IL-6 et oriente préférentiellement la réponse immune vers la production d'anticorps (contrairement à la sous-population TH1 insensible à l'IL-1 et qui produit l'interféron et l'IL-2).

- En liaison avec le TNF- $\alpha$  elle augmente l'activité cytotoxique des macrophages.

#### ✱ Dans la réaction inflammatoire :

- Induit la fièvre, le sommeil, la libération d'ACTH et une neutrophilie.

- Induit la synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Cette sécrétion est en partie sous la dépendance du système nerveux en particulier des noyaux gris centraux. Les neurones innervant ces aires contiennent de l'IL-1 intrinsèque. Celle-ci serait soit son propre messenger intermédiaire soit répondrait au stimulus de l'IL-1 circulante pour devenir le neuromodulateur des sécrétions endocrines cérébrales qui régulent la phase aiguë de l'inflammation.

- Sur les cellules endothéliales augmente l'adhérence des leucocytes et le release de prostaglandines.

- D'une façon plus générale induit la synthèse de PDGF par les fibroblastes et les cellules musculaire lisses (rôle de cicatrisation post-inflammatoire).

#### \* Rôle hématopoïétique et osseux :

- Co-facteur des CSF (colony stimulating factors) lors de l'arrêt des thérapeutiques cytotoxiques.

- Par ailleurs c'est également un facteur de résorption osseuse par activation des ostéoclastes.

- Au total, il s'agit donc d'un adjuvant local endogène-cofacteur de l'activation lymphocytaire dont la synthèse est provoquée par les antigènes, les toxines et le processus inflammatoire en général.

#### 1-4-1-2- Interleukine-2 ( IL-2 ou TCGF(Tcell growth factor) ) :

Découverte au travers de son activité comme facteur de croissance des lymphocytes T humains, c'est une glycoprotéine (PM 15 KD) à glycolisation variable. Le gène fut cloné en 1983 et séquencé. A l'heure actuelle la molécule dont la structure comprend 4 hélices amphipathiques antiparallèles, et son récepteur (également cloné en partie) représentent un modèle conformationnel en cours d'exploitation pour expliquer les interactions messenger hormonal-récepteur membranaire. La découverte et surtout la possibilité d'obtenir l'IL-2 purifiée en grande quantité ont autorisé des avancées récentes très importantes en immunologie :

- L'entretien de lignées continues de cellules T a permis l'étude de l'activation cellulaire T et celle de la restriction de la réponse allogénique au CMH sur le plan moléculaire.

- Les clones de cellules T désormais disponibles en grande quantité ont enfin ouvert la voie à l'identification du récepteur T à l'antigène et à sa caractérisation génique.

- L'étude des cellules T cytotoxiques.

- Enfin la détermination précise du rôle des divers acteurs moléculaires de la coopération cellulaire dans la réponse immune (molécules CD3, CD4, CD8....).

### ■ IL-2-Propriétés fonctionnelles :

#### ✻ Dans le système immunitaire :

C'est le facteur de croissance des lymphocytes T. Les interactions IL-2, récepteur à l'IL-2 (R-IL-2) sont actuellement un modèle d'étude de l'induction de la multiplication cellulaire différenciée. Le récepteur à l'IL-2 (R-IL-2) est un dimère bimoléculaire composé de deux chaînes distinctes A et B. La chaîne B est définie par un anticorps monoclonal de souris (anti-Tac) comme étant l'antigène CD25, elle a un poids moléculaire de 55 KD (P55). La chaîne A a un poids moléculaire de haute affinité ( $10^{-9}M$ ) mais fixe lentement l'IL-2. La chaîne B a une affinité dix fois plus faible ( $10^{-8}M$ ) mais fixe rapidement l'IL-2. La réassociation des 2 chaînes de manière non covalente donne un récepteur qui lie très fortement la molécule ( $10^{-11}M$ ) et aussi rapidement que la seule chaîne B. C'est le premier exemple connu d'association coopérative de 2 sous unités différentes dans la constitution d'un récepteur membranaire avec une cinétique de ce type.

La P75 entraîne la stimulation de la cellule T. On la met en évidence sur les cellules T activées, sur les cellules NK, sur les thymocytes immatures et sur les cellules B où elle est en quantité 10 fois moindre que sur les cellules T. Le gène de la P55 qui est le seul isolé des homologues avec le facteur B du complément.

En pathologie on peut voir des absences de synthèse de l'une ou l'autre des 2 chaînes. Par ailleurs le récepteur de l'IL-2 a été mis en évidence sur de multiples cellules néoplasiques T non stimulées : leucémie à tricholeucocytes, leucémie aiguë lymphoblastique de l'adulte, quelques leucémies lymphoïdes chroniques B, maladie de Hodgkin. Bien que la signification biologique de cette présence soit obscure, le R-IL-2 joue un rôle dans la prolifération cellulaire néoplasique (autostimulation cellulaire).

Le macrophage secrète l'IL-1 et l'IL-6 et présente un fragment d'antigène par le biais des molécules de CMH. La cellule T spécifique pour l'antigène va donc recevoir d'une part un stimulus spécifique par son récepteur T à l'antigène et un stimulus activateur non spécifique (IL-1, IL-6). En réponse à ces 2 stimuli elle synthétise l'IL-2 ainsi que son récepteur réalisant une boucle autocrine qui a pour but d'entraîner la prolifération du seul clone concerné. Cette amplification est universelle et concerne tous les sous-types cellulaires T spécialisés (lymphocytes T8-T4-cytotoxiques, suppresseurs.....).

La transduction du signal spécifique par le biais du récepteur T à l'antigène fait passer la cellule de l'état G0 à G1. C'est le deuxième signal représenté par l'IL-2 se fixant sur son récepteur qui fait passer la cellule de l'état G1 à la phase S.

Dans le cas des cellules B la stimulation de l'IL-2-R par l'IL-2 entraîne la synthèse des mRNA codant pour la forme sécrétoire de la chaîne  $\mu$  et la pièce J nécessaires toutes deux à l'assemblage de l'IgM.

La synthèse de l'IL-2 est inhibée par la cycloporine et les glycocorticoïdes (ce qui expliquerait leur rôle immuno-suppresseur).

Par ailleurs l'IL-2 active les macrophages ; ceci concourt à l'activité antitumorale qu'elle possède déjà avec l'induction des cellules NK.

#### 1-4-1-3- Interleukine-3 ( IL-3 ou CSF( Multipotential colony factor) ) :

C'est l'un des facteurs de croissance des cellules hématopoïétiques. Au total il en existe 5 principaux ; M-CSF (pour les monocytes-macrophages), G-CSF (pour les granulocytes), GM-CSF (pour les 2 types cellulaires), IL-3 que nous allons voir et l'érythropoïétine spécifique des précurseurs érythroïdes (BFU-E et CFU-E). Le préfixe indique la cellule plus ou moins spécialisée qui est la cible de faibles doses d'un CSF donné.

L'IL-3 est une molécule monocatenaire de PM 15-30 KD dont le gène est localisé en 5 q 23-31. Un pont dissulfure intracatenaire garant de sa structure tertiaire est nécessaire à l'intégrité de son activité biologique.

Elle est produite par de nombreuses variétés cellulaires ; macrophages ; cellules du stroma médullaire ; lymphocytes T et quelques cellules en lignées continues. Chez l'homme les gènes du GM-CSF ; du multi CSF (IL-3) du M-CSF et de son récepteur (c-fms), de l'IL-4 et de l'IL-5 sont groupés sur le bras long du chromosome 5 et leur transcription peut parfois s'effectuer de manière coordonnée.

### ■ IL-3-Propriétés fonctionnelles :

#### \* Rôle Hématopoïétique :

L'IL-3 joue un rôle hématopoïétique prépondérant. De nombreux signaux peuvent stimuler la synthèse de ces CSF ; produits bactériens (endotoxine), antigènes étrangers par le biais d'une production préalable d'IL-1. Les CSF sont donc responsables de la prolifération des cellules granuleuses et macrophagiques. Leur activité s'exerce à très basse concentration ( $10^{-10}$  à  $10^{-12}$  Mole/l). Chacun des CSF possède un récepteur membranaire distinct. En plus de leur action multiplicatrice les CSF ont un rôle dans la viabilité cellulaire, la différenciation irréversible d'une cellule à potentialités multiples et l'induction de fonctions effectrices sur les éléments les plus mûrs (phagocytose, production de superoxyde....).

Leur spectre d'action à faible concentration intéresse les populations granuleuses neutrophiles et monocytaires, mais à doses plus fortes les éosinophiles et les mégacaryocytes voire certains précurseurs érythroblastiques. L'IL-3 a pour particularité de stimuler toutes ces cellules indépendamment de sa concentration mais de plus c'est un facteur de croissance des cellules pré B et c'est le seul CSF des Mastocytes.

L'IL-3 ne joue pas à proprement parler de rôle dans le déroulement de la réponse immune.

#### 1-4-1-4- Interleukine-4, IL-4 ou BSF-1 ( B stimulating factor 1) ou BCGF-1 ( B cell growth factor-1) :

Elle a été découverte comme un costimulateur de la prolifération des cellules B activées par des antiglobulines. Son poids moléculaire est de 16-20 KD.

Le gène est localisé en 5q 31. Un récepteur de haute affinité est présent en faible quantité sur la plupart des cellules T, les cellules B, les mastocytes, les macrophages, la majorité des cellules des lignées érythroïdes et myéloïdes, les fibroblastes et les cellules épithéliales.

Le récepteur murin aurait un PM de 65 KD, le récepteur humain 140 KD et serait soit un dimère, soit très différent de son homologue murin.

### ■ IL-4-Propriétés fonctionnelles :

#### ✿ Dans le système immunitaire :

Sur le plan moléculaire l'IL-4 agit sur les cellules B :

- En augmentant l'expression des molécules du CMH et du récepteur Fc des IgE.
- En orientant la production des anticorps IgG vers la sous-classe IgG1.
- En faisant produire de grandes quantités d'IgG.

L'IL-4 est produite essentiellement par la sous-population lymphocytaire TH2 productrice également de l'IL-5 et l'IL-6. Cette sous-population régulatrice oriente la réponse immune vers le pôle humoral. Pour les cellules T l'IL-4 joue également un rôle :

- Elle stimule la prolifération des cellules Th et Tc mûres par un mécanisme autocrine mais Différent de celui de l'IL-2.
- Lors du développement thymique elle provoque la prolifération des cellules CD4-CD8-, CD4+CD8-, CD4-CD8+.
- Enfin elle induirait la synthèse de la molécule CD8 sur des lymphocytes CD4.

Pour les macrophages elle augmente les capacités de présentation des antigènes et stimule leur activité antitumorale.

Les effets négatifs de l'IL-4 sont plus discrets et n'affectent que des voies particulières où intervient l'IL-2.

- Inhibition de la prolifération des cellules B induite par l'IL-2.
- Inhibition de la formation des cellules NK par l'IL-2.

#### ✱ Rôle Hématopoïétique :

En dehors du système immunitaire. Elle agit in vitro en synergie avec le GM-CSF, le M-CSF et l'EPO mais inhibe les colonies sensibles au multi-CSF (IL-3). In vitro c'est un facteur de croissance essentiel aux cultures de mastocytes. L'effet pleïtrope de l'administration de l'IL-4 et la non élucidation complète de son spectre d'activité réservent son utilisation thérapeutique pour un avenir non déter miné. Par contre une forme soluble du récepteur à l'IL-4 pourrait être utilisée pour traiter la réaction de rejet des greffes et la réaction du greffon contre l'hôte (GHV) en bloquant l'accès de l'IL-4 aux cellules T. De même dans les états allergiques on pourrait empêcher la fabrication d'IgE.

#### 1-4-1-5- Interleukine-5, IL-5 ou TRF ( T replacing factor ) ou BCGF-II ( B cell growth factor-2) ou éosinophil differentiation factor.

Découverte comme inducteur de différenciation des lymphocytes B matures en plasmocytes après stimulation antigénique, c'est une glycoprotéine de PM 46 KD qui est un dimère de 2 sous-unités identiques. Le gène est localisé en 5 q 31. Elle est produite par les lymphocytes T exclusivement.

#### ■ IL-5 Propriétés fonctionnelles :

##### ✱ Dans le système immunitaire :

-Elle induit la synthèse et la sécrétion d'IgM et d'IgA des cellules B stimulées par les antigènes thymoindépendants (L.P.S.).

-Elle stimule la prolifération des précurseurs des polynucléaires éosinophiles et provoque leur maturation fonctionnelle (in vivo et in vitro).

Ce facteur semble bien être le médiateur T dépendant qui contrôle la réponse éosinophile aux infestations parasitaires.



Au vu de ce phénomène l'IL-5 pourrait avoir un avenir thérapeutique mais là encore la totalité de ces activités n'a pas encore été précisée.

#### 1-4-1-6- Interleukine-6 ou BCSF-2 (B cell stimulating factor-2) ou BCDF (B cell-différenciation factor).

Autres dénominations tombées en désuétude IF- $\alpha$  2 et HP-1 (hybridoma-plasmocytoma growth factor 1)

Découverte par sa capacité à induire la sécrétion d'anticorps par des cellules B activées ou des cellules transformées par l'EBV et ce sans induire de prolifération cellulaire, c'est une molécule de 184 acides aminés (PM 20 KD environ). Le gène humain est cloné ; il montre une homologie structurale avec le G-CSF ainsi que la même organisation introns-exons. Les deux gènes pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre commun.

L'IL-6 est produite par les cellules T, les cellules B, les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et quelques cellules tumorales ou de lignées continues.

Sa production est induite par une grande variété de signaux :

-Pour les cellules T : les mitogènes T et les antigènes présentés par les macrophages ;

- Pour les monocytes et les fibroblastes : le LPS

-Pour d'autres types cellulaires : l'IL-1, le TNF, le PGDF, l'IF $\gamma$  et divers virus dont leHIV.

Les glycocorticoïdes ont un effet négatif sur sa synthèse. Pour répondre à cette extrême variété de stimuli extérieurs la régulation de la transcription se fait grâce à des structures promotrices situées en amont du gène. Ces régions très particulières sont similaires à celles de la famille c-fos. Une partie du récepteur pour l'IL-6 est cloné. C'est une molécule de 468 acides aminés (PM 80 KD) avec un seul segment transmembranaire sans activité tyrosine-kinase. Il possède un domaine l'apparentant à la superfamille des immunoglobulines (C2). Il existe une deuxième chaîne en association avec la première non encore séquencée, qui ne lie pas l'IL-6 mais qui est nécessaire à la transduction du signal.

Il s'agirait là d'un nouveau mécanisme membranaire de transmission des signaux. Il y a entre 200 et 500 récepteurs par cellule normale, ce chiffre montant jusqu'à 20 000 dans les cas pathologiques (myélome).

#### ■ **IL-6 Propriétés fonctionnelles :**

##### ✿ **Dans le système immunitaire :**

###### **\* Cellules B**

C'est l'interleukine T dépendante qui induit la maturation finale des cellules B, activées au préalable, en cellules productrices d'anticorps. Elle stimule la production d'IgM, d'IgG, d'IgA en augmentant l'expression des gènes CH.

###### **\* Cellules T**

Elle peut agir sur les cellules T au repos en les activant directement mais aussi en induisant la synthèse d'IL-2 et celle de son récepteur faisant démarrer cette boucle autocrine

###### **\* Sur les cellules hématopoïétiques**

Elle agit en synergie avec les CSF: elle potentialise l'effet de l'IL-3 et induit la production de GM-CSF par les fibroblastes. Dans des modèles in vitro, l'IL-6 induirait la différenciation de cellules leucémiques.

##### ✿ **Dans la réaction inflammatoire :**

Elle induit la synthèse hépatique d'une série de protéines de la phase aiguë de l'inflammation : fibrogène,  $\alpha 1$  antichymotrypsine,  $\alpha 1$  antitrypsine,  $\alpha 1$  glycoprotéineacide, haptoglobine, C réactive protéine [72].

##### ✿ **Dans le système nerveux :**

Elle induit la différenciation neurale (de façon analogue au nerve growth factor (NGF) mais en utilisant des récepteurs différents). Elle agit sur l'axe neuroendocrinien en augmentant la libération d'hormones adrénocorticotropes (ACTH) par le biais du corticotripine Au total l'IL-6 a un effet synergique des corticoïdes sur l'induction de la phase aiguë inflammatoire et en retour la sécrétion d'ACTH a un effet inhibiteur (feed-back négatif) de la production d'IL-6 par de nombreux types cellulaires.

## ■ IL-6 et maladies :

### **Myélome multiple/plasmocytome.**

Les études en cours sur les lignées myélomateuses isolées des patients atteints montrent que l'IL-6 exerce un effet autocrine dans cette maladie, et ce d'autant que les cellules myélomateuses expriment 10 à 100 fois plus de récepteur à l'IL-6. L'expression dérégulée de l'IL-6 par adjonction d'un enhancer Ig par exemple, à la suite d'une translocation chromosomique jointe à un deuxième événement oncogène (translocation de c-myc) peut transformer des cellules B normales en cellules myélomateuses.

Par ailleurs dans une maladie rare réunissant un syndrome inflammatoire, une anémie, une hypergammaglobulinémie et des adénopathies bénignes, dite maladie de castelman, on retrouve dans les centres germinatifs des adénopathies une hyperprolifération de cellules produisant de l'IL-6. Cette maladie régresse après ablation des adénopathies incriminées ce qui semble bien indiquer la responsabilité de l'hypersécrétion d'IL-6.

### **Lymphome T de Lennert.**

Ce lymphome non Hodgkinien serait dû à une prolifération anormale d'une population de macrophages pathologiques sensibles à l'IL-6.

### **Maladies auto-immunes et activation polyclonale B.**

Certains cancers ferait de même (cancers de la vessie-de l'utérus). Enfin on a trouvé de hautes concentrations d'IL-6 dans le liquide synovial de malades atteints de polyarthrite rhumatoïdes. L'hyperproduction d'IL-6 (par les cellules synoviales) expliquerait les infiltrats de plasmocytes et de cellules T.

### **1-4-1-7- Interleukine-7 ou lymphopoïétine 1 ou pré-B cell growth factor :**

C'est la dernière molécule caractérisée et homologuée. Elle agit sur les cellules lymphoïdes à un stade très précoce de leur maturation. Ces types cellulaires n'ayant été accessibles que très récemment à l'expérimentation in vitro ceci explique le caractère tardif de sa découverte.

C'est une molécule de 152 acides aminés; le PM théorique est de 18 KD environ allant Jusqu'à 30 KD du fait de la présence de 2 sites de glycosylation.

#### ■ IL-7 Propriétés fonctionnelles :

Sur les cellules B elle n'agit que sur les cellules pré-pré B (dite pro B ) B220-, qui conservent encore la configuration germinale des gènes des immunoglobulines. Ces cellules n'expriment pas encore l'antigène B220 (caractéristique de la lignée B) mais seulement à un bas niveau l'antigène Thy-1 (caractéristique de la lignée T). Elles se différencient en cellules pré-B (B220+) qui réarrangent les gènes des immunoglobulines lesquels également sensibles à l'IL-7. Lorsque les cellules B expriment leur IgM de membrane, l'IL-7 n'agit plus. Sur les cellules T, seules est réceptrice in vivo la population T non activée la plus immature CD4-CD8-. Par ailleurs in vitro les cellules T matures qui répondent à l'IL-7 doivent auparavant avoir été activées par un antigène ou un mitogène. L'IL-7 délivre uniquement un message prolifératif aux cellules précurseurs de lignées T et B mais n'induit aucune différenciation. On peut lui concevoir un rôle thérapeutique dans les aplasies médullaires.

#### 1-4-1-8- Interleukine 8 ou TCF(lymphocyte chemotactic factor) ou NAP-1 (neutrophil activating peptide) :

Il s'agit d'une molécule dont la séquence vient d'être établie mais n'est pas encore « homologuée » officiellement. Elle ne présente aucune homologie avec d'autres lymphokines mais par contre des ressemblances avec des peptides plaquettaires (granules  $\alpha$ ). Il s'agit d'un peptide de 72 acides aminés qui possède une configuration en double boucle elle est produite par les macrophages mais également les fibroblastes, les cellules épithéliales et les hépatocytes et ce en réponse à un stimulus par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ .

#### ■ Propriétés fonctionnelles :

Elle provoque la chemotaxie des neutrophiles et des lymphocytes après injection intradermique mais surtout une émigration lymphocytaire pure dans les endothéliums des veinules. Elle entraîne les réactions de stimulation des polynucléaires neutrophiles uniquement. Elle active l'appareil locomoteur cellulaire et l'expression des molécules d'adhésion ainsi que le release des enzymes granulaires et la production d'ion superoxyde. Son action est de longue durée du fait d'une bonne résistance aux protéases.

### ■ IL-8 et pathologie :

Elle se trouve dans les lésions cutanées du psoriasis. Elle pourrait jouer un rôle dans la polyarthrite rhumatoïde, la fibrose pulmonaire primitive, l'asbestose et le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte toutes conditions pathologiques où existe une infiltration parenchymateuse par des polynucléaires.

#### 1-4-1-10- Interleukine 10 :

Sources cellulaires : lymphocytes Th1, Th2, cellules B transformées par le virus d'Espstein-barr, monocytes/macrophages.

Inducteurs : lipopolysaccharide, antigènes, mitogènes.

Activités biologiques :

Inhibition de la fonction présentatrice de l'antigène des monocytes/macrophages

Inhibition de la production de cytokines et de composés microbicides monocytaires

Inhibition de la prolifération lymphocytaire

Facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes T, B et des mastocytes [73].

#### 1-4-1-12- Interleukine 12 :

L'interleukine 12 (IL-12) est une glycoprotéine hétérodimérique de 70 kDa. Les sous unités p40 et p35, toutes deux glycosylées, sont liées par un pont disulfure essentiel pour l'activité biologique. Les deux sous-unités sont codées par des gènes distincts, indépendamment régulés. En plus de la forme biologiquement active, (l'hétérodimère p70), les cellules productrices d'IL-12 sécrètent également en large excès la sous-unité p40. Aucune activité biologique n'est associée à la p40 monomérique (1,2,3,4,5). L'IL-12 est principalement sécrétée par les macrophages activés et les cellules B. Ses effets proinflammatoires sont puissants et elle agit en régulant la réponse immunitaire à médiation cellulaire [74].

### 1-4-1-13- Interleukine 13 :

L'interleukine 13 (IL-13) est une protéine principalement produite sous une forme non-glycosylée de 10 kDa, bien qu'elle présente 4 sites de N-glycosylation, auxquels correspondent des isoformes mineurs. Produite par les lymphocytes T et de mastocytes activés, l'IL-13 présente une importante homologie de séquence et de structure avec l'IL-4, mais contrairement à cette dernière, l'IL-13 est sans effet biologique direct sur les cellules T. L'IL-13 agit en se liant à un récepteur membranaire hétérodimérique composé d'une RIL-13 spécifique associée à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-4. Le récepteur de l'IL-13 reconnaît non seulement l'IL-13, mais apparaît également être un récepteur fonctionnel pour l'IL-4. Par contre, l'IL-13 n'est pas reconnue par le récepteur de l'IL-4. L'IL-13 est une molécule anti-inflammatoire comme l'IL-4 et l'IL-10, jouant un rôle majeur dans la réponse immunologique de type Th2. Après stimulation, la production d'IL-13 dure sensiblement plus longtemps que celle de l'IL-4, ce qui suggère que cette cytokine peut jouer un rôle particulièrement important dans des pathologies de type allergique ou parasitaire, alors même que la production d'IL-4 est absente ou inhibée.

### 1-4-2- Les interférons :

#### 1-4-2-1- Introduction :

Découverts pour leur activité antivirale, les interférons (IFNs) sont avérés posséder de multiples propriétés biologiques et sont maintenant considérés comme une classe de cytokines à part entière. En plus de leur capacité à inhiber la croissance cellulaire, les (IFNs) sont de puissants médiateurs de réactions immunitaires et ont été, pour ces raisons, utilisés dans de nombreux essais cliniques en cancérologie et virologie.

Ces essais ont mis en évidence une gamma variée d'indications pour les IFN- $\alpha$ . Leur activité anti-tumorale s'exerce principalement en hématologie et dermatologie : tumeurs des lymphocytes B (leucémie à tricholeucocytes, lymphomes non hodgkiniens, myélome multiple), myéloproliférations (leucémie myéloïde chronique, thrombocytoses), lymphomes T cutanés, carcinome basocellulaire, carcinome spinocellulaire de la peau, sarcome de Kaposi. Le traitement par IFN s'avère également efficace pour des tumeurs avec étiologie virale (condylome, papillome laryngé) et bénéfique pour les hépatites chroniques B et C.

Il semble évident que les activités antitumorales des IFN- $\alpha$  proviennent essentiellement de leurs propriétés régularices de la prolifération cellulaire grâce, dans certains cas, à des effets antagonistes sur des facteurs de croissance. Les progrès rapides des travaux concernant les voies de signalisation impliquées dans le contrôle des gènes induits par les IFNs, une plus grande connaissance des interactions de l'IFN- $\alpha$  au sein du réseau des cytokines, ainsi que le développement d'essais faisant appel à la combinaison avec d'autres thérapies (traitements biologiques, chimiothérapie, etc.) devrait permettre d'améliorer considérablement l'utilisation clinique des IFNs [74].

#### 1-4-2-2- Les différentes formes moléculaires :

Trois classes distinctes d'interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ont été caractérisées. 22 gènes IFN- $\alpha$  codent pour 15 protéines fonctionnelles ; mais il n'y a qu'un seul gène  $\beta$  et un seul gène  $\gamma$ . Tous les IFN- $\alpha$  se ressemblent au plan moléculaire; les gènes sont situés sur le chromosome 9 près du gène  $\beta$ . Le gène de l'IFN- $\gamma$  est situé sur le chromosome 12.

Les IFN- $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle dans l'établissement d'un état cellulaire antiviral, dans le contrôle de la différenciation et la prolifération cellulaire en général (inhibition du protooncogène c-myc). Ils possèdent également une activité anticancéreuse.

Les seules actions qu'ils aient au niveau du système immunitaire sont :

\* L'augmentation de l'expression des gènes de classe I du CMH et de la  $\beta$ 2 microglobuline.

\* L'induction et l'augmentation de l'expression du récepteur Fc des IgG et du récepteur pour le TNF.

L'interféron  $\gamma$  joue un rôle plus central et peut légitimement être considéré comme une interleukine. Il s'agit d'une molécule de PM entre 40 et 50 KD. Il possède un récepteur à haute affinité, dont le gène est localisé sur le chromosome n° 6 ; ce dernier a un PM variant de 54 KD à 160 KD du fait de la présence de sites de glycosylation. L'IFN- $\gamma$  est produit par les cellules T sensibles à l'antigène et les cellules NK.

**TABLEAU 8****Principaux types d'interférons humains**

[ C.Billard, Bull Cancer (1993) ]

Interféron	Cellules productrices	Inducteurs Agents	Protéines	Gènes	Localisation	Observation
IFN- $\alpha$	Leucocytes : -Cellules B -Cellules T -Cellules nulles -Macrophages	Virus Mitogènes B ARN bicaténaires	166 acides aminés PM=20kDa 20 sous types identifiés avec 80 % d'homologie	Environ 20 avec 10% d'homologie de séquence nucléotidique pas d'intron	Chromosome 9	
IFN- $\beta$	Fibroblastes Cellules épithéliales	Virus ARN bicaténaires	166 acides aminés PM=20kDa 1 seule protéine identifiée avec 30 % d'homologie avec l'IFN- $\alpha$	1 Gène pas d'intron	Chromosome 9	Protéine naturelle glycosylée
IFN- $\gamma$	Lymphocytes T activés	Mitogènes T Antigènes Spécifiques IL-2	146 acides aminés PM=17kDa	1 Gène 4 Exons 3 Introns	Chromosome 12	Protéine naturelle glycosylée



### 1-4-2-3- Interféron $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) :

#### ■ Propriétés fonctionnelles :

##### ✿ Dans le système immunitaires :

##### Pour des réponses cellulaires :

- \* Il active les cellules T cytolytiques et les cellules NK ;
- \* Il induit l'expression des gènes de classe II du CMH et du récepteur Fc des IgG sur les macrophages et d'autres types cellulaires (ce qui entraîne une meilleure présentation des antigènes)
- \* Il induit l'expression du gène du récepteur au TNF.

##### Pour des réponses humorales :

Il induit la sécrétion d'Ig par les cellules B activées directement par l'IL-2.

- \* Il agit en synergie avec l'IL-4 sur la prolifération des cellules B.
- \* Il provoque la sécrétion d'Ig fixant le complément.

Mais par ailleurs cette molécule inhibe certains effets spécifiques de l'IL-4 ; l'expression du récepteur Fc des IgE l'orientation de la synthèse d'immunoglobulines vers la classe IgE et la sous-classe IgG1. L'IL-4 agit donc en réciprocity avec l'IFN- $\gamma$  pour réguler la production des isotypes des immunoglobulines dans les réponses humorales T dépendantes. Au plan moléculaire tous les interférons agissent au niveau du contrôle de la transcription de nombreux gènes par un mécanisme inconnu [75].

### 1-4-3- La cachectine ou TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factop alpha) :

Il s'agit d'une molécule dont les principaux effets interviennent lors du choc septique et dans l'inflammation. Son rôle comme médiateur immunitaire est très restreint. C'est une molécule de 157 acides aminés (PM :17KD) résultat d'un clivage d'un polypeptide natif de 233 acides aminés avec perte d'un peptide signal de 76 résidus. Le TNF- $\alpha$  présente 28 % d'homologie avec le TNF- $\beta$  ou lymphotoxine. Ces deux molécules partagent certaines fonctions et possèdent le même récepteur. Les 2 gènes qui sont situés sur le bras court du chromosome 6 à proximité des gènes du CMH, peuvent résulter d'une duplication ancestrale en tandem.

Le TNF- $\alpha$  est synthétisé par les macrophages, les monocytes, les lymphocytes, les cellules NK, les cellules de kuppfer, les astrocytes et les cellules de la microglie. Sa synthèse est provoquée par une grande variété de stimuli surtout externes : LPS, entérotoxine, cord factor des mycobactéries, virus, C5a, antigènes parasitaires et fongiques, IL-1 et chez l'homme le TNF- $\alpha$  par une voie autocrine. La dexaméthasone inhibe cette synthèse, l'IFN- $\gamma$  l'amplifie.

### ■ TNF Propriétés fonctionnelles :

En générale :

- \* C'est le médiateur du choc septique endotoxinique.
- \* Il induit les états cachectiques (d'où son nom).

### ✿ Dans la réaction inflammatoire :

C'est un pyrogène par un effet direct sur l'hypothalamus et par un effet indirect en provoquant la synthèse d'IL-1.

Il augmente la chemotaxie des macrophages et des polynucléaires ainsi que leur activité phagocytaire et cytotoxique.

Il provoquerait la synthèse de TGF- $\beta$  (voir plus loin) lequel freine l'action du TNF- $\alpha$  par feed-back négatif.

Le TNF- $\alpha$  joue un grand rôle dans la cicatrisation et dans la lyse tumorale.

### 1-4-4- Le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factors) :

Le GM-CSF humain est une glycoprotéine de 144 acides aminés, sécrétée, sous forme monomérique par les macrophages, les cellules endothéliales et fibroblastiques et, après activation, par les lymphocytes T.

La première activité du GM-CSF est de maintenir la survie et de stimuler la prolifération et la différenciation de progéniteurs engagés dans les lignées neutrophiles et monocytaires. Mais, comme l'IL-3, le GM-CSF permet également la différenciation terminale des lignées myéloïdes : monocyttaire, neutrophile et mégacaryocytaire.

Le GM-CSF a aussi une activité directe sur la lignée érythroïde, avec production de BFU-E lorsqu'il est associé à l'érythropoïétine. Le GM-CSF recrute également des progéniteurs multipotentiels. Il agit en synergie avec d'autres facteurs hématopoïétiques favorisant le développement de différents types cellulaires. Le GM-CSF pourrait être impliqué dans un processus autocrine dans certains cas de leucémie aiguë myéloblastique. En plus de ces activités sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques normaux et leucémiques, le GM-CSF stimule fortement les fonctions des neutrophiles, macrophages et éosinophiles [76].

#### 1-4-5- Interleukine 2 et récepteur de l'interleukine 2 :

Le rôle central de l'IL-2 et de son récepteur (RIL-2) dans le rejet d'allogreffe, dans la réaction du greffon contre l'hôte et dans de nombreuses maladies auto-immunes est bien établi. Le RIL-2 de haute affinité est composé d'au moins deux chaînes  $\alpha$ , ou P55 (récepteur de faible affinité) et la chaîne  $\beta$ , ou P75 (récepteur d'affinité intermédiaire). L'interaction de l'IL-2 avec ce complexe P55-P75 déclenche la différenciation et l'expansion clonale de la réponse immune. Seule la chaîne P55 est inductible après une stimulation des lymphocytes T (par des lectines, des antigènes, etc...). Elle représente un modèle de cible spécifique, présente uniquement sur les lymphocytes T activés. Par exemple, lors d'une allotransplantation cette chaîne est induite sur les seuls lymphocytes T du répertoire qui reconnaissent les antigènes du greffon. En ciblant la molécule P55 il est donc d'envisager une immuno-intervention spécifique, épargnant les cellules du répertoire non «commises» contre ces antigènes. Il est aussi intéressant de noter que certaines molécules immuno-suppressives tendent, dans leurs mécanismes d'action, aux mêmes effets : la ciclosporine et le FK506 agissent essentiellement en bloquant la transcription du gène de l'IL-2, la rapamycine (autre médicament immuno-suppresseur prometteur) interfère avec la transduction du signal suivant la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de haute affinité ; ainsi les effets de ces médicaments qui s'étendent à toute la population de lymphocytes T, s'expriment-ils plus fortement sur les populations activées [77].

## **1-5- DOSAGE DES CYTOKINES : INTERET ET LIMITES :**

Les cytokines sont des protéines multifonctionnelles indispensables à l'homéostasie de l'individu. Elles sont également des témoins privilégiés de certaines maladies et sont parfois suspectées comme étant à l'origine de celles-ci (choc septique, rejet d'allogreffes). La mise à la disposition du chercheur et du clinicien de méthodes de dosage des cytokines a permis de réels progrès dans la compréhension de nombreuses affections. Cependant, ces mesures posent souvent plus de questions qu'elles n'en résolvent et, malgré l'existence des tests fiables et d'utilisation facile, il ne nous semble pas utile d'en recommander l'usage en pratique clinique courante ; ces dosages doivent être réservés à des protocoles de recherche où leurs résultats, à l'échelle d'une population de patients, prennent toute leur valeur et peuvent être utilement complétés par d'autres moyens de détection (amplification en chaîne par polymérase, hybridation in situ...). Cependant, l'amélioration permanente des kits de dosages, le nombre sans cesse croissant des cytokines quantifiables par des tests biologiques simples et les progrès dans l'étude des interactions des cytokines, de leurs récepteurs solubles et leurs inhibiteurs naturels permettront peut-être dans un avenir proche d'analyser finement la réponse immunitaire sur des prélèvements peu agressifs. De plus, on peut espérer disposer rapidement des outils modernes de la biologie moléculaire en pratique clinique quotidienne. Par exemple, la mise au point de méthodes d'automatisation pour l'amplification en chaîne par polymérase pourra apporter des informations précieuses quant à l'état d'activation du système immunitaires dans différentes situations cliniques. Ces techniques associées à la mesure des concentrations locales ou circulantes des cytokines sont essentiels pour le chercheur qui peut, dans des systèmes bien définis, étudier la cinétique de production et de rôle respectif de ces médiateurs [78].

### **1-5-1- Dosage de cytokines : dans quels fluides ? :**

Le développement de moyens de dosage des cytokines a permis de mesurer leur concentration dans divers liquides biologiques, chez le sujet sain ou malade. Classiquement, les dosages sériques de cytokines ont permis de suspecter le rôle de ces médiateurs dans de nombreuses maladies infectieuses ou inflammatoires.

Parallèlement, certains auteurs se sont attachés à doser les cytokines dans d'autres composants reflétant probablement mieux la maladie étudiée du fait de leur contact étroit avec les cellules productrices de cytokines : urines au cours des rejets de greffe rénale, liquide céphalorachidien au cours des méningites, lavage broncho-alvéolaire au cours du syndrome de détresse respiratoire. Enfin, dès la mise au point de dosages fiables des cytokines, ces mesures ont été effectuées dans le surnageant de cultures cellulaires, permettant de déterminer la production ex vivo par des cellules prélevées chez des patients.

### 1-5-2- Dosage de cytokines : quelle méthode ? :

Deux grandes techniques de dosage peuvent être décrites : les dosages biologiques et les dosages immunologiques. Ces deux méthodes ont leurs qualités et leurs défauts propres et peuvent apporter des informations complémentaires.

#### A/ Les dosages biologiques :

Les dosages biologiques utilisent des lignées cellulaires sélectionnées pour leur sensibilité à l'effet d'une cytokine. Par exemple, le dosage de l'activité biologique de l'IL-6 une lignée d'hybridome murin (cellules B9) dépendante de cette interleukine pour sa croissance. L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle reflète l'activité biologique réelle de la cytokine, une activité témoigne de son intégrité structurale et fonctionnelle depuis l'interaction efficace avec son récepteur jusqu'à l'induction d'un signal. Les inconvénients sont la lourdeur relative de mise en œuvre (culture cellulaire), les problèmes techniques inhérents à toute culture cellulaire, l'utilisation éventuelle de radio-éléments (mesure de croissance cellulaire par incorporation de thymidine tritiée) et surtout le possible manque de spécificité (la lignée cellulaire utilisée comme indicateur d'activité peut être sensible à d'autres médiateurs, connus ou à découvrir). En outre les médicaments administrés au patients (corticoïdes, ciclosporine, sérum antilymphocytaire) et présents dans le sérum peuvent interférer avec l'activité biologique [79].

## B/ Les dosages immunologiques :

Les dosages immunologiques recourent à l'emploi d'anticorps (souvent monoclonaux) spécifiques de la cytokine mesurée : les plus utilisés sont les **RIA** (radioimmunoassay) et les **ELISA** (enzyme-linked-immunosorbent-assays). L'avantage majeur de ces techniques réside dans leur simplicité et leur reproductibilité. Un inconvénient non négligeable est leur coût et l'utilisation de radio-éléments dans le cas du RIA. Enfin ces techniques ne sont pas bon reflet de l'activité biologique réelle des cytokines étudiées. Ces deux méthodes sont complémentaires; une attitude rationnelle consisterait en leur utilisation en parallèle ou au moins à contrôler l'activité biologique sur des prélèvements sélectionnés lorsque les deux techniques, biologique et immunologique, sont disponibles.

### 1-5-3- Limites du dosage des cytokines en pratique clinique :

Les cytokines agissent comme des agents promoteurs ou modérateurs des réponses immunitaire et inflammatoire ou de la réparation tissulaire. Ces signaux intercellulaires agissent habituellement sur les modes paracrine ou autocrine plutôt qu'endocrine. Leur détection à des concentrations substantielles dans le sérum correspond donc habituellement à des situations pathologiques caricaturales (choc septique, rejet d'allogreffes.....) : dans ce cas le dosage sera davantage utile comme support pour la discussion d'un mécanisme physiopathologique que comme moyen diagnostique. Dans des situations plus subtiles, il est rare que ces dosages sériques soient perturbés de façon significative, alors que l'étude de la production in situ des cytokines, peut apporter des éléments importants de discussion [80].

Le dosage d'une seule cytokine, voire d'un nombre limité d'entre elles, fait également apparaître une limitation importante dans l'interprétation des résultats. En effet, les cytokines sont unies par des liens extrêmement complexes dans le cadre d'un réseau (network) enchaînant de multiples interactions. Pour traduire cette complexité certains auteurs ont comparé ce réseau à des phrases constituées de mots (les cytokines) dont la signification dépend évidemment du contexte. Doser une seule cytokine à un moment donné serait donc comparable à sortir un mot de son contexte. L'interprétation de ces quelques syllabes n'a donc pas, on le conçoit, une signification univoque : le rôle d'une cytokine donnée dépend du milieu dans lequel elle s'exprime, et tout particulièrement du bruit de fond émis par les autres cytokines

Une autre limite à l'utilisation routinière de ces dosages dans la surveillance de certaines affections tient au fait que les cytokines sont les messagers obligatoires de toute réponse immunitaire ou inflammatoire. Ainsi l'ascension brutale de la concentration d'IL-6 après une transplantation pulmonaire peut tout aussi bien traduire un phénomène de rejet d'allogreffe, ou encore d'une pneumopathie à cytomégalovirus. Seule la précocité des variations de les marqueurs peut alors jouer le rôle de signal d'alarme non spécifique imposant des investigations diagnostiques rapides.

La concentration circulante d'une cytokine ne reflète pas uniquement sa production : elle dépend aussi de sa « consommation » par fixation sur les récepteurs de ces cellules cibles, pouvant aboutir à une rapide décroissance des concentrations sériques détectables. L'état fonctionnel des cellules-cibles peut d'ailleurs être indirectement reflété par la libération de récepteurs solubles de l'IL-2 et l'IL-6, également dosables dans des liquides biologiques.

Le réseau des cytokines connaît un niveau de complexité supplémentaire si l'on y intègre la notion d'inhibiteurs naturels dont la liste s'allonge régulièrement. De tels inhibiteurs sont bien caractérisés pour l'IL-1 et le TNF. La détection par dosage immunologique d'une concentration élevée de l'une de ces cytokines ne présage donc pas de l'activité biologique réelle présente dans le sérum, qui dépend de l'équilibre entre la cytokine et ses antagonistes.

#### 1-5-4- Intérêt du dosage des cytokines en pratique clinique :

A/ Dans une population de malades :

Le dosage sérique, urinaire ou alvéolaire d'une cytokine chez un individu donné pose le délicat problème de la signification d'un résultat brut que nous discuterons plus loin. Une telle limite à l'analyse des dosages de cytokines n'existe plus à l'échelle d'une population de malades où une concentration élevée, par comparaison avec un groupe témoin, prend toute sa signification et permet d'évoquer des mécanismes physiopathologiques à l'origine des perturbations observées. Les dosages de cytokines dans le sérum ou d'autres liquides biologiques permettent de démontrer un certain niveau d'activation du système immunitaire dans diverses affections. De plus, ce témoin d'activation peut apporter une orientation physiopathologique, voire thérapeutique, dans des maladies jusque-là mal comprises. Ainsi, la cascade d'événements suivant une agression à germes à GRAM-négatif a été clarifiée par l'évaluation séquentielle de la production de cytokines.

B/ Chez un individu donné :

Un premier avantage résiderait dans la valeur pronostique des concentrations de cytokines dans certaines affections comme le choc septique. Dès la fin des années 80 de nombreux auteurs avaient signalé le caractère péjoratif de concentrations élevées de TNF-alpha et même leur corrélation avec la mortalité au cours des états septiques graves. L'IL-6 elle aussi, a pu être considérée comme un marqueur de gravité et ses concentrations ont été trouvées en corrélation positive avec les concentrations circulantes de lactates et négative avec la pression artérielle et la numération plaquettaire : enfin, des concentrations élevées d'IL-6 à l'admission semblent avoir une valeur pronostique péjorative. Cependant ces résultats ne témoignent en rien d'un lien de causalité entre la production d'une cytokine et la gravité du choc. Dans le cadre du choc septique, une analyse univariée a montré que les concentrations de TNF-alpha et d'IL-1 sont en corrélation avec l'évolution défavorable de la maladie. Cependant, de nombreux facteurs de confusion persistent dans de telles études et si l'on utilise une analyse multivariée. Il apparaît que des témoins cliniques et paracliniques simples sont de meilleurs marqueurs de la gravité de l'affection que les cytokines : sévérité de la maladie sous-jacente, âge du patient, bactériémie documentée, diurèse, PH artériel.

Un autre avantage des dosages de cytokine réside dans la surveillance dynamique de leur concentration dans des situations bien définies, avec l'espoir d'y trouver un signal d'alarme parfois activé avant l'apparition de signes cliniques dont l'interprétation est souvent délicate. La transplantation en constitue un bon exemple. Les phénomènes de rejet d'allogreffes sont orchestrés par un réseau complexe d'interactions cellulaires où les cytokines jouent un rôle de premier plan. Dans ces conditions, on a pu proposer les dosages sériques de cytokines comme marqueurs précoces du rejet. Certaines publications ont fait état de concentrations élevées de cytokines (TNF-ALPHA, IL-6.....) peu avant la survenue des premiers signes cliniques ou biologiques du rejet. Si on ne peut contester que ces dosages dynamiques puissent être un témoin précoce du dysfonctionnement du greffon, il est bien vite apparu de nombreuses limites à leur utilisation pratique. Tout d'abord, la sensibilité de ces marqueurs de rejet, initialement bonne au cours des 3 premières semaines postopératoires chez le transplanté pulmonaire, par exemple, décroît rapidement par la suite (au-delà du premier mois, la plupart de ces marqueurs ont fait la preuve de leur manque réel de sensibilité).



De plus, l'ascension précoce de ces concentrations impose la mise en œuvre rapide d'explorations exhaustives du fait de la faible spécificité des résultats : en effet, l'infection, et en particulier l'infection symptomatique à cytomégalovirus est responsable d'une ascension significative des concentrations de cytokine. Augmenter l'immunosuppression dans un tel cas n'est évidemment pas souhaitable. Un enrichissement intéressant de ces dosages a été la détection des acides ribonucléiques messagers (ARNm) des cytokines par hybridation in situ permettant la mise en évidence d'un profil d'activation de type Th2 au sein du poumon de sujets asthmatiques. La mise en évidence chez la souris de deux populations lymphocytaires Th1 et Th2 (population T helpers de type 1 et 2) a en effet permis la modélisation de la réponse immunitaire chez l'asthmatique, au moins dans sa forme atopique. De fait, une activation lymphocytaire de type Th2, caractérisée par la production d'IL-3, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) est à même d'aboutir aux anomalies rencontrées chez ces patients : maturation et différenciation éosinophile sous l'action de l'IL-5 mais aussi de l'IL-3 et du GM-CSF, croissance et différenciation mastocytaire par l'IL-3, synthèse accrue d'immunoglobulines de classe E par l'IL-4 [81].

## 1-6- LE COÛT DES CYTOKINES :

L'utilisation des cytokines (interférons, interleukines, facteurs de croissance) est en plein développement. Le prix de ces médicaments innovants issus de la biotechnologie, est élevé. Afin de surveiller leur consommation, la distribution a été réservée aux pharmacies hospitalières. La découverte des cytokines est une avancée scientifique considérable. Leur utilisation en thérapeutique avec la mise en évidence d'une certaine efficacité dans les maladies tumorales et virales, constitue aussi un progrès. Des possibilités importantes pour la recherche et pour les études cliniques sont ainsi ouvertes. Des budgets considérables sont consacrés aux programmes de recherche en biotechnologie : ainsi, pour 1992, le gouvernement américain a prévu une allocation de 3.6 milliards de dollars pour l'agence fédérale *Health and Human Services* [82].

# CHAPITRE II

# MATERIEL ET METHODES

## 1-Principe général de l'ELISA :

ELISA est une technique immuno-enzymatique actuellement très utilisée dans la majorité des laboratoires. Elle est basée d'une part sur des réactions immunologiques entre antigène et anticorps spécifiques et d'autre part sur une réaction enzymatique finale entre une enzyme et son substrat spécifique.

Le but de cette technique « ELISA » est de mettre en évidence la présence ou l'absence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques dans un échantillon donné, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique finale dans laquelle l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation d'un chromogène substrat incolore pour donner un produit coloré, dont l'intensité de coloration est proportionnelle ou inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes ou d'anticorps spécifiques présents.

L'intensité de coloration est exprimée en densité optique lue par un spectrophotomètre.

Deux grands principes régissent le test ELISA :

- \* Méthode Compétitive.
- \* Méthode Sandwich.

**1-Dans le type compétition** : La coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène ou d'anticorps.

**2-Dans le type Sandwich** : La coloration est proportionnelle à la quantité d'antigènes ou d'anticorps présents dans le sérum (c'est le cas de la méthode de dosage des cytokines).

Les techniques ELISA peuvent être de deux types (Figures 8).

- \* Premier type : -Compétition
- \* Deuxième type : -Sandwich vrai.  
-Sandwich indirect

## **1-Principe général de l'ELISA :**

ELISA est une technique immuno-enzymatique actuellement très utilisée dans la majorité des laboratoires. Elle est basée d'une part sur des réactions immunologiques entre antigène et anticorps spécifiques et d'autre part sur une réaction enzymatique finale entre une enzyme et son substrat spécifique.

Le but de cette technique « ELISA » est de mettre en évidence la présence ou l'absence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques dans un échantillon donné, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique finale dans laquelle l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation d'un chromogène substrat incolore pour donner un produit coloré, dont l'intensité de coloration est proportionnelle ou inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes ou d'anticorps spécifiques présents.

L'intensité de coloration est exprimée en densité optique lue par un spectrophotomètre.

Deux grands principes régissent le test ELISA :

- \* Méthode Compétitive.
- \* Méthode Sandwich.

**1-Dans le type compétition** : La coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène ou d'anticorps.

**2-Dans le type Sandwich** : La coloration est proportionnelle à la quantité d'antigènes ou d'anticorps présents dans le sérum (c'est le cas de la méthode de dosage des cytokines).

Les techniques ELISA peuvent être de deux types (Figures 8).

- \* Premier type : -Compétition
- \* Deuxième type : -Sandwich vrai.
  - Sandwich indirect

## **1-Principe général de l'ELISA :**

ELISA est une technique immuno-enzymatique actuellement très utilisée dans la majorité des laboratoires. Elle est basée d'une part sur des réactions immunologiques entre antigène et anticorps spécifiques et d'autre part sur une réaction enzymatique finale entre une enzyme et son substrat spécifique.

Le but de cette technique « **ELISA** » est de mettre en évidence la présence ou l'absence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques dans un échantillon donné, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique finale dans laquelle l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation d'un chromogène substrat incolore pour donner un produit coloré, dont l'intensité de coloration est proportionnelle ou inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes ou d'anticorps spécifiques présents.

L'intensité de coloration est exprimée en densité optique lue par un spectrophotomètre.

Deux grands principes régissent le test **ELISA** :

\* Méthode Compétitive.

\* Méthode Sandwich.

**1-Dans le type compétition** : La coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène ou d'anticorps.

**2-Dans le type Sandwich** : La coloration est proportionnelle à la quantité d'antigènes ou d'anticorps présents dans le sérum (c'est le cas de la méthode de dosage des cytokines).

Les techniques ELISA peuvent être de deux types (**Figures 8**).

\* Premier type : -Compétition

\* Deuxième type : -Sandwich vrai.

-Sandwich indirect

## 1-Principe général de l'ELISA :

ELISA est une technique immuno-enzymatique actuellement très utilisée dans la majorité des laboratoires. Elle est basée d'une part sur des réactions immunologiques entre antigène et anticorps spécifiques et d'autre part sur une réaction enzymatique finale entre une enzyme et son substrat spécifique.

Le but de cette technique « **ELISA** » est de mettre en évidence la présence ou l'absence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques dans un échantillon donné, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique finale dans laquelle l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation d'un chromogène substrat incolore pour donner un produit coloré, dont l'intensité de coloration est proportionnelle ou inversement proportionnelle à la concentration d'antigènes ou d'anticorps spécifiques présents.

L'intensité de coloration est exprimée en densité optique lue par un spectrophotomètre.

Deux grands principes régissent le test **ELISA** :

- \* Méthode Compétitive.
- \* Méthode Sandwich.

**1-Dans le type compétition** : La coloration est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène ou d'anticorps.

**2-Dans le type Sandwich** : La coloration est proportionnelle à la quantité d'antigènes ou d'anticorps présents dans le sérum (c'est le cas de la méthode de dosage des cytokines).

Les techniques **ELISA** peuvent être de deux types (**Figures 8**).

- \* Premier type : -Compétition
- \* Deuxième type : -Sandwich vrai.  
-Sandwich indirect

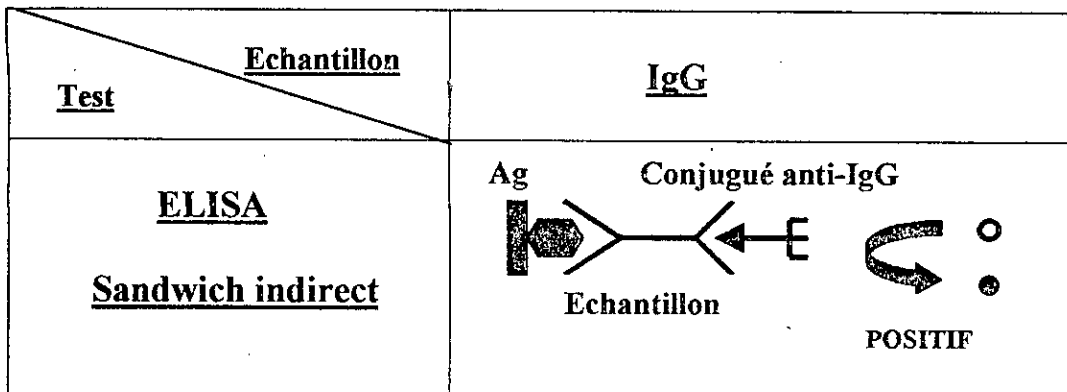
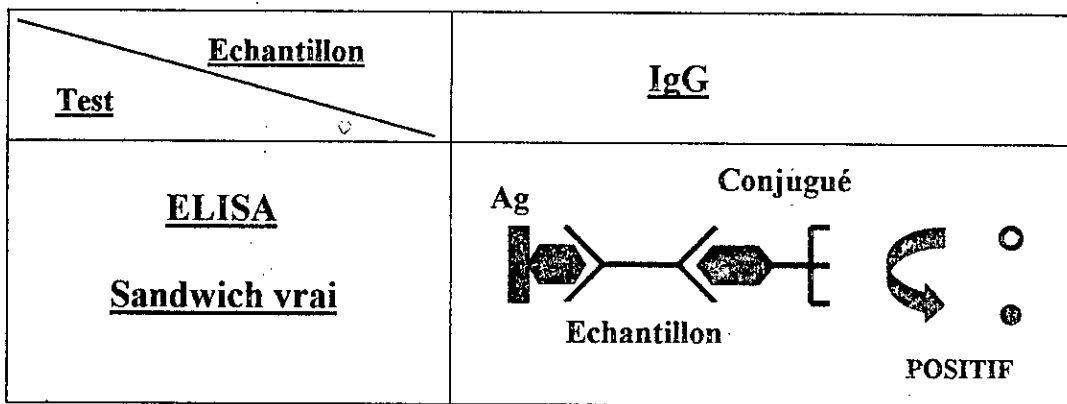
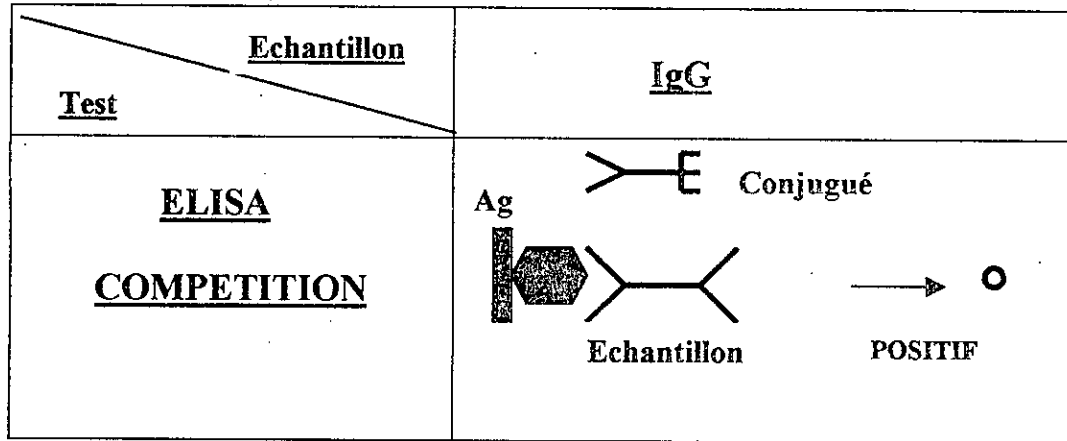


Figure 8 : Différentes types du test ELISA.

## 1-1-Technique (Diagnostics Pasteur et Innostest Diagnostics) :

### 1-1-1-Principe :

Il s'agit d'un dosage immuno-enzymatique de type **SANDWICH** en deux étapes immunologiques : La première étape permet la capture des différentes cytokines (IL-6, IL-8, IL-2Ra, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF) par un anticorps monoclonal anti-(IL-6, IL-8, IL-2Ra, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF) fixé dans les puits d'une plaque de microtitration, la seconde étape permet simultanément la liaison d'un deuxième anticorps monoclonal anti-(IL-6, IL-8, IL-2Ra, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF) biotinylé au complexe anticorps de phase-antigène et la fixation d'un conjugué Streptavidine-Peroxydase à l'anticorps biotinylé par l'intermédiaire de la biotine. L'activité enzymatique liée est ensuite déterminée par addition d'un substrat chromogène. L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la concentration en cytokine présente dans l'échantillon ou le standard (**Figure 9**).

### 1-1-2-Appareillage et réactifs :

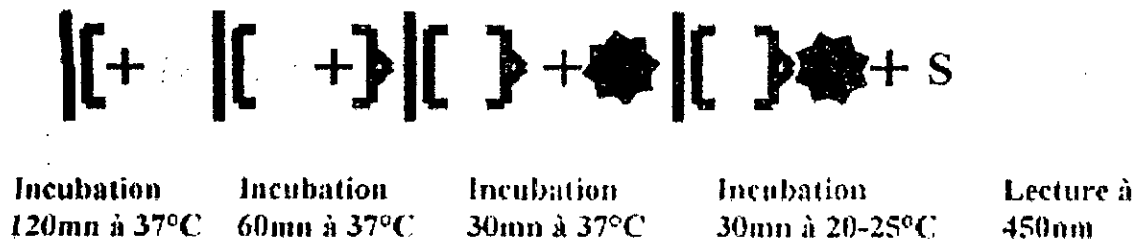
#### a)-Appareillage :

- Centrifugeuse (JOUAN).
- Agitateur (VORTEX)
- Incubateur réglable : Bain marie thermostat à 37°C (JOUAN).
- Incubateur / Agitateur (MUREX).
- Laveur ELISA automatique (ORGANON TEKNIKA) (**Photo 1**).
- Laveur de plaques de microtitration manuel (ORGANON TEKNIKA).
- Lecteur ELISA (SORIN) : Deuxième génération, plus logiciel intégré (**Photo 2**)

#### b)-Verrerie et autre matériel : (Photo 3)

- Eprouvettes graduées de 20 ml, 400 ml.
- Pipettes et multipipettes à embouts réglables.
- Verrerie nécessaire à usage unique (tubes stérilisées)
- Papier absorbant et feuilles adhésives pour microplaques.
- Barquettes.





**Figure 9 : Principe de la technique ELISA.**



**Photo 1 : Laveur de plaques de microtitration  
manuel (ORGANON TEKNIKA).**

- Embouts pour pipettes.
- Gants à usage unique.
- Eau distillée.
- Eau de javel.

**c)-Réactifs :**

Les réactifs nécessaires à la réalisation de cette étude sont réunis dans des trousse provenant de firmes différentes :

- Trousse Diagnostics Pasteur, (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ).
- Trousse Innostest, (IL-6, IL-8, IL-2Ra, TNF- $\alpha$  et GM-CSF)

**Chaque trousse contient : (ANNEXE 1 et 2)**

- Une phase solide (microplaque) sur laquelle sont fixés les antigènes inactivés
- Une série de réactifs conditionnés en flacon ou en bac

**1-1-3-Prélèvement et conservation des échantillons :****1-1-3-1-Téchnique de prélèvement :**

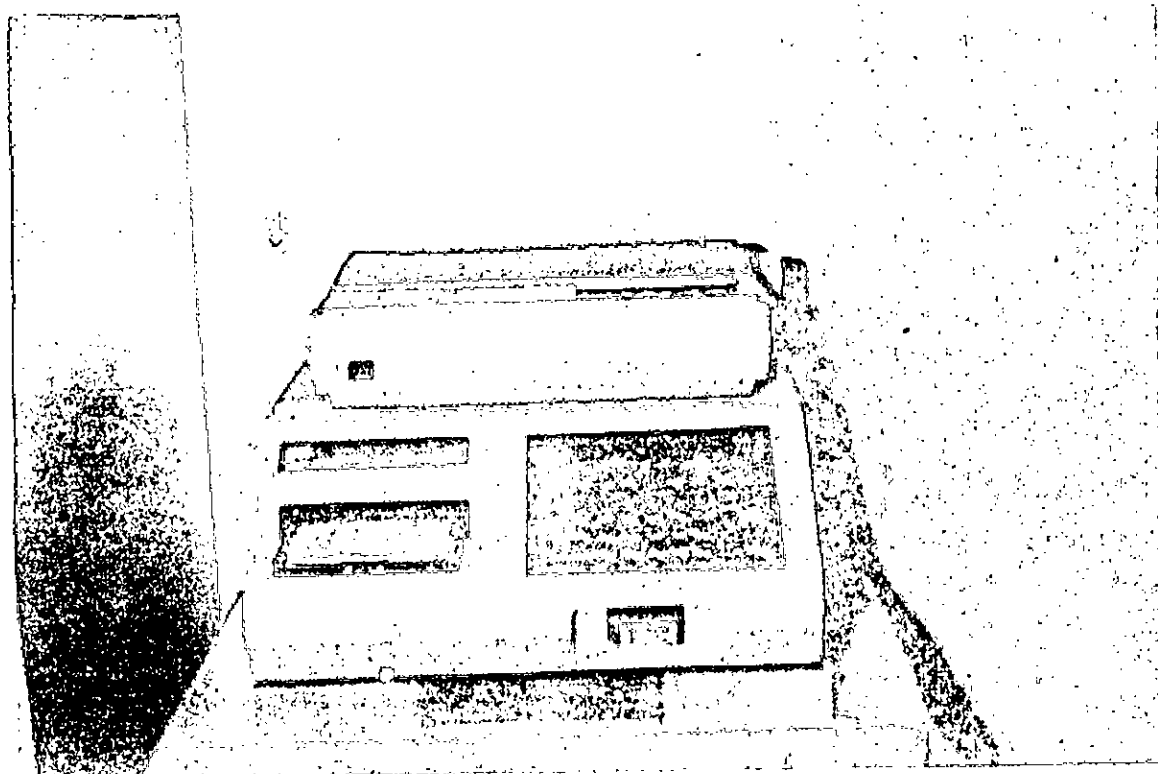
Le sang est prélevé aseptiquement par ponction veineuse dans un tube stérile sans anti-coagulant (sérum) ou avec anticoagulant (EDTA, Héparine, Citrate)(Plasma)

**1-1-3-2-Préparation des échantillons :****Pour l'obtention d'un sérum :**

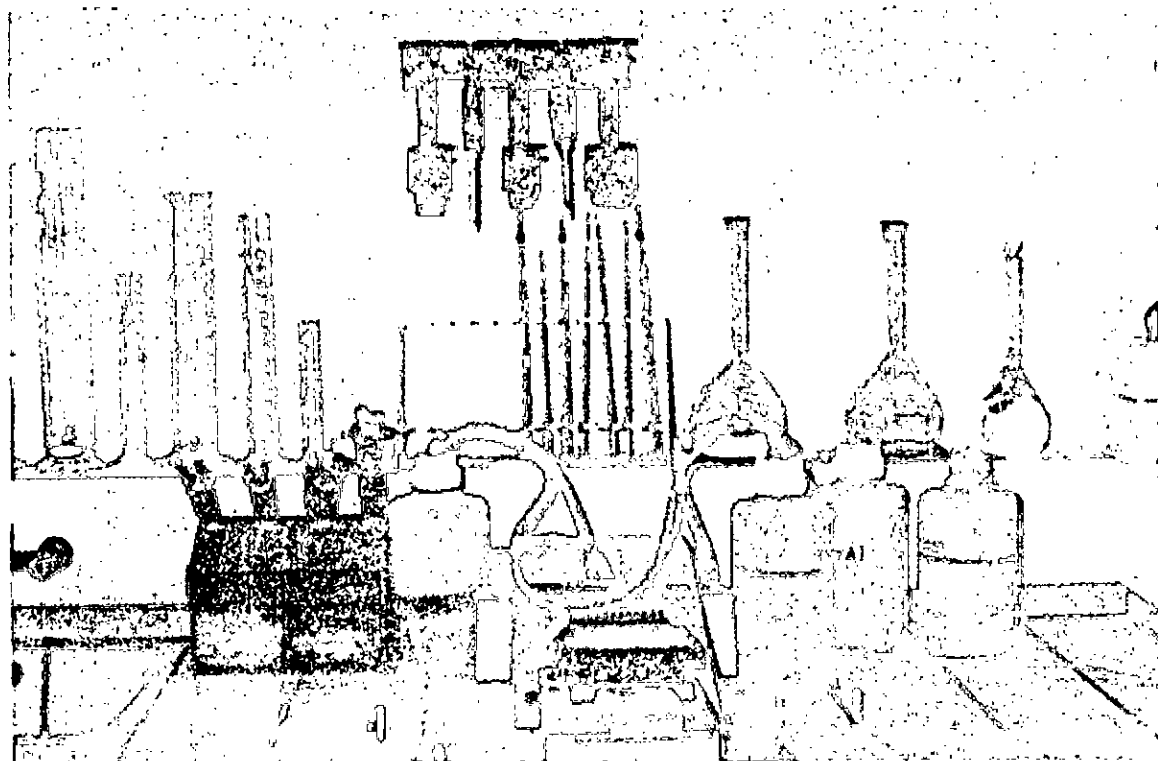
- Laisser reposer les prélèvements sanguins deux heures au minimum à température stable comprise entre 10 et 20°C.
- Retirer si possible le caillot après sa formation complète au moyen d'un crochet.
- Centrifuger à 3000 tours/mn pendant 2mn.

**1-1-3-3-Conservation et transport des échantillons :**

Le transport des échantillons s'effectue à froid +4°C en container isotherme + bloc conservateur congelé (plaque eutectique).



**Photo 2** : Lecteur ELISA (SORIN) : Deuxième génération, plus logiciel intégré.



**Photo 3** : Verreries et autre matériel.

Lors d'une utilisation immédiate des sérums, la conservation se fait pendant :

- deux heures à moins de 25°C
- 2 à 48 heures à +4°C (réfrigérateur).

Lors d'une utilisation différée des sérums, la congélation à -20°C est nécessaire.

La décongélation des échantillons se fait :

- Lentement (18 heures) à +4°C.

L'altération physique des immunoglobulines, possible lors de la congélation / décongélation, est réduite par l'adjonction de glycérol (cryoprotecteur) à 50%.

#### **1-1-4-Mode opératoire :**

Porter les réactifs et les échantillons à température ambiante avant le début du test.

Les précautions à prendre au cours de l'exécution des protocoles-1 et 2 sont en **Annexe-3**.

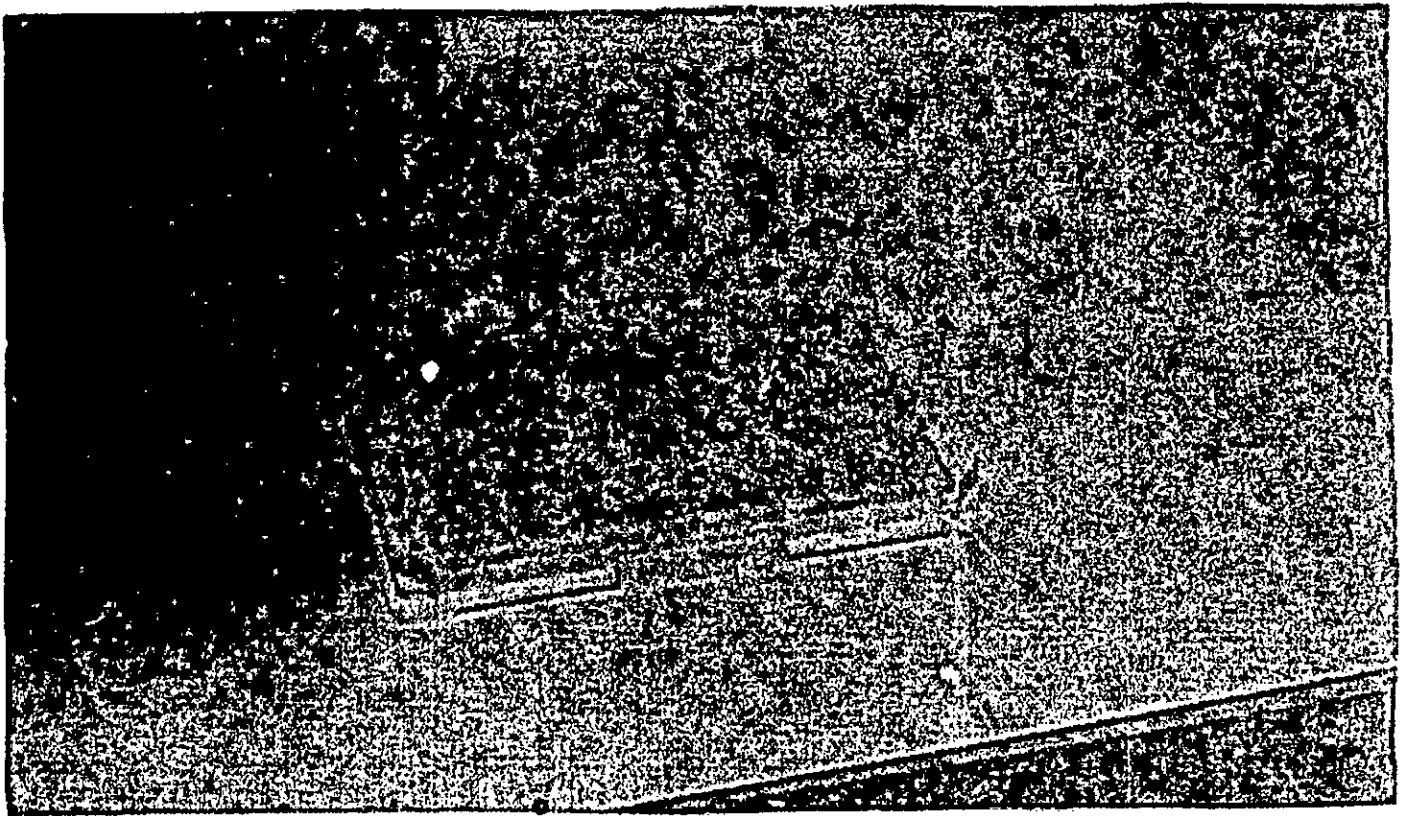
La reconstitution des réactifs est résumée en annexe-1 et 2.

#### **1-1-4-1-Protocole-1 (Diagnostics Pasteur) :**

##### **A)-Protocole : IL-6**

##### **1-1<sup>ère</sup> incubation :**

- Ajouter 50µl de tampon R2 à chaque puits (**Photo 4**).
- Ajouter 50µl de S0 dans les 2 premiers puits.
- Ajouter 50µl de chaque standard (S1, S2, S3, S4) et de chaque échantillon dans les puits suivants.
  
- Recouvrir la plaque de papier adhésif et mettre à incuber 1h à 37°C ± 2°C dans un incubateur à chaleur humide.
- Retirer le papier adhésif **précautionneusement**.
- Laver **vigoureusement** la plaque 5 fois avec le tampon de lavage.(**Annexe-4**).



1ère Ligne

2ème Ligne

A1=BLANC

A2=S2

B1=CN

B2=S3

C1=CN

C2=S3

D1=S0

D2=S4

E1=S0

E2=S4

F1=S1

F2=S5

G1=S1

G2=S5

H1=S2

H2=Ech-1

Remarque : Les autres lignes représentent les différents échantillons.

Photo 4 : Microplaque après distribution des échantillons et des réactifs.

**Figure 10 : Modèle de distribution de standards et d'échantillons d'une plaque de microtitration ELISA.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	STD3	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
B	CN	STD4	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
C	CN	STD4	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
D	STD1	STD5	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
E	STD1	STD5	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
F	STD2	Ech-1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
G	STD2	Ech-2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82
H	STD3	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83

**2-2<sup>ème</sup> incubation :**

- Ajouter 100µl de conjugué R5 à chaque puits.
- Recouvrir d'un nouveau papier adhésif.
- Mettre à incuber 30mn à 37°C ± 2°C dans un incubateur à chaleur humide.
- Retirer le papier adhésif avec soin et laver 5 fois.

**3-Révélation enzymatique :**

- Ajouter 100µl de R6 Substrat TMB dans chaque puits.
- Placer la plaque **dans le noir** à température du laboratoire pendant 30mn. **Ne pas utiliser de papier aluminium (Photo 5).**
- Ajouter 100µl de R7 solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M) dans chaque puits.
- Mesurer la Densité Optique à 450nm **dans les 30mn** après ajout de la solution d'arrêt (Photo 6).

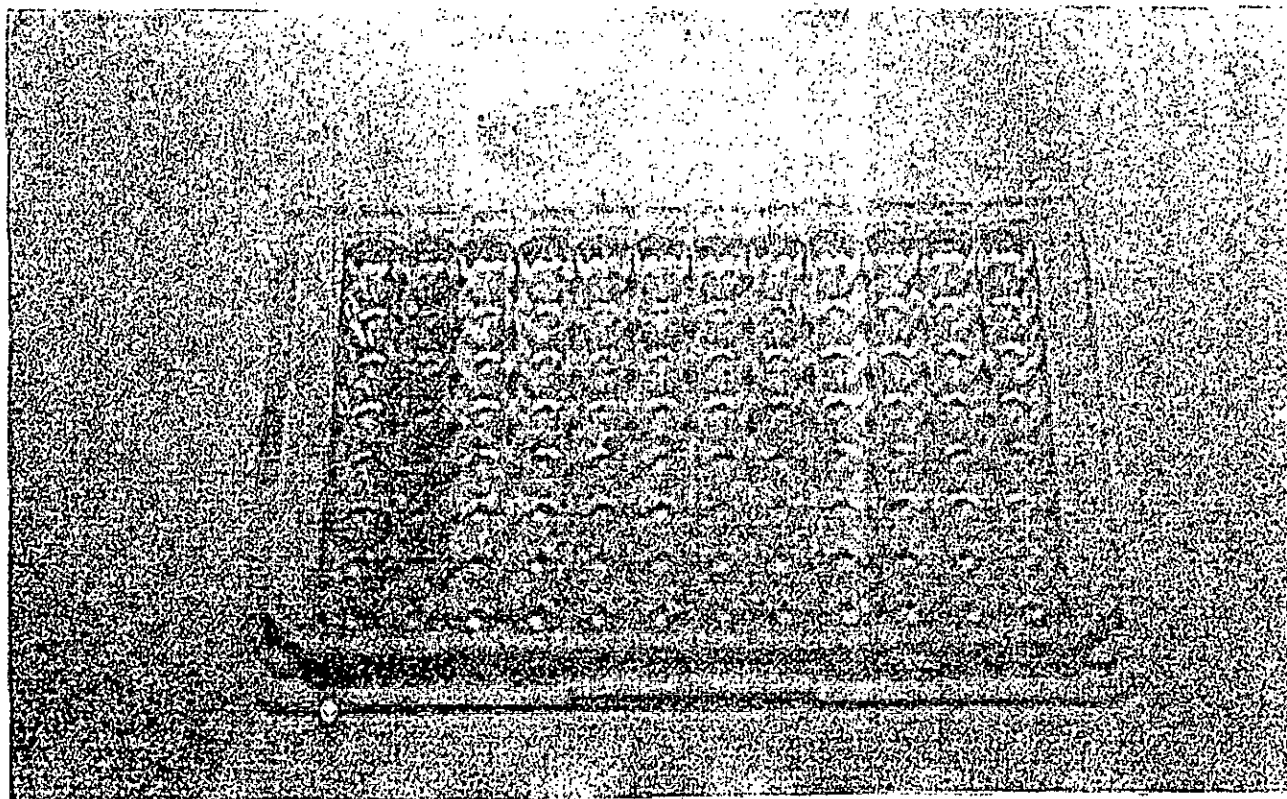
**Remarque :** Voir Annexe-4 pour utilisation partielle de la plaque.

**B)-Protocole : TNF-α****1-1<sup>ère</sup> incubation :**

- Ajouter 50µl de réactif anticorps biotinylés dans chaque puits.
- Ajouter 50µl de chaque point de gamme et de chaque échantillon dans les puits (toujours 2 puits par test).
- Recouvrir la plaque de papier adhésif et de mettre à incuber 2h à 20-25°C.
- Retirer le papier précautionneusement.
- Laver vigoureusement la plaque **3fois** avec la solution de lavage.

**2-2<sup>ème</sup> incubation :**

- Ajouter 100µl de solution Streptavidine HPR dans chaque puits.

1ère Ligne2ème Ligne

A1=BLANC

A2=S2

B1=CN

B2=S3

C1=CN

C2=S3

D1=S0

D2=S4

E1=S0

E2=S4

F1=S1

F2=S5

G1=S1

G2=S5

H1=S2

H2=Ech-1

Remarque : Les autres lignes représentent les différents échantillons.

Photo 5 : Microplaque après ajout du substrat TMB et incubation dans le noir à T° ambiante.



- Recouvrir d'un nouveau papier adhésif.
- Mettre à incuber 30mn à 20-25°C dans les mêmes conditions que la 1<sup>ère</sup> incubation.
- Retirer le papier adhésif avec soin et laver 3fois.

**3-Révélation enzymatique :**

- Ajouter 100µl de R6 Substrat (TMB) dans chaque puits.
- Placer la plaque **dans le noir** à température du laboratoire pendant 30mn (Photo 5).
- Ajouter 100µl de R7 solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M) dans chaque puits.
- Mesurer la Densité Optique sur un lecteur ELISA à 450 et 550nm (Photo 6).

**C)-Protocole : IFN-γ****1-1<sup>ère</sup> incubation :**

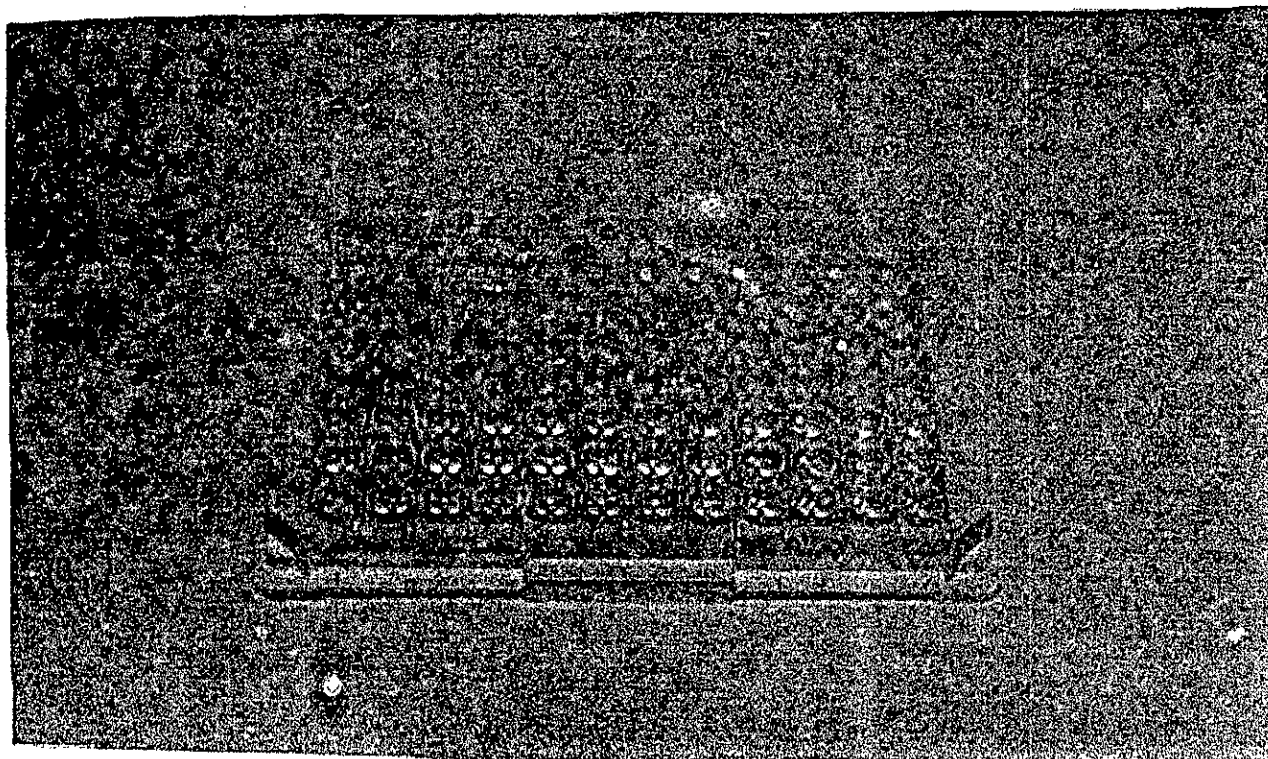
- Ajouter 50µl de tampon R2 à chaque puits.
- Ajouter 50µl de chaque point de gamme et de chaque échantillon dans les puits.
- Recouvrir la plaque de papier adhésif et mettre à incuber 2h à 37°C ± 2°C dans un incubateur à chaleur humide.
- Retirer le papier adhésif **précautionneusement**.
- Laver **vigoureusement** la plaque 5 fois avec le tampon de lavage.

**2-2<sup>ème</sup> incubation :**

- Ajouter 100µl de conjugué R5 dans chaque puits.
- Recouvrir d'un nouveau papier adhésif.
- Mettre à incuber 2h à 37 ± 2°C dans un incubateur à chaleur humide.
- Retirer le papier adhésif avec soin et laver 5 fois.

**3-Révélation enzymatique :**

- Ajouter 100µl de R6 Substrat TMB dans chaque puits.

1<sup>ère</sup> Ligne2<sup>ème</sup> Ligne

A1=BLANC

A2=S2

B1=CN

B2=S3

C1=CN

C2=S3

D1=S0

D2=S4

E1=S0

E2=S4

F1=S1

F2=S5

G1=S1

G2=S5

H1=S2

H2=Ech-1

Remarque : Les autres lignes représentent les différents échantillons.

Photo 6 : Microplaque après ajout de la solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,18M).

- Placer la plaque **dans le noir** à température du laboratoire pendant 30mn.
- Ajouter 100µl de R7 solution d'arrêt ( $H_2SO_4$  0.18M) dans chaque puits.
- Mesurer la Densité Optique à 450nm **dans les 30mn** après ajout de la solution d'arrêt.

#### 1-1-4-2-Protocole-2 (INNOTEST) :

##### A)-INNOTEST IL-6

REACTIFS	VOLUME	PROTOCOLE
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tampon d'incubation</li> <li>- Tampon de dilution</li> <li>- Standards et échantillons</li> </ul>	25µl 100µl 100µ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits</li> <li>• Ajouter dans le 1<sup>er</sup> puits</li> <li>• Distribuer les standards et les échantillons en double</li> <li>• Couvrir de papier adhésif</li> <li>• Incuber pendant 2h à 37°C</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le conjugué-1 avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4 × 0.4ml	Une série de 4 lavages
<b>Conjugué-1</b>	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits</li> <li>• Recouvrir de papier adhésif</li> <li>• Incuber pendant 60mn à 37°C</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le conjugué-2 avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.4ml	Une série de 4 lavages.
<b>Conjugué-2</b>	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Recouvrir de papier adhésif.</li> <li>• Incuber pendant 30mn à 37°C.</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le substrat avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.4ml	Une série de 4 lavages.
Substrat	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Incuber pendant 30mn à 20-25°C <b>dans le noir</b>.</li> </ul>
Acide sulfurique (2N).	100µL	Ajouter dans chaque puits.
		Lire la densité optique à 450 nm après 15 mn

**B)-INNOTEST IL-8**

REACTIFS	VOLUME	PROTOCOLE
Standards et échantillons	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Incuber pendant 2h à 37°C.</li> </ul>
Solution de lavage	5×0.4ml	Une série de 5 lavage.
<b>Conjugué-1</b>	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Couvrir la plaque de papier adhésif.</li> <li>• Incuber pendant 60mn à 37°C.</li> </ul>
Solution de lavage	5×0.4ml	Une série de 5 lavage
<b>Conjugué-2</b>	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Recouvrir avec un papier adhésif.</li> <li>• Incuber pendant 20mn à 37°C.</li> </ul>
Solution de lavage	5×0.4ml	Une série de 5 lavage.
Diluant substrat	100µl	Ajouter dans chaque puits.
Substrat (TMB)	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits</li> <li>• Incuber pendant 20mn à 20-25°C dans le noir.</li> </ul>
Acide sulfurique (2N).	100µL	Ajouter dans chaque puits.
		Lire la Densité Optique à 450nm après 30mn.

**C)-INNOTEST IL-2R**

REACTIFS	VOLUME	PROTOCOLE
- Conjugué-1 - Tampon de dilution - Standards et échantillons	100µl 25µl 25µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Ajouter dans le 1<sup>er</sup> puits.</li> <li>• Distribuer les standards et les échantillons en double.</li> <li>• Couvrir la plaque de papier adhésif.</li> <li>• Incuber pendant 1h à 37°C</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le conjugué-2 avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.3ml	Une série de 4 lavage.
<b>Conjugué-2</b>	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits.</li> <li>• Recouvrir avec papier adhésif.</li> <li>• Incuber pendant 30mn à 37°C.</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le substrat avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.3ml	Une série de 4 lavage
Substrat (TMB)	100µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajouter dans chaque puits</li> <li>• Incuber pendant 30mn à 20-25°C.</li> </ul>
Acide sulfurique (2N)	100µl	Ajouter dans chaque puits.
		Lire la Densité Optique à 450nm après 15mn.

D)-INNOTEST TNF- $\alpha$ 

REACTIFS	VOLUME	PROTOCOLE
-Tampon d'incubation -Tampon de dilution -Standards et échantillons	50 $\mu$ l 50 $\mu$ l 50 $\mu$ l	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Ajouter dans le 1<sup>er</sup> puits</li> <li>•Distribuer les standards et les échantillons en double</li> <li>•Couvrir de papier adhésif</li> <li>•Incuber pendant 2h à 37°C</li> </ul>
<b>Attention : préparer le conjugué-1 avant la fin de l'incubation.</b>		
Solution de lavage	4x0.4 ml	Une série de 4 lavages
<b>Conjugué-1</b>	100 $\mu$ l	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Recouvrir de papier adhésif</li> <li>•Incuber pendant 60mn à 37°C</li> </ul>
<b>Attention : préparer le conjugué-2 avant la fin de l'incubation.</b>		
Solution de lavage	4x0.4ml	Une série de 4 lavages
<b>Conjugué-2</b>	100 $\mu$ l	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Recouvrir de papier adhésif</li> <li>•Incuber pendant 30mn à 37°C</li> </ul>
<b>Attention : préparer le substrat avant la fin de l'incubation.</b>		
Solution de lavage	4x0.4ml	Une série de 4 lavages
Substrat	100 $\mu$ l	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Incuber pendant 30mn à 20-25°C <b>dans le noir.</b></li> </ul>
Acide sulfurique (2N)	100 $\mu$ l	Ajouter dans chaque puits.
		Lire la Densité Optique à 450nm après 15mn

**E)-INNOTEST GM-CSF**

REACTIFS	VOLUME	PROTOCOLE
-Tampon d'incubation -Tampon de dilution -Standards et échantillons	50µl 150µl 150µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Ajouter dans le 1<sup>er</sup> puits</li> <li>•Distribuer les standards et les échantillons en double</li> <li>•Couvrir de papier adhésif</li> <li>•Incuber pendant 2h à 37°C</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le conjugué-1 avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.4ml	Une série de 4 lavages
<b>Conjugué-1</b>	200µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits</li> <li>•Recouvrir de papier adhésif</li> <li>•Incuber pendant 60mn à 37°C</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le conjugué-2 avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.4mL	Une série de 4 lavages.
<b>Conjugué-2</b>	200µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits.</li> <li>•Recouvrir de papier adhésif.</li> <li>•Incuber pendant 30mn à 37°C.</li> </ul>
<b>Attention</b> : préparer le substrat avant la fin de l'incubation.		
Solution de lavage	4×0.4mL	Une série de 4 lavages.
Substrat	200µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ajouter dans chaque puits.</li> <li>•Incuber pendant 30mn à 20-25°C <b> dans le noir.</b></li> </ul>
Acide sulfurique (2N)	50µl	Ajouter dans chaque puits
		Lire la Densité Optique à 450nm après 15mn.

### 3-Méthode d'exploitation des résultats :

Deux modes de lecture peuvent être utilisés :

#### 3-1-Spectrophotomètre simple, première génération : Lecture manuelle.

La lecture des densités optiques des échantillons est pratiquée, en utilisation manuelle sur un spectrophotomètre classique, la lecture des valeurs moyennes des densités optique (DO) obtenues des échantillons est pratiquée, ensuite à partir des standards, une courbe d'étalonnage sur papier semi-logarithmique est tracée.

Les DO en ordonnée (Y) et les concentrations des standards en abscisse (X) suivant les DO de chaque échantillon la concentration de chaque cytokine est obtenue à partir de la courbe.

#### 3-2-Spectrophotomètre avec logiciel intégré deuxième génération : Lecture automatique (quantitatif).

Actuellement des lecteurs de deuxième génération possédant des logiciels permettant l'intégration de la courbe d'étalonnage et l'obtention immédiate des concentrations des échantillons des cytokines (voir modèles de courbe obtenus par SORIN) (ANNEXE-5).

TABLEAU 9

Données générales sur la méthode.

Caractéristique et performance de la méthode	IL-6	IL-8	IL-2Ra	TNF- $\alpha$	GM-CSF
Limite de détection	4.3pg/ml	-	390pg/ml	4pg/ml	8.0pg/ml
Domaine de mesure	0-480pg/ml	0-300pg/ml	0-8000pg/ml	0-800pg/ml	0-320pg/ml
CV : Intra essai	1.5-4.5 %	< 6 %	1.4-7.0 %	1.1-7.8 %	4.0-7.5 %
CV : Inter essai	2.3-8.8 %	< 10 %	2.2-8.7 %	4.7-13.4 %	1.7-9.4 %



#### 4-Méthode statistiques utilisées :

Les tests statistiques que nous avons utilisés sont ceux habituellement utilisés en biologie clinique à savoir :

**Moyenne :** On appelle moyenne d'une variable X, la moyenne arithmétique des valeurs prises par X.

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N X_n$$

**Variance :** On appelle variance d'une variable X, la moyenne des carrés des différences des valeurs de X avec la moyenne.

On note  $S^2_x$  la variance de X.

$$S^2_x = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (X_n - \bar{X})^2$$

**Ecart-type :** On appelle écart-type d'une variable X, la racine carrée (positive) de la variance de X.

On note  $S_x$  l'écart-type de X.

$$S_x = \left( \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (X_n - \bar{X})^2 \right)^{1/2}$$

**Le test du "Khi Deux" :** Utilisé pour mesurer le lien entre deux variables qualitatives, à 95 % de sécurité.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - C_i)^2}{C_i}$$

$O_i$  : effectif observé

$C_i$  : effectif théorique

**Le test de student "t" :** Test quantitatif.

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{S^2}{n_A} + \frac{S^2}{n_B}}} \quad S^2 = \frac{(n_A - 1)S_A^2 + (n_B - 1)S_B^2}{(n_A - 1) + (n_B - 1)}$$

Avec : **mA** : moyenne du groupe A

**nA** : nombre d'échantillons du groupe A

**SA<sup>2</sup>** : variance du groupe A

**S<sup>2</sup>** : variance

(A.J Valleron et al., 1983; F Bertrandias et al., 1984).

**mB** : moyenne du groupe B

**nB** : nombre d'échantillons  
du Groupe B

**SB<sup>2</sup>** : variance du groupe B

## **5-Populations étudiées :**

Notre étude porte sur le dosage des cytokines par méthode ELISA, dans différentes populations (donneurs de sang, autres témoins, malades présentant diverses pathologies et des échantillons provenant de malades atteints de Myélome Multiple et d'infection HIV); (Figure 11 et 12).

### **5-1-Groupes de témoins :(INNOTEST)**

Ce groupe est constitué de différentes populations supposées saines, ils sont au nombre de 37 personnes.

#### **5-1-1-Groupe de donneurs de sang (DDS) :**

On distingue deux différentes groupes à savoir :

##### **5-1-1-1-DDS en équipe mobile (EM) :**

Ce sont des jeunes du service national exclusivement de sexe masculin âgés de 20 à 30 ans, avec une moyenne d'âge de 22 ans, ces jeunes DDS proviennent de toutes les régions d'Algérie et sont recrutés dans les casernes situées autour d'Alger et ses environs (20Km), ils sont au nombre de 24 DDS (Figure 13) .

##### **5-1-1-2-DDS en cabine fixe :**

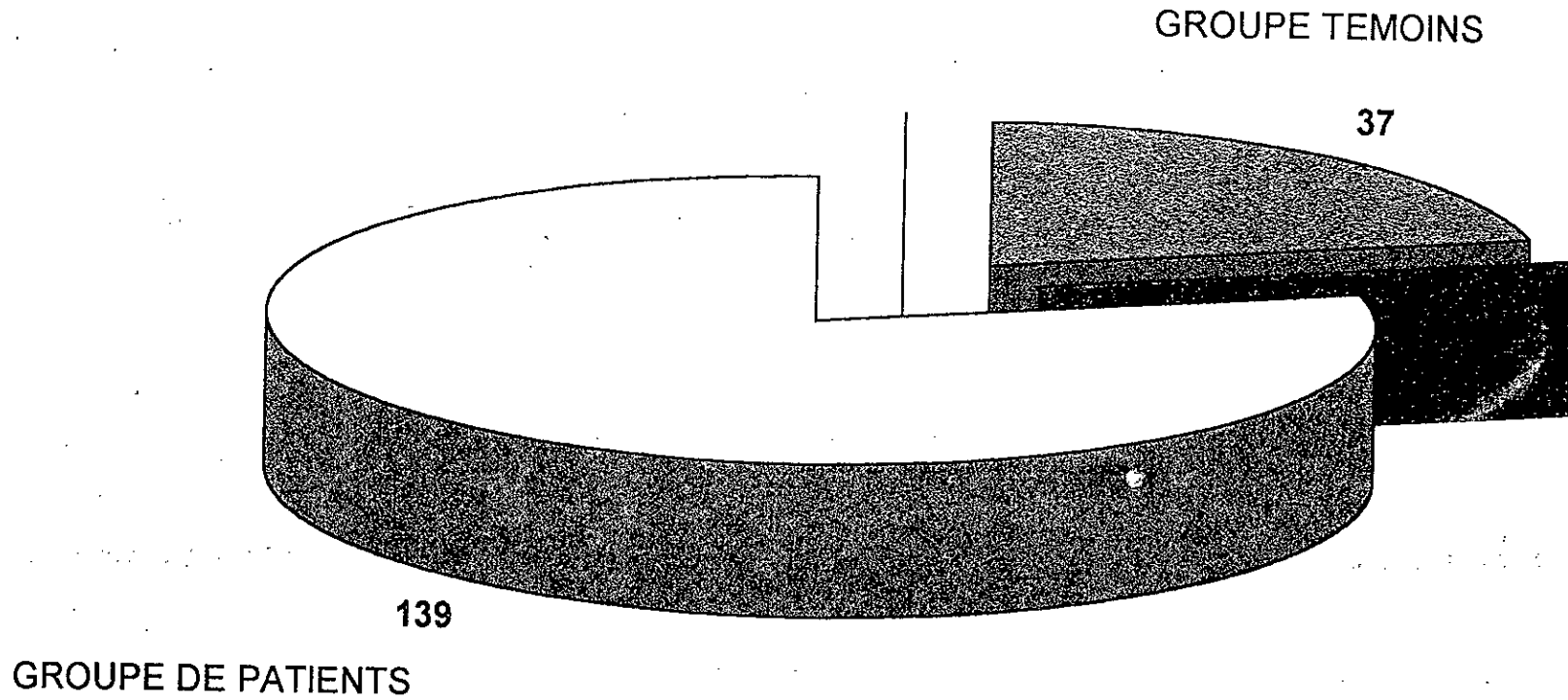
Ces donneurs sont prélevés au niveau du CTS/HCA des deux sexes âgés de 20 à 50 ans, avec une moyenne d'âge de 40 ans, ils sont au nombre de 13 PRP (Figure 13).

### **5-2-Groupes de patients :(INNOTEST)**

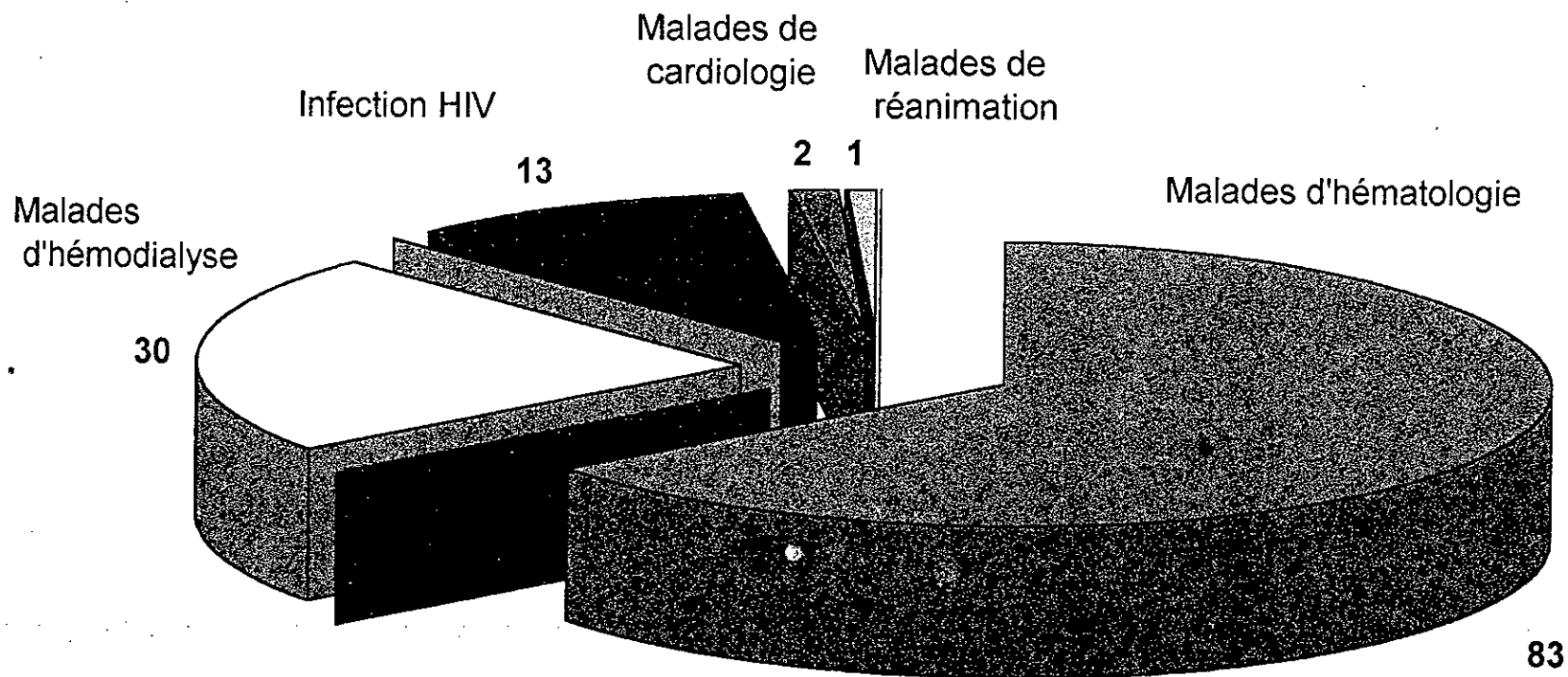
#### **5-2-1-Malades d'Hématologie :**

Notre étude porte sur 405 sérums provenant de 81 malades, présentant des (Myélome Multiple, Lymphome Hodgkinien, Lymphome non Hodgkinien); (Figure 14 et 15); hospitalisés dans le service d'hématologie de l'HCA de 1995 à 1997, pour ces 81 malades des dosages des différentes cytokines ont été effectué (IL-6, IL-8, IL-2R, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ).

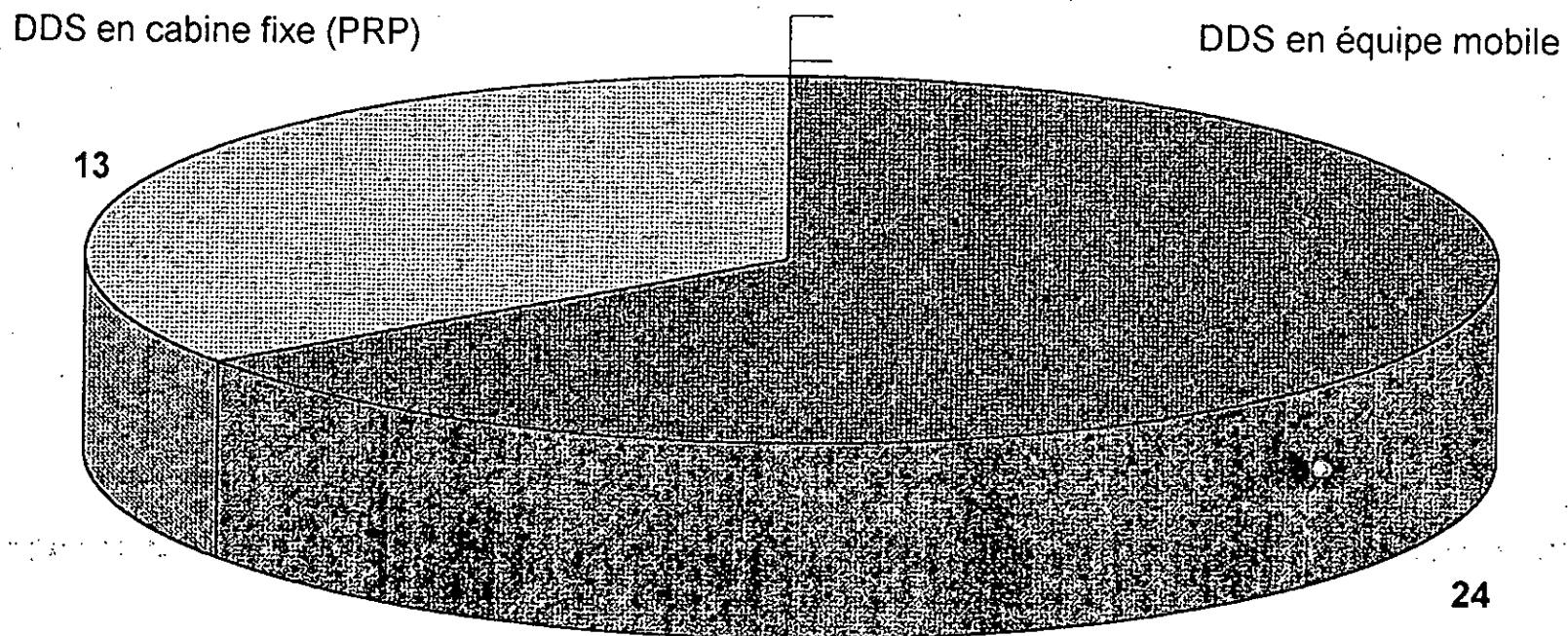
**FIGURE 11: POPULATIONS ETUDIEES**



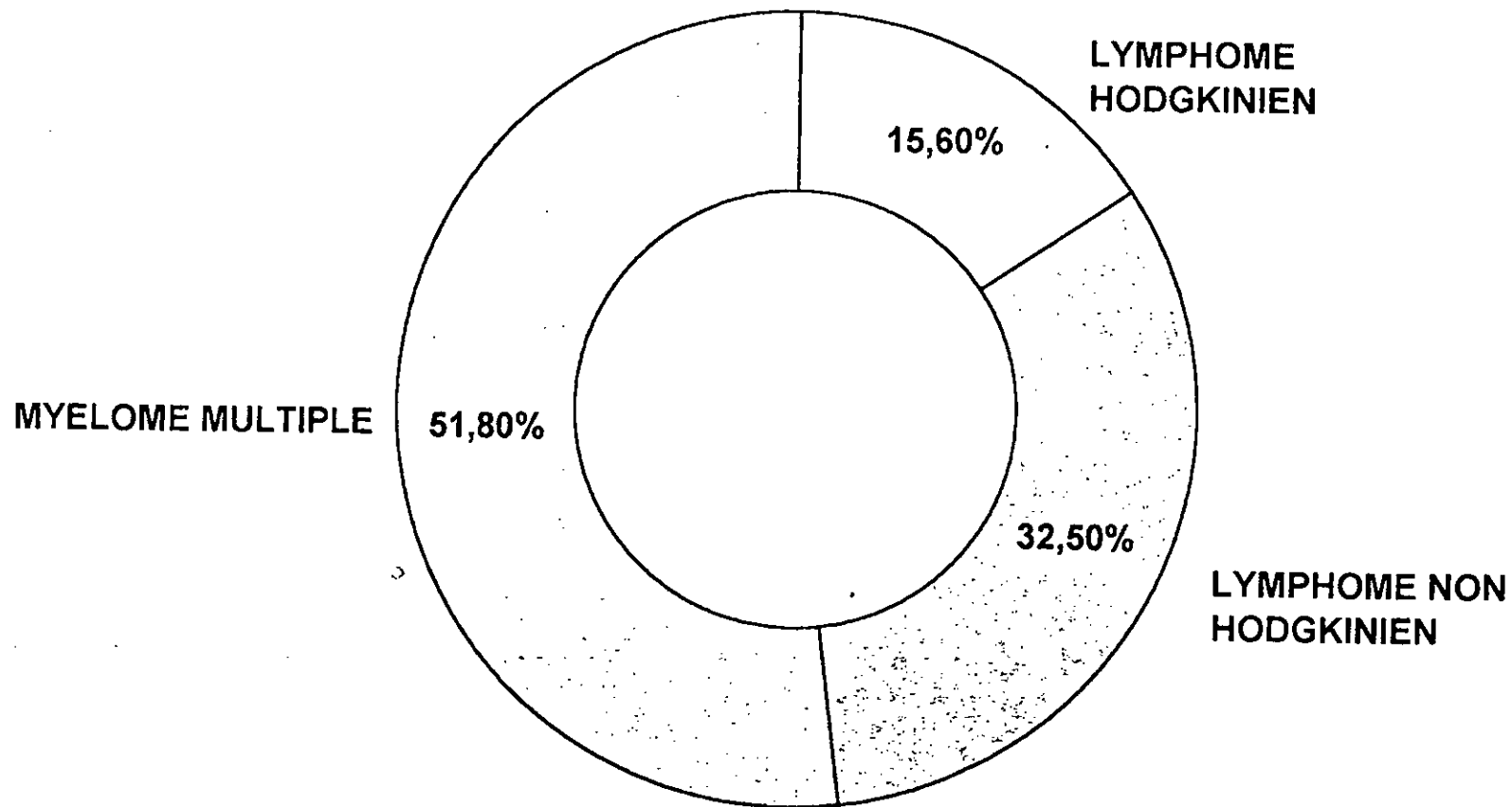
**FIGURE 12 : DISTRIBUTION DES DIFFERENTS MALADES PAR SERVICE**



**FIGURE 13 : DISTRIBUTION DE LA POPULATION TEMOIN**

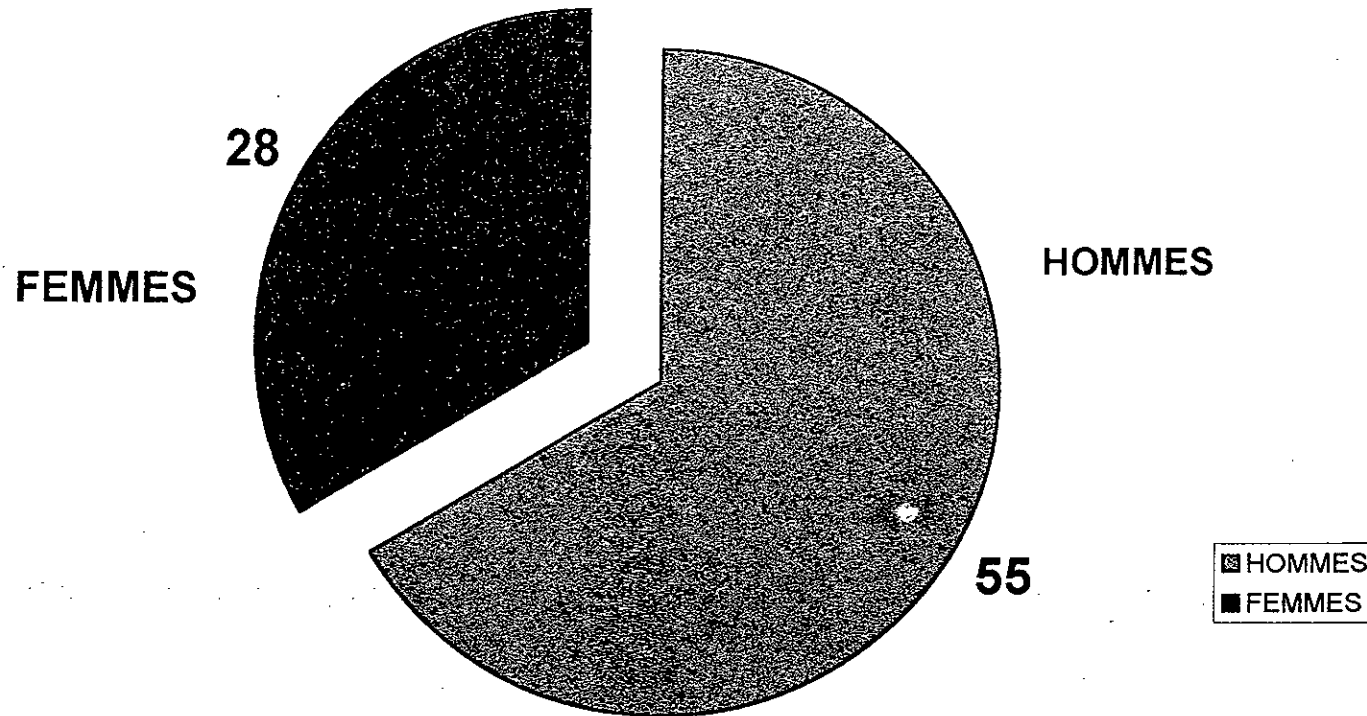


**FIGURE 14 : LES DIFFERENTS DIAGNOSTICS DES MALADES DU SERVICE D'HEMATOLOGIE**



**FIGURE 15 : SERVICE D'HEMATOLOGIE**

**" SEX RATIO " = 1.96**





**5-2-2-Infection HIV :**

Elle est constituée de 13 patients :

Notre étude porte sur 65 sérums, provenant de 13 patients des deux sexes (toxicomanes, transfusés, hétérosexuels) âgés de 20 à 40 ans avec une moyenne d'âge de 25 ans, hospitalisés dans les services d'hématologie et de maladies infectieuses de l'HCA ou bien découverts dans le cadre des dons du sang au CTS, ou adressés par les services de l'HCA pour un dépistage ou pour une expertise.

**5-2-3-Malades d'Hémodialyse :**

Notre étude porte sur 150 sérums provenant de 30 patients appartenant aux deux sexes dont le "SEX RATIO" est de 1.96 (Figure 16), hospitalisés au service d'hémodialyse de l'HCA de 1996 à 1997.

**5-3-Groupes de témoins : (DIAGNOSTICS PASTEUR)****5-3-1-Groupe de donneurs de sang (DDS) :**

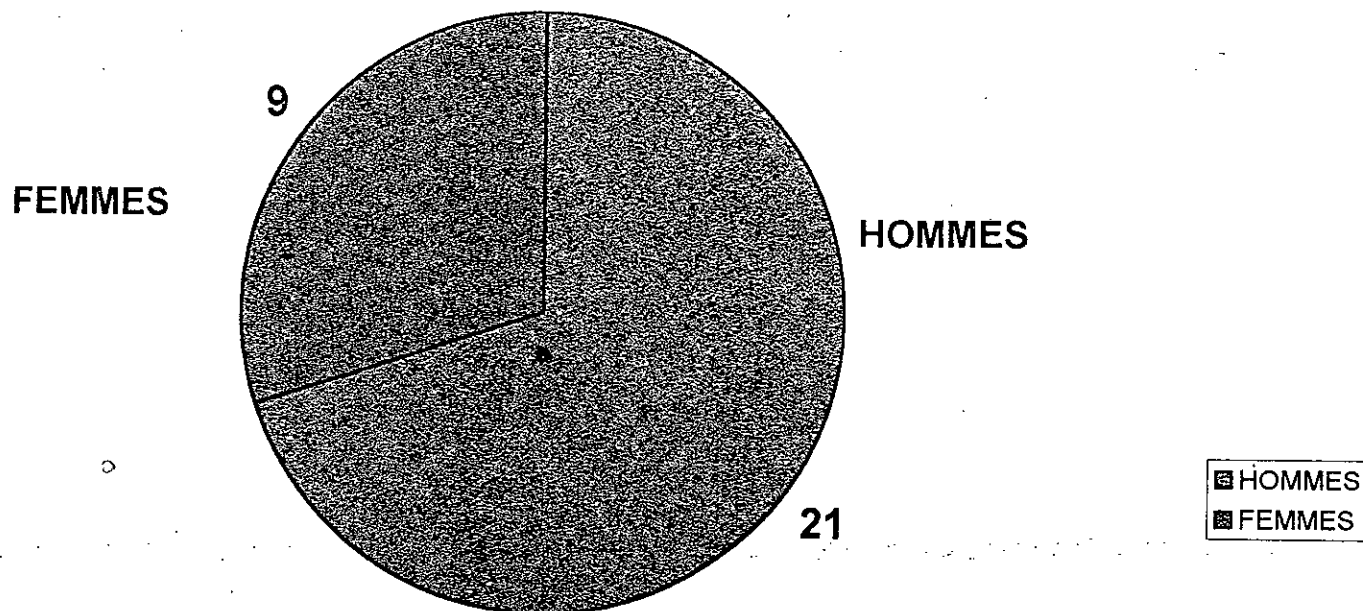
Ce sont des jeunes du service national exclusivement de sexe masculin âgés de 20 à 30 ans, avec une moyenne d'âge de 22 ans; ils sont au nombre de 76 DDS.

**5-4-Groupes de patients : (DIAGNOSTICS PASTEUR)****5-4-1-Malades d'hématologie :**

Notre étude porte sur 39 malades présentant des myélomes multiples hospitalisés dans le service d'hématologie de l'HCA en 1994, pour ces 39 malades des dosages des différentes cytokines ont été effectués (IL-6, TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ).

**FIGURE 16 : SERVICE D'HEMODIALYSE**

**" SEX RATIO " = 1.96**



# CHAPTER III

# RESULTS AND DISCUSSION

## **1-Résultat de la technique ELISA :**

La première phase de l'étude a inclus une prise en main de la méthodologie ELISA, sa calibration et la réalisation de tests préparatoires; des essais de répétabilité et de reproductibilité ont été réalisés sur le contrôle des différentes cytokines (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF et IL-2R).

### **1-1-Répétabilité :**

Pour la répétabilité, 2 séries (à des dates différentes) d'un contrôle et de 06 standards ont été réalisés pour chaque cytokine (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF et IL-2R) (Tableau 10, 11 et 12).

### **1-2-Reproductibilité :**

L'étude de la reproductibilité a consisté à tester sur des jours différents, un essai sur six standards, ces six standards ont été testés 04 fois.

Globalement, l'ensemble des résultats sont cohérent et les différents CV sont acceptables (Tableau 13, 14, 15 et 16).

### **1-3-Etude des échantillons traités en simple ou en double :**

Tous les dosages ont été réalisés selon le protocole décrit et préconisés par le laboratoire, sur des sérums frais ou congelés à -20°C aliquotés en deux ou plusieurs fractions. Les résultats des cytokines en pg/ml, la moyenne, l'écart-type et l'étendue dans chaque groupe de patients ont été calculés et les résultats de comparaison entre les différents groupes sont analysés par un test de student « t ».

Les mêmes échantillons ont été testés en double et en simple pour le dosage des cytokines, nous n'avons pas trouvé de différence significative des DO pour les deux tests du même échantillons.

## **2-Résultats et discussion des populations témoins et malades :**

Nous allons passer en revue les différentes populations étudiées et discuter les résultats des différentes cytokines.

**TABLEAU 10****Intra essai : Valeurs de densité optique des standards de l'IL-6****INNOTEST**

<b>STANDARD</b>	<b>pg/ml</b>	<b>DO450</b>	<b>CV%</b>
<b>PREMIERE SERIE</b>			
BLANC	0	0.105	-
CN	0	0.092	20.16
S1	31.5	0.126	16.84
S2	62.5	0.270	4.71
S3	125	0.469	2.86
S4	250	0.881	5.05
S5	500	1.530	0.51
S6	1000	2.179	0.84
<b>DEUXIEME SERIE</b>			
BLANC	0	0.097	-
CN	0	0.032	28.28
S1	31.5	0.159	6.23
S2	62.5	0.270	11.00
S3	125	0.464	4.11
S4	250	0.852	11.95
S5	500	1.548	1.25
S6	1000	2.184	0.74

**TABLEAU 11****Intra essai : Valeurs de densité optique des standards de l'IL-2R****INNOTEST**

<b>STANDARD</b>	<b>pg/ml</b>	<b>DO450</b>	<b>CV%</b>
<b>PREMIERE SERIE</b>			
BLANC	0	0.049	-
CN	0	0.014	40.41
S1	750	0.136	0.52
S2	1500	0.291	5.09
S3	3000	0.629	25.50
S4	6000	1.330	4.57
S5	8000	1.820	9.98
<b>DEUXIEME SERIE</b>			
BLANC	0	0.048	-
CN	0	0.016	4.88
S1	750	0.131	2.69
S2	1500	0.329	6.02
S3	3000	0.795	16.98
S4	6000	1.476	12.07
S5	8000	1.654	2.31

**TABLEAU 12****Intra essai : Valeurs de densité optique des standards du TNF- $\alpha$** **INNOTEST**

<b>STANDARD</b>	<b>pg/ml</b>	<b>DO450</b>	<b>CV%</b>
<b>PREMIERE SERIE</b>			
BLANC	0	0.054	-
CN	0	0.045	1.55
S1	25	0.139	4.07
S2	50	0.209	7.09
S3	100	0.336	6.31
S4	200	0.631	1.34
S5	400	1.203	0.12
S6	800	1.878	2.30
<b>DEUXIEME SERIE</b>			
BLANC	0	0.062	-
CN	0	0.045	3.52
S1	25	0.090	7.03
S2	50	0.184	2.31
S3	100	0.322	7.67
S4	200	0.701	8.77
S5	400	1.260	2.30
S6	800	1.889	0.71

**TABLEAU 13**

**Inter essai : Valeurs de densité optique des standards de l'IL-6**  
**INNOTEST**

<b>Standards</b> DO 450	BLANC	CONTROLE NEGATIF	S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	0.097	0.026	0.152	0.291	0.478	0.780	1.534	2.195
2	0.062	0.039	0.166	0.249	0.451	0.924	1.562	2.172
3	-	0.010	0.144	0.279	0.460	0.850	1.536	2.192
4	-	0.016	0.141	0.261	0.479	0.913	1.525	2.166
Moyenne	0.079	0.022	0.142	0.270	0.467	0.866	1.539	2.181
Ecart-type	0.017	0.010	0.010	0.015	0.011	0.037	0.013	0.012
CV %	22.08 %	45.45 %	9.14 %	5.89 %	8.55 %	6.63 %	0.89 %	0.57 %



**TABLEAU 14**

**Inter essai : Valeurs de densité optique des standards de l'IL-8**  
**INNOTEST**

<b>Standards</b> <b>DO 450</b>	BLANC	S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	0.010	0.111	0.215	0.382	0.680	1.237	2.128
2	0.045	0.134	0.236	0.401	0.798	1.412	2.172
3	-	0.109	0.199	0.402	0.722	1.375	2.134
4	-	0.120	0.215	0.415	0.801	1.223	2.182
Moyenne	0.027	0.118	0.216	0.400	0.750	1.311	2.154
Ecart-type	0.017	0.009	0.013	0.011	0.151	0.082	0.023
CV %	64.84 %	8.36 %	6.08 %	2.94 %	21.12 %	11.05 %	1.08 %

**TABLEAU 15**

**Inter essai : Valeurs de densité optique des standards de l'IL-2R**  
**INNOTEST**

<b>Standards</b> <b>DO 450</b>	BLANC	CONTROLE NEGATIF	S1	S2	S3	S4	S5
1	0.048	0.020	0.134	0.343	0.891	1.602	1.627
2	0.049	0.015	0.129	0.315	0.700	1.350	1.681
3	-	0.018	0.136	0.302	0.743	1.373	1.692
4	-	0.010	0.137	0.281	0.516	1.287	1.949
Moyenne	0.048	0.015	0.134	0.310	0.712	1.403	1.737
Ecart-type	0.007	0.003	0.064	0.022	0.133	0.113	0.124
CV %	1.47 %	25.60 %	48.15 %	7.24 %	18.75 %	8.44 %	7.17 %

**TABLEAU 16**

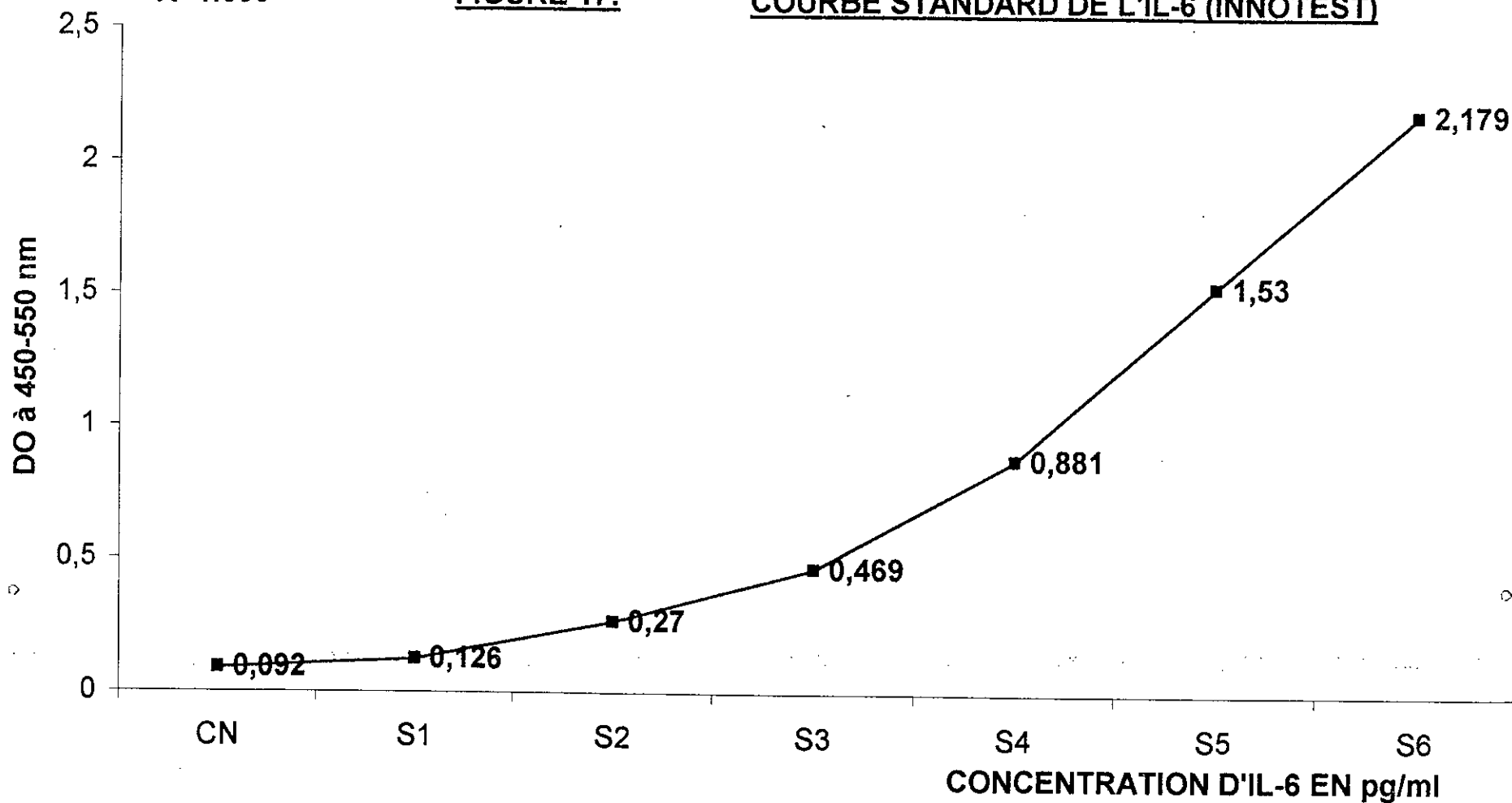
**Inter essai : Valeurs de densité optique des standards du TNF- $\alpha$**   
**INNOTEST**

<b>Standards</b> <b>DO450</b>	BLANC	CONTROLE NEGATIF	S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	0.062	0.030	0.120	0.181	0.340	0.658	1.281	1.899
2	0.054	0.042	0.155	0.187	0.305	0.745	1.240	1.880
3	-	0.045	0.135	0.220	0.351	0.625	1.204	1.848
4	-	0.046	0.143	0.199	0.321	0.637	1.202	1.909
Moyenne	0.058	0.040	0.138	0.196	0.329	0.666	1.231	1.884
Ecart-type	0.010	0.007	0.012	0.014	0.017	0.046	0.032	0.023
CV %	17.75 %	17.89 %	9.15 %	7.61 %	5.36 %	7.05 %	2.59 %	1.23 %

R=1.000

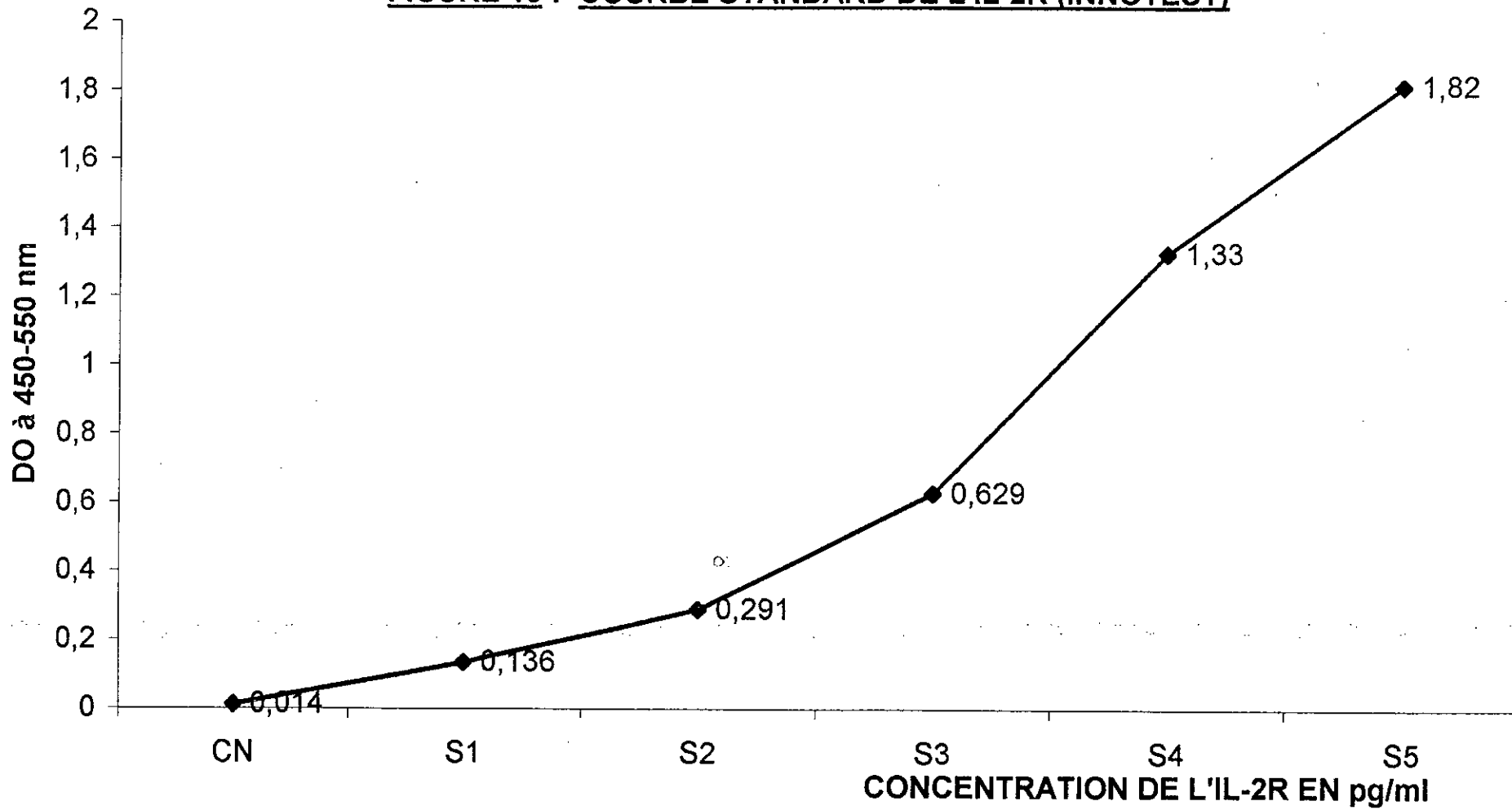
FIGURE 17:

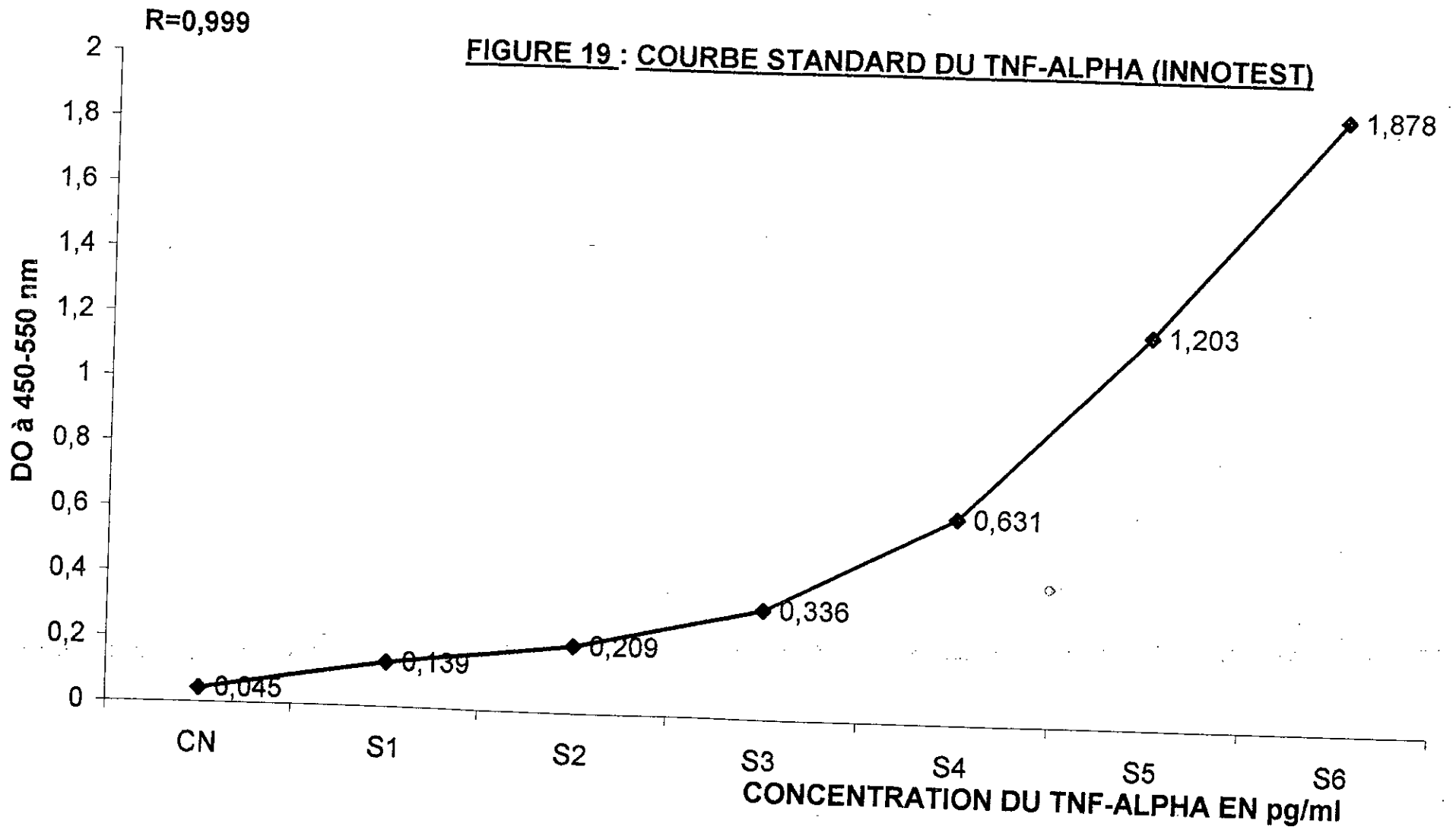
COURBE STANDARD DE L'IL-6 (INNOTEST)



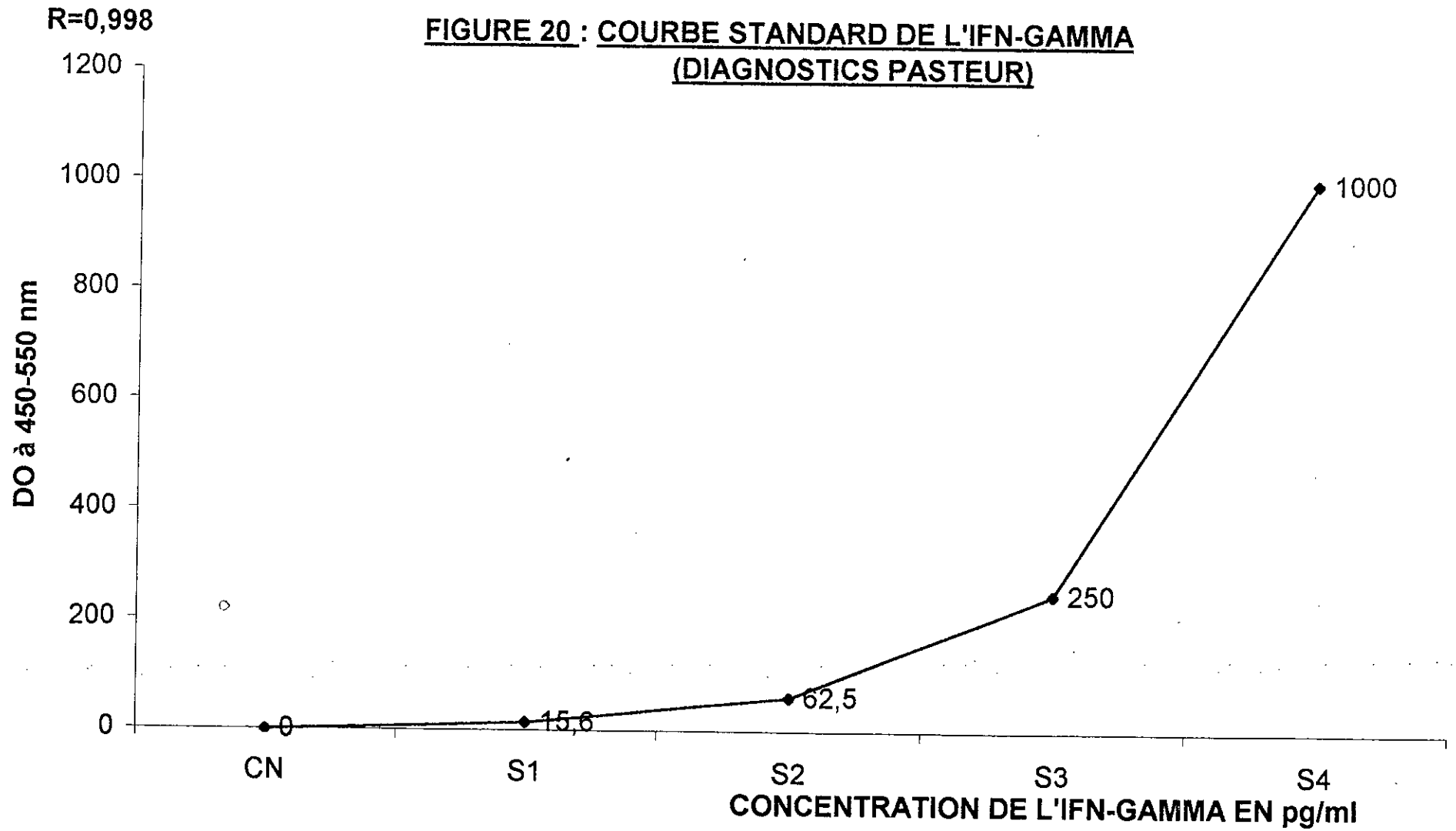
R=0,993

FIGURE 18 : COURBE STANDARD DE L'IL-2R (INNOTEST)





**FIGURE 20 : COURBE STANDARD DE L'IFN-GAMMA  
(DIAGNOSTICS PASTEUR)**



## 2-1-Population de témoins :

### 2-1-1-Donneurs de sang (DDS) :

Notre population de DDS se compose d'individus jeunes (20 à 30 ans) de sexe masculin en équipe mobile (EM) et d'autres plus âgés (20 à 50 ans) des deux sexes en cabine fixe (CF) (PRP).

Le taux moyen des différentes cytokines est représenté au niveau du (Tableau 17 et 18) pour la technique INNOTEST et le (Tableau 23) pour DIAGNOSTICS PASTEUR.

Il n'y a pas de différence significative pour le taux moyen de l'IL-8, l'IL-2R et le TNF- $\alpha$  chez les donneurs de sang en équipe mobile et cabine fixe (PRP). Par contre pour le taux moyen de l'IL-6 qui est de  $12.83 \pm 33.4 \text{pg/ml}$  chez un donneur de sang en cabine fixe (PRP) et de  $4.17 \pm 0.34 \text{pg/ml}$  chez un donneur de sang en équipe mobile; la différence est significative ( $t=4.56$   $p < 0.02$ ); les résultats obtenus illustrent l'hypothèse trouvée dans la littérature qui dit : après une administration d'une dose d'IL-6, nous remarquons une augmentation du nombre de plaquettes; le mécanisme essentiel de l'élévation des plaquettes est lié à la stimulation très importantes de la ploïdie des mégacaryocytes sous l'action de l'IL-6 (B.KLEIN, ERIA DIAGNOSTICS PASTEUR 1992.).

## 2-2-Cytokines en pathologie :

Le rôle des cytokines proinflammatoires a été démontré au cours d'infections sévères comme les états septique, expression extrême de la réaction inflammatoire. Elle se traduit par l'apparition dans la circulation sanguine d'un pic précoce de TNF- $\alpha$  et d'une augmentation retardée d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-8. Les cytokines proinflammatoires circulantes sont élevées au cours du sepsis et leur taux comme leur persistance sont des marqueurs de gravité. Dans notre étude, une malade âgée de 61 ans hospitalisée en réanimation et qui présentait un cas de sepsis grave, le taux du TNF- $\alpha$  était très élevé de  $37.89 \text{pg/ml}$  par rapport à un donneur de sang qui est de  $2.69 \pm 1.69 \text{pg/ml}$ , pour l'IL-6 le taux est de  $151.02 \text{pg/ml}$  par rapport à un DDS qui est de  $4.17 \pm 0.34 \text{pg/ml}$  ainsi que pour l'IL-8 et l'IL-2R qui sont



**TABLEAU 17****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (INNOTEST)****CHEZ LES SUJET SAINS (PRP)**

	IL-6	IL-8	IL-2R	TNF-ALPHA
EFFECTIF	14	15	15	14
MOYENNE (pg/ml)	12.83	233.1	1562.9	1.27
ECART-TYPE (pg/ml)	33.4	153.1	860.6	1.07
ETENDUE (pg/ml)	[1.5-93.50]	[108-440.8]	[525.6-3597.7]	[0.2-4.14]

**TABLEAU 18****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (INNOTEST)****CHEZ LES SUJETS DONNEURS DE SANG : (EM)**

	IL-6	IL-8	IL-2R	TNF-ALPHA
EFFECTIF	24	24	24	24
MOYENNE (pg/ml)	4.17	593.97	2514.06	2.69
ECART-TYPE (pg/ml)	0.34	280.2	2308.4	1.95
ETENDUE (pg/ml)	[4.1-5.85]	[40-1085.32]	[867.52-5877.48]	[0.5-7.35]

respectivement  $>1500\text{pg/ml}$  et  $>8000\text{pg/ml}$  par rapport à un DDS qui sont respectivement de  $593.97\pm 280.2\text{pg/ml}$  et  $798.78\pm 21308.4\text{pg/ml}$ , nos résultats confirment ceux trouvés dans la littérature.

L'IL-6 constitue un puissant facteur de croissance des cellules myélomateuses, il a été démontré par ZHANG, KLEIN et BATAILLE que la réponse in-vitro à l'IL-6 des cellules myélomateuses est directement corrélée à la prolifération in-vivo et à la sévérité de la maladie.

D'après les résultats obtenus (Figure 21) nous remarquons que le taux moyen de l'IL-6 est très augmenté pour les malades d'hématologie, il est de  $24.88 \pm 109\text{pg/ml}$  par contre il est de  $4.37\pm 9.5\text{pg/ml}$  et  $5.18\pm 3.01\text{pg/ml}$  respectivement pour les malades d'hémodialyse et les infections HIV. La différence est statistiquement non significative ( $t=0.103$   $p < 0.90$ ) et ( $t=1.603$   $p < 0.10$ ) pour ce qui concernent les malades d'hémodialyse et les infections HIV par rapport aux DDS (Figure 26 et 27).

Le rôle de l'IL-6 dans les myélomes multiples, dans lequel des taux circulants de l'IL-6 seront de mauvais pronostic d'après C CAPO, J-L-MEGE.

Résultats obtenus dans notre étude (Tableau 23) le taux moyen de l'IL-6 chez les myélomes multiples est de  $6.59\pm 12.57\text{pg/ml}$  par rapport à un taux moyen chez DDS qui est de  $1.40\pm 1.82\text{pg/ml}$  il existe une différence très significative pour les myélomes multiples ( $t=3.43$   $p < 0.001$ ) (Figure 29).

D'après les résultats obtenus, nous observons une augmentation du TNF- $\alpha$  dans toutes les pathologies (Figure 24); (hématologie, hémodialyse et infection HIV).

Il y a une différence significative pour les myélomes multiple ( $t=3.97$   $p < 0.001$ ) (Figure 29).

Le TNF- $\alpha$ , essentiel à la formation du granulome des infections à mycobactéries, chez les patients séropositifs ou atteints de SIDA, le TNF- $\alpha$  est augmenté dans le sérum, nous avons constaté une augmentation de la

**TABLEAU 19****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (INNOTEST)****SERVICE D'HEMATOLOGIE**

	IL-6	IL-8	IL-2R	TNF-ALPHA
EFFECTIF	81	83	83	81
MOYENNE (pg/ml)	24.88	798.78	5549.2	37.78
ECART-TYPE (pg/ml)	109	201.8	2859.4	92.6
ETENDUE (pg/ml)	[0.12-988.8]	[1.2-1500]	[1082.9-8000]	[5.90-782.04]

**TABLEAU 20****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (INNOTEST)****SERVICE D'HEMODIALYSE**

	IL-6	IL-8	IL-2R	TNF-ALPHA
EFFECTIF	30	30	30	30
MOYENNE (pg/ml)	4.37	854.9	7566.05	22.23
ECART-TYPE (pg/ml)	9.5	673.4	1632.4	10.23
ETENDUE (pg/ml)	[0.5-43.32]	[125-1500]	[836.19-8000]	[2.81-43.86]

production spontanée du TNF- $\alpha$  à 101 % par les leucocytes périphériques en culture, ce résultat illustre l'intérêt d'effectuer un dosage de la capacité de production des cytokines plutôt que de se borner à étudier les concentrations des molécules circulantes LAFEUILLADE ET COLL, 1991.

Nos résultats confirment ceux trouvés dans la littérature pour ce qui concerne le TNF- $\alpha$  et l'infection HIV (**Figure 27**); il existe une différence significative pour l'infection HIV ( $t=3.23$   $\rho < 0.001$ ).

Les cytokines proinflammatoire sont impliquées dans les rejets de greffe et la maladie du greffon contre l'hôte pour laquelle l'augmentation de TNF- $\alpha$  a une valeur diagnostique (**Figure 26**), il existe une différence très significative pour les malades d'hémodialyse ( $t=10.28$   $\rho < 0.001$ ).

Pour les résultats de l'IL-2R nous remarquons que le taux de cette cytokine est élevé chez les hémodialyses (**Figure n°26**), la différence est significative ( $t=9.41$   $\rho < 0.01$ ), et d'après la littérature, nous avons trouvé une montée de la concentration du taux de l'IL-2R dans les rejets de greffes (rénales) dans un travail effectué par MAURY ET TEPPPO en collaboration avec le Pr. LE TREUT (unité de transplantation hépatique de l'hôpital de la conception, à Marseille).

Le taux moyen de l'IL-8 n'est significatif que pour les malades d'hématologie ( $t=3.99$   $\rho < 0.001$ ) (**Figure 25**) et les PRP ( $t=4.56$   $\rho < 0.02$ ) (**Figure 28**).

Les résultats obtenus pour l'IFN- $\gamma$  dans le cadre des myélomes multiples s'avèrent significatifs ( $t=2.12$   $\rho < 0.05$ ) (**Figure 29**).

**TABLEAU 21****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (INNOTEST)****INFECTION HIV**

	IL-6	IL-8	IL-2R	TNF-ALPHA
EFFECTIF	13	14	14	13
MOYENNE (pg/ml)	5.18	463.6	4628.7	19.1
ECART-TYPE (pg/ml)	3.01	312.5	2932.2	25
ETENDUE (pg/ml)	[4.36-15.76]	[109-1129.69]	[1708.86-8000]	[0.5-77.43]

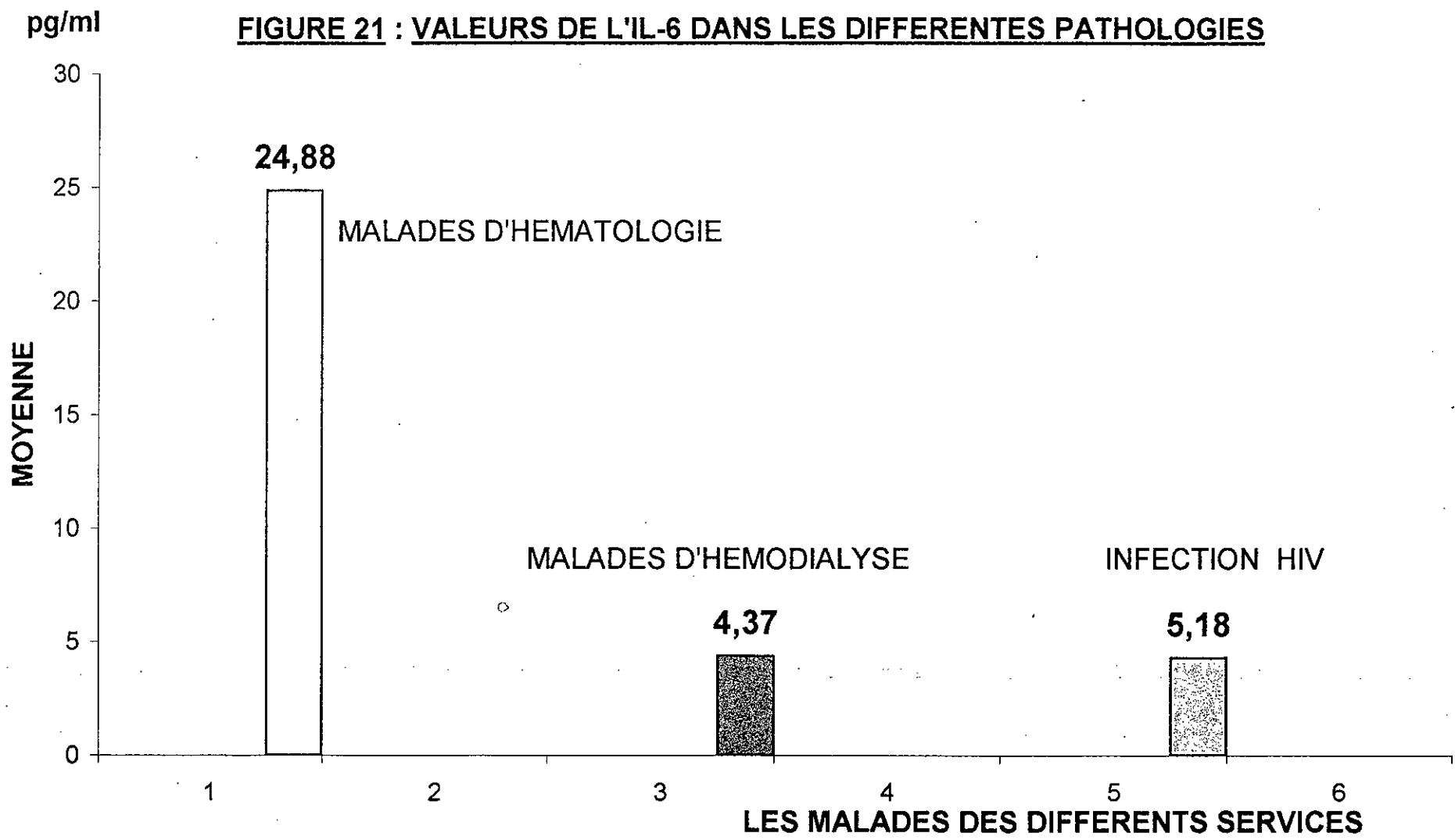
**TABLEAU 22****RESULTATS DES DIFFERENTES CYTOKINES (DIAGNOSTICS PASTEUR)****CHEZ LES SUJETS DONNEURS DE SANG : (EM)**

	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
EFFECTIF	71	76	68
MOYENNE (pg/ml)	1.40	7.85	5.19
ECART-TYPE (pg/ml)	1.82	35.36	4.26
ETENDUE (pg/ml)	[0.35-22.63]	[0.66-169.96]	[0.75-108.99]

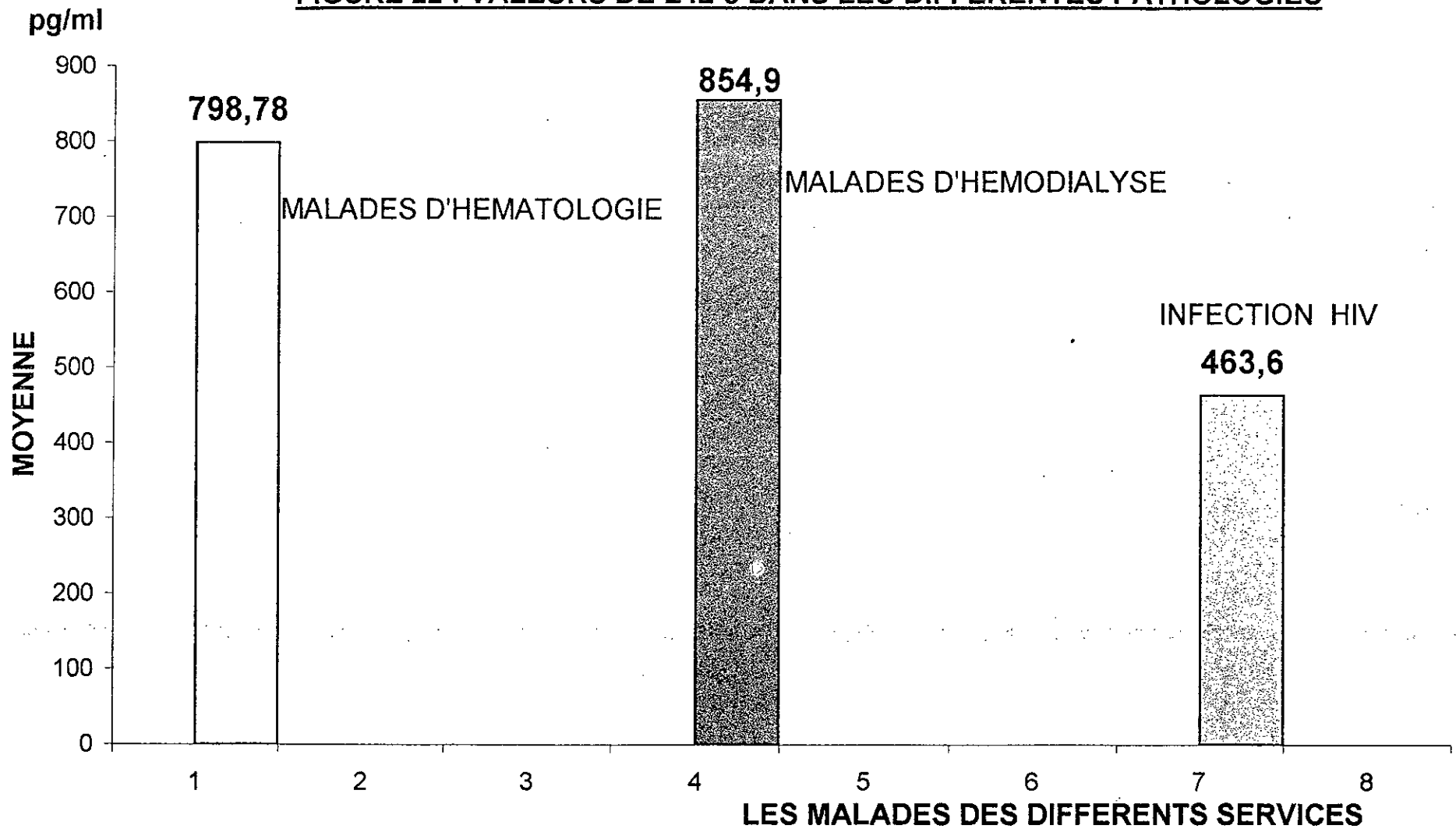
**TABLEAU 23****RESULTAT DES DIFFERENTES CYTOKINES (DIAGNOSTICS PASTEUR)****SERVICE D'HEMATOLOGIE**

	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
EFFECTIF	34	39	35
MOYENNE (pg/ml)	6.59	20.27	14.09
ECART-TYPE (pg/ml)	12.57	26.38	17.60
ETENDUE (pg/ml)	[4-76]	[1.50-459.75]	[2.77-68.99]

**FIGURE 21 : VALEURS DE L'IL-6 DANS LES DIFFERENTES PATHOLOGIES**

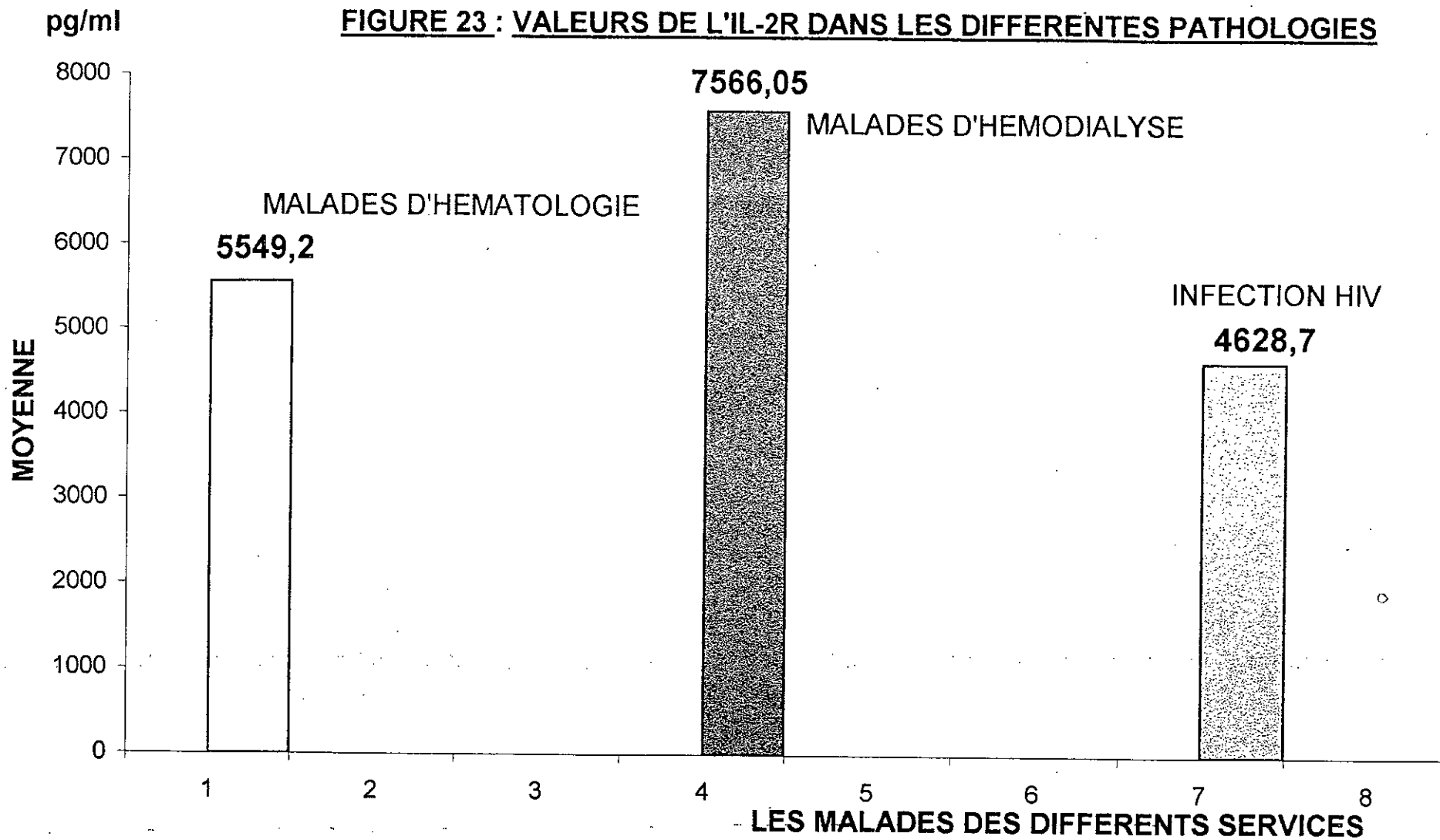


**FIGURE 22 : VALEURS DE L'IL-8 DANS LES DIFFERENTES PATHOLOGIES**

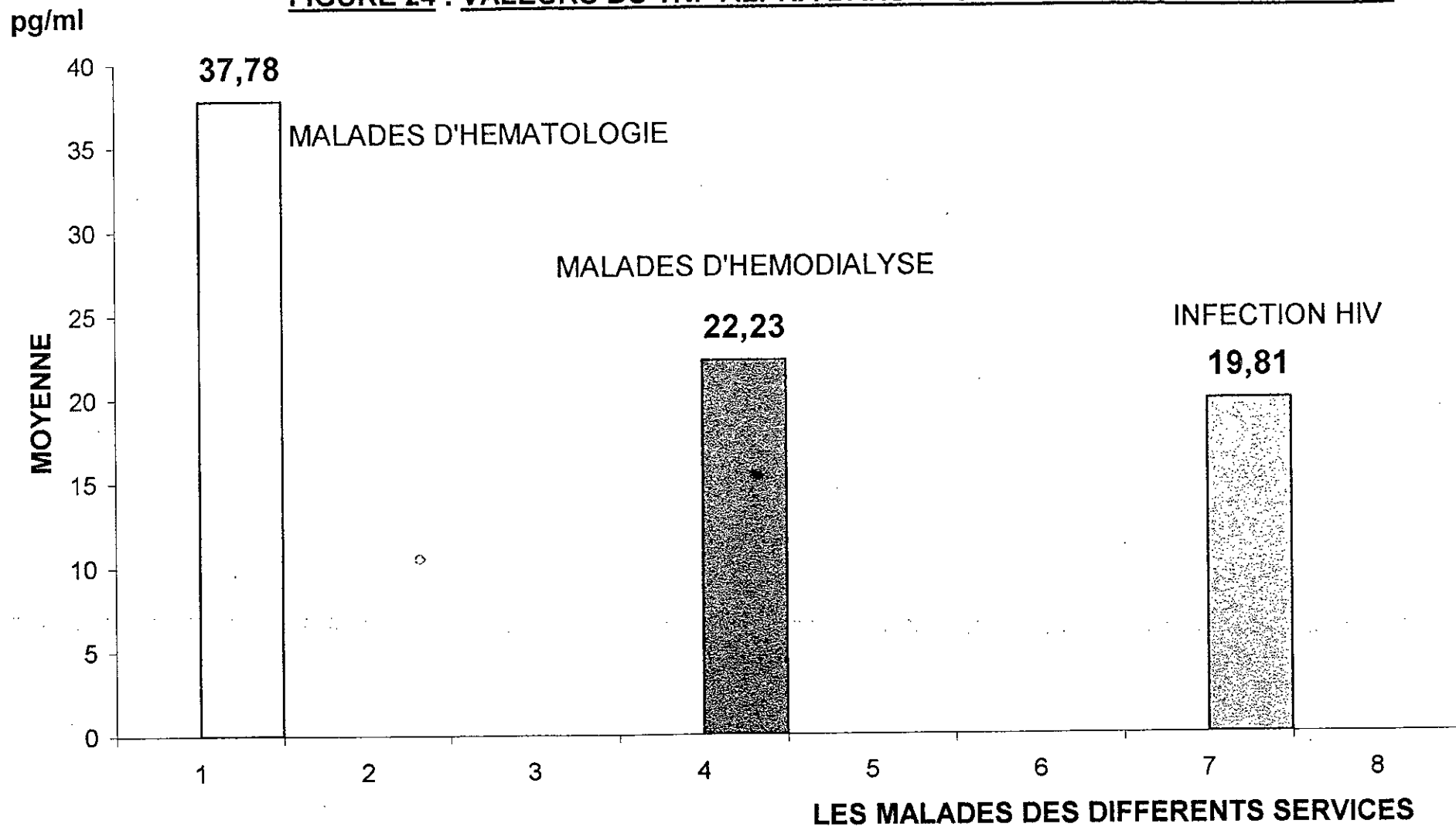




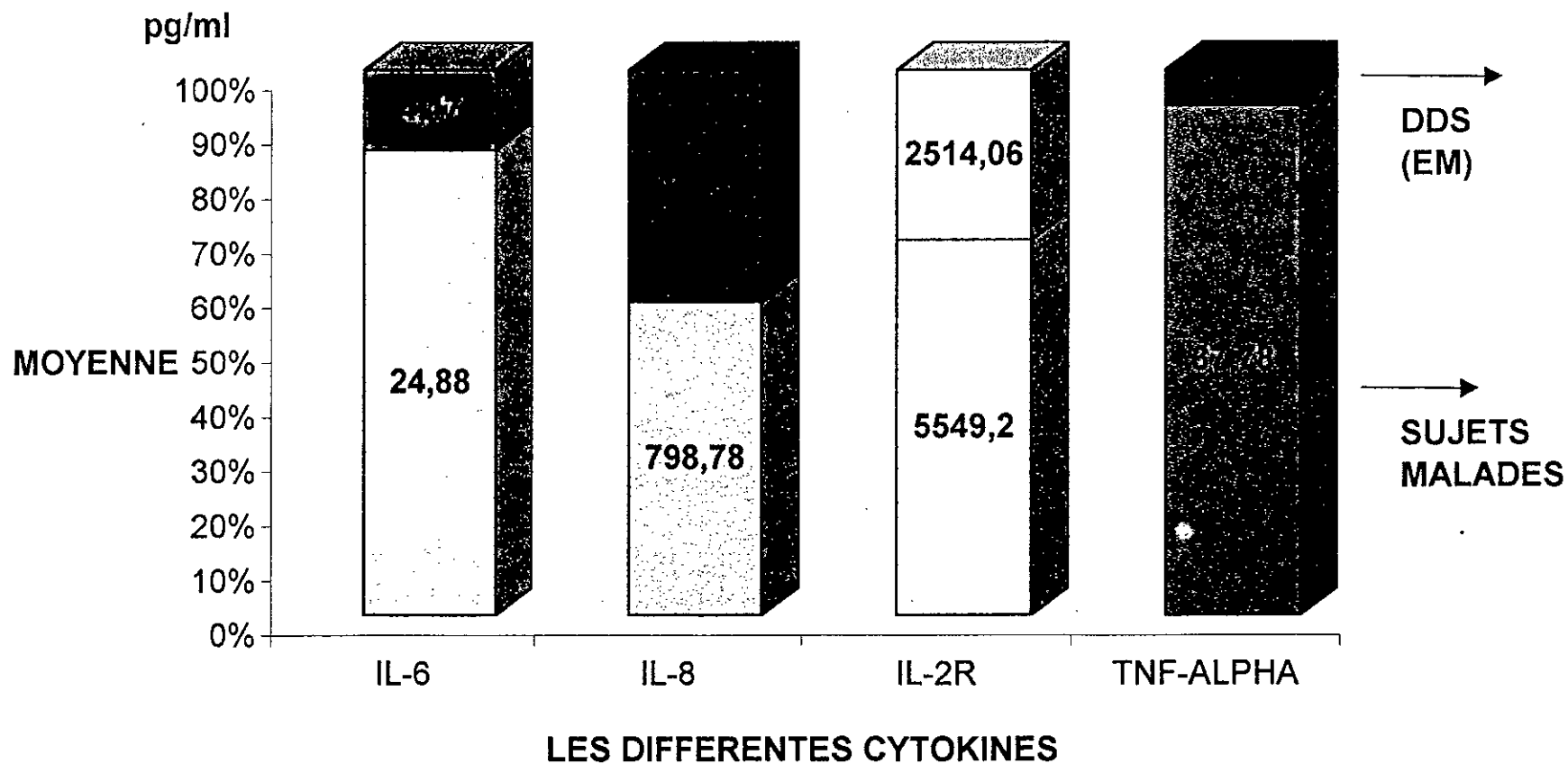
**FIGURE 23 : VALEURS DE L'IL-2R DANS LES DIFFERENTES PATHOLOGIES**



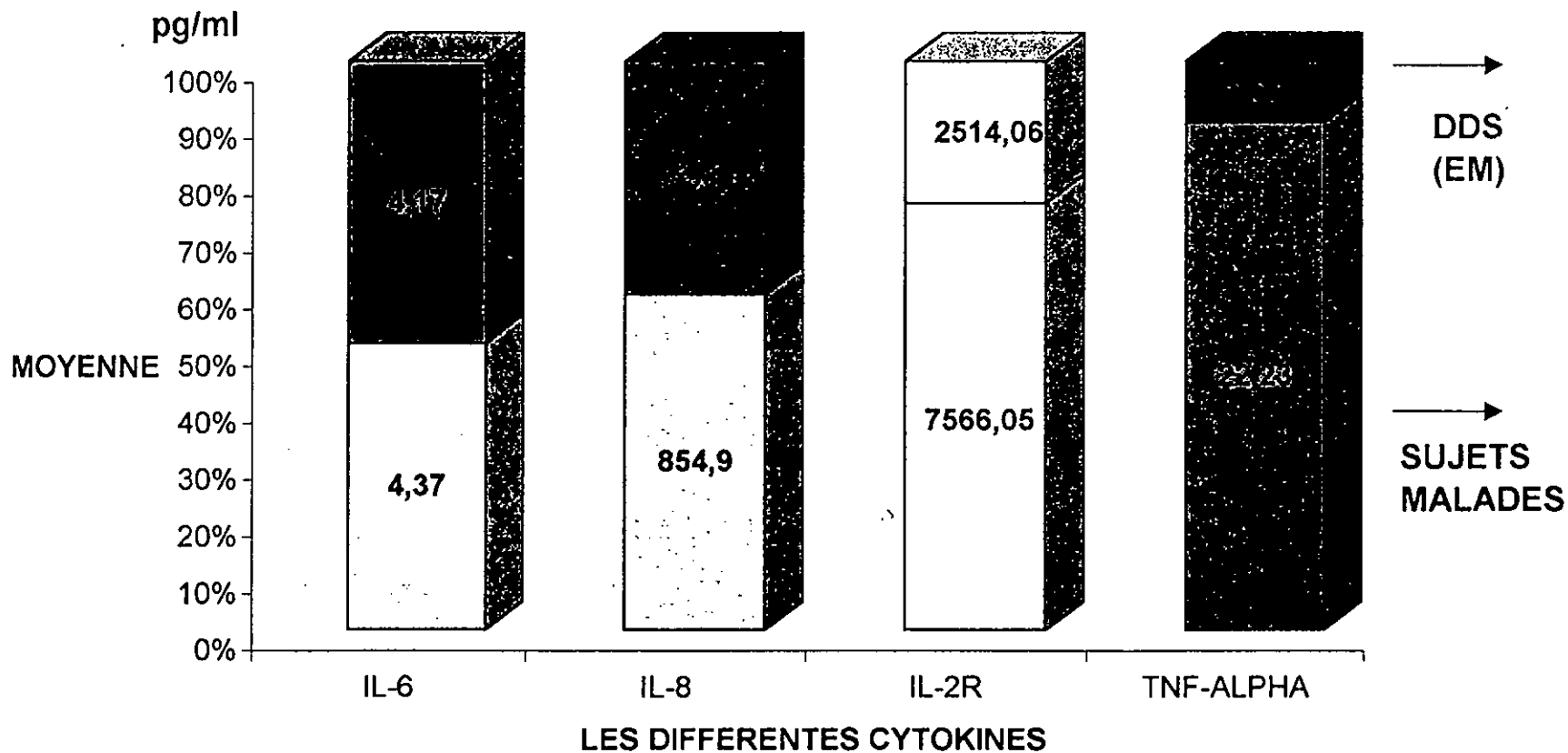
**FIGURE 24 : VALEURS DU TNF-ALPHA DANS LES DIFFERENTES PATHOLOGIES**



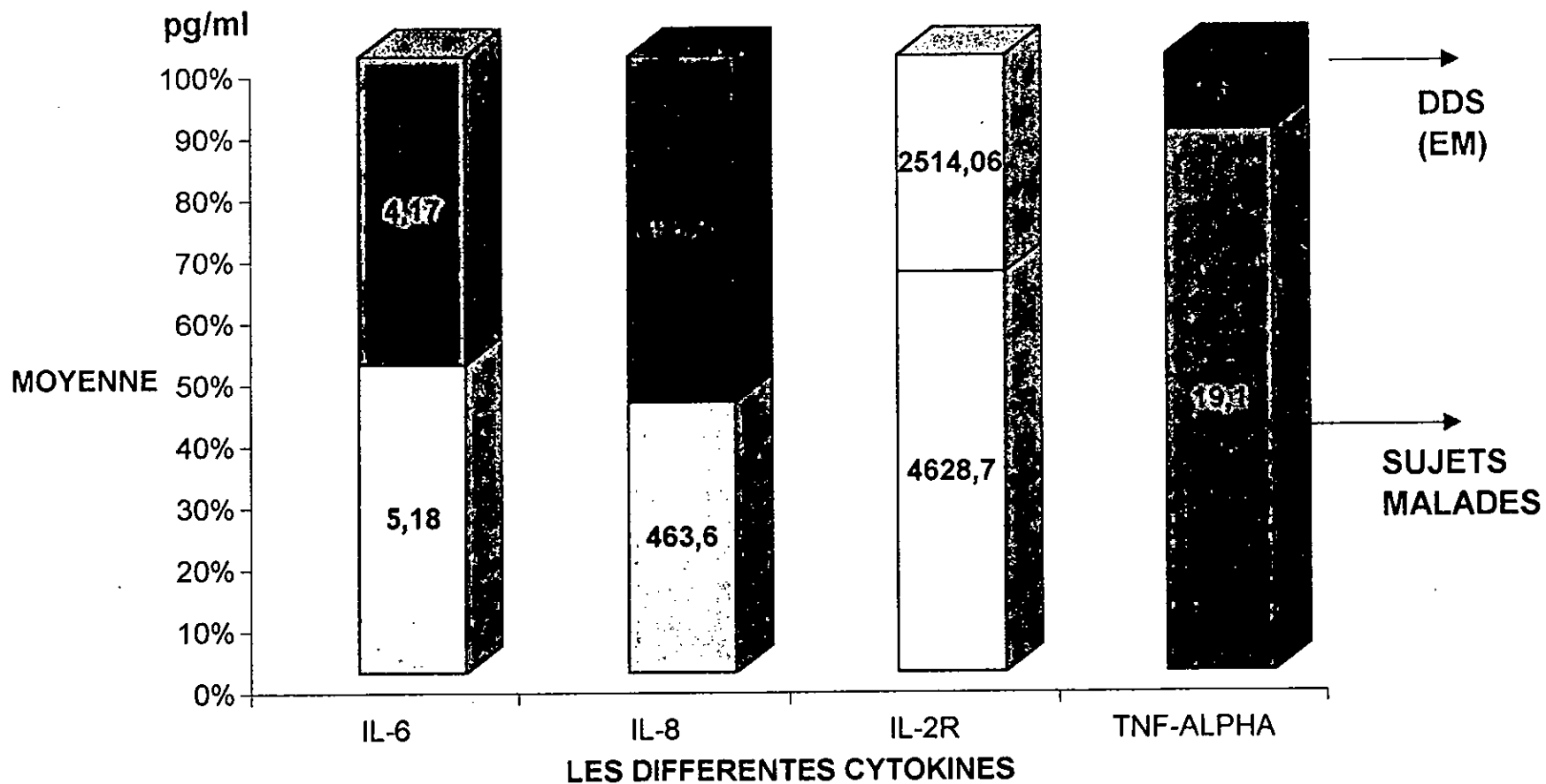
**FIGURE 25 : LES VALEURS DE LA MOYENNE CHEZ LES MALADES D'HEMATOLOGIE ET LES DDS SUIVANT LES DIFFERENTES CYTOKINES**



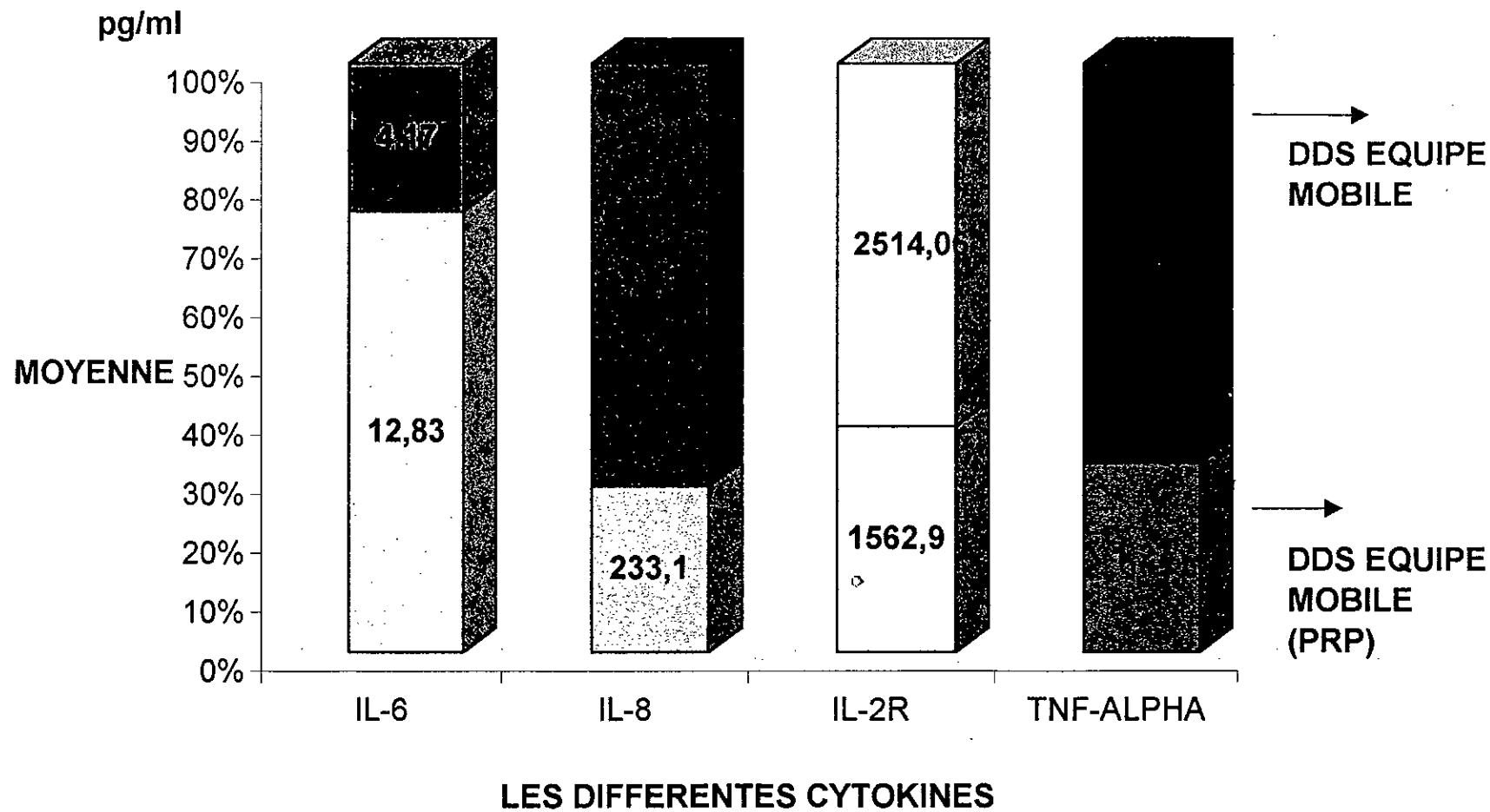
**FIGURE 26 : LES VALEURS DE LA MOYENNE CHEZ LES MALADES D'HEMODIALYSE ET LES DDS SUIVANT LES DIFFERENTES CYTOKINES**



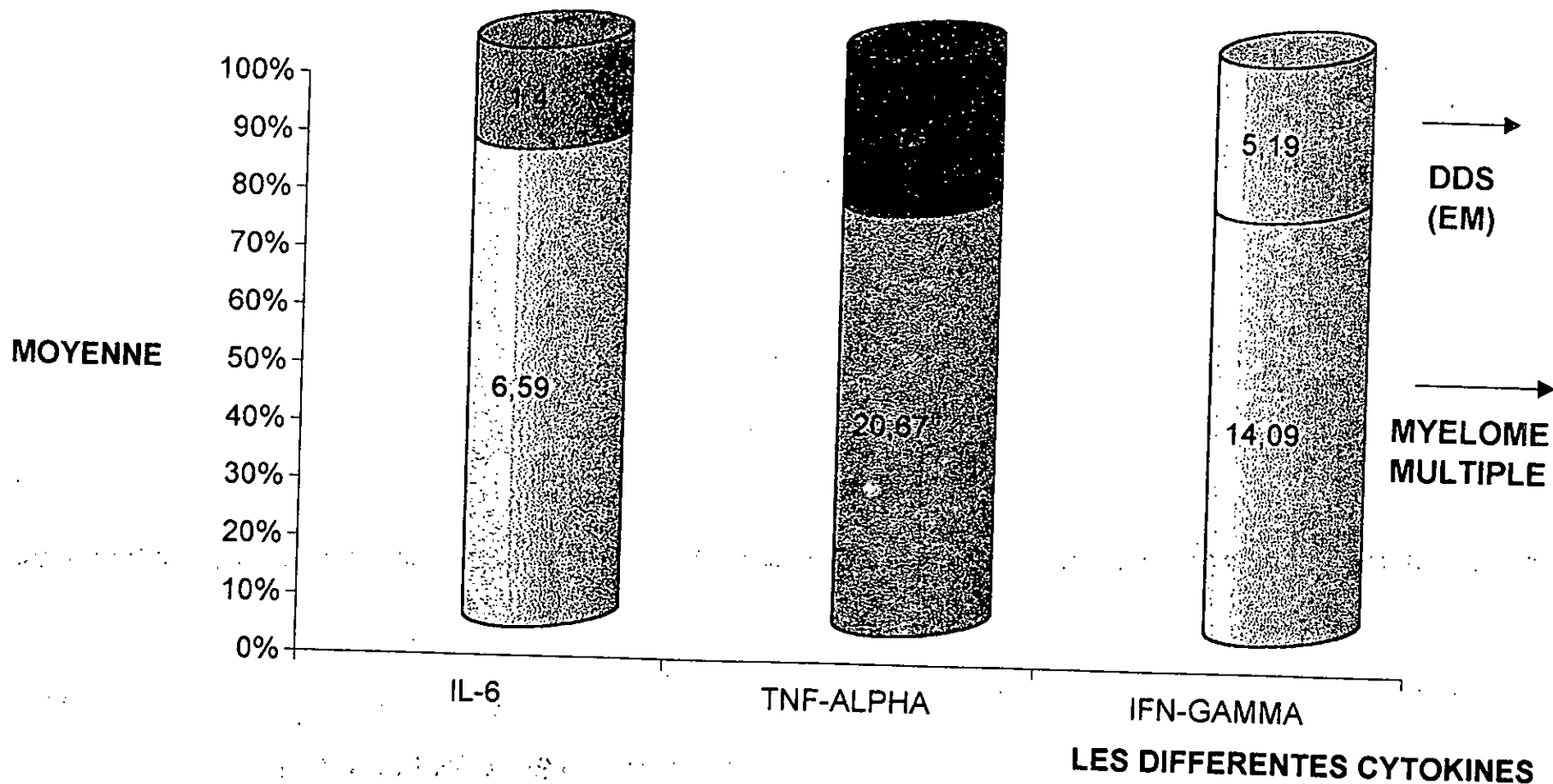
**FIGURE 27 : LES VALEURS DE LA MOYENNE CHEZ LES MALADES HIV ET LES DDS  
SUIVANT LES DIFFERENTES CYTOKINES**



**FIGURE 28 : LES VALEURS DE LA MOYENNE CHEZ LES DDS**



**FIGURE 29 : LES VALEURS DE LA MOYENNE CHEZ LES MYELOMES MULTIPLES ET LES DDS SUIVANT LES DIFFERENTES CYTOKINES (DIAGNOSTICS PASTEUR)**



# CONCLUSION



## ♣♣♣ CONCLUSION ♣♣♣

Dans le cadre précis de l'immuno-assay des cytokines (IL-6, IL-8, IL-2R, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ), nous avons montré que la technique **ELISA** (Diagnostics Pasteur et Innostest), grâce à sa simplicité de mise en œuvre, sa rapidité et sa sensibilité raisonnable, peut s'adapter sans aucun problème à des dosages biologiques de routine effectués sur de grandes séries d'échantillons. La calibration de chaque immunoassay est indispensable.

Sur le plan biologique, des progrès remarquables réalisés dans le domaine de la caractérisation des cytokines et leur dosage ont conduit de nombreux auteurs à rechercher des relations entre la production de ces substances et l'évolution des réactions immunitaires. Les résultats obtenus montrent que ces molécules constituent des marqueurs significativement liés à des états pathologiques, mais des travaux supplémentaires semblent nécessaires pour que ces dosage entrent dans la pratique de la médecine courante.

Lors de notre étude, tous les résultats trouvés chez les témoins et les différentes pathologies confirment bien l'intérêt des cytokines comme indicateur pronostic et concordent dans la majorité des cas avec ceux trouvés dans la littérature.

En conclusion, le domaine des cytokines est devenu un champ d'études à part entière. Des progrès considérables ont été effectués dans l'identification de nouvelles molécules et dans l'étude de leurs propriétés structurales. Une limite à cette étude réside cependant dans le caractère intriqué du réseau de cytokines. Les années à venir devraient nous permettre de mieux comprendre le rôle des cytokines en pathologie et de les utiliser comme armes thérapeutiques.

# BIBLIORAPHIE

\* \* \* **BIBLIOGRAPHIE** \* \* \*

[1]-Ardjoun M, Ardjoun F/Z, Dosage des cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) par ELISA, CTS/HCA (Hôpital Central de l'Armée ), 1994.

[2]-Hirano T, Interleukine-6 and its relation to inflammation and disease. Clin Immunol immunopathol 1992; 62 : S60-S65.

[3]-Maraskovsky E, Chen WF, Shortman K. IL-2 and IFN- $\gamma$  are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. J Immunol 1989; 143 : 1210-4.

[4]-Fiels EH, Becker GC, Blocking of mixed lymphocyte reaction by spleen cells from total lymphoid-irradiated mice involves interruption of the IL-2 Pathway. J Immunol 1992; 148 : 354-9.

[5]-Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF et al. Response of human natural killer (NK) cells to NK stimulatory factor (NKSF) : cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. J Exp Med 1992; 175 : 779-97.

[6]-Charon JA, Luger TA, Mergenhagen SE, Oppenheim JJ. Increased thymocyte-activating factor human gingival fluid during gingival inflammation. Infect Human 1982; 38 : 1190-5.

[7]-Minty AJ. Une nouvelle famille de cytokines inflammatoires. Médecine/Sciences 1991; 7 : 578-88.

[8]-Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA. Differential regulation of IL-6, IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated human monocytes : role of cyclic AMP. *Cytokine* 1990; 2 : 205-10.

[9]-Metcalf D, *The hemopoietic colony stimulating factors*. Amsterdam : Elsevier, 1984.

[10]-Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L et al. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia : synergism of tumor necrosis factor and interféron-gamma. *J Immunol* 1986; 136 : 4487-95.

[11]-Walker F, Nicolas NA, Metcalf D, Burgess AW. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factors receptors. *Cell* 1985; 43 : 269-76.

[12]-Zanetti G, Heumann D, Gerain J et al. Cytokine production after intravenous or peritoneal Gram negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to TNF-ALPHA and to LPS. *J Immunol* 1992; 148 : 1890-7.

[13]-Dinarello CA, The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163 : 1177-84.

[14]-Dinarello CA, Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77 : 1627-52.

[15]-Billiau A, Gamma-interferon : the match that lights the fire. *Immunology Today* 1988; 9 : 37-40.

[16]-Redmond HP, Chavin KD, Bromberg JS, Daly JM. Inhibition of macrophage activating cytokines is beneficial in the acute septic reponse. *Ann Surg* 1991; 214 : 502-9.

[17]-Durum SK, Oppenheim JJ, Macrophage-derived mediators : interleukine-1, tumor necrosis factor, interleukine 6, interferon, and related cytokines. In Paul WÈ (ed) : *Fundamental immunology*. New York : Raven press, 1989 : 639-61.

[18]-Amadori A, Zamarchi R, Veronese ML et al. B cell activation during HIV-1 infection. Cell-to-cell interactions and cytokine requirement. *J Immunol* 1991; 146 : 57-62.

[19]-Emilie D, Maillot MC, Nicolas JF, Fior R, Galanaud P. Antagonistic effect of interferon- $\gamma$  on tat-induced Transactivation of HIV by Long Terminal Repeat. *J Biol Chem* 1992; 267 : 20565-70.

[20]-Peters M. Mechanisms of action of interferons. *Semin Liver Dis* 1989; 9 :235-9.

[21]-Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors  $\beta$ 1 and  $\alpha$  in chronic liver disease. Effect of interferon alpha therapy. *N Engl J Med* 1991; 324 : 933-40.

[22]-Nemunaitis J, Rabinowe SN, Singer JW et al. Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid cancer. *N Engl J Med* 1991; 324 : 1773-8.

[23]-Masaoka T, Takalu F, Kato S et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in allogenic bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 1989; 17 : 1047-50.

[24]-Nelson BE, Borden EC. Interferons : biological and clinical effects. *Semin Surg Oncol* 1989; 5 : 391-401.

[25]-Hirano T, Akira S, T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukine-6. *Immunol Today* 1990 : 11 : 443-9.

[26]-Balkwill F, Burke F, The cytokine network. *Immunol today* 1989; 10: 229-303.

[27]-Sheperd V. Cytokine receptors of the lung. *Am Respir Cell Mol Biol* 1991; 5 : 403-10.

[28]-Tracey K, Fong Y, Hesse D et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic chock during lethal bacteriemia. *Nature* 1987; 330 :662-4.

[29]-Van Oers M, Van der Heyden A, Aarden L. Interleukine-6 in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 1988; 71 : 314-9

[30]-Therre H. Le marché américain des monokines, cytokines et autres facteurs de croissance. Biofutur 1990; n° 86 : 46-47.

[31]-Les biotechnologies au cours des dix dernières années. Explosion en sourdine. Industrie Santé/ACIP 1991; 157 : 23-4.

[32]-Varet B. Perspectives d'utilisation des cytokines en thérapeutique humaine. Médecine-Sciences 1990; 6 : 944-5.

[33]-Lalande F. Cytokines et interférons : aspects économiques et coût de la santé. Médecine-Science 1991; 7 : 715-8.

[34]-Aguet M, Dembic Z, Merlin G (1988) Molecular Cloning and expression of the human interferon- $\gamma$  receptor, Cell 55, 273-280.

[35]-Billard C, Wietzerbin J (1990) Predicting responses to interferon. Lancet 336, 1388-1389.

[36]-Fibbe WE, Schaafsma MD, Falkeinburg JHF, Willemze R. The biological activities of interleukine-1 Blut; 1989, 59 : 147-156.

[37]-Caussy D, Saundez DN. The role of interleukine-1 in the immunological response. Transfusion Medicine Reviews, 1989, III, 3, 194-205.

[38]-Smith KA. Interleukine-2 : inception, impact and implications. Science, 1988, 240, 1169-1176.

- [39]-Chang YC, Steven CC. Interleukine-3; molecular biology and biologic activities, Hematology/oncology clinics of North America. 1989; 33, 441-452.
- [40]-Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Regulation of IgG1, and IgE production by interleukine-4. Immunological Rev, 1988, 102, 29-56.
- [41]-Kishimoto T. The biology of interleukine-6. Blood, 1989, 74, 1, 1-10.
- [42]-Henney CS. Interleukine-7 : effects on early events in lymphocytes. Science, 1989, 243, 1464-1466.
- [43]-Larsen CG, Anderson AO, Appelle E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes Science, 1989, 243, 1464-1466.
- [44]-Trinchieri G, Perussia B. Immune interferon a pleiotropic lymphokine with multiple effects. Immunology Today, 1985, 6, 13136.
- [45]-Smith KA. Interleukine futures. Biotechnology, 1989, 7, 7, 661-664.
- [46]-Cavaillon JM. Les cytokines. Masson, Paris, 1996.
- [47]-Wells, T.N.C, Peitsch MC. The chemokine information source : identification and characterization of several chemokines using worldwideweb and expressed sequence tag databases. J Leukoc. Biol, 1997, 61, 545-550.



- [48]-Curfs JHAJ, Meis FGGM, Hoogkamp-korstanje JAA. A primer on cytokines : sources, receptors, effects and inducers. Clin Microbiol Rev. 1997, 10 : 742-780.
- [49]-Spriggs MK. One step ahead of the game : viral immunoregulation : are we there yet. Immunity 1997, 7 : 1-11.
- [50]-Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu. Rev Immunol, 1992, 10 : 411-452
- [51]-Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function; from molecular level to the bedside. Immunol. Today 1997, 18 : 231-240.
- [52]-Adams DH, Lloyd AR. Chemokines : leucocyte recruitment and activation cytokines. Lancet 1997, 349 : 490-495.
- [53]-Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses : the alternative approaches. Annu Rev Immunol 1997, 15 : 297-322.
- [54]-Raghupathy R. Th1 type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today 1992, 18 : 478-482.
- [55]-Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis Annu Rev Immunol 1996, 14 : 397-440.

[56]-Van Damme J, et al. Separation and comparison of two monokines with lymphocyte-activation factor activity : IL-1 beta and hybridoma growth factor (HGF). Identification of leucocyte-derived HGF as IL-6. J Immunol 1988; 140 : 1435.

[57]-Tosato G, et al. Monocyte-derived human Bcell growth factor identified as interferon (BSF-2, IL-6). Science 1988, 239 : 502.

[57]-Hirano T and T Kishimoto. Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSF p-2). Proc Nat Acad Sci 1985, 82 : 5490.

[58]-Ehlers S, K Smith. Differentiation of T cell lymphokine gene expression : the in vitro acquisition of T cell memory. J Exp Med 1991, 173 : 25-36.

[59]-Kwiatkowski D A, A Hill, I Sambou et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated plasmodium falciparum malaria. The Lancet 1990, 336 : 1201-1204.

[60]-Heaton K M, G Ju, E A Grimm. Human interleukin-2 analogues that preferentially bind the intermediate-affinity interleukine-2 receptor lead to reduced secondary cytokine secretion : implications for the use of these interleukin-2 analogues in cancer immunotherapy. Cancer Res 1993, 53 : 2597-2602.

[61]-Balkwill F. Interferons. The lancet 1989, 1060-1063.

[62]-Exely A R and J Cohen. Optimal collection of blood samples for the measurement of tumor necrosis factor alpha. *Cytokine-2* 1990, 5 : 353-356.

[63]-Tracey KJ, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachetin. *Science* 1990, 23 : 470-474.

[64]-Sebir G, D Emillie, C Wallon et al. In vitro production of IL-6, IL-1beta and TNF by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunology* 1993, 150 (4) : 1517-1523.

[65]-G Zurawski and J Gauldie. Interleukine-13, an interleukine-4 like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not T-cells. *Immunology Today* 1994, 15 : 74-80.

[66]-J F Jenkins and W P Akend. IL-1ra production in human monocytes is induced by IL-1 alpha, IL-3, IL-4 and GM-CSF. *Cytokine* 1993, 5 : 436-447.

[67]-H Bauman and J Gauldie. The acute phase reponse. *Immunology Today* 1994, 15 : 81-88.

[68]-J Bienvenu, L Coulon, C Doche, M-C Gutowski and G E Grau. Analytical performances of commercial ELISA-Kits for IL-2, IL-6 and TNF-alpha. Awho study. *Eur Cytokine Netw* 1993, 4 : 447-451.

[69]-Branellec D, Chouaib S. Le TNF : un agent antitumoral aux frontières de l'immunité et de l'inflammation. *Revue Générale, Pathologie Biologie* 1991, 39 (3) : 230-239.

[70]-Aguet M. The interferon- $\gamma$  receptor : a comparison with other cytokine receptors. *Journal of Interferon Research*, 1990, 10 : 551-558.

[71]-Whicher J T and Evans S W. Cytokine in disease. *Clin Chem* 1990,36/7 : 1269-1281.

[72]-Leonard E J. NAP-1, IL-8. *Immunology Today* 1990, 11 : 223-224.

[73]-Matsushima K and Oppenheim J J. Interleukine-8 and MCAF : Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* 1989, 1 : 2-13.

[74]-De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Interferon- $\gamma$ . *Curr Opinion Immunol* 1992, 4 : 321.

[75]-Rinderknecht E, O Connor B, Rodriguez H. Natural Human IFN- $\gamma$ . *J Biol Chem* 1984, 259 : 6790.

[76]-Le J, Chang T, Liu V, Yip Y, Vilcek J. Monoclonal antibodies as structural probes for oligomeric human interferon-gamma. *J Interferon Res* 1985, 5 : 445.

[77]-Picot S, Peyron F. Le tumor necrosis factor : ses implications en clinique. *Lettre de L'infectiologue* 1990, 3 : 115-123.

[78]-Hachicha M., Rathanaswami P., Naccache P.H., Mc Coll S.R., Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens, *J.Immunol.* 160 (1998) 449-454.

- [79]-Tanaka J., Imamura M., Kasai M. et al., The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplant* 19 (6) (1997) 571-576.
- [80]-Rook A.H., Kubin M., Cassn M. et al. Interleukine-12 reverses cytokine and immune abnormalities in Sezary syndrome, *J. Immunol.* 154 (1995) 1491-1498.
- [81]-Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A., Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature* 383 (1996) 787-793.
- [82]-Smith K.A., Cytokines in the nineties, *Eur. Cytokine Netw* 1 (1990) 7-13.
- [83]-Clarke S., Gordon S., Myeloid gene expression, *J. Leuk. Biol.* 63 (1998) 153-168.
- [84]-Gorham J.D., Guler M.L., Murphy K.M., Genetic control of interleukin-12 reponsiveness : implications for disease pathogenesis, *J.Mol. Med.* 75 (1997) 502-511.
- [85]-Premack B.A., Schall T.J., Chmokine receptors : gateways to inflammation and infection, *Nature Med.* 2 (1996) 1174-1178.
- [86]-Trinchieri G., Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12, *Int. Rev. Immunol.* 76 (1998) 365-396.

# ANNEXES

\* \* \* ANNEXE 1 \* \* \*

COMPOSITION DES DIFFERENTES TROUSSES

**I/ Diagnostics Pasteur** : Technique immunoenzymologique sandwich où le premier anticorps est fixé aux cupules de la microplaque.

**I-1-Composition des différentes trousse** : (IL-6, TNF-ALPHA et IFN-Gamma)

**I-2-Description de la trousse TNF- $\alpha$**  :

- **R1**=Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$  humain en présence de BSA.
- **R2**=Réactif anticorps biotinylés 8ml.
- **R3**=Diluant échantillon 12ml.Prêt à l'emploi. Contient de la BSA et du thimerosal.
- **R4**=Solution de lavage 50 ml, concentré 30 fois, contient du thimerosal.
- **R5**=Streptavidine-HPR concentré 50 $\mu$ l
- **R6**=Substrat, TetraMethylBenzyl (TMB) 12ml. Prêt à l'emploi.
- **R7**=Solution d'arrêt, (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M) 15ml, prêt à l'emploi.
- **R8**=Diluant Streptadivine-HRP 14ml.
- **S**=Standard lyophilisé (2flacon).

## ■ Préparation des réactifs :

### A/Solution de lavage: R4

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter les 50 ml de R4 (solution de lavage concentrée) à 1450 ml d'eau distillée.

Homogénéiser. La solution de lavage doit être à la température du laboratoire avant utilisation.

En cas d'utilisation partielle de la plaque, la solution de lavage reconstituée est stable 8 à 10 mois à + 4°C, sauf si contamination visible.

### B/ Solution de Streptavidine-HPR

1-Préparer cette solution 15 mn avant son utilisation et juste la quantité nécessaire. Ne pas stocker de solution reconstituée. Centrifuger le concentré.

2-Ajouter 30 µl de Streptavidine HPR concentrée à 12 ml de diluant Streptavidine HPR, Homogénéiser la solution de Strptavidine HPR qui est alors prête à l'emploi.

3-Pour chaque barette, utiliser 2.5 µl de Streptavidine HPR concentrée et 1 ml de diluant Streptavidine HPR.

### C/Standards : S

1-La trousse contient 2 flacons de standard lyophilisés permettant l'utilisation partielle de la microplaque. Calibration sur le WHO 871650 TNF-α recombinant. 1pg du standard = 1pg de référence WHO= 0.04 unités WHO.

## ■ Précaution :

1-Utiliser les standars dans l'heure qui suit la reconstitution. Ne pas conserver les standars liquides.

2-Dans le cas où les échantillons sont des surnageants de culture cellulaire, reconstituer le standard avec de l'eau distillée ou désionisée (voir le volume indiqué sur le flacon). La solution obtenue a une concentration de 4ng/ml. Attendre 1mn pour une bonne dissolution. Utiliser le milieu de culture pour préparer les dilutions du standard.



Dans le cas où les échantillons sont de nature sérique ou plasmatique, reconstituer le standard avec de l'eau distillée ou désionisée. Pour préparer les dilutions du standard. Attendre 1mn pour une bonne dissolution. Si vous travaillez au cours d'une même série avec des surnageant de culture cellulaire et des échantillons sériques ou plasmatiques, utilisez un standard reconstitué par de l'eau distillée ou désionisée et diluée dans le standard diluant. Le 2ème flacon de standard permettra de réaliser une deuxième série de dosages.

3-Identifier 5 tubes : 1 pour chaque standard :  
1000pg/ml, 250pg/ml, 62.5pg/ml, 15.6pg/ml, 0pg/ml.

Préparer les dilutions au 1/4 pour la courbe de calibration.

- Diluer 300µl du diluant dans chaque tube.
- Distribuer 100µl du standard reconstitué dans le premier tube (1000pg/ml) et mélanger.
- Distribuer 100µl de la dilution dans le 2<sup>ème</sup> tube marqué 250 pg/ml et mélanger.
- Répéter le processus 2 fois. Les concentrations (1000pg/ml, 250pg/ml, 62.5pg/ml, 15.6pg/ml, 0pg/ml) sont les points de gamma.

### **I-3-Désecrption de la trousse IL-6 :**

- **R1**= Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploie (12×8 barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps anti-IL-6 humain.
- **R2**= Tampon 10ml. Prêt à l'emploi. Tampon contenant de la BSA et du thimerosal.
- **R3**= Diluant échantillons 15ml. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA et du thimerosal.
- **R4**= Solution de lavage 50ml, concentrée 30 fois, contient du thimerosal.
- **R5**= Conjugué 15 ml. Prêt à l'emploi. Anticorps anti-IL-6 humain couplé à la peroxydase, contient du thimerosal.

- **R6**= Substrat TetraMethylBenzyl (TMB) 13ml. Prêt à l'emploi.
- **R7**= Solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M) 15ml. Prêt à l'emploi.
- **S0**= Standard 0 lyophilisé (2f)
- **S1 à S4**= Standard lyophilisé (2×4flacons).

Interleukine-6 humaine recombinant en présence de BSA, la courbe est comprise entre 0 et 1000pg/ml, les concentrations sont indiquées sur les flacons.

- 4 Papiers autocollants.

### ■ Préparation des réactifs :

#### A/Solution de lavage :

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter les 50 ml de R4 (solution de lavage concentrée) à 1450ml d'eau distillée.

Homogénéiser. La solution de lavage doit être à la température du laboratoire avant l'utilisation.

En cas d'utilisation partielle de la plaque, la solution de lavage reconstituée est stable 8 à 10 mois à +4°C, sauf si contamination visible.

#### B/Les standards : S0-S1-S2-S3-S4

1-La trousse contient 2 sets de standards lyophilisés permettant l'utilisation partielle de la microplaque. Calibration : NBSB réf lot 88/54.

1U/ml de la référence standard correspond à 200pg/ml de la trousse.

### ■ Précaution :

1-Utiliser les standard dans l'heure qui suit la reconstitution. Ne pas conserver les standards liquides.

2-Les concentrations sont indiquées sur chaque flacon.

3-Reconstituer chaque flacon avec 500  $\mu$ l d'eau distillée. Attendre une minute pour une bonne dissolution. Le 2<sup>ème</sup> set de standard permettra de réaliser une deuxième série de dosages.

#### **1-4-Déscription de la trousse IFN- $\gamma$ :**

- R1**= Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12 $\times$ 8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-IFN- $\gamma$  humain en présence de BSA.
- R2**= Tampon 8ml. Prêt à l'emploi. Tampon contenant de la BSA et du thimerosal.
- R3**= Diluant standard 12ml. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA et du thimerosal.
- R4**= Solution de lavage 50ml, concentrée 30 fois. Contient du thimerosal.
- R5**= Conjuguée 12ml. Prêt à l'emploi. Anticorps monoclonal anti-IFN- $\gamma$  humain couplé à la peroxydase. Contient du thimerosal.
- R6**= Substrat. TetraMethylBenzyl (TMB) 12ml. Prêt à l'emploi.
- R7**= Solution d'arrêt. (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M) 15ml. Prêt à l'emploi.
- S**=Standard lyophilisé (2 flacons). Solution d'IFN- $\gamma$  humain recombinant.
- 4 Papiers autocollants.

#### **■ Préparation des réactifs :**

##### **A/Solution de lavage : R4**

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter les 500ml de R4 (solution de lavage concentrée) à 1450ml d'eau distillée.

Homogénéiser. La solution de lavage doit être à la température du laboratoire avant l'utilisation.

En cas d'utilisation partielle de la plaque, la solution de lavage reconstituée est stable 8 à 10 mois à +4°C, sauf si contamination visible.

### **B/Standard : S**

1-La trousse contient 2 flacons de standard lyophilisés permettant l'utilisation partielle de la microplaque. Calibration : NIH lot N° Gg 23-901-530. 1 unité NIH=115 pg du standard de la trousse.

2-Identifier 5 tubes : 1 pour chaque standard :  
1000pg/ml, 250pg/ml, 62.5pg/ml, 15.6pg/ml, 0pg/ml.

Préparer les dilutions au 1/4 pour la courbe de calibration :

a)-Distribuer 300µl du diluant dans chaque tube.

b)-Distribuer 100µl du standard reconstitué dans le 1<sup>er</sup> tube (1000pg/ml) et mélanger.

c)-Distribuer 100µl de la dilution dans le 2<sup>ème</sup> tube marqué 250pg/ml et mélanger.

d)-Répéter le process 2 fois. Les concentrations (1000pg/ml, 250pg/ml, 62.5pg/ml, 15.6pg/ml, 0pg/ml) sont les points de gamme.

❁ ❁ ❁ ANNEXE 2 ❁ ❁ ❁

COMPOSITION DES DIFFERENTES TROUSSES

**II/ Innotest Diagnostics :** Technique immunoenzymologique sandwich où le premier anticorps est fixé aux cupules de la microplaque.

**II-1-Composition des différentes trousse :** (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-2Ra, GM-CSF)

**II-2-Composition de la trousse IL-6 :**

- R1**= Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-IL-6 humain.
- R2**=Standard lyophilisé (2×6 flacons de 0.7ml). La courbe est comprise entre 31.25pg/ml et 1000pg/ml. Les concentrations sont indiquées sur les flacons.
- R3**=Tampon d'incubation 10ml. Prêt à l'emploi.
- R4**=Diluant échantillons 30ml. Prêt à l'emploi.
- R5**=Conjugué-1 concentré 0.2ml. Anticorps anti-IL-6 humain couplé à la peroxydase, contient 0.05% Kathon CG, diluer 100× avant utilisation.
- R6**=Conjugué-2 concentré 0.2ml. Diluer 100× avant utilisation.
- R7**=Diluant conjugué-1 et 2 30ml.
- R8**=Substrat TetraMethylBenzyl (TMB) 0.3ml. Diluer 100× avant l'utilisation.
- R9**=Diluant substrat 20ml.
- R10**=Solution de lavage 60ml, concentrée 25 fois.
- R11**=9 papiers autocollants

## ■ Préparation des réactifs :

### A)-Solution de lavage :

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter 48ml de R10 (solution de lavage concentrée) à 1200ml d'eau distillée.

Homogénéiser. La solution de lavage doit être à la température du laboratoire avant l'utilisation.

En cas d'utilisation partielle de la plaque, la solution de lavage reconstituée est stable 8 à 10 mois à +4°C, sauf si contamination visible.

### B/Conjugué-1 et 2 :

1-Préparer cette solution 15mn avant son utilisation et juste la quantité nécessaire. Ne pas stocker de solution reconstituée. Centrifuger rapidement le concentré.

2-Ajouter 120µl de conjugué-1 et 2 (R5 et R6) concentrée à 12ml de diluant conjugué (R7). Homogénéiser la solution de conjugué qui est alors prête à l'emploi.

### C/Substrat :

Ajouter 120µl de substrat solution concentrée (R8) à 12ml de diluant substrat solution (R9). Homogénéiser la solution substrat qui est alors prête à l'emploi.

### D/Standard :

1-La trousse contient (2×06 flacons) de standard lyophilisés permettant l'utilisation partielle de la microplaque. Calibration sur le WHO 89/548. 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31025pg/ml.

## II-3-Composition de la trousse IL-8 :

- R1= Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-IL-8 humain.
- R2= Standard lyophilisé (3 flacons de 2ng).

- R3=Diluant échantillons 25ml contenant du NaN<sub>3</sub>. Prêt à l'emploi.
- R4=Solution de lavage 100ml, concentrée 10 fois.
- R5=Conjugué-1, 12ml.
- R6=Conjugué-2, 12ml
- R7=Substrat solution 12ml. Prêt à l'emploi.
- R8=TetraMethylBenzyl (TMB) solution 12 ml. Prêt à l'emploi.
- R9=Papiers autocollants.

### ■ Préparation des réactifs :

#### A)-Solution de lavage :

Utiliser un récipient de 2litres. Ajouter 100ml de R4 (solution de lavage concentrée) à 900ml d'eau distillée

#### B/Standard :

1-La trousse contient (2×03flacons) de standard lyophilisés, la solution de travail est de 1.5ng/ml. On dilue la solution de travail avec le diluant échantillons (R3), pour obtenir la courbe de calibration, 1500pg/ml, 500pg/ml, 150pg/ml, 50pg/ml, 15pg/ml. Le diluant échantillon est utilisé comme solution standard, 0pg/ml.

#### II-4-Composition de la trousse TNF- $\alpha$ :

- R1=Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$ .
- R2=Standard lyophilisé (06×2 flacons) de 0.35ml à différentes concentrations, 800pg/ml, 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml et 25pg/ml
- R3=Diluant échantillon 30ml. Prêt à l'emploi.

- R4=Tampon d'incubation 10ml. Prêt à l'emploi.
- R5=Conjugué-1 concentré 0.2ml, diluer 100× avant utilisation.
- R6=Conjugué-2 concentré 0.2ml, diluer 100× avant utilisation
- R7=Diluant conjugué-1 et 2, 30ml.
- R8=Substrat TetraMethylBenzyl (TMB) 0.3ml. Diluer 100× avant utilisation.
- R9=Diluant substrat, 20ml.
- R10=Solution de lavage 60ml, concentrée 25 fois.
- R11=9 papiers autocollants.

### ■ Préparation des réactifs :

#### A)-Solution de la lavage :

Utiliser un récipient de 2litres. Ajouter 30ml de R10 (solution de la lavage concentrée) à 750ml d'eau distillée.

#### B)-Conjugée-1 et 2 :

1-Préparer cette solution 15mn avant son utilisation et juste la quantité nécessaire. Ne pas stocker de solution reconstitué. Centrifuger rapidement le concentré.

2-Ajouter 120µl de conjugué-1 et 2 (R5 et R6) concentrée à 12ml de diluant conjugué (R7). Homogénéiser la solution de conjugué qui est alors prête à l'emploi.

#### C)-Substrat :

Ajouter 120µl de substrat solution concentrée (R8) à 12ml de diluant substrat solution (R9). Homogénéiser la solution substrat qui est alors prête à l'emploi.



## **II-5-Composition de la trousse IL-2Ra :**

- R1**=Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-IL-2Ra humain.
- R2**=Standard lyophilisé (2×6 flacons) de 0.20ml à différentes concentrations, 750pg/ml, 1500pg/ml, 3000pg/ml, 6000pg/ml et 8000pg/ml.
- R3**=Diluant échantillon 30ml. Prêt à l'emploi.
- R4**=Tampon d'incubation 10ml. Prêt à l'emploi.
- R5**=Conjugué-1 concentré 0.2ml, diluer 100× avant utilisation.
- R6**=Conjugué-2 concentré 0.2ml, diluer 100×avant utilisation.
- R7**=Diluant conjugué-1 et 2, 30ml.
- R8**=Substrat TetraMethylBenzyl (TMB) 0.3ml. Diluer 100× avant utilisation.
- R9**=Diluant substrat, 20ml.
- R10**=Solution de lavage 60ml, concentrée 25 fois.
- R11**=9 papiers autocollants.

### **■ Préparation des réactifs :**

#### **A)-Solution de lavage :**

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter 60ml de (R10) (solution de lavage concentrée) à 1500ml d'eau distillée.

#### **B)-Conjugué-1 et 2 :**

1-Préparer cette solution 15mn avant son utilisation et juste la quantité nécessaire. Ne pas stocker de solution reconstitué. Centrifuger rapidement le concentré.

2-Ajouter 120µl de conjugué-1 et 2 (R5 et R6) concentré à 12ml de diluant conjugué (R7). Homogénéiser la solution de conjugué qui est alors prête à l'emploi.

### **C)-Substrat :**

Ajouter 120µl de substrat solution concentrée (R8) à 12ml de diluant substrat solution (R9). Homogénéiser la solution substrat qui est alors prête à l'emploi.

### **II-6-Composition de la trousse GM-CSF :**

- R1**=Microplaque 96 puits. Prêt à l'emploi (12×8barrettes). Les puits sont sensibilisés par un anticorps monoclonal anti-GM-CSF humain.
- R2**=Standard lyophilisé (2×5 flacons) de 1.00ml à différentes concentrations, 320pg/ml, 160pg/ml, 80pg/ml, 40pg/ml et 20pg/ml.
- R3**=Diluant échantillons 30ml. Prêt à l'emploi.
- R4**=Tampon d'incubation 10ml. Prêt à l'emploi.
- R5**=Conjugué-1 concentré 0.3ml, diluer 100× avant utilisation.
- R6**=Conjugué-2 concentré 0.3ml, diluer 100× avant utilisation.
- R7**=Diluant conjugué-1 et 2, 60ml.
- R8**=Substrat (TMB) 0.3ml, diluer 100× avant utilisation.
- R9**=Diluant substrat, 30ml.
- R10**=Solution de lavage 60ml, concentrée 25 fois.
- R11**=9 papiers autocollants.

## ■ Préparation des réactifs :

### A)-Solution de lavage :

Utiliser un récipient de 2 litres. Ajouter 60ml de (R10) (solution de lavage concentrée) à 1500ml d'eau distillée.

### B)-Conjugué-1 et 2 :

Ajouter 240 $\mu$ l de conjugué-1 et 2 (R5etR6) concentrée à 24ml de diluant conjugué (R7). Homogénéiser la solution de conjugué qui est alors prête à l'emploi.

### C)-Substrat :

Ajouter 240 $\mu$ l de substrat solution concentrée (R8) à 24ml de diluant substrat solution (R9). Homogénéiser la solution substrat qui est alors prête à l'emploi.

\* \* \* ANNEXE 3 \* \* \*

REGLES DE SECURITE ET PRECAUTION D'EMPLOI

**1-Conditions de conservation :**

**a)-Avant utilisation**

Tous les réactifs de la trousse (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) conservés à +2/+8°C peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

**Ne jamais congeler les réactifs. Ne pas exposer les réactifs à une chaleur excessive ou à la lumière pendant le stockage et l'incubation**

**b)-En cours d'utilisation**

Ne pas conserver les réactifs dilués excepté la solution de lavage. Conserver les microplaques dans la pochette d'origine en présence du dessiccant et fermer soigneusement cette pochette après utilisation. La solution de lavage dilué est stable 8 à 10 mois à +2/+8°C.

**2-Equipement et materiel necessaires (non fournis) :**

-Micropipettes automatiques pouvant distribuer de 50 $\mu$ l à 1ml avec embouts jetables.

-Eprouvette graduée (2L).

-Eau distillée ou déminéralisée.

-1 dispositif de lavage de plaques. Laveur ELISA automatique (**ORGANON teknika**).

-1 dispositif de lavage de plaques de microtitration manuel (**ORGANON teknika**).

-1 incubateur de plaques réglable : Bain marie à 37°C (jouan).

-1 lecteur ELISA (**SORIN**) : 2<sup>ème</sup> génération, plus logiciel intégré.

-Tubes de 1.5ml en polypropylène ou en polyéthylène pour préparer les standards. Ne pas utiliser des tubes en polystyrène, polycarbonate ou verre

### **3-Prélèvement des échantillons :**

Les cultures cellulaires peuvent être testées avec la trousse IFN- $\gamma$  Pasteur. Le prélèvement sanguin peut être effectué sur EDTA.

Il est conseillé d'utiliser des inhibiteurs de protéases tels que l'aprotinine. Dans ce cas, ajouter 0.67 U d'inhibiteur de trypsine par ml de sang.

#### **a)-Recueil sur tube EDTA :**

Mettre le tube de prélèvement dans la glace et centrifuger dans les 10mn suivant le recueil à 1000g pendant 20mn. Séparer immédiatement le plasma.

#### **b)-Recueil sur tube sec :**

Laisser le tube à température ambiante jusqu'à la formation du caillot. Puis rapidement, centrifuger à 1000g pendant 20mn.

-Après décantation, les échantillons (sérums, plasma ou surnageants) peuvent être conservés 24h à +2/+8°C. Au delà il est recommandé de les stocker à -70°C.

-Ne pas congeler et décongeler plus d'une fois.

-Eviter les échantillons troubles ou hémolysés.

-Laisser les échantillons à la température du laboratoire avant utilisation.

-Homogénéiser avant distribution.

**Ne jamais porter les échantillons à 37°C ou 56°C pour les décongeler.**

### **4-Conditions d'utilisation du test :**

#### **Recommandations :**

-Ne jamais utiliser de réactifs après expiration de la date de validité.

**Utiliser la gamme étalon dans l'heure suivant la reconstitution.**

-Amener tous les réactifs à la température du laboratoire avant le test.

-Ne pas décongeler les échantillons au bain-marie.

**Il est essentielle de laver la plaque vigoureusement après la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> incubation.**

-Utiliser un nouveau papier autocollant pour couvrir la plaque après chaque incubation

-Ne pas utiliser de sérum ou plasma hémolysés ou contaminés.

-En cas de troubles ou d'impuretés, il est conseiller de filtrer les échantillons sur 0.2µm.

-Il est préférable de porter des gants afin d'éviter tout contact avec les conserveurs contenus dans les réactifs ainsi qu'avec les échantillons.

\* \* \* ANNEXE 4 \* \* \*

PRECAUTION A PRENDRE PENDANT LE LAVAGE

**A)- Protocole avec laveur de plaque :**

Laver les puits de la plaque de microtitration 3 fois avec un laveur automatique répondant aux critères suivants :

- 1-Tous les puits sont aspirés complètement.
- 2-Tous les puits sont remplis jusqu'au bord par la solution de lavage.
- 3-Le tampon de lavage est amené avec un débit suffisant (typiquement une seconde pour remplir chaque puits).

**B)- Protocole manuel de lavage :**

- 1- Renverser la plaque et la secouer fermement au-dessus d'un évier en la tenant par les côtés longs (ce qui maintient les barrettes en place).
- 2- Remplir tous les puits avec la solution de lavage à l'aide d'une pissette de laboratoire (la solution de lavage peut déborder).
- 3- Répéter les étapes 1, 2 puis à nouveau.
- 4- Taper la plaque retournée sur du papier absorbant.

**REMARQUE** : La séquence de lavage ne doit pas être interrompue.  
Ne pas laisser les puits sécher avant l'ajout du réactif suivant.

**UTILISATION PARTIELLE DE LA PLAQUE :**

Les kits présentent une flexibilité permettant de réaliser 2 séries de dosages.

- \* Remettre la plaque dans le sachet en présence du dessiccant après une 1<sup>ère</sup> Utilisation. **Bien refermer le sachet.**
- \* Reconstituer un set de standard (S0-S1-S2-S3-S4-) à chaque série.
- \* Prélever dans le flacon R6 (substrat) la quantité nécessaire à la réalisation de la 1<sup>ère</sup> série afin de ne pas risquer de contaminer le substrat. Si la solution de TMB est colorée en bleu avant emploi, **ne pas l'utiliser.**

# GLOSSAIRE



\* \* \* GLOSSAIRE \* \* \*

**Antigène**

Substance douée de la propriété de provoquer une réponse immunitaire (anticorps susceptible de réagir spécifiquement avec elle ou réaction à médiation cellulaire).

**Anticorps**

Classe de protéines sériques induites par un contact avec un antigène et qui se lient spécifiquement à l'antigène qui a provoqué leur synthèse.

**Anticorps monoclonaux**

Molécules identiques d'anticorps produites en grande quantité par des lignées de cellules hybrides ou hybridômes, obtenus par la fusion myéломateuses avec des cellules spléniques provenant de souris immunisées contre un antigène donné.

**CD4, CD8**

Molécule aux fonctions analogues exprimées par les cellules T matures. Les cellules peuvent exprimer soit CD4 soit CD8 mais jamais les deux.

**CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)**

Groupe de gènes codant notamment pour les molécules de classe II impliquées dans la présentation de l'antigène aux cellules T. Les molécules de classe I sont retrouvées sur toutes les cellules du système immunitaire.

**CPA (cellules présentant l'antigène)**

Cellules définies fonctionnellement par leur capacité à présenter l'antigène et à le présenter aux lymphocytes sous forme reconnaissable.

### **Déterminant antigénique (épitope)**

Structure présente à la surface de la molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps.

### **Facteur rhumatoïde**

Anticorps anti-IgG retrouvé chez la majorité des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ainsi que dans certaines maladies infectieuses ou immunitaires.

### **Histocompatibilité**

Capacité d'un individu à accepter un greffon provenant d'un autre individu.

### **HLA (humain lymphocyte antigen)**

Le locus HLA est le complexe majeur d'histocompatibilité chez l'homme :

- Les loci HLA-A, -B et -C codent pour les molécules de classe I.
- Les loci HLA-DP, -DQ et DR codent pour les molécules de classe II.

### **Hémolyse**

Destruction de l'hémoglobine des hématies.  
Les globules rouges gonflent, éclatent et abandonnent leur hémoglobine qui se dissout.

### **Immunosuppression**

Décrit l'ensemble des méthodes employées pour réduire l'efficacité de la réponse immune primaire.

### **Monocyte**

Cellules circulantes représentent environ 5% des leucocytes totaux du sang et qui peuvent migrer dans les tissus pour y devenir des macrophages.

### **Restriction à la classe I ou II**

Caractérisé un groupe particulier de cellules T qui reconnaissent l'antigène associé à des molécules du CMH soit de classe I, soit de classe II.

### **Immunité humorale**

Caractérisé par la production d'anticorps.

### **Immunité cellulaire**

Caractérisé par des effecteurs qui sont en particulier les phagocytes mononucléés.

### **Réaction inflammatoire**

Caractérisé par une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme à une agression tissulaire non spécifique.

### **Paracrine**

C'est le cas des cytokines qui agissent sur les cellules voisines.

### **Endocrine**

C'est le cas des cytokines qui agissent à distance sur d'autres cellules.

### **Autocrine**

C'est à dire que la cytokine est capable de faire exprimer son récepteur sur la propre cellule qui l'a produite.

### **Pléiotropique**

C'est le cas des cytokines qui possèdent une activité qui se traduit par des activités biologiques multiples sur des cibles cellulaires très variées.

## ملخص:

هدف عملنا هو تجسيد على مستوى مركز حقن الدم لمستشفى المركزي للجيش في 1994 تقنية (ELISA) لتقويم سيتوكين (IL-6, IFN- $\gamma$  et IFN- $\alpha$ ) أجرى هذا التقويم على متطوعين للعطاء الدم من الجنسين (شهادة أشخاص) للوضع معدلات ذات الطابع الجزائري لمرضى مصالحة أمراض الدم لمستشفى المركزي للجيش و بالأخص مييلوم متعدد.

يتمثل عملنا أولا في التوسيع هذا التقويم على مختلف المظاهر بتولوجية منها الأمراض الدموية، أمراض المفاصل و الأمراض فيرولوجية.

و في وقت ثاني أنجز تقويم سيتوكينات أخرى (IL-8, IL-2R et le GM-CSF).

كلمات المفتاح: سيتوكين - مييلوم متعدد - مظاهر بتولوجية - أمراض الدم.

## RESUME

Les Cytokines sont des médiateurs glycoprotéiques intervenant dans les interactions à courte distance entre les cellules. chaque année, grâce au génie génétique, plusieurs nouvelles molécules de cette famille (Cytokines, récepteurs de cytokines et antagonistes naturels de certains cytokines) sont caractérisées.

Le but de notre travail est la mise en place au centre de transfusion sanguine de l'hôpital central en 1994, d'une technique ELISA de dosage de cytokines (IL-6, IFN- $\gamma$  et IFN- $\alpha$ ). Ce dosage a été pratiqué sur des donneurs de sang des 02 sexes (population témoin) pour l'établissement de normes algériennes, des malades d'hématologie de l'hôpital central de l'armée et en particulier des myélomes multiples.

Notre travail, dans un premier temps, va consister à étendre ce dosage (IL-6, IFN- $\gamma$  et IFN- $\alpha$ ) à différentes pathologies à savoir:

- Les maladies hématologiques telles les lymphomes, les leucémies et les maladies d'hodgkin,
- Les maladies rhumatologiques (spondylarthrite ankylosante, polyarthrite et behcet),
- Les maladies virales (hépatites virales B et C, infection HIV à partir de maladies chroniques et donneurs de sang positif pour les marqueurs du sang).

En transfusion sanguine, le rôle des cytokines dans la conservation du sang.

Dans un second temps, le dosage d'autres cytokines (IL-8, IL-2R et le GM-CSF) a été réalisé.

Mots Clés: Cytokines - inflammations - réponse immune - HIV - pathologies - myélomes multiples.

## ABSTRACT:

Cytokines are molecules involved in intercellular communication, they are produced by several cell types after stimulation and exhibit a large diversity, data from immune intervention directed against other cytokines are for the moment, preliminary, but many potential targets (IL-6, IFN- $\gamma$  et IFN- $\alpha$ ) are emerging.

The aim of this work, is to set up cytokine assay methods (ELISA), enzyme - Linked - immunosorbent - assays) (IL-6, IFN- $\gamma$  et IFN- $\alpha$ ) in the blood transfusion center of central hospital of army in 1994. This assay have been applicated on a sample of blood (donors), man and women in order to established Algerian norms of hematology patients in the central hospital of army in particular the multiple myeloma .

In a first time, our work reach to extend this dosage to differents pathologies: hematologic illnesses: lymphoma - Leukaemia and Hodgkin disease, Rhumatologics disease, viral disease: hepatitis Virus B - Virus C, VHL infection.

In a second time, the dosage of other cytokines (IL-8, IL-2R and le GM-CSF) have been made.

Key Words: Cytokines - Inflammation - immune response - multiple myeloma . pathologies.