

Etude de la balance Th1 / Th2 au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en Tunisie.

S. FEKI*,
Z. BEN REGAYA*,
T. BEN CHAABANE**,
K. BOUKEF*,
F. JENHANI*.

Résumé : Les prélèvements sanguins d'un échantillon de la population tunisienne saine ont été analysés en numération des cellules T (T totales, T CD4+ et T CD8+), B et NK, ainsi qu'en production intracytoplasmique de trois cytokines : interféron- γ , interleukine-2 et interleukine-4, ce qui a permis d'établir les valeurs normales tunisiennes pour tous ces paramètres. Parallèlement, les prélèvements sanguins de patients vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine ont également été analysés pour ces paramètres, montrant l'existence de dysrégulations au niveau de ces trois cytokines, dysrégulations étroitement intriquées avec celles constatées au niveau de la numération des cellules T, B et NK et qui, de plus, semblent associées à la progression de la maladie à VIH.

Mots clés : lymphocytes - cytokines - VIH - cytométrie en flux

Abstract : Blood samples from tunisian healthy donors were analysed in cell enumeration regarding T cells (total, CD4+ and CD8+ T cells), B cells and NK cells, and in intra-cytoplasmic production of three cytokines: interferon- γ , interleukin-2 and interleukin-4, which allowed us to establish the tunisian normal ranges for all these parameters. In parallel, blood samples from patients living with the human immunodeficiency virus were even analysed for these parameters, showing the existence of some dysregulations in these three cytokines, dysregulations that were highly associated with those in T, B and NK cell enumeration and, in addition, that seemed to play a role in the progression of HIV disease.

Keywords : lymphocytes - cytokines - HIV - flow cytometry.

* Laboratoire d'Immunologie Cellulaire ; Centre National de Transfusion Sanguine, Tunis, Tunisie.

** Service Infectieux ; Hopital La Rabta, Tunis, Tunisie.

Introduction

Les cellules Th1 et Th2 peuvent être définies comme étant des formes polarisées de réponses immunitaires qui, non seulement représentent un modèle utile pour la compréhension de la pathogenèse de plusieurs maladies, mais également pourraient fournir les bases pour le développement de stratégies d'immunothérapie (1).

Vers le début des années 1990, il a été proposé que, chez les personnes infectées par le VIH, la diminution progressive des réactions d'hypersensibilité retardée et de la sécrétion de cytokines de type Th1 (telles que l'interleukine 2) soit due à l'orientation, par le virus, de la réponse immune vers une réponse de type Th2 impropre à contrôler la réplication virale (2, 3, 4).

Cependant, par la suite, les résultats des différents travaux à ce sujet étaient contradictoires, certains prouvant la véracité de cette hypothèse (5), d'autres ne lui trouvant aucun fondement (6, 7). De plus, parmi les travaux infirmant la thèse d'un « switch » Th1 vers Th2, la majorité ont trouvé une diminution de production d'IL-2 avec une augmentation de production d'INF- γ , associés à une production d'IL-4 qui était inchangée pour certains (6, 7, 8), diminuée au stade clinique A du CDC (Center for Disease Control) pour d'autres (9), et augmentée aux stades A et B pour d'autres encore (5). Il est donc évident que les avis demeurent encore, à ce jour, plutôt controversés. Toutefois, une chose est certaine, c'est que les cellules Th1 classiques produisent de l'INF- γ qui

possède des effets antiviraux (10, 11).

Le but de ce travail a été d'explorer la balance Th1 / Th2 dans une population d'individus tunisiens séropositifs pour le VIH et ce, à travers l'étude de la production intra cytoplasmique, par différentes catégories de cellules T, de deux cytokines Th1 (Interféron- γ et interleukine-2) et d'une cytokine Th2 (interleukine-4).

Matériel et méthodes

Patients

Les prélèvements sanguins de 26 individus vivant avec le VIH nous ont été adressés en 1999 par le service des maladies infectieuses de l'hôpital La Rabta. Ces patients séropositifs pour le VIH avaient un nombre de cellules T CD4+ compris entre 13 et 547 / μ l (moyenne = 215 / μ l). Parmi eux, 5 étaient asymptomatiques (stade clinique A), 6 étaient symptomatiques (stade clinique B) et 15 présentaient une condition définissant le stade SIDA (stade clinique C). 13 patients seulement prenaient un traitement antirétroviral (trithérapie) au moment de notre étude.

Notre deuxième population d'étude était constituée de 30 donneurs de sang volontaires, séronégatifs pour le VIH et en bonne santé, provenant tous du Centre National de Transfusion Sanguine. Tous les tests effectués pour les patients séropositifs pour le VIH, étaient également appliqués pour les donneurs normaux.

Réactifs

Le PMA, l'ionomycine et la bréfeldine A nous ont été fournis par Sigma. La solution de perméabilisation FACS *Permeabilising solution*TM et la solution de lyse des hématies *FACS Lysing solution*TM nous ont été fournies par Becton Dickinson. Le milieu CYTO-SF1 avec de la L-glutamine provient de KEMP-Biotechnologies, INC. Les anticorps monoclonaux (Acm) nous ont été fournis par Becton Dickinson (CD3-PerCP, anti INF γ -FITC humain, anti IL4-PE humain et contrôle isotypique Acm de souris IgG1-PE / IgG2a- FITC, TriTEST (CD3/CD4/CD45, CD3 / CD8 / CD45, CD3/CD19/CD45 et CD3/CD16+CD56/CD45), Immunotech (CD4-FITC, CD8-PE), Dako (CD3-FITC, CD45RO-PE) et Immuno-Quality Products (anti INF γ -PE humain, anti IL2-PE humain).

Traitement du sang

a) Détermination des cytokines intra cytoplasmiques

Les prélèvements sanguins d'individus séronégatifs et séropositifs pour le VIH ont été réalisés dans des tubes héparinés. La détermination de la production de cytokines par les sous-classes de lymphocytes T était basée sur la stimulation des cellules T par le couple PMA/Ionomycine, en présence de bréfeldine A qui inhibe le transport intracellulaire (13) de telle sorte que les cytokines produites, pendant l'activation, soient retenues à l'intérieur des cellules et donc, après fixation puis perméabilisation, puissent être révélées par un marquage intra cytoplasmique (14).

500 μ l de sang étaient mélangés à 500 μ l de milieu CYTO-SF1 dans des tubes de culture cellulaire, puis incubés avec de la bréfeldine A (10 μ g / ml), en présence (pour les tubes stimulés : tube «contrôle» et tube «test») ou en absence (pour le tube non stimulé) de PMA (25 ng / ml) et d'ionomycine (1 μ g / ml), pendant 4 heures à 37°C, dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂. Un volume de 100 μ l de sang ainsi traité était alors marqué par un anticorps monoclonal de surface (CD3, CD4, CD8 ou CD45RO), à température ambiante et pendant 15 minutes. Par la suite, les érythrocytes étaient lysés pendant 15 minutes et à température ambiante, avec 2 ml de *FACS Lysing Solution*[®], puis centrifugés (toutes les centrifugations étaient conduites à 500g, c'est-à-dire environ 1750 tr / mn pour notre centrifugeuse, pendant 5 mn et à température ambiante). Les leucocytes étaient alors perméabilisés par 500 μ l de *FACS Permeabilising Solution*[®] pendant 10 mn et à température ambiante. Après centrifugation, les cellules étaient incubées avec un ou deux anticorps monoclonaux anti-cytokine (pour le tube non stimulé et le tube stimulé «test») ou avec un ou deux anticorps contrôles isotypiques pour le tube stimulé «contrôle», pendant 30 mn, à l'obscurité et à température ambiante. Après un lavage au PBS-BSA 0.5%, les cellules étaient fixées dans 250 μ l de paraformaldéhyde à 1%.

Un total de 100 000 événements ont été acquis grâce au logiciel *CellQUEST*[™] (BD Biosciences).

Stratégie de fenêtrage

Nous avons utilisé une méthode de cytométrie en flux en trois couleurs pour étudier la production in vivo de cytokines par la méthode «cellule par cellule». Il a été auparavant établi que, lorsqu'elles étaient stimulées, les cellules synthétisant des cytokines entraînent dans un cycle de blastogénèse qui pouvait se traduire par un forward scatter et un side scatter augmentés (15). En fait (figure 1), pour les échantillons normaux non stimulés, lorsque la fenêtre était placée sur les cellules CD3+ totales (side scatter bas et élevé) (figure 1b), les pourcentages moyens de cellules productrices de cytokine étaient approximativement 20 fois plus élevés que lorsqu'elle était placée sur les cellules CD3+ à bas side scatter uniquement (figure 1a). Etant donné que notre but était d'évaluer les cellules réelles produisant des cytokines, nous avons choisi, au cours de toute cette étude, d'effectuer notre fenêtrage sur l'ensemble des cellules CD3+, c'est-à-dire avec une granularité (side scatter) faible et élevée. Ceci est important à souligner car cela explique les pourcentages élevés de cellules productrices de cytokine sans avoir été stimulées par le couple PMA/ionomycine, et qui - à notre surprise - présentaient, dans certains cas, une différence significative entre les donneurs de sang normaux et les patients infectés par le VIH.

Tests statistiques

Nous avons utilisé la méthode de comparaison de deux moyennes observées sur de petits échantillons (inférieurs à 30), basée sur le test de Student.

b) Numération des populations lymphocytaires T, B et NK en valeur absolue

Des aliquots de sang sont marqués selon la technique de «lyse sans lavage», par un panel de réactifs *TriTEST*[®] (CD3/CD19/CD45 et CD3/CD16+CD56/CD45), utilisant des tubes *TruCount Absolute Count*[®] (BD Biosciences) pour la numération des trois populations lymphocytaires T, B et NK en valeur absolue. Une numération des cellules T CD4+ et T CD8+ a été menée en parallèle, avec également des réactifs *TriTEST*[®] (CD3/CD4/CD45 et CD3/ CD8/ CD45) et des tubes *TruCount Absolute Count*[®] (BD Biosciences). Les données sont collectées grâce à un cytomètre en flux (FacsCalibur, BD Biosciences) utilisant le logiciel *MultiSet*[®] (BD Biosciences).

Tests statistiques

Nous avons utilisé la méthode de comparaison de deux moyennes observées sur de grands échantillons (supérieurs à 30), basée sur l'écart réduit ϵ .

Résultats

1) Production de cytokines chez les sujets VIH+ par rapport aux sujets sains

a) Production par les cellules T totales :

Au départ, nous avons examiné la production d'INF- γ (interferon- γ), d'IL-2 (interleukine-2), et d'IL-4 (interleukine-4) par les cellules T totales (cellules CD3+ avec side scatter bas et élevé), dans les tubes stimulés et non stimulés (Tableau I). Dans les échantillons stimulés, il y a une augmentation du pourcentage de cellules productrices d'INF- γ dans le groupe des patients VIH+

Tableau I : Pourcentages moyens de cellules T productrices d'INF γ , d'IL-2 et d'IL-4.

	Cellules CD3+ INF γ +			Cellules CD3+ IL-2+			Cellules CD3+ IL-4+		
	NS	S	E	NS	S	E	NS	S	E
Contrôles	8.47%	59.7%	8,31	2.41%	35.7%	10,8	0.289%	2.76%	2,45
Patients	12.2%	69.0%	10,6	2.27%	14.7%	6,27	0.246%	2.11%	2,36
p	p<0.05	p<0.02	-	NS	p<0.001	-	NS	NS	-

NS : Non stimulés ; S : Stimulés ; E : Ecart-type pour les stimulés

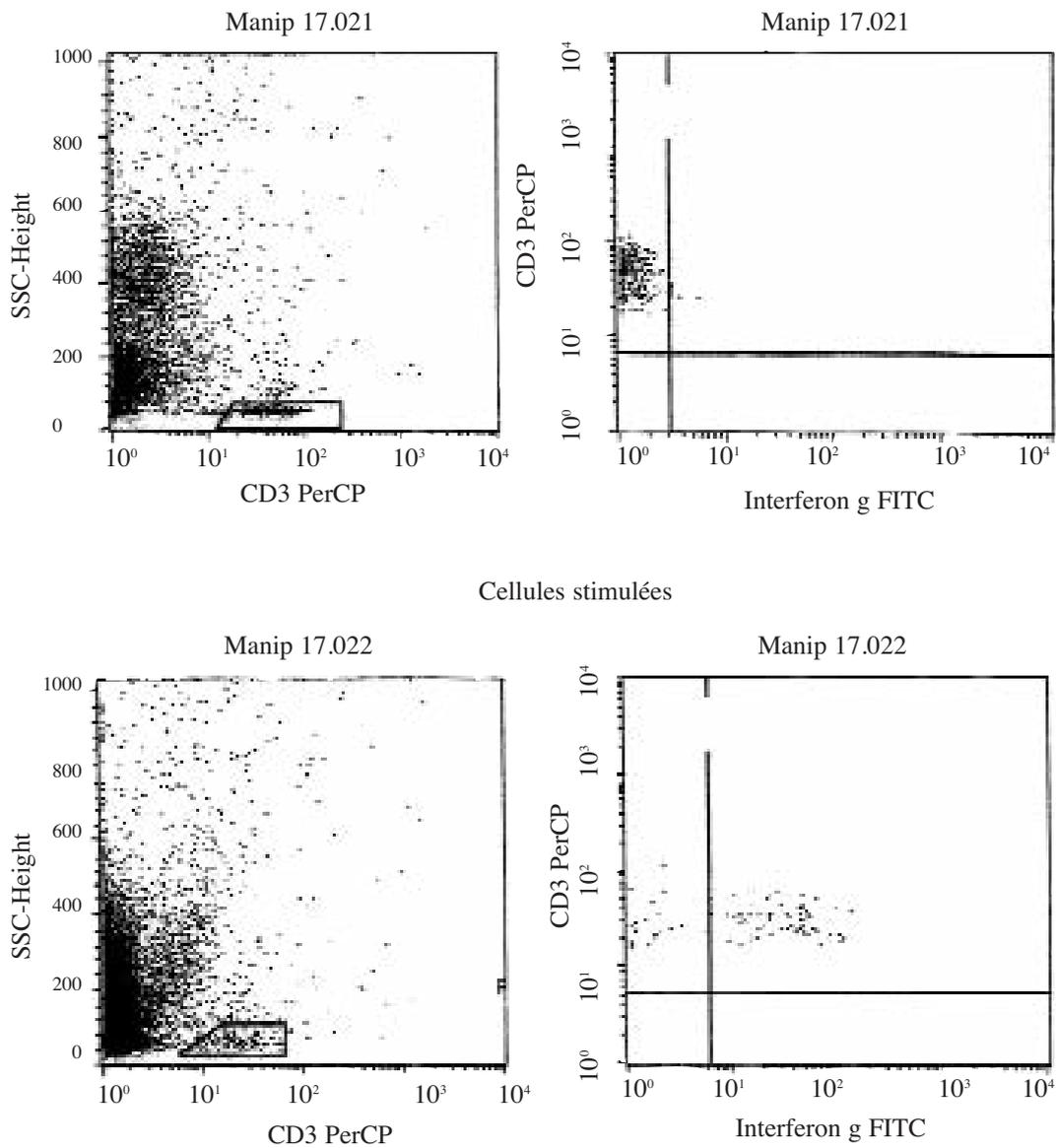


Figure 1 : Stratégie de fenêtrage pour la détection intracellulaire des cytokines

Figure 1a : Fenêtrage sur les cellules T avec un side scatter bas

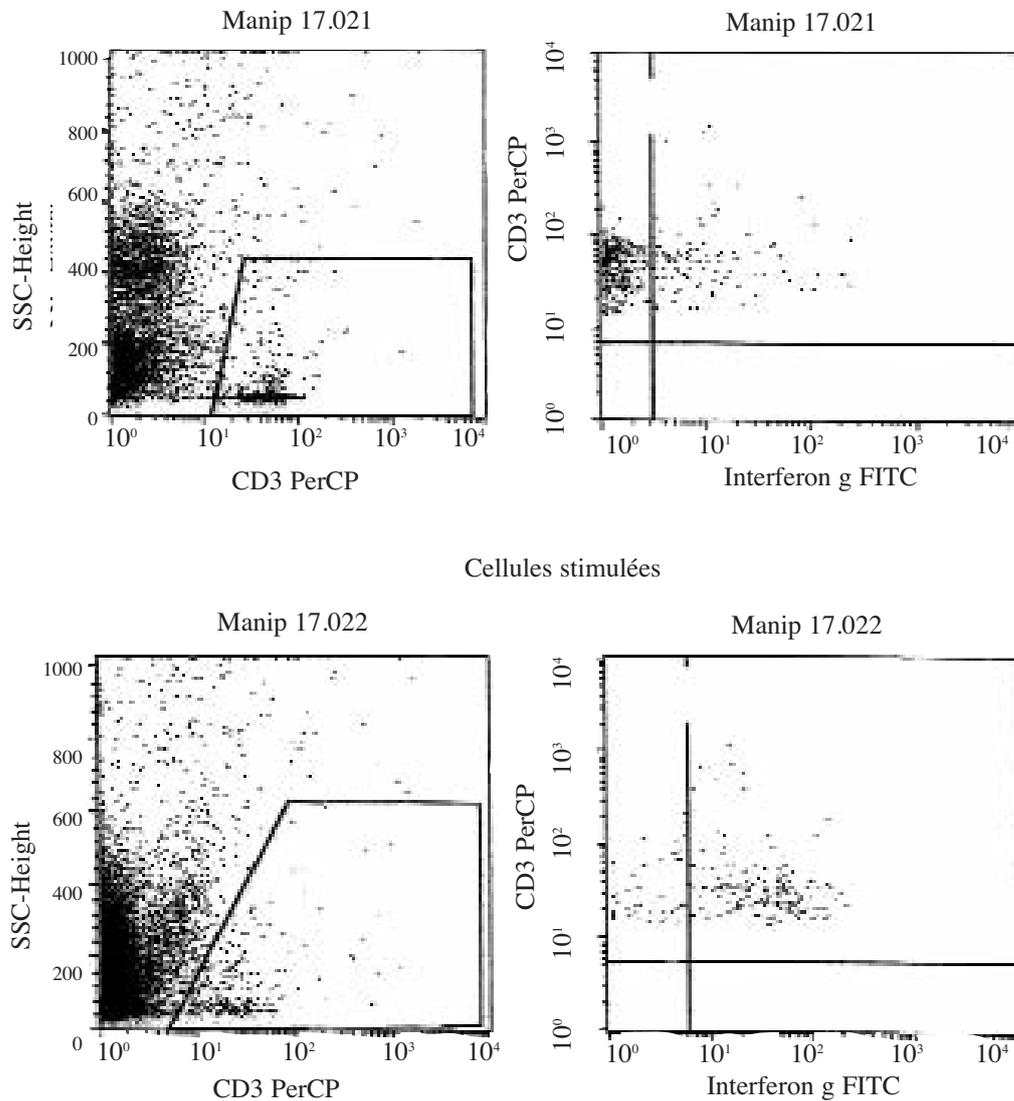


Figure 1b : Fenêtrage sur les cellules T avec un side scatter bas et élevé

($p < 0.02$), alors que le pourcentage de cellules productrices d'IL-2 est dramatiquement diminué ($p < 0.001$), en comparaison avec le groupe des donneurs normaux. Le pourcentage de cellules productrices d'IL-4 est légèrement diminué dans le groupe VIH+, mais pas de manière significative (p voisin de 0.3).

Dans les échantillons non stimulés, il y a une augmentation significative du pourcentage de cellules productrices d'INF- γ dans le groupe des patients VIH+ ($p < 0.05$) ; les pourcentages de cellules T non stimulées productrices d'IL-2 et d'IL-4 sont faiblement réduits chez les patients VIH+ par rapport aux donneurs normaux, mais sans atteindre une signification statistique.

b) Production par les sous-populations de cellules T :

L'analyse des sous-populations lymphocytaires parmi les cellules CD3+ stimulées (tableau II) montre également une augmentation significative du pourcentage de production d'INF- γ par les cellules CD3+CD4+ ($p < 0.001$) et les cellules CD3+CD8+ ($p < 0.01$) chez les

VIH séropositifs par rapport au groupe des donneurs normaux. De plus, le pourcentage des cellules CD3+ CD45RO+ productrices d'INF- γ (cellules T à mémoire) était également significativement augmenté ($p < 0.001$) chez les VIH séropositifs par rapport au groupe des donneurs normaux.

2) Production de cytokines en fonction de l'évolution de la maladie à VIH

Le profil de production cytokinique était également variable en fonction des stades clinico-biologiques de l'infection par le VIH (tableau III). En fait, le pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ n'était pas modifié durant les deux premiers stades cliniques (A et B) et significativement augmenté au stade C ($p < 0.01$). Pour ce qui est de l'IL-2, le pourcentage de cellules qui la produisent amorcent une baisse dès le stade A, puis continuent à baisser au stade B et encore plus au stade C. Enfin, pour l'IL-4, la situation est un peu plus délicate à analyser en raison des mauvais clones d'anticorps anti-

Tableau II : Pourcentages moyens des sous-populations de cellules T stimulées productrices d'INF γ

	CD3+ INF γ +	E	CD3+ CD4+ INF γ +	E	CD3+ CD8+ INF γ +	E	CD3+ CD45RO+ INF γ +	E
Contrôles	59.7%	8,31	18.4%	4,92	62.9%	15,4	55.0%	6,90
Patients	69.0%	13,4	37.6%	9,63	84.4%	12,1	79.8%	9,72
p	$p < 0.02$	-	$p < 0.001$	-	$p < 0.01$	-	$p < 0.001$	-

E : Ecart-type

Tableau III : Pourcentages moyens de cellules T productrices de cytokines en fonction du stade clinico-biologique de l'infection par le VIH.

Cellules	Stade A			Stade B			Stade C		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
CD3+ INF γ +	52.4%	64.3%	89.1%	50.6%	-	67.0%	-	68.2%	72.3%
	62.5%			58.8%			70.3%		
CD3+ IL-2+	-	20.2%	-	14.3%	15.4%	12.6%	-	22.9%	11.9%
	20.2%			14.4%			13.7%		
CD3+ IL-4+	0.79%	1.54%	-	1.54%	1.59%	1.71%	-	0.62%	3.19%
	1.04%			1.62%			2.93%		
CD3+ CD45RO+ INF γ +	67%	68%	93%	-	-	-	-	81%	82.3%
	76%			-			82%		

IL-4 existants actuellement et qui donnent des résultats très faibles. Mais il n'en demeure pas moins que nous avons réussi à déceler une diminution très précoce, dès le stade A1, des pourcentages de cellules productrices d'IL-4, pourcentages qui, cependant, se mettent à revenir à la normale progressivement, c'est-à-dire au fur et à mesure que l'on avance dans les stades cliniques et biologiques, devenant même légèrement supérieurs à la normale au stade final (C3) de l'infection. Toutes ces variations subtiles dans la production de l'IL-4 ne sont toutefois pas significatives (p entre 0.2 et 0.3) ; ceci peut être dû à l'effectif réduit à l'intérieur de chaque stade clinico-biologique ou à une variation réellement faible dans la production de cette cytokine.

En ce qui concerne les cellules T «mémoire» (CD3+CD45RO+) productrices d'INF- γ , leur pourcentage est significativement supérieur à la normale dès le stade A, et continue à augmenter en fonction des stades clinico-biologiques.

3) Numération des populations lymphocytaires T, B et NK

Les résultats des sous-populations lymphocytaires T, B et NK en valeur absolue, dans la population saine et la population VIH+, sont présentés dans les tableaux IV, V et VI ;

Tableau IV : Valeurs absolues moyennes des cellules T, B et NK dans les populations saine et VIH positive

Populations cellulaires	Individus sains			Individus VIH+			α
	Moyenne	Ecart-type	Min-max	Moyenne	Ecart-type	Min-max	
T	1433	434	618-2639	1142	898	70-4946	0.05
B	261	125	55-763	121	97.5	6-359	< 10 ⁻⁸
NK	252	137	58-652	103	99.0	13-535	< 10 ⁻⁸

Tableau V : Variations des valeurs absolues cellulaires en fonction du stade clinique de l'infection par le VIH

Stade clinique	T	B	NK	TCD4+	TCD8+	Effectif
Normaux	1433	261	252	799	470	46
A	1522	206	225	406	1003	3
B	1212	157	121	281	891	17
C	1040	84	73	143	926	23

Discussion

Nous avons enregistré (Tableau I) une augmentation du pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ dans le groupe des patients VIH+ (p<0.02), alors que le pourcentage de cellules productrices d'IL-2 était, au contraire, fortement diminué (p<0.001), en comparaison avec le groupe des donneurs normaux. Le pourcentage de cellules productrices d'IL-4 était légèrement diminué dans le groupe VIH+, mais pas de manière significative (p voisin de 0.3). Tout ceci est en accord avec les travaux de la littérature (6, 7, 8) qui infirment l'hypothèse du «switch» Th1 vers Th2 (6, 7) énoncée par Clerici et al (2, 3, 4) et confirmée par certains (5). Par ailleurs et en accord avec Sousa et al (9), nous avons noté une diminution du pourcentage de cellules T productrices d'IL-4 au stade clinique A de la maladie.

L'augmentation, chez les malades par rapport au groupe des donneurs normaux, du pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ concernait aussi bien les cellules T CD4+ (p<0.001), que les cellules T CD8+ (p<0.01) et les cellules T «à mémoire» CD3+CD45RO+ (p<0.001) (Tableau II). La comparaison entre la production de cytokines et la numération des différentes populations lymphocytaires T, B et NK a montré l'existence de corrélations significa-

Tableau VI : Variations des valeurs absolues cellulaires en fonction du stade biologique de l'infection par le VIH

Stade biologique	TCD4+	T	B	NK	TCD8+	Effectif
Normaux	799	1433	261	252	470	46
1	CD4>500	1804	211	122	1244	8
2	200<CD4<500	1278	154	117	1063	12
3	CD4<200	840	73	89	728	23

tives entre l'augmentation du pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ d'une part, et de l'autre côté la diminution du nombre de cellules T CD4+ ($\alpha < 0.001$), la variation des cellules T CD8+ ($\alpha < 0.001$), et la diminution du nombre de cellules B ($\alpha \approx 0.05$) d'autre part ; aucune corrélation n'a été trouvée, cependant, avec le nombre de cellules NK. Aucune corrélation n'a été trouvée, non plus, entre la variation du pourcentage de cellules T productrices d'IL-2 et d'IL-4 et la numération des différentes populations lymphocytaires T, B et NK, bien que des séries avec des effectifs plus grands soient nécessaires pour se prononcer complètement. En ce qui concerne la production d'INF- γ par les sous-populations de cellules T, une corrélation négative a seulement été trouvée entre le pourcentage de cellules T CD4+ productrices d'INF- γ et le nombre de cellules T CD4+, et entre le pourcentage de cellules T CD8+ productrices d'INF- γ et le nombre de cellules T CD8+. Ces dernières corrélations sont faiblement significatives et il faudrait augmenter le nombre d'échantillons pour pouvoir se prononcer.

Des corrélations significatives ont également été trouvées à l'intérieur des différents stades clinico-biologiques, entre la production cytokinique et la numération des cellules T, B et NK. En effet, à l'intérieur du stade clinique A (tableaux III et V) ainsi qu'à l'intérieur du stade biologique 1 (tableaux III et VI), une corrélation significative a été trouvée entre le pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ et le nombre de cellules T ($\alpha < 0.05$). Or, l'augmentation du nombre de cellules T, au premier stade de la maladie, est due uniquement aux cellules T CD8+ (tableaux V et VI). Cela implique donc que la principale source d'INF- γ chez le patient infecté par le VIH, au premier stade de sa maladie, consiste en

les lymphocytes T CD8+ (tableau II). A l'intérieur du stade clinique C et du stade biologique 3, une corrélation significative a été trouvée entre l'augmentation du pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ et la diminution du nombre de cellules T CD4+ ($\alpha < 0.05$). En revanche, aucune corrélation n'a été trouvée pour les stades B et 2. Ceci dénote, avant tout, d'une très bonne concordance entre les stades cliniques et biologiques pour ce qui est de l'évolution des cellules T en nombre et en fonction (production de cytokines) ; il existe une relation inverse, au stade ultime de l'infection (C3), entre le pourcentage de cellules T productrices d'INF- γ et le nombre de cellules T CD4+. Ainsi, plus la maladie s'aggrave, moins il y a de cellules T CD4+ et plus la proportion de cellules T productrices d'INF- γ augmente, ce qui suggère que l'organisme continue à se battre jusqu'au bout, par cette production d'INF- γ . Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'évolution de la production d'IL-4 est inversement similaire à l'évolution des cellules T CD8+. En effet, le premier stade de l'infection est caractérisé, par rapport au groupe témoin, par un pourcentage de cellules T productrices d'IL-4 bas et par un nombre de cellules T CD8+ élevé. Puis progressivement, le pourcentage de production d'IL-4 augmente mais tout en restant inférieur à la normale, tandis que le nombre de cellules T CD8+ diminue mais tout en restant supérieur à la normale. Enfin, au stade ultime de la maladie (C3), on assiste à une augmentation de production d'IL-4 qui devient supérieure à la normale, tandis que le nombre de cellules T CD8+ chute littéralement pour devenir inférieur à la normale. Autrement dit, lors de la primo-infection, l'organisme se défend par l'augmentation des cellules T CD8+ (qui produisent de l'INF- γ) et la diminution de l'IL-4, alors que

l'aggravation de la maladie est associée au contraire à une forte diminution des cellules T CD8+ et une remontée du pourcentage de cellules T productrices d'IL-4, cette remontée est un peu masquée puisque cette cytokine est produite par les cellules T CD4+ uniquement, cellules qui, justement, voient leur taux diminuer au fur et à mesure que la maladie s'aggrave, expliquant ainsi les variations non significatives enregistrées pour cette cytokine. L'ensemble de ces résultats nous mène à proposer le scénario suivant :

Le VIH étant un virus intracellulaire, le moyen classique qu'utilise l'organisme pour tenter de l'éradiquer est la stimulation d'une activité cytotoxique qui se manifeste, dans notre étude, par un nombre de cellules T CD8+ très augmenté dès le premier stade de la maladie, avec une production d'INF- γ normale. Ceci est, accompagné d'une hyper activation des lymphocytes B (de cause actuellement inconnue) qui se mettent à produire une grande quantité d'anticorps polyclonaux, de faible affinité, à caractère auto-immun et surtout, inefficace contre le VIH (16, 17). Or, la seule cytokine identifiée à ce jour comme étant un facteur permettant, aussi bien chez la souris que chez l'homme, l'établissement d'une réponse prédominante de type Th2, est l'IL-4 (18). C'est pourquoi, dans le but de tenter de contrecarrer cet emballement des lymphocytes B, on assisterait à une dépression de la production d'IL-4 très tôt dans l'infection. Mais la cause (le virus lui-même ?) à l'origine de l'hyper activation des lymphocytes B continuerait d'agir et très vite, les mécanismes à l'origine de la dépression de la production d'IL-4 se relâcheraient. On assisterait alors à une petite remontée progressive du pourcentage de cellules T productrices d'IL-4 parallèlement à une diminution des cellules T CD4+, ce qui aurait pour conséquence (ou inversement, en serait la conséquence) la diminution observée du pourcentage de cellules T productrices d'IL-2 et donc également, la petite diminution du nombre de cellules T CD8+ (qui restent cependant bien supérieures à la normale et entraîneraient la diminution de la charge virale observée habituellement au cours de la phase asymptomatique). Ce semblant d'équilibre durerait quelques années puis, à la suite d'une réactiva-

tion virale, viendrait s'ajouter une augmentation de la production d'INF- γ provenant de l'augmentation du pourcentage de cellules T «à mémoire» productrices de cette cytokine. Cette augmentation de la production d'INF- γ qui, comme on peut le croire, aurait pour but d'inhiber la réplication virale (19), survient au stade final de la maladie (C3), au moment où le nombre de cellules T CD4+ et le nombre de cellules T CD8+ chutent de manière spectaculaire et, d'après nos résultats, cette production d'INF- γ proviendrait de ces deux types cellulaires conjointement.

Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus ne permettent en aucune façon d'affirmer l'existence d'un «switch» Th1 vers Th2 ; simplement, ils nous ont permis de montrer la présence d'une dysrégulation au niveau de ces trois cytokines explorées, et que cette dysrégulation - intriquée avec celle au niveau de la numération des cellules T, B et NK - semblait associée à la progression de la maladie à VIH.

Références

1. Xiao B-G and Link H. Is there a balance between microglia and astrocytes in regulating Th1 / Th2-cell responses and neuropathologies? *Immunol Today* 1999; 20 (n°11): 477-9.
2. Clerici M, Shearer GM. Th1/Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993 ; 14 : 107-11.
3. Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection : new insights. *Immunol Today* 1994 ; 15 : 575-81.
4. Clerici M, Balotta C, Meroni L et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term nonprogression in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996 ; 12 (11) : 1053-61.
5. Klein SA, Döbmeyer JM, Döbmeyer TS et al. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* 1997 ; 11 (9) : 1111-8.
6. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M et al.

Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4+ T cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 1998 ; 72 (8) : 6646-56.

7. Tanaka M, Hirabayashi Y, Gatanaga H et al. Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection : direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4+ CD8- T cells. *Scand J Immunol* 1999 ; 50 (5) : 550-4.

8. Westby M, Marriot JB, Guckian M et al. Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (INF-gamma) production as HIV-1 –associated markers of immune dysfunction. *Clin Exp Immunol* 1998 ; 111 (2) : 257-63.

9. Sousa AE, Victorino RM. Single-cell analysis of lymphokine imbalance in asymptomatic HIV-1 infection : evidence for a major alteration within the CD8+ T cell subset. *Clin Exp Immunol* 1998 ; 112 (2) : 294-302.

10. Vyakarnam A, Matear PM, Martin SJ et al. Th1 cells specific for HIV-1 gag p24 are less efficient than Th0 cells in supporting HIV replication, and inhibit virus replication in Th0 cells. *Immunology* 1995 ; 86 : 85-96.

11. Emilie D, Maillot MC, Nicolas JF et al. Antagonistic effect of interferon-gamma on tat-induced transactivation of HIV long terminal repeat. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 20565-70.

12. Feki S, Ben Chaabane T, Jenhani F, Boukef K. Numération des populations lymphocytaires T, B et Natural Killer : Etablissement des valeurs normales tunisiennes et étude dans une population d'individus séropositifs pour le VIH, en fonction de l'évolution clinico-biologique de leur maladie. Article sous presse.

13. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995 ; 86 : 1408-19.

14. Jung T, Schauer U, Heusser C et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993 ; 159, n° 1-2 : 197-207.

15. Kemp K, Hviid L, Kharazmi A et al. Interferon-g production by human T cells and natural killer cells in vitro in response to antigens from the two intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania major*. *Scand J Immunol* 1997 ; 46 : 495-9.

16. Amadori A, Chieco-Bianchi L. B-cell activation and HIV-1 infection : deeds and misdeeds. *Immunol Today* 1990 ; 11 (10) : 374-9.

17. Daniel V, Süsal C, Weimer R et al. CD8+ lymphocyte decrease in HIV disease : association with anti-CD4+ but not anti-CD8+ lymphocyte autoantibodies. *Vox Sang* 1996 ; 70 : 86-91.

18. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an ab T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6065-9.

19. Toth FD, Mosborg-Petersen P, Kiss J et al. Differential replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD8- and CD8+ subsets of natural killer cells : relationship to cytokine production pattern. *J Virol* 1993 ; 67 (10) : 5879-88.