

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**



ANNEE 1995

THESE N° 20

**ETUDE DES EFFETS IMMUNOMODULATEURS
DE DEUX PRODUITS
A FORT POUVOIR ELECTRODONNEUR:
LEVAMISOLE ET IMIPRAMINE**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 31 Mai 1995

PAR

Arnaud DOUMAYRENC
né le 12 Novembre 1968 à Brive-La-Gaillarde

EXAMINATEURS DE LA THESE

Mr LAGORCE, Maître de Conférences.....- Président
Mlle CLEDAT, Maître de Conférences.....- Juge
Mme CHABERNAUD, Docteur en Pharmacie.....- Juge
Mlle PAILLER, Docteur en Pharmacie..... - Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE****DOYEN DE LA FACULTE :**

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

Monsieur DREYFUSS Gilles- Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

LEFORT DES YLOUSES Daniel

PHARMACIE GALENIQUE

MOESCH Christian

HYGIENE

OUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

PENICAUT Bernard

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

RABY Claude

PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A la mémoire de mon grand-père, Tony.

Je dedie ce travail,

A Caroline, avec tout mon amour.

A ma mère, à Jean-Jacques,

A mon père, à Dominique,

A mon frère,

A ma grand-mère, Mireille,

A mes grands-parents, Yvette et Jean,

A Marie-Noelle, Alix et Georges,

A Simone,

A Pascale, Anne-Marie et Pierre,

A toute ma famille,

A tous mes amis,

Qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de mes études.

Qu'ils veuillent bien recevoir par l'intermédiaire de ce travail mes sincères et chaleureux remerciements.

A monsieur Jean-François LAGORCE,
Maître de Conférences de Chimie Organique et de Chimie Thérapeutique.
Docteur d'Etat en Pharmacie.
Diplomé d'études approfondies de Pharmacochimie.
Diplomé du Doctorat és Sciences Pharmaceutiques.

Qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury.

Pour sa précieuse contribution à l'élaboration de ce travail et pour l'orientation qu'il a su lui donner.

Pour sa gentillesse, sa disponibilité, l'attention qu'il nous a accordé tout au long de nos études, ainsi que pour les enseignements qu'il nous a dispensés.

Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et soyez assuré de notre profond respect.

A Mademoiselle Dominique CLEDAT

Maître de conférences de Chimie Analytique

Que nous remercions d'avoir accepté de juger ce travail

Pour sa disponibilité à notre égard, ses compétences, sa patience, son enthousiasme.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance

A Madame Marie-Laure CHABERNAUD,

Docteur en Pharmacie.

Diplômée d'études approfondies en Biotechnologies.

Sans qui nous n'aurions pu réaliser ce travail.

Pour sa bonne humeur, ses compétences, son esprit d'analyse et ses précieux conseils.

Qu'elle trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre estime.

A Mademoiselle Isabelle PAILLER,

Docteur en Pharmacie.

Pour la joie que vous nous procurez en acceptant de siéger dans ce jury.

Pour toutes ces années d'étude passées ensemble sur les bancs de la faculté durant lesquelles vous nous avez ravi par votre bonne humeur et votre gentillesse.

Pour l'honneur que vous nous faites en nous donnant votre amitié.

Veillez trouver ici le témoignage de toute notre affection.

A Mademoiselle Frédérique MARTIN,

A Madame Frédérique CLAUDE,

A Monsieur Jamal FATIMI,

Pour leur accueil, leur sympathie et leurs compétences.

PLAN

INTRODUCTION

1. Les maladies auto-immunes

1.1. Généralités

1.2. Maladies thyroïdiennes auto-immunes

1.2.1. Facteurs prédisposants

1.2.1.1. Facteurs endogènes

1.2.1.1.1. Le sexe

1.2.1.1.2. Le stress

1.2.1.1.3. L'âge

1.2.1.1.4. Facteurs génétiques

1.2.1.2. Substances chimiques

1.2.1.2.1. Polluants environnementaux

1.2.1.2.2. Substances médicamenteuses

1.2.1.2.2.1. L'amiodarone

1.2.1.2.2.2. L'iode

1.2.1.2.2.3. Le lithium

1.2.1.2.3. Facteurs infectieux

1.2.2. Les auto-antigènes

1.2.2.1. La thyroglobuline

1.2.2.2. La peroxydase thyroïdienne

1.2.2.3. Le récepteur à la T.S.H.

1.2.3. Les auto-anticorps thyroïdiens

1.2.3.1. Les anticorps anti-Tg

1.2.3.2. Les anticorps anti-hormones thyroïdiennes

1.2.3.3. Les anticorps anti-thyroperoxydase

1.2.3.4. Les anticorps anti-récepteur à la T.S.H.

1.2.4. Processus et déclenchement de la réponse auto-immune

1.2.4.1. Induction d'auto-immunité par court-circuit des lymphocytes T inducteurs

1.2.4.1.1. Défaut de présentation de l'antigène

1.2.4.1.2. Stimulation idiotypique

1.2.4.1.3. Activation polyclonale

1.2.4.2. Induction d'auto-immunité par court-circuit des mécanismes régulateurs

1.2.4.2.1. Défauts dans le circuit des suppresseurs

1.2.4.2.2. Expression anormale de molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité

1.2.5. Principales maladies thyroïdiennes auto-immunes

1.2.5.1. La thyroïdite de Hashimoto

1.2.5.1.1. Symptomatologie

1.2.5.1.2. Biologie

1.2.5.1.3. Radiographies

1.2.5.1.4. Echographies

1.2.5.1.5. Scintigraphies

1.2.5.1.6. Traitements

1.2.5.2. La maladie de Basedow

1.2.5.2.1. Symptômes typiques

1.2.5.2.2. Symptômes atypiques

1.2.5.2.3. Traitements

1.2.5.2.3.1. Traitements médicamenteux

1.2.5.2.3.2. Traitement chirurgical

1.2.5.2.3.3. Traitement par l'iode radioactif

2. Complexométrie-Constante de formation K_c

2.1. Complexe par transfert de charge : définition

2.1.1. Deux catégories de donneurs

2.1.2. Deux catégories d'accepteurs

2.1.3. Déroulement de la réaction de complexation

2.2. Méthode d'étude

2.2.1. Spectrophotométrie

2.2.2. Constante de formation du complexe K_c

2.2.3. Calcul de la constante de formation K_c

2.3. Molécules utilisées

3. Méthode d'étude

3.1. Le cycle cellulaire

3.1.1. Le cycle nucléaire

3.1.2. Le cycle de croissance

3.1.3. Prolifération cellulaire

3.2. La cytométrie en flux

3.2.1. Principe

3.2.2. Le cytomètre et son environnement

3.2.2.1. Paramètres analysés

3.2.2.1.1. Analyse de la fluorescence

3.2.2.1.2. Analyse de la lumière diffusée

- 3.2.2.1.3. Lumière absorbée
- 3.2.2.2. Mise en suspension des cellules
- 3.2.2.3. L'optique
 - 3.2.2.3.1. Source d'excitation
 - 3.2.2.3.1.1. Les lampes
 - 3.2.2.3.1.2. Les lasers
 - 3.2.2.3.2. Filtres et miroirs
 - 3.2.2.3.2.1. Les miroirs dichroïques
 - 3.2.2.3.2.2. Les filtres
 - 3.2.2.3.3. La chambre d'analyse
 - 3.2.2.3.4. Les détecteurs
- 3.2.2.4. Traitement du signal optique et analyse
- 3.2.3. Application à l'étude du cycle cellulaire
 - 3.2.3.1. Analyse monoparamétrique
 - 3.2.3.2. Analyse biparamétrique
 - 3.2.3.2.1. Analyse biparamétrique du contenu cellulaire en ADN et en protéines
 - 3.2.3.2.2. Analyse du cycle après incorporation de BrdU

4. Matériel et méthode

4.1. Matériel biologique

4.2. Culture cellulaire

4.2.1. Séparation des lymphocytes

4.2.2. Préparation des solutions de produits à tester

4.2.3. Substance stimulant la prolifération

4.2.4. Mise en culture

4.2.5. Arrêt de la culture cellulaire

4.3. Coloration en vue de l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

4.3.1. Analyse du contenu en ADN-protéines

4.3.2. Analyse du cycle cellulaire après incorporation de BrdU

4.4. Réglages du cytomètre

5. Résultats

5.1. Etude du cycle cellulaire par mesure du contenu en ADN et en protéines

5.1.1. Imipramine

5.1.2. Lévamisole

5.2. Etude du cycle cellulaire après incorporation de BrdU

5.3. Action du méthimazole et du propylthiouracile sur le cycle cellulaire

6. Discussion

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES CONSULTÉS

Introduction

Des auteurs ont observé des anomalies du système immunitaire chez des malades traités par des antithyroïdiens de synthèse. Il semblerait que l'un des effets secondaires des molécules antithyroïdiennes puissent être une activité immunomodulatrice. Ceci pourrait être intéressant lors du traitement de maladies thyroïdiennes auto-immunes nécessitant la prise d'antithyroïdiens de synthèse comme la maladie de Basedow. Ces maladies se caractérisant par un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque à certains constituants de la glande thyroïde par production d'auto-anticorps et par infiltration lymphocytaire au sein de la glande.

Au cours de notre étude, nous allons mesurer l'action de molécules antithyroïdiennes sur la réponse immunitaire. Pour cela, nous utiliserons un test, appelé test de transformation lymphoblastique, permettant d'évaluer la réponse T. En effet, le rôle de l'immunité à médiation cellulaire et des lymphocytes T est prépondérant dans l'initiation et l'entretien des maladies auto-immunes.

Nous effectuerons des cultures cellulaires de lymphocytes T, auxquelles nous adjoindrons la molécule étudiée, l'action pharmacologique étant quantifiée par analyse du cycle cellulaire lymphocytaire par cytométrie en flux.

Les produits étudiés seront deux molécules, d'indications thérapeutiques et de structure chimique différentes, mais possédant toutes les deux une activité antithyroïdienne, l'imipramine et le lévamisole. Le choix de ces molécules a

été déterminé en fonction de leur pouvoir électrodonneur, donné par le calcul de la constante K_c .

Les résultats seront comparés à ceux obtenus lors d'une étude similaire menée sur deux antithyroïdiens de synthèse de référence, le propylthiouracile (P.T.U.) et le méthimazole (M.T.I.).

1. Les maladies auto-immunes :

1.1 Généralités :

Le système immunitaire est capable de reconnaître et de piéger pratiquement toute forme de molécules microbiennes présentes ou à venir.

De ce fait il s'est avéré incapable de ne pas reconnaître ses propres constituants. Cependant la reconnaissance des composants du "Soi " n'entraîne pas de réponse immunitaire car il existe des mécanismes qui empêchent cette autodestruction.

Mais, comme tout mécanisme, il existe toujours un "risque de panne" qui grandit à mesure que l'organisme vieillit.

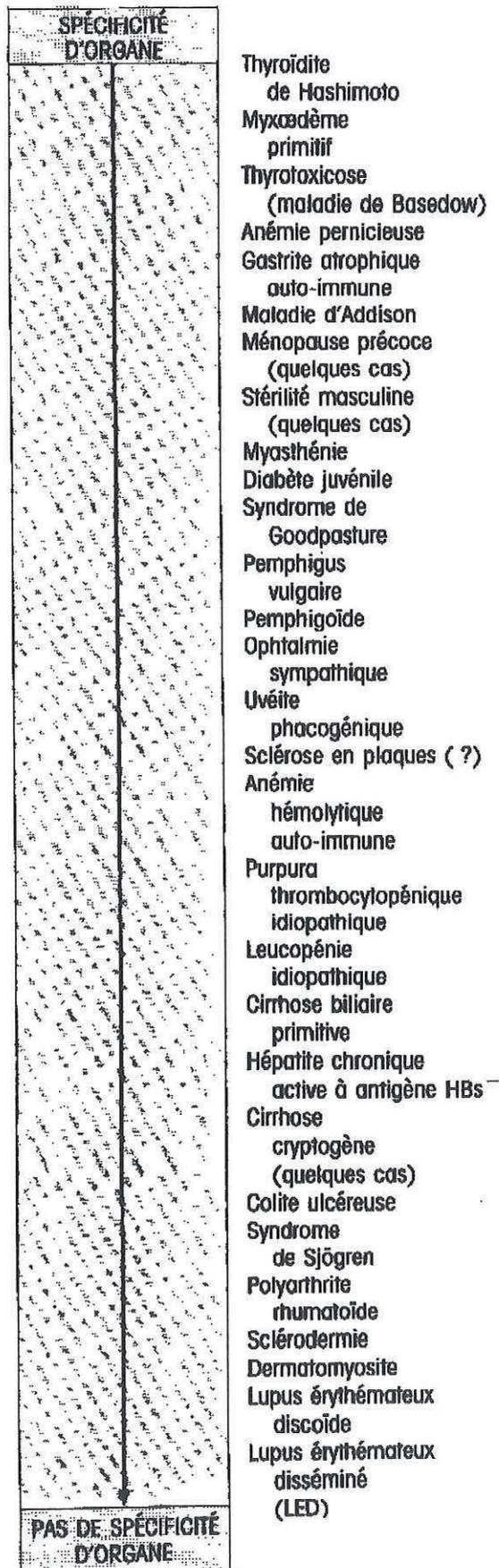
Lorsque ce dérèglement survient il y a production d'anticorps dirigés contre des constituants du soi, appelés auto-anticorps.

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par des processus de défenses, de nature humorale, comme la production d'auto-anticorps, ou de nature cellulaire, mis en oeuvre , par l'organisme contre certains de ces constituants.

Roitt a été le premier à classer ces troubles le long d'un spectre allant des maladies spécifiques d'organe aux maladies non spécifiques d'organe (fig.1).

Les maladies spécifiques d'organes sont associées à des auto-anticorps spécifiques d'un organe. La thyroïdite de Hashimoto en est un bon exemple, elle est en outre caractérisée par la production d'auto-anticorps circulants dirigés spécifiquement contre un constituant de la thyroïde.

Figure 1



A l'autre extrémité du spectre se trouvent les maladies non spécifiques d'organe. C'est le cas du lupus érythémateux disséminé dans lequel ni les lésions, ni les auto-anticorps ne sont spécifiques d'un organe. C'est une affection qui touche principalement la peau, le glomérule rénal, les séreuses et les vaisseaux sanguins. Ces lésions sont accompagnées par la production d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN et d'autres constituants nucléaires de toutes les cellules de l'organisme.

Entre les deux extrémités de ce spectre se trouvent des pathologies dans lesquelles les lésions sont associées à un organe précis, mais les auto-anticorps ne sont pas spécifiques de cet organe. C'est le cas par exemple de la cirrhose biliaire primitive, dans laquelle les lésions affectent les canalicules biliaires alors que les anticorps sériques associés, le plus souvent dirigés contre un antigène mitochondrial, ne sont pas spécifiques du foie.

1.2 Maladies thyroïdiennes auto-immunes (M.T.A.I.) :

Chez l'Homme, la glande thyroïde est le siège de nombreuses formes de maladies auto-immunes. Elle présente la particularité de pouvoir être le siège de deux pathologies totalement opposées tant dans leurs caractéristiques immunologiques qu'endocriniennes : l'hypothyroïdie ou thyroïdite de Hashimoto, l'hyperthyroïdie ou maladie de Basedow (ou maladie de Grave).

A coté de ces deux pathologies importantes, la thyroïde peut être touchée par d'autres types de maladies auto-immunes plus ou moins bien définies.

Thyroïdites auto-immunitaires

- maladie de Hashimoto
- myxœdème primitif
- thyroïdite subaiguë « indolore »
- thyroïdite du post-partum

Maladie de Basedow

- forme typique
- orbitopathie isolée ou apparemment isolée
- formes avec acropachie
- « hashitoxicose »

Dysthyroïdites néonatales

- maladie de Basedow néonatale
- hypothyroïdie transitoire
- hypothyroïdie congénitale définitive (?)

Le seul point commun entre toutes ces formes est la présence d'auto-anticorps dirigés contre des constituants ou des produits de sécrétion de la glande, l'existence d'une certaine prédisposition génétique, l'association

éventuelle avec d'autres affections auto-immunes, et la présence dans la glande d'infiltrats lymphomonocytaires diffus ou organisés en follicules lymphoïdes.

L'expression clinique de la maladie paraît dépendre qualitativement ou quantitativement, du type d'anticorps produits et de la nature des lymphocytes qui ont envahi le tissu.

L'auto-immunité est certainement actuellement la cause prédominante des diverses pathologies thyroïdiennes.

1.2.1 Facteurs prédisposants :

1.2.1.1 Facteurs endogènes :

1.2.1.1.1 Le sexe :

Il semblerait que les hormones sexuelles aient un rôle dans l'apparition des maladies auto-immunes, en effet le sexe féminin développe plus de maladie auto-immune que le sexe masculin.

La testostérone et la progestérone auraient une activité immunosuppressive alors que les oestrogènes auraient un effet immunostimulant.

1.2.1.1.2 Le stress : [1]

Le déclenchement d'une M.T.A.I. aurait une composante psychologique, qui serait plus apparente pour la maladie de Basedow que pour les thyroïdites [2,3].

Le stress tend à déprimer les fonctions immunosuppressives, de manière encore plus importante chez des personnes prédisposées.

Seraient en jeu une augmentation du cortisol et des catécholamines, qui aggraveraient le défaut de la fonction T suppressive, et la libération de diverses hormones qui sensibiliserait l'organisme à une agression virale.

1.2.1.1.3 L'âge :

Il semble exister une période optimale pour le développement des maladies auto-immunes.

Le vieillissement est associé à une apparition ou à une augmentation des auto-anticorps sériques.

1.2.1.1.4 Facteurs génétiques :

La prédisposition génétique est démontrée par la fréquence excessive soit de M.T.A.I., soit des auto-anticorps antithyroïdiens dans certaines familles et la concordance de 30-50 % de M.T.A.I. chez les jumeaux vrais.

Cette prédisposition s'applique aussi bien à la maladie de Basedow qu'à la thyroïdite d'Hashimoto.

Chez les européens et américains du nord, l'haplotype HLA-B8-DR3 augmente d'un facteur 3.7 le risque relatif de maladie de Basedow et de thyroïdite atrophique [4].

Les groupes DR4 et DR5 sont associés à la thyroïdite de Hashimoto et à la thyroïdite du post-partum.

1.2.1.2 Substances chimiques :

1.2.1.2.1 Polluants environnementaux :

La présence d'anticorps anti-thyropéroxydase (anti-TPO) a été remarquée chez des ouvriers, présentant une hypothyroïdie sans goitre, travaillant dans une usine utilisant des biphényles polychlorés et polybromés. Les titres d'anticorps sont cependant peu significatifs statistiquement [5].

De même une exposition à des polluants organiques extraits de la houille tels que des dérivés du phénol, du benzène, s'est aussi révélée être associée à une fréquence accrue d'auto-anticorps antithyroïdiens [6].

L'ingestion involontaire de tels composés présents dans l'environnement pourraient éventuellement être à l'origine du déclenchement de certaines M.T.A.I., mais il est difficile de tirer des conclusions sur ce sujet du fait du manque et de la difficulté d'effectuer des études épidémiologiques sur le sujet.

1.2.1.2.2 Substances médicamenteuses :

1.2.1.2.2.1 L'amiodarone :

C'est une molécule utilisée en cardiologie comme antiarythmique de classe III, qui possède de nombreux effets indésirables : elle entraîne notamment des dysthyroïdies.

La survenue de ces dysthyroïdies s'explique à la fois par son analogie structurale avec la T4, d'où une inhibition compétitive des enzymes impliqués dans la désiodation et le catabolisme de l'hormone, ainsi que par sa richesse en iode (75 mg pour 200 mg de principe actif par comprimé, soit 6 mg d'iode détaché de la molécule par 24 h pour une prise de 200 mg).

Des anticorps anti-TPO ont été retrouvés à des titres élevés chez la moitié des malades ayant une hypothyroïdie induite par l'amiodarone [7]. Ces anticorps disparaissent 6 mois après l'arrêt du traitement [8].

Ont également été retrouvés des pourcentages élevés de lymphocytes T exprimant des antigènes HLA DR chez deux malades ayant une hyperthyroïdie induite par l'amiodarone.

De même, il a été observé l'augmentation d'une sous population de lymphocytes T, incluant des phénotypes CD4+ et CD8+ chez six malades sur neuf traités par l'amiodarone [9].

1.2.1.2.2.2. L'iode :

Il est reconnu que l'iode peut favoriser la survenue de M.T.A.I..

L'effet immunostimulateur de l'iode semble mettre en jeu une augmentation de l'antigénicité de la thyroglobuline richement iodée, ainsi qu'une activation des lymphocytes B, et des macrophages (dans leur fonction de phagocytose et de présentation).

Il a été également émis l'hypothèse selon laquelle l'iode pourrait induire l'auto-immunité en augmentant l'activité des lymphocytes préalablement sensibilisés aux antigènes thyroïdiens [10].

1.2.1.2.2.3 Le lithium :

C'est une molécule utilisée en psychiatrie comme normothymique, qui a une action antithyroïdienne par similitude aux iodures.

Le lithium aurait de nombreuses actions sur le système immunitaire [11]:

- inhibition ou augmentation de la synthèse des immunoglobulines
- diminution de la production des lymphokines
- augmentation de la phagocytose des macrophages
- diminution de l'activité suppressive
- augmentation de la fonction auxiliaire des lymphocytes
- augmentation et inhibition de la stimulation mitogénique des lymphocytes en culture selon la concentration en mitogène et en Li.

Toutes ces propriétés sont dues à l'action du Li sur les mécanismes AMPc dépendants, ainsi que sur les systèmes ATPase Na⁺/K⁺ impliqués dans la régulation de la fonction lymphocytaire.

La présence d'auto-anticorps antithyroïdiens est fréquente chez les patients traités par le lithium [12].

Il semblerait que l'effet immunomodulateur du Li ne s'exerce que sur une auto-immunité préexistante. En effet l'augmentation des auto-anticorps antithyroïdiens chez des malades maniaco-dépressifs n'est constatée que si ces auto-anticorps étaient déjà présents avant le traitement par le Li.

1.2.1.3 Facteurs infectieux :

Des infections virales pourraient avoir un rôle dans l'apparition des maladies thyroïdiennes auto-immunes.

Ainsi la fréquence accrue d'anticorps dirigés contre le virus Influenza B a été détectée au sein d'un groupe de malades atteints de la maladie de Basedow [13].

Il semblerait également que *Yersinia enterocolitica* puisse entraîner une auto-immunité [14]. En effet cette bactérie porte des structures fonctionnelles et antigéniques similaires au récepteur de la TSH.

1.2.2 Les auto-antigènes thyroïdiens :

Les principaux auto-antigènes sont :

- la thyroperoxydase TPO
- la thyroglobuline Tg
- le récepteur de la TSH (rTSH)

Tous trois sont spécifiques de la glande thyroïde.

1.2.2.1 La thyroglobuline :

La thyroglobuline constitue 75 à 80 % de la colloïde. La colloïde est une substance amorphe contenue au centre de l'unité fonctionnelle de la thyroïde, le follicule thyroïdien (couche monocellulaire de thyrocytes entourant la colloïde).

Une fois synthétisée par le thyrocyte la Tg est concentrée dans la lumière folliculaire. Là elle pourra subir une iodation puis elle sera réabsorbée par pinocytose. La protéine sera ensuite dégradée libérant ainsi les hormones thyroïdiennes T3 et T4, qui seront excrétées et rejetées au niveau du flux sanguin.

Toutes ces étapes sont sous le contrôle de la thyroid stimulating hormon, la TSH.

La thyroglobuline humaine est une protéine de poids moléculaire égal à 660 KDa, constituée de deux monomères de 2748 acides aminés. Après synthèse, chaque monomère subit différentes transformations :

- glycosilation
- sulfatation
- phosphatation
- iodation.

Rq: La Tg est présente à une très faible concentration au niveau du sérum (10 ng/l).

1.2.2.2 La peroxydase thyroïdienne TPO :

C'est une enzyme qui participe, à deux niveaux, à la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Elle intervient au niveau de l'oxydation des iodures, ainsi qu'au niveau du couplage des iodotyrosines.

C'est une enzyme de poids moléculaire de environ 110 KDa, de structure héminique.

La TPO humaine possède une chaîne protéique de 933 acides aminés.

La TPO est localisée au niveau de la membrane apicale du thyrocyte [15].

Au sein de la molécule il existe 2 sites enzymatiques, l'un responsable de l'oxydation des iodures, l'autre du couplage des iodothyrosines.

1.2.2.3 Le récepteur à la TSH :

C'est un récepteur sensible à la TSH hypophysaire. C'est par son intermédiaire que s'effectue le contrôle normal de la fonction et de la croissance du thyrocyte par la TSH. Il est également impliqué dans certaines pathologies auto-immunes thyroïdiennes. Il est reconnu par différents types d'auto-anticorps.

Ainsi dans la maladie de Basedow des anticorps stimulants se substituent à la TSH et conduisent à une hyperstimulation incontrôlée de la glande entraînant une hyperthyroïdie.

Dans certaines formes de myxoedème idiopathique, des auto-anticorps bloquants induisent un état d'hypothyroïdie en rendant le récepteur insensible à la TSH.

Il est sous la forme d'un dimère constitué d'une sous-unité A de 55 kDa, glycosilée, liée par pont(s) disulfure(s) à une sous-unité B de 35 kDa. Cette structure proviendrait de la dégradation d'un précurseur de 120 kDa.

La sous-unité A serait la partie de la molécule interagissant avec la TSH (ou les anticorps stimulants), la sous-unité B permettant l'ancrage du récepteur au niveau de la membrane plasmique du thyrocyte.

Il y aurait environ 1 millier de récepteurs par cellule normale.

Le récepteur à la TSH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (il a le même effet que les agents stimulants de l'adénylate cyclase ou que des agents augmentant le taux d'AMPc intracellulaire).

1.2.3 Les auto-anticorps thyroïdiens :

1.2.3.1 Les auto-anticorps anti-Tg :

Les anticorps anti-Tg sont habituellement des Ig G, moins fréquemment des Ig A ou des Ig M.

Les auto-anticorps anti-Tg spontanés ne reconnaissent qu'un nombre très limité d'épitopes sur la molécule de Tg.

Le rôle pathologique de ces anticorps n'est pas apparent.

Ils peuvent constituer des immunocomplexes circulants ou fixés dans le tissu thyroïdien ou même dans le rein, de rares cas de syndrômes néphrotiques ayant été décrits.

1.2.3.2 Les anticorps anti-hormone thyroïdienne :

Les anticorps anti-T3 et anti-T4 sont détectés chez environ 5 % des patients atteints de thyroïdite ou de maladie de Basedow [16].

Ces anticorps représentent des spécificités particulières d'anticorps anti-Tg. En effet les hormones thyroïdiennes sont des haptènes, elles n'ont pas de pouvoir immunogène, mais elles peuvent l'acquérir en se fixant sur des molécules plus volumineuses. Ces anticorps anti-hormones thyroïdiennes peuvent se former à partir de la Tg au niveau d'épitopes contenant des sites hormonogéniques.

Ces anticorps sont habituellement sans effet sur l'action des hormones. Cependant un rôle biologique de ces anticorps est envisageable par blocage fonctionnel. Mais peu de cas d'hypothyroïdie dues à ces anticorps anti-hormones thyroïdiennes ont été signalés [17].

Rq: La présence de ces auto-anticorps peut induire des artefacts dans le dosage des hormones thyroïdiennes dont l'intensité et la sensibilité dépendent de la méthode employée.

1.2.3.3 Les anticorps anti-thyropéroxydase :

Ceux sont généralement des Ig G, rarement des Ig A ou des Ig M.

Ils fixent le complément, ce qui leur donne un effet potentiel de cytotoxicité [18].

Ils semblent également capables de médier des réactions de cytotoxicité dépendants d'anticorps spécifiques (A.D.C.C.).

Dans certains cas ces anticorps sont capables d'inhiber l'activité de l'enzyme [19], mais il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre l'existence d'hypothyroïdie et la présence de certains sous groupes de ces anticorps.

En général ils n'ont pas d'action sur l'organisme, ainsi l'immense majorité des nouveaux nés de femmes atteintes de thyroïdite avec des titres élevés d'anticorps anti-TPO ne présentent pas la moindre anomalie thyroïdienne.

1.2.3.4 Les anticorps anti-recepteur à la TSH :

Les anticorps anti-rTSH sont détectés par leurs effets biologiques. Ils manifestent plusieurs types d'activités.

Schématiquement, les auto-anticorps anti-rTSH peuvent appartenir aux classes suivantes [20] :

- anticorps stimulants (thyroid stimulating antibody TSAb, thyroid stimulating immunoglobulin TSI) : sa fixation entraîne une production d'AMPc, une augmentation du captage des iodures, une augmentation de l'organification de l'iode, une augmentation de l'hormonogénèse thyroïdienne.

- anticorps inhibant la liaison de la TSH à son récepteur (thyrotropin binding inhibitory antibody, TBIAb; thyrotropin binding inhibitory immunoglobulins, TBI I).

- anticorps bloquants: définis par la capacité de bloquer l'action stimulante de la TSH et/ou de TSAb. L'effet inhibiteur de ces anticorps intervient au niveau du récepteur et à un niveau intracellulaire.

Les anticorps anti-rTSH sont tenus pour responsable de l'hyperactivité fonctionnelle thyroïdienne de la maladie de Basedow.

Ces anticorps sont actifs sous forme monovalente en fraction Fab.

Ils sont d'hétérogénéité restreinte chez un même patient et plus souvent de type λ [21].

Rq: Immuns complexes intrathyroïdiens et circulants :

- Des dépôts d'immuns complexes ont été observés contre la membrane basale des follicules thyroïdiens chez certains patients atteints de MTAI. Ils peuvent être responsables d'une réaction inflammatoire locale médiée par le complément.

- Chez certains patients des immuncomplexes circulants constitués essentiellement de complexes "Tg-anti Tg " sont retrouvés. Ils peuvent être chez de rares patients responsables d'une pathologie rénale.

1.2.4 Processus et déclenchement de la réponse auto-immune :

La maladie thyroïdienne auto-immune apparaît au moment où un auto-antigène thyroïdien devient immunogène c'est à dire qu'il devient capable de stimuler les lymphocytes T4.

Pour ce faire, il faut que l'antigène soit accessible par les lymphocytes (ce qui est le cas la plupart du temps).

Il faut également que l'auto-antigène atteigne une concentration suffisante à la surface des cellules présentant l'antigène pour être détecté.

L'auto-antigène doit également être présenté au lymphocyte T4 en association aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité.

La présence de lymphocytes B et T autoréactifs à l'état normal est démontrée. Une petite proportion de lymphocytes B normaux fixent les auto-antigènes par des récepteurs de surface.

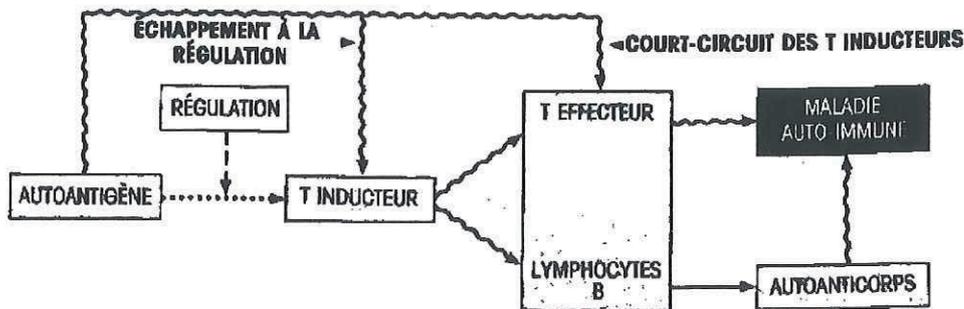
En culture *in vitro*, il est possible d'observer ces lymphocytes autoréactifs (mise en culture de lymphocytes T avec des tissus autologues en présence de lectines-agents mitogènes- ou de serum de veau foetal entraînant la production de lymphocyte T effecteurs reconnaissant spécifiquement ces tissus).

A l'état normal il doit exister des mécanismes de défense qui empêchent ces lymphocytes autoréactifs de s'activer.

On peut supposer que la clé du système est le contrôle des lymphocytes T auxiliaires (inducteurs) autoréactifs.

Il est probable que par délétion clonale ou action de lymphocytes T suppresseurs ou encore par déficit de présentation de l'antigène, les lymphocytes T autoréactifs soient mis hors d'état de répondre, la maladie ne pouvant ainsi se déclencher.

Déclenchement de la maladie auto-immune: (d'après Roitt)



La maladie auto-immune peut être induite selon deux voies différentes:

- par court-circuit des lymphocytes T inducteurs
- par court-circuit des mécanismes régulateurs.

1.2.4.1. Induction d'auto-immunité par court-circuit des lymphocytes T inducteurs :

1.2.4.1.1. Défaut de présentation de l'antigène :

+ Apparition de nouveaux déterminants antigéniques :

- Modification de l'auto-antigène :

Cela donne un nouveau déterminant soit par défaut de synthèse, soit par anomalie du clivage lysosomal.

Le seul exemple connu est celui de la polyarthrite rhumatoïde dans laquelle il y a un défaut de galactosylation des chaînes Ic γ .

Dans le cas de la thyroïde et de la Tg, il est possible qu'un métabolisme anormal de l'iode par la glande elle-même soit en cause : en effet la thyroïdite est atténuée par un régime hypoiodé.

Rq: L'antigène peut être modifié dans certaines maladies par combinaison avec les médicaments:

Ainsi l'anémie hémolytique associée à l'administration d'alpha méthyl dopa serait due à une modification des molécules de surface des érythrocytes. Ces molécules deviendraient des porteurs capables de stimuler les lymphocytes B reconnaissant l'antigène rhésus e qui est normalement un antigène faible.

- Réactions croisées :

Le déterminant potentiellement auto-antigénique est présent sur une molécule exogène.

Ex : Rhumatisme articulaire aigu

- Reconnaissance associative :

Un nouveau déterminant auxiliaire peut apparaître grâce à des modifications médicamenteuses ou grâce à l'insertion d'un antigène viral dans la membrane d'une cellule. Ceci provoquerait une réaction avec des composés cellulaires préexistants.

Ce mécanisme serait peut-être l'une des causes de la maladie de Basedow.

1.2.4.1.2. Stimulation idiotypique :

Les lymphocytes T auxiliaires, spécifiques d'un idiotype, peuvent stimuler une cellule présentant cet idiotype, il est concevable qu'un parasite ou un virus activant la production d'un anticorps porteur d'un idiotype publique, qui serait commun au récepteur d'un lymphocyte T ou B autoréactif, puisse provoquer une réponse auto-immune.

1.2.4.1.3. Activation polyclonale :

Les micro-organismes agissent souvent comme adjuvant. Ceci est du au fait que certains de leurs constituants possèdent des propriétés d'activation polyclonale des lymphocytes. Ces produits fournissent un signal non spécifique déclenchant la stimulation des lymphocytes B, court-circuitant ainsi la nécessité de la collaboration avec les lymphocytes T.

1.2.4.2. Induction d'auto-immunité par court-circuit des mécanismes régulateurs :

1.2.4.2.1. Défauts dans le circuit des suppresseurs:

Les mécanismes permettant de court-circuiter les lymphocytes T inducteurs, et d'entraîner ainsi une auto-immunité n'assurent pas cette réponse dans le temps. En effet, chez les animaux, la production d'auto-anticorps est rapidement étouffée grâce à l'action de lymphocytes T suppresseurs.

D'une façon générale, toute manipulation réduisant l'activité des lymphocytes T suppresseurs favorise l'émergence de l'auto-immunité.

1.2.4.2.2. Expression anormale de molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité :

La plupart des auto-antigènes spécifiques d'un organe apparaissent normalement à la surface des cellules de l'organe cible associées à des molécules de classe I du C.M.H., mais pas de celles de classe II. Ces cellules ne peuvent donc pas communiquer avec les lymphocytes T inducteurs et sont donc immunologiquement silencieuses.

Or les cellules d'organes cibles, sous l'action de divers facteurs, sont capables d'exprimer des molécules de classe II du C.M.H. et de se comporter comme des cellules présentatrices de l'antigène. Ainsi des études ont révélé la présence de ces molécules à la surface des thyrocytes de sujets atteints de maladie thyroïdienne auto-immune [22].

Les facteurs régulateurs de cette expression sont nombreux parmi eux on peut citer la phytohémagglutinine (in vitro) [23], l'interféron γ [24], la TSH [25], les anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH [26]. L'interféron γ semble le plus actif, il agit in vitro à des concentrations physiologiques [27].

Certains facteurs peuvent exercer une régulation négative.

En fait, il semblerait que l'expression de molécules de classe II du C.M.H. par les thyrocytes ne soit pas la cause des maladies auto-immunes thyroïdiennes, mais qu'elles contribueraient à l'entretien du processus auto-immun. Cette expression est régulée de manière complexe par des cytokines produites par les cellules immunes infiltrant la thyroïde [28] mais également par les thyrocytes eux-mêmes [27].

Tout en entretenant le processus, la cellule folliculaire thyroïdienne est en premier lieu la cible de la pathologie auto-immune. Ceci est dû au fait que ces

cellules présentant à leur surface des auto-antigènes thyroïdiens ainsi que des molécules d'adhésion I et II du C.M.H., réagissant respectivement avec les structures CD8 et CD4 des cellules lymphoïdes, vont favoriser la cytotoxicité à médiation humorale et cellulaire. De plus le thyrocyte est le site propice à l'inflammation car il est capable de générer des radicaux libres.

1.2.5 Principales maladies thyroïdiennes auto-immunes :

La pathologie thyroïdienne de mécanisme auto-immun comprend des phénomènes paradoxaux allant de l'hypothyroïdie à l'hyperthyroïdie, du goitre à l'atrophie de la glande thyroïde.

Tout cela se produit sous la dépendance d'anticorps antithyroïdiens variés : destructeurs comme les anticorps anti-TPO, activateurs comme les anticorps stimulant la multiplication des cellules thyroïdiennes, bloquant la synthèse hormonale comme certains anticorps anti-récepteur de la TSH ou à l'inverse stimulant comme d'autres anticorps vis-à-vis du même récepteur.

1.2.5.1 La thyroïdite de Hashimoto :

C'est une thyroïdite lymphocytaire diffuse entraînant un dysfonctionnement thyroïdiens variable selon les cas.

Cette affection fut décrite pour la première fois en 1912 par Hashimoto.

C'est une pathologie préférentiellement féminine (sex ratio 12) survenant le plus souvent entre 30 et 60 ans.

Il est admis que plus d'un individu sur cent aura une thyroïdite de Hashimoto.

Il existe des terrains prédisposants :

- Autres cas de thyropathies auto-immunes dans la famille.
- Affections auto-immunes extrathyroïdiennes spécifiques d'organes.
- Groupes tissulaires : la thyroïdite de Hashimoto est liée à l'haplotype HLA DR5 avec un risque relatif multiplié par 3 ou 4.

La glande thyroïde est augmentée de volume dans son ensemble, parfois bosselée ou même nodulaire. Il se produit une infiltration lymphocytaire.

Le goitre est le motif habituel de consultation. Son apparition est progressive au fil des semaines et des mois. Le goitre est de volume moyen, symétrique, indolore parfois responsable d'une gêne locale .

1.2.5.1.1 Symptomatologie :

En général lors de la consultation la patiente est euthyroïdienne (dans 80 % des cas) ou légèrement hypothyroïdienne (dans 15 % des cas).

Elle présente une légère fatigue, une petite prise de poids, quelques crampes, une tendance à l'oedème des paupières inférieures, d'éventuels troubles gynéco-endocriniens mais sauf exception elle ne présente pas d'hypométabolisme important.

La fonction thyroïdienne est parfois augmentée (ainsi dans 5 % des cas la thyroïdite de Hashimoto se trouve associée à une thyrotoxicose), en général elle est normale, dans la moitié des cas elle conduit à une hypothyroïdie dans les cinq ans.

1.2.5.1.2 Biologie :

- Dosages hormonaux :

Selon les cas il y a confirmation de l'euthyroïdie avec les dosages de T3, T4 et de la TSH qui sont normaux, ou bien les dosages dépistent une hypothyroïdie avec une réponse explosive de TSH à TRH, puis élévation de la TSH basale, baisse de T4 et baisse de T3.

- Différents témoins de l'état métabolique :

VGM, cholestérol, CPK, SBP ... peuvent être mesurer pour évaluer l'état métabolique.

- Divers :

Il survient souvent une élévation des taux de calcitonine témoignant d'une hyperplasie des cellules C [39].

- Bilan inflammatoire :

Il peut être modérément perturbé : VS à 25/50, et surtout une hypergammaglobulémie.

- Les auto-anticorps :

Les auto-anticorps anti-TPO sont présents dans pratiquement 100 % des cas, la plupart du temps à des titres très élevés. Ils reconnaissent la TPO présente surtout au niveau apical des thyrocytes ainsi qu'au niveau de la

membrane basale. In vitro ces anticorps ont une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules thyroïdiennes mis en culture. Il est admis que ces anticorps ont un rôle destructeur in vivo.

Les anticorps anti-Tg sont présents dans 90 % des cas à des titres moins élevés [29,30,31].

La recherche des Thyrotropin binding inhibiting antibodies TBIAb est couramment pratiquée. Sa positivité s'observerait dans 15 à 20 % des thyroïdites de Hashimoto [30]. Ceci traduit la présence dans le serum d'anticorps se fixant in vitro sur les récepteurs de la TSH. Peut-être ces anticorps sont-ils réellement stimulant mais la thyroïde incapable de répondre, à un stade tardif de la maladie, peut-être s'agit-il plutôt d'anticorps non stimulants.

On peut noter également la présence de thyroid stimulating blocking antibodies TSBAb [33].

Il n'y a pas de thyroid stimulating antibodies TSAAb [30,32].

Sont parfois présents des TGI (thyroid growth immunoglobulins) à un taux corrélé à l'importance du goitre [34,35], des TGBI (thyroid growth blocking immunoglobulins) [36,33].

La présence d'anticorps anti-T3 et anti-T4 est rare. Lorsqu'ils sont présents, ils sont sans effet sur l'action des hormones thyroïdiennes, mais ils perturbent leur dosage.

Dans 50 % des cas de thyroïdite de Hashimoto, peuvent être mis en évidence des phénomènes de cytotoxicité directe ou anticorps dépendants (ADCC), par

la mesure de la destruction de globules rouges entourés de Tg et marqués au ^{51}Cu par les lymphocytes du patient et le sérum d'un témoin, ou par les lymphocytes d'un témoin et le sérum du patient [37].

Les auto-anticorps thyroïdiens étant parfois associés à d'autres affections auto-immunes, il peut être intéressant d'effectuer la recherche de divers anticorps dans le cadre d'une enquête familiale. On note souvent la présence d'anticorps anti- ilots ICA et d'anticorps anti-canaux salivaires [38].

1.2.5.1.3 Radiographies :

Les radiographies du cou et du thorax peuvent montrer une déviation de la trachée et une opacité du médiastin antérosupérieur en cas de goitre volumineux et plongeant.

1.2.5.1.4 Echographies :

Une échographie permet de visualiser les lésions qu'il y ait sclérose (stade ultime) ou simple infiltration lymphocytaire. Cela se manifeste de la même façon sur l'échographie. En effet, ces deux types de lésions sont hypoéchogènes.

Ainsi l'existence de lésions hypoéchogènes très étendues témoigne d'une hypothyroïdie déjà présente ou prévisible à court terme .



1.2.5.1.5 Scintigraphies :

Les scintigraphies à ^{123}I ou à ^{99}Tc fournissent des images comparables à celles obtenues par échographie. Elles ne permettent pas là non plus de faire un diagnostic différentiel.

1.2.5.1.6 Traitements :

La plupart du temps, le traitement se limite à un contrôle métabolique de la thyroïde.

Une supplémentation hormonale sera entreprise lorsque une hypothyroïdie sera cliniquement décelable. La diminution du goitre est alors réelle [40].

La majorité des patients atteints d'une thyroïdite de Hashimoto nécessite un traitement médical.

Parfois il faut avoir recours à la chirurgie, notamment lorsque le volume du goitre ne diminue pas.

Médicaments :

CYNOMEL®

(liothyronine) comprimés à 25 μgr .

EUTHYRAL®

(lévothyroxine, liothyronine) comprimés à 100 μgr de L-T4, et à 20 μgr de L-T3.

LEVOTHYROX®

(lévothyroxine sodique) comprimés à 25, 50,75, 100,
150 μ gr.

L.THYROXINE®

(lévothyroxine sodique) comprimés à 100 μ gr
solution buvable, solution injectable

1.2.5.2 La maladie de Basedow (ou maladie de Grave) :

Décrite pour la première fois en 1846, c'est la cause la plus fréquente d'hyperthyroïdie.

Elle est décrite comme étant l'association d'un goitre, d'une exophtalmie et de signes de thyrotoxicose (tachycardie, amaigrissement, tremblement).

De nos jours, elle est considérée comme étant une maladie auto-immune se développant sur un terrain génétiquement prédisposé.

C'est une pathologie préférentiellement féminine. L'incidence annuelle est de l'ordre de 2 à 3 cas pour 1000 femmes. Elle survient entre 25 et 70 ans en moyenne à l'âge de 48 ans (homme et femme).

1.2.5.2.1 Symptômes typiques :

- Signes de thyrotoxicose :

Les signes de thyrotoxicose les plus fréquents sont des signes cardiovasculaires, ce peut être une tachycardie mais le plus souvent se sont des troubles du rythme.

L'amaigrissement peut être relativement important sans pour autant que l'appétit disparaisse.

Les autres signes de thyrotoxicose sont la thermophobie, les troubles vasomoteurs, la polydypsie, les troubles nerveux et caractériels.

- Signes d'anomalies auto-immunes :

* Le goitre : il est habituellement diffus, élastique, homogène, symétrique et non douloureux.

* Les signes oculaires : ils apparaissent, en général, en même temps que les signes de thyrotoxicose. Il y a association d'une exophtalmie, d'un oedème palpébral, d'une rétraction des paupières supérieures et plus rarement d'une diplopie.

* Le myxoedème pré-tibial : il est rare. Lorsqu'elles sont présentes les lésions siègent préférentiellement au niveau de l'arête antérieure du tibia sous forme d'un érythème s'épaississant progressivement et devenant violacé.

Tous ces signes de la maladie ne sont pas toujours présents.

Le diagnostic formel repose sur la biologie; le dosage de la T3 et de la T4 libres montreront des taux très élevés, la TSH sera effondrée.

La cartographie thyroïdienne au Technetium ou à l'Iode révèle un goitre homogène.

Les anticorps anti-récepteurs stimulants semblent jouer un rôle important dans la maladie de Basedow:

- TSAb est détecté chez plus de 80 % des patients basedowiens avant tout traitement.
- Il y a corrélation entre le titre de TSAb et la probabilité de rechute de la maladie après une cure d'antithyroïdien.
- L'entrée spontanée en rémission observée chez plus de 25 % des patientes s'accompagne d'une disparition pratiquement constante de TSAb.
- Les formes euthyroïdiennes de maladie de Basedow révélées par une ophtalmie isolée s'accompagnent, la plupart du temps, de taux faibles ou nuls de TSAb.
- Les titres de TSAb, tant dans la circulation maternelle que dans celle du nouveau-né, rendent parfaitement compte des cas d'hyperthyroïdie néonatale observée chez des enfants de mère basedowienne.

1.2.5.2.2 Symptômes atypiques :

La maladie de Basedow n'a pas toujours une expression franche comme dans sa forme type, elle se manifeste alors par différents symptômes isolés.

- Manifestations neurologiques :
 - . Atteinte du SNC
 - . Neuropathie périphérique
 - . Syndrome pyramidal (chorée le plus souvent)

- Manifestations musculaires :

Diverses manifestations musculaires sont observées au cours de la maladie de Basedow : elles sont appelées myopathies des ceintures .

. Paralyse périodique thyrotoxique [41] :

Très fréquente en extrême orient où 2 à 8 % des hyperthyroïdiennes présentent cet accident, elle est exceptionnelle en Occident.

. Myasthénie et hyperthyroïdie :

La survenue de myasthénies chez les personnes atteintes par la maladie de Basedow est de 10 à 100 fois plus importante que dans une population prise au hasard.

De même une hyperthyroïdie basedowienne s'observe chez 5 % des myasthéniques.

La relation unissant ces deux pathologies n'est pas clairement établie.

- Manifestations digestives :

. Atteintes hépatiques [42] :

Elles sont présentes dans 15 à 20 % des cas, mais leur expression est très variable.

Dans tous les cas les tests hépatiques sont perturbés (augmentation des transaminases ainsi que des phosphatases alcalines).

. Maladie de Basedow et vomissements :

Il existe de rares formes de maladie de Basedow dans lesquelles le patient est pris de vomissements intenses, incontrôlables, entraînant un amaigrissement.

Cela s'arrange lorsqu'il y a retour à l'euthyroïdie.

- Troubles du métabolisme phosphocalcique :

L'hypercalcémie de la maladie de Basedow est un fait classique, le plus souvent sans symptomatologie.

Dans les rares cas d'hypercalcémies sévères peuvent apparaître des symptômes caractéristiques : vomissements, polyurie, troubles de la conscience.

- Manifestations hématologiques :

. Anémie microcytaire par trouble de l'absorption digestive ou du métabolisme du fer : elles guérissent la plupart du temps avec la disparition de la thyrotoxicose.

. Anémie macrocytaire de type Biermer :

Ceci témoigne de la survenue simultanée de deux maladies auto-immunes chez le même individu.

- Manifestations cardiaques (cardiothyroïose) :

Ce sont les complications les plus importantes de la maladie de Basedow en raison de leur fréquence et de leur gravité éventuelle.

Ces manifestations cardiaques se traduisent par différents troubles du rythme cardiaque.

Il est d'ailleurs recommandé de faire un dosage des hormones thyroïdiennes libres et de la TSH en présence de troubles du rythme chez des personnes âgées, afin de dépister d'éventuelle hyperthyroïdies frustes.

Il peut également survenir une insuffisance cardiaque. Ceci est favorisé par une cardiopathie préexistante et par l'âge. Cette insuffisance cardiaque peut rapidement devenir globale. De plus elle est rebelle aux traitements classiques

par les digitaliques et les diurétiques. Par contre elle réagit à la réduction de la thyrotoxicose.

Si des troubles du rythme cardiaque sont découverts, le traitement éventuel par l'amiodarone est alors contre-indiqué.

- Gynécomasties :

Une gynécomastie le plus souvent bilatérale, peut apparaître chez des hommes atteints de la maladie de Basedow.

En général cela survient chez des hommes de moins de 50 ans au cours du 3^{ème} ou du 4^{ème} mois d'évolution de l'hyperthyroïdie.

Ce phénomène est du à l'augmentation de la SBP ainsi qu'à l'augmentation du rapport oestradiol/testostérone libre.

Cette gynécomastie disparaît à la guérison de la maladie thyroïdienne.

- Prise de poids :

Ceci est paradoxal, mais une prise de poids résultant d'une polyphagie peut survenir chez des sujets jeunes.

- Association à d'autres maladies auto-immunes :

La maladie de Basedow peut être associée à d'autres maladies auto-immunes en particulier à des endocrinopathies [43], notamment à une insuffisance surrénalienne ou à un diabète.

1.2.5.2.3 Traitements :

Le traitement de la maladie de Basedow peut être médicamenteux, chirurgical ou bien par iode radioactif.

1.2.5.2.3.1 Traitements médicamenteux :

* Traitement par les anti-thyroïdiens de synthèse : A.T.S.

C'est un traitement utilisé dans environ 60 % des cas en première intention [44].

Les produits utilisés sont tous des thioamides comportant la structure thiocarbamide dotée d'une activité antithyroïdienne. La base de tous ces produits est la thiourée.

Les ATS se divisent en deux familles :

- Les dérivés du thiouracile :
 - + le méthylthiouracile M.T.U.
 - + le propylthiouracile P.T.U.
 - + le benzylthiouracile B.T.U.
- Les dérivés du mercapto-imidazole :
 - + le méthimazole
 - + le carbimazole

En France sont commercialisés le carbimazole sous le nom commercial de NEOMERCAZOLE®, et le benzylthiouracile sous le nom de BASDENE® .

Le P.T.U. n'est pas commercialisé mais il est disponible auprès des pharmacies hospitalières.

Rq: Le carbimazole n'a pas d'action antithyroïdienne, il est actif, dans l'organisme par son métabolite actif qui est le méthimazole.

Mécanisme d'action :

Les A.T.S. ont deux modes d'action :

-inhibition de la T.P.O.

-action par leur pouvoir électrodonneur : ils inhibent l'organification de l'iode, notamment au niveau de l'incorporation de l'iode oxydé sur les groupements thyrosine de la molécule de Tg.

Ils inhibent également le couplage entre la mono-iodothyrosine et la diiodothyrosine conduisant à la formation des iodothyronines.

Effets secondaires:

La complication la plus sévère d'un traitement par les A.T.S; est l'agranulocytose. Elle survient chez environ 0,5 % des patients traités par les A.T.S.. Elle est réversible à l'arrêt du traitement.

Il est recommandé d'effectuer une NFS tous les 10 jours au cours des deux premiers mois de traitement. Cela n'est pas toujours suffisant car la majorité des accidents surviennent brutalement.

Les autres complications sont des leucopénies, des vascularites, des hépatites ainsi que des réactions cutanées.

Durée du traitement :

A l'heure actuelle, le traitement conventionnel de la maladie de Basedow par les A.T.S. est effectué à dose moyenne pour une durée de 18 mois (30 à 60 mg par 24 h durant les deux premiers mois, puis 15 à 30 mg les mois suivants).

*Autres traitements médicamenteux :

- Le propranolol est un bêta bloquant.

Il est utilisé à la dose de 40 à 120 mg /j.

Il agit sur toutes les manifestations sympathomimétiques de l'hyperthyroïdie.

- L'iode inhibe rapidement la sécrétion des hormones thyroïdiennes. Pour éviter la constitution d'un stock hormonal intrathyroïdien trop important il est recommandé de n'administrer l'iode que plusieurs heures après le commencement du traitement anti-thyroïdien.

L'iode est utilisé dans le cas de thyrotoxicoses aiguës.

- Lithium

- Les glucocorticoïdes :

A forte dose, ils peuvent diminuer l'hypersécrétion de T4 au cours de la maladie de Basedow. Ils diminuent également la conversion périphérique de T4 en T3.

Leur utilisation a un effet adjuvant bénéfique.

1.2.5.2.3.2 Traitement chirurgical :

Il est rarement utilisé en première intention (dans 1 % des cas).

Mais la thyroïdectomie constitue le traitement initial de la maladie de Basedow avec goitre important.

En général la thyroïdectomie est subtotale, il est recommandé de laisser en place environ 5 gr de tissu thyroïdien.

Avant l'intervention il est obligatoire de revenir à l'état d'euthyroïdie. Celui-ci est généralement obtenu après 6 à 8 semaines de traitement par les ATS.

Avant l'opération l'administration de solution de Lugol fort ou de KI saturé est parfois effectuée.

Une hypothyroïdie peut survenir après l'opération, elle peut être transitoire ou définitive.

1.2.5.2.3.3 Traitement par l'iode radioactif :

En Europe, c'est un traitement de première intention chez 25 % des sujets présentant une maladie de Basedow type [44,45].

L'isotope utilisé est l'¹³¹I.

Son action thérapeutique est due à son émission de rayons bêta. Les propriétés de captage et d'incorporation de l'iode dans les composés organiques de la synthèse hormonale thyroïdienne permettent une irradiation interne, sélective au niveau cellulaire avec un respect relatif des autres organes.

L'¹³¹I est administré par voie orale ou par voie veineuse en cas de troubles digestifs.

La dose administrée est fonction de la masse de la glande ainsi que du pourcentage de fixation thyroïdienne.

Le traitement est effectué en une administration à dose forte ou en plusieurs administrations à dose faible selon les cas.

L'efficacité de ce traitement est importante :

7 malades sur 10 sont euthyroïdiens après 1 dose

2 " " 10 " " " 2 doses

1 " " 10 " " " 3 "

L'effet indésirable le plus fréquent est l'hypothyroïdie. Celle-ci peut être transitoire ou durable auquel cas il faut entreprendre une hormonothérapie.

2 Complexation-Constante de formation K_c :

Des auteurs ont observés des anomalies du système immunitaire chez des malades traités par des antithyroïdiens de synthèse [46,47,48,49].

Cette action des A.T.S. ne peut pas s'expliquer par l'action de ces molécules sur la peroxydase thyroïdienne car les lymphocytes n'en possèdent pas.

Les A.T.S. ont un autre mécanisme d'action, ils agissent sur l'iode moléculaire intrathyroïdien. Ils forment des complexes avec l'iode ce qui à pour conséquence d'empêcher l'iodation des restes tyrosyles de la Tg, et donc d'empêcher la formation d'hormones thyroïdiennes.

La formation de complexes par transfert de charge est due au fort pouvoir électrodonneur de ces molécules. Celui-ci est établi grâce au calcul d'une constante de formation de complexe appelée K_c (exprimée en $l.mole^{-1}$). L'étude des relations entre la valeur de la K_c et la structure chimique de nombreuses molécules à permis de déterminer l'importance de certains groupements chimiques. Ainsi la présence dans une molécule d'un enchaînement N-C-S et/ou d'un hétérocycle azoté insaturé, et/ou d'une chaîne alkylaminée ainsi que d'un groupement thioamide lui confère la capacité à former des complexe avec l'iode.

Ce mode d'action des A.T.S. est maintenant reconnu [50,51,52]

Nous avons envisagé que l'activité de ces molécules sur les lymphocytes est en rapport avec le pouvoir électrodonneur.

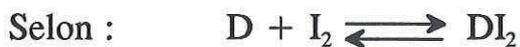
2.1 Complexe par transfert de charge : Définition

La formation de complexes par transfert de charge provient d'interactions entre un composé donneur et un composé accepteur d'électrons.

L'iode est la molécule acceptrice, car elle a une forte affinité pour les doublets d'électrons libres.

Le complexe par transfert de charge se forme grâce au transfert partiel ou total d'électrons d'une molécule, antithyroïdienne par exemple, à l'iode (théorie de Mulliken).

En pratique la formation de complexes par transfert de charge a lieu en solution. En effet ces complexes sont instables et n'existent qu'en solution diluées où ils sont en équilibre avec leurs composants.



Ces complexes sont aisément étudiés en solution grâce aux différences de propriétés spectrales existant entre eux et leurs composants, notamment grâce à la différence d'absorption de la lumière.

2.1.1 Deux catégories de donneurs :

- les " π donneurs " :

Ce sont les alcènes, les alcynes et les dérivés aromatiques.

- les "n donneurs" :

Ce sont les alcools, les sulfures organiques, les dérivés nitrés ou toutes autres molécules ayant une paire d'électrons libres pouvant donner lieu à la formation d'une liaison de coordination.

2.1.2 Deux catégories d'accepteurs :

- les " τ accepteurs" :

Ce sont par exemple I_2 , Br_2 , ICl , ICN ...

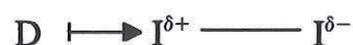
- les " π accepteurs" :

Ce sont des composés aromatiques substitués par des halogènes, par des fonctions nitrées.

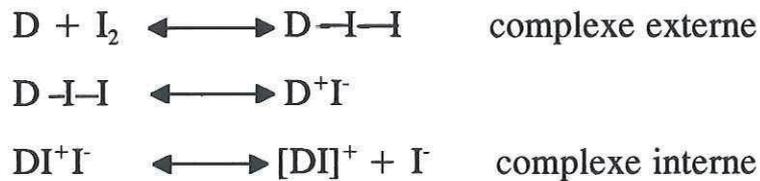
Les complexes par transfert de charge étudiés, entre les A.T.S. et l'iode, sont des complexes $n-\pi$.

2.1.3 Déroulement de la réaction de complexation :

Dans la molécule d'iode, la densité électronique est plus importante sur l'un des deux atomes d'iode ce qui explique qu'un atome porteur d'un doublet d'électrons libre (N, S ou O) puisse former une liaison dative avec l'iode.



Lors de la réaction, il se forme rapidement un complexe externe qui se transforme progressivement en complexe interne.



Rq : Les iodures libérés lors de la formation du complexe interne peuvent réagir avec l'iode présent dans la thyroïde pour donner des ions I_3^- .

Rq : Lors d'un traitement thyroïdien par les A.T.S., l'iode est détourné de sa voie métabolique normale par ces deux mécanismes :

- il ne peut plus être oxydé en I^+
- il ne peut plus se fixer sur les restes tyrosyls de la Tg

Il y a donc une diminution de la synthèse hormonale plus ou moins importante en fonction des doses d'A.T.S. utilisés.

2.2 Méthode d'étude :

2.2.1 Spectrophotométrie :

On mesure l'absorbance du complexe en équilibre avec ces constituants, selon la loi de Beer :

$$\text{D.O.} = \log I_0/I$$

I_0 : intensité du faisceau incident

I : intensité du faisceau émergent

2.2.2 Constante de formation du complexe K_c :

C'est en fait une constante d'équilibre de formation du complexe DI.

K_c s'exprime en l.mole^{-1} .

Elle est calculée par la méthode de Lang (valable seulement pour les complexes de stoechiométrie 1:1).

Formule de Lang :

$$\frac{[A_0][D_0]}{d_c} = \frac{1}{\varepsilon_c} \left[[D_0] + [A_0] - \frac{d_c}{\varepsilon_c} \right] + \frac{1}{K_c \cdot \varepsilon_c}$$

où $[A_0]$ = concentration initiale en accepteur (I_2)

$[D_0]$ = concentration initiale en donneur

d_c = absorbance de la solution de complexe

ε_c = coefficient d'extinction molaire du complexe

K_c = constante de formation du complexe

2.2.3 Calcul de la constante de formation K_c :

L'étude spectrophotométrique dans le visible des solutions D- I_2 montre des perturbations de la bande visible de l'iode.

Cette perturbation consiste en un déplacement hypsochrome.

Il apparaît une nouvelle bande d'absorption qui est appelée "bande de l'halogène complexé" (B.H.C.).

Les mesures étant effectuées pour différentes concentrations en donneur, s'il y a formation d'un complexe par transfert de charge, les spectres correspondants à chaque concentration différente se coupent en un même point appelé point isobestique.

La constante K_c est calculée à partir de ces différents spectres.

Une molécule est dite antithyroïdienne lorsque la valeur de sa constante K_c est supérieure ou égale à 100 l.mole^{-1} .

2.3 Molécules utilisées :

Afin de savoir si l'action immunomodulatrice des A.T.S. est en rapport avec le pouvoir électrodonneur nous avons décidé de travailler avec les deux molécules suivantes :

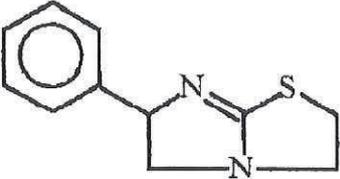
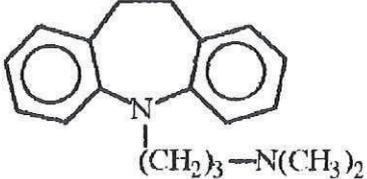
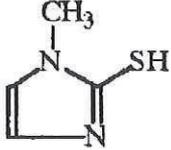
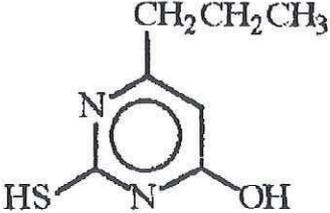
- le lévamisole $K_c = 823 \text{ l.mole}^{-1}$

- l'imipramine $K_c = 4907 \text{ l.mole}^{-1}$

Les résultats obtenus avec ces deux produits seront comparés avec des travaux, effectués au sein du laboratoire de Chimie Organique de la Faculté de Pharmacie de Limoges, portant sur deux A.T.S. majeurs :

le méthimazole (M.T.I.) $K_c = 23194 \text{ l.mole}^{-1}$

le propylthiouracile (P.T.U.) $K_c > 2500 \text{ l.mole}^{-1}$

Nom usuel et poids moléculaire	Dénomination chimique	Formule développée
Lévamisole P.M. 204,31	2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo [2,1-b]thiazole	
Imipramine P.M. 280,40	5-(3-diméthylaminopropyl)-10,11 dihydro-5H-dibenzo[b,f]-azépine	
Méthimazole P.M. 114,70	1-méthyl-2-thioimidazole	
Propylthiouracile P.M. 170,23	6-propyl-2-thiouracile ou 2-thio-4-oxo-6-propyl-1,3 pyrimidine	

3 Méthode d'étude :

Au cours de cette étude nous allons évaluer l'activité immunomodulatrice de deux molécules à visée antithyroïdienne. Pour cela nous envisageons de mesurer l'action de ces molécules sur le cycle cellulaire de lymphocytes à l'aide d'une technique appelée cytométrie en flux.

3.1 Le cycle cellulaire :

3.1.1 Le cycle nucléaire :

La croissance cellulaire est considérée comme une succession de phases caractérisées par des processus biochimiques spécifiques [53] regroupés sous le terme de cycle cellulaire.

Toute cellule doit assurer le renouvellement de son matériel génétique, au cours de la phase de synthèse d'ADN appelée phase S. Après quoi elle entre en phase de division, appelée phase mitotique, phase M.

Il existe également des intervalles de temps entre la phase M et la phase S ainsi qu'entre la fin de la phase S et le début de la phase M. On appelle ces intervalles de temps phase G_1 (G pour Gap : phase de repos), entre la phase M et la phase S, et phase G_2 , entre la phase S et la phase M.

Le cycle nucléaire est donc l'enchaînement de quatre phases successives G_1 - S - G_2 -M (Fig.2).

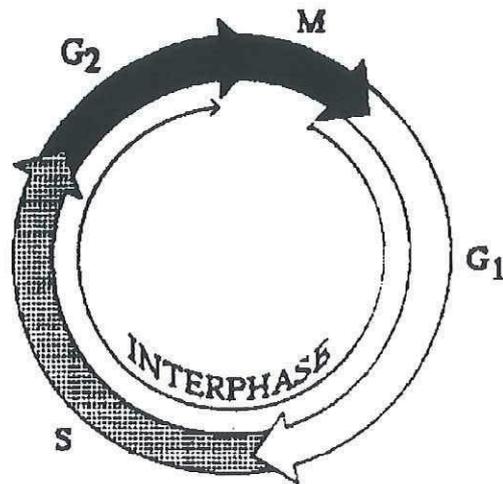


Fig.2 : Schéma représentant l'enchaînement des quatre phases du cycle nucléaire.

3.1.2 Le cycle de croissance :

Pour accéder à la phase mitotique, une cellule doit assurer, parallèlement à la réplication de son matériel génétique, le doublement de l'ensemble de ses constituants (la synthèse de ces constituants est généralement continue avec des taux variables au cours de l'interphase)[54].

Le cycle nucléaire et le cycle de croissance sont considérés comme deux phénomènes distincts, et leurs mécanismes de régulation paraissent différents [55,56]. Mais ces deux cycles, afin d'éviter un déséquilibre de la croissance cellulaire, doivent converger de façon synchrone vers la mitose [57,58].

3.1.3 Prolifération cellulaire :

Les cellules proliférantes sont les cellules traversant de façon continue les différentes phases du cycle.

Les différentes phases du cycle n'ont pas la même durée. Ainsi la phase mitotique est brève par rapport à la durée de l'interphase. Les phases S et G2 sont caractérisées par une durée relativement constante [59].

La durée de la phase G1 varie en fonction du type cellulaire entraînant des différences dans la durée de l'interphase, et donc dans celle du cycle cellulaire [60,61].

Les cellules peuvent arrêter temporairement leur progression dans le cycle, elles entrent alors en phase de quiescence (phase Q). Ce sont les travaux de Darzynkiewicz [62] par cytométrie en flux qui ont permis d'observer ces phases de quiescence. Il a aussi mis en évidence des états métaboliques intermédiaires entre la quiescence et la prolifération : ce sont les phases de transitions (phase T).

La phase de quiescence intervient généralement après la phase mitotique, les cellules demeurent alors quiescentes jusqu'à ce qu'un élément stimulant de l'environnement provoque à nouveau l'entrée dans le cycle.

La phase G1Q (ou G0) est donc la phase de quiescence la plus importante dans les conditions normales.

La quiescence n'est toutefois pas spécifique de la phase G1[63,64,65]. Il existe des phases de quiescence en S (phase SQ) ainsi qu'en G2 (phase G2Q)

(Fig.3,4).

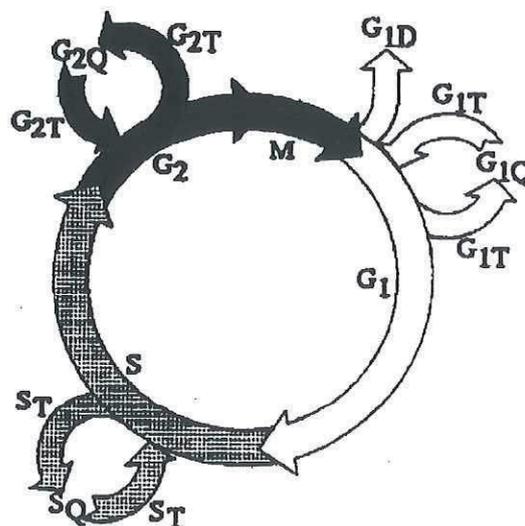


Fig.3 : Représentation schématique des phases de transition et de quiescence associées à G0G1, S et G2M.

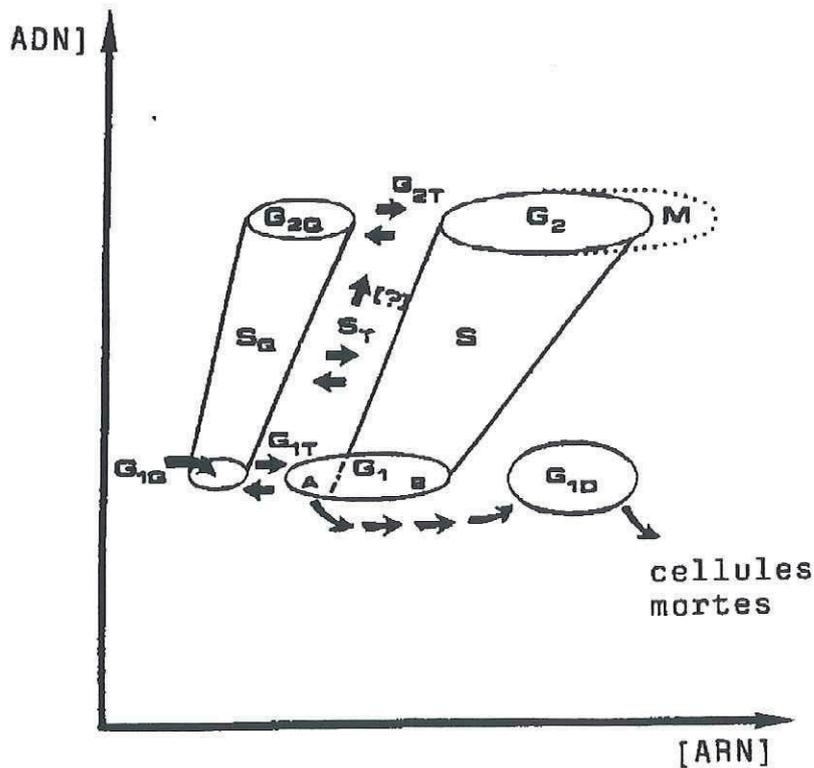


Fig.4 : Représentation schématique des phases et des sous phases du cycle cellulaire, après coloration de l'ADN et de l'ARN avec l'acridine orange d'après Darzynkiewicz.

3.2 La cytométrie en flux :

3.2.1 Principe :

Les cellules sont analysées de manière individuelle. Pour cela elles doivent être obligatoirement en suspension. Elles sont ensuite injectées sous pression au sein d'une veine liquide.

Un système de deux flux laminaires permet de réaliser un véritable capillaire liquide dont la section restreinte contraint les cellules à se présenter individuellement lors de leur interception par le faisceaux lumineux.

Ce faisceau lumineux provient généralement d'un laser, ce qui permet d'obtenir une lumière émise à une longueur d'onde bien définie, puissante et focalisée sur une faible surface (qui est à peu près celle de la cellule).

Lors de l'éclairement, la cellule émet un certain nombre de signaux optiques (tel que la lumière diffusée ou une fluorescence) qui parcourent des circuits optique constitué par une succession de miroirs et de filtres qui permet la séparation de différents signaux et leur acheminement vers des capteurs (photomultiplicateurs ou diodes).

Tous ces paramètres peuvent être étudiés simultanément. Le cytomètre mesure l'intensité de chaque signal . L'ensemble est ensuite numérisé et traité (Fig.5).

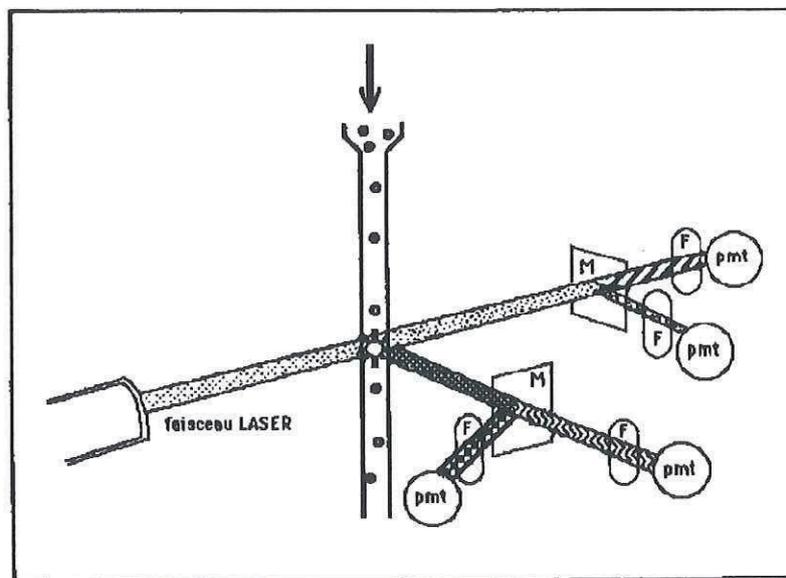


Fig.5 : Représentation schématique d'un cytomètre à flux.

M : miroirs dichroïques.

F : filtres interférentiels.

pmt : photomultiplicateurs.

La flèche indique le sens de défilement des cellules.

Les résultats sont accessibles, après traitement informatique des signaux électriques :

- sous forme d'histogramme :

Monoparamétrique : qui représente l'intensité du paramètre en abscisse et le nombre de cellules en ordonnée.

Biparamétrique : où deux paramètres sont mis en corrélation.

Ex: contenu en ADN et en protéines totales .

- sous la forme de tableaux statistiques indiquant par exemple le nombre de différents types cellulaires présents dans une préparation donnée, leur intensité moyenne de fluorescence, leur homogénéité...

3.2.2 Le cytomètre et son environnement :

3.2.2.1 Paramètres analysés :

Le cytomètre détecte des signaux optiques. Ces signaux peuvent être soit des signaux lumineux émis ou modifiés par des cellules non colorées soit une fluorescence naturelle ou conférée à la cellule par un colorant appelé fluorochrome.

3.2.2.1.1 Analyse de la fluorescence :

- Fluorochromes spécifiques d'éléments cellulaires :

Dans ce cas, le fluorochrome a une spécificité de fixation bien caractérisée sur un élément cellulaire, et l'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité de cet élément.

C'est par exemple le cas des marqueurs des acides nucléiques.

En mesurant l'émission de fluorescence après fixation d'un des marqueurs on pourra connaître le contenu cellulaire en ADN. Il existe de même des marqueurs spécifiques de protéines, des lipides, des ions ainsi que des marqueurs spécifiques d'organites tels que les mitochondries.

- Fluorochromes liés à un marqueur spécifique d'élément cellulaire :

Le fluorochrome est alors fixé sur un marqueur spécifique d'un site cellulaire.

Les marqueurs les plus connus sont les anticorps monoclonaux.

Tableau des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie en flux : (tableau 6).

- Utilisation des propriétés intrinsèques de fluorescence

Propriétés étudiées	Fluorochromes	L.O. d'exc.	L.O. d'émis.	Type laser	Raie laser	Fixation
Ag et récepteurs	FITC	494 nm	517 nm	Ar	488 nm	Protéines
Contenu en protéines	Phycocérythrine	540 nm	570 nm	Ar	488,514 nm	
	Allophycocyanine	650 nm	660 nm	He Ne color	633 nm	
	Rouge Texas	596 nm	615 nm	Kr color	568 nm	
	XRITC	585 nm	620 nm	Kr color	568 nm	
Cycle cellulaire	IP	540 nm	625 nm	Ar	488,514 nm	ADN et ARN
Viabilité cellulaire				Kr	531 nm	
Pléide						double
Caryotype en flux	Bromure d'éthidium	518 nm	610 nm	Ar	488,514 nm	brin
Caryotype en flux						ADN
Cycle cellulaire (toxicité limitée)	Hoescht 33342	350 nm	460 nm	Ar, Kr, He Cd	U.V.	Région A-T
Caryotype en flux	DAPI	340 nm	450 nm	Ar, Kr		ADN
Cycle cellulaire	Chromomycine	420 nm	555 nm	He Cd	U.V.	Région G-C
	Mithramycine					
Etude simultanée de l'ADN et de l'ARN	Acridine orange	490 nm	530 nm	Ar	488 nm	ADN
		500 nm	640 nm	Ar	488 nm	ARN
Contenu en ARN	Pyronine Y	540 nm	580 nm	Ar	457 nm	ARN
Activité mitochondriale membranaire	Rhodamine 123	500 nm	525 nm	Ar	488 nm	Membrane mitochondriale
Masse membranaire mitochondriale	Nonyl-acridine orange (NAO)	489 nm	525 nm	Ar	488 nm	
Microviscosité membranaire	Di-phenyl hexatriène	358 nm	445 nm	Ar	U.V.	Lipides
Mesure du pH	BCECF	500 nm	570 nm	Ar	488 nm	Intracellulaire
Flux de calcium	Indo-1	363 nm	480 nm	Ar, Kr	U.V.	Libre
			405 nm	He Cd		Lié au calcium

Tableau 6 : Principaux fluorochromes avec leur site d'action, λ exc. et λ em.

3.2.2.1.2 Analyse de la lumière diffusée :

Certaines propriétés cellulaires peuvent être mises en évidence sans coloration, en étudiant la transmission de la lumière par la cellule.

- Sous un angle inférieur à 10° ou diffusion aux petits angles (FAS, forward angle scatter, ou FSC) : l'intensité varie surtout avec la taille de la cellule, la lumière considérée est alors essentiellement de la lumière diffractée.

- Sous un angle de plus grande valeur (angle droit) ou diffusion aux grands angles (RAS, right angle scatter, ou SSC) : on recueille surtout la lumière réfractée et réfléchie.

La réfraction est due à la déviation du rayon qui pénètre non perpendiculairement dans le cytoplasme (dans un milieu transparent).

La réflexion est due à la traversée de milieux différents par le rayon incident; ce dernier est en partie renvoyé vers le premier milieu lorsqu'il rencontre le second.

L'intensité de la réflexion et de la réfraction sont fonction des différentes propriétés intrinsèques de la cellule comme la réfringence du cytoplasme, la présence de granulations et le rapport nucléocytoplasmique.

L'étude de la lumière diffusée permet de caractériser différents types cellulaires comme les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires.

3.2.2.1.3 La lumière absorbée :

Eclairée par une source de faible intensité, très stable et bien focalisée, "l'ombre portée" d'une cellule sphérique, détectée par une photodiode, est proportionnelle à son volume.

Le volume cellulaire mesuré par ce signal est plus précis que les résultats obtenus par quantification de la lumière diffusée.

3.2.2.2 Mise en suspension des cellule :

Les cellules doivent être impérativement mises en suspension monodispersées dans une solution tampon.

Elles sont injectées au centre d'une veine liquide sous pression qui les aligne et les conduit devant le faisceau pour en faire l'analyse.

- **Trieurs :**

Sur de nombreux appareils, la veine liquide peut être fractionnée en gouttelettes contenant chacune une cellule pour en permettre le tri.

Ce système de fractionnement est constitué d'un cristal piezo électrique. Par ces vibrations ce cristal décompose le flux liquide en une succession de gouttelettes contenant chacune une cellule isolée.

Les gouttelettes, étant chargées électriquement, vont être déviées lors de leur passage dans un champ électrique créé entre les deux plaques d'un condensateur.

Si le cytomètre détecte une cellule à sélectionner, les plaques du condensateur se chargent, la gouttelette est alors attirée par la plaque de signe opposé, sa trajectoire modifiée l'entraînant vers un tube collecteur.

Si la cellule analysée n'est pas sélectionnée, les plaques du condensateur ne se chargent pas et la gouttelette est éliminée dans la gouttière centrale.

Rq: Le triage ne sera pas utilisé lors de nos manipulations.

3.2.2.3 L'optique :

3.2.2.3.1 Sources d'excitation :

Les sources lumineuses des cytomètres sont généralement constituées par un laser ou par une lampe.

Il est à noter que selon le type de source utilisé seulement certains fluorochromes pourront être employés.

3.2.2.3.1.1 Les lampes :

Les lampes les plus utilisées en cytométrie sont les lampes à vapeur de mercure ou de xénon.

Les lampes permettent d'utiliser un grand nombre de fluorochromes car la lumière émise à un spectre élargi.

L'installation nécessite des lentilles pour focaliser la lumière, ainsi que des filtres optiques pour sélectionner la longueur d'onde désirée.

3.2.2.3.1.2 Les lasers :

Le grand intérêt des lasers est qu'ils produisent une lumière

- monochromatique (ce qui permet d'exciter spécifiquement un seul fluorochrome).
- puissante
- focalisée (sur une surface proche de celle de la cellule)
- stable

Les lasers les plus utilisés sont les lasers à ions argon qui ont comme intérêt d'émettre leur maximum de puissance à 488 et à 514 nm. De très nombreux fluorochromes étant efficacement stimulés à ces longueurs d'onde.

(Souvent un second laser est adjoint pour étendre la gamme des fluorochromes utilisables).

3.2.2.3.2 Filtres et miroirs :

La présence de filtres et de miroirs est nécessaire pour pouvoir différencier les différents signaux optiques. Ils permettent entre autre de séparer la fluorescence émise par la cellule de la lumière diffusée, ainsi que de la lumière provenant de la source d'excitation. De plus une cellule pouvant émettre

simultanément plusieurs signaux de fluorescence, il convient de les différencier.

3.2.2.3.2.1 Les miroirs dichroïques :

Ils aiguillent chaque signal optique vers son détecteur. Ils permettent le passage d'un signal dans une direction (transmission) et l'envoi d'un autre signal dans une autre direction (réflexion). La sensibilité doit être la plus grande possible aux longueurs d'onde que l'on veut recueillir (absorption).

Les caractéristiques essentielles d'un miroir dichroïque sont le pourcentage de transmission et la longueur d'onde limite transmise.

La transmission peut avoir lieu, selon le type de miroir, au dessus ou en dessous de cette valeur.

Dans le premier cas le miroir est dit passe haut ou long pass et dans le second cas il est dit passe bas ou short pass.

3.2.2.3.2.2 Les filtres :

Les signaux transmis par le miroir ne peuvent être mesurés qu'après soustraction de toutes les lumières annexes.

C'est le rôle des filtres.

Un filtre doit donc laisser passer au maximum le signal optique qui intéresse le manipulateur.

Il existe des filtres passe haut, passe bas , passe bande ou bloque bande.

3.2.2.3.3 La chambre d'analyse :

Elle peut être inexistante. La rencontre entre le faisceau lumineux et la cellule se fait alors directement dans l'air.

Si elle est présente, elle est généralement constituée de parois planes en quartz.

3.2.2.3.4 Les détecteurs :

Les détecteurs d'énergie lumineuse sont des photomultiplicateurs. Ils ont pour rôle de convertir une énergie lumineuse en énergie électrique, après amplification celle-ci pourra être enregistrée précisément par les composant électroniques du cytomètre.

3.2.2.4 Traitement du signal optique et analyse :

Le signal optique reçu, une fois transformé en signal électrique ne peut être exploité facilement de la sorte.

Survient alors la phase de transformation, à l'aide d'un convertisseur analogique-digital qui permet de numériser les signaux électriques ce qui les rend stockables et exploitables par un système informatique adapté.

Les données sont alors sous forme de nombres qui à l'aide d'un logiciel peuvent être représentés sous une forme utilisable par le manipulateur.

Pour que le traitement ait lieu, l'opérateur doit avoir préalablement défini un seuil de tension au dessus duquel s'effectue la prise en compte du signal. Il doit également définir le (ou les) paramètre(s) qui déclenche(nt) le traitement des signaux.

Une fois l'amplification effectuée, le convertisseur analogique-digital transforme le signal analogique en une série de nombres entiers qui pourra être stockée dans la mémoire de l'ordinateur.

Les données ainsi obtenues peuvent ensuite être utilisées grâce à un logiciel.

Les résultats sont alors immédiatement accessibles sous deux formes différentes :

- sous la forme de tableaux statistiques indiquant par exemple le nombre des différents types cellulaires présents dans la préparation, leur homogénéité ...

- sous la forme d'histogrammes :

Ces histogrammes sont dits monoparamétriques lorsqu'ils représentent l'intensité d'un paramètre en abscisse et le nombre de cellules en ordonnée.

Ils sont aussi dits biparamétriques lorsque deux paramètres sont mis en corrélation.

3.2.3 Application à l'étude du cycle cellulaire :

Nous allons effectuer différents types d'analyses sur des populations lymphocytaires préalablement mises en culture afin d'étudier la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle et l'influence sur cette répartition, de drogues ajoutées, à différentes concentrations, au milieu de culture.

Les analyses peuvent être de type monoparamétrique ou biparamétrique.

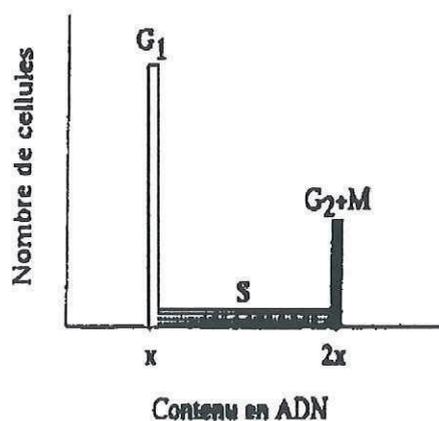
3.2.3.1 Analyse monoparamétrique :

Il existe une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence émise par le fluorochrome et la quantité d'ADN cellulaire [66]. Ceci est dû au fait que les molécules fluorescentes utilisées se fixent spécifiquement et de manière stoechiométrique à l'ADN de la cellule.

Au sein d'une population asynchrone le contenu en ADN diffère selon les cellules. Les cellules en phase G₀ et G₁ sont caractérisées par un contenu en ADN de x , alors que les cellules en phase G₂ et M ont un contenu égale à $2x$. Les autres ont une teneur en ADN intermédiaire, comprise entre x et $2x$. Ces dernières représentent la phase S, au cours de laquelle se déroule la synthèse d'ADN, ce qui permet aux cellules en G₁ de doubler leur teneur en ADN.

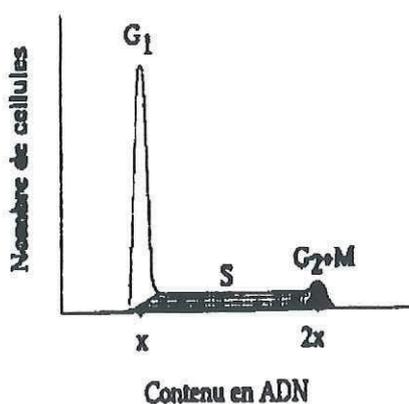
Il est possible d'établir l'histogramme de distribution théorique des cellules dans le cycle en fonction de leur intensité de fluorescence donc en fonction de leur contenu en ADN (Fig.7a).

Fig.7a



En fait l'histogramme réel n'est pas équivalent à l'histogramme théorique, il existe en effet une dispersion de la fluorescence détectée par rapport à la valeur théorique (Fig.7b).

Fig.7b



Ceci est du à différents paramètres :

- Variations de la fixation du fluorochrome, pour des cellules ayant le même contenu en ADN, dues à l'état de concentration de la chromatine ainsi qu'à la présence des protéines nucléaires.

- Instabilités dues au cytomètre : position de la cellule dans le faisceau lumineux, variabilité du rendement des détecteurs ...

Pour estimer avec précision la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle une analyse mathématique est nécessaire car l'histogramme de distribution des cellules en fonction de leur contenu en ADN ne permet pas de faire une distinction nette entre G0G1 et S ou S et G2M.

Des modèles mathématiques ont été réalisés, le cycle cellulaire bénéficie de nombreux algorithmes adaptés à l'analyse des histogrammes de distribution.

L'ensemble de ces modèles mathématiques proposés a pour but de définir la phase d'appartenance des cellules au niveau des zones de recouvrement entre G0G1 et S ou S et G2M.

Il existe des méthodes graphiques et des méthodes paramétriques :

- Les méthodes graphiques sont rapides mais peu précises, elles ne font d'hypothèses que sur certaines phases du cycle, les autres phases étant estimées par exclusion. Le modèle I de Baisle [67] ou méthode des rectangles, nécessite des coefficients de variation relativement faibles, des populations asynchrones et peu de cellules en phase S.

La méthode de Barlogie [68], ou méthode du miroir, peut s'appliquer à des populations synchrones ou non, mais les estimations sont sujettes à fluctuations si les coefficients de variation ne sont pas assez grands.

Ces deux modèles tendent à sous estimer S.

- Les méthodes paramétriques, ou par ajustement, consistent à réaliser un modèle mathématique et à le comparer avec la distribution obtenue lors de l'analyse.

Ceci est fait afin de déterminer différents paramètres (pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle, coefficient de variation des pics G0G1 et G2M).

D'une façon générale, les phases G0G1 et G2M sont assimilées à des courbes gaussiennes tandis que la phase S est représentée par une fonction qui est caractéristique du modèle considéré.

Les modèles les plus courants sont ceux de Dean et Jett [69], de Fox [70] et de Fried [71].

L'algorithme de Dean et Jett permet d'évaluer correctement la phase S d'une population asynchrone, mais G2M est généralement surestimée au dépend de G1. De plus il est difficile d'appliquer ce modèle à des populations synchrones lorsqu'une phase du cycle est peu représentée ou quand les coefficients de variation de G0G1 et G2M sont importants.

Le modèle de Fox est utilisable pour des populations cellulaires partiellement synchronisées (partiellement en phase S). Il permet d'apprécier correctement G2M. Ce modèle surestime fréquemment S au dépend de G1.

Le modèle de Fried permet d'évaluer G2M pour des populations asynchrones ou partiellement synchronisées (particulièrement en G2). Comme le modèle de Fox il surestime souvent S au dépend de G1.

Il n'existe donc pas de modèle mathématique idéal, le choix de la méthode étant fonction de l'échantillon analysé.

Rq: Lors d'une analyse monoparamétrique il est nécessaire de différencier les doublets de cellules en G1 des cellules en G2M en réalisant une analyse de la fluorescence selon les modes pic et surface.

- Intérêt et limites :

L'analyse monoparamétrique du contenu cellulaire en ADN permet de réaliser une estimation rapide de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle.

Il n'est pas possible de discriminer les cellules en G2 des cellules en M et de mettre en évidence les phénomènes de quiescence et de prolifération.

C'est pour cela que nous utiliserons des analyses biparamétriques.

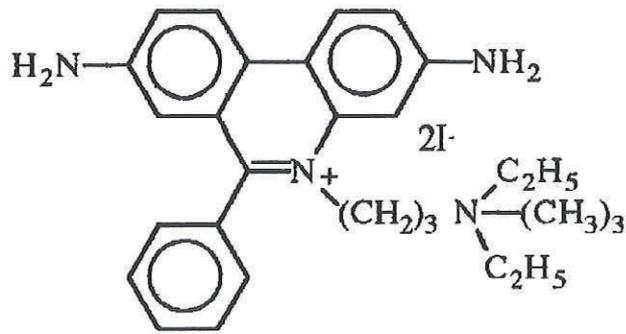
3.2.3.2 Analyse biparamétrique

3.2.3.2.1 Analyse biparamétrique du contenu cellulaire en ADN et en protéines :

Les techniques employées ont été décrites par Crissman [72].

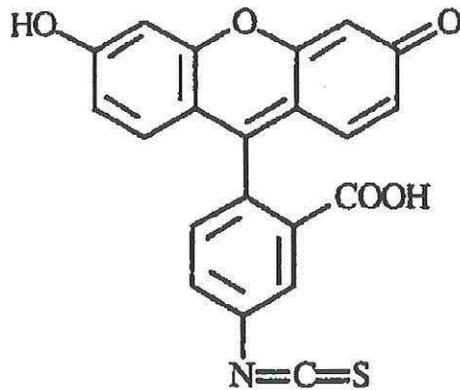
- Principe :

L'ADN cellulaire est marqué par une molécule intercalante des acides nucléiques doubles brins, l'iodure de propidium.



Formule chimique de l'IP

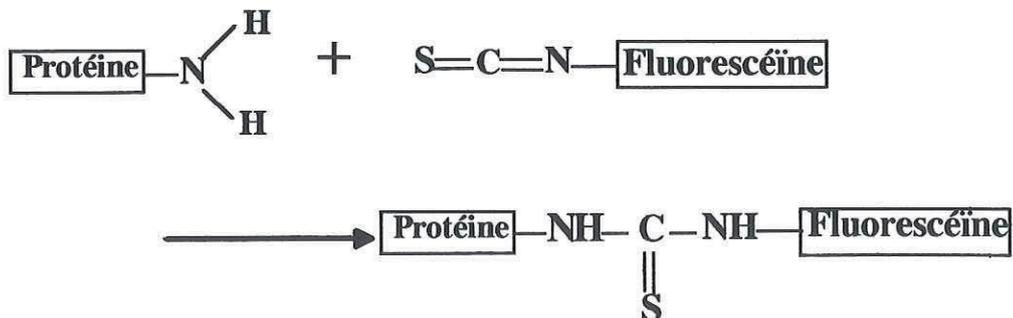
Les protéines totales sont marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine (F.I.T.C.) .



Formule chimique de la FITC

Rq : L'I.P. pouvant également se fixer sur l'ARN double brin il est nécessaire de traiter les cellules par de la RNase pour obtenir une coloration stoechiométrique de l'ADN.

Fixation de la F.I.T.C. sur les groupements aminés protéiques :



- Analyse des résultats :

L'analyse des histogrammes de distribution de l'ADN est effectuée selon l'algorithme de Fried.

Ce test nous permet de quantifier l'action des drogues testées sur le cycle cellulaire.

C'est une méthode d'analyse du cycle cellulaire plus fiable et plus précise que l'analyse monoparamétrique.

Cette technique est utilisée dans un premier temps pour montrer si les molécules testées ont une action ou non sur les cellules et à quelle concentration.

3.2.3.2.2 Analyse du cycle après incorporation de

BrdU :

C'est une technique qui a été décrite par Gray [73].

- Principe :

La 5-Bromodéoxyuridine (BrdU) est un analogue de la thymidine.

Mis dans le milieu de culture elle est incorporée dans l'ADN des lymphocytes en cours de réplication au niveau de la phase S. La BrdU est "révélée" par marquage indirect. Ceci s'effectue par fixation d'anticorps monoclonal anti BrdU qui est mis en évidence par un anticorps polyclonal de chèvre anti-souris qui est couplé à la F.I.T.C. dont la fluorescence peut être détectée.

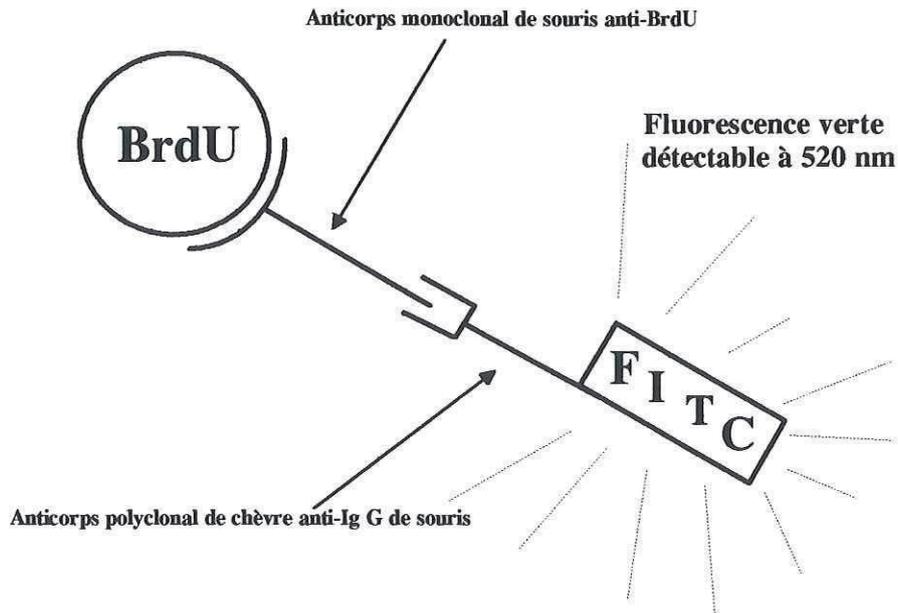


Fig.8 : Marquage indirect de la BrdU.

La comparaison entre l'intensité de la fluorescence caractérisant la BrdU et celle de l'IP marquant l'ADN total permet de reconnaître les sous populations quiescentes des sous populations proliférantes. En effet seule ces dernières sont capables d'incorporer de la BrdU au cours du temps d'incubation qui est de 30 minutes (car en un temps si court seules les cellules allant vite dans la phase S peuvent l'incorporer, ce sont donc les cellules étant en Sp).

Ce test sera employé pour des molécules qui ont une action sur le cycle cellulaire au niveau de la phase S.

4 Matériel et méthode :

4.1 Matériel biologique :

Cette étude a été réalisée sur des lymphocytes du sang périphérique humain obtenu par veinoponction sur tube hépariné [74].

Les sujets sont tous volontaires, hommes ou femmes d'âge divers, sans pathologie connue ni traitement médicamenteux.

Les prélèvements sont tous réalisés entre 8 h 30 et 9 h 30, en raison du rythme circadien des lymphocytes périphériques [47,74,75].

4.2 Culture cellulaire :

Les échantillons sont traités dans l'heure qui suit leur prélèvement

Toutes les manipulations sont effectuées sous une hotte à flux laminaire, avec du matériel stérile, afin d'éviter toute contamination lors de la mise en culture.

4.2.1 Séparation des lymphocytes :

Les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) sont isolées grâce à un gradient de densité (MSL Eurobio).

* Mesurer le volume de sang à traiter et le diluer au demi avec du PBS, pH 7.4, Sigma.

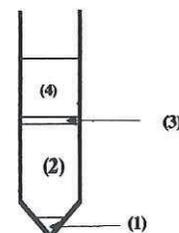
* Mettre du MSL, en quantité égale au volume de sang préalablement mesuré, dans un tube de 50 ml à fond conique en polypropylène Greiner.

* A l'aide d'une pipette verser goutte à goutte le sang dilué sur le MSL. Il ne doit pas y avoir mélange des deux phases, le sang dilué doit rester à la surface du MSL.

* Centrifuger pendant 25 minutes à 1500 g.

Les cellules mononuclées se trouvent dans la partie blanche du tube. En effet après la centrifugation, le tube est formé de trois parties de couleurs distinctes:

- une partie rouge brune au fond du tube contenant les hématies (1).
- une partie translucide, contenant le MSL et les cellules polynuclées (2).
- un anneau central blanchâtre contenant les cellules mononuclées (3)
- une partie supérieure orangée contenant le plasma et les plaquettes sanguines (4).



* Prélever l'anneau de cellules mononuclées et le mettre dans un tube vide.

* Centrifuger 10 minutes à 420 g.

* Enlever le surnageant, ajouter du PBS puis remettre en suspension.

* Effectuer à nouveau les deux dernières opérations.

* Centrifuger 10 minutes à 420 g, éliminer le surnageant puis reprendre le culot par une petite quantité de RPMI complet (environ 3 ml).

(RPMI 1640 Sigma contenant 2 mM de L-glutamine, 25 mM de tampon HEPES, 2 g/l de bicarbonate de Na, 10 % de sérum de remplacement décomplémenté Sigma CPSR-2, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine).

* Remettre en suspension.

* Compter les lymphocytes sur cellule de Malassez. C'est un comptage par ml. Ramener au nombre de ml présents dans le tube.

Sachant qu'il faut 1.5 million de cellules/ml pour une cupule, déterminer le nombre de cupule que l'on peut remplir.

4.2.2 Préparation des solutions de produits à tester :

Les molécules à tester sont dissoutes dans le milieu de culture à différentes concentrations. Ceci limite l'application de ce test à des molécules solubles dans le milieu aqueux.

Pour chaque drogue choisie nous préparerons quatre solutions de concentrations différentes allant de 10^{-3} M à 10^{-6} M.

4.2.3 Substance stimulant la prolifération :

Lectine : c'est une substance d'origine naturelle qui, sans agir comme un antigène, est néanmoins capable in vitro de provoquer certains phénomènes ressemblant à des réactions immunitaires tels que la transformation blastique des lymphocytes ou l'agglutination des globules rouges.

Nous utilisons la phytohémagglutinine (P.H.A.), c'est une lectine possédant un récepteur sur les lymphocytes T. Elle possède un effet mitogène sur les lymphocytes.

La PHA utilisée est la PHA M, elle correspond à la fraction mucoprotéique extraite de la graine de *Phaseolus vulgaris*, elle est commercialisée par Boehringer Mannheim.

La solution de PHA est préparée à la concentration de $150 \mu\text{g/ml}$. Cette concentration est choisie de telle façon que l'addition de $150 \mu\text{l}$ par cupule de culture (1.5 ml) aboutisse à la concentration finale de $15 \mu\text{g/ml}$.

Cette concentration efficace a été déterminée, lors de travaux effectués préalablement au laboratoire, selon les critères suivant :

- viabilité cellulaire supérieure à 85 %
- activation des lymphocytes : augmentation de la population en phase S et G2M.
- accroissement de la taille (FAS) et de la réfringence (RAS).

Ces critères ont été déterminé par cytométrie en flux par l'étude de paramètres morphologiques et du contenu en ADN et protéines totales.

4.2.4 Mise en culture :

Les lymphocytes sont cultivés dans des plaques de 24 puits en polypropylène Greiner d'un volume de 3.5 ml.

Les analyses seront effectuées sur des séries de six cupules :

- une cupule témoin (ne contenant ni PHA, ni molécule à tester)
- une cupule PHA (contenant la PHA mais ne contenant pas la molécule à tester).

- quatre cupules contenant la PHA, et la molécule à tester à différentes concentrations :

une cupule à 10^{-4} M

une cupule à 10^{-5} M

une cupule à 10^{-6} M

une cupule à 10^{-7} M

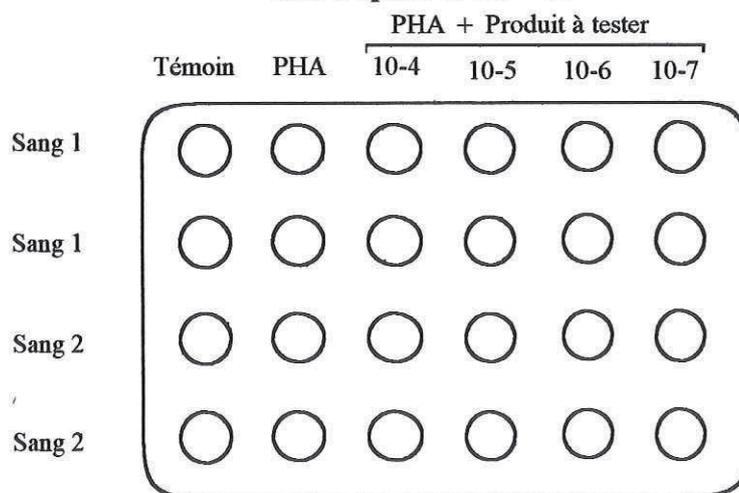


Fig.9 : Répartition des différents produits dans les cupules de la plaque de culture.

Mettre 1 ml de la suspension de lymphocyte dans chaque cupule.

Ajouter dans la cupule témoin 500 μl de RPMI complet pour un volume final de 1.5 ml.

dans la cupule PHA 350 μl de RPMI complet
150 μl de PHA

dans les cupules contenant les solutions à tester

200 μl de RPMI complet

150 μl de PHA

150 μl de la solution correspondante dans

la cupule soit

150 μl de la solution 10^{-3} M dans la cupule 10^{-4}

150 μl de la solution 10^{-4} M dans la cupule 10^{-5}

150 μl de la solution 10^{-5} M dans la cupule 10^{-6}

150 μl de la solution 10^{-6} M dans la cupule 10^{-7}

Les cultures sont donc effectuées à la densité de $1 \cdot 10^6$ cellules / ml.

Les plaques sont mises à incuber pendant 68 h à 37 °C, dans une atmosphère saturée en humidité, contenant 5 % de gaz carbonique.

4.2.5 Arrêt de la culture cellulaire :

Après 68 h de culture, effectuer une remise en suspension du contenu des cupules .

Prélever ensuite le contenu de chaque cupule et le verser dans un tube. Lors du prélèvement, utiliser autant d'embout différents qu'il y a de cupules différentes.

S'il y a deux lots de sang sur une plaque de culture les tubes seront numérotés de la manière suivante:

sang 1	T1 tube correspondant à la cupule témoin du sang 1				
	P ₁	"	"	" "	" PHA du sang 1
	4 ₁	"	"	" "	" produit 10 ⁻⁴ du sang 1
	5 ₁	"	"	" "	" produit 10 ⁻⁵ du sang 1
	6 ₁	"	"	" "	" produit 10 ⁻⁶ du sang 1
	7 ₁	"	"	" "	" produit 10 ⁻⁷ du sang 1

De même pour le sang 2 T₂, P₂, 4₂, 5₂, 6₂, 7₂.

Centrifuger les tubes 10 minutes à 420 g.

Pendant la centrifugation ajouter 1 ml de PBS dans les cupules ; "gratter" le fond des cupules avec les embouts correspondants, afin de décoller les lymphocytes qui n'auraient pas été remis en suspension préalablement.

Reprendre le PBS et le mettre avec les culots correspondants de la centrifugation.

Effectuer un nouveau lavage en centrifugeant 10 minutes à 420 g.

Eliminer le surnageant.

Remettre en suspension dans du PBS, compter les cellules et ajuster leur concentration à 5 millions par ml.

Fixer les cellules en ajoutant goutte à goutte un volume double d'éthanol pour une concentration finale de 1/3 de PBS et 2/3 d'éthanol dans le cas d'une étude du contenu ADN-Protéines.

Les cellules peuvent ainsi être conservées au congélateur en vue de leur utilisation ultérieure, après coloration, en cytométrie en flux.

4.3 Coloration en vue de l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux :

4.3.1 Analyse du contenu en ADN-Protéines :

La coloration ne peut avoir lieu qu'après fixation des cellules, ce qui augmente la perméabilité membranaire et permet aux réactifs de pénétrer dans la cellule.

Les cellules fixées sont lavées 3 fois dans du PBS avant la coloration.

Prélever 820 μl de la suspension cellulaire ajouter 100 μl d'iodure de propidium (à 180 $\mu\text{g.l}^{-1}$), 50 μl d'isothiocyanate de fluoréscéïne (à 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) et 60 μl de RNase (à 500 U. ml^{-1} , chauffée 10 minutes à 70 °C pour éliminer toute trace de DNase résiduelle)Boehringer.

La préparation est maintenue 20 minutes à température ambiante, puis une heure à + 4 °C à l'obscurité, avant d'être analysée en cytométrie.

La stabilité de la coloration dure 3 heures.

4.3.2 Analyse du cycle cellulaire après incorporation de BrdU:

La BrdU s'incorpore à l'ADN cellulaire en cours de phase S, c'est un analogue de la thymidine.

Après culture, les cellules, à la densité de 1.10^6 cellules/ml, sont maintenues dans leur milieu à 37 °C. La BrdU (à 0.9 mg/ml, Calbiochem) est ajoutée pendant 30 minutes à raison de 10 μ l par ml de suspension cellulaire.

La réaction est arrêtée par addition de PBS froid (+ 4 °C).

Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS par centrifugation à 450 g pendant 10 minutes. Elles sont ensuite fixées à l'éthanol.

Avant le marquage de la BrdU fixée par la cellule, il faut procéder à l'élimination des histones. Cette étape est obligatoire pour que l'anticorps anti-BrdU puisse reconnaître la BrdU incorporée dans la double hélice d'ADN, mais elle provoque une dénaturation de cette dernière. Il faut limiter cette dénaturation pour que la fixation de l'iodure de propidium reste stoechiométrique.

Pour cela les cellules fixées à l'éthanol sont centrifugées 5 minutes à 300 g, puis remises en suspension dans 1 ml d'acide chlorhydrique 2N (Prolabo), et maintenues 30 minutes à température ambiante.

Le pH du milieu est ensuite neutralisé par trois lavages des cellules dans du PBS contenant 0.5 % de Tween 20 (Interchim) froid (+4 °C).

Coloration des cellules :

- Marquage indirect de la BrdU :

Les cellules sont remises en suspension dans 50 μ l de PBS-0.5 % Tween 20 froid et incubées 30 minutes à température ambiante, avec 10 μ l d'anticorps monoclonal anti-BrdU (Immunotech).

Après deux lavages dans du PBS-Tween, par centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est remis en suspension dans 50 μ l de PBS-tween, et incubé 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité, avec 10 μ l d'anticorps polyclonal de chèvre anti-souris couplé à la FITC (Immunotech), reconnaissant l'anticorps anti-BrdU déjà fixé.

- Marquage de l'ADN par l'iodure de propidium :

Ajouter 50 μ l d'iodure de propidium à 0.5 mg.ml⁻¹ quelque minutes avant l'analyse par cytométrie en flux.

4.4 Réglages du Cytomètre :

Les échantillons sont analysés grâce à un cytomètre Ortho 50 H (Ortho Diagnostic Systems, USA) . La source utilisée est un laser argon (Innova 90-4 Coherent, USA) émettant une lumière à la longueur d'onde de 488 nm.

Les données ont été traitées par un ordinateur (MCA 300, Brüker, France) couplé au cytomètre.

Les échantillons sont analysés et des fenêtres de sélection sont choisies sur les paramètres taille (FAS, forward angle scatter) et réfringence (RAS, Right angle scatter) afin d'éliminer de l'analyse les débris et les agrégats, et de sélectionner la population cellulaire qui nous intéresse (Fig.10).

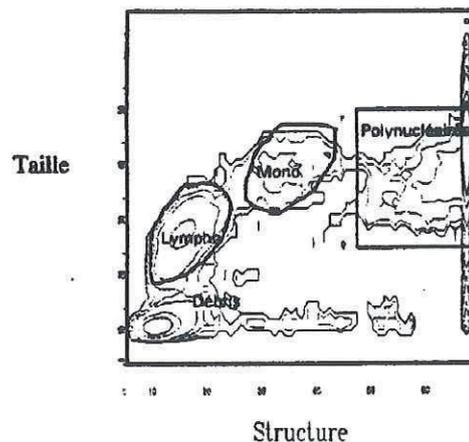


Figure 10 : Représentation des fenêtres permettant la sélection de la population voulue en fonction de la taille et de la réfringence cellulaire.

La fluorescence verte émise par la F.I.T.C. (protéines et BrdU) est recueillie par un filtre passe bande 520 ± 20 nm.

La fluorescence rouge émise par l'iodure de propidium (ADN) est recueillie par un filtre long pass 615 nm.

5 Résultats :

5.1 Etude du cycle cellulaire par mesure du contenu en ADN et en protéines :

5.1.1 Imipramine :

L'étude du cycle cellulaire est effectuée sur 12 séries, chaque série comportant une cupule témoin, une cupule contenant de la P.H.A. seulement, et quatre cupules contenant chacune de la P.H.A. et une solution d'imipramine à chacune des quatre concentrations testées.

Nous effectuons une moyenne portant sur toutes les séries, ce qui conduit au tableau de résultats suivant :

	Population en G0G1 (%)	Population en S (%)	Population en G2M (%)
Témoin	75,7	19,3	5,0
P.H.A.	60,0	29,2	10,8
Imipramine $10^{-7}M$	52,6	34,1	14,1
Imipramine $10^{-6}M$	58	29,7	12,3
Imipramine $10^{-5}M$	59,2	30,0	10,8
Imipramine $10^{-4}M$	61,1	30,3	8,7

Tableau 11 : Répartition de lymphocytes dans les différentes phases du cycle cellulaire en pourcentage.

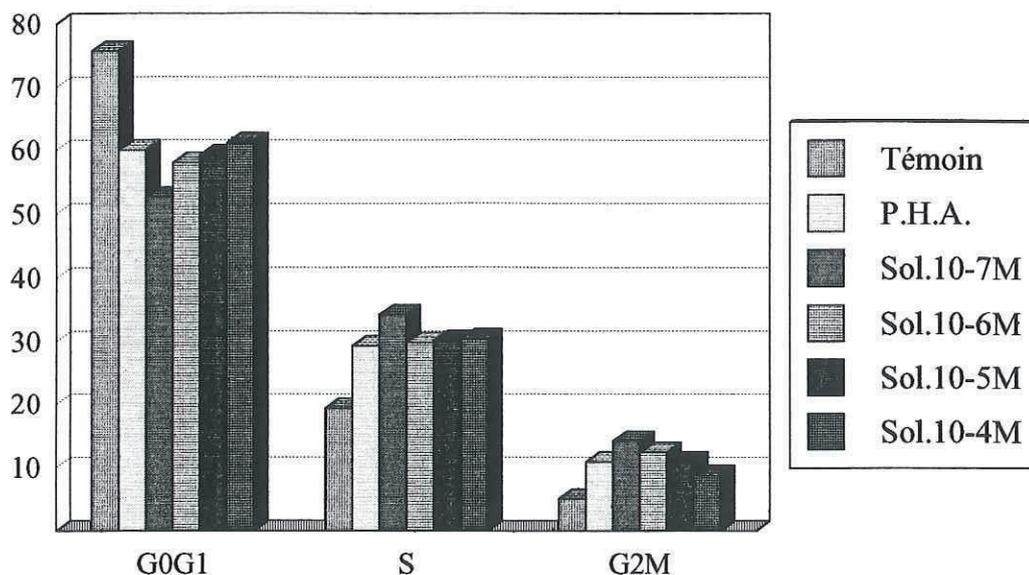


Fig.12 : Histogramme correspondant au tableau 10.

Etude statistique :

Nous faisons ensuite une étude statistique pour savoir si les différences observées sont significatives.

Le test statistique utilisé est le test t de Student pour séries appariées (le même échantillon de sang servant à toute la série de tests) (Témoin-PHA-Imipramine). Ce test est significatif si $p < 0,05$.

G0G1 :

T/P.H.A.	75,7/60,0	$p=0,005$
P.H.A./ 10^{-7}	60,0/52,6	$p=0,028$
P.H.A./ 10^{-6}	60,0/58,0	$p=0,321$
P.H.A./ 10^{-5}	60,0/59,2	$p=0,733$
P.H.A./ 10^{-4}	60,0/61,1	$p=0,851$

S :

T/P.H.A.	19,3/29,2	p=0,003
P.H.A./10 ⁻⁷ M	29,2/34,1	p=0,047
P.H.A./10 ⁻⁶ M	29,2/29,7	p=0,734
P.H.A./10 ⁻⁵ M	29,2/30,0	p=0,582
P.H.A./10 ⁻⁴ M	29,2/30,3	p=0,740

G2M :

T/P.H.A.	5,0/11,8	p=0,014
P.H.A./10 ⁻⁷ M	11,8/14,1	p=0,032
P.H.A./10 ⁻⁶ M	11,8/12,3	p=0,223
P.H.A./10 ⁻⁵ M	11,8/10,8	p=0,990
P.H.A./10 ⁻⁴ M	11,8/8,7	p=0,218

Résultats :

- Les effets dus à la P.H.A. valident le choix de la concentration de 15µg/ml. Ainsi à cette concentration on observe une diminution de G0G1, une augmentation de S et de G2M ; ces trois variations étant significatives.

- Action de l'imipramine :

Sur G0G1 : il y a une diminution de G0G1 significative avec $p < 0.05$ seulement à 10⁻⁷ M.

Sur S : il y a une augmentation non significative de S.

Sur G2M : augmentation de G2M aux deux concentrations les plus faibles, diminution aux plus fortes.

A 10^{-7} M , on observe une effet lymphoprolifératif net, alors qu'à 10^{-6} M on observe cet effet de manière très faible (non significatif) et qu'à 10^{-4} et 10^{-5} M on observe un effet toxique avec sous évaluation de G2M au profit de S.

Conclusion :

On remarque, en premier, lieu l'action stimulante de la P.H.A., en effet en comparant la cupule témoin à la cupule contenant la P.H.A. seule on note l'activation lymphocytaire qui se traduit par une diminution du pourcentage de cellules en G0G1 et par une augmentation du pourcentage de cellules en phase S ainsi qu'en G2M.

L'imipramine induit un faible effet lymphoprolifératif, significatif à la concentration de 10^{-7} M mais présent également à 10^{-6} M, à 10^{-5} M et à 10^{-4} M on observe des effets toxiques avec une sous évaluation de la population en G2M au profit des deux autres compartiments.

Nous ne poursuivrons pas notre étude sur cette molécule en faisant le test à la BrdU, car ce test n'a pas un grand intérêt lorsque l'on observe une prolifération cellulaire, Sq étant augmentée dans les mêmes proportions que Sp.

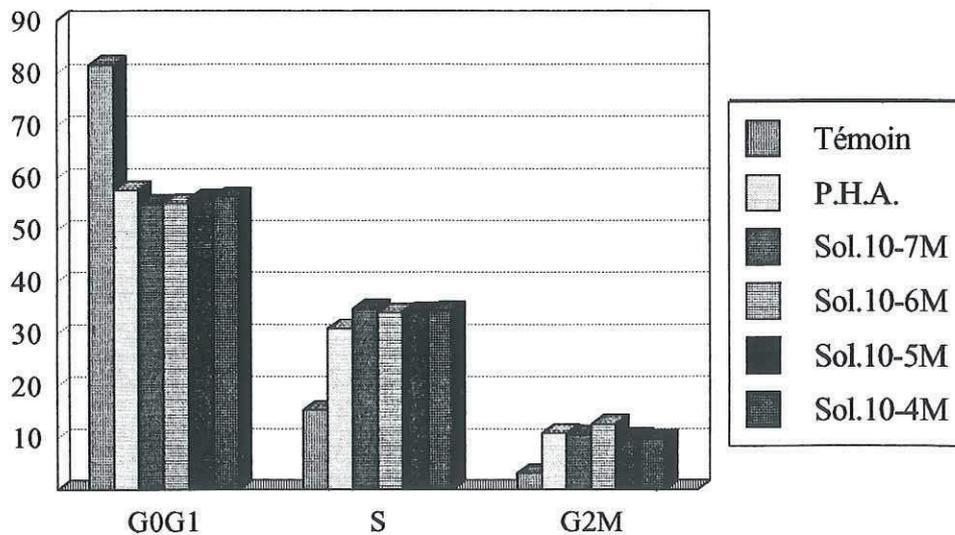
5.1.2 Lévamisole :

L'étude est effectuée sur 9 séries. La moyenne sur ces neuf séries donne les résultats suivants:

I

	Population en G0G1 (%)	Population en S (%)	Population en G2M (%)
Témoin	81,4	15,2	3,1
P.H.A.	57,4	30,8	10,8
Lévamisole 10 ⁻⁷ M	54,8	34,7	10,5
Lévamisole 10 ⁻⁶ M	54,8	33,9	12,6
Lévamisole 10 ⁻⁵ M	55,8	34,1	10,1
Lévamisole 10 ⁻⁴ M	56,2	34,3	9,7

II



Tab.13 : I- Répartition des lymphocytes dans les différentes phases du cycle (en %) en présence de lévamisole à concentration croissante; II- Histogrammes correspondants.

Etude statistique :**G0G1 :**

T/P.H.A.	81,4/57,4	p=0,001
P.H.A./10 ⁻⁷ M	57,4/54,8	p=0,210
P.H.A./10 ⁻⁶ M	57,4/54,9	p=0,403
P.H.A./10 ⁻⁵ M	57,4/55,8	p=0,279
P.H.A./10 ⁻⁴ M	57,4/56,2	p=0,342

S :

T/P.H.A.	15,2/30,8	p=0,001
P.H.A./10 ⁻⁷ M	30,8/34,7	p=0,029
P.H.A./10 ⁻⁶ M	30,8/33,9	p=0,048
P.H.A./10 ⁻⁵ M	30,8/34,1	p=0,036
P.H.A./10 ⁻⁴ M	30,8/34,3	p=0,038

G2M :

T/P.H.A.	3,1/10,8	p=0,001
P.H.A./10 ⁻⁷ M	10,8/10,5	p=0,832
P.H.A./10 ⁻⁶ M	10,8/12,6	p=0,523
P.H.A./10 ⁻⁵ M	10,8/10,1	p=0,466
P.H.A./10 ⁻⁴ M	10,8/9,7	p=0,098

Résultats :

- Les différences observées entre les cupules témoins et les cupules contenant de la P.H.A. sont là aussi significatives, ce qui valide encore le choix de cette concentration.

- Action du lévamisole :

Sur G0G1: il y a une diminution non significative à chacune des quatre concentrations testées.

Sur S : il y a une augmentation significative ($p < 0.05$) aux quatre concentrations testées.

Sur G2M : Cette phase est peu ou pas augmentée.

Conclusion :

Le test ADN-Protéines a permis de mettre en évidence une augmentation de la phase S, ceci traduisant soit un ralentissement des cellules en S soit une prolifération cellulaire, ce qui serait alors en accord avec la littérature, qui donne au lévamisole un effet immunostimulant (observé par incorporation de thymidine tritiée). L'augmentation significative de S se fait au détriment des deux autres compartiments, ceci semblant attester d'un blocage des cellules en phases S. Afin de confirmer ce résultat, nous effectuons une étude plus poussée par incorporation de bromodéoxyuridine.

5.2 Analyse du cycle cellulaire après incorporation de BrdU ; action du lévamisole :

Ce test est effectué sur 9 séries comportant chacune une cupule témoin, une cupule contenant de la P.H.A. et quatre cupules contenant de la P.H.A. et du lévamisole à une concentration donnée.

Nous effectuons une étude statistique, à l'aide du test de Student, qui conduit au tableau de résultats suivants :

	Sp	p	Sq	p
T	1,6		1,4	
P.H.A.	14,8	0	8,8	0
10^{-7} M	10,4	0,057	11,3	0,001
10^{-6} M	11,2	0,327	11,9	0,041
10^{-5} M	14,1	0,856	10,1	0,375
10^{-4} M	13,9	0,829	10,4	0,165

Tableau 14 : répartition cellulaire dans les phases Sp et Sq sous l'action du lévamisole, en pourcentage (p : degré de signification).

Résultats :

- On note l'action de la P.H.A. sur les phases Sp et Sq (en comparant la ligne P.H.A. à la ligne Témoin).
- Le lévamisole n'a pas d'action sur la phase Sp.

- Le lévamisole a une action sur Sq aux concentrations de 10^{-6} M et de 10^{-7} M (avec un risque relatif d'erreur inférieur à 5 %).

Conclusion :

Le test d'incorporation de BrdU montre une augmentation de la phase de synthèse quiescente, Sq (ceci n'est statistiquement significatif qu'à 10^{-6} M et à 10^{-7} M). Ce résultat s'apparente à celui du M.T.I..

Ce phénomène ne concerne qu'un nombre réduit de cellules.

Cette augmentation de Sq peut traduire deux phénomènes différents :

- soit les cellules sont arrêtées et vont mourir
- soit elles sont très ralenties mais elles vont quand même évoluer vers

Sp et G2M.

Ces effets observés sont en désaccord avec les effets immunostimulants du lévamisole, décrits dans la littérature.

Le mécanisme d'action du lévamisole sur le cycle cellulaire lymphocytaire n'est pas connu, mais nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Le lévamisole peut avoir une action au niveau du lymphocyte lui-même soit directement sur l'ADN, soit indirectement sur des éléments intervenant sur la synthèse d'ADN.

Pour savoir si le lévamisole agit au niveau des lymphocytes, il faudrait faire une étude avec du lévamisole marqué pour savoir s'il pénètre dans la cellule.

Nous pouvons également envisager une action de cette drogue par l'intermédiaire des cellules présentatrices de l'antigène, comme pour le méthimazole (qui ne pénètre pas dans les lymphocytes), mettant en jeu les

monocytes et macrophages faisant intervenir des radicaux libres, ou des produits de sécrétions tels que les interleukines.

5.3 Action du méthimazole et du propylthiouracile sur le cycle lymphocytaire :

Ces résultats ont été obtenus à partir de travaux antérieurs effectués au laboratoire de chimie organique de l'U.F.R. de Pharmacie de Limoges.

	Population en G0G1 (%)	Population en S (%)	Population en G2M (%)
P.H.A.	74.7	17.8	7.2
Méthimazole 10^{-7} M	73,8	20.0	7.1
Méthimazole 10^{-6} M	67.6	22.2*	10.2
Méthimazole 10^{-5} M	66.8	23,7**	10.6
Méthimazole 10^{-4} M	67.7	21,6*	10.2

Tableau 15 : Effets du méthimazole sur les lymphocytes stimulés par la P.H.A., en pourcentage (moyenne sur 7 séries). Test t de Student : * $p < 0.05$

** $p < 0.01$

	Population SP (%)	Population SQ (%)
P.H.A.	12,4	7,2
Méthimazole 10 ⁻⁷ M	8,1*	9,1*
Méthimazole 10 ⁻⁶ M	8,8*	9,3**
Méthimazole 10 ⁻⁵ M	8,9*	9,5**
Méthimazole 10 ⁻⁴ M	9,7*	9,8**

Tableau 16 : Effets du méthimazole sur la population lymphocytaire en phase de synthèse après stimulation par la P.H.A., en pourcentage (moyenne sur 7 séries). Test t de Student : * p < 0.05 ** p < 0.01

Les tableaux de résultats 15 et 16 montrent que le méthimazole a une action bloquante sur la phase S du cycle cellulaire lymphocytaire. Ce blocage s'effectue par augmentation de la sous-phase Sq.

Le méthimazole est la molécule qui a été la mieux étudiée pour ces propriétés immunomodulatrices. Tout les travaux effectués sur l'effet immunomodulateur de cette molécule ont permis d'émettre plusieurs hypothèses quand à leur mode d'action.

Le méthimazole ne pénètre pas dans les lymphocytes [78], il n'est donc pas nécessaire au M.T.I. d'être concentré dans les cellules pour produire un effet immunosuppresseur. Ceci conduit à s'orienter vers un mode d'action indirect du méthimazole faisant intervenir les cellules présentatrice de l'antigène ainsi

que des produits émis par ces cellules tels que les radicaux libres oxygénés, les interleukines ...

Les différences observées sur la répartition des populations lymphocytaires dans les différentes phases du cycle cellulaire en présence du propylthiouracile ne sont significatives qu'à une concentration (Tab.17), ceci est insuffisant pour conclure à une action de ce produit sur les lymphocytes.

	Population en G0G1 (%)	Population en S (%)	Population en G2M (%)
P.H.A.	59.0	30.9	10.0
PTU 10^{-6} M	58,5	32,5	9.8
PTU 10^{-8} M	56.7	33.8*	9,5
PTU 10^{-4} M	58.6	31.3	10.1
PTU 10^{-6} M	58,2	31.9	9.9

Tableau 17 : Effets du propylthiouracile sur des lymphocytes stimulés par la P.H.A., en pourcentage (moyenne sur 15 séries).

Test t de Student : * $p < 0.05$.

6 Discussion :

Des études ont montré que des patients sous traitement antithyroïdiens pouvaient présenter des anomalies du système immunitaire.

L'action antithyroïdienne par inhibition de la T.P.O. ayant été pendant longtemps le seul mode d'action connu des A.T.S., ces molécules semblaient être incapable d'agir sur le système immunitaire, les lymphocytes ne contenant pas de systèmes enzymatiques.

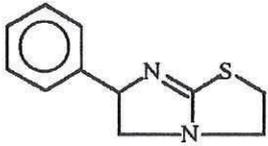
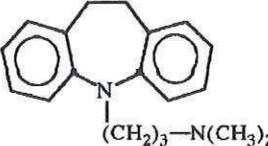
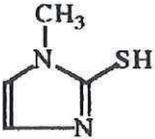
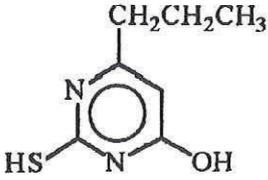
Pourtant des effets directs du M.T.I. et du P.T.U. ont été mis en évidence [76,77].

Des travaux, effectués à l'U.F.R. de Pharmacie de Limoges dans le service de Chimie organique et de Chimie thérapeutique par l'équipe du Professeur Raby, ont permis de montrer qu'il existait un second mode d'action des A.T.S.. Ils agissent également par détournement de l'iode moléculaire intra-thyroïdien. Grâce à leur fort pouvoir électrodonneur ces molécules forment des complexes avec l'iode, ces complexes étant caractérisés par une constante de formation K_c (en $l.mole^{-1}$).

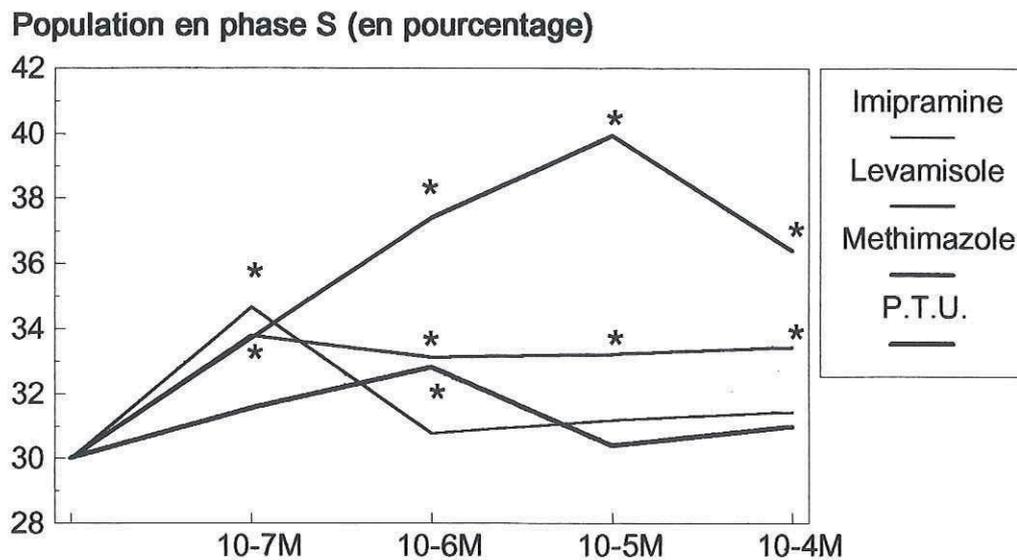
Une étude antérieure a été menée (Chabernaud et coll.) dans le but d'étudier l'action immunomodulatrice de molécules antithyroïdiennes in vitro, et de la mettre en rapport avec leur pouvoir électrodonneur. L'objet de ces travaux été l'étude de l'action de deux molécules à forte action antithyroïdienne, le méthimazole (M.T.I) et le propylthiouracile (P.T.U.), sur le cycle cellulaire de lymphocytes en culture. L'analyse du cycle cellulaire étant réalisée par cytométrie en flux.

Au cours de notre travail nous avons effectué le même type d'étude sur deux autres molécules, l'imipramine et le lévamisole, dans le but de comparer les résultats obtenus avec des données concernant le M.T.I et le P.T.U.

Ce qui conduit au tableau de résultats suivant :

	Formule chimique	Valeur de Kc en l.mole ⁻¹	Action sur le cycle lymphocytaire
Lévamisole		823	Action bloquante sur la phase S par augmentation de la sous-phase Sq.
Imipramine		4907	Action stimulante aux faibles concentrations, puis effets toxiques aux fortes concentrations.
Méthimazole		23194	Action bloquante sur la phase S par augmentation de la sous-phase Sq.
Propylthiouracile		> 2500	Pas d'action sur le cycle cellulaire lymphocytaire.

Le lévamisole et le méthimazole qui sont les deux molécules les plus actives sur les quatre comparées (courbe 18) ont des valeurs de K_c très différentes soit 823 l.mole^{-1} pour le lévamisole et $23194 \text{ l.mole}^{-1}$ pour le méthimazole. De plus, l'imipramine, qui a une constante K_c élevée n'a pas d'action bloquante sur le cycle cellulaire. Aux vues des résultats, le pouvoir électrodonneur ne semble pas être en relation avec l'action bloquante des molécules sur le cycle cellulaire.



Courbe 18 : Activité comparée sur le cycle cellulaire lymphocytaire des quatre molécules étudiées.

Il semblerait donc, que l'action sur le cycle cellulaire soit dépendante de la géométrie des molécules organiques, donc de leur encombrement stérique.

Nous allons maintenant, envisager l'étude de la structure et de la géométrie des différentes molécules, afin de savoir s'il existe des points communs permettant de rapprocher les structures des molécules ayant une activité similaire, ce qui permettrait de mieux cerner leur mécanisme d'action éventuel.

Cette étude est effectuée grâce au logiciel de modélisation moléculaire Hyperchem[®] fonctionnant sous Windows[®] sur un PC 486 DX2 66. Ce logiciel nous a permis de connaître les configurations moléculaires de plus basses énergie, donc les plus stables.

Le lévamisole est une molécule constituée de deux hétérocycles pentagonaux accolés sur lequel est greffé un groupement phényle. L'un de ces cycles est diazoté et monoinsaturé, l'autre est soufré. Cette molécule n'est pas plane, les deux hétérocycles étant le siège de torsions (Fig. 19).

L'imipramine est une molécule tricyclique formée de deux noyaux benzéniques séparés par un hétérocycle azoté saturé à heptagonal, qui n'est pas plan. Cette molécule n'est donc pas plane. Au niveau de l'azote 11 du cycle saturé se trouve une chaîne alkylaminée qui se place "au-dessus" du cycle porteur (Fig.20).

Le methimazole est une molécule constituée par un hétérocycle diazoté insaturé qui est plan. L'atome d'azote 1 porte un groupement méthyle, l'atome de carbone 2 porte un groupement thiol (-SH). Ce groupement est pratiquement dans le plan de l'hétérocycle, en effet la torsion qui s'exerce au niveau du groupement -SH est seulement de 2,3° (Fig.21).

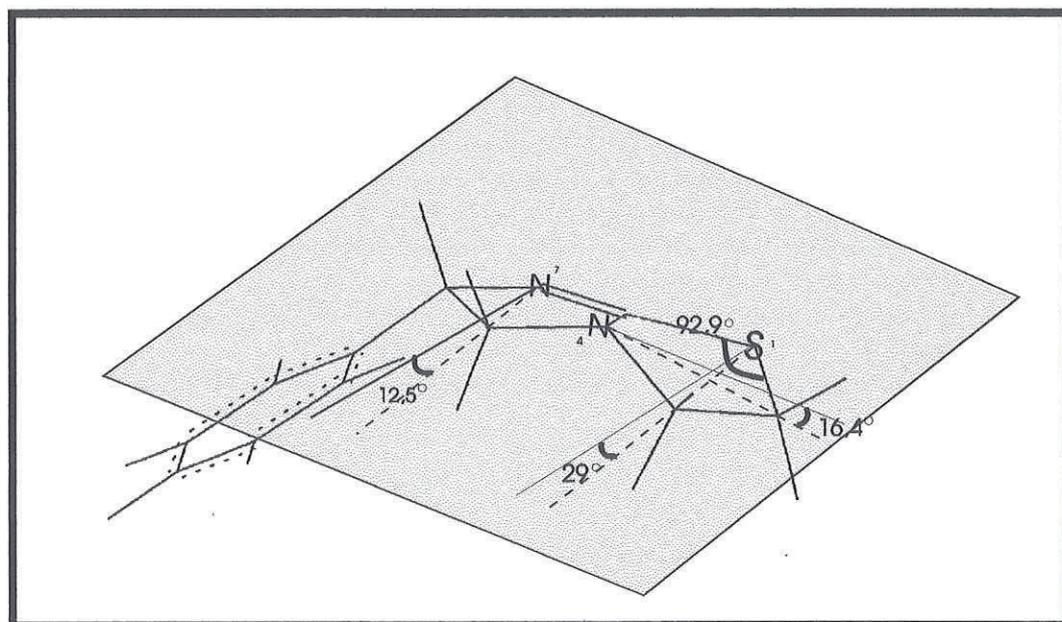
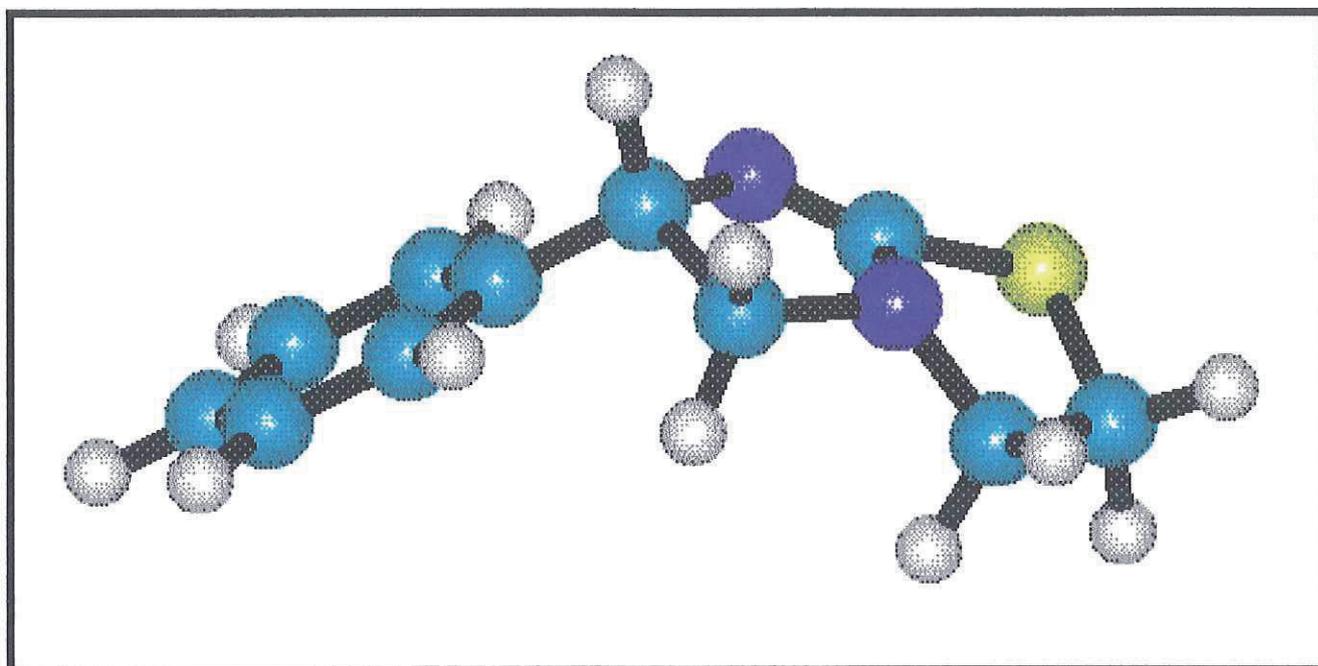


Figure 19 : Représentation tridimensionnelle du lévamisole réalisée à l'aide du logiciel Hyperchem®.

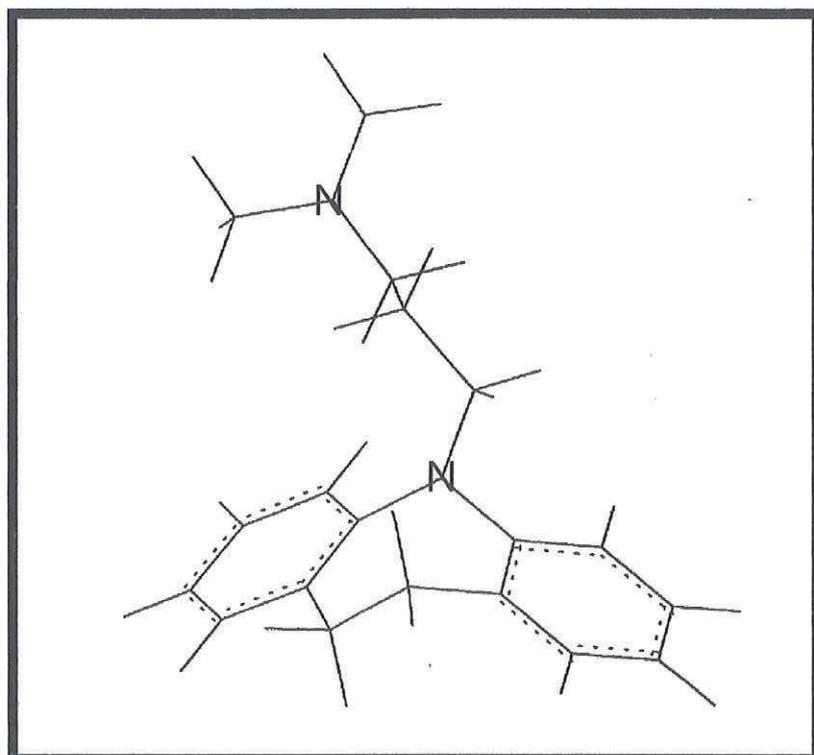
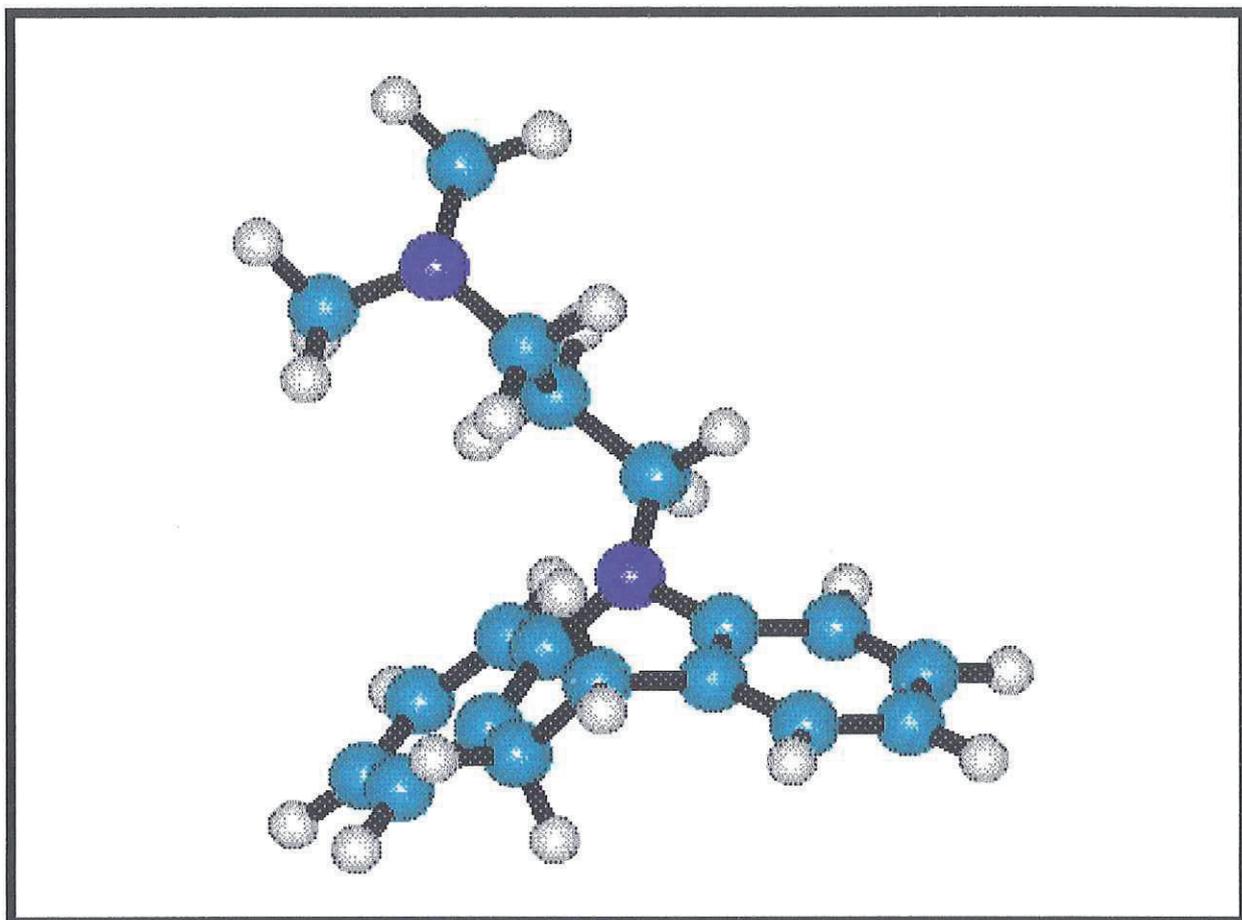


Figure 20 : Représentation tridimensionnelle de l'imipramine réalisée à l'aide du logiciel Hyperchem®.

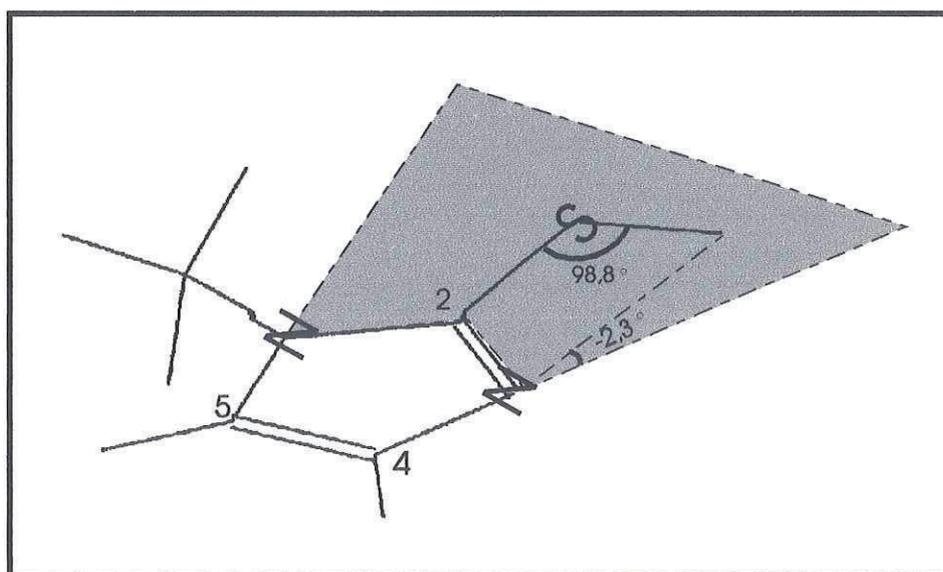
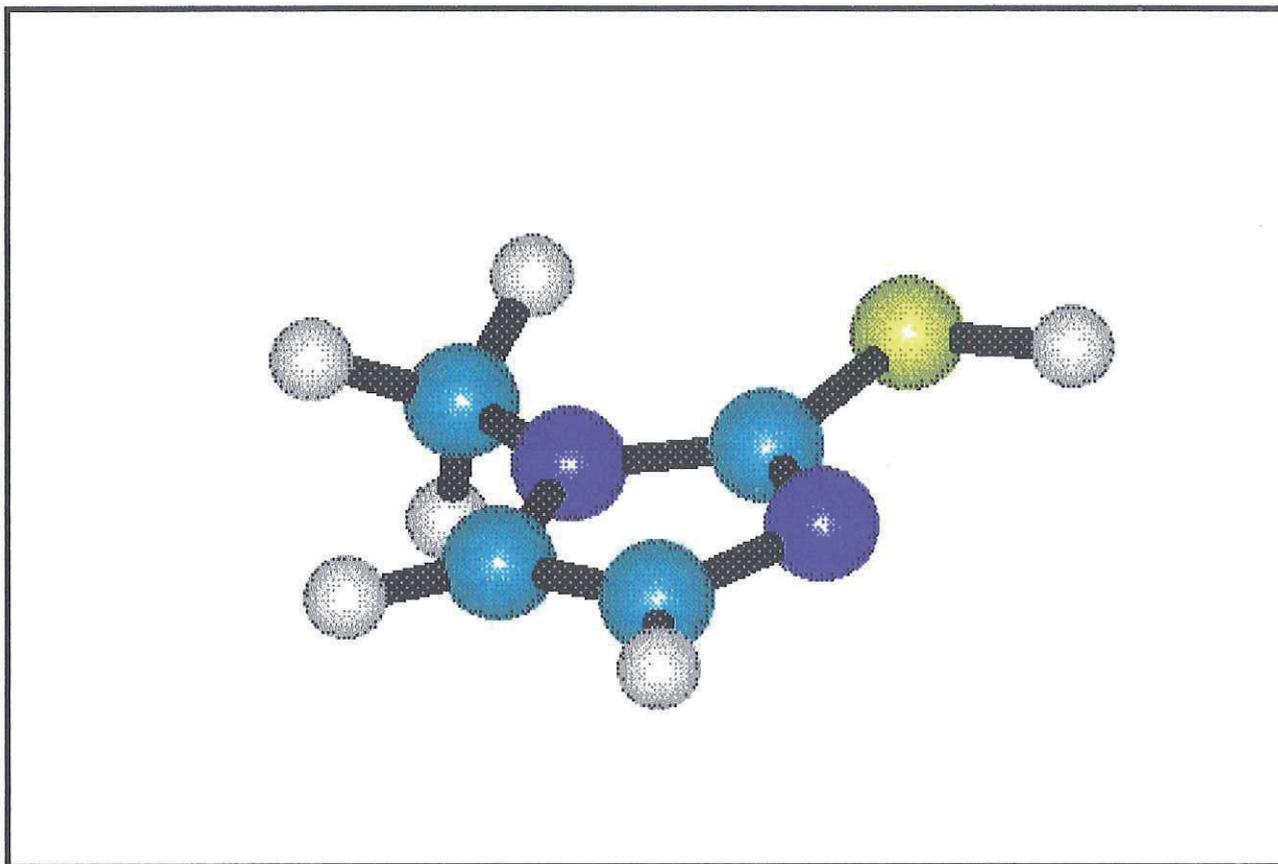


Figure 21 : Représentation tridimensionnelle du méthimazole réalisée à l'aide du logiciel Hyperchem®.

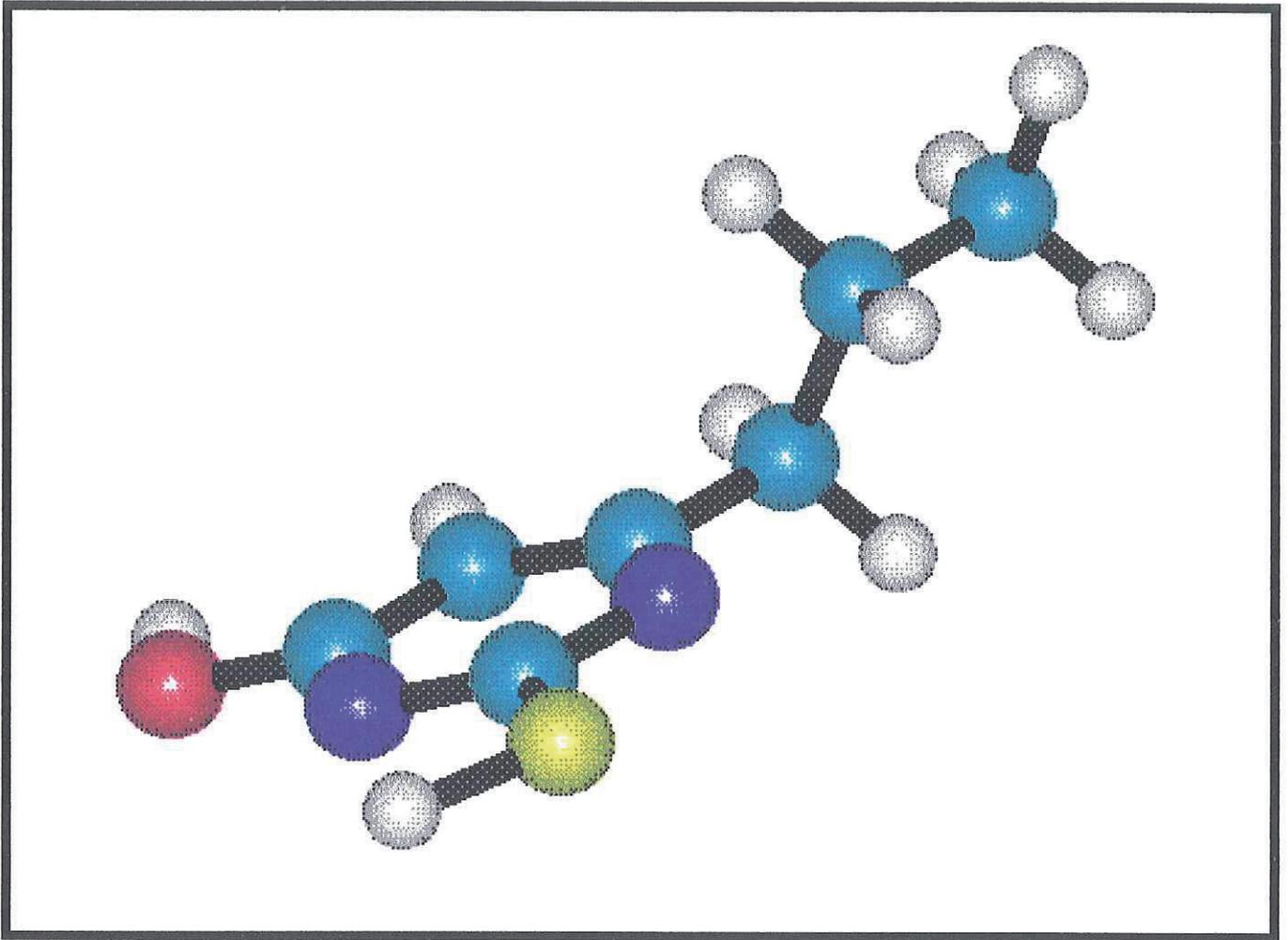
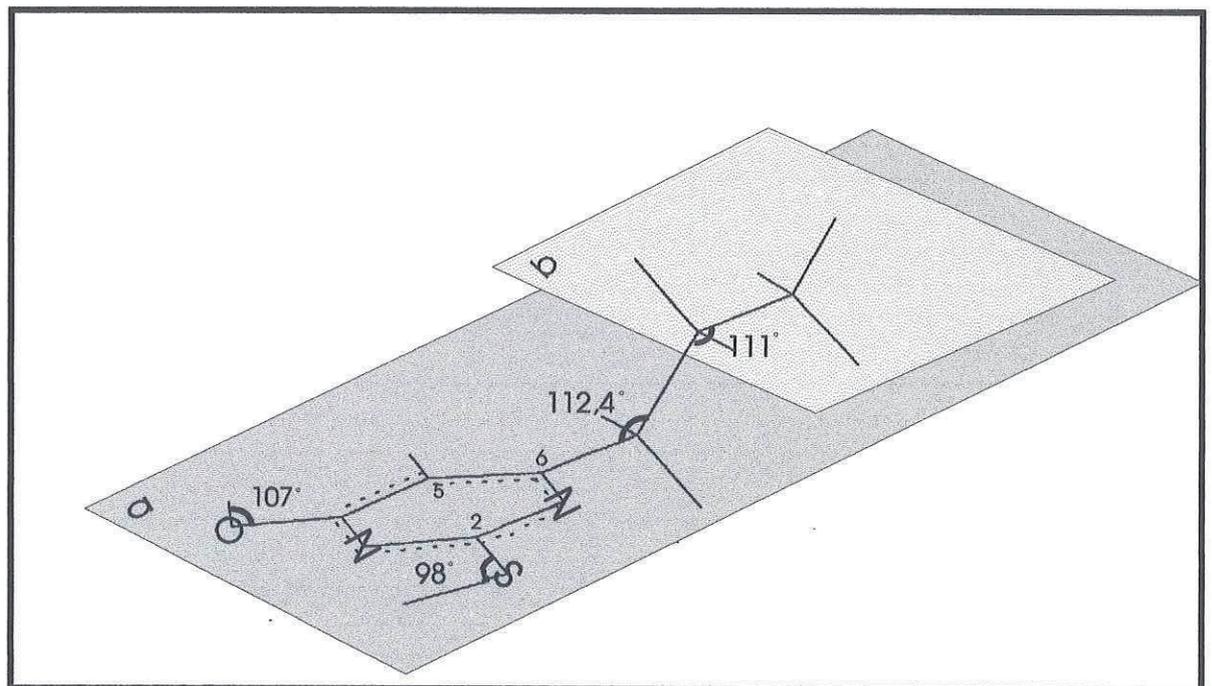


Figure 22 : Représentation tridimensionnelle du propylthiouracile réalisée à l'aide du logiciel Hyperchem®.



Le propylthiouracile est constitué d'un cycle pyrimidique sur lequel se greffent en 2 un groupement -SH, en 4 un groupement -OH et en 6 une chaîne à trois atomes de carbone. Cette molécule est plane jusqu'au premier atome de carbone de la chaîne latérale, la liaison entre les atomes 7 et 8 se trouvant au dessus du plan de la molécule. La liaison entre les atomes 8 et 9 se trouve quand à elle dans un plan pratiquement parallèle au plan de la molécule (Fig.22).

Grâce à cette analyse structurale, nous pouvons maintenant envisager d'établir une relation structure activité en comparant ces différentes molécules.

A/ Le M.T.I. et le lévamisole agissent sur le cycle cellulaire en bloquant S par augmentation de Sq. Le P.T.U. n'a pas d'action sur le cycle. L'action bloquante en S n'est donc pas due au groupement -SH car il est présent au niveau du P.T.U., elle n'est pas due non plus à l'enchaînement NCS.

En comparant les deux molécules qui bloquent la phase S, nous retrouvons une structure commune qui est le synton pentagonal diazoté .

Ces deux molécules possèdent une activité d'intensité différente. L'action moins importante du lévamisole peut s'expliquer

- par l'absence du groupement -SH libre, le soufre étant ici incorporé dans un second cycle.

- par la présence d'un substituant phényle.

- par la torsion qui s'exerce sur le cycle pentagonal diazoté au sein de la molécule de lévamisole (Fig.23) . Cette torsion n'est pas présente au niveau de la molécule de M.T.I. qui est plane. Pour le lévamisole (S), elle

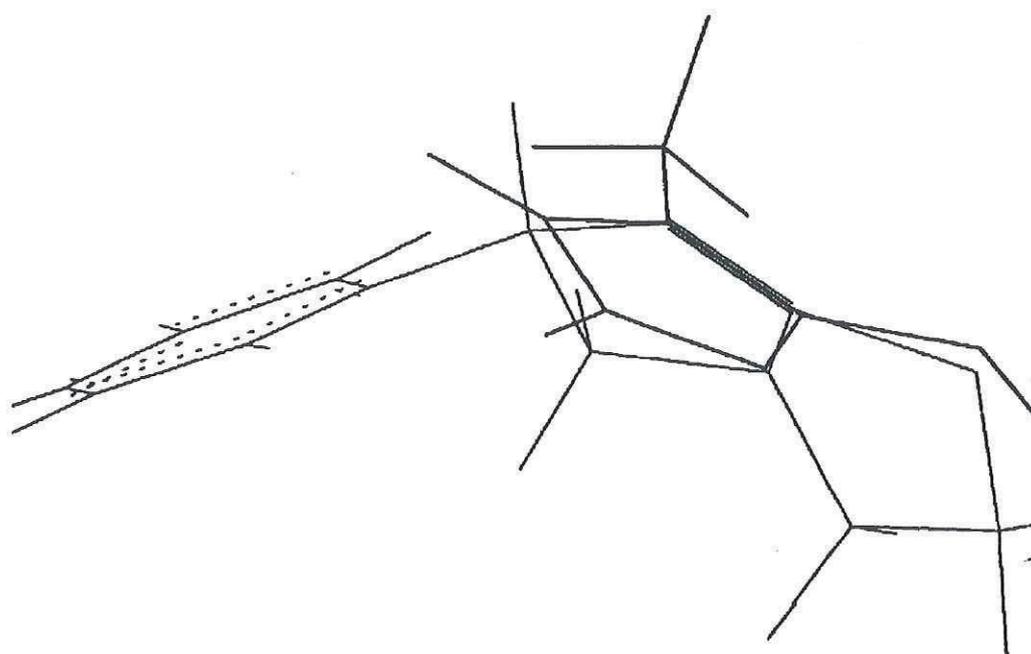


Figure 23 : Superposition des structures fil de fer du lévamisole (S) et du méthimazole permettant de visualiser la torsion présente au niveau de l'hétérocycle pentagonale diazoté du lévamisole.

a pour valeur $12,5^\circ$. Ceci s'explique par la différence d'hybridation des atomes de carbone présents au niveau de l'hétérocycle dans les molécules de M.T.I. et de lévamisole. Les atomes d'azote présents au niveau du synton dans le M.T.I. et dans le lévamisole ont les mêmes états d'hybridation, l'un est hybridé sp^2 , l'autre est hybridé sp .

Par contre les atomes de carbone sont hybridés différemment dans les deux molécules. Pour le M.T.I., tous les atomes de carbones appartenant à l'hétérocycle ont la même hybridation sp^2 alors que pour le lévamisole les atomes 5 et 6 sont hybridés sp^3 alors que l'atome 8 est hybridé sp^2 . Cette hybridation différente entraîne une différence au niveau de la longueur des liaisons interatomiques se traduisant par une torsion au sein du cycle.

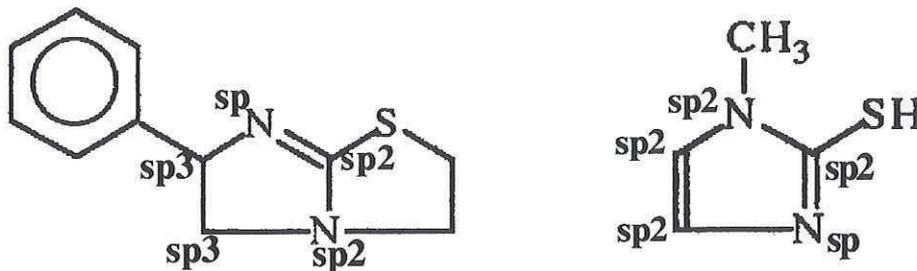


Figure 20 : Etat d'hybridation des différents atomes au sein de l'hétérocycle pentagonal diazoté dans les molécules de lévamisole et de M.T.I..

B/ Le P.T.U. n'a pas d'action sur le cycle cellulaire bien qu'il possède un enchaînement NCS et un groupement $-SH$ libre. Le cycle pyrimidique semble annuler l'effet de ces groupements.

C/ L'imipramine présente une action différente de celle du M.T.I. et du lévamisole sur le cycle cellulaire. Elle stimule la prolifération lymphocytaire.

Cette molécule ne possède aucune parenté structurale avec le M.T.I. et le lévamisole, l'action antithyroïdienne de ces molécules étant donnée par l'atome de soufre alors qu'au niveau de l'imipramine il est donné par l'atome d'azote de la chaîne latérale . L'activité sur le cycle cellulaire pourrait être due à la structure relativement volumineuse de cette molécule, notamment grâce à la chaîne latérale qui se replie au dessus des trois cycles.

Conclusion

Au cours de notre étude, nous avons étudié l'effet de deux molécules, ayant un effet secondaire antithyroïdien, sur le cycle cellulaire lymphocytaire.

Des auteurs ayant observés des anomalies du système immunitaire chez des patients traités par des antithyroïdiens de synthèse, il semblait intéressant d'effectuer une étude permettant de tester l'activité de molécules antithyroïdiennes sur certaines composantes du système immunitaire afin de savoir si de telles molécules avaient une action immunomodulatrice. En effet, ceci pourrait être intéressant lors du traitement de maladies auto-immunes nécessitant la prise d'antithyroïdiens de synthèse comme la maladie de Basedow.

Les maladies thyroïdiennes auto-immunes se caractérisant, entre autre, par la production d'auto-anticorps et par des infiltrations lymphocytaires au niveau de la glande thyroïde, nous avons tester l'action de molécules sur des cultures cellulaires de lymphocytes T. L'activité des molécules testées a été quantifiées par cytométrie en flux.

L'un des modes d'action des molécules antithyroïdiennes est du à leur pouvoir électrodonneur. Elles agissent en formant des complexes par transfert de charge avec l'iode intrathyroïdien. Le choix des deux molécules utilisées a été fait en fonction de leur capacité à former ces complexes. Le pouvoir électrodonneur est donné par le calcul de la constante de formation de complexe par transfert de charge appelé K_c exprimée en $l.mole^{-1}$. Une molécule est antithyroïdienne si elle a une valeur de $K_c > 100 l.mole^{-1}$. Pour notre étude nous avons choisi deux molécules ayant des valeurs de K_c différentes soit le lévamisole de $K_c 823 l.mole^{-1}$ et l'imipramine $4907 l.mole^{-1}$.

Ces molécules appartiennent à des classes thérapeutiques très différentes mais elles ont en commun un effet secondaire antithyroïdien.

Nous avons envisagé de savoir si ces molécules avaient une action sur le cycle cellulaire lymphocytaire et si cette action était en rapport avec leur pouvoir électrodonneur.

Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus lors de travaux antérieurs portant sur deux antithyroïdiens majeurs le méthimazole et le propylthiouracile.

L'imipramine a une action stimulante sur les lymphocytes en culture aux faibles concentrations alors qu'elle présente des effets toxiques aux fortes concentrations.

Le lévamisole augmente la population en phase S. Grâce au test d'incorporation de la BrdU nous avons pu mettre en évidence que cette augmentation de S se faisait par augmentation de la sous-phase Sq.

L'activité du lévamisole sur le cycle cellulaire lymphocytaire est la même que celle du méthimazole mais elle est de moindre intensité.

L'activité bloquante sur la phase S du cycle cellulaire ne semble pas être en rapport avec le pouvoir électrodonneur des molécules en effet le M.T.I. et le lévamisole ont des valeurs de K_c très différentes, de plus l'imipramine qui a une valeur de K_c de 4907 l.mole^{-1} n'a pas d'action bloquante sur le cycle cellulaire.

Nous avons par la suite effectué une étude structurale de ces molécules afin de savoir s'il existait des structures communes à ces différentes molécules permettant d'expliquer leur action sur le cycle cellulaire.

En comparant le M.T.I. et le lévamisole, nous avons mis en évidence une structure commune qui semble être responsable de l'activité bloquante en S, par augmentation de Sq, de ces molécules. Cette structure commune est le synton pentagonal diazoté présent au sein de ces deux molécules. L'intensité d'action plus faible du lévamisole pouvant s'expliquer de plusieurs façons :

- par l'absence de groupement -SH libre, le soufre étant incorporé au sein d'un second cycle.
- par la présence d'un substituant phényle
- par la non planéité de cette molécule au sein de laquelle s'exerce des torsions dues aux états d'hybridation des différents atomes.

En résumé, il semblerait que le blocage de la phase S par accumulation de cellules au niveau de la sous-phase Sq soit liée à la présence d'un hétérocycle pentagonal diazoté possédant un enchaînement NCS avec un groupement -SH libre ou un soufre alicyclique.

Il serait bon d'affiner cette relation structure activité, en testant l'activité de molécules antithyroïdiennes possédant cette structure commune afin de voir si elles ont le même type d'action sur le cycle cellulaire.

De plus, il serait intéressant de savoir si le lévamisole pénètre dans les lymphocytes et si c'est le cas s'il agit lui-même ou par l'intermédiaire d'un métabolite intracellulaire. Si le lévamisole ne pénètre pas dans les cellules, on peut penser à un mode d'action indirect comme pour le M.T.I. qui agirait par l'intermédiaire des cellules accessoires et de leurs sécrétions (radicaux libres, interleukines...).

BIBLIOGRAPHIE

[1] **Ducornet B., Duprey J.**

Stress et immunité. Place du stress dans l'auto-immunité de la maladie de Basedow.

Ann. Endocrinol., 1990, 51, 17.

[2] **Winsa B., Adami H.O., Bergström R., Gamstedt A., Dahlberg P.A., Adamson U., Jansson R., Karlsson A.**

Stressful life events and Graves' disease.

Lancet, 1991, 338, 1475.

[3] **Leclere J., Germain M., Weryha G., Duquenne M., Hartemann P.**

Role of stressful life-events in the onset of Graves' disease.

The 10th International Thyroid Conference, February 3-8, 1991, The Hague, The Netherlands, Abstract n° 169.

[4] **Stenszky V., Kozma L., Balazs C.S., Rochlitz S.Z., Bear J.C., Farid N.R.**

The genetics of Graves' disease : HLA and disease susceptibility.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1985, 61, 735.

[5] **Bahm A.K., Mills J.L., Snyder P.J.**

Hypothyroidism in workers exposed to polybrominated biphenyls.

N. England J. Med., 1980, 302, 31.

[6] **Safran M., Paul T.L., Roti E.**

Environmental factors affecting auto immune thyroid disease.
Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 1987, 16, 327.

[7] **Martino E., Safran M., Aghini-Lombardi F.**

Environmental iodine intake and thyroid dysfunction during chronic
amiodarone therapy.
An. Inter. Med., 1984, 101, 28.

[8] **Monteiro E., Galvao-Teles A., Santos M.L.**

Antithyroid antibodies as an early marker for thyroid disease induced
by amiodarone.
Br. Med. J., 1986, 292, 227.

[9] **Rabinowe S.L., Larsen P.R., Antman E.M.**

Amiodarone therapy and autoimmune thyroid disease : increase in a
new monoclonal antibody- defined T cell subset.
Am. J. Med., 1986, 81, 53.

[10] **Weetman A.P., Mc Gregor A.M., Campbell H.**

Iodide enhances Ig synthesis by human peripheral blood lymphocyte
in vitro.
Acta. Endocrinol. (Copenh.), 1983, 103, 210.

- [11] **Hassman R.A., Lazarus J.H., Dieguez C., Weetman A.P.**
The influence of lithium chloride on experimental autoimmune thyroid disease.
Clin. Exp. Immunol., 1985, 61,49.
- [12] **Lazarus J.H., John R., Bennie E., Chalmers R., Crocket G.**
Lithium therapy of thyroid function. A long term study.
Psychol. Med., 1981, 11, 83.
- [13] **Joascoo A., Robertsen P., Murray I.P.C.**
Viral antibodies and thyrotoxicosis.
Lancet, 1975, 2, 125.
- [14] **Wenzel B.E., Heesemann J., Wenzel K.W., Scriba P.C.**
Patients with autoimmune thyroid diseases have antibodies to plasmid encoded proteins of enteropathogenic yersinia .
J. Endocrinol. Invest., 1988, 11, 139.
- [15] **Khoury E.L., Bottazzo G.F., Roitt I.M.**
The thyroid "microsomal" antibody revisited. Its paradoxical binding in vivo the apical surface on the follicular epithelium.
J. Exp. Med., 1984, 159, 577.
- [16] **Benvenga S., Trimarchi F., Robbins J.**
Circulating thyroid hormon autoantibodies.
J. Endocrinol. Invest., 1987, 10, 605.

- [17] **Karlsson F.A., Wibell L., Wide L.**
Hypothyroidism due thyroid-hormon-binding antibodies.
N. Engl. J. Med., 1977, 296, 1146.
- [18] **Khoury E.L., Hammond L., Bottazzo G.F., Doniach D.**
Presence of the organ specific "microsomal" autoantigen on the
surface of human thyroid cells in culture : its involvement in
complement-mediated cytotoxicity.
Clin. Exp. Immunol., 1981, 45, 316.
- [19] **Ghamoto Y., Hamada N., Saito H., Ghno M., Noh J., Ito K.,
Morii H.**
Thyroid peroxydase activity-inhibiting immunoglobulins in patients
with autoimmune thyroid disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1989, 68, 730.
- [20] **Mc Kenzie J.M., Zakariga M.**
The clinical use of thyrotropin receptor antibody measurements.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 69, 1093.
- [21] **Weetman A.P., Yatemann M.E., Ealey P.A., Black C.M.,
Reimer C.B., Williams R.C.Jr, Shine B., Marshall N.J.**
Thyroid-stimulating antibody activity between different
immunoglobulin G subclasses.
J. Clin. Invest., 1990, 86, 723.

- [22] **Hanafusa T., Pujoll-Borrell R., Chiovato L., Russel R.C.G., Doniach D., Bottazzo C.F.**
Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease : relevance for autoimmunity.
Lancet, 1983, 2, 1111.
- [23] **Davies T.F., Piccini L.A.**
Autoimmune thyroid disease.
Endocrinol. Metabol. Clin. N. Am., 1987, 16, 247.
- [24] **Salamero J., Michel-Bechet M., Wietzerbin D., Charreire J.**
Syngeneic sensitization of mouse lymphocytes on monolayers of thyroid epithelial cells (TEC). VIII. Interferon induced Ia antigen expression on TEC cultures.
Tissue antigens, 1985, 25, 266.
- [25] **Bottazzo C.F., Pujoll-Borell R., Hanafusa T., Feldmann M.**
Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity.
Lancet, 1983, 2, 1115.
- [26] **Weetman A.P., Wolkman D.J., Burman K.D., Gerrard T.L., Fauci A.P.**
The in vitro regulation of human thyrocyte HLA-DR antigen expression.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1985, 61, 817.

- [27] **Grubeck-Loebenstein B., Buchan G., Chantry D., Kassal H., Pirich K., Barrett K., Turner M., Waldhaus L.W., Feldmann M.**
Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease. Thyroid follicular cells produce interleukin-1 α and interleukin-6.
Clin. Exp. Immunol., 1989, 77, 324.
- [28] **Turner M., Londei M., Feldmann M.**
Human T cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor.
Eur. J. Immunol., 1987, 17, 1867.
- [29] **Doniach D., Bottazzo G.F., Russel R.C.G.**
Goitrous autoimmune thyroiditis.
Clin. Endocrinol. Metab., 1979, 8, 63.
- [30] **Ducornet B., Duprey J.**
Maladie de Hashimoto et hyperthyroïdie.
Ann. Med. Interne, 1991, 142, 181.
- [31] **Volpe R.**
Autoimmune thyroiditis.
In : Werner S., *The thyroid*, 5 \grave{e} me éd., pp.1266-1291. Lippincott, Philadelphie, 1986.

- [32] **Wagor G., Makinen T., Lamberg B.A., Gordin A., Apter L., Pekonen F.**

Thyrotropin binding inhibiting immunoglobulins (TBII) in Graves' disease, toxic nodular goitre and autoimmune thyroiditis.

Ann. Clin. Res., 1982, 14, 83.

- [33] **Kraiem Z., Lakat W., Glaser B., Baron E., Sadek O., Sheinfeld M.**

Thyrotropin receptor blocking antibodies : incidence, characterization and in vitro synthesis.

Clin. Endocrinol., 1987, 27, 409.

- [34] **Drexhage H.A., Bottazzo G.F., Russel R.C.G.**

Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid disease.

Lancet, 1980, 2, 287.

- [35] **Zakariga M., Mc Kenzie J.M.**

Do thyroid growth-promoting immunoglobulins exist?.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 1990, 70, 308.

- [36] **Drexhage H.A., Bottazzo G.F., Bitensky L., Chayen J., Doniach D.**

Thyroid growth blocking antibodies in primary myxoedema.

Nature, 1981, 289, 594.

- [37] **Dessaint J.P., Wattré P., Wemeau J.L., Capron A., Criquette M.**
Antibody inducing lymphocytes cytotoxicity (ADCC) and lymphocyte mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid diseases.
Pathol. Biol., 1981, 29, 211.
- [38] **Guerin V., Prestat F., Bene M.Ch., Faine G., Hartemann P., Leclere J.**
Prévalence des auto-anticorps non thyroïdiens dans les dysthyroïdies auto-immunes.
Ann. Endocrinol., 1989, 50, 447.
- [39] **Barbot N., Guyétant S., Beldenet V., Ahrass A., Gerf I., Perdrisot R., Bigorgne J.C..**
Thyroidite chronique auto-immune et hyperplasie des cellules C.
Ann. Endocrinol., 1991, 52, 103.
- [40] **Hegedüs L., Hansen J.M., Feldt-Rasmussen U., Hansen B.M., Hoeier-Madsen M.**
Influence of thyroxine treatment on thyroid size and anti-thyroid peroxydase antibodies in Hashimoto's thyroiditis.
Clin. Endocrinol., 1991, 35, 235.

[41] **Vague J., Angeletti S.**

La paralysie périodique thyrotoxique sa phase nosographique.
Ann. Endocrinol., 1982, 43, 23.

[42] **Fanello S., Rhomer V., Bigorgne J.C.**

Hyperthyroïdie et foie.
Ouest Med., 1984, 37, 297.

[43] **Neufeld M., Mc Laren N.K., Blizzard R.M.**

Two types of autoimmune Addison's disease associated with
different polyglandular auto-immune PGA syndrome.
J. C. E. M., 1981, 60, 355.

[44] **Dunn J.T.**

Choice of therapy in young adult with hyperthyroidism of Graves'
disease. A brief case directed poll of fifty four thyroidologists.
Ann. Intern. Med., 1984, 100, 891.

[45] **Glinoeur D., Hesch D., Lagasse O., Laurberg P.**

The management of hyperthyroidism due to Graves' disease in
Europe en 1986. Results of an international survey.
Acta Endocrinol., 1985, 285 (suppl.), 115.

[46] **Kendall-Taylor P.**

Are antithyroid drugs immunosuppressive ?
Brit. Med. J., 1984, 288, 1683.

- [47] **Ludgate M.E., Mc Gregor A.M., Weetman A.P.,
Ratanachaiyavong S., Lazarus J.H., Hall R., Middleton G.W.**
Analysis of T cells subsets in Graves' disease : alterations associated
with carbimazole.
Brit. Med. J., 1984, 288, 526.
- [48] **Teng W.P., Cohen S.B., Posnett D.N., Weetman A.P.**
T cell receptor phenotypes in autoimmune thyroid disease.
J. Endocrinol. Invest., 1990, 13, 339.
- [49] **Posnett D.N., Gottlieb A., Bussel J.B., Frieman S.M.,
Chiorazzi N., Li Y.**
T cell antigen receptors in autoimmunity.
J. Immunol., 1988, 141, 1963.
- [50] **Raby C., Lagorce J.F., Jambut-Absil A.C., Buxeraud J.,
Catanzano G.**
Mechanism of action of synthetic antithyroid drug. Iodine
complexation during iodine oxydation.
Endocrinology, 1990, 126, 1683.
- [51] **Lagorce J.F., Buxeraud J., Raby C.**
Synthèse et activité antithyroïdienne des dérivés du 1,2,4-triazole.
Eur. J. Med. Chem., 1992, 27

[52] Lagorce J.F., Thomes J.C., Catanzano G., Buxeraud J., Raby M., Raby C.

Formation of molecular iodine during oxydation of iodide by the peroxydase/H₂O₂ system : implications for antithyroid therapy.

Biochem. Pharmacol., 1991, 42, 89.

[53] Baserga R.

Recombinant DNA approaches to studying control proliferation : an overview.

In : Recombinant DNA and cell proliferation, Stein G.S., Stein J.L. (eds.), pp 337-360, 194.

[54] Hockhauser S.J., Skin J.L., Stein G.S.

Gene expression and cell cycle regulation.

Int. Rev. Cytol., 1981, 71, 95.

[55] Darzynkiewicz Z.

Molecular interactions and cellular changes during the cell cycle.

Pharmacol. Ther., 1981, 21, 143.

[56] Baserga R.

Growth in size and cell DNA replication.

Exp. Cell. Res., 1984, 151, 1.

[57] **Zetterberg A., Engstrom W.**

Induction of DNA synthesis and mitosis in absence of cellular enlargement.

Exp. Cell. Res., 1983, 144, 199.

[58] **Tysen J.J.**

The coordination of cell growth and division. Intentional or incidental.

Bio. Essays, 1985, 2, 72.

[59] **Smith J.A., Martin L.**

Do cells cycle ?

Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1973, 70, 1263.

[60] **Pardee A.B., Dubrow R., Hambin J.L., Kletzien R.F.**

Animal cell cycle.

Ann. Rev. Biochem., 1978, 47, 715.

[61] **Zetterberg A., Larssen O.**

Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells.

Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1985, 82, 5365.

[62] **Darzynkiewicz Z., Crissman H.A., Traganos F., Steinkamp J.**

Cell heterogeneity during the cell cycle.

J. Cell. Physiol., 1982, 113, 465.

[63] **Darzynkiewicz Z., Traganos F., Melamed M.R.**

New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry.

Cytometry, 1980, 1, 98.

[64] **Coninx P., Liautaud-Roger F., Boisseau A., Loirette M., Cattan A.**

Accumulation of non-cycling cells with a G2 DNA content in aging solide tumors.

Cell Tissue Kinet, 1983, 16, 505.

[65] **Darzynkiewicz Z.**

Metabolic and kinetic compartments of the cell cycle distinguished by multiparameter flow cytometry.

In : Skehan P., Friedman S.J., (eds) Growth, cancer and the cell cycle. Chifton, N.J.:Humana Press, pp 249-278, 1984.

[66] **Kerher M., Van Dilla M.A., Bransting A.**

Is the central dogma of flow cytometry true : that fluorescence intensity is proportionnal to cellular dye content ?

Cytometry, 1982, 3, 71.

[67] **Baish H., Göhde W., Linden W.A.**

Analysis of PCP data to determine the fraction of cells in the various phases of cell cycle.

Radiat. Environ. Biophys., 1975, 12, 31.

[68] **Barlogie B., Drewinko B., Johnston D.A., Buchner T., Hanss W.H., Freidreich E.J.**

Pulse cytophotometric analysis of synchronized cells in vitro.
Cancer Res., 1976, 36, 1176.

[69] **Dean P.N., Jett J.H.**

Mathematical analysis of DNA distributions derived from
microfluorometry.

J. Cell. Biol., 1974, 40, 523.

[70] **Fox M.H.**

A model for the computer analysis of synchronous DNA
distributions obtained by flow cytometry.

Cytometry, 1980, 1, 71.

[71] **Fried J.**

Method for quantitative evaluation of data from flow
microfluorometry.

Comput. Biomed. Res., 1976, 9, 263.

[72] **Crissman H.A., Steinkamp J.A.**

Rapid one step staining procedurs for an analysis od cellular DNA
and protein by single and dual laser flow cytometry.

Cytometry, 1982, 3, (2), 84.

- [73] **Gray J.W., Dolheave F., Pallavicini M.G., Beisher W., Waldman F.**
Cell cycle analysis using flow cytometry.
Int. J; Radiat. Biol., 1986, 49, (2), 237.
- [74] **Hengst J.C.D., Mitchell M.S.**
Methods of mesuring drug-induced immunosuppression in humans.
In : Rose N.R., Friedman H., Fabrey J.L., chap.109, p.727.
- [75] **Ritchie A.W.S., Oswald I., Spedding, Michlena H., Boyd J.E., Elton R.A., Jazwinska E., James K.**
Circadien variation of lymphocyte subpopulations : a study with monoclonal antibodies.
Brit. Med. J., 1983, 286, 1773.
- [76] **Okabe N., Inoue K., Mori R.**
Effects of antithyroid drugs on lymphocyte proliferative responses to lectins : relationship between insulin autoimmune syndrome and methimazole.
J. Clin. Lab. Immunol., 1983, 11, 167.
- [77] **Hallengren B., Forsgren A., Melander A.**
Effects of antithyroid drugs on lymphocyte function in vitro.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1980, 51, (2), 298.

[78] Shewring G.S., Lazarus J.H.

The accumulation of [35S] methimazole by human and rat lymphocytes.

Acta Endocrinologica, 1983, 102, 68.

OUVRAGES CONSULTÉS

ROITT I.

Immunologie.

Ed. Pradel - 1989.

LECLERC J., ORGIAZZI J., ROUSSET B. (et ol).

La thyroïde : de la physiologie cellulaire aux dysfonctions, des concepts
à la pratique clinique.

Expansion scientifique française, Paris - 1992.

METEZEAU P., MIGLIENNA R., RATINAUD M.H..

La cytométrie en flux. Guide pratique de la préparation à l'analyse.

Presses de l'Université de Limoges (PULIM) - 1994.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
PLAN	9
INTRODUCTION	14
1. Les maladies auto-immunes	16
1.1. Généralités	16
1.2. Maladies thyroïdiennes auto-immunes	19
1.2.1. Facteurs prédisposants	20
1.2.1.1. Facteurs endogènes	20
1.2.1.1.1. Le sexe	20
1.2.1.1.2. Le stress	21
1.2.1.1.3. L'âge	21
1.2.1.1.4. Facteurs génétiques	21
1.2.1.2. Substances chimiques	22
1.2.1.2.1. Polluants environnementaux	22
1.2.1.2.2. Substances médicamenteuses	23
1.2.1.2.2.1. L'amiodarone	23
1.2.1.2.2.2. L'iode	24
1.2.1.2.2.3. Le lithium	24
1.2.1.3. Facteurs infectieux	25
1.2.2. Les auto-antigènes thyroïdiens	26
1.2.2.1. La thyroglobuline	26
1.2.2.2. La peroxydase thyroïdienne T.P.O.	27
1.2.2.3. Les récepteur à la T.S.H.	27
1.2.3. Les auto-anticorps thyroïdiens	28
1.2.3.1. Les auto-anticorps anti-Tg	28
1.2.3.2. Les anticorps anti-hormone thyroïdienne	29
1.2.3.3. Les anticorps anti-thyropéroxydase	30
1.2.3.4. Les anticorps anti-recepteur à la T.S.H.	30
1.2.4. Processus et déclenchement de la réponse auto-immune	32
1.2.4.1. Induction d'auto-immunité par court-circuit des lymphocytes T inducteurs	33
1.2.4.1.1. Défaut de présentation de l'antigène	33
1.2.4.1.2. Stimulation idiotypique	35
1.2.4.1.3. Activation polyclonale	35
1.2.4.2. Induction d'auto-immunité par court-circuit des mécanismes régulateurs	35
1.2.4.2.1. Défauts dans le circuit des suppresseurs	35

1.2.4.2.2. Expression anormale de molécules de classe	
II du complexe majeur d'histocompatibilité	36
1.2.5. Principales maladies thyroïdiennes auto-immunes	37
1.2.5.1. La thyroïdite de Hashimoto	37
1.2.5.1.1. Symptomatologie	38
1.2.5.1.2. Biologie	39
1.2.5.1.3. Radiographies	41
1.2.5.1.4. Echographies	41
1.2.5.1.5. Scintigraphies	42
1.2.5.1.6. Traitements	42
1.2.5.2. La maladie de Basedow	43
1.2.5.2.1. Symptômes typiques	43
1.2.5.2.2. symptômes atypiques	45
1.2.5.2.3. Traitements	49
1.2.5.2.3.1. Traitements médicamenteux	49
1.2.5.2.3.2. Traitement chirurgical	52
1.2.5.2.3.3. Traitement par l'iode radioactif	52
2. Complexation-Constante de formation K_c	54
2.1. Complexe par transfert de charge : définition	55
2.1.1. Deux catégories de donneurs	55
2.1.2. Deux catégories d'accepteurs	56
2.1.3. Déroulement de la réaction de complexation	56
2.2. Méthode d'étude	57
2.2.1. Spectrophotométrie	57
2.2.2. Constante de formation du complexe K_c	58
2.2.3. Calcul de la constante de formation K_c	59
2.3. Molécules utilisées	59
3. Méthode d'étude	61
3.1. Le cycle cellulaire	61
3.1.1. Le cycle nucléaire	61
3.1.2. Le cycle de croissance	62
3.1.3. Prolifération cellulaire	62
3.2. La cytométrie en flux	64
3.2.1. Principe	64
3.2.2. Le cytomètre et son environnement	66
3.2.2.1. Paramètres analysés	66
3.2.2.1.1. Analyse de la fluorescence	67
3.2.2.1.2. Analyse de la lumière diffusée	69
3.2.2.1.3. La lumière absorbée	70

3.2.2.2. Mise en suspension des cellules	70
3.2.2.3. L'optique	71
3.2.2.3.1. sources d'excitation	71
3.2.2.3.1.1. Les lampes	71
3.2.2.3.1.2. Les lasers	72
3.2.2.3.2. Filtres et miroirs	72
3.2.2.3.2.1. Les miroirs dichroïques	73
3.2.2.3.2.2. Les filtres	73
3.2.2.3.3. La chambre d'analyse	74
3.2.2.3.4. Les détecteurs	74
3.2.2.4. Traitement du signal optique et analyse	74
3.2.3. Application à l'étude du cycle cellulaire	76
3.2.3.1. Analyse monoparamétrique	76
3.2.3.2. Analyse biparamétrique	80
3.2.3.2.1. analyse biparamétrique du contenu en cellulaire en ADN et en protéines	80
3.2.3.2.2. Analyse du cycle après incorporation de BrdU	82
4. Matériel et méthode	84
4.1. Matériel biologique	84
4.2. Culture cellulaire	84
4.2.1. Séparation des lymphocytes	84
4.2.2. Préparation des solutions de produits à tester	86
4.2.3. Substance stimulant la prolifération	87
4.2.4. Mise en culture	88
4.2.5. Arrêt de la culture cellulaire	89
4.3. Coloration en vue de l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	91
4.3.1. Analyse du contenu en ADN-Protéines	91
4.3.2. Analyse du cycle cellulaire après incorporation de BrdU	92
4.4. Réglages du cytomètre	94
5. Résultats	95
5.1. Etude du cycle cellulaire par mesure du contenu en ADN et en protéines	95
5.1.1. Imipramine	95
5.1.2. Lévamisolé	99
5.2. Analyse du cycle cellulaire après incorporation de BrdU; action du lévamisolé	102

5.3. action du méthimazole et du propylthiouracile sur le cycle lymphocytaire	104
6. Discussion	107
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	122
OUVRAGES CONSULTES	139
TABLE DES MATIERES	141



DOUMAYRENC(Arnaud). - Etude des effets immunomodulateurs de deux produits à fort pouvoir électrodonneur : imipramine et lévamisole. - 145 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm .
(Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1995)

RESUME :

Des auteurs ont observés des anomalies du système immunitaire chez des patients traités par des antithyroïdiens de synthèse (A.T.S.). Les A.T.S. semblent avoir une activité immunomodulatrice.

Nous avons envisagé de tester l'activité de molécules possédant un effet secondaire antithyroïdien sur le cycle cellulaire de lymphocytes en culture.

Notre choix s'est porté sur deux molécules ayant un pouvoir électrodonneur très différent, le lévamisole et l'imipramine. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus lors d'une étude similaire portant sur deux antithyroïdiens majeurs, le méthimazole et le propylthiouracile.

L'imipramine a un effet stimulant sur le cycle cellulaire lymphocytaire. Le lévamisole a une action bloquante de la phase S par augmentation de la sous-phase Sq, comme le méthimazole.

Après avoir montré que l'effet immunomodulateur n'était pas en rapport avec le pouvoir électrodonneur, nous avons mis en évidence une parenté structurale entre le lévamisole et le méthimazole nous permettant d'expliquer leur analogie d'action sur la phase S.

MOTS-CLES :

- Lymphocytes.
- Culture cellulaire.
- Cycle cellulaire.
- Cytométrie en flux.
- Lévamisole.
- Imipramine.
- Méthimazole.
- Propylthiouracile.



JURY : Président : Monsieur LAGORCE
Juges : Mademoiselle CLEDAT
Madame CHABERNAUD
Membre invité : Mademoiselle PAILLER