

EXPRESSION DE LA NOSYNTASE 2 ET PRODUCTION DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) AU COURS DE L'HYDATIDOSE

Reçu le 12/05/2004 – Accepté le 31/12/2004

Résumé

La production *in-vivo* de NO au cours de l'hydatidose est évaluée par dosage des nitrites selon la méthode de Griess modifiée dans 74 sérums de patients porteurs de kystes de localisations diverses et 13 sérums de donneurs sains. Les résultats désignent le NO comme mécanisme de défense potentiel de l'hôte vis-à-vis d'*Echinococcus granulosus*. Cette production également observée dans le liquide hydatique impliquerait une diffusion du NO dans l'hydatide. Des sources cellulaires supplémentaires à celles décrites par notre équipe (leucocytes, PBMC) expliqueraient les teneurs relativement élevées observées. Ces données sont confirmées par la mise en évidence de la présence de la NOS2 inductible dans les hépatocytes de patients atteints d'hydatidose hépatique par des tests immuno-histochimiques utilisant un anticorps anti-NOS2.

Mots clés: hydatidose, kystes echinococcosis, monoxyde d'azote (NO), NOSynthase 2 inductible (NOS2), leucocytes, cellules mononucléées périphériques circulantes (PBMC).

Abstract

Nitric oxide production is evaluated *in vivo* in 74 sera of patients with cystic echinococcosis and in 13 healthy blood donors. The nitrite levels determined by Griess assay are significantly higher in patients sera (94,08 μ M) compared to healthy control levels (34,23 μ M) supporting the host protective role of NO against the macroparasite. Considerable amounts of nitrite are observed in the hydatid cyst fluid of patients suggesting some local nitric oxide production in addition to circulant cells sources of NO we have previously showed (PBMC, leukocytes). This free radical probably diffuses through the cyst wall of the larval stage of *Echinococcus granulosus*. Interestingly, NOSynthase2 is revealed by immuno-histochemical staining method using liver biopsies of patients with liver hydatidosis.

Keywords: Hydatidosis, cystic echinococcosis, NOSynthase 2 (NOS2), nitric oxide (NO), leukocytes, peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

S. AÏT AÏSSA

M. AMRI

C. TOUIL-BOUKOFFA

Laboratoire de Biologie

Cellulaire & Moléculaire

Faculté des Sciences Biologiques

USTHB, BP 12 El-Alia

Bab-Ezzouar, 16111 Alger

ملخص

نظهر في هذه الدراسة عملية إنتاج NO أحادي أكسيد الأزوت داخل جسم الكائن الحي لدى مرضى جزائريين مصابين بالكيس المائي.

ولقد وضعنا أيضا عملية إنتاج NO داخل السيتود: "إكينوكوكوس قرانيلوس" (*Echinococcus granulosus*) في مرحلته اليرقية.

كما تم الكشف عن أحادي أكسيد الأزوت و ال NO سنيتاز 2 (NOS2) على الترتيب بطريقة فريس GRIESS المنقحة وعن طريق تقنية الإمبو استو الكيميائية باستعمال مولد الجسم أحادي كلونال – مضاد ال NO سنيتاز 2 على أنسجة مستأصلة من كبد المريض المصاب بالكيس المائي.

يعد NO واحد من ميكانيزمات الدفاع المشكلة من طرف العائل ضد الطفيلي.

تقترح نتائج الدراسة منظور جديد في معرفة أسباب نشوء المرض ومراقبة الدفاع المناعي للمرضى.

الكلمات المفتاحية: كيس المائي، *Echinococcus granulosus*، أكسيد الأزوت، NO سنيتاز 2.

L'Algérie, mais également les autres pays du Maghreb, sont victimes d'une forte endémie hydatique que vient conforter une démographie importante. Cette pathologie constitue à bien des égards une situation d'exception par les contraintes du diagnostic (du fait d'une vaste communauté antigénique), son traitement lourd et son pronostic redoutable. Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine reste donc plus que jamais d'actualité. De nombreux travaux sont mis en œuvre afin de découvrir une substance de spécificité étroite et dont la détection serait exploitée dans l'établissement d'un diagnostic de certitude et le suivi thérapeutique [1,2,3].

C'est dans cette optique que nous sommes intéressés au monoxyde d'azote (NO), composé radicalaire bio-synthétisé par une famille de trois isoenzymes : les NOSynthases. Ces dernières catalysent à partir d'un précurseur banal, la L-Arginine, par deux mono-oxydations successives, la formation de NO et de L-Citrulline [4].

Le NO apparaît comme un effecteur majeur de la réponse immuno-inflammatoire sous le contrôle des cytokines. En effet, l'activité NOS2 (NOS de type 2 ; inductible) est sous l'action des cytokines IFN γ , TNF α , Il-1 et Il-6 ou d'immunomodulateurs bactériens (LPS) [5]. L'expression fonctionnelle de cette enzyme est obtenue après liaison des antigènes CD23 aux IgE ou aux anticorps monoclonaux anti-CD23, ce qui conduit à la destruction de parasites à multiplication intracellulaire tels que *Leishmania major* [6,7] ou encore *Plasmodium falciparum* et *P. vivax malaria* [8,9,10].

Les travaux antérieurs ayant révélé l'implication des cytokines et plus particulièrement celle de l'interféron γ dans la réponse immunitaire anti-hydatique, nous ont incité à quantifier ce produit de leur induction que constitue le monoxyde d'azote au cours de l'échinococcose [4,11]. Notre étude porte sur deux axes : le dosage *in vivo* des nitrites dans les sérums et liquides hydatiques de patients porteurs de kystes hydatiques de localisations diverses et la détection de la NOS2 au niveau des hépatocytes avoisinants le kyste chez des patients atteints d'hydatidose hépatique.

MATERIEL ET METHODES

Sang total et Sérums de patients

Le sang et les sérums de patients atteints d'hydatidose ont été obtenus au niveau des services de chirurgie de l'hôpital de Mustapha Bacha d'Alger, Algérie (2001-2004). Les sérums de 74 malades et 13 sérums négatifs ont pu être obtenus puis leur immunoréactivité testée par la méthode ELISA après confirmation de la pathologie par hémagglutination passive au sein du Service de Parasitologie de L'Institut Pasteur d'Alger. Cette population étudiée (n = 87) est constituée d'individus de 6 à 80 ans avec 56% d'hommes pour 44% de femmes. La localisation des kystes est variée : Foie, poumon, rate, rein, trachée, estomac, pancréas, os, cerveau, péritoine et muscle. Ces localisations comprennent 05 cas de récurrence.

Le liquide hydatique

Le liquide hydatique (28 liquides fertiles ou non fertiles dont 14 issus de kystes pulmonaires, 13 hépatiques et 01 de l'ovaire) est obtenu par ponction de kystes fertiles non fissurés et contrôlé, sur gélose nutritive pour sa qualité microbiologique. Les kystes de localisation hépatique, pulmonaire et de l'ovaire (5-12,5 cm de diamètre) ont été obtenus au niveau des services de chirurgie de l'hôpital Mustapha Bacha, Alger, Algérie. Suite à l'ablation chirurgicale, le kyste hydatique est rincé à l'eau physiologique. Le liquide fertile ou non fertile (Fig. 1) est prélevé aseptiquement à partir de kystes non fissurés et non surinfectés puis filtré sur de la gaze afin d'éliminer les débris membranaires. Il est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 30 mn afin d'éliminer les scolex. Ces échantillons subissent une caractérisation antigénique par immunoelectrophorèse et selon la technique ELISA.

Etude histochemique et immuno-histochemique des biopsies hépatiques

Les biopsies hépatiques (n = 8) ont été obtenues à partir de patients atteints d'hydatidose de localisation essentiellement hépatique. Pour chaque patient, deux prélèvements sont réalisés suite à l'exérèse (perikystique et à distance de la paroi du kyste). Afin de réaliser dans les mêmes conditions des témoins négatifs, et dans le strict respect des règles éthiques, nous avons obtenu des biopsies hépatiques négatives notamment issues d'autopsies (pièces opératoires aimablement fournies par les services d'Anatomo-Pathologie du CHU Mustapha Bacha et du CHU Parnet, Alger Algérie, cas de mort accidentelle, aucune pathologie décelée). La réalisation des coupes se

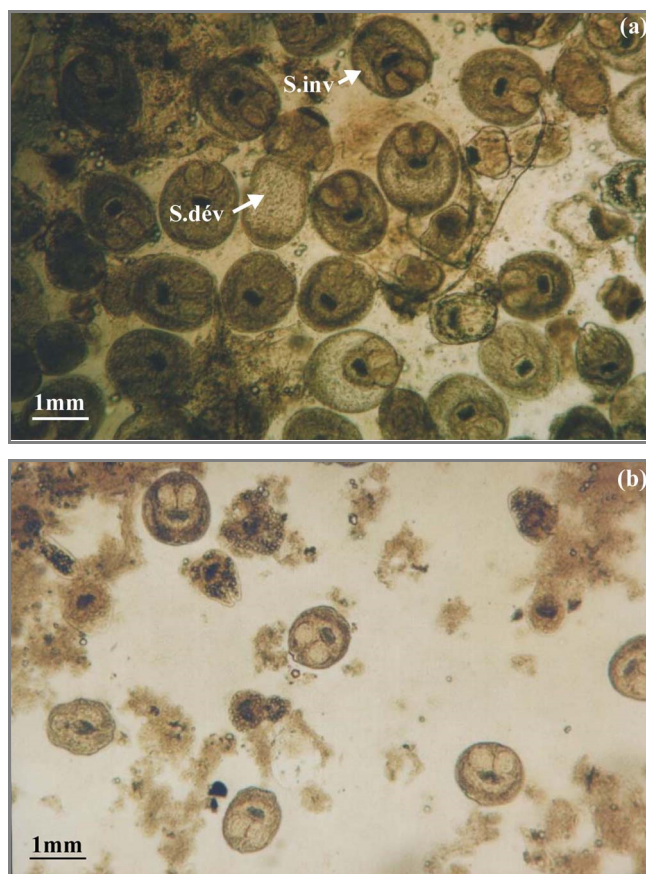


Figure 1: Observation des protoscolex dans les liquides hydatiques de patients porteurs de kystes hydatiques.

(a), (b) observation de la différence de fertilité entre deux liquides hydatiques issus de patients différents, nombre, état et forme des protoscolex différents.

F.inv : forme invaginée ; **F.dév** : forme dévaginée.

fait à partir de blocs tissulaires d'une taille minimale de 1cm×1cm. Le prélèvement est placé dans du paraformaldéhyde tamponné à 4% et préparé par inclusion dans de la paraffine. Après la coupe au microtome, une étude histologique est réalisée (par coloration à l'Hématoxyline-Eosine) préalablement aux tests immunohistochemiques selon la méthode Avidine-biotine modifiée. Les lames blanches destinées à l'étude immunohistochemique sont conservées à 37°C au moins 24 heures avant le test. Nous avons employé pour le test immunoenzymatique un anticorps anti-NOS2 (Rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz biotechnology). Le chromogène employé pour la révélation est le DAB (3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochloride; Sigma).

Dosage du monoxyde d'azote

Le dosage de la production de NO dans les sérums et dans le liquide hydatique est réalisé selon la détermination du métabolite physiologiquement stable du NO, les nitrites (NO_2^-). Les teneurs en nitrites sont évaluées selon la méthode de Griess modifiée décrite par Ischiropoulos [10], utilisant une souche ATTC 8062 (Unité 365-Institut Curie Paris), *Pseudomonas oleovorans* douée de propriétés Nitrate-réductase. Cette quantification des nitrites se fait par dosage colorimétrique à $\lambda = 543 \text{ nm}$ par le biais du

réactif de Griess composé d'un mélange de deux solutions : Naphthyléthylènediamine dichloride à 5% - HCl 20% et Sulfanilamide à 5% - HCl 20% donnant aux nitrites une coloration rose plus ou moins intense.

RESULTATS

Dans le cadre de cette étude, le dosage de NO (sous forme de nitrites) a montré la présence de ce radical dans les sérums de patients atteints d'hydatidose (kyste hydatique cliniquement et sérologiquement confirmé). Les résultats obtenus révèlent une différence significative entre les taux de NO observés pour les patients (94,08 μM) et ceux des donneurs sains (34,23 μM) (Fig.2). Cette différence supérieure au double en moyenne confirme la distinction observée dans le profil des porteurs de kyste hydatique et celui des contrôles.

Ces derniers correspondent respectivement aux intervalles de [14-325 μM] et [13-69 μM]. En effet, les maxima peuvent atteindre des taux en nitrites jusqu'à 05 fois plus élevés que ceux des contrôles.

Les cas de récurrences sont relativement fréquents et leurs teneurs en nitrites sériques (21,22 $\mu\text{M} \pm 5,07$) demeurent inférieures à celles des donneurs sains (34,23 $\mu\text{M} \pm 5,5$). Les intervalles observés pour ces deux

catégories (respectivement de [14-86 μM] et [13-69 μM]) suggèrent que l'état de récurrence semble conférer aux patients un profil en nitrites proche de celui des donneurs sains et surtout bien en deçà de celui des patients contractant pour la première fois cette pathologie (4,4 fois supérieur). Ces résultats semblent impliquer une relation entre le statut clinique et la production de NO.

Les résultats de ce dosage, considérés selon la localisation du kyste, révèlent que les sérums de patients porteurs de kystes hépatiques (siège préférentiel de l'hydatide) prédominent tant par leur fréquence (57 %) que par leurs teneurs élevées en nitrites sériques (129,4 $\mu\text{M} \pm 68,3$; n = 42). Le taux sérique en monoxyde d'azote des patients atteints de kyste hépatique de la population étudiée est respectivement 2,3 fois supérieure à ceux des porteurs de kyste pulmonaire et de plus de 03 fois supérieure aux cas de localisation rare ou secondaire. En effet, les localisations pulmonaires arrivent en seconde position constituant 20 % des sérums de patients avec une teneur moyenne en nitrites de 57 $\pm 20,2$ μM . Ces valeurs demeurent toutefois élevées (09 – 102 μM) par comparaison aux valeurs obtenues pour les donneurs sains.

De plus, nous avons eu l'opportunité d'obtenir plusieurs localisations secondaires ou rares (rein, rate, péritoine, os, muscle, pancréas, trachée, estomac et cerveau). Cet

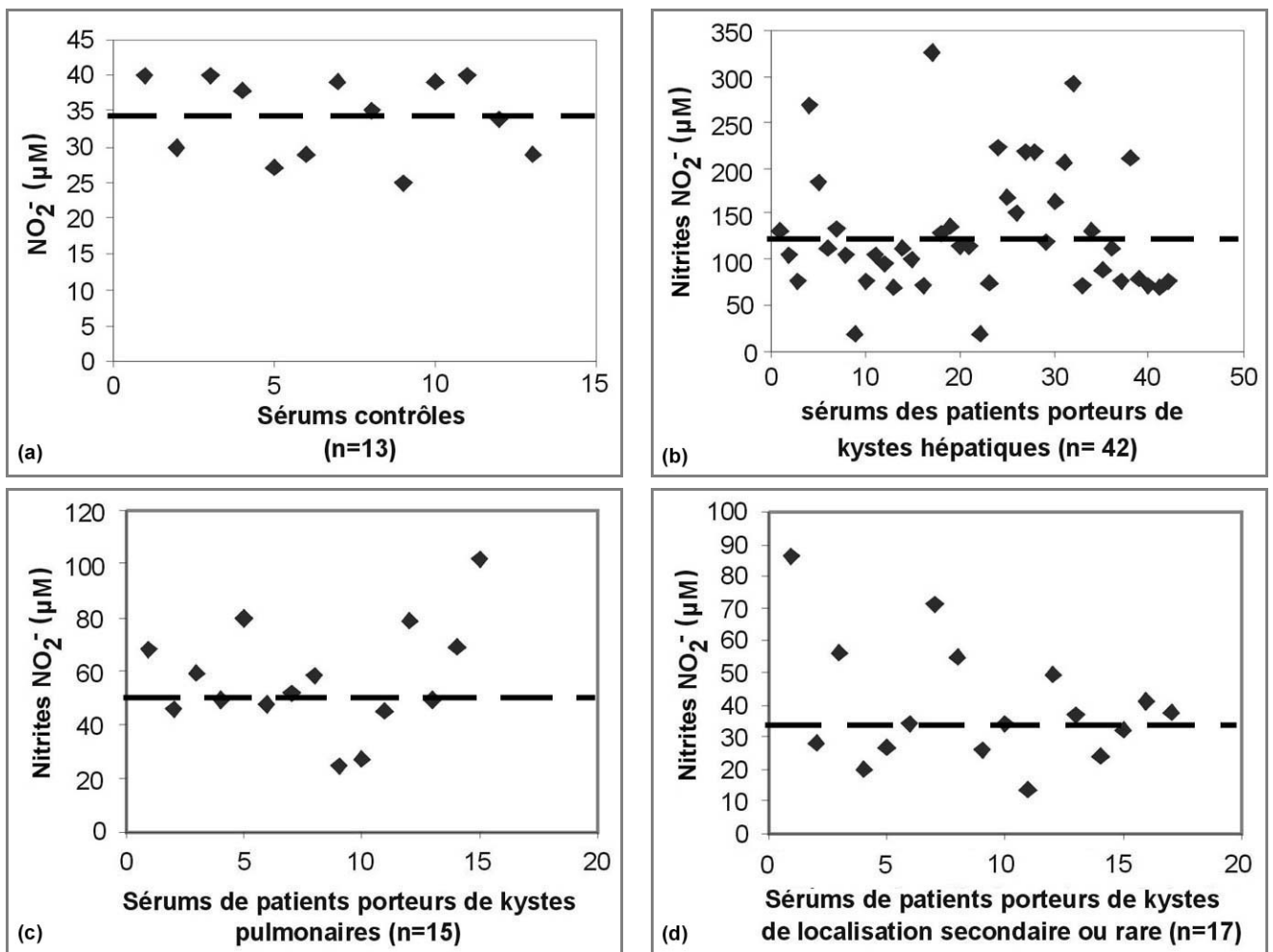


Figure 2: Résultats du dosage in vivo de nitrites (μM) dans les sérums de patients atteints d'hydatidose (n= 74). — — Médiane.

échantillonnage (n = 17) constitue 23 % de la population de patients considérée. Les teneurs en nitrites observées pour ces sérums ($14-86 \mu\text{M}$; $39,52 \mu\text{M} \pm 18,7$) sont, de façon globale, supérieures à celles observées chez les donneurs sains mais inférieures à celles des localisations hépatiques mais également pulmonaires ($57 \mu\text{M} \pm 20,2$). L'ensemble de ces résultats suggère une relation entre la localisation kystique et les teneurs en nitrites totaux (Fig. 3, Tab. 1). Parmi ces localisations rares ou secondaires, deux atteintes ont particulièrement attiré notre attention, le rein et la rate.

Tableau 1: Teneurs sériques en nitrites (μM) selon le statut clinique et la localisation kystique des patients.

Sérums	Population	Moyenne
Contrôle	n=13	34,23 +/- 5,5
Récidives	n=05	21,22 +/- 5,07
2 ^{cd} ou rares	n=17	39,52 +/- 18,7
Pulmonaires	n=15	57 +/- 20,2
Hépatiques	n=42	129,4 +/- 68,3

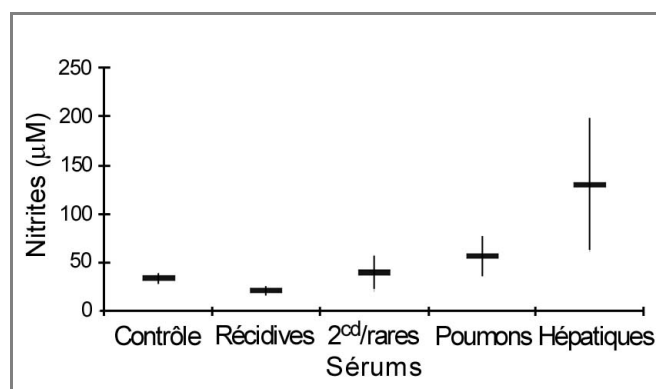


Figure 3: Teneurs sériques en nitrites (μM) selon le statut clinique et la localisation kystique des patients.

La localisation la plus fréquente de cet échantillonnage est le rein. Nous relevons 06 cas de patients atteints de kystes rénaux dont un est associé à un kyste au niveau du muscle. Les teneurs en nitrites sériques sont variables allant de 20 à $71 \mu\text{M}$.

Trois cas spléniques ont également été relevés. Cette localisation constitue, selon Nozais *et al.* [13], près de 4 % des cas, atteignant jusqu'à 8 % en Algérie. Les valeurs observées sont faibles ($14-26 \mu\text{M}$). Un seul de ces cas est lié à un kyste uniloculaire primitif ($26 \mu\text{M}$). Les localisations médiastinale, intra-abdominale et extra-hépatique (trachées, pancréas, estomac, péritoine) présentent des valeurs proches de celles observées pour les témoins ou les cas de récurrence. Ces cas sont le fait d'échinococcoses secondaires de découverte opératoire issues de la fissuration ou de l'ouverture d'un kyste. Concernant la localisation cérébrale ($24 \mu\text{M}$), il s'agit d'une atteinte crânienne proche de la localisation osseuse.

Par ailleurs, la présence observée au sein même de l'hydatide du monoxyde d'azote (11 liquides hydatiques testés) ($53,7 \mu\text{M}$ en moyenne) suggère un lien entre ce produit de l'induction des cytokines avec le degré d'antigénicité de l'hydatide. En effet, il semble exister une

relation directe entre la fertilité évaluée à la fois selon l'évaluation qualitative et quantitative du nombre de protoscolex et des résultats immunoelectrophorétiques.

La localisation du kyste semble également impliquée dans la mesure ou les teneurs en nitrites des localisations hépatiques ($60,31 \mu\text{M}$) sont 1,34 fois supérieure en moyenne à celles des localisations pulmonaires ($45,14 \mu\text{M}$). Ces résultats n'excluent pas une éventuelle source *in situ* de ce radical, avoisinant le parasite, capable en théorie de diffuser de part et d'autre des membranes biologiques (Fig. 4).

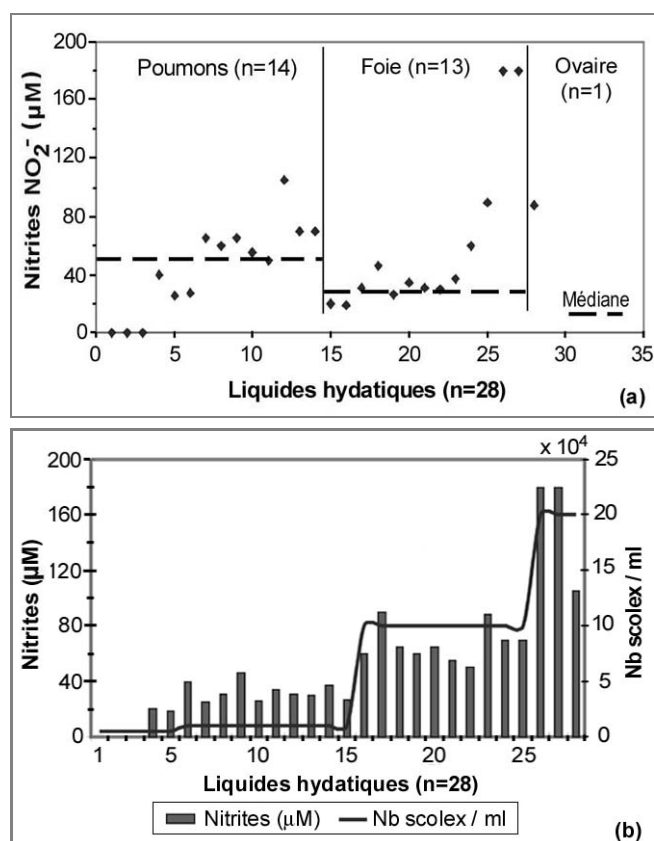


Figure 4: Teneurs en nitrites ($\text{NO}_2^- \mu\text{M}$) dans les liquides hydatiques de patients porteurs de kystes hydatiques (n=28):

(a) selon la localisation du kyste ;

(b) selon la fertilité du kyste. Les teneurs en nitrites augmentent proportionnellement au nombre de protoscolex. Ces derniers témoignent de la fertilité du kyste en plus des tests immunologiques réalisés sur les échantillons.

Au cours de la recherche de la NOS2 et préalablement à l'étude immunohistochimique, la nature échinococcique du kyste a été confirmée à l'examen histologique par coloration à l'Hématoxyline-Eosine des coupes réalisées sur les différents échantillons de patients. Cette étude préalable comprend la mise en évidence de la couche laminaire acellulaire avec ou sans couches germinative interne (Fig. 5) [14]. Nous avons également eu à constater la fertilité des kystes par la présence de scolex (Fig. 1).

Nous relevons une atrophie de la zone constituée par les hépatocytes avoisinant et la présence d'une bande scléreuse. En dehors de la zone péri-kystique, il y a globalement conservation de l'architecture hépatique (intégrité des cellules hépatocytaires et travées cellulaires

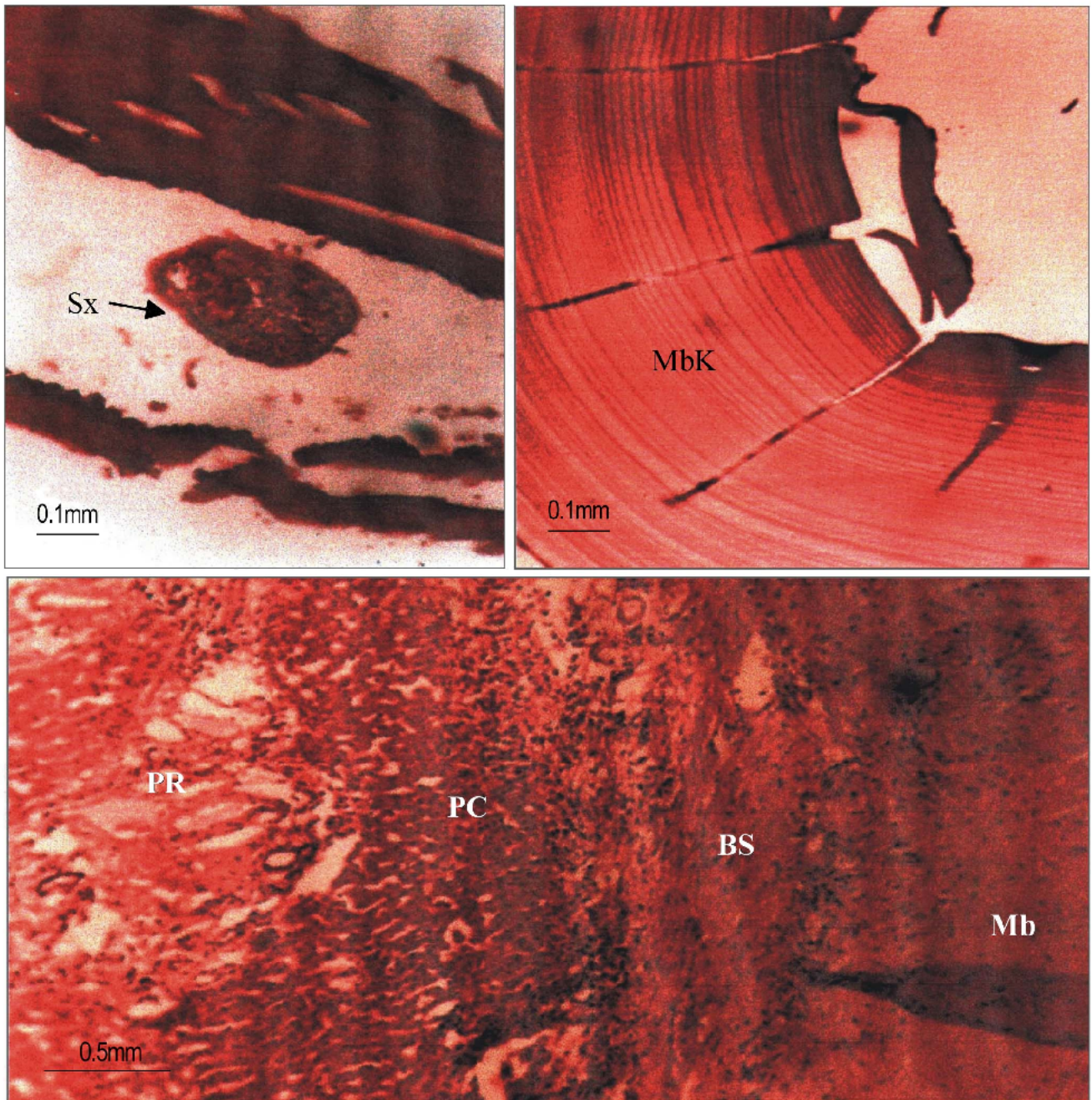


Figure 5: Aspects histologiques des biopsies hépatiques de patient en coupe transversale, coloration Hématoxiline-Eosine.

(a) Scolex (Sx).

(b) Membrane du kyste sous l'aspect d'une bande rouge homogène décomposées en fines couches lamellaires.

(c) Parenchyme hépatique péri-kystique.

PC : parenchyme hépatique conservé

PR : parenchyme hépatique remanié constituant une zone cicatricielle

BS : bande scléreuse

préservées). Toutefois, l'observation microscopique des différentes lames révèle des zones d'infiltrats inflammatoires cellulaires disséminés notamment au niveau des espaces portes. Entre les travées hépatocytaires, apparaissent des foyers de prolifération de cellules de küpffer hyperplasiées se présentant parfois sous forme de cellules épithéloïdes.

Dans les zones les plus remaniées mais également au niveau des zones les plus conservées, nous relevons des signes de nécrose en foyer. Il y a dégénérescence des hépatocytes, le cytoplasme est granuleux. De plus, la présence d'hépatocytes binucléés suggère une régénération du parenchyme hépatique. Les membranes se désagrègent et les noyaux sont de taille, de forme et de couleur

différentes, suggérant une altération de la chromatine, ils disparaissent par endroits. D'autres encore, présentent une pycnose.

Pour toutes les coupes testées en immuno-histochimie (biopsies périkystique ou à distance du kyste), on observe une réaction positive se traduisant par une granulation brune disséminée de façon régulière sans polarité particulière dans le cytoplasme des hépatocytes. Notons qu'il n'y a pas de granulations pigmentaires brunes dans les travées. La coloration est au niveau cytoplasmique (Fig. 6).

Une recherche attentive au niveau des *cellules de küpffer* et des cellules endothéliales, bien que fortement colorées, ne nous permet pas de conclure de façon nette sur leur positivité dans la mesure où leur noyau actif et volumineux empêche l'observation du cytoplasme avec clarté.

L'intensité de coloration par le DAB n'est pas homogène sur toute la lame, certaines zones sont plus foncées que d'autres laissant présumer une différence quantitative de la protéine recherchée. Les zones les plus remaniées notamment celles présentant des signes de nécrose (surtout échantillons périkystiques) présentent toutes une réaction positive décelable malgré un remaniement complet de l'architecture hépatique (Fig. 6).

DISCUSSION

Les titres en nitrites sériques obtenus sont élevés comparés à ceux observés dans d'autres types de pathologies. En effet, une étude portant sur des patients sujets au choc septique (qui constitue un cas extrême de forte production du NO) montre des teneurs sériques moindres (1-165 μM avec une moyenne de 25 μM pour les contrôles) [15]. De plus, une étude portant sur la production de NO sérique au cours de la maladie de Behcet rapporte des teneurs de $40,25 \pm 10,51 \mu\text{M}$ pour les patients et de $25,09 \pm 5,3$ pour les contrôles [16].

Les études ayant trait aux infections parasitaires semblent plus proches. Ainsi chez des sujets infectés par *Plasmodium falciparum*, Antsey *et al.* [9] rapportent des teneurs sériques en nitrites de 48,4 μM en moyenne pour les patients et de 30,8 μM en moyenne pour leurs témoins. Le développement à caractère extracellulaire du parasite *Echinococcus granulosus* est sans doute moins en cause dans la différence observée avec les parasitoses intracellulaires que l'activation probable de sources supplémentaires de NO. Les cas de polykystoses constitueraient un bon système d'étude pour l'évaluation de l'expression de la NOS inductible selon la charge antigénique.

Tous les cas de récurrence que nous avons relevés présentent de faibles taux de NO, inférieurs à ceux observés pour les contrôles. Ces résultats soulignent le rôle probable de la charge antigénique et du stade clinique du patient dans la production de NO.

La réduction marquée de ces cas récidivants serait liée à l'absence des agents inducteurs impliqués dans le signal d'activation de la NOSynthase2. Nos résultats sont en rapport avec ceux de Touil-Boukoffa *et al.* [17] qui associent aux cas de récurrence s une déplétion en CD4+. Notons que cette diminution de la production du NO

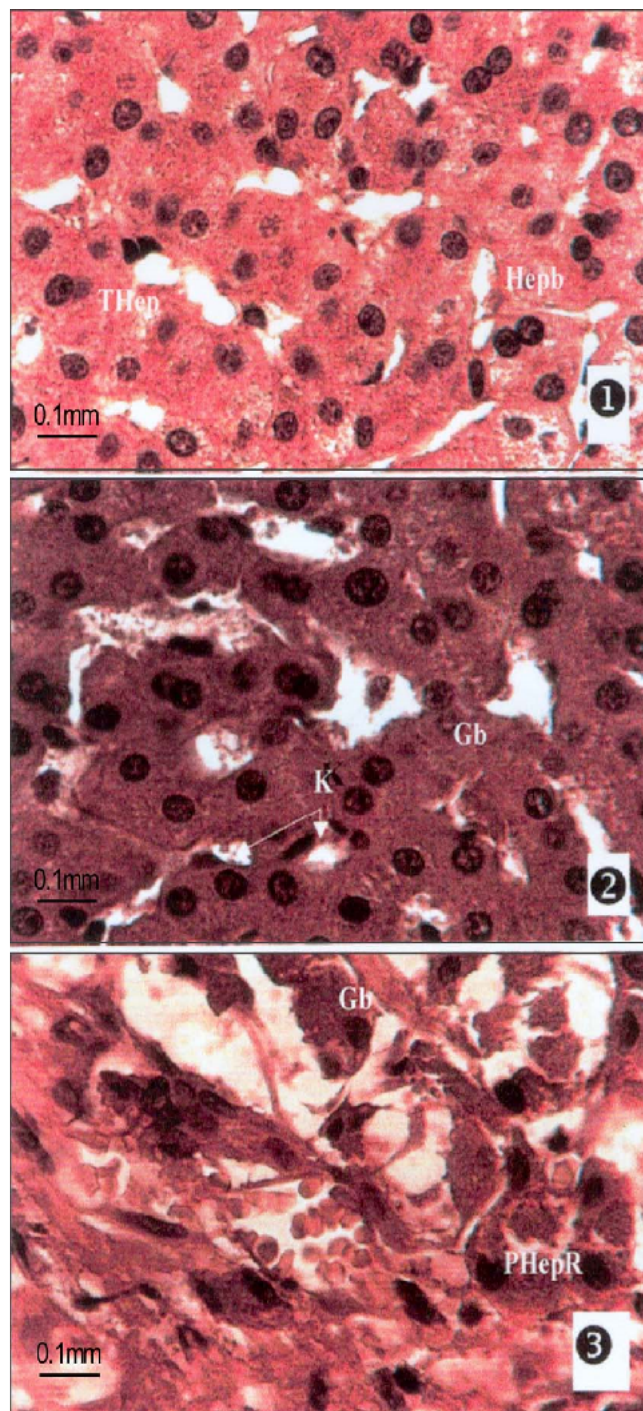


Figure 6: Test immunohistochimique réalisé sur biopsie hépatique, utilisant un anticorps anti-NOS2 et révélé par DAB. (1) Témoin négatif; (2) Test positif en zone conservée; (3) Test positif en zone périkystique remaniée. **Thep:** travée hépatocyttaire; **PHepR:** parenchyme hépatique remanié; **Hepbi:** hépatocyte binucléé; **K:** cellule de küpffer; **Gb:** granulation brune due au DAB.

constituerait, par sa valeur prédictive, un outil précieux d'orientation des cas chroniques.

La sérothèque que nous avons établie est relative à des patients porteurs de kystes de localisations diverses. Nous relevons que la localisation hépatique présente les taux de NO sériques les plus importants. Cette prédominance est

probablement liée d'une part au rôle de premier filtre du foie, d'autre part à la différence du degré de sensibilisation des cellules T ainsi qu'à l'activation des cellules sources pouvant exprimer l'enzyme NOS2 (hépatocytes, leucocytes) [1,18]. Par ailleurs, notons que cette localisation s'accompagne fréquemment d'une hyperéosinophilie sanguine pouvant contribuer à la hausse du taux de NO sérique [14,17]. Enfin, ces teneurs élevées sont également à associer à une latence clinique longue mais également à une grande tolérance fonctionnelle hépatique [19].

Les taux de nitrites de la localisation pulmonaire succèdent en importance à la localisation hépatique. Ces résultats seraient liés à l'hypothèse émise par Cesbron *et al.* [20] selon laquelle les kystes pulmonaires fourniraient des antigènes de moindre qualité et donc de moindre efficacité quant à leur pouvoir inducteur de la NOS2. Les kystes hépatiques seraient en revanche plus riches en protéines douées d'activité antigénique [17,20].

De plus, le poumon présente une faible tolérance à l'action compressive exercée par le kyste et la détection de la pathologie y est précoce. Cet état de fait contribue souvent à une réactivité immunologique de moindre intensité que celle observée pour les kystes hépatiques dont l'évolution est lente et silencieuse.

Les cas rares ou secondaires (rein, rate, péritoine, os, muscle, pancréas, trachée, estomac et cerveau) présentent les taux les plus faibles qui restent néanmoins supérieurs aux contrôles. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les organes concernés sont plus faiblement vascularisés et de ce fait moins enclins à recevoir une hydatide et à favoriser son développement. Cette notion d'accessibilité et surtout de possibilité d'échange et primordiale puisqu'elle est garante de la présence de l'effecteur antigénique et de l'intensité des stimuli occasionnés par le parasite ainsi que de la réponse de l'hôte.

Les valeurs observées peuvent constituer une amorce pour présager de l'incidence du type de tissu atteint et donc de ses caractéristiques physiologiques et structurales sur l'expression de la NOS2 au cours de l'hydatidose.

Ainsi, pour la localisation rénale, nous pensons que les teneurs les plus élevées (55-71 μM) sont associées à la présence de kystes multivésiculaires fréquents pour cette localisation. La valeur observée pour le cas du patient porteur de kystes rénal et musculaire (55 μM) nous conforte dans cette idée et ce d'autant plus que l'atteinte du muscle comme celle de la peau ne présenterait aucune particularité.

Les taux observés pour la localisation splénique sont très faibles (14 - 26 μM). Ce dernier cas est associé à une atteinte hépatique suggérant une récurrence du foie ayant occasionné par contiguïté ou par voie artérielle l'atteinte de la rate.

L'argumentation en faveur d'une relation entre la localisation kystique et la production de NO suscite la question des sources cellulaires exprimant la NOS2 impliquée dans la réponse anti-hydatique. Le niveau d'induction élevé du NO chez les porteurs de kystes hépatiques, nous a incité à rechercher la présence de la NOS2 au niveau des hépatocytes de ces patients.

L'étude immuno-histochimique portant sur des biopsies de patients a révélé, et ce pour la première fois, la présence de la NOS2 au niveau du cytoplasme des hépatocytes au cours de l'hydatidose. Nos résultats sont en relation avec ceux de Nussler *et al.* [21] rapportant une activité anti-parasitaire L-arginine dépendante des localisations hépatiques durant l'infection par la malaria. C'est en 1992 que ces mêmes auteurs ont montré la synthèse de NO dans les hépatocytes humains au cours de cette parasitose [18]. Ces résultats suggèrent que ces cellules pourraient directement répondre à l'infection parasitaire par l'expression de la NOS2. Mellouk *et al.* [22] relèvent, en effet, une activité anti-plasmodiale par la production de NO dans les hépatocytes murins et humains induite par le parasite lui-même.

Nous rapportons une présence importante de cette protéine au niveau des hépatocytes des zones les plus remaniées du parenchyme hépatique aux mieux conservées. Cette donnée n'est pas contradictoire dans la mesure où les hépatocytes comme les macrophages exhibent une grande tolérance vis à vis de la production de NO [19].

Concernant les signes de nécrose observés, de nombreux auteurs ont en effet montré que le NO produit à fortes doses pouvait déclencher la mort cellulaire par des phénomènes de nécrose mais également d'apoptose [23,24,25]. Ce phénomène serait à mettre en relation avec la présence de TNF α . En effet, Kolb *et al.* [26] rapportent que le TNF α pourrait potentialiser l'action de la NOS2 par le biais d'un élément de réponse TNF spécifique présent dans le gène promoteur de la NOS2 des hépatocytes.

La variation d'intensité de la coloration par le DAB selon les différents échantillons suggère une différence sur le plan quantitatif suscitant la question de la modulation de l'expression du gène codant pour la NOS2 au niveau des hépatocytes au cours de l'échinococcose humaine. Par ailleurs, nos observations confirment la nature cytosolique de la NOS2 au niveau des hépatocytes alors que le cytosol de ces cellules présenterait un déficit en BH4 nécessaire à l'activité de l'enzyme [4,19]. La tétrahydrobioptérine pourrait être impliquée dans cette différence d'expression de la NOS2.

La détection *in vivo* des nitrites totaux dans les liquides hydatiques montre l'implication du NO dans l'étroite interaction hôte parasite. Cette présence au sein même de l'hydatide, et plus particulièrement du liquide hydatique, suggère deux possibilités : soit que le NO aurait diffusé via la circulation jusqu'au travers des parois respectives élaborées par l'hôte et son parasite, soit qu'il existe une source de production supplémentaire de cette molécule *in situ* au voisinage du parasite.

Dans les deux cas, la fertilité des kystes et donc leur degré d'antigénicité ainsi que l'immunoréactivité du patient seraient à considérer dans l'expression de la NOS2.

La fertilité des kystes, évaluée notamment par la présence de scolex, impliquerait ces derniers dans la stimulation de la production du NO. En effet, des travaux antérieurs ont montré la capacité de l'antigène 5 obtenu à partir du liquide hydatique, à stimuler la production de NO; or, les protoscolex présentent également cette fraction antigénique. La détection de l'enzyme NOS2 au niveau des

hépatocytes semble étayer cette argumentation. L'évaluation de l'expression de la NOS2 au niveau des cellules de poumons porteurs de kyste hydatique pourrait apporter de plus amples informations sur l'importance de la production de NO par l'organe et plus précisément par le type de cellule affecté par le macroparasite.

Notons par ailleurs que les très faibles teneurs obtenues pour les liquides hydatiques non fertiles (03 cas sur 05 ou ce taux est nul) laissent supposer la possibilité de leur emploi en tant que témoin négatifs, facilitant l'exploitation des résultats relatifs au dosage du NO dans le liquide hydatique.

CONCLUSION

Cette étude montre l'implication du NO dans les mécanismes de défense contre *Echinococcus granulosus*, parasite à développement extracellulaire. La mise en évidence pour la première fois de la présence de la NOS2 dans le cytoplasme des hépatocytes de patients indique une source cellulaire de NO supplémentaire à celles préalablement décrites au cours de l'hydatidose [17,11]. L'observation originale et inattendue des teneurs en NO quantifiées dans les liquides hydatiques apporte un éclairage nouveau concernant le mécanisme d'intervention de la voie du NO dans l'étroite relation hôte-parasite. Enfin, nos résultats portant sur la production *in vivo* de NO indiquent que l'expression de la NOS2 est en rapport avec le stade clinique et la localisation kystique des patients. Ces données, compte tenu de leur valeur prédictive, pourraient contribuer à l'établissement d'un diagnostic précoce de cette infection, à l'appréhension de sa chronicité ainsi qu'au suivi thérapeutique des patients.

REFERENCES

- [1]- Touil-Boukoffa C., "Etude du système interféron et cytokines au cours de l'hydatidose humaine. Implication de l'IFN gamma, du TNF alpha, de l'IL-6 et du NO dans la réponse immunitaire anti-antigène 5", Thèse Doctorat es Sciences / Bioch. Immunopath, ISN- USTHB, (1998).
- [2]- Cardozo G., Tucci P. & Hernandez A., "Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from *Echinococcus granulosus* protoscolexes in patients with cystic hydatid disease", *Parasitology Research*, Vol. 88, 11, (2002), pp. 984 - 990
- [3]- Zhang W., Li J. & McManus D.P., "Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease", *Clinical Microbiology Reviews*, January 2003, Vol. 16, 1, (2003), pp. 18-36
- [4]- Sennequier N. & Vadon le Goff S., "Biosynthèse du monoxyde d'azote : mécanisme, régulation et contrôle", *Med. Sci.*, 14, (1998), pp. 1185-1195.
- [5]- Drapier J.C., "Monoxyde d'azote et macrophages", *Path. Biol.*, 45 (2), (1997), pp. 110-114.
- [6]- Dugas-Paul-Eugène N., Mossalayi D., Sarfati M., Yamaoka K., Aubry J.P., Bonnefoy J.Y., Dugas B. & Kolb J.P., "Evidence for a role of FCεRII / CD23 in the IL-4 induced NO production by mononuclear phagocytes", *Cellular Immunology*, 163, (1995), pp. 314-318.
- [7]- Vouldoukis I., Riveros-Moreno V., Dugas B., Ouaz F., Debré P., Moncada S. & Mossalayi D.M., "The killing *Leishmania* major by human macrophages is mediated by NO induced after ligation of the FCεRII/CD23 surface antigen", *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, 92, (1995), pp. 7804-7808.
- [8]- Nüssler A.K., Eling W. & Kremsner P.J., "Patients with *Plasmodium falciparum* malaria and *Plasmodium vivax* malaria show increased nitrite and nitrate plasma levels", *J. Infect. Dis.*, 169, (1994), pp. 18-19.
- [9]- Antsey N.M., Weinberg J.B., Hassalany M.Y., Mwaikambo E.D., Manyanga D., Mysukonis M.A., Arnelle R.D., Hottis D., Mc Donald M.L. & Granger D.L., "Nitric oxide in Tanzanian children Malaria : Inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production / NOS2 expression", *J. Exp. Med.*, 184, (1996), pp. 557-567.
- [10]- Bertholet S. & Muel J., "Human monohydrate U937 cells transfected with human hepatic inducible NOS exhibit leishmanicidal activity", *J. Leuc. Biol.*, 67, 1, (2000), pp. 34-39.
- [11]- Rigano R., Profumo E., Ioppolos S., Notargiacomo S., Teggi A. & Siracusano A., "Serum cytokine detection in the clinical follow-up of patients with cystic echinococcosis", *Clin. Exp. Immunol.*, 115 (3), (1998), pp. 503-507.
- [12]- Ischiropoulos H., Zhu L. & Beckman J., "Peroxynitrite formation from macrophage derived nitric oxide", *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, (1992), pp. 446-451.
- [13]- Nozais J.P., Detry A. & Danis M., *Traité de Parasitologie médicale*. Ed. Pradel, (1997).
- [14]- Rippert C., "Epidémiologie des maladies parasitaires-Helminthiases", Ed. Med. Int. 3ème Edition, Tome II, (1998), pp. 277-309.
- [15]- Groeneveld P.H.P., Kwappenberg K.M.C., Langermans J.A.M., Nibbering P.T. & Curtis L., "Relation between pro and anti-inflammatory cytokines and the production of NO in sever sepsis", *Cytokine*, Vol. 9, 2, (1997), pp. 131-142.
- [16]- Evereklioglu C., Turkoz Y., Er H., Inaloz H.S., Ozbek E. & Cekmen M., "Increased nitric oxide production in patients with Behcet's disease. Is it a new activity marker?", *J. Acad. Dermatol.*, 46, 1, (2002), pp. 50-54
- [17]- Touil-Boukoffa C., Bauvois B., Sanceau J., Hamrioui B. & Wietzerbin J., "Production of NO in human hydatidosis relationship between nitrite production and interferon gamma levels", *Biochimie*, 80, (1998), pp. 739-744.
- [18]- Zhang J. & Snyder H., "Nitric oxide in the nervous system", *Ann. Pharmacol. Toxicol.*, 35, (1995), pp. 213-233.
- [19]- Nüssler A.K., Berger H.G., Liew Z.Z. & Billiar T.R., "Nitric oxide, hepatocytes and inflammation", *63rd Forum of Immunology*, (1996), pp. 671-677.
- [20]- Cesbron J.Y. Capron M. & Capron A., "Le diagnostic de l'hydatidose humaine", *Gastro-Enterol. Clin. Biol.*, 10, (1986), pp. 415-418.
- [21]- Nüssler A.K., Drapier J.C., Renia L., Pied S., Miltgen S., Gentilini M. & Mazier D., "L-Arginine dependant destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumour necrosis factor and/or IL-6 stimulation", *Eur. J. Immunology*, 21, (1991), pp. 227-230.
- [22]- Mellouk S., Hoffman S.L., Liu Z.Z., De la Vega P., Billiar T.R. & Nussler A.K., "Nitric oxide mediated antiplasmodial activity in human and murine hepatocytes induced by IFN gamma and the parasite it-self : enhancement by exogenous tetrahydrobiopterine", *Infect. Immunol.*, 62, (1994), p. 4043.
- [23]- Kolb H. & Kolb-Bachofen V., "Nitric oxide in autoimmune disease, cytotoxic or regulatory mediator?" *Immunology Today*, Vol. 19, n°12, (1998), p. 556.
- [24]- Kolb J.P., "Mechanisms involved in the pro and anti-apoptotic role of NO in human leukemia", *Leukemia*, 14, 9, (2000), pp. 1685-1694.
- [25]- Wietzerbin J., "Interférons et cytokines : Rapport 2000", INSERM, Unité U365- Institut Curie, Paris, (2000).
- [26]- Kolb J.P., Paul-Eugène-Dugas N., Yamaoka K., Mossalayi M.D. & Dugas B., "Role of CD23 in NO production by human monocytic cells", *63rd Forum in Immunology*, (1996), pp. 684-688. □

