### Université de Reims-Champagne Ardenne UFR Médecine

Année 2006 N°

### **THESE**

Présentée pour l'obtention du

### DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

DE

### **REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE**

# REGULATION DE LA GENERATION DE THROMBINE PAR L'IL-10;

### POLYMORPHISMES DE L'IL-10 ET RISQUE VASCULAIRE

Présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2006

Par

### Eva COCHERY-NOUVELLON

Discipline : Hématologie

Spécialité : Biomolécule et Dynamique cellulaire

### Membres du jury:

- Rapporteur : Pr Marie-Christine ALESSI

- Rapporteur : Pr Marc VASSE

- Directeur de thèse : Pr Philippe NGUYEN

- Co-directeur de thèse : Pr Jean-Christophe GRIS

- Examinateur : Pr Philippe de MOERLOOSE

- Examinateur : Pr Anne LONG

- Examinateur : Dr Nathalie HEZARD

### Remerciements

#### A mon directeur de recherche

Monsieur le Professeur Philippe Nguyen,

Je te remercie pour tout ton soutien au cours de ce travail. Ton encadrement, tes conseils, les nombreuses discussions que nous avons eu ont permis de valoriser ces travaux de recherche. Je te remercie, encore une fois, également pour tous les autres travaux pour lesquels tu m'as auparavant dirigée (Thèse, DEA..) et pour les années que j'ai passées dans ton service en tant qu'assistante. Sois assuré de mon entière reconnaissance.

#### A mes juges

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Gris,

Vous m'avez accueillie dans votre service, je vous en remercie. Ceci m'a permis de poursuivre ce travail et de l'enrichir en y intégrant la pathologie vasculo-placentaire. Je vous remercie pour vos conseils quotidiens ainsi que pour l'ensemble des projets que vous m'avez permis de mener à bien.

Monsieur le Professeur Philippe de Merloose,

Vous me faites un très grand honneur en acceptant de juger ce travail, je vous en remercie.

Madame le professeur Anne Long,

Je vous remercie d'avoir accepter de juger ce travail.

Madame le Docteur Nathalie Hézard,

Je te remercie pour tes conseils et tes encouragements. Merci d'accepter de juger ce travail.

### A mes rapporteurs

Madame le Professeur Marie-Christine Alessi,

Je vous remercie d'avoir accepter d'être rapporteur pour ce travail. Je vous remercie pour vos conseils et corrections.

Monsieur le Professeur Marc Vasse,

Vous avez accepté d'être rapporteur pour ce travail, soyez en remercié.

#### Monsieur le Professeur Gérard Potron,

Vous m'avez accueillie dans votre service en tant qu'interne en biologie. Vous m'avez initiée à l'Hématologie et à la Recherche. Vous m'avez accordée votre confiance en me proposant un poste d'assistante, à travers ce travail, je vous en remercie.

### Aux équipes des laboratoires d'Hématologie de Reims et de Nîmes

Un grand MERCI à tous ceux qui de prêt ou de loin m'ont aidé à mener ce travail à bien : Pascale Cornillet-Lefèbvre, Eric Mercier, Lucile Gillot, Stéphane Poitevin, Marie-Geneviève Remy, Annick Dupont, Fabien Vitry, aux équipe des cultures cellulaire, de l'élutriation...

### A ma famille

### A Jeanne et Emmanuel

Merci pour votre soutien quotidien, merci pour votre aide, merci d'être là....

#### A mes parents

MERCI pour vos encouragements, votre aide ces dernières semaines, et merci pour tout le reste....

A mes amis de Reims, de Nîmes, de Tours et d'ailleurs..

A tous ceux qui sont présents aujourd'hui..

## Sommaire

Présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2006.	
Sommaire	<u>1</u>
Principales abréviations	<u>3</u>
Intitulés des figures	5
Intitulés des tableaux	
I Introduction générale	
II Etat des connaissances sur le sujet	10
II.1 Le gène de l'IL-10 : structure et régulation	
II.1.1 Le gène.	
II.1.2 Le promoteur	11
II.1.2.1 Les polymorphismes génétiques, leurs nomenclatures et leurs fréquence	
alléliques	
II.1.2.2 Voies de signalisation et facteurs de transcription intervenant dans la	
régulation de la transcription du gène de l'IL-10	16
II.2 La protéine IL-10.	22
II.2.1 Structure de la protéine IL-10.	22
II.2.2 Analogies structurales des protéines de la famille de l'IL-10	<u>25</u>
II.3 Le récepteur de l'IL-10	27
II.3.1 Structure du récepteur.	27
II.3.2 Voie de signalisation	
II.4 Activités biologiques de l'IL-10	<u>32</u>
II.4.1 IL-10 et régulation des phénomènes immunologiques.	
II.4.1.1 Effet de l'IL-10 sur les monocytes, les macrophages, les cellules dend	
et les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.	
II.4.1.2 Effet de l'IL-10 sur les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellul	
II.4.1.3 Effets biologiques de l'IL-10 virale.  II.4.2 IL-10 et hémostase.	
II.4.2.1 Introduction.	
II.4.2.2 IL-10 et régulation de l'expression du facteur tissulaire	
II.4.2.3 IL-10 et fibrinogène.	
II.4.2.4 IL-10 et fibrinolyse.	
II.5 IL-10 et pathologie	
II.5.1 Introduction.	
II.5.2 Modèles animaux	
II.5.2.1 Introduction.	
II.5.2.2 Modèles animaux : IL-10 et thrombose veineuse.	
II.5.2.3 Modèles animaux : IL-10 et thrombose artérielle.	49
II.5.3 Polymorphismes de l'IL-10 et pathologie humaine.	<u>53</u>
II.5.3.1 Introduction.	
II.5.3.2 Polymorphismes de l'IL-10 et pathologie infectieuse	
II.5.3.3 Polymorphismes de l'IL-10 et hémopathies malignes	<u>55</u>
II.5.3.3.1 Polymorphismes de l'IL-10 et myélome.	
II.5.3.3.2 Polymorphismes de l'IL-10 et lymphomes.	
II.5.3.4 Polymorphismes de l'IL-10 et lupus érythémateux disséminé (LED)	
II.5.3.5 Polymorphismes de l'IL-10 et grossesse	64

II.5.3.6 Polymorphismes de l'IL-10 et thrombose.	67
III Résultats personnels	
III.1 IL-10 et régulation de la génération de thrombine	
III.1.1 Introduction	
III.1.2 Matériel et méthode.	
III.1.3 Résultats	73
III.1.3.1 Article soumis.	
III.1.3.2 Principaux résultats	97
III.1.4 Discussion.	
III.2 Polymorphismes de l'IL-10 en pathologie vasculaire	<u> 104</u>
III.2.1 Détermination des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 che	z 20
témoins, corrélation à la production d'IL-10	104
III.2.1.1 Introduction.	104
III.2.1.2 Matériel et méthode.	105
III.2.1.2.1 Population recrutée.	
III.2.1.2.2 Etude moléculaire des polymorphismes du promoteur de l'IL-10	
III.2.1.2.3 Dosage de l'IL-10 par technique ELISA (Enzyme Like Immunosor	
Assay) dans le surnageant de deux modèles de culture cellulaire	
III.2.1.3 Résultats.	<u> 108</u>
III.2.1.4 Discussion.	
III.2.2 Modèle de la thrombose veineuse.	
III.2.2.1 Introduction	121
III.2.2.2 Résultats	122
III.2.2.2.1 Publication.	122
III.2.2.2.2 Principaux résultats.	128
III.2.2.3 Discussion.	
III.2.3 Modèle de la pathologie obstétricale vasculo-placentaire.	
III.2.3.1 Introduction	133
	133
III.2.3.3 Résultats	137
III.2.3.3.1 Analyse univariée.	
III.2.3.3.2 Analyse multivariée.	144
III.2.3.4 Discussion.	145
IV Conclusions et perspectives	
V Références.	<u> 155</u>
VI Annexe 1 : Zammiti et al (Mol Hum Reprod, 2006)	183

### Principales abréviations

ADNc: acide désoxyribonucléique codant

AILIM/ICOS: Activation-inducible lymphocyte immuno-mediatory molecule/inducible co-

stimulateur

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

C/EBP (CAAT/enhancer binding protein): facteur transcriptionnel se liant à la boite CAAT

CMH: complexe majeur d'hystocompatibilité

CREB (cAMP responsive element binding): protéine trans-activatrice médiant les effets de

1'AMPc

ERK: extra-cellular signal regulated kinase

FC: fausses-couches FT: facteur tissulaire

GM-CSF: granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

ICAM: intercellular adhesion molecule

IL: interleukine

IL-10 : interleukine 10 IM: infarctus du myocarde

INFγ: interféron γ JAK-2: Janus Kinase 2

JNK: c-Jun N-terminal kinase

Kb: kilobase

LDL : lipoprotéine de basse densité

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen-activated protein kinase MEK: Mitogen-activated ERK kinase

MGUS: monoclonal gammapathy of undetermined significance

MM : myélome multiple MMP : métalloprotéase NF-kB : facteur nucléaire kB

NK: natural killer

PAI : *plasminogen activator-inhibitor* PAP : complexe plasmine α2 antiplasmine

PBMC : cellules mononucléées périphériques sanguines

PI3K: phosphatidyl-inositol 3 kinase

PKB: proteine kinase B

PPP: plasma pauvre en plaquettes

PTI: purpura thrombocytopénique idiopathique

SA: semaines d'aménorrhée

SNP : (single nucléotide polymorphism) polymorphisme de substitution d'acide nucléique

Src: oncogène Src-tyrosine kinase

STAT: signaux transducteur et activateur de la transcription

TFPI: inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (Tissue Factor Pathway inhibitor)

Th1: T helper 1 Th2: T helper 2

TLR: Toll like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

t-PA: activateur du plasminogène d'origine tissulaire TRAF-3: récepteur au TNF associé au facteur 3 VCAM: vascular cellular adhesion molecules

# Intitulés des figures

Figure 1. Localisation des polymorphismes génétiques –592C>A, -819C>T, -1082G>A, des microsatellites IL-10G et IL-10R, et des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription situés sur le promoteur du gène de l'IL-10 d'après Eskdale J	
(16)	19
Figure 2. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la transcription de l'IL-10 d'après Okamoto N (50) et Dahle MK (51)	21
Figure 3. Structure de l'IL-10 d'après Zdanov A (67)	25
Figure 4. Interaction entre l'IL-10 et les chaînes IL-10R1 et IL-10R2 de son récepteur d'après Pletnev S (73)	30
Figure 5. Voie de signalisation activée par l'IL-10 et son récepteur d'après Donnelly RP (74).	32
Figure 6. Effets de l'interleukine 10 sur différents médiateurs de l'immunité d'après Mocellin S (93)	36
Figure 7. Recrutement de la population de patientes de l'étude clinique sur les fausses-couches et les polymorphismes de l'interleukine 10	136

### Intitulés des tableaux

Tableau I Correspondance entre la nomenclature des allèles du
microsatellite IL-10G, le nombre de répétitions de CA et la taille des
produits de PCR d'après Eskdale J (21)13 Tableau II Correspondance entre la nomenclature des allèles du
Tableau II Correspondance entre la nomenclature des allèles du
microsatellite IL-10R, le nombre de répétitions de CA et la taille des
produits de PCR d'après Eskdale J (22)13
Tableau III Différentes nomenclatures des polymorphismes de substitution
d'acide nucléique 13
d'acide nucléique
l'interleukine 10 en fonction des ethnies15
Tableau V Facteurs et sites de transcription de l'interleukine 10 décrits
dans la littérature chez l'homme21
Tableau VI Facteurs et sites de transcription de l'interleukine 10 chez la
souris et le rat22 Tableau VII Cytokines humaines de la famille de l'interleukine 10 d'après
Tableau VII Cytokines humaines de la famille de l'interleukine 10 d'après
Fickenscher H (69)26
Tableau VIII Cytokines virales de la famille de l'interleukine 10 d'après
Fickenscher H (69)26
Tableau IX Interleukine 10 et facteur tissulaire : revue de la littérature39
Tableau X Modèles animaux d'étude de l'interleukine 10 dans la thrombose
veineuse48
Tableau XI Modèles animaux d'étude de l'interleukine 10 dans la
thrombose artérielle52
Tableau XII Myélome multiple et polymorphismes génétiques du
promoteur de l'interleukine 1057
Tableau XIII Lymphomes et polymorphismes génétiques du promoteur de
l'interleukine 1060
Tableau XIV Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10
et lupus érythémateux disséminé63
Tableau XV Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10
et fausses-couches 66
Tableau XVI Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10
et thromboses artérielles68
Tableau XVII Correspondance entre la nomenclature des allèles du
microsatellite IL-10G d'après Eskdale J (21) * et la nomenclature utilisée
au cours de la thèse110
Tableau XVIII Correspondance entre la nomenclature des allèles du
microsatellite IL-10R d'après Eskdale J (22) * et la nomenclature utilisée
au cours de la thèse110

<b>Tableau XIX Allèles du microsatellite IL-10G et pathologies : revue de la</b>
littérature 131
Tableau XX Allèles du microsatellite IL-10G et pathologies : revue de la
littérature (suite)132
Tableau XXI Répartition du nombre de fausses-couches totales dans le
groupe cas (toutes les FC<10 SA) et dans le groupe contrôle (toutes les
FC>10 SA)
Tableau XXII Répartition des patientes caractérisées par un nombre élevé
de fausses-couches en fonction du nombre de FC et de leur période de
survenue 138
Tableau XXIII Caractéristiques biologiques des patientes du groupe cas
(toutes les FC<10 SA) et du groupe contrôle (toutes les FC>10 SA) 139
Tableau XXIV Fréquences alléliques des microsatellites IL-10G, IL-10R et
des polymorphismes génétiques de substitution -592C>A et -810C>T des
groupes cas (toutes les FC<10 SA) et contrôle (toutes les FC>10 SA) 141
Tableau XXV Fréquence des génotypes identifiés dans le groupes cas
(toutes les FC<10 SA) et contrôle (toutes les FC>10 SA)143
Tableau XXVI Fréquences des génotypes regroupés en fonction du nombre
d'allèles mutés dans le groupes cas (toutes les FC<10 SA) et contrôle (toutes
les FC>10 SA)
Tableau XXVII Variables dont les fréquences sont significativement
différentes entre les deux groupes de patientes en analyse multivariée 144

### I Introduction générale

De nombreuses pathologies dysimmunitaires et/ou inflammatoires sont caractérisées par un dérèglement de l'hémostase et/ou un risque accru de survenue d'évènements thromboemboliques. Les pathologies les plus étudiées dans ce domaine sont la coagulopathie de consommation associée au sepsis, le syndrome primitif des anti-phospholipides, les thrombocytopénies induites par l'héparine, la thrombose artérielle et veineuse associée ou non à une dysimmunité et la pathologie néoplasique. La physiopathologie de la survenue d'un événement thrombo-embolique dans ces différents contextes cliniques a été en partie identifiée ces dernières années par de nombreuses études expérimentales et cliniques qui ont montré un lien entre l'immunité, l'inflammation et l'hémostase. Ainsi, une élévation des marqueurs de l'inflammation tels que la CRP ou les cytokines pro-inflammatoires a été identifiée durant les poussées thrombo-emboliques. Cependant, il semblerait que dans la thrombose veineuse, contrairement à la thrombose artérielle, le phénomène inflammatoire ne soit pas l'événement initiateur de la formation du thrombus, mais soit un événement supplémentaire favorisant la survenue d'un thrombus. Le rôle exact de l'inflammation dans la thrombose veineuse reste encore à déterminer.

Le facteur tissulaire (FT) a un rôle essentiel dans l'initiation de la coagulation. Il est le récepteur/cofacteur membranaire du facteur VII de la coagulation. Le facteur VII adopte sa forme active une fois lié au FT. Le FT est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les monocytes et les cellules endothéliales activés par différents agents pro-inflammatoires tels que des agents infectieux, les endotoxines, les complexes immuns et des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (IL-1 et TNF). L'augmentation de l'expression du FT au cours des phénomènes inflammatoires est une des clefs biologiques reliant l'inflammation à la coagulation. Par ailleurs les cytokines pro-inflammatoires inhibent le système inhibiteur de la coagulation thrombomoduline / protéine C, perturbent le système de la fibrinolyse en activant l'activateur du plasminogène et l'inhibiteur de type 1 de cet activateur (PAI-1) et stimulent la synthèse par les cellules endothéliales d'agents vasoactifs. En revanche, l'interleukine-10 (IL-10), l'IL-4 et l'IL-13, cytokines anti-inflammatoires de type Th2, synthétisées au cours des phénomènes inflammatoires, diminuent l'expression du FT par les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages et régulent ainsi l'activation de la coagulation (1) (2). Il apparaît, à travers la littérature, que l'équilibre cytokinique Th1 (cytokines pro-inflammatoires)/Th2

(cytokines anti-inflammatoires) joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'hémostase. L'équilibre des cytokines influe sur le niveau d'activation hémostatique en modifiant les interactions complexes entre les cellules endothéliales, les cellules sanguines et le système coagulation/fibrinolyse, paramètres essentiels de l'hémostase.

Afin de comprendre son implication dans la. survenue d'évènements thromboemboliques, nous avons étudié dans un premier temps l'influence de l'IL-10 sur la génération de thrombine par des monocytes. Ces travaux ont été rédigés sous la forme d'un article actuellement en cours de soumission (Chapitre III.1.3.1). Dans un second temps nous avons essayé de corréler certains polymorphismes du promoteur du gène de cette cytokine avec son expression dans un modèle de transfection. Nous avons également effectué des dosages de l'Il-10 dans le surnageant de cultures de cellules mononucléées isolées chez des témoins chez lesquels des polymorphismes du promoteur de l'IL-10 avaient été identifiés. Puis nous avons conduit deux études clinico-épidémiologiques. La première étude analysait la fréquence des polymorphismes du promoteur de l'IL-10 dans une population de patients caractérisés par la survenue d'une maladie thrombo-embolique veineuse et dans une population de témoins. Cette étude a été soumise à publication et acceptée (Chapitre III.2.2.2.1). Au cours de la seconde étude, nous avons déterminé ces fréquences dans des populations de patientes ayant développé des fausses-couches de différents types cliniques. Ces travaux seront très prochainement rédigés sous forme d'article et soumis à publication.

### II Etat des connaissances sur le sujet

L'interleukine-10 (IL-10) est décrite pour la première fois en 1989 (3) comme un facteur inhibant la production de cytokines par des lymphocytes T helper de type 1 (Th1) et les fonctions effectrices des monocytes/macrophages. Sa fonction principale semble être l'inhibition de la réponse inflammatoire. Ce rôle dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation est mis en évidence in vivo dans un modèle de souris dont le gène de l'IL-10 a été invalidé. Ces souris développent une réaction de type Th1 importante (4) associée à l'expression de pathologies inflammatoires (5) (6) (7) (8). C'est dans ce contexte que de nombreuses études fondamentales et cliniques concernant le rôle de l'IL-10 dans la survenue de pathologies à composante inflammatoire et/ou dysimmunitaire ont été publiées. De plus, depuis quelques années, émerge un groupe de protéines, d'origine humaine ou animale, appelé famille de l'IL-10. Ces protéines sont caractérisées par des séquences en acides aminés homologues. Leurs effets physiologiques sont pour certaines de ces protéines, notamment virales, très proches de ceux de l'IL-10 et pourraient expliquer le rôle pathologique de l'IL-10 dans la survenue de certaines hémopathies.

### II.1 Le gène de l'IL-10 : structure et régulation

### II.1.1 Le gène

Le gène de l'IL-10 se situe sur le chromosome 1 entre les positions 1q31 et 1q32 (9). Le locus de ce gène mesure environ 2 Kb. Il est présent en une seule copie dans les cellules. Le gène est formé de quatre introns et de cinq exons (10). Sa structure est très conservée et caractérise la famille des cytokines homologues de l'IL-10. Le premier exon code pour le peptide signal et l'hélice A, le deuxième pour la boucle AB et l'hélice B, le troisième pour les hélices C et D, le quatrième pour la boucle DE et le cinquième pour l'hélice E, l'hélice F, la partie COOH terminale de l'IL-10 et un segment non transcrit intervenant dans la stabilité de l'ARNm (11).

Des séquences d'ADNc homologues ont été identifiées dans le génome de nombreux virus. Les homologies les plus fortes sont identifiées dans le génome des virus Epstein-Barr

(12) (13), Herpes papio et Herpes équin (14). Ces virus ont ainsi la possibilité de synthétiser une IL-10 virale dont les propriétés sont proches de celles de l'IL-10 humaine. Cette propriété leur permet de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte ce qui leurs confère une défense naturelle et permet leur survie.

### II.1.2 Le promoteur

# II.1.2.1 Les polymorphismes génétiques, leurs nomenclatures et leurs fréquences alléliques

Kube D *et al* (15) décrivent le promoteur de l'IL-10 pour la première fois en 1995. La séquence est déterminée à partir du site de démarrage de la transcription jusqu'à la position – 4082. Cette séquence est déposée dans la banque GenBank sous le numéro d'accession X78437. Aujourd'hui plus d'une quinzaine de polymorphismes génétiques sont décrits dans le promoteur du gène de l'IL-10 (16) (17) (18). Ces polymorphismes sont le plus souvent des polymorphismes de substitution d'acide nucléique (SNP). Deux microsatellites de répétitions de CA ont été également identifiés ainsi qu'une insertion/délétion de trois nucléotides. Des variations inter-individuelles de production cellulaire d'IL-10 ont été identifiées. Soixante dix pourcents de ces variations ont une origine génétique (19). Plusieurs études ont essayé de déterminer si certains polymorphismes du promoteur de l'IL-10 étaient des facteurs génétiques de variation de sécrétion d'IL-10 (20). Par ailleurs, les fréquences alléliques de nombreux polymorphismes du promoteur de l'IL-10 ont été déterminées dans des populations de patients atteints de pathologies inflammatoires et/ou dysimmunitaires afin d'établir une corrélation entre la présence d'un allèle et l'expression d'une pathologie.

Au cours de notre travail, nous avons étudié les cinq polymorphismes génétiques les plus fréquemment analysés dans les études cliniques. Ces polymorphismes regroupent deux microsatellites formés de répétitions de CA nommés IL-10G et IL-10R et trois polymorphismes de substitution d'acides nucléiques C>A, C>T et G>A situés respectivement aux positions –592, -819 et –1082 du promoteur (16). Les deux microsatellites IL-10R et IL-10G sont respectivement situés à –4Kb et –1,1Kb du site d'initiation de la transcription. Ils sont formés d'un nombre variable de répétitions de CA (**Tableaux I et II**).

La nomenclature des allèles des microsatellite IL-10G et IL-10R la plus utilisée est celle d'Eskdale J et al (21) (22) (Tableaux I et II). Certains auteurs décrivent les allèles par la taille des produits de PCR. Celle-ci étant dépendante de la localisation des amorces, ce choix de description est à l'origine d'erreurs d'interprétation des résultats. La nomenclature la plus fréquemment employée pour décrire les polymorphismes de substitution d'acide nucléiques (SNP ou single nucléotide polymorphism) est celle de Turner DM et al (23) (Tableau III). Les trois polymorphismes de substitution d'acide nucléique sont dénommés en fonction de leur position dans le promoteur. Cette position est déterminée à partir du codon « start » ATG. La localisation de ces SNP a été réalisée à partir de la séquence X78437 du promoteur déposée dans GenBank. Bien que la nomenclature la plus couramment utilisée soit celle de Turner DM (23), il existe une nomenclature officielle que l'on peut retrouver sur le site <a href="http://snp500cancer.nci.nih.gov">http://snp500cancer.nci.nih.gov</a> (Tableau III). La nomenclature concernant les SNP et les microsatellites n'est pas homogène dans la littérature. Cet aspect sera repris et discuté dans la partie présentant nos résultats.

Tableau I Correspondance entre la nomenclature des allèles du microsatellite IL-10G, le nombre de répétitions de CA et la taille des produits de PCR d'après Eskdale J (21).

Allèles	Nombre de répétitions	Taille des produits
	de CA	de PCR (%)
G1	14	124 (0,5)
G2	15	126 (0)
G3	16	128 (0)
G4	17	130 (0)
G5	18	132 (0,5)
G6	19	134 (0)
G7	20	136 (2,4)
G8	21	138 (3,4)
G9	22	140 (50)
G10	23	142 (6,8)
G11	24	144 (9,8)
G12	25	146 (4,4)
G13	26	148 (16,1)
G14	27	150 (4,9)
G15	28	152 (0)
G16	29	154 (0,5)

(% : fréquence déterminée dans une population de 102 témoins sains caucasiens de Glasgow)

Tableau II Correspondance entre la nomenclature des allèles du microsatellite IL-10R, le nombre de répétitions de CA et la taille des produits de PCR d'après Eskdale J (22).

Allèles	Nombre de répétitions de CA	Taille des produits de PCR (%)
R0	11	
R1	12	
R2	13	114 (56,4)
R3	14	116 (40,4)
R4	15	118 (3,2)

(% : fréquence déterminée dans une population de 94 témoins sains caucasiens de Glasgow)

Tableau III Différentes nomenclatures des polymorphismes de substitution d'acide nucléique.

Polymorphismes	DM Turner (23)	Nomenclature officielle*
TGGGA(G>A)GGGGA	-1082	-1116 (IL10-03)
TGTAA(C>T)ATCTC	-819	-853 (IL10-01)
CCTGT(C>A)CTGTA	-592	-626 (IL-10-02)

(\* site internet <a href="http://snp500cancer.nci.nih.gov">http://snp500cancer.nci.nih.gov</a>)

Les données publiées sur la fréquence des allèles de ces cinq polymorphismes rapportent des différences liées à l'origine ethnique des populations étudiées (Tableau IV). Ainsi, les fréquences alléliques des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 déterminées dans les populations témoins des études varient. Eskdale J et al (24) montrent que la fréquence allélique IL-10R3 est moins fréquente dans une population témoin afroaméricaine d'Atlanta (n=38, 23,7%) que dans deux populations témoins de Glasgow (n=94, 40,4%) et d'Oxford (n=87, 36,2%). La population témoin d'Afrique du sud (n=73) de MacKay et al (25) a une fréquence allélique de IL-10R3 de 15% alors que cet allèle présente une fréquence de 31% dans leur population témoin contrôle de caucasiens de Grande-Bretagne (n=296). Kube D et al (26) analysent la fréquence des allèles des microsatellite IL-10G et Il-10R dans une population saine de caucasiens originaires d'Allemagne (n=218) et dans une population saine africaine originaire du Gabon (n=91). L'allèle IL-10R3 est significativement moins fréquent dans la population gabonaise (9%) que dans la population allemande (28%). L'allèle IL10G9 est beaucoup moins représenté dans la population gabonaise (29% versus 38% dans la population allemande) alors que les allèles IL-10G10 et IL-10G11 y sont beaucoup plus fréquent (22% et 26% versus 10% et 9%). Dans la population de 102 témoins caucasiens non apparentés originaires de Glasgow analysés par Eskdale J et al (21), les fréquences des allèles IL-10G9, G10 et G11 sont respectivement de 50%, 6,8% et 9,8%. Les fréquences des allèles –1082A et –592A sont déterminées dans des populations témoin caucasiennes du sud-est de l'Angleterre (n=152) (27), de Manchester en Grande Bretagne (n=660) (28), d'Allemagne (n=218) (29), et également de Chine (n=166) (30) et du Gabon (n=91) (29). La fréquence la plus élevée de l'allèle -592A est déterminée dans la population chinoise (67%). La fréquence la plus basse est identifiée dans la population du sud est de l'Angleterre (16,4%). La fréquence de l'allèle -1082A est le plus souvent proche de 50% excepté dans la population chinoise où elle est de 94%. Ces variations de fréquence allélique, mais également d'haplotype, en fonction de l'origine ethnique sont à connaître lors de l'interprétation des études cliniques. En effet dans la majorité des études, les auteurs corrèlent un polymorphisme génétique de l'Il-10 avec la survenue de pathologies. Par ailleurs ils mettent en parallèle les différences de fréquences alléliques des polymorphismes de l'IL-10 avec des différences de fréquence de survenue de pathologies en fonction de l'ethnie.

Tableau IV Fréquences alléliques des polymorphismes du promoteur de l'interleukine 10 en fonction des ethnies.

Etude	Origine des contrôles (n)	R2 (%)	R3 (%)	R4 (%)	G9 (%)	G10 (%)	G11 (%)	-592C (%)	-592A (%)	-819C (%)	-819T (%)	-1082G (%)	-1082A (%)
Eskdale J, Immunogenetics 1995 (21)	Caucasiens, Glasgow (Ecosse) n=102	,			50,5	6,8	9,8						,
Eskdale J, Immunogenetics 1996 (21)	Caucasiens Glasgow (Ecosse) n=92	56,4	40,4	3,2									
Turner DM, Eur J Immunogenetics 1997 (23)	Causcasiens Nord ouest Angleterre N=119							79,0	21,0	79,0	21,0	51,0	49,0
Eskdale J, Lancet 1998 (24)	Caucasiens Oxford (Angleterre) n=87	60,9	36,2	2,9									
Eskdale J, Lancet 1998 (24)	Noirs américains Atlanta (EU) n=38	72,3	23,7	0,0									
Perrey C, Transplant Immunology 1998 (28)	Caucasiens Manchester (Angleterre) n=330							77,0	23,0	77,0	23,0	49,0	51,0
Mok CC, Arthritis Rheum 1998 (30)	Chine, n=166											6,0	94,0
Reynard MP, J Immunogenetics 2000 (27)	Caucasien Sud est Angleterre, n=152							68,0	32,0			52,6	47,4
D'Alfonso S, Arthritis Rheum 2000 (31)	Caucasiens Italie du nord N=164	80,0	18,0	0,9	35,0	6,0	8,0					64,0	36,0
Kalusa W, Arthritis Rheum 2001 (32)	Caucasiens Finlandais n=62	53,0	21,0	4,0	30,0	18,0	6,0						
Kube D, Eur Cytokine Netw 2001 (26)	Caucasiens, Cologne (Allemagne) n=218	69,0	28,0	3,0	38,0	10,0	9,0	74,0	26,0			49,0	51,0
Zhou Y, J Rheumatol 2002 (33)	Caucasiens suédois N=109				29,0	11,0	9,0						
Kube D, Genes and Immunity 2003 (29)	Africains (Gabon) n=91	88,à	9,0	2,0	29,0	22,0	26,0	62,0	38,0			48,0	52,0
MacKay K, Rheumatol 2003 (25)	Caucasiens Grande Bretagne n=296	65,0	31,0										
MacKay K, Rheumatol 2003 (25)	Africains, Afrique du sud (n=73)	77,0	15,0										

# II.1.2.2 Voies de signalisation et facteurs de transcription intervenant dans la régulation de la transcription du gène de l'IL-10

La régulation de la production de l'IL-10 reste mal connue à ce jour. Cette cytokine antiinflammatoire est produite par de nombreux types cellulaires parmi lesquels ont été identifiés les lymphocytes Th1, Th2 Th0, les lymphocytes B, les mastocytes, les polynucléaires éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les kératinocytes (34) (35) (36) (37) (38) et également des cellules pathologiques telles que les tricholeucocytes (39), les cellules de Hodgkin (40), les cellules de Sezary (41), les plasmocytes de myélome multiple (42) et certaines cellules de mélanome (43).

Quel que soit le type de cellule, la synthèse de l'IL-10 est toujours secondaire à un stimulus. La régulation de l'expression de l'IL-10 en réponse à un stimulus semble être propre à chaque type cellulaire (44). De plus, d'après Westendorp RGJ et al (19), la capacité cellulaire à produire faiblement ou fortement de l'IL-10 en réponse à un stimulus serait déterminée génétiquement à 75%. Cette grande hétérogénéité individuelle de réponse aux stimuli a été imputée en partie aux trois polymorphismes de substitution d'acide nucléiques (SNP) du promoteur de l'Il-10 –1082G>A, -819C>T et –592C>A et aux deux microsatellites IL-10G et IL-10R. L'étude de la réponse cellulaire à un stimulus par la mise en culture de cellules mononucléées de génotype connu a permis de corréler l'allèle IL-10R3 à une faible production d'IL-10 (45) et l'haplotype -1082G/-819C/-592C à une capacité plus élevée de produire de l'IL-10 (23). Crawley E et al (46) ont étudié le rôle des trois SNP par une technique de transfection et ont corrélé l'haplotype ATA à une capacité diminuée de production d'IL-10. Eskdale J et al (16) (Figure 1) ont déterminé les sites potentiels de fixation de facteurs de transcription se situant entre le codon « start » et la position –4082 du promoteur (séquence X78437 dans GenBank) notamment pour identifier le rôle exact des polymorphismes sur la transcription du gène. Ils ont utilisé les logiciels SIGSCAN® et MatInspector/TRANSFAC®. Au total 74 sites ont été identifiés. Les polymorphismes – 1082G>A -819C>T et -592C>A se situent respectivement proche d'un site de fixation du facteur de transcription Ets, d'un site de régulation positive (non déterminé) et d'un site de fixation du facteur de transcription STAT3. Par ailleurs, ils ont également décrit des sites participant plus particulièrement aux voies de signalisation des cytokines, suggérant leur rôle dans la régulation de la transcription et dans l'expression de l'IL-10 ainsi qu'un rôle

d'autorégulation par l'IL-10 elle-même. Ainsi, neufs sites de fixation de facteurs de la famille NF $\kappa$ B/REL, caractérisés pour participer à la voie de signalisation du TNF (47), ont ainsi pu être localisés ainsi que quatre sites de fixation de STAT 1, facteur de transcription intervenant dans la voie de signalisation de l'interféron (48). Des séquences consensus pour l'INF $\gamma$ , l'IL-6 et le GM-CSF « responsive element » sont également fréquemment identifiées (**Figure 1**).

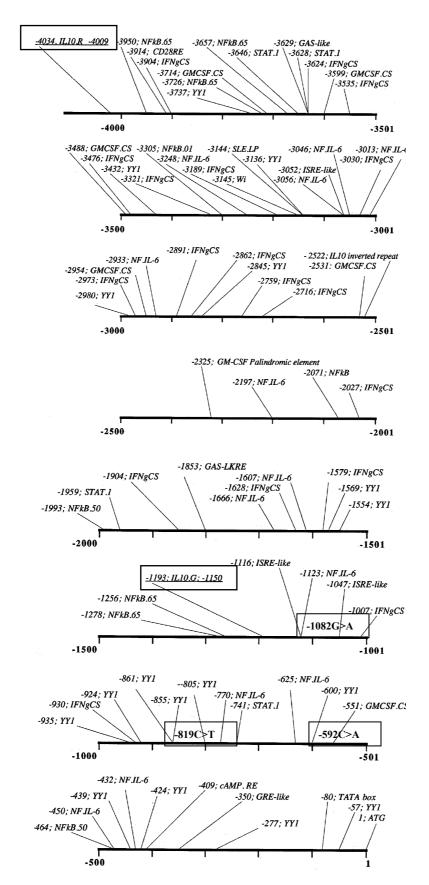
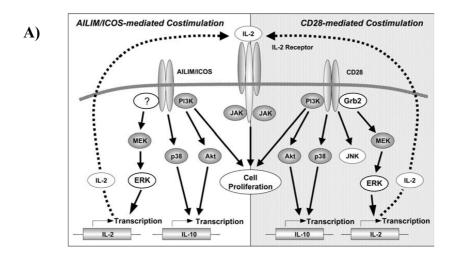


Figure 1. Localisation des polymorphismes génétiques -592C>A, -819C>T, -1082G>A, des microsatellites IL-10G et IL-10R, et des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription situés sur le promoteur du gène de l'IL-10 (d'après Eskdale J) (16).

Un modèle de transfection a permis à Kube D *et al* d'identifier différentes régions du promoteur régulatrices de la transcription de l'IL-10 (15). La délétion de la région –141/+27 comportant le site majeur de transcription (CAT) et la TATA box située en position –80/-140 induit une absence totale de transcription. La délétion de la région –1000/-800 entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle ce qui suggère la présence de site de fixation de facteurs activateurs de la transcription. La construction comportant une délétion de la région – 750/-350 induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle ce qui permet aux auteurs de conclure à la présence de site de fixation de facteurs inhibiteurs de la transcription.

Depuis, plusieurs facteurs de transcriptions ainsi que leurs sites de fixation sur le promoteur ont été décrits (**Tableau V**). La plupart des auteurs ont associé des techniques de transfection, de PCR quantitative et de retard sur gel de mobilité électrophorétique (« band shift assay ») pour identifier les facteurs de transcription et leurs sites de fixation. Les protéines trans-activatrices actuellement identifiées comme participant à la transcription du gène de l'IL-10 sont Sp1 et 3, STAT3, CREB/ATF, C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , c-Maf (49) et NF $\kappa$ B. Les récepteurs Fas / Fas ligand, les récepteurs de type  $\beta$ 2 adrénergiques, les récepteurs à l'adénosine (notamment  $A_{2B}$ ) et les récepteurs de type « Toll Like Receptor » (TLR 2, 3, 4) sont impliqués dans l'activation de la transcription du gène de l'IL-10 (**Tableau V**). L'activation de ces récepteurs déclenche des voies de signalisation impliquant la P38 MAPK le plus souvent mais également JAK 2, ERK, JNK, PI3K et les caspases 3, 8 et 9 (50) (51).

Les modèles utilisés pour identifier les facteurs de transcription et les voies de signalisation de l'IL-10 sont très variables. Les cellules sont d'origine humaine ou animale (**Tableaux V et VI**). Les types cellulaires et les activateurs sont également très différents. On retrouve le plus fréquemment des lignées cellulaires hématopoïétiques. La question de la spécificité humaine ou animale et/ou de type cellulaire de chaque facteur de transcription ou de voie de signalisation se pose bien que certains facteurs comme Sp1 soient décrits comme ubiquitaires.



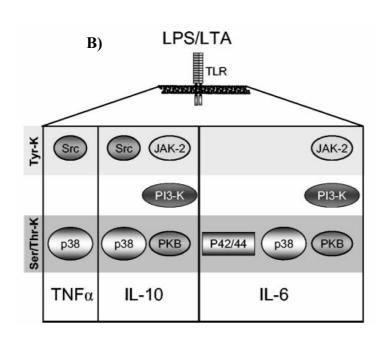


Figure 2. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de la transcription de l'interleukine 10 d'après Okamoto N (50) et Dahle MK (51).

- A) Modèle de lymphocytes T purifiés activés via deux types de récepteurs : le CD28 et le AILIM/ICOS par des anticorps monoclonaux anti-CD28 ou anti- AILIM/ICOS (50).
- **B)** Modèle de cellules Kuppfer de rats activées via un récepteur de type TLR par deux activateurs : le LPS et le LTA (51).

(AILIM/ICOS: Activation-inducible lymphocyte immuno-mediatory molecule/inducible co-stimulateur; PI3-kinase: phosphatidyk-inositol 3 kinase; ERK: extra-cellulaire signal regulated kinase; MEK: Mitogen-activated ERK kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; JAK: Janus Kinase; PKB: proteine kinase B; Src: oncogène Src-tyrosine kinase)

Tableau V Facteurs et sites de transcription de l'interleukine 10 décrits dans la littérature chez l'homme.

Auteurs	Modèles cellulaires	Activateurs	Sites de fixation	Facteurs de trans- cription	Voies de signalisation
Tone M, J Immunol 2000 (52)	lignée lymphoide (RAW 264) lignée non lymphoïde (EL 4)	PMA ionomycine	-95/-71 pb	Sp1 et Sp3	
Benkhart EM, J Immunol 2000 (53)	Lignée B Lignée monocytaire (Mono Mac 6) Lignée T H9	LPS	-150 pb	STAT3	P38 MAPK
Platzer C, J Neuroimmunol 2000 (54)	Lignée monocytaire THP1 et HL-60		CRE1 et CRE4 –1308 pb	CREB/ATF	Récepteur β2 adrénergiques/AMPc
Ma W, J Biol Chem, 2001 (55)	Lignée monocytaire THP1 / CD14	LPS	-636/-631	Sp1	P38 MAPK
Yang BC, J Immunol 2003 (56)	Lignée T leucémique Jukat et Molt-4 Lymphocytes T sanguins	Coculture avec des cellules de gliome (U- 373MG et U- 118MG)			Fas/Fas ligand Caspases 8, 3 et 9
Brenner S, J Biol Chem 2003 (57)	Lignée monocytaire THP1 et HL-60	AMPc	CRE3 –900/- 800 pb C/EBP5 – 100/0 pb C/EBP3 – 500/-400 pb C/EBP1 – 900/-800 pb	C/EBP $\alpha$ et $\beta$	Récepteur β2 adrénergiques/AMPc
Okamoto N, Biochem Biophys Res Commun 2003 (50)	Lymphocytes T	CD28L AILIM/ICOS			PI3-kinase/Akt P38 MAPK
Veiopoulou C, Neuroimmuno- modulation 2004 (58)	Lymphocyte T CD4+ Lignée leucémique HUT-78	PMA Ionomycine Anti-CD3			P38 MAPK
Vega MI, Oncogene 2004 (59)	Cellules de lymphome non hodgkinien 2F7 B NHL et10C9 B NHL	Rituximab (anti CD20)			P38 MAPK (inhibition) et diminution transcription IL-10
Jack CS, J Immunol 2005 (60)	Cellules gliales et astrocytes humains	LPS			TLR2, TLR3, TLR4
Nemeth ZH, J Immunol 2005 (61)	Macrophages humains RAW 264.7	LPS et adénosine			A <sub>2B</sub> récepteur  Régulation post- transcriptionnelle, fixation de protéine sur la région non traduite en 3' (3' UTR)

Tableau VI Facteurs et sites de transcription de l'interleukine 10 chez la souris et le rat.

Auteurs	Modèles cellulaires	Activateurs	Sites de fixation	Facteurs de transcription	Voies de signalisation
Kim KY, Neuroport 2002 (62)	Cellules de la microglie de rat	thrombine	ND	ND	P38 MAPK
Dahle MK, Infec Immun, 2004 (51)	Cellules de Kuppfer de rat	Acide lipoteichoïque	ND	ND	PI3K, JAK 2, P38 MAPK
Liu YW, JI 2005 (63)	Macrophages de souris	LPS	ND	ND	NF-κB, MAPK (P38, ERK, JNK), C/EBPδ
Dahle MK, Infec Immun 2005 (64)	Cellules Kuppfer de rat	LPS	ND	ND	Récepteurs E prostanoïdes α et β adrénergiques Adényl cyclase 9, AMPc
Hacker H, Nature 2006 (65)	Cellules myéloïdes de souris invalidées pour les gènes de TRAF3 et 6	ND	ND	ND	TRAF3

(ND: non déterminé)

### II.2 La protéine IL-10

### II.2.1 Structure de la protéine IL-10

L'ADNc de l'IL-10 a un cadre ouvert de lecture pour un polypeptide de 178 acides aminés contenant une séquence signal hydrophobe caractéristique d'une protéine sécrétée de 18 acides aminés. Le polypeptide mature comprend donc 160 acides aminés. La protéine contient un site potentiel de N-glycosylation.

L'IL-10 est une protéine homodimérique non covalente. Chaque monomère comporte six hélices  $\alpha$  (66) (67) (68). Elles sont nommées de A à F pour le premier monomère et de A' à F' pour le second. L'analyse du dimère en cristallographie révèle une interpénétration étroite des deux monomères qui adoptent une conformation en V (**Figure 3**). Chacun des bras du V est formé de quatre hélices  $\alpha$  originaires d'un monomère et de deux hélices  $\alpha$  originaires de l'autre monomère. Les deux hélices situées en position C-terminale d'un monomère pénètrent au milieu des quatre hélices  $\alpha$  N-terminales du deuxième monomère. La structure de l'IL-10

ressemble fortement à celle de l'interféron ce qui explique en partie les relations étroites entre les deux cytokines.

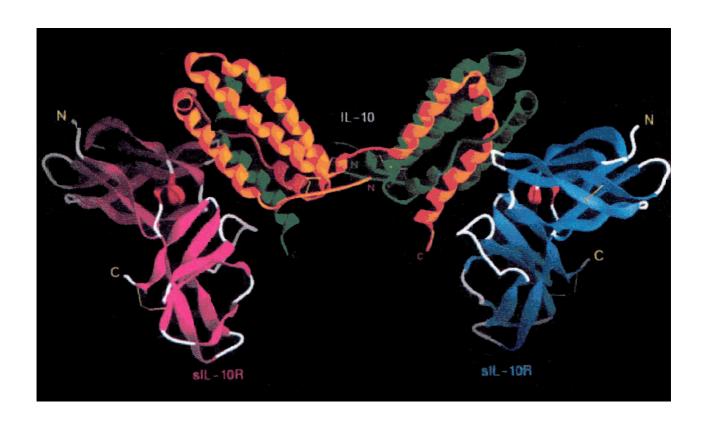


Figure 3. Structure de l'interleukine 10 d'après Zdanov A (67).

(En jaune et vert les deux monomères qui la constitue ; en rose et bleu deux monomères du récepteur ; en blanc : zones sous forme de boucle ou enroulées ; en rouge : hélices  $\alpha$ ).

### II.2.2 Analogies structurales des protéines de la famille de l'IL-10

Les cytokines ayant des homologies de séquence en acides aminés avec l'IL-10 ont été regroupées. Elles forment la famille des cytokines apparentées à l'IL-10. Les cytokines de cette famille sont d'origine humaine (**Tableau VII**) ou virale (**Tableau VIII**) (69). La comparaison des structures de ces cytokines apparentées à l'IL-10 a permis d'identifier des régions conservées. Ainsi les profils d'hydrophobicité des six hélices  $\alpha$  sont identiques pour toutes les cytokines de cette famille. Les fragments situés côté C-terminal de l'hélice C et N-terminal de l'hélice F sont également des régions très conservées. Ces deux régions contiennent 4 (Phénylalanine 71, Tyrosine 72, Alanine 139, et glutamine 142) des 5 acides aminés clefs impliqués dans la stabilisation de la structure de l'IL-10 et de l'INF  $\gamma$ . En revanche, il apparaît que les quatre cystéines caractérisées dans la séquence de l'IL-10 humaine et formant deux ponts disulfures, ne sont pas retrouvées chez tous les membres de la famille et ne paraissent donc pas indispensables au maintien structural de la protéine (66) (68).

Tableau VII Cytokines humaines de la famille de l'interleukine 10 d'après Fickenscher H (69).

Cytokines homologues	Localisation chromosomique	Homologie avec l'IL-10 humaine (%)
IL-10	1q32	100
IL-19	1q32	20
IL-20	1q32	28
IL-24/MDA-7	1q32	23
IL-22/IL-TIF	12q15	26
IL-26/AK155	12q15	27

Tableau VIII Cytokines virales de la famille de l'interleukine 10 d'après Fickenscher H (69).

Cytokine homologue	Origine	Homologie avec l'IL-10 humaine (%)
EBV IL-10	Epstein-Barr virus	83
HVP IL-10	Herpes virus papio	78
EHV-2 IL-10	Herpes virus équin	76
HCMV IL-10	Cytomégalovirus humain	27
SCMV IL-10	Cytomégalovirus simien	29
Orf IL-10	Orf parapoxvirus ovin	73
YLDV	Poxvirus yaba-like	30

### II.3 Le récepteur de l'IL-10

### II.3.1 Structure du récepteur

La structure des gènes codant pour les deux types de chaînes constituant le récepteur de l'IL-10 est similaire à celle des autres membres de la famille des gènes des récepteurs de cytokines de classe II. Ces gènes ont une taille de 30 à 40 KDa. Le premier exon code pour le peptide signal et le début des acides aminés du peptide mature. Les second et troisième exons codent pour le premier sous-domaine 100 (SD100) alors que les troisième et quatrième exons codent pour le deuxième SD100 domaine extra-cellulaire. Le sixième exon code pour le domaine trans-membranaire. Le septième exon code pour le domaine intra-cellulaire qui interagit avec la protéine de signalisation JAK et possède les sites de recrutement de la protéine de signalisation STAT. Il code également pour la région non traduite située en 3' de l'ARN (3'UTR) (44) (70).

Les deux chaînes formant le récepteur de l'IL-10 sont appelées IL-10R1 ou récepteur de haute affinité et l'IL-10R2 ou récepteur de basse affinité (**Figure 4**). Elles possèdent un domaine extra-cellulaire de 200 acides aminés, un domaine transmembranaire de 20 acides aminés et un domaine intra-cytoplasmique de 322 et 62 acides aminés respectivement pour IL-10R1 et IL-10R2. Les domaines extracellulaires comportent deux domaines : un domaine N terminal (D1) et un domaine C terminal (D2). Ces deux domaines forment un angle de 90° et adoptent la forme d'un « L ». Chaque domaine comprend sept sous-domaines formés de deux feuillets β anti-parallèles. Le domaine D1 et le domaine D2 comportent respectivement quatre (L1 à L4) et deux formations d'acides aminés en forme de boucle (L5 et L6). Les boucles L2, L3, L4, L5 et L6 interagissent avec l'IL-10. Il n'a pas été décrit dans la littérature de forme soluble de IL-10R1 et R2.

Les études en cristallographie et en spectroscopie confocale de fluorescence du récepteur de l'IL-10 (71) ont montré que celui-ci était formé de deux chaînes IL-10R1 et de deux chaînes IL-10R2. Celles-ci sont présentes au niveau membranaire sous forme préassemblée. Ces quatre chaînes interagissent entre elles, en présence, mais également en absence de leur ligand. La liaison de l'IL-10 à son récepteur se fait en deux étapes. Au cours de la première étape, L'IL-10, protéine homodimérique, se lie symétriquement aux deux chaînes IL-10R1 (récepteur de haute affinité) (72). Cette première interaction crée la

formation deux sites de coopération entre le complexe IL-10R1/IL-10 et la chaîne IL-10R2 (73).

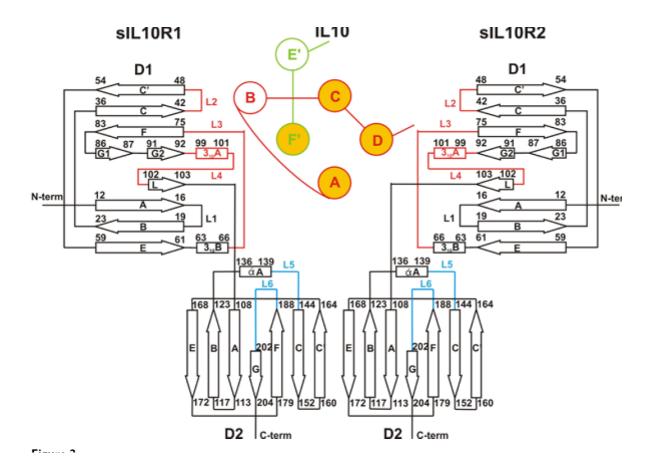


Figure 4. Interaction entre l'IL-10 et les chaînes IL-10R1 et IL-10R2 de son récepteur d'après Pletnev S (73).

(Flèches : feuillets  $\beta$  ; rectangles : hélice  $\alpha$  ; couleur rouge : domaines D1 ; couleur bleue : domaines D2 ; cercles : hélices  $\alpha$  de l'IL-10 ; A,B, C, et D : hélices de la même chaîne ; E', F' : hélices de la même chaîne ; cercles oranges : hélices  $\alpha$  qui interagissent avec les récepteur.

### **II.3.2** Voie de signalisation

L'activation du récepteur de l'IL-10 induit l'inhibition de la production de nombreuses cytokines de type Th1. La voie de signalisation activée la mieux caractérisée met en jeu la voie JAK/STAT (Figure 5) (74). Le récepteur de l'IL-10 est pré-assemblé (75). L'interaction de l'IL-10 avec son récepteur active les tyrosines kinases Jak1 et Tyk2 (76, 77). Jak1 et Tyk2 sont respectivement liées aux chaîne IL-10R1 et IL-10R2 constitutivement (78, 79). L'activation des deux kinases se fait par cross-phosphorylation de deux résidus tyrosine du domaine intra-cellulaire de la chaîne IL-10R1 (80). Ces tyrosines phosphorylées permettent l'interaction directe entre le récepteur et STAT 3 (81). Ensuite STAT 1, STAT 3 et STAT 5 sont phosphorylées par Jak1 et Tyk2. STAT 1, 3 et 5 peuvent alors s'assembler sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Ils migrent alors dans le noyau et interviennent sur la transcription des gènes dépendants du facteur de transcription STAT 3 (82). La délétion de la partie -COOH terminale du domaine intra-cellulaire de la chaîne Il-10R1 et/ou l'absence de phosphorylation de STAT 3 inhibent tous les effets anti-inflammatoires de l'Il-10 (81). Par ailleurs SOCS-1 et 3 font partie des gènes activés par l'IL-10 (83). SOCS-1 est décrit comme étant l'inhibiteur physiologique majeur des signaux de transductions induits par l'INF-y, l'IL-10 et l'IL-4 (83, 84) (85). SOCS-1 inhibe les signaux de transductions en inactivant des kinases. Il occupe le site actif des kinases et empêche ces dernières de phosphoryler leurs substrats (86). Ce mécanisme permet d'expliquer comment l'IL-10 inactive certains effets d'autres cytokines et également comment l'INF-y inhibe les effets de l'IL-10. De plus l'activation de SCOS-3 par l'IL-10 inhibe une majorité d'effets produits par la voie de signalisation de gp130 initiée par l'IL-6 (87). Les autres effets anti-inflammatoires de l'IL-10 sont certainement imputables à sa capacité à stabiliser IκBα dans le cytoplasme (88) et ainsi à neutraliser les effets de l'activation de NFkB par le LPS (89). L'IL-10 est également impliquée dans la transcription des métalloprotéases (MMP). Elle simule la transcription d'IL-10E1, facteur capable inhiber la transcription des métalloprotéases (90) (91). Ainsi de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription sont activés par l'Il-10 et expliquent la multiplicité de ses effets.

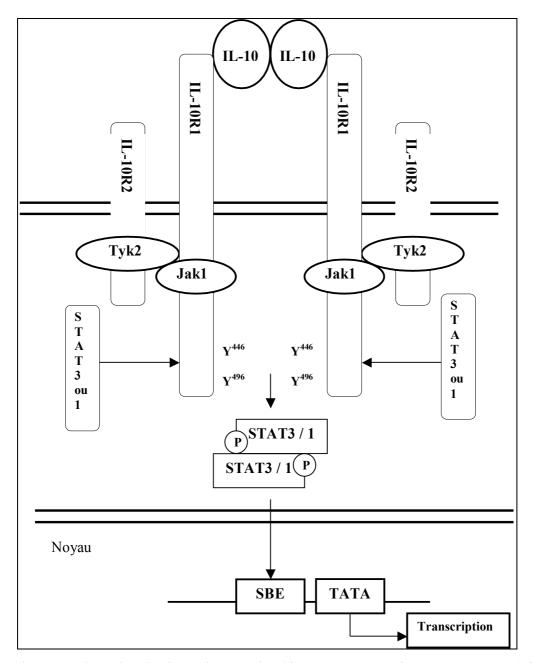


Figure 5. Voie de signalisation activée par l'IL-10 et son récepteur d'après Donnelly RP (74)

(IL-10R1 : chaîne R1 du récepteur, IL-10R2 : chaîne R2 du récepteur ; JAK et TyK : Janus tyrosine kinase ; STAT3/1 : Signal transducer and Activator of Transcription 3 ou 1 ; SBE : Stat Binding Element ; TATA : site de départ de la transcription)

### II.4 Activités biologiques de l'IL-10

### II.4.1 IL-10 et régulation des phénomènes immunologiques

# II.4.1.1 Effet de l'IL-10 sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles

L'IL-10 était initialement caractérisée comme un facteur inhibiteur de synthèse de cytokine (CSIF) (76) synthétisé par les lymphocytes Th2 et inhibant la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Il a ensuite été montré que les lymphocytes B étaient capables également de produire de l'IL-10 (44) (92). Depuis de nombreuses activités biologiques de L'IL-10 ont été décrites (44) (93) (**Figure 6**).

L'IL-10 inhibe la capacité de présentation de l'antigène des macrophages et des cellules dendritiques (94, 95) (96) (93).

Elle diminue la production, par les monocytes/macrophages activés, de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 elle-même, l'IL-12, l'IL-18, le GM-CSF, le G-CSF, le M-CSF, le TNF (94). L'inhibition de la production d'IL-1 et de TNF est majeure dans le rôle anti-inflammatoire de l'IL-10.

L'IL-10 inhibe la production de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes, des cellules dendritiques, des polynucléaires neutrophiles et des cellules T (97). L'IL-10 induit la production de molécules anti-inflammatoires telles que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA) et les antagonistes du récepteur du TNF (p55 et p75) (98, 99).

L'IL-10 augmente l'expression du récepteur du fMLP, du PAF, de CCR1, CCR2 et CCR5 sur les monocytes, rendant ces derniers plus sensibles au VIH (100).

L'IL-10 inhibe l'expression de cyclooxygénase 2 et induit une diminution de production de prostaglandine E2 (101). Ceci affecte l'expression de métalloprotéases telles que la MMP2, la MMP9 et le TIMP (inhibiteur des MMP), ces dernières étant régulées par la voie du PGE-AMPc (102). Les monocytes/macrophages voient ainsi leur capacité à modifier la matrice extra-cellulaire diminuée.

L'IL-10 inhibe l'expression des molécules du CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité) ce qui altère le mécanisme de présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les monocytes (103).

L'IL-10 augmente la cytotoxicité des monocytes en stimulant l'expression membranaire du récepteur Fc $\gamma$  (104) ce qui accroît le potentiel de phagocytose des particules opsonisées par les monocytes. Cependant l'IL-10 diminue la génération d'ions superoxides et de NO ce qui réduit la capacité des cellules à tuer les microorganismes ingérés (105).

Les cellules dendritiques mises en présence d'IL-10 atteignent un état d'anergie les rendant incapables, lors de la présentation de l'antigène, de stimuler les lymphocytes (94).

L'expression de l'intégrine CR3 (CD11b/CD18) des polynucléaires neutrophiles est diminuée en présence d'IL-10 ce qui affecte considérablement leur capacité à phagocyter les microorganismes opsonisés par C3bi (106). Cette cytokine augmente la production d'IL-1RA par les polynucléaires neutrophiles (107). L'IL-10 diminue la production de cytokines par les polynucléaires éosinophiles activés par du LPS (108).

L'ensemble de ces observations confère à l'IL-10 un potentiel anti-inflammatoire important associé à une diminution de la capacité à éliminer les microorganismes.

# II.4.1.2 Effet de l'IL-10 sur les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK

L'IL-10 augmente la durée de vie des lymphocytes B humains. Cette observation est corrélée à une augmentation de l'expression de l'oncogène anti-apoptotique bcl-2 (109). La prolifération des lymphocytes B matures et de leurs précurseurs est activée en présence d'IL-10 (110). L'IL-10 provoque la maturation des lymphocytes B en plasmocytes et influence la commutation isotypique (111). Ainsi des lymphocytes B activés par un anticorps anti-CD40 mis en présence d'IL-10 sécrètent de plus grandes quantités d'Ig M, G1, G2, G3 et d'Ig A. En présence d'Il-4 et d'IL-10 la commutation sera orientée vers une synthèse Ig G4 et d'Ig E (112).

L'IL-10 possède des effets anti-inflammatoires sur les lymphocytes CD4+ (93). Elle diminue indirectement leur production de cytokine et leur prolifération dépendantes des cellules présentatrices de l'antigène, en inhibant la fonction de présentation de l'antigène des monocytes (103). En fonction des conditions d'activation, l'IL-10 affecte directement la production d'IL-2, de TNF et d'IL-5 par les lymphocytes T CD4+ (113) (114). Elle est également capable de provoquer un état d'anergie de cette population lymphocytaire (115). L'effet de l'IL-10 sur les lymphocytes T CD8+ est opposé à celui produit sur les CD4+. Elle induit leur recrutement, stimule leur activité cytotoxique et leur prolifération (116) (117).

La prolifération, la cytotoxicité et la production d'INF- $\gamma$  des cellules NK sont activées en présence d'IL-10 associée à l'IL-18 (118).

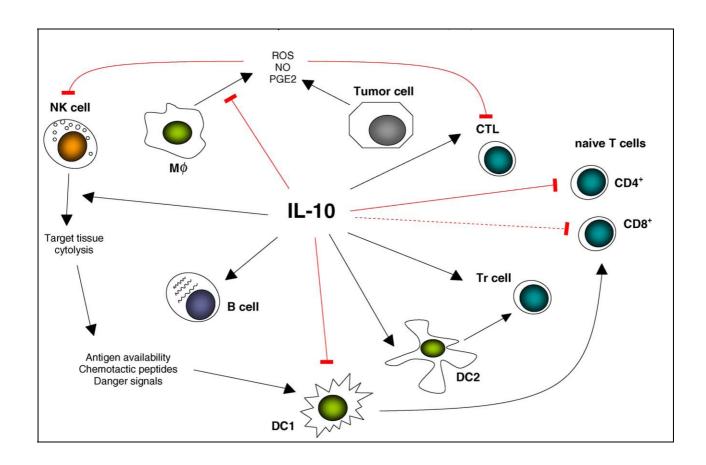


Figure 6. Effets de l'interleukine 10 sur différents médiateurs de l'immunité d'après Mocellin S (93)

(Flèches : stimulation ; traits gras : inhibition ; pointillés : effets incertains ; PGE2 : prostaglandine E2 ; NK cell : cellules natural killer ;  $M\phi$  : macrophage ; DC1 : cellule dendritique activant les lymphocytes T na $\ddot{}$ fs ; DC2 : cellule dendritique activant les lymphocytes T matures régulateurs ; Tr : lymphocytes T matures régulateurs ; CTL : lymphocyte T cytotoxique).

## II.4.1.3 Effets biologiques de l'IL-10 virale

Les virus produisent de l'IL-10 (IL-10v). Ainsi, lorsqu'ils infectent un organisme, ils diminuent la réponse immune de ce dernier et peuvent persister dans cet organisme. L'IL-10v est capable d'inactiver les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages (105) ce qui permet au virus de persister dans l'organisme sous forme latente. Par ailleurs l'IL-10v possède les mêmes propriétés que l'IL-10 humaine sur la lignée lymphocytaire. Elle est capable d'activer la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Cependant les effets biologiques de l'IL-10 humaine et de l'IL-10v ont des profils différents. Les études de relation structure/activité imputent ces variations d'activité à 20 acides aminés, différents entre l'IL-10 virale et humaine, situés dans la région N terminale des chaînes de l'IL-10 (119).

#### II.4.2 IL-10 et hémostase

### II.4.2.1 Introduction

La majorité des études sur la régulation de l'hémostase par l'IL-10 traitent de l'effet de l'IL-10 sur l'expression du FT. Par ailleurs quelques études sur la relation entre l'IL-10 et le fibrinogène, et l'IL-10 et la fibrinolyse, ont été publiées.

#### II.4.2.2 IL-10 et régulation de l'expression du facteur tissulaire

Le phénomène inflammatoire, observé notamment au cours des sepsis, s'accompagne de l'activation de la coagulation et du système fibrinolytique. Cette observation a conduit plusieurs équipes à étudier le rôle de l'IL-10 dans ces deux systèmes de l'hémostase.

De nombreuses études concernant la modulation de l'expression du facteur tissulaire par l'IL-10 ont été publiées (**Tableau IX**). En effet, le facteur tissulaire est l'initiateur principal de la voie extrinsèque de la coagulation. C'est une glycoprotéine transmembranaire dont la partie extracellulaire supporte la fonction récepteur du facteur VII et du facteur VII

activé. L'importance du facteur tissulaire dans la thrombogénèse in vivo est suggérée par des données expérimentales (120) et par des données épidémiologiques (121). Le facteur tissulaire est exprimé par de très nombreuses cellules de l'organisme. A côté d'une expression dite constitutive, il existe une synthèse inductible dans certains types cellulaires tels que les monocytes-macrophages (122), les cellules endothéliales (123), les polynucléaires éosinophiles (124) et les cellules musculaires lisses (125). Cependant la possibilité d'une induction de la synthèse de facteur tissulaire dans les cellules qui possèdent une expression constitutive de base a été démontrée dans une lignée d'origine épithéliale (126). Pour les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales l'expression est uniquement inductible. Elle est déclenchée par de nombreux stimuli immunitaires et inflammatoires : l'endotoxine, l'interleukine-1, le TNF-α, les fragments activés du complément, les complexes immuns et l'interleukine-2 (127). Lors de certains états pathologiques, et en particulier au cours du sepsis, le facteur tissulaire peut être exprimé par les monocytes et les cellules endothéliales et être responsable d'une coagulation intravasculaire disséminée. Par ailleurs, l'expression fonctionnelle du facteur tissulaire dépend de l'activation transcriptionnelle de son gène mais aussi de facteurs post-transcriptionnels. Parmi ceux-ci sont décrits les phénomènes de stabilisation ou d'épissages alternatifs des ARN, l'expression sous forme encryptée inactive ou « déencrypté » active (128), les interactions cellulaires stimulant sa synthèse, la présence de TFPI (129) (130).

La régulation de l'expression du FT par l'IL-10 est étudiée dans plusieurs modèles cellulaires (**Tableau IX**), le plus fréquent étant les monocytes humains activés par le LPS. Des activateurs différents du LPS ont cependant été décrits. Del Prete *et al* (131) ont étudié l'influence de l'IL-10 sur l'expression du FT par des monocytes mis en culture en présence de lymphocytes CD8+, CD4+ Th1 ou Th2 activés par de la phytohémagglutinine. Le but de ce travail était d'identifier quelle population lymphocytaire était à l'origine de l'expression du FT et quelle cytokine, IL-10 comprise, était susceptible de moduler cette voie d'activation. Dans une autre étude (132) l'effet de l'IL-10 sur le FT est étudié dans un modèle de monocytes mis en culture sur une matrice de fibrine infectée par des Streptococcus sanguis afin de reproduire un modèle *in vitro* d'endocardite bactérienne sur végétation. Paysant J *et al* (133) ont publié la première étude mesurant l'expression de FT par des monocytes non activés mis en culture 96 heures en présence d'IL-10. Cette longue durée d'incubation a été déterminée afin de reproduire in vitro le contact prolongé entre les cytokines relarguées dans la plaque d'athérome et les macrophages.

Quelques équipes ont analysé l'effet de l'IL-10 sur l'expression du FT par des monocytes en sang total (134) (135). Ce modèle a l'avantage d'intégrer les interactions cellulaires plaquette/monocytes et lymphocytes / monocytes susceptibles d'activer les monocytes par des voies de signalisation différentes de celle obtenue dans le modèle monocyte/LPS.

La majorité des études met en évidence une régulation de l'expression du FT par l'IL-10. Cette cytokine anti-inflammatoire a la propriété de diminuer le phénomène procoagulant observé lors des phénomènes inflammatoires. L'utilisation d'un modèle de génération de thrombine par des monocytes humains élutriés et stimulés par du LPS pour analyser l'effet de l'IL-10 sur l'expression du FT monocytaire n'a jamais été décrit.

Tableau IX Interleukine 10 et facteur tissulaire : revue de la littérature.

Auteurs	Modèle cellulaire	Activateur	IL-10rh : durée d'incubation et dose	Effet de l'IL-10
Pradier O, Eur J Immunol 1993 (136)	Cellules mononucléées sanguines	LPS (6h)	- 6 heures - avant le LPS - 30 à 120 pg/mL	- ↓ FT :APC - ↓ FT :Ag (membranaire)
Ramani M, FEBS 1993 (137)	Monocytes humains	LPS (4h)	-30 minutes -avant le LPS - 0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 ; 50 U/mL	-↓FT :Ag (lysat) -↓FT :APC -↓FT :ARNm
Del Prete G, Blood 1995 (131)	Monocytes humains	Lymphocytes T CD4+ Th1 activés par de la PHA (24h):	- 8 heures - 2, 20, 200 U/mL - après la PHA	-↓FT :Ag (lysat) -Anti-II-10 neutralise IL-10 exogène
Ernofsson M, BJH 1996 (2)	Monocytes humains adhérents	LPS	-5 ng/mL	- ↓ FT :ARNm - ↓ FT :Ag (membranaire)
Pradier O, Eur J Immunol 1996 (138)	Cellules mononucléées sanguines	- anti-CD40 - anti-CD 40L		Pas de ↓ via CD40/CD40L
Osnes LT, Cytokine 1996 (1)	Monocytes humains	LPS (20h)	- 20h - 5 ng/mL - en même temps que le LPS	-↓FT :ARNm -↓FT :APC
Lindmark E, BJH 1998 (134)	Sang total humain	LPS (30 min ou 1 h)	- 5 min avant le LPS - 30 min ou 1h après le LPS - 0,5 ; 5 ; 10 ; 50 ng/mL	- ↓ FT :ARNm - ↓ FT :Ag (membranaire) - ↓ FT :APC
Chu AJ, J Surg Research 1998 (139)	Lignée leucémique humaine promonocytaire THP1	LPS (8 h) ou anti- CD14	- 2 heures - 500 ng/mL - avant le LPS	-↓FT :APC
Warnes G, BJH 1998 (135)	Sang total humain	LPS (6h)	- 6h - en même temps que le LPS - 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 ng/mL	- ↓ FT:Ag (membranaire)
Noble KE, BJH 1999 (140)	Monocytes humains	Cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVECs) LPS IL-1	-20 ng/mL	-↓FT :APC
Veltrop MHAM, Infection and immunity 2001 (132)	Monocytes humains	Culture sur matrice de fibrine contenant des Streptococcus sanguis (4h)	- 4 h - 100U/mL - en même temps que la culture	- ↓ FT :APC -Anti-II-10 neutralise IL-10 endogène
Paysant J, BJH 2005 (133)	Monocytes humains adhérents	Pas d'activateur	- 18, 48, 96h - 250 pmol/L	- ↓FT :APC du lysat effet maximun à 18h -↓FT :APC membranaire effet max à 96h -↑FT :Ag membranaire (maximum 48h) ↓FT :Ag (lysat) (max96h) - ↓ARNm (max 18h)

(II-10rh : IL-10 recombinante humaine ; APC : activité procoagulante ; FT : Ag: facteur tissulaire antigénique ;  $\downarrow$  diminution ;  $\uparrow$  augmentation)

## II.4.2.3 IL-10 et fibrinogène

Une seule étude rapporte l'effet de l'IL-10 sur la régulation de la synthèse de fibrinogène (141). Le modèle utilisé est une lignée cellulaire humaine d'hépatocytes immortalisés (lignée Hep G2) cultivée en présence d'IL-6, cytokine connue pour induire la synthèse de fibrinogène. Les auteurs évaluent l'effet direct de l'IL-10 sur la production de fibrinogène par les hépatocytes stimulés par l'IL-6. Les hépatocytes sont incubés 24 heures en présence d'IL-10. Quel que soit le protocole utilisé, préincubation ou non de 24 heures, avant l'ajout d'IL-6, des cellules avec l'IL-10 et quelle que soit la concentration testée d'IL-10 (0, 1 ou 100 ng/mL), aucun effet significatif n'est observé. Les concentrations de fibrinogène sont identiques dans tous les cas à celle obtenue en absence d'IL-10. L'analyse en parallèle de l'expression de l'ARNm de la chaîne β du fibrinogène par les hépatocytes révèle une diminution de l'activité transcriptionnelle du fibrinogène en présence d'IL-10. Ces résultats mettent en évidence une action retardée de l'IL-10 sur la régulation de la synthèse et de l'expression du fibrinogène. La régulation de la synthèse du fibrinogène par l'IL-10 est également indirecte. En effet, les monocytes activés par le LPS et incubés en présence d'IL-10, ont une sécrétion d'IL-6 diminuée. Cette inhibition est plus importante lorsque les cellules sont incubées 24 heures avec l'IL-10 avant l'ajout de LPS dans le milieu de culture. Cette capacité à réguler la sécrétion de fibrinogène permet d'attribuer à l'IL-10 un rôle protecteur lors de l'activation de la coagulation observée notamment au cours des phénomènes inflammatoires.

#### II.4.2.4 IL-10 et fibrinolyse

Pajkrt D *et al* (142) et Okada K *et al* (143) étudient le rôle de l'IL-10 dans la fibrinolyse. Les modèles utilisés par Pajkrt D (142) et Okada K (143) sont respectivement un modèle de septicémie induite par du LPS chez 16 témoins sains humain et un modèle d'ischémie / reperfusion pulmonaire induite chez des souris sauvages ou invalidées pour le gène de l'IL-10 (142) (143).

Chez l'homme, l'injection d'IL-10 recombinante humaine est effectuée à la dose de 25 µg/kg contre placebo. Deux protocoles sont testés : au cours du premier, l'IL-10 ou le placebo

sont injectés 2 minutes avant l'endotoxine, au cours du second l'endotoxine est injectée 1 heure avant l'IL-10 ou le placebo. Les auteurs font des dosages antigéniques du t-PA, du PAI, des complexes PAP et des D-Dimères. Les dosages sont effectués toutes les heures de la première à la 8<sup>e</sup> heure puis à la 20<sup>e</sup> heure. Les résultats obtenus concernant le t-PA, les complexes PAP, et les D-Dimères varient en fonction du protocole utilisé. Ainsi, si l'IL-10 est injectée avant le LPS, ces trois paramètres ont des taux significativement plus bas que chez les témoins ayant reçu du placebo. Si le LPS est injecté avant l'IL-10, aucune différence significative n'est observée pour les taux de ces trois marqueurs. Pour le paramètre PAI-1, des taux significativement plus bas que ceux observés chez les témoins « placebo » sont obtenus quelle que soit la chronologie des injections. L'IL-10 injectée avant le LPS diminue l'activation et l'inhibition de la fibrinolyse. En revanche, si le LPS est injecté avant l'IL-10 seule la diminution de l'inhibition de la fibrinolyse est significative. Par ailleurs, comme il est montré que le TNF active la coagulation et la fibrinolyse au cours des septicémies, les auteurs ont utilisé le même modèle et les mêmes protocoles (142) pour identifier un potentiel effet de l'IL-10 sur la sécrétion de TNF. Les auteurs montrent une diminution de la sécrétion de TNF sérique après injection d'IL-10 humaine recombinante lorsque l'injection d'IL-10 précède celle de LPS. En revanche, lorsque l'injection de LPS précède celle d'IL-10, aucune diminution de sécrétion de TNF n'est observée. La synthèse de TNF précédant l'injection d'IL-10, l'IL-10 ne peut pas réguler la synthèse de TNF. Ainsi, la diminution de l'activation de la fibrinolyse par l'IL-10 est corrélée à une diminution de la sécrétion de TNF. Lorsque l'IL-10 ne régule pas la sécrétion de TNF, elle ne diminue pas l'activation de la fibrinolyse. Les auteurs concluent que la régulation de l'activation de la fibrinolyse par l'IL-10 se fait par l'intermédiaire du TNF. En revanche, l'inhibition de la synthèse de PAI-1 par l'IL-10 semble être moins dépendante de la voie du TNF. En effet, l'injection d'IL-10 après celle de LPS, et donc en absence de régulation de la synthèse de TNF par l'IL-10, n'empêche pas l'effet inhibiteur de cette cytokine sur la synthèse de PAI-1.

Pour étudier le rôle de l'IL-10 dans la régulation de la fibrinolyse, Okada K *et al* (143) utilisent un modèle murin chez lequel est provoquée une ischémie suivie d'une reperfusion pulmonaire. Les souris sont des souris sauvages ou des souris invalidées pour le gène de l'IL-10, ou encore des souris invalidées chez lesquelles de l'IL-10 murine recombinante est injectée. Les auteurs effectuent des dosages de l'activité du PAI et du t-PA ainsi qu'un dosage de l'ARNm du PAI-1. Ils mettent également en évidence les dépôts de fibrine dans les vaisseaux par immuno-marquage et western-blot. Les résultats montrent qu'après une heure d'ischémie et deux heures de reperfusion il existe une augmentation de l'ARNm du PAI chez

les trois types de modèles par rapport à un témoin sans ischémie/reperfusion. Le taux d'ARNm mesuré chez les souris invalidées pour le gène de l'IL-10 est 4,7 fois plus élevé que celui du témoin. C'est le taux observé le plus élevé. L'injection d'IL-10 murine recombinante diminue significativement cette augmentation. L'activité du PAI-1 est significativement augmentée chez les souris invalidées pour le gène de l'IL-10 par rapport au témoin, au modèle de souris sauvage et à la souris invalidée ayant eu une injection d'IL-10 murine recombinante. Il n'existe pas de différence significative entre le témoin, la souris sauvage et la souris invalidée / substituée en IL-10. Le plus haut rapport (activité du PAI-1/activité du t-PA) est obtenu chez les souris invalidées. C'est chez ces mêmes souris que les dépôts de fibrine de localisation intra-vasculaire sont les plus importants. Ces résultats montrent que l'IL-10 régule la fibrinolyse notamment en inhibant l'activité du PAI-1 ce qui, lors de l'activation de la coagulation permet de diminuer les dépôts de fibrine.

Deux études cliniques, menées respectivement chez 45 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde versus 33 témoins sains (144) et chez 10 patients ayant un angor stable versus 15 témoins sains (145), montrent une corrélation négative entre le taux d'IL-10 et le taux de PAI-1. Le taux d'IL-10 est significativement plus bas chez les patients atteints d'angor stable que chez les témoins sains alors que le taux de PAI-1 est plus élevé chez les patients et plus bas chez les témoins sains. Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde les taux d'IL-10 sont plus élevés et les taux de PAI-1 plus bas chez les patients que chez les témoins mais ces résultats ne sont pas corrélés à la gravité de la pathologie.

Les résultats de ces quatre études sont homogènes. Ils montrent que l'IL-10 est capable de réguler la fibrinolyse. L'action la plus constante semble être sa capacité à réduire l'accumulation de fibrine en diminuant l'activité du PAI-1. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de facteur de risque de thrombose artérielle, indépendant ou non, du PAI-1 (146) (147). Bien que cette pathologie soit multifactorielle, que les interactions gène-environnement soient complexes, l'augmentation du PAI-1 doit participer à l'expression de pathologies coronariennes en diminuant la dissolution du thrombus. Il est licite d'émettre l'hypothèse qu'une diminution de synthèse d'IL-10 en favorisant l'augmentation du PAI-1, induit une diminution de la dégradation de la fibrine et la survenue de thrombus.

# II.5 IL-10 et pathologie

#### **II.5.1 Introduction**

Quelques modèles animaux ont permis d'évoquer le rôle prépondérant de l'IL-10 dans les phénomènes thrombotiques artériels et veineux. Les polymorphismes de l'IL-10 ont, par ailleurs, fait l'objet de nombreuses publications dans des domaines très variés de pathologies notamment immunologiques et hématologiques.

#### II.5.2 Modèles animaux

#### II.5.2.1 Introduction

Le rat Sprague Dawley et la souris C57BL/6 sont les modèles animaux les plus fréquemment décrits dans les études analysant le rôle de l'IL-10 dans la survenue de thromboses veineuses et artérielles (**Tableaux X et XI**). Le rat Sprague Dawley à l'état sauvage est utilisé dans deux études concernant la thrombose veineuse (148) (149). La souris C57BL/6 sert de modèle dans la thrombose veineuse et dans la thrombose artérielle. Les auteurs l'utilisent le plus souvent à l'état sauvage ou après invalidation de ses deux gènes codant pour l'IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>). Pour la pathologie veineuse, l'induction du thrombus est toujours réalisée au niveau de la veine cave inférieure après avoir opéré une ligature sous les veines rénales. Pour la pathologie artérielle, les plaques d'athéromes sont obtenues après avoir soumis les souris à un régime athérogène (**Tableau XI**). Les plaques situées au niveau de l'aorte ou de la carotide sont ensuite analysées.

# II.5.2.2 Modèles animaux : IL-10 et thrombose veineuse

Depuis quelques années, l'analyse de la physiopathologie de la thrombose veineuse a mis en évidence la présence de facteurs inflammatoires au niveau de la zone « thrombosée » (149). Il semblerait que ces facteurs participent activement à l'amplification du phénomène thrombotique. Des marqueurs de l'inflammation ont été identifiés également au niveau

systémique (150). L'utilisation de modèles animaux de thrombose veineuse a permis aux auteurs d'identifier de l'IL-10 endogène au niveau de la paroi vasculaire altérée par un thrombus (148) (151) et du thrombus lui-même (151). Chez ces animaux, le taux d'IL-10 endogène était significativement plus élevé que chez les animaux témoins, ces derniers ayant bénéficié d'une laparotomie sans ligature de la veine cave inférieure. L'influence de l'IL-10 sur les évènements thrombotiques et inflammatoires a été évaluée en observant les modifications quantitatives et qualitatives du thrombus et de son environnement (taille du thrombus, contenu du thrombus et de son environnement) provoquées par des variations du taux d'IL-10.

La diminution du taux d'IL-10 est provoquée en utilisant des d'anticorps neutralisants anti-IL-10 (148) ou des souris invalidées pour le gène de l'IL-10 (151) (152). Les résultats obtenus ne sont pas comparables. En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-10 provoque l'afflux significatif de cellules inflammatoires sur le site du thrombus, alors que le phénomène inverse est décrit chez les souris invalidées pour le gène de l'IL-10 par Myers DD et al (151) (**Tableau X**). En effet, Downing LJ et al (148) montrent, dans leur modèle de rat auquel ils ont injecté un anticorps neutralisant l'IL-10, un afflux de cellules inflammatoires sur le site du thrombus significativement plus important que celui observé chez des rats non traités. Cependant, ils ne précisent pas quelle dose d'anticorps ils utilisent. Ils ne montrent pas non plus d'effet-dose. Dans leur modèle de souris invalidées pour le gène de l'IL-10, Sullivan VV et al (152) montrent une diminution de la teneur en fibrine dans le thrombus formé dans ce même modèle de souris deux jours après l'induction du thrombus. Six jours après cette induction, la teneur en fibrine entre les souris invalidées et les sauvages est comparable. Les auteurs expliquent ces résultats inattendus par le délai de 6 jours, trop court, qui ne permettrait pas de voir l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10 synthétisée par les souris sauvages contrôles. Ce résultat est en accord avec celui de Myer DD et al (151) qui montrent un afflux de cellules inflammatoires, deux jours après l'induction du thrombus, moins important chez les souris invalidées que chez les souris sauvages. Ce résultat s'inverse lorsque l'observation est effectuée six jours après l'induction du thrombus. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un effet pro-inflammatoire paradoxal de l'IL-10 au cours des premiers jours de formation du thrombus. Lors de l'utilisation d'anticorps neutralisants, l'expression de cet effet paradoxal pourrait dépendre de la dose d'anticorps injecté.

Le résultat obtenu par Sullivan VV *et al* (152) concernant la régulation de la fibrine par l'IL-10 est contradictoire avec celui d'Okada K *et al* (143). En effet dans leur modèle, Sullivan VV *et al* (152) corrèlent l'absence d'IL-10 à une diminution de la teneur en fibrine

du thrombus (152). L'action la plus fréquemment rapportée de l'IL-10 sur la fibrinolyse, est sa capacité à réduire l'accumulation de fibrine en diminuant l'activité du PAI-1. Okada k *et al* (143) montrent que des souris C57BL/6 invalidées pour les gènes de l'IL-10 ont des dépôts intra-vasculaires de fibrine plus importants et plus nombreux que ceux des souris sauvages. Cependant la thrombose observée dans le modèle d'Okada K *et al* (143) se situe dans les vaisseaux pulmonaires, et non dans la veine cave inférieure. La lésion initiale des vaisseaux est provoquée par un clampage du hile pulmonaire durant une heure suivie d'un déclampage provoquant un phénomène d'ischémie / reperfusion (I/R). L'analyse des dépôts de fibrine dans les vaisseaux pulmonaires est effectuée sur des poumons prélevés en pré-mortem 30 minutes après l'I/R. Dans le modèle décrit par Sullivan *et al*, l'identification des dépôts de fibrine est réalisée 2 jours après l'induction du thrombus (152). Ainsi, bien que les souris invalidées soient identiques, les différences entre les protocoles d'étude peuvent expliquer les résultats contradictoires.

L'effet de l'augmentation de l'IL-10 a également été évalué. Pour cela, de l'IL-10 a été injectée aux souris. Plusieurs protocoles sont décrits dans la littérature (Tableau X). Downing LJ et al (148) et Myers DD et al (153) ont réalisé des injections systémiques d'IL-10 recombinante humaine (IL-10rh). L'injection était effectuée avant ou pendant l'induction du thrombus. Henke PK et al (149) et Myers DD et al (153) ont choisi d'effectuer une transfection du gène de l'IL-10 virale (IL-10v) dans la paroi vasculaire adjacente à la formation du thrombus. L'injection systémique d'Il-10rh a permis de diminuer le nombre de cellules inflammatoire sur le site de la thrombose. Une diminution de l'expression de la Psélectine, glycoprotéine nécessaire à l'interaction leucocyte / cellule endothéliale et à l'extravasation des leucocytes dans la paroi vasculaire, est décrite par Myers DD et al (153) et corrobore le résultat précédent. L'IL-10rh injectée est également capable d'induire une diminution de la taille et/ou de la masse du thrombus. Les deux études utilisant la transfection du gène viral décrivent des résultats contradictoires. Henke PK et al (149) observent une diminution concomitante de l'afflux de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire et de l'expression de P-, E-sélectine et ICAM-1. Ils n'observent pas de diminution de la taille du thrombus. Ce dernier résultat est également décrit par Myers DD et al (153). Cependant la transfection de l'IL-10v dans leur modèle n'induit pas de diminution du nombre de cellules inflammatoires sur le site de la thrombose. L'expression de la E-sélectine n'est pas modifiée contrairement à ce qui est observé par Henke PK et al (149). Ces deux modèles ne sont pas complètement comparables : l'animal utilisé et la chronologie d'induction du thrombus et de transfection ne sont pas identiques. Ainsi Henke PK et al (149) ont effectué leurs expériences

sur le rat Sprague Dawley alors que Myers DD *et al* (153) ont utilisé la souris C57/BL6. La technique de transfection utilisée est identique. Cependant celle-ci est effectuée deux jours avant l'induction du thrombus par Henke PK *et al* (149) contrairement à Myers DD *et al* (153) qui pratiquent celle-ci au moment de l'induction du thrombus. Cette différence de chronologie dans le protocole pourrait expliquer la discordance des résultats. En effet, effectuer la transfection deux jours avant l'induction du thrombus au lieu de l'effectuer au moment même de l'induction permet à l'IL-10v d'être active plus rapidement au niveau de la paroi vasculaire au moment de l'induction du thrombus par ligature. Cependant provoquer une augmentation d'IL-10 dans la paroi vasculaire avant la formation du thrombus ne semble pas être corrélée à la physiopathologie (148). L'étude menée par Myers DD *et al* (153) compare l'injection systémique d'IL-10rh à la transfection du gène de l'IL-10 virale. L'injection systémique et la transfection sont réalisées au moment de l'induction du thrombus. L'IL-10rh et l'IL-10v ont des effets opposés. Dans ce modèle, seule l'IL-10rh diminue la taille du thrombus et a un effet anti-inflammatoire (**Tableau X**).

Une seule étude (149) a évalué l'influence de l'IL-10 sur l'expression du FT dans un modèle murin (rat Sprague Dawley). Le gène de l'IL-10 transfecté est le gène viral. Cette transfection ne modifie pas l'expression du FT (activité) au niveau du thrombus. Bien que les séquences d'acides aminés de l'IL-10rh et l'IL-10v aient 84% d'homologie et qu'elles aient le même récepteur leurs effets biologiques ne semblent pas être complètement superposables.

Il apparaît, à travers ces études, que seule l'IL-10 humaine possède des caractéristiques anti-thrombotiques. Le mode et la chronologie d'administration de l'IL-10 peuvent également modifier les résultats obtenus. Les résultats obtenus dans les modèles animaux concernant la régulation par l'IL-10 de l'évolution du thrombus veineux et de l'inflammation locale sont majoritairement homogènes. L'IL-10 endogène est présente en quantité augmentée sur le site de la thrombose que se soit au niveau de l'interface thrombus/paroi et dans la paroi vasculaire (endothélium et adventice). Cette augmentation apparaît comme étant le résultat de l'induction du thrombus. Les souris IL-10<sup>-/-</sup> développent un syndrome inflammatoire plus important que celui observé chez les souris sauvages. Celuici est caractérisé par un afflux massif de cellules pro-inflammatoires sur le site de la thrombose. Le même effet est observé lors de l'injection d'anticorps neutralisant l'IL-10. L'augmentation du taux d'IL-10 régule le phénomène inflammatoire présent sur le site de la thrombose notamment en diminuant l'expression des glycoprotéines nécessaires à l'afflux des leucocytes dans la paroi vasculaire. Cet effet anti-inflammatoire est observé en présence d'IL-10rh et est corrélé à une diminution de la taille du thrombus. Seule la diminution de la teneur

en fibrine du thrombus, observée chez les souris invalidées pour le gène de l'IL-10, apparaît comme un résultat discordant avec la littérature. Le modèle utilisé pourrait en être à l'origine.

Tableau X Modèles animaux d'étude de l'interleukine 10 dans la thrombose veineuse.

Auteurs	Modèle animal	Site de la thrombose	Traitements	Résultats
Downing LJ, JI 1998 (148)	Rats Sprague Dawley sauvage	Veine cave inférieure	Injection systémique: - Anti-II-10 1 heure avant le thrombus - IL-10 rh 1 heure avant le thrombus - Sacrifice à J2 post thrombus	Sans traitement:  -↑ IL-10 endogène dans la paroi vasculaire pendant le thrombus  Avec anti-IL-10  -↑ cellules inflammatoires sur le site  Avec IL-10rh  -↓ cellules inflammatoires sur le site  -↓ masse (g/cm de veine) du thrombus avec IL-10 recombinante
Henke PK, JI 2000 (149)	Rats Sprague Dawley (mâle) sauvage	Veine cave inférieure	- Transfection d'IL-10v 2 jours avant l'induction du thrombus dans la paroi vasculaire - sacrifice à J2 post thrombus	- ↓ monocytes et PNN dans la paroi vasculaire - ↓ expression P, E sélectine et ICAM-1 - pas de modification des taux de FT et de VWF - pas de modification de la surface (mm²) du thrombus
Myers DD, J Surg Research 2002 (151)	Souris C57BL/6 : - sauvage - IL-10 <sup>-/-</sup>	Veine cave inférieure	- Sacrifice à J2 et J6 post thrombus	Souris sauvages:  ↑ II-10 endogène (J2 et J6):  - à l'interface parois/thrombus  - dans l'endothélium  - dans l'adventice  Souris II-10 <sup>-/-</sup> versus sauvages:  - Nombre de cellules inflammatoires J2 : Souris II-10 <sup>-/-</sup> < sauvages  - Nombre de cellules inflammatoires J6 : Souris II-10 <sup>-/-</sup> > sauvages  Pas de modification de la taille du thrombus  Souris II-10 <sup>-/-</sup> J2 versus J6  - cellules inflammatoires J6>J2
Sullivan VV, J Surg Research 2003 (152)	Souris C57BL/6: - sauvage - IL-10 <sup>-/-</sup>	Veine cave inférieure	- Sacrifice à J2 et J6 post thrombus	Souris IL-10 <sup>-/-</sup> versus sauvage -↓ teneur en fibrine du thrombus à J2 - Teneur en fibrine du thrombus similaire à J6
Myers DD, J Surg Research 2003 (153)	Souris C57BL/6 : - sauvage	Veine cave inférieure	- Injection systémique d'IL-10rh à l'induction du thrombus - Transfection d'IL-10v à l'induction du thrombus dans la paroi vasculaire - Sacrifice à J2 et J6 post thrombus	↓ masse du thrombus (g/cm de veine)  IL-10rh ↓ significative  IL-10v ↑ significatifve      ↓ inflammation parois veineuse  effet IL-10rh significatif  pas d'effet IL-10v      ↓ expression P-sélectine  effet IL-10rh significatif / pas d'effet  IL-10v

(-/- : souris invalidée pour le gène correspondant ; IL-10rh : Il-10 recombinante humaine ; IL-10v : IL-10 virale; MMP : métallo-protéinase ; FT : facteur tissulaire ;  $\uparrow$  : augmentation ;  $\downarrow$  : diminution)

## II.5.2.3 Modèles animaux : IL-10 et thrombose artérielle

Le rôle d'un processus inflammatoire chronique dans la formation et l'évolution des plaques athéroscléreuses est formellement reconnu (154). Le développement des lésions athéroscléreuses de la paroi vasculaire doit être considéré comme une série de réponses cellulaires et moléculaires spécifiques qui constituent dans leur ensemble une maladie inflammatoire. Une altération initiale de l'endothélium entraîne un dysfonctionnement de ce dernier. Les propriétés des cellules endothéliales sont modifiées. Celles-ci acquièrent un caractère pro-coagulant, elles synthétisent des molécules vaso-actives, des cytokines et des facteurs de croissance. Les lésions athérogènes sont caractérisées par l'accumulation dans la paroi artérielle de cellules inflammatoires, de lipides, LDL-cholesterol en particulier, et de matrice extra-cellulaire (154). L'IL-10 a été identifiée parmi les cytokines synthétisées par les cellules endothéliales durant le phénomène inflammatoire (155) (156). Elle est présente aux stades précoces et avancés de la plaque (155) (156). Certains évènements cellulaires participant au maintien du phénomène inflammatoire et à l'évolution de la plaque peuvent être régulés par l'IL-10. Ainsi l'IL-10 est capable d'inhiber l'activation du facteur nucléaire kB (NF-kB) (89) (157), la production de métalloprotéinase (MMP9, MMP2) (158-160), de facteur tissulaire (161), de cyclooxygénase 2 (102) (162) et la mort cellulaire (163). Toutes ces données permettent d'évoquer un rôle de l'IL-10 dans le contrôle de l'évolution de la plaque d'athérome.

Les souris C57BL/6 constituent le modèle animal le plus fréquemment décrit pour l'étude du rôle de l'IL-10 dans l'évolution de la plaque. Ces souris sont soumises à un régime alimentaire athérogène. Des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE) ou en récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL) servent de modèle dans deux études (**Tableau XI**). Ces souris développent spontanément des lésions athéromateuses, qui avec le temps, deviennent complexes et ressemblent aux lésions d'athérosclérose humaine. Comme pour l'étude du rôle de l'IL-10 dans la thrombose veineuse, l'évolution de la thrombose artérielle est étudiée chez des souris invalidées pour les gènes de l'IL-10. Caligiuri *et al* (164) utilisent un modèle de souris invalidées pour le gène de l'IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) et pour le gène de l'ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>). Deux études (165) (166) comparent les résultats obtenus chez des souris sauvages à ceux obtenus chez des souris IL-10<sup>-/-</sup>. Pour objectiver l'effet de l'IL-10 sur l'évolution des lésions athéromateuses Mallat Z *et al* (165) injectent de l'IL-10 humaine aux souris IL-10<sup>-/-</sup>. Pinderski-Oslund LJ *et al* (166), en plus du modèle invalidé, utilisent un modèle de souris

transgénique surexprimant l'IL-10. Celle-ci est sous le contrôle du promoteur de l'IL-2. Ainsi, la stimulation des lymphocytes T de ces souris entraîne une hyper-expression d'IL-10 par ces derniers qui évoluent alors vers un profil de type Th2 associé à une diminution de la sécrétion d'INF-γ (167). Enfin, le modèle de souris de l'étude de Von der Thüsen JH *et al* (168) est invalidé pour le gène du récepteur aux LDL. Une augmentation du taux d'IL-10 de ces souris est ensuite provoquée soit par injection systémique de l'adénovirus porteur du gène humain de l'IL-10 soit par transfection locale de ce même virus.

Les résultats décrits sont homogènes (Tableau XI). L'IL-10 modifie qualitativement le métabolisme du cholestérol en diminuant la proportion de LDL-cholestérol et en augmentant le taux de HDL-cholestérol. Dans la phase la plus précoce de l'athérogénèse, des lipoprotéines de faible densité ou LDL s'amassent dans l'intima des artères où elles sont soumises à un stress oxydant. Ces LDL oxydées sont internalisées de manière excessive par des macrophages. Ces derniers sont alors appelés cellules spumeuses et forment la strie lipidique. Un déficit en IL-10 chez les souris conduit à une augmentation de la progression de la taille des plaques expérimentales associée à une diminution de la proportion en collagène (165). L'expression d'IL-10 dans les plaques est associée à une baisse des signes d'inflammation et à une diminution de l'activation de la coagulation. L'absence d'IL-10 conduit à une surexpression des cytokines de type Th1, à une stimulation de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP) et à une augmentation de l'activité procoagulante facteur tissulaire-dépendante. Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression par les cellules musculaires lisses, les macrophages et les cellules endothéliales de MMP. Les MMP sont responsables de la dégradation de la matrice extra-cellulaire sous-endothéliale et de son remodelage (169) mais également de l'amincissement de la chape fibreuse pouvant être à l'origine de la rupture de la plaque. Elles favorisent le recrutement des monocytes notamment en induisant l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1). Elles modulent la réponse fibro-proliférante de la plaque. Ainsi la production des collagènes type I et III par les cellules musculaires lisses apparaît augmentée par l'IL-1 et le TNF-α, cytokines proinflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires de la plaque peuvent également intervenir dans les complications thrombotiques associées à l'athérosclérose. Les propriétés antithrombotiques des cellules endothéliales sont altérées par l'IL-1 et le TNF-α qui augmentent l'activité procoagulante de type tissulaire et suppriment l'activité anticoagulante relayée par le système thrombomoduline-protéine C en diminuant l'expression de la thrombomoduline et du récepteur de la protéine C. Ces cytokines modifient aussi les

propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales en inhibant la production de l'activateur tissulaire du plasminogène et en augmentant la production de son inhibiteur principal le PAI-1 (170). L'IL-10 permet une régulation de l'équilibre inflammatoire. Elle est produite en grande quantité par les monocytes-macrophages et possède des propriétés « désactivatrices » de ces cellules en inhibant la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par ces cellules (171). Elle a la propriété d'inhiber la synthèse de MMP-1 et MMP-9 et d'induire la production de TIMP 1 (158). Enfin, l'IL-10 intervient dans la régulation de la coagulation au niveau de la plaque en réprimant l'expression locale du facteur tissulaire.

Tableau XI Modèles animaux d'étude de l'interleukine 10 dans la thrombose artérielle

Auteurs	Modèle animal	Thrombose étudiée	Traitement	Résultats
	Souris C57BL/6:			Cholestérol total Pas de différence significative entre les 2 groupes
Mallat Z, Circ Research 1999 (165)	- IL-10 <sup>+/+</sup> -IL-10 <sup>-/-</sup> Régime enrichi en graisse 16 semaines	Aorte	Injection IM d'Il-10 murine (plasmide)	HDL-cholestérol IL-10 <sup>-/-</sup> < IL-10 <sup>+/+</sup> Taille de la plaque IL-10 <sup>-/-</sup> > IL-10 <sup>+/+</sup> Composition de la plaque Cytokine Th1: IL-10 <sup>-/-</sup> >IL-10 <sup>+/+</sup> Collagène: IL-10 <sup>-/-</sup> < IL-10 <sup>+/+</sup> ↓ taille des lésions
Pinderski oslund LJ, Vasc Biol 1999 (166)	souris C57BL/6:  -sauvage -IL-10 <sup>+/+</sup> surexprimée (souris transgénique) -IL-10 <sup>-/-</sup> Régime enrichi en graisse 15 semaines	Aorte		HDL cholestérol IL-10 <sup>-/-</sup> < sauvage et < IL-10 <sup>+/+</sup> surexprimée  Taille de la plaque IL-10 <sup>+/+</sup> surexprimée < sauvage < IL-10 <sup>-/-</sup>
Von der Thüsen JH, FASEB J 2001 (168)	Souris LDLr <sup>-/-</sup> (femelle)	Carotide	<ul> <li>- Adénovirus porteur du gène de l'IL-10 h, injection systémique</li> <li>- Adénovirus porteur du gène de l'IL-10h, transfection locale</li> </ul>	Il-10 h, systémique, résultats 12 j après injection: ↓ taille de la plaque (μm²) ↓ ARNm IL-10R hépatique ↓ TNFα ↓ cholestérol total  Il-10h transfectée, résultats 12 j après injection: ↓ taille de la plaque (μm²)
Caligiuri G, Mol Med 2003 (164)	Souris C57BL/6:  - Apo E <sup>-/-</sup> x IL-10 <sup>-/-</sup> - Apo E <sup>-/-</sup> x IL-10 <sup>+/+</sup> Régime enrichi en graisse 16 semaines	Aorte		IL-10 <sup>-/-</sup> versus IL-10 <sup>-/-</sup> :  - ↑ taille des lésions chez souris femelles IL-10 <sup>-/-</sup> - ↑ LDL et ↓ VLDL  - ↑ cytokine Th1  A 48 semaines:  - lésions identiques  - ↑ cytokine Th1  - ↑ MMP9, pro-MMP9  - ↑ fragments 1+2 de la prothrombine  - ↑ activité du FT aortique  - ↑ du nombre de coronaires thrombosées

(IM : intra-musculaire ;  $\uparrow$  : augmentation ;  $\downarrow$  diminution ; FT : facteur tissulaire)

## II.5.3 Polymorphismes de l'IL-10 et pathologie humaine

#### II.5.3.1 Introduction

Il existe de nombreuses pathologies du système immunitaire, pour certaines très bien définies sur le plan génétique et moléculaire et pour d'autres encore mal connues. Leurs conséquences principales sont de façon non exclusive la création d'un état de susceptibilité anormale aux agents infectieux et la survenue de réponses immunes non appropriées. Cellesci peuvent être pathologiques par leurs modalités malgré une reconnaissance normale d'antigènes exogènes ou par leur reconnaissance anormale d'auto-antigènes. Les propriétés biologiques de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, immunosuppressive et facteur de différenciation des lymphocytes B, ont conduit à de nombreuses études de son rôle dans la survenue de pathologies. Les pathologies étudiées dans la littérature concernent essentiellement les pathologies infectieuses, dysimmunitaires, inflammatoires, hémopathies malignes affectant essentiellement la lignée des lymphocytes B, le rejet du greffon au cours des transplantations et certains cancers. Une sécrétion inappropriée d'IL-10 pourrait être à l'origine d'une dérégulation du système immunitaire et/ou inflammatoire. Approximativement 75% de la sécrétion d'IL-10 est contrôlée génétiquement (19). Cette régulation intervenant au niveau transcriptionnel, les études ont essayé de corréler les polymorphismes du promoteur de l'IL-10 à la survenue de certaines maladies.

## II.5.3.2 Polymorphismes de l'IL-10 et pathologie infectieuse

Au cours d'une infection, la réponse de l'hôte contre l'agent infectieux doit être suffisante pour éliminer ce dernier mais elle doit être contrôlée pour ne pas causer de dommages aux cellules et tissus de l'hôte. Les modèles animaux, essentiellement des souris, montrent qu'une diminution du taux d'IL-10 est souvent corrélée à une meilleure résistance à l'infection lorsqu'elle est d'origine bactérienne, fongique ou parasitaire (44). Lorsque l'infection est virale, les souris IL-10<sup>-/-</sup> développent des pathologies plus sévères. L'implication majoritaire des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans la réponse immune contre l'infection

virale explique le peu d'effet de l'IL-10 dans ces pathologies. Les études cliniques montrent un rôle évident de l'IL-10 dans les pathologies infectieuses. De fortes corrélations sont mises en évidences entre les taux de protéine IL-10 et d'ARNm et l'évolution de pathologies infectieuses chroniques telles que la leishmaniose viscérale, le paludisme, la filariose, la lèpre, la tuberculose, les candidoses et les infections à Mycobacterium avium (44). L'injection d'anticorps bloquant anti-IL-10 restaure l'immunité dépendante des lymphocytes T in vitro des patients infectés. La relation de cause à effet entre le taux d'IL-10 et la virulence de l'agent infectieux n'est pas élucidée. Est-ce un taux d'IL-10 haut qui permet à l'agent infectieux d'être virulent ou l'infection par un agent virulent qui induit un taux d'IL-10 élevé ?. Les auteurs pensent à l'heure actuelle, que les deux mécanismes interviennent. Westendorp RG et al (19) étudient la production d'IL-10 chez 61 patients atteints de méningite à Neisseria meningitis, 190 parents apparentés au premier degré et 26 paires de jumeaux homozygotes. La capacité cellulaire à produire de l'IL-10 est évaluée ex-vivo sur sang total après stimulation par des endotoxines. Les auteurs montrent que 75% des variations des taux d'IL-10 sont imputables à des facteurs génétiques. Par ailleurs, un taux élevé d'IL-10 est associé à un risque 20 fois plus élevé d'évolution mortelle. Lowe PR et al (172) montrent une augmentation de la fréquence de l'allèle -592A du promoteur de l'IL-10 chez des patients en défaillance viscérale aiguë. Cet allèle est corrélé à un taux bas de sécrétion d'IL-10. Gallagher PM et al (173) corrèlent la présence de l'allèle -1082A avec la survenue plus fréquente de pneumonie communautaire acquise. Enfin Reid CL et al (174) mettent en évidence une fréquence accrue de l'allèle -592A dans une population de patients d'unité de soins intensifs par rapport à une population de témoins. Cet allèle, à l'état hétérozygote ou homozygote, est corrélé à la sécrétion la plus basse d'IL-10 des patients hospitalisés et au plus fort taux de mortalité. Par ailleurs les patients homozygotes ont tous développé un sepsis et sont tous décédés. L'IL-10 et ses polymorphismes semblent participer à la réponse immune au cours des infections. Une sécrétion trop élevée d'IL-10 est corrélée à une virulence exacerbée de l'agent infectieux alors qu'une sécrétion trop basse de cette cytokine ne permet plus de réguler la réponse inflammatoire et conduit à une mortalité plus élevée (172).

## II.5.3.3 Polymorphismes de l'IL-10 et hémopathies malignes

# II.5.3.3.1 Polymorphismes de l'IL-10 et myélome

Une des principales activités biologiques de l'IL-10 est sa capacité à augmenter la survie des lymphocytes B et de leurs précurseurs. Elle favorise également leur prolifération et leur différenciation en plasmocyte (175). L'IL-10 induit un taux de synthèse d'immunoglobuline élevé. Par ailleurs l'IL-10 humaine possède 70% d'homologie avec l'IL-10 virale produite par le virus d'Epstein Barr (EBV). Cette dernière est un facteur de prolifération des cellules infectées par l'EBV (176).

Seules deux études (177) (178) déterminant la fréquence des polymorphismes du promoteur de l'IL-10 dans le myélome multiple (MM) sont décrites (**Tableau XII**). Zheng C *et al* (177) déterminent la fréquence des allèles du polymorphisme de substitution –1082G>A et des microsatellites IL-10R et IL-10G chez 73 patients atteints de MM, tous stades confondus, chez des patients atteints de gammapathie monoclonal de signification indéterminée (MGUS) et chez des témoins sains. Les auteurs utilisent les mêmes amorces qu'Eskdale J *et al* (21) (22) pour déterminer les allèles des microsatellites IL10G et IL10R. Ils désignent les allèles des microsatellites par la taille du fragment obtenu.

Les fréquences des allèles du microsatellite IL-10G déterminées dans les trois groupes n'est pas significativement différentes. Les auteurs notent cependant une fréquence augmentée de l'allèle IL-10G 136 et du génotype 136/136 dans les groupes MM et MGUS par rapport au groupe témoin. La fréquence de cet allèle dans le groupe témoin est très proche de celle décrite par Eskdale J et al (21) pour l'allèle IL-10G9. Cet allèle correspond à un fragment amplifié de 140 pb dans l'article publié par Eskdale et al (21) et non de 136 pb. Les allèles du microsatellite IL-10R sont également déterminés par analyse de taille des produits de PCR obtenus. Les tailles obtenues et les fréquences alléliques du groupe témoin permettent de conclure que les allèles 112, 114 et 116 correspondent aux allèles R1, R2 et R3 d'Eskdale J et al (22). Aucune des fréquences alléliques du microsatellite IL-10R n'est significativement différente entre les trois groupes. Les auteurs observent cependant une augmentation de l'allèle IL-10R 112 (R1) et une diminution de l'allèle IL-10R 116 (R3) dans les groupes MM et MGUS par rapport au groupe témoin. L'analyse des fréquences des allèles sous forme génotypique montre que les génotypes IL-10R 112/114 et 114/116 ont des fréquences

respectivement plus élevées et plus basses dans le groupe MM et le groupe MGUS comparativement au groupe témoin. Ies auteurs montrent une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 par les cellules mononucléées des patients atteints de MM et porteurs de l'allèle IL-10G 136. Les auteurs n'ont pas étudié la sécrétion d'IL-10 chez les patients porteurs des génotypes IL-10R 112/114 et 114/116. Les fréquences alléliques du polymorphisme 1082G>A ne sont pas significativement différentes entre les trois groupes.

Mazur G *et al* (178) comparent la fréquence de trois polymorphismes de substitution dans une population de 54 patients atteints de MM et chez 50 témoins sains. En référence à l'article de Zheng C *et al* (177), ils analysent la fréquence du polymorphisme –1082G>A. Ils ne rapportent aucune différence significative entre les deux groupes. L'analyse des trois polymorphismes sous forme d'haplotype ne montre pas non plus de différence significative.

Les cytokines impliquées dans la survie, la prolifération et la différentiation des lymphocytes B sont de mieux en mieux connues. Ainsi en présence de CD40, d'IL-4 et d'IL-2 les lymphocytes du centre germinatif des ganglions se différencient en lymphocytes B mémoire. L'IL-10 permet ensuite la transformation de ces lymphocytes B mémoire en plasmocytes (175). De plus, l'IL-10 est un facteur de survie et de prolifération des lymphocytes des centres germinatifs (109) (110). Lu Z et al (179) et Gu Z et al (180) montrent que l'IL-10 est un facteur de survie et de croissance des lignées myélomateuses. Ces dernières expriment le récepteur de l'IL-10 et sont capables de produire de l'IL-10. L'étude de Zheng C et al (177) montre d'une part une fréquence augmentée de l'allèle IL-10G 136 dans les populations de patients atteints de MM et de MGUS et d'autre part une augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les cellules mononucléées sanguines des patients porteurs de cet allèle. Par ailleurs, dans leur population de patients, les fréquences de l'allèle IL-10R 116 (R3) et du génotype 114/116 sont diminuées. Dans une étude analysant la sécrétion d'IL-10 en fonction des allèles des microsatellites IL-10G et R, Eskdale et al (45) ont corrélé l'allèle IL-10 R3 (116) à une sécrétion d'IL-10 diminuée. Dans leur étude, Zheng C et al (177) identifient une fréquence augmentée d'un polymorphisme corrélé à une capacité accrue de synthèse d'IL-10, associée à la diminution de fréquence d'un polymorphisme, lui-même corrélé à une diminution de la synthèse d'IL-10. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature (181) qui attribue un rôle potentiellement pathogène, du à sa capacité à transformer les lymphocytes B en plasmocytes, de l'IL-10 dans la survenue du myélome multiple.

Tableau XII Myélome multiple et polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10.

Auteur	Patients	Témoins	Résultats
Zheng C, Int J Cancer 2001 (177)	73 MM - 23 stade I - 37 stade II - 13 stade III	107 témoins sains appariés sur l'ethnie	MM versus Témoins: -1082G>A: NS IL10G: NS IL10R génotype 112/114 ↑ IL10R génotype 114/116 ↓ MGUS versus témoins:
			IL10R 114/116↓
Mazur G, Immunol Lett 2005 (178)	54 MM - 1 stade I - 14 stade II - 39 stade III	50 témoins sains	-1082A>G : NS haplotype (-1082A>G / -819C>T/- 592A>C) : NS

 $<sup>(\</sup>uparrow$ : augmenté ;  $\downarrow$ : diminué ; NS : différence non significative ; stade de la classification de Durie et Salmon (182); MM : myélome multiple)

#### II.5.3.3.2 Polymorphismes de l'IL-10 et lymphomes

Le rôle de l'IL-10 dans la lymphopoïèse a logiquement conduit plusieurs équipes à évoquer et étudier son rôle dans les lymphomes. Bien que la littérature soit abondante concernant l'analyse des taux sériques d'IL-10 chez les patients atteints d'hémopathies lymphoïdes, l'analyse des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 est rarement décrite.

En plus de son rôle majeur sur la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, l'IL-10 est un facteur de survie et de prolifération pour les cellules du centre germinatif des ganglions. L'IL-10 exerce également un effet inhibiteur sur la réponse cellulaire T antigène dépendante et sur la réponse macrophagique. Ces éléments contribuent à la progression des lymphomes. Des études montrent que les lignées lymphomateuses produisent de l'IL-10 et que cette cytokine est un facteur de prolifération pour ces lignées (183) (184). Les études cliniques montrent que le taux d'IL-10 sérique détecté chez des patients atteints de lymphome non-Hodgkinien, au moment du diagnostic, est significativement supérieur à celui de témoins sains (185) (186-188). Les auteurs ont également essayé de corréler les taux d'IL-10 au pronostic de la maladie. Les résultats concernant ces paramètres divergent. Blay JY et al (185) rapportent des taux d'IL-10 bas ou indétectables chez les patients en rémission complète ou partielle et un taux de survie bas chez les patients de grade intermédiaire ou haut avec un taux d'IL-10 détectable au diagnostique. Cortes JE et al (188) ne mettent pas en évidence de corrélation entre les taux d'IL-10 et le pronostic de la maladie. Cependant entre ces deux études plusieurs paramètres divergent. La sensibilité et la spécificité des tests de dosage de l'IL-10, les sous-groupes histologiques recrutés et les thérapeutiques utilisées diffèrent et ne permettent pas de réelle comparaison.

Lech-Maranda E *et al* (189) (**Tableau XII**) ont analysé la fréquence des SNP – 1082G>A, -819C>T et -592C>A du promoteur du gène de l'IL-10 chez 199 patients consécutifs atteints de lymphome B diffus à larges cellules et chez 112 témoins appariés sur l'ethnie. L'allèle –1082G était significativement plus fréquent dans la population de patients que dans la population de témoins (0,47 versus 0,39; p=0,043). Il était également significativement plus fréquent chez les patients ayant une rémission de plus de 5 ans que chez les patients faisant des rechutes précoces. L'analyse statistique a identifié cet allèle comme un facteur indépendant de bon pronostic. Les auteurs rappellent que l'allèle –1082G est associé à une capacité plus grande de produire de l'IL-10 notamment sur le site tumoral.

Ceci pourrait rendre l'évolution de la pathologie moins agressive, l'IL-10 inhibant notamment l'angiogénèse et le phénomène inflammatoire.

En janvier 2006, le consortium «InterLymph» (International Lymphoma Epidemiology Consortium) analyse la fréquence allélique de polymorphismes génétiques de plusieurs cytokines dont l'IL-10 dans la pathologie lymphomateuse (190) (**Tableau XIII**). Les auteurs étudient deux SNP du promoteur du gène de l'IL-10: -3575T>A et –1082G>A. Les patients inclus sont issus de huit études cas-contrôle. Ils sont atteints de lymphome malin non hodgkinien (LMNH). Huit laboratoires effectuent l'analyse de douze polymorphismes. Les auteurs comparent les fréquences alléliques obtenues dans la population témoin à celles obtenues dans la population de patients, tous types de lymphomes confondus. Ils font ensuite la même analyse statistique en différenciant les lymphome diffus à large cellule de type B et les lymphomes folliculaires. Leurs résultats montrent une association entre la présence de l'allèle –3575A et la survenue de LMNH (p<0,05; 3462 contrôles versus 3030 LMNH) et plus particulièrement avec la survenue de lymphome B diffus à larges cellules (p<0,05; n=1169). L'allèle –1082G est également associé à la survenue de lymphome diffus à larges cellules de type B (p<0,05, 3565 contrôles versus 1084 patients).

Il apparaît que l'allèle –1082G est associé à la survenue de lymphome diffus à larges cellules de type B. La production d'Il-10 étant favorisée par cet allèle, ce résultat est en accord avec le rôle physiologique de l'IL-10 sur la lignée lymphocytaire B. Cependant Lech-Maranda E *et al* (189) identifient l'allèle –1082G comme un facteur indépendant de bon pronostic, ils mettent ainsi en évidence la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu dans cette pathologie et notamment la variabilité des effets de l'Il-10 en fonction de l'évolution de la maladie.

Tableau XIII Lymphomes et polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10.

Auteurs	Patients	Témoins	Résultats
Lech- Maranda E, Blood 2004 (189)	199 DBLC	112 témoins sains appariés sur l'ethnie (Donneurs de sang)	-1082G (patients versus témoins): associé à la survenue de DLBC Patients -1082G versus patients -1082A: -1082G associé plus de rémission sur 5 ans
	1084 DLBC	3565 témoins sains (liste électorale)	-1082G associé à la survenue de DLBC
Rothman N, Lancet 2006 (190)	3030 LMNH	3462 témoins sains (liste électorale)	
	1169 DBLC	3921 témoins sains (liste électorale)	-3575A : associé à la survenue de LMNH (tous types confondus) et de DBLC

(LMNH: lymphome malin non hodgkinien; DBLC: lymphome diffus à larges cellules B)

## II.5.3.4 Polymorphismes de l'IL-10 et lupus érythémateux disséminé (LED)

Le lupus érythémateux disséminé est une pathologie auto-immune caractérisée par une hyperactivité des lymphocytes B responsable d'une sécrétion excessive d'auto-anticorps. Les dommages tissulaires sont causés par des dépôts de complexes immuns à l'origine de l'activation d'un phénomène inflammatoire. Les rôles physiologiques de l'IL-10 sur la stimulation de la prolifération, de la différenciation et de la synthèse d'immunoglobulines par la lignée lymphocytaire B ainsi que sa capacité à inhiber la réponse immunitaire de type Th1 ont conduit à émettre l'hypothèse qu'elle pouvait intervenir dans la physiopathologie du LED. Llorente L et al (191) publient le premier article décrivant la synthèse de l'IL-10 par les cellules mononucléées sanguines (PBMC) de 47 patients atteints de LED. Par la technique de RT-PCR, ils mettent en évidence, chez trente quatre des 47 patients, la présence de transcrits de l'IL-10 dans les PBMC non stimulées contre une seule identification de transcrits chez 34 témoins sains. Le dosage de l'IL-10 produite par ces mêmes cellules après 24 heures de culture (dans le surnageant) montre une production 33 fois plus forte par les cellules des patients comparativement aux témoins. Les dosages sériques de l'IL-10 (192) (193) des patients atteints de LED sont toujours en moyenne 7 fois plus élevés que chez les contrôles. Des études montrent que les apparentés au premier degré des patients atteints de LED ont également des PBMC sécrétant de forts taux d'IL-10 (194). Les fréquences des polymorphismes de l'IL-10 sont déterminées afin caractériser ou non ces polymorphismes comme des facteurs de risque génétique du LED. Aucune association entre les haplotypes formés par les SNP et l'incidence du LED n'est identifiée (30) (195) (196) (Tableau XIV). Cependant l'haplotype GCC est associé à l'expression de manifestations rénales et d'anticorps anti-Ro dans une population caucasienne originaire de Grande-Bretagne, alors que l'haplotype « inverse » ATA est associé aux même manifestations cliniques mais dans une population chinoise. Cette différence est très certainement imputable aux différences de répartition alléliques ethniques bien que les témoins et les patients soient éthniquement appariés (Tableau IV). Les études fonctionnelles montrent cependant que l'haplotype GCC est associé à une capacité élevée de produire de l'IL-10. Les allèles du microsatellite IL-10G semblent être associés à l'incidence du LED. Ainsi les allèles G10, G12 et G13 sont plus fréquents chez les patients atteints de LED que chez les témoins. L'allèle IL-10G9 est quant à lui moins fréquent chez les patients. En revanche, dans la population de patients il est associé à

l'expression d'anticorps anti-ENA (**Tableau XIV**). L'étude fonctionnelle des allèles du microsatellite IL-10G n'a jamais été décrite. Les allèles significativement impliqués dans le LED ont des répétitions de CA très proches. Les allèles G9, G10, G12 et G13 ont respectivement 22, 23, 25 et 26 répétitions de CA ce qui pourrait imputer un rôle fonctionnel à la taille du microsatellite.

Tableau XIV Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10 et lupus érythémateux disséminé.

Auteurs	Patients	Témoins	Résultats
Lazarus M, J Rheumatol 1997 (195)	76 caucasiens (Grande Bretagne)		Haplotype –1082G/-819C/-592C  - Pas de différence significative entre les patients et les témoins  1 - Associé à l'expression d'anticorps anti-Ro  - associé à la survenue de manifestations rénales
Mok CC, Arthritis Rheum 1998 (30)	88 chinois	83 témoins appariés sur l'ethnie	Haplotype –1082A/-819T/-592A  - Pas de différence significative entre les patients et les témoins  - Associé à la survenue de manifestations rénales
Crawley E, Arthritis Rheum 1999 (196)	120 patients caucasiens (Grande bretagne)	274 témoins appariés sur l'ethnie	Haplotype –1082A/-819T/-592A - pas de différence significative entre les patients et les témoins
Eskdale J, Tissue Antigens 1997 (197)	56 patients caucasiens (Allemagne)	102 témoins appariés sur l'ethnie	Allèles IL-10G9  - Plus fréquent chez les témoins que chez les patients  - Associé à la présence d'anticorps anti-ENA
. ,			Allèles IL-10G13 Plus fréquent chez les patients que chez les témoins
Mehrian R, Arthritis Rheum 1998 (198)	156 américains mexicains	220 témoins appariés sur l'ethnie	II-10G10 Plus fréquent chez les patients que chez les témoins
D'Alfonso S, Arthritis Rheum 2000 (31)	172 caucasiens (Italie du Nord)	164 témoins appariés sur l'ethnie	IL-10G12 Plus fréquent chez les patients que chez les témoins
Gibson AW, Journal of Immunology 2001 (199)	60 américains africains (Alabama)	64 témoins appariés sur l'ethnie	-2763A  Moins fréquent chez les patients que chez les témoins  Associé à une plus faible production d'IL-10

## II.5.3.5 Polymorphismes de l'IL-10 et grossesse

Il est maintenant reconnu que l'absence de rejet de l'unité foeto-placentaire par la mère est due à un état physiologique d'immuno-tolérance. Le placenta et la décidua sont capables de synthétiser de nombreuses cytokines (200). Plusieurs études montrent qu'au cours de la grossesse normale, les cytokines synthétisées, notamment à l'interface placenta/décidua, sont de type Th2/Th3 alors qu'un profil immunitaire de type Th1 est associé à la survenue de fausses-couches (201) (202). Les cellules trophoblastiques, d'origine fœtale, et les cellules de la décidua, d'origine maternelle, principales cellules de l'interface foeto-placentaire, sont capables de synthétiser de l'IL-10 et son récepteur (203) (204). La sécrétion d'IL-10 par le trophoblaste (cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste) est maximale au cours du premier et du deuxième trimestre, puis elle diminue significativement au terme de la grossesse (203) (205). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la chute d'IL-10 pourrait être un des signaux de déclenchement du travail. L'IL-10 autorise l'implantation foeto-placentaire en induisant l'expression d'antigènes de classe 1 particuliers appelés HLA-G à la surface des trophoblastes ce qui empêche le rejet des cytotrophoblastes par les cellules de l'organisme maternel, notamment lorsqu'ils migrent et envahissent l'endomètre maternel en interagissant avec les cellules déciduales et les cellules immunocompétentes intra-déciduales (206). Par ailleurs l'IL-10 possède la propriété de diminuer l'expression de cytokines de type Th1, délétères pour le développement placentaire humain. En effet l'INF-γ, le TNF-α et l'IL-2 en activant les macrophages et les cellules NK déciduales altèrent le trophoblaste (207).

La production d'IL-10 étant influencée par les allèles des SNP de son promoteur, leurs fréquences ont été analysées chez des patientes faisant des fausses couches récidivantes idiopathiques (**Tableau XV**). Aucune différence significative entre les fréquences alléliques du SNP –1082G>A identifiées dans le groupe des patientes et celui des témoins n'est mise en évidence dans trois études (208-210). Le groupe de patientes de l'étude de Daher S *et al* (211) est porteur de l'allèle –1082G plus fréquemment que le groupe témoin. Les femmes porteuses de cet allèle sont identifiées comme fortes productrices d'IL-10 (23). L'auteur n'explique pas le mécanisme physiopathologique participant à la survenue de fausses-couches en présence de forts taux l'IL-10. Kamali-Sarvestani E *et al* (210) identifient une fréquence plus élevée de l'allèle –592C dans sa population de patientes (**Tableau XV**). Cet allèle, selon le type de cellules mises en culture (lymphocytes seuls, cellules mononucléées) et le type d'activateur

(212), est associé soit à un fort taux de réponse cellulaire soit à un faible taux de réponse cellulaire. Les auteurs associent l'allèle -592C à un faible taux de sécrétion d'IL-10 afin d'être en accord avec la physiopathologie la plus fréquemment décrite dans la littérature. La seule étude corrélant la survenue de FC à la présence de polymorphismes du promoteur de l'IL-10 a été publiée récemment par Zammiti W et al (213) (Annexe 1), groupe tunisien travaillant en collaboration avec notre équipe. Dans cette étude, les fréquences alléliques sont comparées entre un groupe de patientes ayant fait au moins trois FC idiopathiques et un groupe contrôle de femmes n'ayant pas fait de FC. Les auteurs ont également divisé le groupe de cas en deux sous-groupes : le premier est caractérisé par des patientes dont les FC ont toutes eu lieu avant 10 SA et le deuxième par des patientes dont les FC ont toutes eu lieu après 10 SA. A partir de 10 SA la circulation placentaire est mature. L'analyse statistique montre une fréquence significativement augmentée de l'haplotype –592A/-819T/-1082A dans la population totale de cas. Elle révèle également une fréquence statistiquement augmentée des allèles -592A et -819T dans le sous-groupe de femmes ayant eu des FC avant 10 SA. L'haplotype ATA a été corrélé dans la littérature a une sécrétion d'IL-10 diminuée (46) (214), ce qui pourrait expliquer la survenue de FC chez les femmes porteuses de cet haplotype. De plus, deux des allèles présents dans cet haplotype (-592A et -819T) sont corrélés à la survenue de FC précoces. L'interprétation physiopathologique de ces résultats laisse penser que l'IL-10 aurait un rôle important à la phase d'implantation, certainement en induisant un état d'immuno-tolérance de l'organisme maternel envers le fœtus.

Les quatre études (**Tableau XV**) ne rapportant pas de corrélation entre les polymorphismes génétiques de l'IL-10 et la survenue de FC ont un plus faible nombre de patientes incluses que celui rapporté par Zammiti W *et al* (213). Par ailleurs, les taux des cytokines varient durant les neufs mois de gestation puis au moment du post-partum. Cette observation est un reflet de l'immuno-physiologie de la grossesse qui évolue tout au long de la gestation. Ceci introduit la notion que des facteurs de risque de FC devraient être déterminés selon le type clinique précis de FC, en particulier selon le terme de survenue. Enfin, l'ensemble de ces études rapporte des résultats obtenus à partir de populations ethniques différentes ce qui ne permet ni la comparaison ni la généralisation de leurs résultats.

Tableau XV Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10 et fausses-couches.

Auteurs	Patients	Témoins	Résultats
Babbage SJ, J Reprod Immunol 2001(208)	43 patientes caucasiennes avec au moins trois FC idiopathiques consécutives (originaires de Grande Bretagne)	73 femmes caucasiennes avec au moins 2 enfants et n'ayant jamais fait de FC	-1082G>A Pas de différence significative entre les patients et les témoins
Karhukorpi J, Mol Hum Reprod 2001 (209)	38 patientes caucasiennes avec au moins trois FC idiopathiques consécutives précoces (originaires de Finlande)	131 femmes et hommes appariés sur l'ethnie	-1082G>A Pas de différence significative entre les patients et les témoins
Daher S, J Reprod Immunol 20 (211)	43 patientes caucasiennes avec au moins trois FC idiopathiques consécutives (originaires du Brésil)	104 femmes et hommes appariés sur l'ethnie	Allèle 1082G Plus fréquent chez les patientes
			-1082G>A Pas de différence significative entre les patients et les témoins
Kamali-Sarvestani E, J Reprod Immunol 2005 (210)	139 patientes iraniennes avec au moins trois FC idiopathiques consécutives avant la 20 <sup>ème</sup> SA	143 témoins appariés sur l'ethnie	-819C>T Pas de différence significative entre les patients et les témoins
			-592C>A -592C plus fréquent chez les patientes
			Haplotype –592/-819/-1082 Plus fréquent chez les patientes que chez les témoins -819T
Zammiti W, Mol Hum Reprod 2006 (213)	350 patientes tunisiennes avec au moins trois FC idiopathiques consécutives : - avant 10 SA : 71 - après 10 SA : 79	200 femmes ayant eu des enfants, appariées sur la consommation de cigarettes, d'alcool et la prise de	(hétéro-et homozygotes regroupés) Plus fréquent chez les patientes faisant des FC avant 10 SA
	- avant et après 10 SA : 200	contraception orale -5	-592A
			(hétéro-et homozygotes
			regroupés) Plus fréquent chez les patientes
			faisant des FC avant 10 SA

(FC : fausses-couches ; SA : semaines d'aménorrhée)

## II.5.3.6 Polymorphismes de l'IL-10 et thrombose

La littérature comporte deux études sur les polymorphismes du promoteur de l'IL-10 et la survenue de thromboses principalement dans le cadre de la pathologie athéromateuse (**Tableau XVI**). Aucune étude sur la fréquence de ces polymorphismes et la survenue de thrombose veineuse n'est publiée à notre connaissance.

Donger C et al (215) étudient la fréquence des SNP dans une large cohorte recrutée pour l'étude ECTIM. Les 1107 patients inclus dans cette étude ont eu des infarctus du myocarde (IM). Les fréquences alléliques des SNP de ces patients sont comparées à celles obtenues chez 1082 témoins sains appariés sur l'âge, le sexe et l'origine géographique. Aucune différence significative n'est observée entre ces deux groupes. Une étude similaire a été menée par Koch W et al (216). Les patients inclus sont porteurs d'une sténose coronarienne identifiée par angiographie. Deux groupes sont différenciés : les patients sans antécédent d'IM ou sans signe d'IM aigu (n=998) et les patients avec un antécédent d'IM ou avec des signes d'IM aigu (n=793). Les fréquences alléliques de ces SNP sont comparées à celles obtenues chez 340 témoins appariés sur l'âge et le sexe. L'appariement sur l'ethnie n'était pas signalé. Aucune différence significative n'est identifiée entre les témoins et les deux groupes. Les SNP ne semblent donc pas être des déterminants génétiques favorisant la survenue de sténose coronarienne ou d'IM. Ce résultat semble discordant avec ceux obtenus à partir des modèles animaux. Le modèle le plus couramment utilisé qui a permis d'identifier le rôle de l'IL-10 dans l'athérosclérose est celui de la souris invalidée pour les deux gènes de l'IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) et pour laquelle la synthèse d'IL-10 est nulle. Bien que l'allèle –1082A soit associé à des individus « faibles producteurs » d'IL-10, la comparaison avec le modèle de souris IL-10<sup>-/-</sup> ne peut être que partielle. L'étude de l'athérosclérose dans un modèle de souris faible productrice, étude non décrite dans la littérature, devrait se rapprocher un peu plus de l'homme. Dans un de ses modèles d'athérosclérose développé chez la souris IL-10<sup>-/-</sup>, Mallat Z et al (165) montrent que la taille de la lésion aortique est significativement plus importante lorsque les expériences sont effectuées en milieu conventionnel (présence de pathogène) comparativement aux expériences menées en milieu stérile. Il semble donc, à partir de ces résultats, que les effets protecteurs de l'IL-10 sont majorés en présence de pathogènes. Dans leurs études, Donger C et al (215) et Koch W et al (216) ne précisent pas le statut infectieux de leurs patients. Il pourrait être intéressant d'effectuer l'analyse des fréquences alléliques des

SNP dans des sous-groupes de patients avec un statut infectieux connu, notamment à *Chlamydiae pneumoniae*, *Helicobacter pylori* ou à cytomegalovirus qui sont des pathogènes dont la persistance pourrait favoriser le phénomène athéromateux.

Tableau XVI Polymorphismes génétiques du promoteur de l'interleukine 10 et thromboses artérielles.

Auteurs	Patients	Témoins	Résultats
Donger C, Eur J Clin Invest 2001 (215)	1107 caucasiens issus de l'étude ECTIM (originaire de Belfast en Ireland, de Glasgow en Ecosse et de Strasbourg en France)	1082 témoins appariés sur l'âge, le sexe et la zone géographique	-1082G>A/-819C>T/-592C>A Pas de différence significative entre les témoins et les patients
Koch W, Atherosclerosis 2001 (216)	998 caucasiens ayant eu une sténose coronarienne sans signe d'IM (originaires de München, Allemagne)  793 caucasiens ayant eu un IM (originaires de München, Allemagne)	340 témoins appariés sur l'âge, le sexe	-1082G>A/-819C>T/-592C>A Pas de différence significative entre les témoins et les patients

(IM: infarctus du myocarde)

# III Résultats personnels

# III.1 IL-10 et régulation de la génération de thrombine

#### **III.1.1 Introduction**

Les monocytes activés par du LPS expriment une activité procoagulante liée à l'expression inductible de facteur tissulaire (FT) (122). Par ailleurs il est montré que l'IL-10 a la propriété de diminuer l'expression du FT et donc de réguler l'activité procoagulante des monocytes activés. Dans le but de mieux caractérisé l'effet de l'IL-10 sur l'activité procoagulante de monocytes activés nous avons utilisé un système d'analyse de génération de thrombine intégré. La thrombinographie n'a jamais était décrite pour caractériser le rôle de l'IL-10 sur la génération de thrombine par des monocytes activés. Le modèle que nous avons réalisé nous a permis d'observer l'effet de l'IL-10 exogène mais également l'effet de l'IL-10 endogène monocytaire sur la génération de thrombine. Dans ce système, la génération de thrombine est exclusivement initiée par le FT. Nous avons également confirmé la modulation de l'expression du FT par l'IL-10 en analysant l'expression de son ARN et de la protéine FT à localisation membranaire ou à l'état clivé.

#### III.1.2 Matériel et méthode

#### Réactifs

Nos expériences ont nécessité l'utilisation d'IL-10 recombinante humaine (IL-10rh), d'un anticorps monoclonal anti-IL-10 humaine (IgG<sub>2B</sub> de souris, clone 23738) et d'un anticorps monoclonal bloquant anti-récepteur α de l'IL-10 (IL-10Ra) (IgG1 de souris, clone 37607.11). Nous avons utilisé des anticorps de contrôle de même isotype pour valider les expériences. Tous ces anticorps provenaient de chez R&D Systems (Minneapolis, USA). Un anticorps monoclonal bloquant anti-FT (n°4509, American Diagnostica SARL, Neuville sur Oise France), un plasma déficient en facteur VII (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France), du lipopolysaccharide (LPS : Escherichia coli sérotype O55 :B5, Sigma, St Louis, USA), et de l'aprotinine (Sigma, St Quentin Fallavier, France) ont également été employés.

#### Purification des monocytes et culture cellulaire

Les monocytes provenaient de sang total de volontaires sains ayant donné leur consentement éclairé. Ils ont été purifiés par élutriation (217). La pureté et la viabilité des monocytes ont été déterminées respectivement par la numération des cellules marquées par un anticorps anti-CD14 et par un test au bleu Trypan. La viabilité et la pureté étaient respectivement supérieures à 98% et à 95%. Les monocytes ont été mis en culture à la concentration finale de 1.106/mL dans du RPMI-1640 1X sans L-Glutamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté à 5% en sérum de veau fœtale (Invitrogen) et en glutamine à 2 mmol/L (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA). Les monocytes ont été mis en culture 4, 6 ou 24 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO2. Durant leur incubation, ils ont été activés par du LPS à 100 ng/mL. En fonction des expériences, les monocytes pouvaient être pré-incubés 2 heures avec soit de l'IL-10rh (0,1, 1 ou 10 ng/mL), soit un anticorps anti-IL-10 (0,1 ou 1 μg/mL) soit un anticorps anti-IL-10Ra (0,1 ou 1 μg/mL).

## Préparation du plasma nécessaire au test de génération de thrombine

Du sang total de deux volontaires sains a été prélevé sur Monovette® (Citrate à 0,106 mol/L, Sarsted) après avoir recueilli leur consentement éclairé. Le sang a été immédiatement centrifugé deux fois 10 minutes successivement à 190 et 1750g afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquette (PPP). Ce PPP a été lui-même centrifugé 20 minutes à 13000g à 20°C, ce qui a permis d'éliminer toutes les plaquettes, puis il a été conservé à –80°C. Pour les tests de génération de thrombine, ce plasma « déplaquetté » a été supplémenté en aprotinine (218).

#### *Tests de génération de thrombine (TGT)*

Les tests de génération de thrombine ont été effectués sur un lecteur de fluorescence en microplaque (ThermoLabsystems, Helsinki, Finland). Le protocole utilisé était proche de celui décrit par Hemker *et al* (219). Après incubation (6 ou 24 heures) les monocytes ont été remis en suspension et leur concentration a été ajustée à 0,2 10<sup>6</sup> cellules/mL. Dans chaque puits ont été ajoutés 10 μL de suspension cellulaire, 5 μL de tampon HBS (Hepes à 20 mM, NaCl 140 mM, albumine bovine à 0,5%, pH à 7,4), 80 μL de plasma déplaquetté supplémenté en aprotinine (concentration finale à 200 KIU/mL) et 5 μL de phospholipides à 100 μmol/L (concentration finale à 4 μmol/L). Les phospholipides étaient constitués de 20% de phosphatidyl-sérine, 20% de phosphatidyl-éthanolamine et de 60% de phosphatidyl-choline

(Avanti Polar Lipids Inc. Coger, Paris, France). Les plaques de lecture ont été insérées dans le lecteur de fluorescence et incubées 5 minutes à 37°C. Les mesures de fluorescence (390 et 460 nm) ont été effectuées automatiquement après l'ajout de 20 μL d'un mélange composé d'un substrat fluorescent de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 2,5mmol/L, Bachem, Bubendorph, Suisse), de tampon calcique (CaCl<sub>2</sub> 100 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, albumine Bovine à 6% et pH à 7,4). La fluorescence a été mesurée en temps réel à 37°C. A l'aide d'un calibreur de thrombine (Synapse BV, Maastricht, Pays bas) et du logiciel Thrombinoscope<sup>TM</sup> (Synapse BV) les signaux de fluorescence ont été convertis en concentration de thrombine. Chaque dosage a été mesuré dans trois puits et la moyenne de ces trois dosages pour les paramètres d'intérêt (quantité de thrombine générée, temps de latence, pic de génération de thrombine et temps d'obtention du pic de génération de thrombine) a été calculée.

# Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel

Les monocytes ont été incubés dans les mêmes conditions que pour les tests de génération de thrombine. Seuls deux paramètres ont été modifiés : la concentration cellulaire ajustée à 10<sup>6</sup> cellules/mL et les temps d'incubation qui étaient soit de 4 soit de 24 heures. Après incubation les monocytes ont été lavés en PBS (tampon phosphate salin). L'ARN total a été extrait à l'aide du kit Rneasy minikit de Qiagen (Courtaboeuf, France). Le kit TaqMan reverse transcription (PE Applied Biosystems) a permis d'obtenir du cDNA (DNA complémentaire) à partir d'un microgramme d'ARN total, cDNA à partir duquel a été effectué la RT-PCR. La RT-PCR a été réalisée sur le thermocycleur ABI PRISM 7000 SDS à l'aide du kit SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied). La β2-microglobuline, gène exprimé constitutivement par les monocytes, a été choisie comme « gène de ménage » pour contrôler la reproductibilité de chaque dosage. Les amorces sens et anti-sens pour la \(\beta^2\)microglobuline, le FT et l'IL-10 étaient les suivantes : 5'-CCCCACTGAAAAAGATGAG-3' 5'-TCATCCAATCCAAATGCGGC-3' pour la β2-microglobuline, 5'-CCGACGAGATTGTGAAGGATGT-3' et 5'-AGAGGCTCCCCAGCAGAAC-3' pour le FT, 5'-AGGCGCATGTGAACTCCCT-3' et 5'-CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3' pour l'IL-10. Les acquisitions et les analyses des données ont été réalisées avec le logiciel ABI PRISM 7000 SDS

Mesure du facteur tissulaire membranaire des monocytes en cytométrie de flux

Les monocytes ont été incubés 6 ou 24 heures dans les mêmes conditions que pour les tests de génération de thrombine. Cinq cent microlitres de monocytes en suspension (106/mL) ont été incubés 30 minutes à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-FT conjugué à de la phycoérythrine (FT-PE) ou avec un anticorps de contrôle de même isotype IgG<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>-PE) également conjugué à de la phycoérythrine (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France). Après deux lavages au PBS, les fluorescences des échantillons ont été mesurées sur un cytomètre de flux Epics XL-MCL (Coulter Corp., Miami FL, USA) et analysées à l'aide du logiciel System 2. Les intensités moyennes de fluorescence (MnX) ont été mesurées sur 5000 évènements et les résultats ont été exprimés sous forme de ratio (MnX FT-PE/MnX IgG<sub>1</sub>-PE).

## Mesure du facteur tissulaire extra-cellulaire et de l'IL-10 par ELISA

Le FT extra-cellulaire et l'IL-10 ont été mesurés dans les surnageants des milieux de culture. Nous avons utilisé les kits Imubind® Tissue Factor (American Diagnostica, Neuville sur Oise, France) et QUANTIKINE ® (R&D Systems™, USA) respectivement pour les dosages du FT et de l'IL-10. Les détections limites précisées par le fabricant étaient de 10 pg/mL pour le dosage du FT et de 2 pg/mL pour l'IL-10.

## Analyse statistique

Les données obtenues n'ayant pas une distribution gaussienne, l'analyse statistique des différences entre les différents groupes a été réalisée à l'aide de tests non paramétriques : le test de Wilcoxon pour les séries appariées et le test de Mann-Whitney U pour les séries non appariées. Une valeur de p<0,05 a été considérée comme significative.

# III.1.3 Résultats

# III.1.3.1 Article soumis

Regulation of tissue factor trafficking and thrombin generation by a

negative feedback loop involving endogenous IL-10 produced by LPS-

primed monocytes

Running head: Regulation of thrombin generation by IL-10

S. Poitevin, \*‡ E. Cochery-Nouvellon, \*‡ A. Dupont, \* A. Robinet, § and P. Nguyen \*

\* Laboratory of Hematology, CHU Robert Debré, UPRES EA3796 and § Laboratory

of Medical Pharmacology, UPRES EA3801, Faculty of Medicine, University of

ReimsChampagne Ardenne, Reims, France

‡ Both authors contributed equally to this work

# correspondence:

Pr. Philippe Nguyen

Laboratoire Central d'Hématologie

Hôpital Robert Debré

Avenue du Général Koenig

51092 Reims Cedex

France

Phone: 00-33-326783871

Fax: 00-33-326788171

E-mail: pnguyen@chu-reims.fr

Abstract: 246 words

Text: 4512 words

74

#### Introduction

Inflammation and coagulation are closely linked in a variety of diseases such as sepsis, atherosclerosis and inflammatory diseases [1]. Interleukin-10 (IL-10) is a multifunctional cytokine that plays a major role in the limitation of inflammatory responses [2] by inhibiting, in part, a broad spectrum of activated monocyte functions [3]. IL-10 has been shown to down regulate the expression of tissue factor (TF) by monocytes in response to lipopolysaccharide (LPS) and to inhibit procoagulant activity (PCA) in response to LPS and IL-1 [4-7]. TF, the main trigger of coagulation, is a 47-kDa transmembrane glycoprotein and a high affinity receptor for coagulation factor VII/FVII(a) [8]. So far, the techniques used to assess the effect of IL-10 on PCA were all based on the measurement of coagulation times. These methods give a partial view of the thrombin generation process since they are not sensitive to the presence of physiological antithrombins. The present study was designed to explore the time course of thrombin generation triggered by LPS-primed monocytes and the effects of exogenous and endogenous IL-10. Indeed, the role of IL-10 on the kinetics of thrombin generation has, so far, never been directly demonstrated. We have thus used a fluorogenic method [9, 10] to measure thrombin generation supported by highly purified human monocytes [11] in a contact pathway-inhibited system [12].

We found that LPS-primed monocytes induced a TF-dependent thrombin generation. Recombinant human IL-10 significantly slowed down the burst of thrombin generation. Conversely, the inhibition of endogenous IL-10 produced by LPS-primed monocytes accelerated the burst of thrombin and increased the amount of generated thrombin. These effects are explained by an up-regulation of TF expression and release. IL-10 may therefore be a major regulator of thrombin generation through its effects on TF trafficking.

#### Materials and methods

#### Materials

Recombinant human IL-10 (rhIL-10), anti human IL-10 monoclonal antibody (mouse  $IgG_{2b}$ , clone 23738), anti human receptor alpha to IL-10 (IL-10 R $\alpha$ ) monoclonal antibody (mouse  $IgG_1$ , clone 37607.11) and isotype-matched antibodies were obtained from R&D Systems (Minneapolis, USA). TF inhibitory monoclonal antibody (no 4509) was purchased from American Diagnostica SARL (Neuville sur Oise, France). FVII deficient Plasma was from

Diagnostiga Stago (Asnières sur Seine, France). Lipopolysaccharide (LPS: Escherichia coli serotype O55:B5) and aprotinin were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

#### Monocyte purification and cell culture

Monocytes were elutriated from whole blood [11]. Blood was obtained from healthy volunteers after informed consent. The purity of monocyte preparations, assessed by the number of CD14 positive cells, was higher than 95%. Cell viability, assessed by trypan blue exclusion test, was higher than 98%. Monocytes were washed in RPMI-1640 1X without L-glutamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and resuspended in RPMI-1640 supplemented with 5% heat-inactivated foetal calf serum (Invitrogen) and 2 mmol L<sup>-1</sup> glutamine (Sigma). Monocytes were activated by LPS 100 ng mL<sup>-1</sup> and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In some experiments, monocytes were incubated for 2 hours with rhIL-10, anti IL-10 or anti IL-10 Rα prior stimulation with LPS.

#### Blood collection and plasma preparation

Platelet free plasma (PFP) was obtained from one single healthy volunteer after informed consent. For this, whole blood was withdrawn by antecubital venipuncture into Monovette<sup>®</sup> tubes (0.106 mol L<sup>-1</sup> citrate, Sarsted,). PFP was prepared immediately after blood collection using a 3-step centrifugation procedure: 10 minutes at 190g, 10 minutes at 1750g, then 30 minutes at 13000g. PFP was stored at -80°C. For thrombin generation assay, PFP were thawed and supplemented with aprotinin for final concentration of 200 kallikrein inhibitory units per milliliter (KIU mL<sup>-1</sup>) [12].

## Fluorogenic measurement of thrombin generation

Monocytes (1.10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>) were incubated 6 and 24h at 37°C, then adjusted at the concentration of 0.2.10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> with RPMI-1640 on ice. Thrombin generation assay was performed according to Hemker *et al.* [9, 10] with minor modifications. Briefly, 10 μL of cell suspension, 80 μL of aprotinin-supplemented PFP and 5 μL of phospholipids 100 μmol L<sup>-1</sup> (20% phosphatidyl-choline, 20% phosphatidyl-ethanolamine, 60% phosphatidyl-serine) [Avanti Polar Lipids Inc. Coger, Paris, France] were added in each well of a 96-well plates. The fluorometric measurements (Fluoroskan Ascent plate reader, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) were performed after automated addition of fluorogenic substrate Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Bubendorph, Switzerland). For each condition, thrombin generation

lag time (min) and thrombin peak (nmol  $L^{-1}$ ) were the mean values calculated from three replicates by the Thrombinoscope<sup>TM</sup> software (Synapse BV, Maastricht, The Netherlands). To determine the specificity of thrombin generation trigger by TF, FVII deficient plasma supplemented with aprotinin was used. In addition monocytes activated by LPS during 6h were incubated at 4°C in presence of inhibitory monoclonal antibody to TF or isotype control (IgG<sub>1</sub>) during 1 hour prior thrombin generation assay.

#### RNA extraction and real-time RT-PCR

Monocytes were incubated at 1.5 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> and treated as described above. Total RNA was extracted using Rneasy minikit<sup>TM</sup> (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA (1 μg) was reverse transcribed (TaqMan reverse transcription kit<sup>TM</sup>, PE Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). The cDNAs were then subjected to real-time RT-PCR with Sybr Green PCR core reagents. The PCRs were carried out in an ABI Prism 7000 sequence detector (PE Applied Biosystems), with the thermal cycle conditions suggested by the manufacturer. Forward and reverse oligonucleotide primers were as follows:β<sub>2</sub>-microglobulin: CCCCCACTGAAAAAGATGAG-3' and 5'-TCATCCAATCCAAATGCGGC-3'; TF: 5'-CCGACGAGATTGTGAAGGATGT-3' and 5'-AGAGGCTCCCCAGCAGAAC-3'; IL-10 5'-AGGCGCATGTGAACTCCCT-3' and 5'-CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3'. Data were acquired and analyzed with the 7000 System SDS software. The transcript for the constitutive gene product  $\beta_2$ -microglobulin was used for data normalization.

# Measurement of membrane-bound TF by flow cytometry

Monocytes (0.5.10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>) were incubated with 10 μL of anti-TF phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody or IgG<sub>1</sub>-PE isotype control (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) for 30 min at 4°C. After washing twice with PBS, samples were acquired on a Epics XL-MCL flow cytometer (Coulter Corp., Miami FL, USA) using System 2 software. Mean fluorescent intensity (MnX) of 5000 events count was recordered and results are expressed as ratio between MnX FT-PE and MnX IgG<sub>1</sub>-PE.

#### Measurement of extracellular TF and IL-10 by ELISA

TF and IL-10 were measured in conditioned media obtained from monocytes after LPS priming. TF and IL-10 were assayed according to the manufacturer's recommendations, using commercial kits from American Diagnostica (Neuville sur Oise, France) and R&D Systems

(Minneapolis, USA) respectively (lower detection limits are 10 pg mL<sup>-1</sup> for TF and 2 pg mL<sup>-1</sup> for IL-10).

#### Statistical analysis

Data are represented as means  $\pm$  SEM or box plots. In a box plot, the central box represents the values from lower to upper quartile (25 to 75 percentile) and the middle line represents the median. A line extends from the minimum to maximum value, excluding outside and far out values which are displayed as separate points. Because the data obtained had a non-Gaussian distribution, statistical differences between groups were evaluated using non parametric methods. Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney U test were performed respectively on paired and unpaired samples. A p value <0.05 was regarded as significant.

#### Results

Time course of Tissue Factor and IL-10 expression by primary human monocytes in response to lipopolysaccharide

We first studied the time course of TF and IL-10 expression by primary human monocytes in response to LPS. At 4 hours, a significant induction of TF mRNA was observed in LPS-stimulated monocytes (median: 52.3 fold when compared to control, p< 0.01, n = 9). In LPS-primed monocytes, at 24 hours, median value of TF mRNA was equivalent to basal expression (*i.e.* at 4 and 24 hours, in the absence of LPS). Twenty four hour-LPS-primed monocytes showed a significantly TF mRNA decrease (p<0.05) compared to 4 hour-LPS-primed monocytes (Fig. 1a).

In parallel, we determined the level of IL-10 expression in the same conditions. In response to LPS, IL-10 mRNA significantly increased by 12.9 fold (median) at 4 hours and by 3.1 fold (median) at 24 hours when compared with controls (Fig. 2a). In addition, IL-10 mRNA significantly decreased in LPS-stimulated monocytes at 24 hours compared with 4 hours (p< 0.05, n = 7). In conditioned media obtained from a 24 hour-monocyte culture, IL-10 was under the limit of detection of the ELISA assay ( $< 2 \text{ pg mL}^{-1}$ ). After an incubation of 24 h

with LPS, IL-10 was present in the conditioned media (median = 267.0 pg mL<sup>-1</sup>, n = 7, p< 0.05) (Fig. 2b).

Thrombin generation triggered by LPS-primed monocytes in the calibrated fluorogenic assay.

We next determined the time course of thrombin generation supported by non activated and LPS-primed monocytes. Unstimulated (control) monocytes incubated for 6 hours at  $37^{\circ}$ C exhibited a late and low thrombin generation [Lagtime Time =  $47.0 \pm 6.9$  min, peak =  $14.8 \pm 6.7$  nmol L<sup>-1</sup>, mean  $\pm$  SEM, n = 7]. Six hour-LPS-activated monocytes supported a significantly more rapid and higher thrombin generation (Fig. 3a and table 1). After a 24 hours incubation, unstimulated monocytes supported a comparable thrombin generation when compared with a 6 hour-incubation. At 24 hours, LPS-primed monocytes supported a thrombin generation slower and lower thrombin generation when compared with 6 hours, although statistical significance was not obtained (Table 1).

To determine the specificity of thrombin generation triggered by TF-bearing monocytes, we used inhibitory monoclonal antibody to TF and FVII deficient plasma in this assay. We confirmed that of thrombin generation, triggered by LPS-primed monocytes, was inhibited by neutralizing mAb directed against TF. Furthermore, no thrombin generation was measured in FVII deficient plasma (Fig. 3b).

#### RhIL-10 down regulates thrombin generation triggered by LPS-primed monocytes

We observed that rh-IL-10 inhibited thrombin generation in a dose-dependent manner. Figure 4a presents a typical thrombogram out of 7 independent experiments. The effect of rhIL-10 on LT and thrombin peak was visible at all tested concentrations (0.1 ng mL<sup>-1</sup>) (Fig. 4b and 4c). LT progressively increased with rhIL-10 concentrations according to a dose-ranging effect (10.4  $\pm$  2.8, 24.6  $\pm$  6.9 \* and 42.1  $\pm$  6.5 \* min for respectively IL-10 0.1, 1 and 10 ng mL<sup>-1</sup>, mean  $\pm$  SEM, n = 7, \*p < 0.05 *versus* control). In a comparable manner, we noticed that the peak of thrombin generation was significantly and dose-dependently decreased (Fig. 4c).

Inhibition of endogenous IL-10 up-regulates the expression and release of TF and increases thrombin generation

As IL-10 is produced by monocytes in response to LPS, we evaluated the effect of endogenous IL-10 on TF expression. For this, we used neutralizing monoclonal antibodies 79 directed against IL-10 receptor  $\alpha$  (anti-IL-10R $\alpha$ ) or IL-10 [13, 14]. When IL-10R $\alpha$  was

blocked, TF mRNA production in response to LPS (Fig. 5a) and membrane-bound TF were increased (Fig. 5b and 5c). In parallel, TF shedding was significantly increased when IL- $10R\alpha$  or IL-10 bioactivity were neutralized (Fig. 6).

We next evaluated the effects of IL-10R $\alpha$  and endogenous IL-10 neutralization on thrombin generation supported by LPS-primed monocytes (Fig 7). The effect of anti-IL-10 mAb on thrombin generation was visible at 1 µg mL<sup>-1</sup> with a significant decrease of LT in comparison to IgG<sub>2b</sub> control (LT: 7.1  $\pm$  1.1 \* *versus* 12.9  $\pm$  4.9 min, mean  $\pm$  SEM, n = 7, \* p< 0.05). A weak increase of thrombin peak was observed in the presence of anti IL-10 at the highest tested concentration. On the contrary, anti IL-10R $\alpha$  mAb decreased the LT at 0.1 and 1 µg mL<sup>-1</sup> (respectively 7.2  $\pm$  0.1 \* and 4.7  $\pm$  0.3 \* *versus* 12.4  $\pm$  3.1 min for IgG<sub>1</sub>control, mean  $\pm$  SEM, n = 7, \* p< 0.05). In addition, anti IL-10R $\alpha$  (1 µg mL<sup>-1</sup>) increased significantly the thrombin peak (136.1  $\pm$  21.4 \* nmol L<sup>-1</sup> compared to 52.6  $\pm$  16.7 nmol L<sup>-1</sup> for IgG<sub>1</sub>control, \* p< 0.05).

#### **Discussion**

In the present study, we explored the effect of IL-10 on the kinetics of TF expression and thrombin generation supported by LPS-primed monocytes. We first studied the time course of TF and IL-10 expression by primary human monocytes in response to LPS. This approach using highly purified human monocytes in the absence of residual platelets has never been reported so far. PCR, flow cytometry and ELISA experiments demonstrated that TF and IL-10 are co-expressed in monocytes in response to LPS. This is consistent with several previous studies [15-18]. Furthermore, a membrane-bound TF shedding was observed between 6 and 24 hours. This extracellular TF could be bound to microparticles as monocytes undergo a process of membrane microvesiculation in response to LPS [19, 20].

In order to measure with a high accuracy the kinetics of thrombin generation, we adapted a fluorogenic method [9, 10] by adding aprotinin in PFP to inhibit contact factor pathway [12]. To the best of our knowledge, we demonstrated for the first time, by this method, that LPS-stimulated monocytes during 6 hours supported a rapid and an important thrombin generation as shown by the determination of the lag time and the thrombin peak. On the contrary, in the absence of LPS-priming of monocytes, we observed a very low and delayed thrombin generation. We demonstrated that thrombin generation is triggered by TF and its exclusive ligand FVII(a). At 24 hours extracellular TF, resulting of a shedding process, is mainly

responsible of thrombin generation since very low TF antigen was present at the surface of monocytes.

As it was demonstrated earlier that rhIL-10 could block LPS-induced procoagulant activity of monocytes in whole blood and TF expression [21-23], we studied the effect of rhIL-10 on thrombin generation. Indeed, recombinant human IL-10 increased the LT of thrombin generation supported by LPS-primed monocytes in a dose-dependent manner whereas decreased the peak of thrombin generated. In parallel, we observed that LPS induced IL-10 production by elutriated monocytes, which is in agreement with published data [15, 16]. Thus, we blocked the bioactivities of IL-10 and subsequently, we observed that endogenous IL-10 down regulated thrombin generation. We hypothesized that this effect is mediated by the inhibition of a microvesiculation process which could inhibit the liberation of TF produced early by LPS-stimulated monocytes. To our knowledge, this is the first time that endogenous IL-10 is shown to down-regulate TF expression and shedding in LPS-stimulated monocytes. The effect of IL-10 on the trafficking of TF remains poorly understood. It was recently shown that prolonged incubation with IL-10 (up to 96 hours) induced a time- and dose-dependent decrease of TF mRNA expressed in the absence of agonists by adherent monocytes in culture [24]. In these conditions IL-10 increased membrane-bound TF whereas PCA was reduced. In their model, these authors showed that IL-10 increased membrane-bound TFPI-1 (TF pathway inhibitor-1). Therefore, they hypothesized that this parallel increase of membrane TF and TFPI-1 may explain the decrease of PCA, suggesting that rhIL-10 down regulates the clearance of TF/TFPI-1 complexes. In our model, monocytes do not express TF mRNA and protein after 24 hours in the absence of LPS stimulation. These differences may be explained by differences in cell separation and culture methods (plastic adhesion versus LPS stimulation in suspension). In the present study, we did not focus on TFPI-1 expression since there is a clear correlation between the decrease of TF mRNA, TF membrane-bound antigen (data not shown) and thrombin generation when monocytes where incubated with rhIL-10 and stimulated by LPS. However, we previously reported that TFPI-1 is constitutively expressed by elutriated monocytes in a LPS-independent manner [11]. Our interpretation is that IL-10 exert an inhibition on TF shedding. This could also explain the results of Paysant et al. who did not explore this aspect. The mechanisms which are proposed to explain the role of IL-10 on TF expression involve a participation of ERK1/2, MEK-1/2 and Elk-1, leading to a reduced activation of the serum response element 3 within the promoter of Egr-1, this latter playing a central role in the transcription of TF [25]. On the contrary, the effect of IL-19 on microvesiculation is so far unknown.

Taken together, our results show that thrombin generation, as allowed by thrombinography, is thus a promising tool to study global TF activity at both cell membrane and extracellular levels and to determine the rate of thrombin produced in conditions close to physiology. We have recently demonstrated that thrombinography, triggered by rTF in a platelet rich plasma allowed to screen patients with thrombophilia [26]. In addition, we have shown that IL-10 polymorphisms could determine a risk factor of deep venous thrombosis [27]. It was also demonstrated that IL-10 polymorphisms could play a role in recurrent loss pregnancies [28]. Here, we show that endogenous IL-10 produced by LPS-stimulated monocytes plays an important role in the limitation of thrombin generation by decreasing TF expression and TF membrane-bound shedding. These data might explain how IL-10 contributes to reduce coagulation and inflammation during the atherosclerosic and thrombotic processes associated in part to IL-10 polymorphisms.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Pr Thomas Lecompte and Dr Véronique Regnault for stimulating discussion on thrombinography. We are indebted to Dr Jean Jacques Huart and Dr Eric Toulemonde to provide us leukopheresis preparations.

We thank Catherine Macé and Marie-Geneviève Remy for technical assistance.

#### References

- Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005; **131:** 417-30.
- 2 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; **170**: 2081-95.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19:** 683-765.
- 4 Pradier O, Gerard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1993; **23:** 2700-3.
- Jungi TW, Brcic M, Eperon S, Albrecht S. Transforming growth factor-beta an \$2 interleukin-10, but not interleukin-4, down-regulate procoagulant activity and tissue

- factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Thromb Res* 1994; **76:** 463-74.
- Osnes LT, Westvik AB, Joo GB, Okkenhaug C, Kierulf P. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine* 1996; **8:** 822-7.
- Tindmark E, Tenno T, Chen J, Siegbahn A. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br J Haematol* 1998; **102:** 597-604.
- 8 Fair DS, MacDonald MJ. Cooperative interaction between factor VII and cell surface-expressed tissue factor. *J Biol Chem* 1987; **262:** 11692-8.
- 9 Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000; **83:** 589-91.
- Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; **32:** 249-53.
- Nguyen P, Broussas M, Cornillet-Lefebvre P, Potron G. Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide. *Transfusion* 1999; **39:** 975-82.
- Tanaka KA, Szlam F, Katori N, Vega JD, Levy JH. Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic activation in vitro. *Thromb Res* 2004; **113:** 333-9.
- Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, Fong S, Lowe D, Min HY, Lin L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992; **148**: 808-14.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991; **173:** 507-10.
- Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997; **349:** 1912-3.
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW.
   Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad 83* Sci USA 1998; 95: 9465-70.

- Meszaros K, Aberle S, Dedrick R, Machovich R, Horwitz A, Birr C, Theofan G, Parent JB. Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS): dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 1994; **83:** 2516-25.
- van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbolester. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; **5:** 211-20.
- 19 Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; **153**: 3245-55.
- Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; **103**: 4545-53.
- Warnes G, Biggerstaff JP, Francis JL. Monocyte B7 and Sialyl Lewis X modulates the efficacy of IL-10 down-regulation of LPS-induced monocyte tissue factor in whole blood. *Br J Haematol* 1998; **102:** 588-96.
- 22 Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Ternisien C, Bridey F, de Prost D. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced tissue factor mRNA production by human monocytes. *FEBS Lett* 1993; **334:** 114-6.
- Ernofsson M, Tenno T, Siegbahn A. Inhibition of tissue factor surface expression in human peripheral blood monocytes exposed to cytokines. *Br J Haematol* 1996; **95**: 249-57.
- Paysant J, Soria C, Cornillet-Lefebvre P, Nguyen P, Lenormand B, Mishal Z, Vannier JP, Vasse M. Long-term incubation with IL-4 and IL-10 oppositely modifies procoagulant activity of monocytes and modulates the surface expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Br J Haematol* 2005; **131**: 356-65.
- Kamimura M, Viedt C, Dalpke A, Rosenfeld ME, Mackman N, Cohen DM, Blessing E, Preusch M, Weber CM, Kreuzer J, Katus HA, Bea F. Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. *Circ Res* 2005; **97**: 305-13.

- Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem* 2006; **52:** 665-70.
- Cochery-Nouvellon E, Vitry F, Cornillet-Lefebvre P, Hezard N, Gillot L, Nguyen P. Interleukin-10 promoter polymorphism and venous thrombosis. A case-control study. *Thromb Haemost* 2006; **96:** 24-8.
- 28 Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi-Fard B, Sarvari J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Reprod Immunol* 2005; **65:** 171-8.

- **Fig. 1.** Time course of TF expression and shedding in LPS-primed monocytes. Cells were cultured for 4, 6 and 24 hours in the presence of vehicle (control) or LPS (100 ng mL<sup>-1</sup>). (a) TF mRNA expression was quantified using real-time PCR reactions. Data are expressed as a fold induction versus control. (b, c) Membrane-bound TF antigen was determined by flow cytometry. Fig. 1b shows a representative histogram of monocyte TF expression in comparison with  $IgG_1$ -PE isotypic control (shaded gray). In fig. 2b, results are expressed as a ratio: TF-PE /  $IgG_1$ -PE. (d) Extracellular TF in conditioned media was quantified by ELISA. Box blots and mean  $\pm$  1 SEM were obtained from 7 to 12 independent experiments. \*, p < 0.05 and \*\*\*, p < 0.001 (Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney U test respectively on paired and unpaired samples).
- **Fig. 2.** Endogenous IL-10 production by LPS-primed monocytes. (a) Monocytes were cultured for 4 and 24 hours in the presence of vehicle (control) or LPS (100 ng mL<sup>-1</sup>). IL-10 mRNA expression was quantified using real-time PCR reactions. Results were normalised for β<sub>2</sub>-microglobulin expression. (b) ELISA of IL-10 in conditioned media of monocytes cultured for 24 hours in the presence of vehicle (control) or LPS (100 ng mL<sup>-1</sup>). Box blots were obtained from 7 independent experiments. \*, p < 0.05, Wilcoxon signed rank test.
- **Fig. 3.** Kinetic of thrombin generation triggered by monocytes. (a) Cells were cultured for 6 and 24 hours in the presence of vehicle (control) or LPS (100 ng mL<sup>-1</sup>). (b) Effect of neutralising antibody to TF and FVII deficient plasma (VII def) on thrombin generation triggered by LPS-primed monocytes (see Materials and Methods). Thrombograms are representative of at least three independent experiments.
- **Fig. 4.** Effect of rhIL-10 on thrombin generation supported by LPS-primed monocytes. Cells were pre-incubated for 2 hours in the presence of vehicle (control) or rhIL-10 (0.1, 1, and 10 ng mL<sup>-1</sup>), and then stimulated by LPS 100 ng mL<sup>-1</sup> for 6 hours. (a) Representative thrombograms out of seven independent experiments. (b, c) Lagtime and thrombin peak; mean  $\pm$  1 SEM of 7 independent experiments.\*, p < 0.05 (Wilcoxon signed rank test).
- **Fig. 5.** Neutralisation of IL-10R $\alpha$  increases TF expression in LPS primed monocytes. (a) TF mRNA expression: results were normalised for  $\beta_2$ -microglobulin expression and were expressed as a fold induction versus control [box blots of 7 independent experiments]. (b,86)

Membrane-bound TF antigen determined by flow cytometry on monocytes incubated as described above (IgG<sub>1</sub> or anti IL-10R $\alpha$  at 1 µg mL<sup>-1</sup>) and then stimulated with LPS 100 ng mL<sup>-1</sup> for 24 hours. Fig. 5b shows a representative histogram out of seven independent experiments. In fig. 5c, results are expressed as a ratio: TF-PE / IgG<sub>1</sub>-PE, mean  $\pm$  1 SEM.\*, p < 0.05 (Wilcoxon signed rank test).

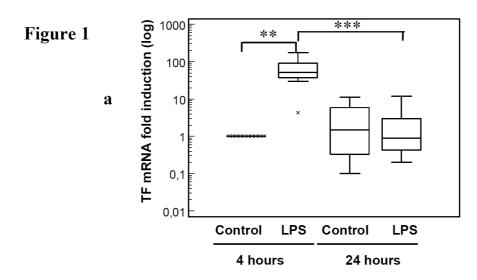
**Fig. 6.** Neutralisation of IL-10 and IL-10R $\alpha$  increases TF release by LPS-primed monocytes. Extracellular TF in conditioned media was quantified by ELISA. Mean  $\pm$  1 SEM were calculated from 7 to 9 independent experiments. \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01, Wilcoxon signed rank test.

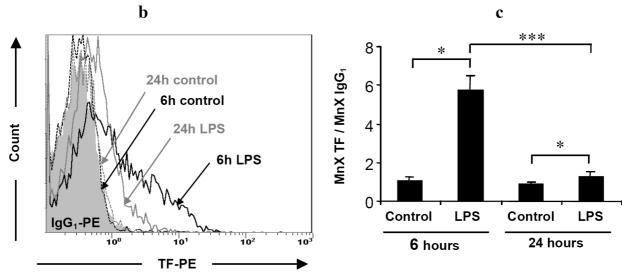
**Fig. 7.** Neutralisation of IL-10 and IL-10R $\alpha$  increases kinetic of thrombin generation supported by LPS-primed monocytes. (a) Representative thrombograms out of seven independent experiments. (b, c) Lagtime and thrombin peak; mean  $\pm$  1 SEM of 7 independent experiments.\*, p < 0.05, Wilcoxon signed rank test.

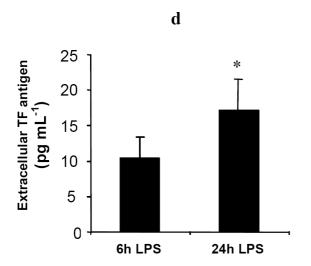
Table 1 Kinetics of thrombin generation triggered by monocytes

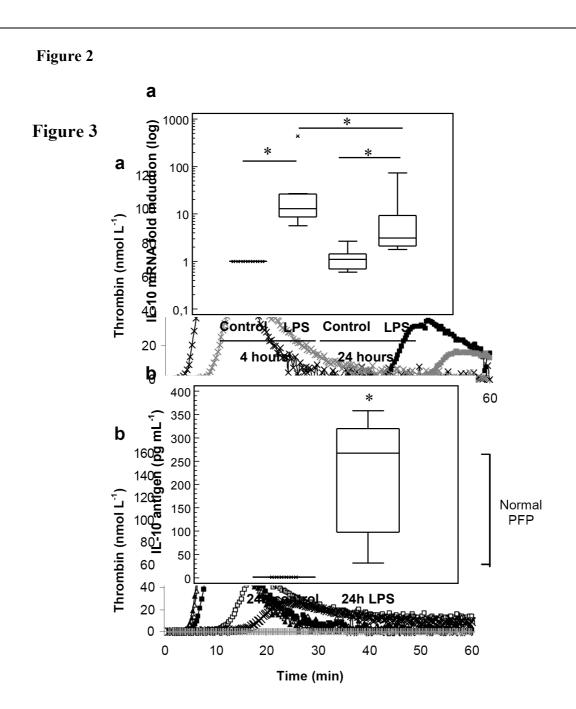
	6 hours		24 hours	
	Control	LPS (100 ng mL <sup>-1</sup> )	Control	LPS (100 ng mL <sup>-1</sup> )
Lagtime	$47.0 \pm 6.9$	7.5 ± 1.4 *	$49.0 \pm 5.8$	10.9 ± 3.0 *
Thrombin peak (nmol L <sup>-1</sup> )	$14.8 \pm 6.7$	82.9 ± 27.3 *	$15.3 \pm 8.3$	53.1 ± 8.1 *

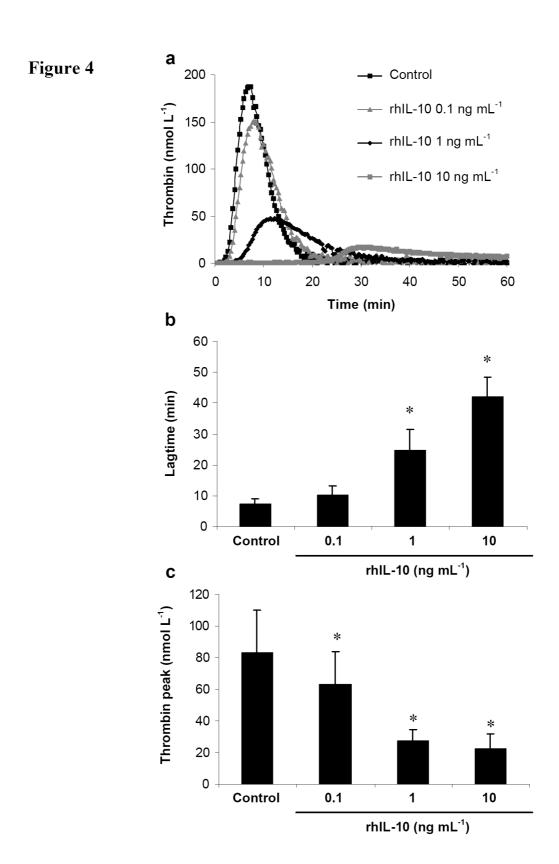
Monocytes were prepared as described in *Materials and Methods*. Lagtime and thrombin peak are expressed as a mean  $\pm$  1 SEM calculated from independent experiments.\*, p < 0.05, Wilcoxon signed rank test.











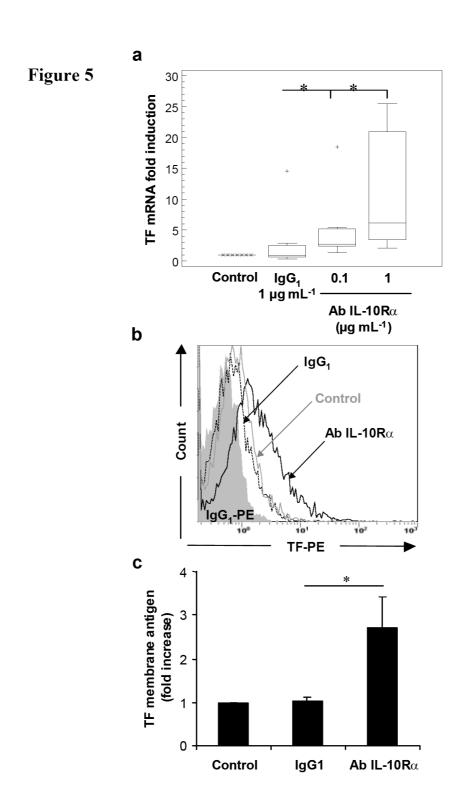


Figure 6

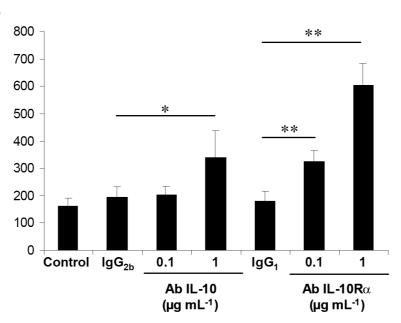
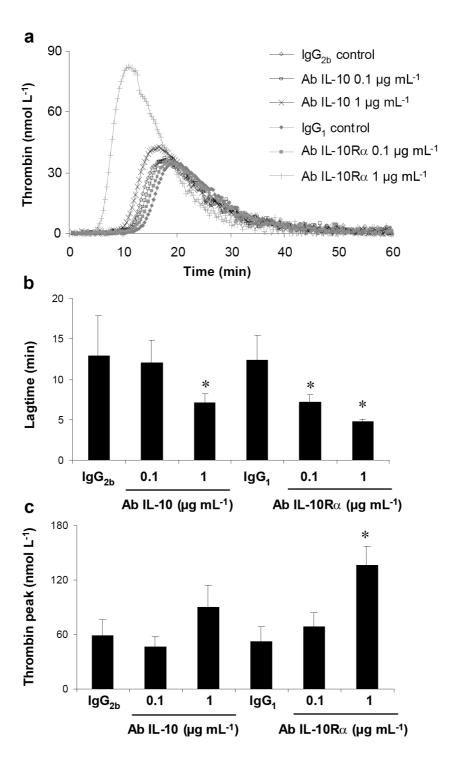


Figure 7



#### III.1.3.2 Principaux résultats

Cinétique d'expression du facteur tissulaire et de l'IL-10 par les monocytes stimulés par le LPS

Nous avons déterminé quantitativement l'ARN messager (ARNm) du FT à 4 et 24 heures d'incubation en présence ou non de LPS. La reproductibilité de chaque dosage a été vérifiée par l'amplification simultanée du gène de la β2 microglobuline (gène de ménage). En absence de stimulation par le LPS (état basal), la synthèse d'ARNm du FT mesurée après 4 ou 24 heures d'incubation était peu significative. En présence de LPS et après 4 heures d'incubation, la synthèse d'ARNm du FT mesurée était 52,3 fois plus fortement stimulée qu'en absence de LPS (p<0,01, n=9) (Article, Figure 1a). En présence de LPS et après 24 heures d'incubation, la synthèse d'ARNm était redevenue équivalente à celle observée à l'état basal (culture en absence de LPS) (Article, Figure 1a). Nous avons déterminé quantitativement l'ARNm de l'IL-10 à 4 et 24 heures d'incubation en présence ou non de LPS (Article, Figure 2a). En absence de LPS, à 4 et 24 heures d'incubation la synthèse d'IL-10 était peu stimulée (Article, Figure 2a). En revanche en présence de LPS, la synthèse d'ARNm de l'IL-10 était fortement stimulée par rapport à l'état basal (culture en absence de LPS) à 4 et à 24 heures. La synthèse d'ARNm était encore mesurable après 24 heures d'incubation en présence de LPS, on observait cependant une diminution significative d'ARNm de l'IL-10 entre 4 et 24 heures d'incubation en présence de LPS (p<0,05 ; n=7). Les cinétiques de synthèse d'ARNm du FT et de l'IL-10 étaient donc décalées dans le temps, la synthèse d'ARNm de l'IL-10 étant encore effective après 24 heures de culture contrairement à celle du FT.

Nous avons déterminé par cytométrie de flux l'expression de facteur tissulaire membranaire exprimé par des monocytes après 6 ou 24 heures d'incubation en absence ou en présence de LPS. Après 6 ou 24 heures d'incubation en absence de LPS, on ne mesurait pas de FT sur la membrane des monocytes (**Article, Figure 1b et 1c**). Après 6 heures d'incubation en présence de LPS, on observait une augmentation significative de l'expression du FT membranaire. Toujours en présence de LPS mais après 24 heures d'incubation, l'expression membranaire du FT avait considérablement diminué. En parallèle on a mesuré par technique ELISA le FT dans le surnageant des milieux de culture (**Article, Figure 1d**). Le taux de FT mesuré à 24 heures était significativement plus élevé que celui mesuré à 6 heures (172±43 pg/mL versus 104±30 pg/mL; moyenne±erreur standard à la moyenne, n=6,

p<0,05). Entre 6 et 24 heures de culture en présence de LPS, on observait en parallèle une diminution de FT membranaire concomitante à une augmentation de FT dans le surnageant.

Après 24 heures d'incubation en absence ou en présence de LPS, des dosages d'IL-10 ont été effectués dans le surnageant des milieux de culture par technique ELISA (**Article, Figure 2b**). En absence de LPS, les taux d'IL-10 se situaient en dessous de la limite de détection du kit (<2 pg/mL), ces taux devenaient significativement détectables en présence de LPS (médiane=267 pg/mL; n=7; p<0,05).

Génération de thrombine par des monocytes stimulés par du LPS, mesure par un test fluorescent calibré

Nous avons ensuite mesuré des générations de thrombine induites par des monocytes stimulés ou non par du LPS (100ng/mL) après 6 ou 24 heures d'incubation. Des mesures de fluorescence en continu ont permis d'obtenir une cinétique de concentrations de thrombine grâce au lecteur de plaque Fluoroscan® et à son logiciel Thrombinoscope®. Nous avons ajouté de l'aprotinine à nos réactifs afin de rendre la génération de thrombine indépendante de la voie intrinsèque.

En absence de LPS, après une incubation de 6 heures ou 24 heures, les générations de thrombine étaient tardives et faibles (**Article, Figure 3a**). Aux même temps d'incubation, mais en présence de LPS, la génération de thrombine induite par les monocytes stimulés était significativement plus rapide et plus élevée. La génération de thrombine observée après 6 heures d'incubation en présence de LPS était plus importante et plus rapide que celle observée après 24 heures d'incubation (**Article, Tableau I**).

Nous avons confirmé que la génération de thrombine observée était bien dépendante du FT monocytaire. Pour cela nous avons fait des générations de thrombine à partir de monocytes incubés 6 heures en présence de LPS. Les expériences ont été réalisées en présence soit d'anticorps neutralisant anti-FT, soit de plasma déficient en facteur VII de la coagulation (**Article, Figure 3b**). La génération de thrombine était inhibée par les anticorps anti-FT de façon dose-dépendante. Aucune génération de thrombine n'était obtenue en présence de plasma déficient en facteur VII.

L'interleukine 10 humaine recombinante (IL-10rh) régule la génération de thrombine induite par les monocytes stimulés par du LPS.

Les monocytes ont été préincubés 2 heures en présence d'IL-10rh avant d'être stimulés 6 heures par du LPS (100 ng/mL). L'IL-10rh a été testée à trois doses : 0,1, 1 et 10 ng/mL.

Chaque expérience a été effectuée trois fois pour des monocytes d'un même donneur. Au total nous avons testé les monocytes de 7 donneurs différents (**Article, Figure 4a,b,c**). Le temps de latence, temps au bout duquel apparaissent les premières traces de thrombine, était augmenté de façon dose dépendante en présence d'IL-10rh ( $10,4\pm2,8,\ 24,6\pm6,9,\$ et  $42,1\pm6,5$  minutes) respectivement pour les doses de  $0,1,\ 1$  et 10 ng/mL d'IL-10rh (n=7; p<0,05). On observait également que cette cytokine diminuait le pic maximal de thrombine générée de façon dose dépendante. L'IL-10rh modifiait la cinétique de la génération de thrombine de notre modèle.

L'inhibition de l'IL-10 endogène monocytaire induit une augmentation de l'expression du FT membranaire, du FT dans le surnageant des milieux de culture et de la génération de thrombine

Nous avons ensuite évalué, indirectement, l'effet de l'IL-10 endogène sur l'inhibition de l'expression de l'ARNm du FT, sur l'expression du FT à la membrane de monocytes stimulés par du LPS (100 ng/mL) et sur son « délestage » de la membrane. Nous avons également observé son effet sur la génération de thrombine induite par des monocytes stimulés par du LPS. Pour cela nous avons utilisé des anticorps neutralisants dirigés contre le récepteur α de l'IL-10 (anti-IL-10Ra) et des anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-10 humaine (IL-10h). Ces deux anticorps ont été testés à deux doses : 0,1 et 1 μg/mL. Chacune des expériences a été validée par des anticorps de contrôle de même isotype (voir matériel et méthode). Les monocytes ont été préincubés deux heures en présence de chacun des anticorps avant d'être incubés 24 heures en présence de LPS. Chacune des conditions expérimentales a été testée sept fois indépendamment à partir des monocytes de 7 donneurs différents.

Les résultats des PCR quantitatives en temps réel ont été normalisés par l'analyse simultanée de l'expression du gène de la β2 microglobuline. Les résultats ont été exprimés en augmentation d'induction de l'expression par rapport à un contrôle. Le contrôle utilisé était constitué de monocytes non stimulés incubés 24 heures.

L'incubation des monocytes stimulés en présence d'anticorps anti-IL-10Ra augmentait l'expression de l'ARNm du FT aux deux doses testées par rapport au contrôle (monocytes non stimulés) et par rapport à l'incubation en présence de l'anticorps de contrôle et de LPS (**Article, Figure 5a**). De plus, chez les monocytes stimulés, l'incubation en présence des anticorps anti IL-10Ra (1 µg/mL) accroissait l'expression du FT membranaire par rapport à l'incubation en présence de l'anticorps de contrôle (**Article, Figure 5b,c**). Les taux de FT dosés dans le surnageant des milieux de culture de monocytes activés par du LPS étaient

significativement plus élevés lorsque les monocytes étaient préincubés avec des anticorps anti- IL-10Ra (0,1 et 1  $\mu$ g/mL) ou anti-Il-10h (1  $\mu$ g/mL) plutôt qu'avec les anticorps contrôle de même isotype (**Article, Figure 6**).

Nous avons ensuite observé les effets de l'incubation avec les anticorps anti-IL-10Ra et anti-IL10h sur la génération de thrombine induite par des monocytes stimulés par du LPS (**Article, Figure 7**). Les anticorps ont été testés à deux doses : 0,1 et 1  $\mu$ g/mL. On pouvait observer une diminution du temps de latence (temps de latence : IL-10rh 1  $\mu$ g/mL 7,1 $\pm$ 1,1 $^*$  versus contrôle isotypique 12,9 $\pm$ 4,9 $^*$  minutes, n=7,  $^*$ p<0,05) et une augmentation du pic de thrombine. Ces modifications semblaient doses-dépendantes bien que non significatives statistiquement. Concernant l'anticorps anti-IL-10Ra, une diminution significative du temps de latence était obtenue aux deux concentrations testées (7,2 $\pm$ 0,1 et 4,7 $\pm$ 0,3 minutes respectivement à 0,1 et 1  $\mu$ g/mL versus 12,4 $\pm$ 3,1 minutes pour le contrôle IgG<sub>1</sub>). De plus l'incubation avec l'anticorps anti-IL-10Ra à la dose de 1  $\mu$ g/mL augmentait significativement le pic maximal de thrombine par rapport au contrôle IgG1 (136,1+21,4 $^*$  versus 52,6+16,7 nmol/L, n=7, p<0,05).

#### **III.1.4 Discussion**

L'objectif de notre étude était de montrer l'effet de l'IL-10 sur l'expression du FT par des monocytes stimulés par le LPS et d'observer l'impact de cette cytokine sur la génération de thrombine induite par ces mêmes monocytes. Les suspensions de monocytes ainsi que le plasma utilisés au cours de cette étude étaient caractérisés par l'absence de résidus plaquettaires. Ceci a permis d'obtenir des activations cellulaires et notamment une induction de l'expression du FT indépendante des résidus plaquettaires (220). De plus, le nombre de résidus plaquettaires étant variable d'une préparation monocytaire à l'autre, ce paramètre aurait pu gêner l'interprétation des résultats.

Toutes nos expériences (PCR quantitative, cytométrie de flux et dosages ELISA) ont montré que le FT et l'IL-10 étaient synthétisés par les monocytes stimulés par du LPS. Ces résultats sont en accord avec la littérature (221). Nos mesures effectuées à 4 (ARN) et à 24 heures ont révélé un décalage de synthèse des ARNm du FT et de l'IL-10. L'ARNm du FT n'était plus mesurable après 24 heures de stimulation contrairement à celui de l'IL-10. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse que l'IL-10 présente à 24 heures pouvait moduler la synthèse du FT au niveau transcriptionnel. Ce résultat est en accord avec la littérature . On a mis

également en évidence une augmentation significative du FT dans le surnageant du milieu de culture lorsque les monocytes étaient incubés 24 heures en présence de LPS comparativement à une incubation de 6 heures. Inversement, entre 6 et 24 heures d'incubation on a observé une diminution significative de l'expression membranaire du FT. La présence de ce FT dans le surnageant des cultures pourrait être du à un phénomène de microvésiculation. En effet plusieurs études ont montré que le LPS active la microvésiculation des monocytes (223) (224). De plus, dans son étude, Egorina EM *et al* (224) ont montré que le LPS induit la transcription de FT mais que cet activateur favorise également le transport intra-cellulaire du FT jusqu'à la membranaire et le délestage du FT ancré à la membrane.

Afin de mettre en évidence l'activité procoagulante des monocytes activés par le LPS, nous avons mesuré en continu la génération de thrombine monocytaire. Cette méthode de mesure appliquée à des monocytes purifiés n'a jamais été décrite auparavant. Elle nous a permis d'observer et de comparer des cinétiques de génération de thrombine obtenues à partir de monocytes incubés dans des conditions expérimentales différentes (temps d'incubation variables, incubation en présence ou non de LPS, d'IL-10, d'anticorps anti-IL-10h ou anti-IL10Ra). Pour rendre la génération de thrombine indépendante de la voie intrinsèque, nous avons ajouté au milieu expérimental de l'aprotinine, cette molécule ayant la caractéristique d'inhiber in vitro l'activation de la coagulation dépendante de la kallicréine (218). Pour confirmer l'absence d'activation de la voie intrinsèque, nous avons effectué des tests de génération de thrombine en présence de plasma déficient en facteur VII de la coagulation ou en présence d'anticorps bloquants anti-FT. On a observé une absence complète de génération de thrombine en présence du plasma déficient tandis que l'ajout d'anticorps bloquant anti-FT a induit une diminution de la génération de thrombine dose-dépendante. Nous avons montré pour la première fois par cette méthode de mesure que la génération de thrombine, FTdépendante, induite par des monocytes incubés 6 heures en présence de LPS était rapide et importante. En revanche, en absence d'activation par le LPS, la génération de thrombine était très faible et tardive. La thrombine générée après 24 heures d'incubation par des monocytes stimulés par du LPS était plus faible qu'à 6 heures. Ce résultat était corrélé à la diminution significative du FT membranaire entre 6 et 24 heures d'incubation. En effet, dans notre test le FT du surnageant intervient peu puisque le protocole nécessite une forte dilution de ce dernier (chapitre matériel et méthode).

Nous avons ensuite utilisé ce modèle de génération de thrombine pour mettre en évidence le rôle régulateur de l'IL-10 sur l'activité procoagulante de monocytes activés par le LPS. Bien que de nombreuses études soient déjà publiées concernant la régulation de

l'expression du FT et de l'activité procoagulante monocytaire par l'IL-10, les modifications de cinétiques de génération de thrombine induites par l'IL-10 n'ont jamais été décrites. De plus l'utilisation d'anticorps bloquants anti-IL-10h ou anti-IL10Ra nous a permis d'évaluer l'effet de la neutralisation de l'IL-10 endogène sur la génération de thrombine. L'ajout d'IL-10rh dans le milieu de culture a induit une augmentation du temps de latence avant l'apparition de thrombine générée et une diminution du pic maximal de thrombine. L'utilisation de doses croissantes d'IL-10rh a montré une modification dose-dépendante des paramètres de la cinétique. Ce résultat est conforme aux données de la littérature rapportant une diminution de l'expression du FT en présence d'IL-10 recombinante humaine (**Tableau IX**).

L'étude de l'IL-10 endogène a nécessité 24 heures d'incubation. En effet il a été montré que la synthèse maximale de la protéine est observée après 24 heures d'incubation (34). Pour appréhender l'effet de l'IL-10 endogène, nous avons utilisé des anticorps qui la neutralisaient ou qui bloquaient son récepteur. L'utilisation de ces deux types d'anticorps a provoqué une diminution du temps de latence et une augmentation du pic maximal de thrombine. Les modifications de ces paramètres, observées à deux doses d'anticorps, sont plus marquées à la dose la plus élevée (1 µg/mL). La synthèse d'IL-10 endogène module donc la génération de thrombine par les monocytes activés par du LPS. Bien que ces résultats soient attendus, ils n'ont jamais été montrés. Ces résultats ont été corrélés avec une augmentation significative de l'expression du FT (ARNm, FT membranaire, FT dans le surnageant) lors de l'incubation des monocytes en présence d'anticorps neutralisant l'activité de l'IL-10 endogène. A 24 heures d'incubation, l'IL-10 endogène participe significativement à la régulation de l'expression du FT. Nos résultats sont concordants avec les nombreuses études qui ont montré le rôle régulateur de l'IL-10 sur l'expression du FT : l'IL-10 diminue l'expression du FT par les monocytes activés par le LPS (Tableau IX). Malgré des conditions expérimentales très différentes, les résultats publiés sont souvent homogènes. Ainsi les durées d'incubation des cellules en présence de LPS varient ainsi que les concentrations d'IL-10 testées. L'IL-10 est introduite dans le milieu de culture avant l'activation des cellules ou après l'activation des cellules en fonction des protocoles. Plusieurs types de dosage du FT sont utilisés pour mettre en évidence le rôle de l'IL-10 dans la modulation de l'expression du FT. Des dosages du FT de type antigénique, d'activité procoagulante, et d'ARNm sont décrits. Les dosages antigéniques et fonctionnels sont réalisés sur des lysats de cellules ou sur la membrane externe des cellules. L'association de dosages membranaires et de dosages à partir de lysat permet d'appréhender la régulation post-transcriptionnelle alors que le dosage de

l'ARNm permettra d'évaluer la régulation du gène. Le plus souvent la diminution de l'expression du FT est observée dans tous les types de dosage. La régulation de l'expression du FT par l'IL-10 semble se faire, au moins en partie, au niveau transcriptionnel puisque la diminution de l'ARNm est corrélée à une diminution des dosages antigéniques et fonctionnels effectués à partir soit des lysats de monocytes soit en membranaire. Seule l'étude de Paysant J et al (133) montre une augmentation de l'expression antigénique du FT membranaire. Son modèle se caractérise par une durée d'incubation en présence d'IL-10 beaucoup plus longue que dans les autres modèles (48 et 96 heures), l'absence d'activateur et la culture de monocytes adhérents. Ces conditions expérimentales ont été choisies afin de se rapprocher du modèle de la plaque athéromateuse au sein de laquelle les cytokines et les cellules ont un temps de contact prolongé. Les résultats montrent une diminution de l'ARNm du FT, de l'activité procoagulante du lysat et de la membrane et du dosage antigénique effectué dans le lysat. En revanche les auteurs observent une augmentation de l'expression antigénique du FT membranaire. Par ailleurs les auteurs montrent une augmentation de l'expression du TFPI à la surface des monocytes. Ils émettent l'hypothèse qu'une longue incubation avec l'IL-10 induirait modification du mécanisme d'élimination des complexes FT / FVIIa / FXa / TFPI-1 qui resteraient localisés sur la membrane externe des monocytes. Ce résultat, d'après Payant J et al, mettrait en évidence une régulation post-transcriptionnelle du facteur tissulaire par l'IL-10 (133). Les résultats que nous avons obtenus à 24 heures en présence des anticorps bloquants nous font émettre l'hypothèse différente que l'IL-10, en plus d'inhiber l'activité transcriptionnelle du FT, pourrait favoriser son délestage de la membrane. Concernant la régulation de l'activité transcriptionnelle du gène du FT par l'IL-10, il a été montré que l'inhibition de la synthèse de FT provoquée par l'IL-10 était due à une réduction de l'activité de NFkB (225) et du facteur de transcription Egr-1 (222). L'effet de l'IL-10 sur le délestage ou bourgeonnement du FT monocytaire n'a jamais était exploré. Plusieurs études ont montré une augmentation significative des microvésicules circulantes porteuses de FT dans le plasma de patients atteints de syndromes coronariens (226) (227) ou de CIVD au cours de sepsis (228). En perspective de ce travail nous envisageons de vérifier l'hypothèse d'une inhibition du bourgeonnement cellulaire du FT par l'IL-10. L'utilisation de notre modèle de génération de thrombine pourra être adaptée à l'évaluation de l'activité procoagulante de ces microvésicules.

# III.2 Polymorphismes de l'IL-10 en pathologie vasculaire

# III.2.1 Détermination des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 chez 20 témoins, corrélation à la production d'IL-10

#### III.2.1.1 Introduction

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui a un rôle important dans l'immuno-régulation et l'inflammation. Une dysrégulation de sa production pourrait conduire à l'expression de pathologies inflammatoires et/ou dysimmuntaires. Les modèles animaux invalidés pour le gène de l'IL-10 sont sujets à la survenue de pathologies dysimmunitaires et/ou inflammatoires (**Chapitre II.5**). La littérature rapporte de nombreuses études cliniques évaluant les taux d'Il-10 au cours de pathologies le plus souvent infectieuses, auto-immunes, dans les hémopathies lymphoïdes ou au cours de grossesses pathologiques. Par ailleurs Westendorp RGJ *et al* (19) montrent que les variations inter-individuelles de production d'IL-10 sont essentiellement imputables à des déterminants génétiques. D'après leur étude, 75% de la production d'IL-10 serait génétiquement déterminée. L'expression d'un gène étant contrôlée en partie, par son promoteur, les nombreux polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10 sont de potentiels facteurs de variation de la production d'IL-10.

Dans ce contexte nous avons déterminé cinq polymorphismes génétiques situés dans le promoteur du gène de l'IL-10 de 20 témoins caractérisés par l'absence d'antécédents personnels et familiaux de maladie thrombo-embolique, de thrombophilie et de pathologie dysimmunitaire. Nous avons déterminé en parallèle la capacité de leurs cellules, mises en culture, à produire de l'IL-10 afin de corréler les polymorphismes à un phénotype « bon » ou « mauvais » producteur. Au total nous avons identifié trois polymorphismes de substitution d'acide nucléique situés respectivement aux positions –592, -819 et –1082 du promoteur et deux microsatellites formés de répétitions de CA nommés IL-10G et IL-10R. Nous avons étudié la production d'IL-10 dans plusieurs modèles de culture cellulaire. Nous avons étudié la production d'IL-10 par des cellules mononucléées sanguines isolées ou cultivées en sang total en présence de deux types d'activateurs : du LPS ou un anticorps anti-CD3 (OKT3).

### III.2.1.2 Matériel et méthode

# III.2.1.2.1 Population recrutée

La population de l'étude est constituée de 20 témoins, ayant donné leur consentement éclairé, recrutés parmi le personnel du laboratoire d'Hématologie du CHU de Reims. Ces 20 témoins sont caractérisés par l'absence d'antécédents personnels et familiaux de maladie thrombo-embolique, de pathologie dysimmunitaire et de pathologie infectieuse aiguë ou chronique.

# III.2.1.2.2Etude moléculaire des polymorphismes du promoteur de l'IL-10

Extraction de l'ADN et détermination des ADN témoins par séquençage du promoteur de l'IL-10

Nous avons utilisé la technique de relargage des protéines par du NaCl 6M pour extraire l'ADN à partir de 10 ml de sang recueillis sur tube EDTA (229).

Nous avons déterminé les allèles de deux microsatellites formés de répétitions de CA, IL-10G et IL-10R, et de trois polymorphismes de substitution d'acide nucléique (SNP) situés aux positions -1082, -819 et -592 du promoteur du gène de l'IL-10. Nous avons séquencé trois régions encadrant respectivement le microsatellite IL-10G, le microsatellite IL-10R et les trois SNPs -1082G>A, -819C>T et -592C>A. Les amorces utilisées pour amplifier ces régions étaient 5'-aatccaagacaacactactaagg-3' (amorce sens) et 5'-ttccattttactttccagaga-3' (amorce anti-sens) pour la région des SNPS, 5'-agatettgtcaactgtagaatgc-3' (amorce sens) et 5'-ggtaaagtccaaaggtttaa-3' (amorce anti-sens) pour la région du microsatellite IL-10R, 5'-ttccccaggtagagca-3' (amorce sens) et 5'-ggctggagtctaaagtttaa-3' (amorce anti-sens) pour la région du microsatellite IL-10R. Chaque PCR a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN dans un volume final de 50 µL. Les réactifs et leurs concentrations finales étaient les suivants : Tris HCl pH 8,8 à 50 mM; KCl à 25 mM; les 4 types de dNTP (Pharmacia-Amersham, France) à 125 µM chacun; les amorces à 30 pM et une unité de Taq Polymérase (Invitrogen, France). La concentration de MgCl<sub>2</sub> a été optimisée pour chacune des trois PCR : 1,5 mM pour les deux microsatellites et 2,5 mM pour la région encadrant les trois SNPs. Le cycle d'amplification comprenait une étape initiale de 3 minutes à 92°C. Cette étape était suivie de 35 cycles comprenant chacun les étapes suivantes : 30 secondes à 94°C, 40 secondes à 55°C,

40 secondes à 72°C. Cette série de cycles était suivie d'une dernière étape de 7 minutes à 72°C. Le thermocycleur utilisé était un 9700 Applied Biosystems®. Le produit de PCR était ensuite séquencé dans les deux directions (5'→3' et 3' →5') sur le séquenceur ABI Prism™ 377 ABI à l'aide du kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems, USA) et des gels Long Ranger gel® (FMC Corporation, USA). La nomenclature utilisée concernant la numérotation des allèles des microsatellites était celle d'Eskdale J (21) (22).

Détermination des allèles des SNPs –1082G>A, -819C>T et –592C>A par PCR ASA ou Amplification Spécifique d'Allèle

Cette technique a nécessité de réaliser deux PCR par SNP. Les PCRs ont été effectuées à partir de 100 ng d'ADN et dans un volume final de 50 μL. Les réactifs et leurs concentrations finales étaient les suivants : du Tris HCl pH 8,8 à 50 mM ; du KCl à 25 mM ; les 4 types de dNTP (Pharmacia-Amersham, France) à 125 μM chacun ; les amorces (spécifique et consensus) à 30 pM chacune, du MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM et une unité de Taq Polymérase (Invitrogen, France). Le cycle d'amplification comprenait une étape initiale de 3 minutes à 92°C. Cette étape était suivie de 35 cycles comprenant chacun les étapes suivantes : 30 secondes à 94°C, 40 secondes à 54°C (pour les SNPs –1082G>A et –592C>A) ou 61°C (pour le SNP –819C>T), 40 secondes à 72°C. Cette série de cycles était suivie d'une dernière étape de 7 minutes 72°C. L'amplification au cours du même cycle de PCR du gène du facteur IX de la coagulation servait de contrôle interne de qualité de l'ADN (230).

Détermination des allèles des microsatellites IL-10G et IL-10R par analyse de taille

Les deux PCR permettant d'amplifier les régions encadrant les deux microsatellites IL-10R et IL-10G ont été réalisées à partir de 50 ng d'ADN et dans un volume final de 15 μL. Les amorces sens ont été marquées par le fluorophore 6-FAM (Applied Biosystems, USA) en 5'. Les réactifs et leurs concentrations finales étaient les suivants : du Tris HCl pH 8,8 à 50 mM ; du KCl à 25 mM ; les 4 types de dNTP (Pharmacia-Amersham, France) à 100 μM chacun ; les amorces à 15 pM chacune, du MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM et 0,25 unités de Taq Polymérase (Invitrogen, France). Le cycle d'amplification comprenait une étape initiale de 3 minutes à 92°C. Cette étape était suivie de 30 cycles comprenant chacun les étapes suivantes : 30 secondes à 92°C, 40 secondes à 65°C, 40 secondes à 72°C. Une dernière étape de 7 minutes à 72°C était réalisée. Deux microlitres des produits de PCR dilués au 1/20ème étaient ensuite

mélangés avec 5 μL de formamide (95%) et du tampon de charge (bleu dextran à 5% et EDTA à 25 mM) contenant 0,5 μL de marqueur de taille (ROX-350®, Applied Biosystems, USA). Après une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C, nous avons déposé 1,5 μL de ce mélange sur un gel d'électrophorèse à 5% d'acrylamide (Long Ranger<sup>TM</sup>, FMC Corporation, USA). Les électrophorèses ont été réalisées sur le séquenceur ABI PRISM 377<sup>TM</sup> à 1600V pendant une heure. Les logiciels Genescan 3.1® et Genotyper® ont permis de déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés. La corrélation entre la taille des fragments et le nombre de répétitions de CA a été déterminée grâce aux ADN contrôles séquencés auparavant.

# III.2.1.2.3Dosage de l'IL-10 par technique ELISA (Enzyme Like Immunosorbant Assay) dans le surnageant de deux modèles de culture cellulaire

# Préparation du sang total mis en culture

Le sang total a été dilué au 1/5 ème dans du RPMI 1640 1X W/O L-glutamine (Gibco-BRL®, USA). Nous avons ajouté de la L-glutamine, de la pénicilline et de la streptomycine aux concentrations finales respectives de 300 mg/L, 100 UI/mL et 100 μg/mL.

# Préparation des cellules mononucléées isolées mises en culture

Les cellules mononucléées sanguines (PBMC) ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité (Lymphoprep™, densité 1,77 ; Nycomed® ; Norvège). Les cellules mises en culture ont été ajustées à la concentration finale de 1.10<sup>6</sup>/mL dans du RPMI 1640 1X W/O L-glutamine (Gibco-BRL®, USA). Nous avons ajouté de la L-glutamine, de la pénicilline, de la streptomycine et du sérum de veau fœtal (Fœtal Bovine Serum, Origine Australie, Gibco-BRL ®, Ecosse) aux concentrations finales respectives de 300 mg/L, 100 UI/mL, 100 μg/mL et 5% dans le milieu de culture.

# Activateurs utilisés pour stimuler les cellules

Nous avons testé deux activateurs : le LPS (Lipopolysaccharide, Sigma® from Escherichia coli serotype O111 : B4, USA) et l'OKT3 (Pelicluster CD3, clone CLB-CD3, CLB-T3/4.E, TEBU®, USA). L'OKT3 est un anticorps monoclonal de souris d'isotype IgE

dirigé contre le CD3 des lymphocytes T. Le LPS et l'OKT3 ont été utilisés aux concentrations finales respectives de 1 et 0,37 µg/mL.

### Protocole de culture et dosage de l'IL-10

Les prélèvements sanguins ont été recueillis sur des tubes contenant de l'héparinate de lithium et certifiés sans endotoxine. Le sang total et les cellules mononucléées ont été mis à incuber (séparément) dans une plaque de 24 puits (NUNC<sup>TM</sup>, Danemark), 24 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et 99% d'humidité en présence soit du LPS soit de l'OKT3. Chacun des quatre modèles de culture (Sang total/LPS; sang total/OKT3; PBMC/LPS; PBMC/OKT3) a été effectué en double.

L'IL-10 a été dosée dans le surnageant des cultures à l'aide du kit Quantikine® (R&D systems<sup>TM</sup>, USA) par la technique ELISA. Le fabricant précisait que le seuil minimal de détection de ce kit était de 3,9 pg/mL et que les anticorps utilisés ne reconnaissaient pas l'IL-10 virale.

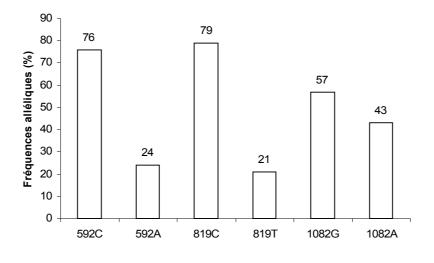
### Statistiques

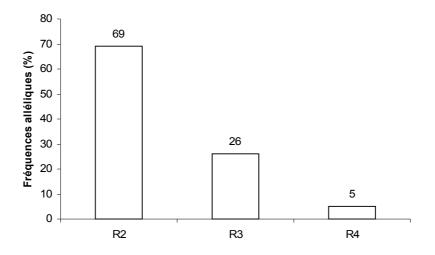
La comparaison de la sécrétion de l'IL-10 en fonction des quatre types de conditions de culture a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique T de Wilcoxon pour séries appariées. En raison du faible nombre de témoins identifiés par sous-type allélique, nous n'avons pas fait l'analyse statistique comparant la sécrétion d'IL-10 en fonction des sous types alléliques.

### III.2.1.3 Résultats

Fréquences alléliques des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10

Le séquençage a permis d'identifier d'une part des témoins de référence pour chacun des allèles des SNP et d'autre part des témoins pour l'identification des allèles des microsatellites par analyse de taille. En effet, grâce au séquençage nous avons pu attribuer un nombre de répétitions de CA aux tailles de produits de PCR obtenus lors de l'amplification des régions encadrant les microsatellites IL-10G et IL-10R. Les fréquences alléliques que nous avons déterminées sont comparables à celles de la littérature (**Figure 7, Tableaux XVII et XVIII**).





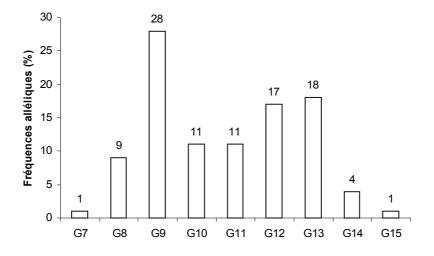


Figure 7. Fréquences alléliques des polymorphismes -592C>A, -819C>T, -1082G>A, IL-10R et IL-10G déterminées chez 20 témoins.

Tableau XVII Correspondance entre la nomenclature des allèles du microsatellite IL-10G d'après Eskdale J (21) \* et la nomenclature utilisée au cours de la thèse.

Dénomination	Nombre de répétitions de CA d'après Eskdale J*	Nombre de répétitions de CA après séquençage	Taille des produits de PCR d'après Eskdale J*	Taille des produits de PCR après séquençage
G1	14	13	124	123
G2	15	14	126	125
G3	16	15	128	127
G4	17	16	130	129
G5	18	17	132	131
G6	19	18	134	133
G7	20	19	136	135
G8	21	20	138	137
G9	22	21	140	139
G10	23	22	142	141
G11	24	23	144	143
G12	25	24	146	145
G13	26	25	148	147
G14	27	26	150	149
G15	28	27	152	151
G16	29	28	154	153

Tableau XVIII Correspondance entre la nomenclature des allèles du microsatellite IL-10R d'après Eskdale J (22) \* et la nomenclature utilisée au cours de la thèse.

Allèles	Nombre de répétitions de CA	Tailles des produits de PCR d'après Eskdale J*	Tailles des produits de PCR après séquençage
R0	11	ND	107
R1	12	ND	109
R2	13	114	111
R3	14	116	113
R4	15	118	115

(ND : non déterminé)

Modèles de cultures cellulaires et synthèse d'IL-10

L'étude de la sécrétion d'IL-10 par des cellules mononucléées sanguines stimulées a été réalisée à partir des cellules de 19 témoins. Au total quatre modèles de culture ont été testés pour chaque témoin : Sang total/LPS; sang total/OKT3; PBMC/LPS; PBMC/OKT3. Les taux d'IL-10 dosée dans les surnageants ont été rapportés à 1.10<sup>6</sup> cellules mononucléées (**Figure 8**). Les taux d'IL-10 obtenus en présence de sang total étaient significativement plus bas que ceux obtenus par les cultures de PBMC. D'autre part l'utilisation de LPS permettait d'obtenir des taux d'IL-10 significativement plus élevés que ceux obtenus en présence d'OKT3, que la culture soit effectuée en sang total ou en PBMC. En absence d'activateur (données non montrées), les taux d'IL-10 étaient inférieurs au seuil de détection du kit commercial utilisé (3,9 pg/mL).

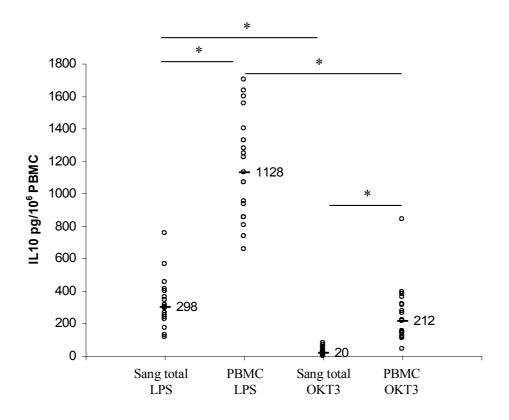


Figure 8. Production d'interleukine 10 dans quatre modèles de culture par les cellules de 19 témoins.

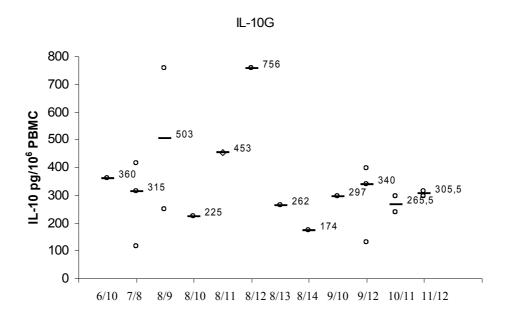
(Cercle : une valeur de dosage ; barre : médiane ;\* p<0,05; test test U de Mann-Whitney)

### Sécrétion d'IL-10 et variations alléliques

Nous n'avons pas fait l'analyse statistique de la corrélation de la production d'IL-10 en fonction des allèles en raison du faible nombre d'individu par sous-groupe d'allèle. La sécrétion d'IL-10 ne semble pas corrélée aux allèles du microsatellite IL-10G (**Figure 9**).

L'allèle IL-10R3 du microsatellite IL-10R semble associé à une plus faible synthèse d'IL-10 (**Figure 9**). Les cellules des témoins homozygotes pour cet allèle (R3R3) sécrètent moins d'IL-10 que les témoins hétérozygotes (R3R2) qui eux-mêmes sécrètent moins d'IL-10 que les témoins ne portant pas d'allèle R3 (R2R2).

La comparaison de sécrétion d'IL-10 en fonction des allèles des SNP met en évidence une diminution de sécrétion d'IL-10 en présence de l'allèle –1082A. Cette régulation semble être dose dépendante puisque les homozygotes –1082A/A sécrétent moins d'IL-10 que les hétérozygotes, ces derniers sécrétant moins d'IL-10 que les témoins ne portant pas cet allèle (-1082G/G) (**Figure 10**).



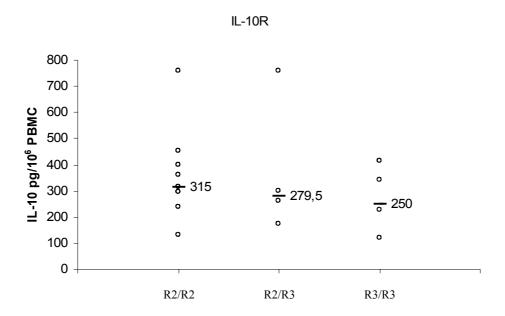


Figure 9. Production d'interleukine 10 mesurée sur sang total après 24 heures de stimulation par LPS en fonction des haplotypes des microsatellites IL-10G (en haut) et IL-10R (en bas) déterminé chez 19 témoins.

(Cercle : une détermination ; barre : médiane des valeurs obtenue pour l'haplotype)

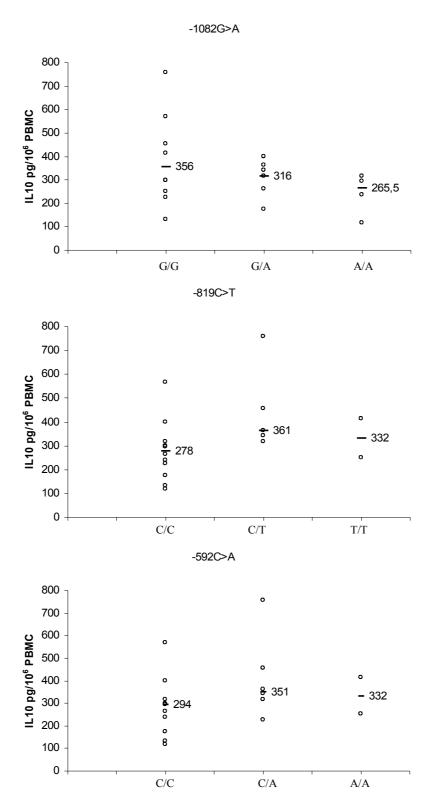


Figure 10. Production d'interleukine 10 mesurée sur sang total après 24 heures de stimulation par LPS en fonction des polymorphismes –592C>A, -819C>T, -1082G>A déterminé chez 19 témoins.

(Cercle : une détermination ; barre : médiane des valeurs obtenue pour l'haplotype)

### III.2.1.4 Discussion

Fréquences alléliques des polymorphismes génétiques IL-10G, IL-10R, -1082G>A, -819C>T et -592C>A déterminées chez 20 témoins sains

Le séquençage nous a permis de sélectionner nos témoins de référence pour la PCR-ASA et l'analyse de taille des microsatellites IL-10R et IL-10G. Nous avons utilisé la PCR-ASA (Amplification Spécifique d'Allèle) pour l'identification des allèles des SNP. Cette technique est facilement réalisable dans un contexte d'étude épidémiologique. L'analyse de taille est d'interprétation plus facile que celle des électrophorégrammes obtenus au cours des séquençages directs. Concernant les nomenclatures, nous avons choisi les plus couramment utilisées pour la dénomination des allèles des microsatellites et des SNP. Ainsi nous avons appliqué la nomenclature d'Eskdale J et al (21) (22) aux allèles des microsatellites IL-10R et IL-10G et la nomenclature de Turner DM et al (23) aux allèles des trois SNPs que nous avons étudiés. Après avoir identifié nos contrôles de PCR par séquençage, nous avons relevé plusieurs discordances concernant la nomenclature des allèles du microsatellite IL-10G (Tableau XVII) et nous avons du « réinterpréter » nos résultats pour nous adapter à la nomenclature d'Esdale J et al (21). En effet ils attribuent au microsatellite IL-10G de la séquence de référence X78837 (GenBank) vingt deux répétitions de CA au lieu des 21 présentes. Par ailleurs ils attribuent une taille de 140 paires de bases à la séquence qu'ils amplifient et qui contient le microsatellite IL-10G. Après vérification, la taille réelle du fragment amplifié avec les amorces qu'ils ont déterminées est de 137 paires de bases. Ils déterminent les allèles du microsatellite IL-10G par analyse de taille sur gel de polyacrylamide. Ils n'utilisent pas la technique de séquençage, technique de référence pour la caractérisation d'ADN témoins, pour la détermination du nombre exact de répétitions de CA. Nous avons donc attribué la dénomination G9 à l'allèle qui comporte 21 répétitions de CA déterminées par séquençage et 22 répétitions de CA dans la description initiale d'Eskdale J (21) en nous basant sur la comparaison des fréquences alléliques. La difficulté engendrée par cette erreur est l'interprétation de la littérature. En effet la majorité des auteurs identifient les allèles du microsatellite IL-10G par analyse de taille des fragments amplifiés sans déterminer le nombre de répétitions de CA par séquençage. Ils attribuent ensuite un nombre de répétitions de CA à une longueur de fragment en se basant sur la publication d'Eskdale J et al (21). Eskdale J et al utilisent également une technique d'analyse de taille pour déterminer les

allèles du microsatellite IL-10R. Après le séquençage des produits de PCR obtenus avec les mêmes amorces, nous avons identifié une différence de 3 paires de base dans la longueur des fragments d'ADN amplifiés (22) (**Tableau XVIII**). Cette erreur rend également l'interprétation des fréquences alléliques du microsatellite IL-10R décrites dans la littérature difficiles. En effet la majorité des auteurs décrivent les allèles du microsatellite IL-10R par leur taille respective.

J Eskdale *et al* (16), DM Turner *et al* (23) et D Kube *et al* (15) ont publié les premiers articles concernant les polymorphismes de substitution d'acide nucléique –1082G>A, -819C>T et –592C>A, en se basant sur la même règle de nomenclature pour leurs dénominations : les trois polymorphismes de substitution d'acide nucléique sont dénommés en fonction de leur position dans le promoteur. Cette position est déterminée à partir du codon « start » ATG. Les acides nucléiques se situant en amont de ce codon ont une numérotation négative, le premier acide nucléique en amont du codon « start » ayant la position –1. Ces trois auteurs ont décrit les trois polymorphismes de substitution d'acide nucléique (SNP ou single nucléotide polymorphisme) à partir de la séquence X78437 du promoteur déposée dans GenBank. Malgré cela, la dénomination attribuée par les trois auteurs est différente de quelques bases. La nomenclature officielle de ces polymorphismes de substitution d'acide nucléique est décrite sur le site <a href="http://snp500cancer.nci.nih.gov">http://snp500cancer.nci.nih.gov</a> (Tableau III).

Après avoir adapté nos résultats aux nomenclatures utilisées dans la littérature nous avons pu comparer nos résultats de fréquences alléliques à ceux publiés. Les fréquences alléliques des trois SNPs et des deux microsatellites (**Figure 7**) que nous avons déterminées sur 20 témoins sont proches de celles de la littérature (**Tableau IV**) et plus particulièrement de celles décrites par Kube D *et al* (18) qui ont travaillé dans une population caucasienne d'origine allemande (Cologne).

# Polymorphismes génétiques et synthèse d'IL-10

Les témoins participant à cette étude étaient indemnes de pathologie thromboembolique, de pathologie dysimmunitaire et de pathologie infectieuse aiguë ou chronique. Ils n'avaient pas d'antécédents familiaux de pathologies de type thrombo-embolique ou dysimmunitaire. Nous avons déterminé ces critères de sélection car la littérature montre une variation de production d'IL-10 chez les patients atteints de maladie infectieuse ou de pathologie dysimmunitaire. Par ailleurs la physiopathologie de la maladie thrombo-embolique et l'hypothèse que nous avons émise d'un possible rôle de l'IL-10 dans la physiopathologie de cette maladie nous a fait exclure les personnes ayant des antécédents personnels ou familiaux de thrombose.

Nous avons testé quatre modèles de culture cellulaire : sang total/LPS, cellules mononucléées sanguines PBMC/LPS, sang total/OKT3 et PBMC/OKT3. Les modèles de culture cellulaire décrits dans la littérature sont réalisés à partir de sang total ou de PBMC. L'activateur le plus décrit est le LPS. In vitro les lymphocytes T activés par des anticorps anti-CD3 tel que l'OKT3 produisent de l'IL-10 (44). Nous avons mis les cellules 24 heures en culture car cette durée d'incubation est nécessaire pour obtenir la production maximale d'IL-10 (196). Plusieurs concentrations de LPS et d'OKT3 ont été testées afin d'optimiser la production d'IL-10. Les concentrations de 1 µg/mL et de 0,37 µg/mL respectivement pour le LPS et l'OKT3 ont été retenues. La concentration utilisée de LPS est classiquement décrite dans les modèles de culture cellulaire.

Les cultures cellulaires à partir de cellules mononucléées sanguines purifiées permettent une sécrétion d'IL-10 plus importante (à activateur identique) que celle obtenue en sang total (**Figure 8**). La présence d'hématies, de plaquettes et de polynucléaires modifie les interactions cellulaires du modèle purifié et diminue la synthèse d'IL-10. Par ailleurs des facteurs plasmatiques, bien que le sang total soit dilué au 1/5 ème dans du RPMI, peuvent également participer à la régulation de la synthèse d'IL-10. Les concentrations d'IL-10 obtenues en présence du LPS sont plus élevées que celles obtenues avec l'OKT3, anticorps anti-CD3. Le LPS est capable d'activer toutes les cellules exprimant le CD14 (récepteur du LPS) alors que l'OKT3 active exclusivement les lymphocytes T, seules cellules à exprimer le CD3 (récepteur de l'OKT3). L'activation de plusieurs catégories de cellules en même temps provoque une synthèse d'IL-10 plus importante.

Le modèle de culture en sang total nous a semblé plus adapté pour analyser la production d'IL-10 en fonction des allèles des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10. En effet ce modèle est plus représentatif des interactions cellulaires physiologiques. Par ailleurs De Groote D *et al* (231) ont montré que ce modèle, comparé à la culture de PBMC, était sujet à peu de variations intra-individuelles ce qui le rend plus adapté à notre étude. De plus la culture en sang total ne nécessite pas d'étape de purification, cette dernière pouvant potentiellement activer les cellules et constituer un facteur de variation de production d'IL-10. L'utilisation du LPS, composant des parois bactériennes, permet de se rapprocher d'un modèle d'activation classique de type infectieux. De plus cet activateur met en évidence de plus grandes différences de sécrétions inter-individuelles ce qui est plus adapté à notre étude d'analyse génétique.

Nous avons ensuite observé les taux d'IL-10 obtenus en fonction des génotypes des cinq polymorphismes génétiques que nous avons déterminés. Nous n'avons pas fait d'analyse statistique de corrélation entre la production d'IL-10 et la présence d'un génotype car le nombre de témoin inclus dans chaque groupe était réduit. Nous avons observé que les variations inter-individuelles de sécrétion d'IL-10, à génotype identique, sont importantes. Deux allèles semblent corrélés à une capacité diminuée de sécrétion d'IL-10. Ce sont les allèles IL-10R3 et -1082A (Figures 9 et 10). Pour ces deux allèles la corrélation semble être dose dépendante puisque leur présence à l'état homozygote chez un individu est corrélée à une sécrétion plus basse que leur présence à l'état hétérozygote. De plus leur présence à l'état hétérozygote est corrélée à des taux d'IL-10 plus bas que les taux d'IL-10 mesurés chez les individus non porteurs de ces allèles. Ces résultats sont en adéquation avec les observations décrites dans la littérature. Dans la littérature, une seule étude analyse la corrélation entre les allèles des microsatellites IL-10R et IL-10G et la sécrétion d'IL-10 (45). Ces travaux, publiés par Eskdale J et al (45), sont réalisés à partir du même modèle cellulaire que notre étude (sang total/LPS/culture pendant 24 heures). Ils montrent que la sécrétion d'IL-10 dosée chez 44 individus porteurs de l'allèle R3 est significativement plus basse que celle dosée chez 39 individus non porteurs de cet allèle. Dans cette étude la corrélation de l'allèle R3 à des taux d'IL-10 plus bas est également dose dépendante de manière significative. Le microsatellite IL-10R se situe environs 4000 paires de bases en amont du site de transcription (16). De nombreux sites de fixation de facteurs de transcription, et notamment ceux de NF-KB et de l'interféron, ont été décrits dans cette région. Il paraît vraisemblable qu'un allèle du microsatellite IL-10R puisse modifier la capacité d'interagir d'un facteur de transcription avec son site de fixation et induire diminution de la transcription du gène de l'IL-10.

Nous avons mis en évidence une diminution de sécrétion d'IL-10, dose dépendante, chez les patients porteurs de l'allèle –1082A. L'étude de Turner DM *et al*, publiée dans European Journal of Immunogenetics en 1997 (23), analyse la corrélation possible entre les taux d'IL-10 sécrétés et la présence des allèles des trois SNP que nous avons étudié. Pour cela les auteurs mettent en culture les lymphocytes activés par de la phytohémagglutinine (PHA) de 37 témoins sains. Ils montrent une diminution significative de sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes des témoins porteurs au moins d'un allèle –1082A. Crawley E *et al* (196), dans un modèle de culture sang total/LPS et par transfection, corrèlent des taux bas de sécrétion d'IL-10 à des haplotypes comportant l'allèle –1082A. Ce polymorphisme se situe à côté (environ 150 pb) d'un site de fixation du facteur de transcription *ETS*. La fixation de ce dernier pourrait être modifiée en fonction de l'acide nucléique présent en position –1082 et diminuer la capacité de ce facteur à induire la transcription du gène de l'IL-10.

Westendorp RGJ *et al* (19) ont analysé la production d'IL-10 de 190 membres de la famille au premier degré de 61 patients atteints d'une infection sévère méningococcique nécessitant une réanimation et de 26 paires de jumeaux homozygotes. Ils ont utilisé un modèle de culture en sang total et l'activation des cellules était provoquée par du LPS. L'analyse statistique des résultats a montré que 75% des variations inter-individuelles de production d'IL-10 étaient imputables à des facteurs génétiques, 25% de variation étant certainement liés à l'environnement. Les modifications de production d'IL-10 que nous avons observées en présence des allèles IL-10R3 et –1082A ont également été décrites dans la littérature. Ces deux polymorphismes semblent être des facteurs génétiques de modification de la production d'IL-10.

### III.2.2 Modèle de la thrombose veineuse

### **III.2.2.1 Introduction**

L'IL-10 est capable de moduler un grand nombre d'évènements cellulaires (voir chapitres précédents) impliqués dans le développement de la formation du thrombus et depuis quelques années le rôle de cette cytokine dans la pathologie thrombotique est évoqué. Les études se sont plus particulièrement focalisées sur le choc septique, pathologie caractérisée par une activation de la coagulation (170). Cependant les études cliniques évaluant le rôle de l'IL-10 dans la pathologie thrombotique sont rares (Tableau XVI) et concernent exclusivement la thrombose artérielle. Aucune étude n'a été publiée sur la corrélation de ces polymorphismes et la survenue de thrombose veineuse. Le rôle anti-inflammatoire et régulateur de l'expression du facteur tissulaire de cette cytokine, principal initiateur de la coagulation, autorise l'hypothèse d'un possible rôle de l'IL-10 dans la physiopathologie de la maladie thrombo-embolique. Il a été montré l'existence de différences individuelles à produire de l'IL-10. Ces différences ont été attribuées à des différences génétiques qui ont permis de classer les individus en forts ou faibles producteurs (19). Nous avons donc décidé d'analyser les fréquences alléliques de cinq polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10, -1082G>A, -819C>T, -592C>A, et les microsatellites IL-10G et IL-10R, dans une population de patients ayant fait au moins une thrombose veineuse.

# III.2.2.2 Résultats

# III.2.2.2.1 Publication

**Cochery-Nouvellon E**, Vitry F, Cornillet-Lefebvre P, Hezard N, Gillot L, Nguyen P. Interleukin-10 promoter polymorphism and venous thrombosis: a case-control study. Thromb Haemost 2006; 96: 24-8

# Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis

# Interleukin-10 promoter polymorphism and venous thrombosis

### A case-control study

Eva Cochery-Nouvellon<sup>1,3</sup>, Fabien Vitry<sup>2</sup>, Pascale Cornillet-Lefebvre<sup>1,3</sup>, Nathalie Hezard<sup>1</sup>, Lucile Gillot<sup>1</sup>, Philippe Nguyen<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Central d'hématologie and <sup>2</sup>Unité d'aide méthodologique, CHU Robert Debré, <sup>3</sup>Unité UPRES EA3796 IFR53, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France

#### Summary

The human interleukin-10 promoter gene is highly polymorphic. IL-10 polymorphisms have been associated with various autoimmune and lymphoproliferative disorders. Although IL-10 has been shown to modulate thrombin generation in several experimental models, it is not known whether IL-10 polymorphisms could be a risk factor for venous thrombosis. We therefore conducted a case-control study comparing 74 consecutive patients who experienced at least one episode of documented venous thromboembolic event and 100 healthy controls. All subjects were Caucasians. Five polymorphisms of the IL-10 promoter

gene were studied: two highly polymorphic dinucleotide repeats, IL-10 R and IL-10G, and three single nucleotide polymorphisms at position  $-1082,\,-819$  and -592. Factor VG1691C Leiden mutation was systematically determined. Multivariate logistic regression analysis showed that IL-10 G13 and G10 alleles are independent risk factors for venous thrombosis (Odds ratio: OR = 3.33, p = 0.003 and OR = 2.83, p = 0.03, respectively). Furthermore, IL-10 G10 allele is more frequent in recurrent disease.

#### **Keywords**

Deep vein thrombosis, interleukin-10, factor V Leiden, hereditary thrombosis risk factor

Thromb Haemost 2006; 96: ■■■

### Introduction

The pathogenesis of venous thrombosis is multifactorial, involving both acquired and genetic factors. Among Caucasian populations, factor V G1691C (FV Leiden) mutation is the most common genetic defect causing venous thrombosis (1).

Interleukin-10 (IL-10) is a major immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine (2, 3). In humans, the IL-10 promoter gene is highly polymorphic with two polymorphic dinucleotide repeats, IL-10G and IL-10R microsatellites (4, 5), and three single nucleotide polymorphisms (SNPs) assigned to positions –1082, –819 and –592 (6). It has been suggested that IL-10 polymorphisms could play a role in the onset of various autoimmune and lymphoproliferative disorders (7–10). The role of IL-10 in venous thrombosis is, so far, unknown. It is pertinent to hypothesize that IL-10 may play a role in the pathogenesis of venous thrombosis since this disorder is associated with a consistent inflammatory state. In an experimental mouse model, it was observed that IL-10 could control the development of deep ve-

nous thrombosis (11). In addition, local viral IL-10 gene transfection decreased venous thrombosis and was associated with inflammation (12). *In vitro* and *in vivo* studies with recombinant IL-10 and neutralizing antibodies directed against IL-10 indicated that IL-10 is critical to limit inflammatory response (13). The aim of this study was to estimate the allelic frequencies of IL-10 polymorphisms in patients with venous thrombosis events in an attempt to uncover a genetic association of the IL-10 gene with disease. The search for FV Leiden mutation was systematically performed for comparison.

### Patients and methods

### **Patients and controls**

Patients were consecutively recruited from a specialized haematology clinic of an academic hospital (CHU de Reims, France). Informed consent was obtained according to the policy of the local ethical committee. Included were patients presenting with a previous personal medical history of at least one symptomatic

Correspondence to:
Philippe Nguyen
Laboratoire Central d'Hématologie
CHU de Reims, Avenue du Général Koenig
51092 Reims, Cedex, France
Tel.: + 33 3 26 78 7789, Fax: + 33 3 26 78 8171
E-mail: pnguyen@chu-reims.fr

Received January 17, 2006 Accepted after resubmission May 14, 2006

Prepublished online doi:10.1160/TH06-01-0027

deep vein thrombosis. Thrombotic events were documented by phlebography or ultrasonography. Patients diagnosed as having a deficiency in antithrombin (AT), protein C (PC) or protein S (PS) were not included in the cohort of patients. A complete clinical summary with emphasis on personal and family history for thromboembolic disease and circumstantial vascular risk factors (surgery, immobilisation, pregnancy, post-partum, oral contraception) was obtained. The controls consisted of hospital staff without any personal or familial history of thromboembolic disease or thrombophilia. Seventy-four patients and 100 healthy controls were recruited from December 2001 to July 2002.

# DNA extraction and direct DNA sequencing of IL-10 promoter

DNA was extracted from 7 ml EDTA anticoagulated whole blood by sodium chloride using a method described elsewhere (14). Five polymorphisms of the IL-10 promoter gene were studied: two highly polymorphic dinucleotide repeats IL-10R and IL-10G (4, 5) and three SNPs at position -1082, -819 and - 592 (6). In order to characterize DNA positive controls, we amplified and sequenced three regions in the IL-10 promoter. The first region contained the three SNPs. The two other regions contained IL-10R or IL-10G microsatellites, respectively. The following primers were used: SNPs: 5'-aatccaagacaacactactaagg-3' (sense) and 5'-ttccattttactttccagaga -3'(antisense); IL-10R: 5'-agatettgtcaactgtagaatgc-3' (sense) and 5'-ggtaaagtccaaagg tttaa-3'(antisense); IL-10G: 5'-ttccccaggtagagca-3' (sense) and 5'-ggctggagtctaaagtttaa-3'(antisense). Polymerase chain reaction (PCR) was performed with a total volume of 50 µl and 100 ng genomic DNA. Final concentrations were 50 mM Tris HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 125 µM each dNTPs (Pharmacia-Amersham, France), 30 pmol of primers, MgCl<sub>2</sub> at optimal concentration (i.e. 1.5 mM for IL-10R and IL-10G or 2.5 mM for SNPs) and 1 unit Taq Polymerase (Invitrogen, France). All PCR were performed on a 9700 Applied Biosystems® thermocycler. After an initial melting time at 92°C for 3 min, the following 35 cycles were used: 94°C for 30 s; 55°C for 40 s; 72°C for 40 s and each followed by 72°C for 7 min. DNA was sequenced in both directions using the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit® (PE Applied Biosystems, USA) on ABI Prism TM 377 ABI sequencer (PE Applied Biosystems, USA). The sequencing gel used was the Long Ranger gel® (FMC Corporation, USA). For both microsatellites, the allele numbers were assigned according to the nomenclature used by Eskdale (4, 10).

# SNPs – 1082G/A, – 819C/T and – 592C/A analysis by AS (allele specific) -PCR amplification

Two PCRs were performed for each SNP. PCRs were performed with a total volume of 50  $\mu$ l and 100 ng of sample genomic DNA. Final concentrations were 50 mM Tris HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 125  $\mu$ M each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 pmol of consensus primer and specific primers and 1 unit Taq Polymerase. The following cycles were used: 35 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 40 s (for -1082G/A and -592C/A polymorphisms) or 61°C for 40s (-819C/T polymorphism); 72°C for 40 s, each followed by 72°C for 7 min. Quality control for the DNA amplification was performed using factor IX gene as an internal control, as described previously (15).

### IL-10 microsatellite fragment length analysis

The regions of the IL-10 promoter containing IL-10R and IL-10G were amplified by PCR. Sense primers were 5'-labelled with 6-FAM fluorophore (Applied Biosystems, USA). PCR was performed with a total volume of 15 µl and 50 ng of sample genomic DNA. Final concentrations were 50 mM Tris HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 100 μM each dNTPs, 15 pmol of primers, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.25 unit Taq Polymerase. After an initial melting time at 92°C for 3 min, the following 30 cycles were used: 92°C for 30 s; 65°c for 40 s; 72°C for 40 s, each followed by 72°C for 7 min. Two µl of the 1:20 dilution of PCR product were mixed with 5 ul of formamide (95%) and loading buffer (5% blue dextran, 25 mM EDTA) that contained 0.5 µl ROX-350® internal size standard (Applied Biosystems, USA). After a step of denaturation (95°C for 5 min), 1.5 μl of this mixture was run onto a 12-cm length -5% acrylamide- Long-Ranger gel with 1X TBE buffer. Electrophoresis was performed on ABI 377® at 1600 V for one hour. The relationship between CA repeats and fragment length analysis of IL-10 microsatellites was determined using sequenced positive controls. The fragment length analysis was automatically determined by use of Genescan 3.1® and Genotyper® softwares (Applied Biosystems, USA).

# Factor V G1691C (Leiden) mutation identification by AS-PCR

PCR was performed as described previously (15, 16).

#### Statistical analysis

First, a univariate analysis was performed comparing variables and allelic frequencies between patients and cases. Allelic frequencies (defined as the number of copies of a specific allele divided by the total number of alleles in the group) were calculated in patient and control groups. Chi<sup>2</sup>- or Fisher's exact test and a Student t-test were used for frequency and age comparisons, respectively, between cases and healthy controls. Then we looked for a relationship between allelic frequencies and recurrence of thrombotic events in patients having presented one single thrombotic event and patients having experienced recurrent thrombotic events. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant. Multivariate analysis including genetic factors showing significance or a trend to correlation to thrombotic event (p  $\leq$ 0.2) in the univariate analysis, was performed with a logistic regression model. We also systematically included in this analysis the three SNPs –1082 G>A, –819 C>T, –592 C>A since they have been previously described as risk factors for inflammatory diseases. We performed a stepwise forward logistic regression with an entry threshold in the model at 0.2 (exit value = 0.35). Odds Ratio (OR) and confidence interval (CI) were calculated for each variable entered in the model.

### Results

### **Patient characteristics**

Patient characteristics of the present study are shown in Table 1. There were significant differences between case and control groups with regard to age and sex, but not to oral contraception. Thirty-six patients (48.65 %) presented with documented recurrent venous thrombotic events. Forty-three patients had a docu-

Table 1: Patients characteristics.

	Cases (n=74)	Controls (n=100)	P-value
Male	18 (24.3%)	32 (32.0%)	0.26
Female	56 (75.7%)	68 (68%)	
Age in years (SD)*	48.8 (16.7)	40.0 (10.9)	0.0001
Oral contraception	6 (8.1 %)	12 (12 %)	0.40
Recurrences	36 (48.65 %)		
Familial history of DVT/PE	43 (58.1 %)		

Data are expressed as an absolute number of patients and as a percentage (%); \*for age, mean (standard deviation) are given; n, number of subjects; DVT, deep venous thrombosis; PE, pulmonary embolism.

Table 2: Allelic frequencies of the factor V Leiden, the IL-10G, IL-10R micro satellites, -592C>A, -819C>T and -1082G>A SNPs.

	Allele	Cases (n=74)	Controls (n=100)	P-value
FV Leiden	1691A	0.14	0.02	<10-4
L-10 G micros	atellite			
	<b>G</b> 7	0.02	0.05	0.14
	G8	0.06	0.08	0.64
	G9	0.28	0.31	0.60
	GI0	0.14	0.09	0.10
	GII	0.11	0.13	0.64
	GI2	0.06	0.115	0.11
	GI3	0.23	0.16	0.04
	GI4	0.06	0.06	0.86
	GI5	0.006	0.005	0.82
L-10 R microsa	atellite			·
	R2	0.72	0.75	0.65
	R3	0.27	0.23	0.46
	R4	0.01	0.02	0.44
SNPs				
	-592A	0.22	0.29	0.003
	-819T	0.19	0.26	0.22
	-1082A	0.52	0.42	0.11

mented familial history of deep venous thrombosis/pulmonary embolism (DVT/PE).

### Univariate analysis

Allelic frequencies of FV Leiden and IL-10 polymorphisms were calculated in patients and controls (Table 2). Using an univariate analysis, we observed a significantly higher frequency of the factor V Leiden mutation in patients when compared with controls (14% vs. 2%; p<10<sup>-4</sup>). IL-10 SNP – 592A was statistically significantly different (p=0.003) between patients and controls, while IL-10 SNPs – 1082G>A, – 819C>T were not. The allelic frequencies in the IL-10G microsatellite polymorphisms were not statistically different between patients and controls, except for IL-10 G13 (p=0.04). However, there was a trend towards significance (p<0.20) for G7, G10 and G12 alleles. The

Table 3: IL-10 G10 and G13 allelic frequencies in patients experiencing single thrombotic event, in patients with recurrent thrombotic events and in controls.

		Cases (n=74)	
	> I event (n=36)	One event (n=38)	
IL-10 G7	0.01	0.03	0.05
IL-10 G10	0.18	0.10	0.09
IL-10 G12	0.08	0.05	0.115
IL-10 G13	0.22	0.25	0.16

n, number of subjects. Allelic frequencies were compared with the Chi<sup>2</sup>-test.

Table 4: Multivariate analysis including age, sex, FV Leiden mutation, –819 C>T, single nucleotide polymorphism, IL-10 G10, G12 and G13 alleles.

Variable		OR (95% CI)	P-value		
Age		1.06 [1.03–1.09]	<10-4		
Sex	male	1			
Jex	female	2.41 [1.03–5.67]	<0.05		
FV Leiden	A 1691	10.91 [2.99–39.85]	<10-3		
IL-10 Allele					
- 819	С	1			
-017	Т	0.45 [0.23–1.09]	0.08		
G10	•	2.83 [1.11–7.24]	0.03		
GI2		0.53 [0.2–1.4]	0.2		
GI3		3.33 [1.53–7.23]	<0.003		
OR: Odd Ratio; CI:	Confidence Interval.				

allelic frequencies of the IL-10R microsatellite were not statistically different.

We then compared the allelic frequencies in both groups of patients. In patients who had one single thrombotic event, IL-10 G10 allelic frequency was identical to controls (Table 3). Moreover, in patients who experienced recurrent events, IL-10 G10 allele was significantly higher than in controls (p=0.03).

#### **Multivariate analysis**

Based on the univariate analysis and after a search for the absence of interaction between variables, we performed a multivariate analysis including all variables showing significance or a trend toward significance (p<0.20): Age, FV Leiden and IL-10 G7, G10, G12, G13, -592A, -1082A alleles in a multivariate logistic regression analysis. In addition, we included the following variables: sex and SNP -819T. Results showed that IL-10 G10 and G13 alleles were independent risk factors for venous thrombosis. IL-10 G12 and -819T did not reach statistical significance although a trend to be protective factors was observed (Table 4). As expected, FV Leiden was a strong independent risk factor for venous thrombosis. Age and sex appeared to be significant risk factors.

### Discussion

The aim of this study was to determine whether a polymorphism in the IL-10 gene promoter could be associated with a high risk for venous thrombosis. In this population, the allelic frequency of FV Leiden was in agreement with currently reported allelic frequencies in Caucasian populations (17). No G20210A prothrombin mutation was observed in this cohort of patients. We then determined allelic frequencies of IL-10 gene promoter polymorphisms known to play a role in the modulation of the inflammatory process. Due to the high degree of complexity of IL-10 polymorphism, we performed the statistical analysis in two steps. An univariate analysis was performed in order to identify which IL-10 polymorphisms could be a risk factor for venous thrombosis (defined by a P-value  $\leq 0.20$ ). According to these criteria, G7, G10, G12 and G13 were selected for multivariate analysis. Moreover, we included in the multivariate analysis polymorphisms known to be implicated in inflammatory and autoimmune disorders, i.e. SNPs (18, 19). Finally, FV Leiden was included. Taken together, our data show that G13 is an independent risk factor for venous thrombosis (O.R. 2.18; p= 0.04). Moreover, IL-10 G10 allele is associated with recurrences

Many publications have been reported on the association between IL-10 gene promoter polymorphisms and miscellaneous diseases. SNPs were previously correlated to allergies and asthma (20), endometriosis (21), primary Sjögren's syndrome (22), type I diabetes (23), leprosy (24), melanoma outcome (25) and juvenile rheumatoid arthritis (19). IL-10G microsatellite polymorphisms were involved in the clinical expression of systemic lupus erythematosus (SLE) (26, 27), familial psoriasis (28), ankylosing spondylitis (29), reactive arthritis (30), multiple sclerosis (31), myasthenia (32), Crohn's disease and ulcerative colitis (33). To the best of our knowledge, this is the first clinical study reporting on the implication of IL-10 polymorphisms in deep venous thrombosis/pulmonary embolism.

Interestingly, the G13 allele was reported as being significantly more frequent in patients presenting with SLE (27), a disease known to be associated with an increase in IL-10 secretion (34). Two publications reported that G13 favoured familial psoriasis, a disorder in which an IL-10 deficiency is observed (28, 35). However, both studies failed to demonstrate an association between LPS-induced IL-10 secretion and the G13 allele.

A major difficulty in interpreting the publications is related to the fact that the IL-10 polymorphism nomenclature is not unified and has changed over time. This question of a standardized nomenclature has been raised by Kube, after a study conducted in Caucasian/African populations (36). Indeed, the terminology used to describe microsatellites can be misleading, using either a "G" terminology or fragment length PCR products while it would be more appropriate to use the number of CA repeats. In the present report, we chose the nomenclature after Eskdale, as the most currently used (4). We validated this classification comparing allelic frequencies found in our control population. Regarding the R allele, the nomenclature has changed since the publication of two novel alleles in 1998 (10).

The role of cytokines in the development of thrombotic and vascular diseases is poorly documented, although a cross-talk between coagulation and inflammatory processes is today well recognized.

The mechanism by which IL-10 polymorphisms may play a role in the onset of venous thrombosis remains to be clarified. The IL-10G microsatellite is located 1.1 Kb from the 5' flanking region of the transcription initiation site (37). Two NF  $\kappa$ B binding sites lie close together immediately upstream of the IL-10 G microsatellite, whereas one NF  $\kappa$ B binding site immediately clusters downstream of the IL-10 R microsatellite. We therefore speculate that the variation of G and R microsatellites could influence the rate of IL-10 transcription in response to pro inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ .

Our conclusions have to be confirmed in larger populations. In this respect, it would be worthwhile to determine whether the IL-10 polymorphism could determine the onset of venous thrombosis or predict recurrence in FV Leiden patients. For further clinical studies on IL-10 polymorphisms, a standardization of the nomenclature is mandatory.

### References

- 1. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369:64-7.
- 2. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 1991; 147: 3815–22.
- **3.** De Waal Malefyt R, Abrams J, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209–20.
- **4.** Eskdale J, Gallagher G. A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. Immunogenetics 1995; 42: 444–5.
- **5.** Eskdale J, Kube D, Gallagher G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. Immunogenetics 1996; 45: 82–3.
- **6.** Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet 1997; 24: 1–8.
- 7. Khatri VP, Caligiuri MA. A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malig-

- nancies. Cancer Immunol Immunother 1998; 46: 239-44.
- 8. Kube D, Platzer C, von Knethen A, et al. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. Cytokine 1995: 7: 1–7.
- 9. Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). Cytokine Growth Factor Rev 2002: 13: 403–12.
- 10. Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, et al. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. Lancet 1998: 352: 1282–3.
- 11. Downing LJ, Strieter RM, Kadell A, et al. IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis. J Immunol 1998; 161: 1471–6.
- 12. Henke PK, DeBrunye LA, Strieter RM, et al. Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis. J Immunol 2000; 164: 2131–41.

- 13. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, et al. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 258–68.
- 14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
- Hezard N, Cornillet-lefebvre P, Droulle C, et al. Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. Thromb Res 1997; 88: 59–66.
- **16.** Hezard N, Cornillet-lefebvre P, Gillot L, et al. Multiplex ASA PCR for simultaneous determination of factor V Leiden gene, G-->A 20210 prothrombin gene and C-->T 677 MTHFR gene mutations. Thromb Haemost 1998; 79: 1054–5.
- 17. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. JAMA 1997; 277: 1305–7.

- 18. Font J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, et al. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjogren's syndrome. Rheumatology 2002; 41: 1025–30.

  19. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposi-
- 19. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. Rheumatology 2001; 40: 574–8.
- 20. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, et al. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 1958–62.
- 21. Kitawaki J, Obayashi H, Ohta M, et al. Genetic contribution of the interleukin-10 promoter polymorphism in endometriosis susceptibility. Am J Reprod Immunol 2002: 47: 12–8
- 22. Anaya JM, Correa PA, Herrera M, et al. Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjogren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism. J Rheumatol 2002: 29: 1874–6.
- morphism. J Rheumatol 2002; 29: 1874–6. 23. Tegoshi H, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Polymorphisms of interferon-gamma gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type I diabetes. Hum Immunol 2002; 63: 121–8.
- 24. Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. J Infect Dis 2002: 186: 1687–91.

- 25. Martinez-Escribano JA, Moya-Quiles MR, Muro M, et al. Interleukin-10, interleukin-6 and interferongamma gene polymorphisms in melanoma patients. Melanoma Res 2002; 12: 465–9.
- 26. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. J Immunol 2001; 166: 3915–22.
- 27. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, et al. Association between polymophisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 1997; 49: 635–9.
- **28.** Asadullah K, Eskdale J, Wiese A, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis. J Invest Dermatol 2001: 116: 975–8.
- **29.** Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, et al. Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. Genes Immun 2003; 4: 74–6.
- 30. Kaluza W, Leirisalo-Repo M, Marker-Hermann E, et al. IL 10.G microsatellites mark promoter haplotypes associated with protection against the development of reactive arthritis in Finnish patients. Arthritis Rheum 2001; 44: 1209–14.
- **31.** Martinez Doncel A, Rubio A, Arroyo R, et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2002; 131: 168–72.

- 32. Huang DR, Zhou YH, Xia SQ, et al. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implication of diverses effects of Il-10 in the pathogenesis of the disease. J Neuroimmunol 1999; 94: 82–7.
- 33. Van der Linde K, Boor PP, Sandkuijl LA, et al. A Gly 15 Arg mutation in the interleukin-10 gene reduces secretion of interleukin-10 in Crohn disease. Scand J Gastroenterol 2003: 38: 611–7.
- **34.** Llorente L, Zou W, Richaud-Patin Y, et al. *In vivo* production of interleukin-10 by non-T-cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1994; 37: 1647–55.
- 35. Hensen P, Asadullah K, Windemuth C, et al. Interleukin-10 promoter IL10.G and familial early onset psoriasis. Br J Dermatol 2003; 149: 381–5.
- 36. Kube D, Schmidt D, Mörmann M, et al. Semiautomated and simultaneous analysis of the interleukin-10 microsatellites IL-G and IL-R by fluorescence-based polymerase chain reaction reveals significant differences in allele distributions between Caucasians (Germany) and Africans (Gabon). Eur Cytokine Netw 2001; 12: 537–44.
- 37. Eskdale J, Kube D, Tesch H, et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics 1997; 46: 120–8.

### III.2.2.2.2Principaux résultats

Les allèles IL-10G10 et G13 sont significativement plus fréquents dans la population de cas. De plus la fréquence de l'allèle IL-10G10 est significativement élevée dans la population de patients ayant fait des thromboses veineuses récidivantes que dans la population ayant fait une seule thrombose.

### III.2.2.3 Discussion

Nous avons conduit une étude clinique prospective comparant la fréquence allélique de cinq polymorphismes du promoteur du gène de l'IL-10 dans une population de patients (n=74) ayant fait au moins une thrombose veineuse et dans une population de témoins sains (n=100) sans antécédent familial ou personnel de maladie thrombo-embolique, recrutés parmi le personnel du laboratoire d'Hématologie du CHU de Reims. Les patients et les témoins étaient tous d'origine caucasienne. Les patients inclus dans l'étude n'avaient pas de déficit en antithrombine, protéine C ou protéine S. Parmi ces patients, 48,65% avaient fait au moins deux thromboses. Le sexe ratio et le nombre de femmes prenant une contraception orale n'étaient pas significativement différents entre le groupe de témoins et le groupe de patients. Le groupe de cas avait une moyenne d'âge significativement plus élevée que le groupe témoin. La mutation facteur V Leiden étant le facteur de risque constitutionnel le plus fréquent de la maladie thrombo-embolique veineuse, nous avons déterminé sa fréquence et l'avons inclus dans notre analyse statistique. Les fréquences alléliques de la mutation FV Leiden, déterminées dans nos groupes patients et témoins, sont proches de celles classiquement décrites dans les populations caucasiennes générales ou dans les populations de patients caucasiens ayant fait une thrombose veineuse (232) (233). Les patients et les témoins recrutés n'avaient pas de particularité concernant ce facteur de risque constitutionnel.

Les fréquences des allèles –592A, -819T et –1082A de nos témoins étaient respectivement de 29, 26 et 42%. Les fréquences des allèles –592A, -819T et –1082A décrites dans la littérature chez des témoins sains varient respectivement de 21 à 38%, 21 à 23% et 36 à 94% (**Article, Tableau 2**). Nos fréquences sont proches de celles de la littérature quand elles sont déterminées dans des populations caucasiennes. En effet les fréquences de 38% pour l'allèle –592A et 94% pour l'allèle –1082A ont été observées respectivement dans une population africaine du Gabon et dans une population chinoise dont la région n'a pas été précisée (**Thèse, Tableau IV**). Les fréquences des allèles des microsatellites IL-10G et IL-

10R sont également très variables. Les différences les plus marquées pour les microsatellites IL-10R et G concernent les fréquences observées chez les Ecossais de Glasgow et les Gabonais (**Thèse, Tableau IV**). L'origine ethnique des patients et des témoins recrutés dans les études doit être impérativement précisée afin de pouvoir comparer des résultats. De plus la nomenclature utilisée dans les articles n'étant pas toujours clairement déterminée (voir chapitre I 1.16.4.), l'interprétation des résultats des études peut être erronée.

Nous avons ensuite inclus dans notre analyse statistique (analyse univariée suivie d'une analyse multivariée) les fréquences des allèles des cinq polymorphismes étudiés (IL-10G, IL-10R, -592A, -819T et -1082A) et de la mutation facteur V Leiden. Nous avons également inclus dans notre analyse l'âge et le sexe qui sont décrits comme des facteurs de risque de maladie thrombo-embolique (234) (235). L'âge est un facteur de risque significatif de thrombose veineuse dans notre étude. Nos résultats montrent également que le sexe féminin est un facteur de risque de survenue de thrombose. Les patients recrutés au cours de l'étude avaient consulté indifféremment pour des thromboses veineuses spontanées ou survenues après un facteur déclenchant. Parmi ces derniers, nous avons inclus les patientes ayant fait une thrombose veineuse à la suite de la prise d'une contraception orale, pendant une grossesse ou en post-partum. Au total, soixante quinze pourcents des patients recrutés étaient des femmes (versus 68% des témoins) et le facteur sexe féminin a été identifié comme un facteur de risque dans l'analyse multivariée bien que le sexe ratio ne soit pas significatif en analyse univariée. Cependant la revue des principales études sur le sexe ratio et son incidence sur la maladie thrombo-embolique montre que l'incidence entre les deux sexes est probablement très proche (236).

Nous avons montré que les allèles IL-10G10 et IL-10G13 du microsatellite IL-10G étaient des facteurs de risque significatifs de survenue de thrombose veineuse dans notre étude. De plus l'allèle IL-10G10 avait une fréquence plus élevée dans le groupe de patients caractérisés par l'expression de thromboses veineuses récidivantes. Ces deux allèles, seuls ou sous forme d'haplotype, ont déjà été identifiés dans la littérature comme facteurs de risque de pathologies de type dysimmunitaire le plus souvent (**Tableau XIX et XX**). Cependant certaines études ayant identifiés le même allèle (IL-10G13) comme facteur de risque (197) (237-239) retrouvent des dosages d'IL-10 soit augmentés soit diminués par rapport à leurs témoins sains. Cette constatation rend l'interprétation du potentiel rôle physiopathologique des allèles du microsatellite Il-10G difficile. Lors de l'analyse de la littérature, on remarque cependant que les allèles les plus fréquemment corrélés à la survenue d'une pathologie ont de façon homogène un nombre de répétition de CA élevé. Ainsi, trois études ont analysé des

allèles du microsatellite IL-10G dans la survenue de réaction du greffon contre l'hôte au cours des allogreffes de moelle osseuse (**Tableau XX**). De façon intéressante, les auteurs ont choisi de comparer la fréquence de l'ensemble des allèles de petite taille (moins de 26 répétitions de CA, nomenclature d'Eskdale J, **Tableaux I**) à celle de l'ensemble des allèles de grande taille (plus de 26 répétitions de CA). Cette approche facilite l'interprétation de l'impact que pourrait avoir le nombre de répétition de CA du microsatellite Il-10G dans la transcription du gène de l'IL-10. En effet, trois sites de fixation de NF<sub>x</sub>B ont été identifiés à proximité de ce microsatellite (197). On peut émettre l'hypothèse qu'à partir d'une certaine taille (ou nombre de répétitions de CA), les facteurs de transcription ayant leur site de fixation à proximité du microsatellite IL-10G auraient leur efficacité modifiée. La seule expérimentation qui permet d'évaluer cette hypothèse est l'analyse des modifications de l'activité transcriptionnelle induites sur un gène rapporteur par la transfection du microsatellite IL-10G à différentes tailles dans un promoteur. Cette approche expérimentale est actuellement en train d'être réalisée au laboratoire.

Tableau XIX Allèles du microsatellite IL-10G et pathologies : revue de la littérature

Auteurs	Pathologies	Patients	Témoins	Résultats
	Lupus érythémateus			
Eskdale J, Tissue Antigens 1997 (197)	Lupus érythémateux disséminé	56 caucasiens	102 caucasiens	IL-10G9:  ↓ chez les patients Il-10G13: ↑ chez les patients
Mehrian R, Arthritis & Rheum 1998 (198)	Lupus érythémateux disséminé	158 américains d'origine mexicaine	223 témoins d'origine mexicaine	II-10G10 : ↑ chez les patients
D'Alfonso S, Arthritis Rheum 2000 (31)	Lupus érythémateux disséminé	159 italiens (65% du nord, 35% du sud)	164 Italiens (65% du nord, 35% du sud)	II-10G11 : ↑ chez les patients
	Polyarthrite rhumatoïde			
Eskdale J, The Lancet 1998 (45)	Polyarthrite rhumatoïde	-103 caucasiens originaires de Glasgow - 148 caucasiens originaires d'Oxford	- 94 caucasiens originaires de Glasgow - 87 caucasiens originaires d'Oxford	Pas de fréquence allélique significativement différente entre les patients et les témoins.
Kaluza W, Arthritis Rheum 2001 (32)	Polyarthrite rhumatoïde	85 finlandais	62 finlandais	II-10G10 :  ↑ chez les patients IL-10G12 :  ↑ chez les patients
Schotte H, Ann Rheum Dis 2005 (240)	Polyarthrite rhumatoïde et réponse au traitement par récepteur au TNF rh (Etanercept®)	50 Caucasien allemands - 25 bon répondeurs - 25 partiel ou non répondeurs		II-10G9 :  - ↓ chez les mauvais répondeurs  IL-10G13 :  - ↑ chez les mauvais répondeurs
	Psoriasis			
Asadullah K, J Invest Dermatol 2001 (237)	Psoriasis	80 caucasiens allemands	90 caucasiens allemands	II-10G13 :  ↑ chez les patients avec des antécédents familiaux de psoriasis (n=26) / patients sans antécédents familiaux (n=56)
Hensen P, Br J Dermatol, 2003 (239)	Psoriasis	137 familles indépendantes caractérisées par la présence de deux membres atteints de psoriasis, analyse statistique à partir des parents et du propositus.		II-10G13 : Pas de corrélation avec le psoriasis familial  II-10G9 : Rôle protecteur mineur

 $<sup>(\</sup>uparrow : Fr\'{e}quence \ augment\'{e}; \downarrow : fr\'{e}quence \ diminu\'{e}; \ GVHD: \ greffon \ versus \ host \ disease \ ; \ SMD: \ syndrome \ my\'{e}lodysplasique \ ; \ LNH: \ lymphome \ non \ hodgkinien \ ; \ MM: \ my\'{e}lome \ multiple)$ 

Tableau XX Allèles du microsatellite IL-10G et pathologies : revue de la littérature (suite)

Auteurs	Pathologies	Patients	Témoins	Résultats
	<b>Réaction du greffon contre l'hôte (GVHD)</b> (greffe allogénique de moëlle osseuse)			
(241)	GVH aiguë post allogreffe chez des patients atteints de leucémies aiguës ou chroniques, myéloïdes ou lymphoïdes, de SMD.	49 patients sans origine précisée (Newcastle, Grande Bretagne?)	28 contrôles sans origine précisée	II-10G12 à G15 :  ↑ chez les patients faisant des GVH stade III ou IV (n=9/11) versus les autres stades (n=18/38)
Cavet J Blood 1999 (242)	GVH aiguë et chronique post allogreffe chez des patients atteints de Leucémies aiguës ou chroniques, myéloïdes ou lymphoïdes, de SMD, de LNH, de MM ou autre (non précisé)	GVH aiguë: 88 paires donneurs/receveur GVH chronique: 55 paires donneurs/receveur Pas origine précisée (Minneapolis, Minnesota?)		II-10G12 à G16 :  ↑ chez les patients faisant des GVH stade III (17/76) et IV versus IL-10G7 à G11 faisant des GVH stade III ou IV (n=2/51)
Takahashi, Bone Marrow Transplant 2000 (243)	GVH aiguë et chronique post allogreffe (hémopathies non précisées)	GVH aiguë: 62 paires donneurs/receveur GVH chronique: 54 paires donneurs/receveur Pas origine précisée (Niigata, Japon?)		Allèles ≤ II-10G13 : Plus fréquents chez les donneurs des patients évoluant en GVH chronique (13/26 versus 5/28)
	Autres			
Huang D, J Neuroimmunol, 1999 (244)	Myasténie gravis	145 caucasiens suédois	109 suédois	II-10G8 : ↑ chez les patients forts producteurs d'anticorps anti-récepteur de la N- acétylcholine (n=21)
Hennig BJW, Genes Immun 2000 (245)	Maladie péri-odontale	72 caucasiens de Newcastle et Birmingham (UK)	73 caucasiens	Pas de différence significative entre les patients et les témoins
Anaya J-M, J Rheum 2002 (246)	Syndrome de Sjögren	Origine non précisée (Colombie ?) - 20 forts producteurs d'IL-10 - 19 faibles producteurs d'IL-10	Aucun	II-10G9 : ↑ chez les patients forts producteurs
Zhou Y, J Rheumatol 2002 (33)	Maladie de Wegener	36 suédois	109 suédois	IL-10G8 : ↑ chez les patients

 $<sup>(\</sup>uparrow$ : Fréquence augmentée ;  $\downarrow$ : fréquence diminuée ; GVHD: greffon versus host disease ; SMD : syndrome myélodysplasique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; MM : myélome multiple)

### III.2.3 Modèle de la pathologie obstétricale vasculo-placentaire

### **III.2.3.1 Introduction**

La fausse-couche spontanée est un événement qui concerne environs 15% des grossesses. C'est la complication la plus fréquente des grossesses Aujourd'hui approximativement 0,5 à 2% des femmes font des fausses-couches (FC) récidivantes (trois ou plus) (247) (248). De plus, aucune étiologie n'est retrouvée dans plus de 40% des fausses-couches (249). Deux évènements majeurs sont indispensables au maintien de la gestation: la tolérance par le système immun maternel du fœtus et du placenta ainsi que le bon fonctionnement de ce dernier. Ainsi, plusieurs études ont montré qu'une inhibition de l'immunité maternelle de type Th1 à l'interface fœto-maternel était nécessaire au maintien de la grossesse (207) (250). Par ailleurs, certains facteurs de risque de thrombophilie, constitutionnels ou acquis, entraînent une altération du placenta et sont associés à la survenue de FC (251) (252). Dans ce contexte il nous a semblé intéressant d'évaluer le rôle des polymorphismes du promoteur de l'IL-10 dans la survenue de FC. En effet cette cytokine a la propriété d'une part de diminuer l'expression des cytokines de type Th1 et d'autre part de diminuer l'expression du FT, principal initiateur de la coagulation.

### III.2.3.2 Matériel et méthode

### Etude et Population

Nous avons fait une étude rétrospective de la fréquence des polymorphismes du promoteur de l'IL-10 sur 465 femmes caucasiennes ayant fait des FC. Ces femmes n'avaient jamais eu d'enfant et consultaient pour des FC consécutives à des grossesses naturelles. Toutes les femmes incluses dans cette étude avaient bénéficié d'une exploration biologique prescrite par leur médecin. Elles n'avaient, en revanche, pas eu d'expertise hémostatique de leur dossier obstétrical (**Figure 7**). Elles étaient recrutées de 1997 à 2002. Le but de notre étude étant de corréler les polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 avec la période de survenue des FC (exprimée en semaines d'aménorrhée), nous avons classé les patientes en deux groupes : le groupe cas constitué de patientes ayant fait toutes leurs FC

avant 10 semaines d'aménorrhée (SA) (n=342) et le groupe contrôle constitué de patientes ayant fait toutes leurs FC après 10 SA (n=123).

La recherche des principaux facteurs de risque de FC (pathologies infectieuses, désordres endocriniens et métaboliques, anomalies anatomiques utérines, incompatibilité Rhésus, PTI, thrombocytopénie allo-immune foeto-maternelle) était négative. La recherche de facteurs de risque biologique de thrombophilie (vitamine B12 et B9 intra-érythrocytaire, homocystéinémie, protéine C (PC), protéine S (PS), résistance à la PC activée, facteur VIII, facteur XII, anticorps anti-phospholipide / cofacteurs) et la réalisation d'un caryotype étaient prescrits. Les dosages biologiques étaient effectués à distance de toute FC (au moins 8 semaines). Ces femmes n'avaient pas d'antécédent personnel de thrombose veineuse.

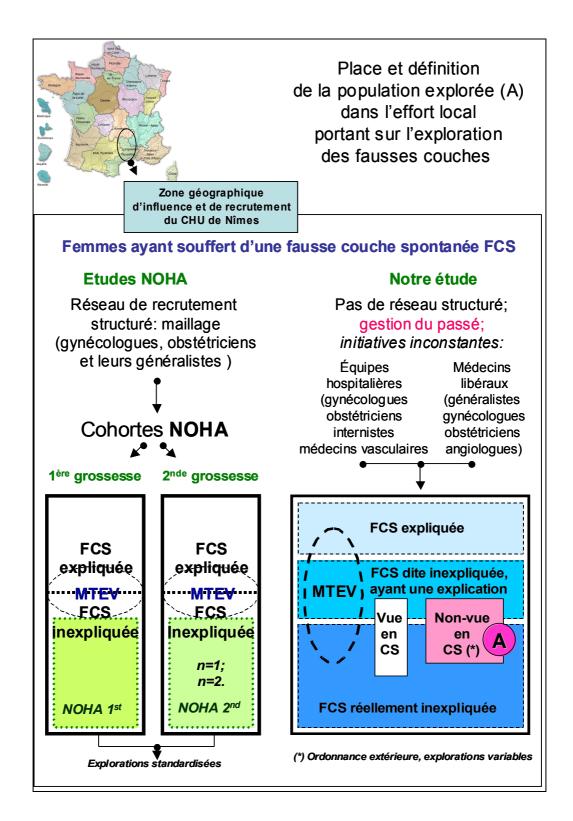


Figure 7. Recrutement de la population (A) de notre étude.

 $(FCS: fausses-couches\ ;\ CS: consultation\ ;\ METV:\ maladie\ thrombo-embolique\ veineuse;\ NOHA:\ The\ N\^imes\ Obstetricians\ and\ Haematologists\ Study)$ 

### *Analyse statistique*

Nous avons évalué les déséquilibres de liaison des 4 polymorphismes étudiés (microsatellites IL-10R et G, SNP –592C>A et –819C>T) par un test du  $\chi^2$  de Hardy Weinberg.

L'indépendance des variables a été testée.

Une analyse univariée a permis la comparaison des fréquences alléliques des polymorphismes génétiques de l'IL-10 et des paramètres biologiques dans les deux groupes de patientes. Un test du χ2 ou un test exact de Fisher et un test de t de Student ont été réalisés. Des valeurs de P<0,05 ont été considérées comme significatives. Nous avons ensuite réalisé une analyse multivariée. Les variables (paramètres biologiques ou allèles) proposées au modèle de régression logistique devaient avoir présenté en univarié un seuil de significativité égal ou inférieur à 0,20. Nous avons également proposé au modèle les différents génotypes formés par les deux SNP, -819C>T et -592C>A. On a réalisé une régression logistique ascendante pas à pas. L'Odds Ratio (OR) et l'intervalle de confiance (IC) ont été calculés pour chaque variable entrée dans le modèle. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS v8.0 (SAS Institute, Cary, NC).

Détermination des allèles des SNPs -819C>T et -592C>A par PCR ASA ou Amplification Spécifique d'Allèle et des allèles des microsatellites IL-10G et IL-10R par analyse de taille Voir chapitre I.1.16.2.2

### III.2.3.3 Résultats

# III.2.3.3.1 Analyse univariée

### Description de la population

Au cours de cette étude rétrospective, nous avons comparé deux groupes de patientes, toutes caractérisées par la survenue de FC. Les patientes recrutées au cours de cette consultation ont fait majoritairement des FC récidivantes (**Tableau XXI**). Le groupe cas était composé de 342 patientes pour lesquelles la date de survenue de toutes leurs FC était inférieure ou égale à 10 SA. Le groupe contrôle comprenait 123 patientes ayant fait toutes leurs FC au-delà de 10 SA. L'âge moyen et le nombre de FC n'étaient pas significativement différents entre le groupe cas (FC $\leq$ 10 SA) (32,3  $\pm$  4,9 ans et 2,49  $\pm$  0,97 FC) et le groupe contrôle (FC $\geq$ 10 SA) (32,9  $\pm$  4,54 ans et 2,37  $\pm$  1,34 FC).

Le nombre total de FC par patientes était réparti de 1 à 9 (**Tableau XXI**). Lors de l'analyse de la répartition des FC par SA, on constatait que toutes les FC des sept femmes qui avaient fait plus de cinq FC survenaient à la même période (**Tableau XXII**).

Tableau XXI Répartition du nombre de fausses-couches totales dans le groupe cas (toutes les FC≤10 SA) et dans le groupe contrôle (toutes les FC>10 SA).

Nombre total de FC	Cas (n=342)	Contrôles (n=123)
1	26	22
2	184	65
3	88	22
4	33	7
5	8	3
6	-	1
7	2	1
8	1	-
9	-	2

(FC: fausses-couches; n= nombre de patientes)

# Tableau XXII Répartition des patientes caractérisées par un nombre élevé de fausses-couches en fonction du nombre de FC et de leur période de survenue.

	Cas				Contrôles		
Nombre de FC total	Nombre de patientes	< 4 SA	4 – 8 SA	8 - 10 SA	Nombre de patientes	10 – 22 SA	> 22 SA
6	-	-	-	-	1	1	-
7	2	1	1	_	1	1	-
8	1	-	1	_	_	_	-
9	-	-	-	-	2	1	1

(FC: fausses-couches; SA: semaines d'aménorrhée)

Parmi les facteurs de risque biologique explorés (**Tableau XXIII**), seul le taux en PS inférieur à 65% avait une fréquence significativement différente entre les deux groupes : celle-ci était plus élevée dans le groupe contrôle (FC>10 SA) (23,39% pour les cas versus 34,15% pour les contrôles). La présence d'au moins un facteur de risque de thrombophilie tendait à être plus fréquente dans le groupe contrôle que dans le groupe cas ( $P \le 0,20$ ). Par ailleurs 2,5% des patientes du groupe cas avaient des anomalies caryotypiques, alors qu'aucune anomalie chromosomique n'avait été retrouvée dans le groupe contrôle ( $P \le 0,20$ ).

Tableau XXIII Caractéristiques biologiques des patientes du groupe cas (toutes les  $FC \le 10$  SA) et du groupe contrôle (toutes les  $FC \ge 10$  SA).

	Cas	Contrôles	Valeur de P
	(n=342)	(n=123)	
Taux de PC abaissé (<65%)	0.58 %	1.63 %	0.28
Taux de PS abaissé (< 65%)	23.39 %	34.15 %	0.02
RPCA positive	3.25 %	5.85 %	0.26
FVIII >150%	0 %	0.81 %	0.26
Déficit FXII	2.05 %	0.81 %	0.68
Carence en folates	1.46 %	0.81 %	0.99
Hyper homocystéinémie	3.80 %	2.44 %	0.57
Carence en B12	0 %	0.29 %	0.99
Présence d'au moins un des	32.46	39.02	0.18
facteurs de risque de			
thrombophilie précédents			
ANA positifs	20.47 %	21.95 %	0.72
Anti thyroïdien positifs	5.85 %	4.88 %	0.68
LA positifs	7.02 %	5.69 %	0.61
Anti-Annexine V positifs	2.34 %	2.44 %	0.95
Anti-béta 2 GpI positifs	10.53 %	8.13 %	0.48
Anti-cardiolipine positifs	6.73 %	8.94 %	0.41
Anomalie chromosomique	2.05 %	0 %	0.19

(n= nombre de patientes ; caractères gras :  $P \le 0.20$  ; PC : protéine C ; PS : protéine S ; RPCA : résistance à la protéine C activée ; ANA : anticorps anti-nucléaires ; LA : anticoagulant lupique ; ) (P < 0.05 est significatif ; Test du  $\chi^2$ )

Analyse des polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10 : -819C>T, -592C>A, IL-10G et IL-10R

Les fréquences alléliques des deux SNP situés en position -819 et -592 ainsi que du microsatellite IL-10R n'ont pas de répartition significativement différente, dans notre population totale de patientes, de celle d'une population générale (p>0,05 ;  $\chi^2$  de Hardy-Weinberg).

En revanche les fréquences alléliques du microsatellite IL-10G ne sont pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg (p<0,05 ;  $\chi^2$  de Hardy-Weinberg).

Nous avons déterminé les fréquences alléliques des deux SNP −819C>T et −592C>A et des deux microsatellites II-10G et IL-10R dans les deux groupes de patientes (**Tableau XXIV**). Aucun des allèles du microsatellite IL-10G n'avait de fréquence significativement différente entre les deux groupes. On notait cependant que les fréquences des allèles G8 et G11 tendaient à être significativement différentes entre les deux groupes de patientes. L'allèle IL-10R3 était significativement moins fréquent dans le groupe de cas (toutes les FC≤10 SA) (**Tableau XXIV**). Les allèles mutés -592A et −819T étaient significativement plus fréquemment identifiés dans le groupe de cas (*P*<0,0001).

Tableau XXIV Fréquences alléliques des microsatellites IL-10G, IL-10R et des polymorphismes génétiques de substitution -592C>A et -810C>T des groupes cas (toutes les FC $\le$ 10 SA) et contrôle (toutes les FC>10 SA).

	Allèle	Cas (n=342)	Contrôles (n=123)	Valeur de <i>P</i>
IL-10G microsatellite			,	
	G4	0	0.0040	0.26
	G5	0	0	-
	G6	0.0307	0.0285	0.85
	G7	0.0994	0.0976	0.94
	<b>G8</b>	0.3055	0.2399	0.051
	G9	0.0599	0.0447	0.37
	G10	0.1228	0.1422	0.43
	G11	0.0950	0.1300	0.12
	G12	0.1915	0.1992	0.79
	G13	0.0833	0.1016	0.38
	G14	0.0087	0.0122	0.70
	G15	0.0029	0	0.99
IL-10R microsatellite				
	R0	0.0014	0	0.99
	R1	0.7631	0.7602	0.92
	R2	0.2178	0.1992	0.54
	R3	0.0175	0.0406	0.04
	R4	0	0	_
SNPs				
	-592A	0.3260	0.1585	< 0.0001
	-819T	0.3289	0.1626	< 0.0001

(n= nombre de patientes ; caractères gras :  $P \le 0.20$  ; SNP : polymorphisme de substitution d'acide nucléique) ( $P \le 0.05$  est significatif ; Test du  $\chi^2$  )

Nous avons également déterminé les fréquences des génotypes formés par les SNP – 819C>T et –592C>A (**Tableau XXV**). En raison du faible nombre de l'effectif de certains génotypes, nous les avons regroupés en fonction du nombre d'allèles mutés (-592A et –819T) présents dans le génotype puis nous avons comparé la fréquence de ces génotypes entre les deux groupes de patientes (**Tableau XXVI**). Les patientes ayant fait des fausses-couches avant 10 SA avaient des génotypes qui comportaient significativement un plus grand nombre d'allèles mutés.

Tableau XXV Fréquence des génotypes identifiés dans le groupes cas (toutes les FC≤10 SA) et contrôle (toutes les FC>10 SA).

<b>Génotypes</b> (-819C>T/-592C> <b>A</b> )	Cas (n=342)	Contrôles (n=123)
CC / CC	128 (37,4 %)	77 (62,6 %)
TC / CC	28 (8,19 %)	12 (9,76 %)
TC / AC	125 (36,55 %)	20 (16,26 %)
CC/AC	17 (4,97 %)	9 (7,32 %)
TT/CC	3 (0,88 %)	0
TT/AC	1 (0,29 %)	0
CC/AA	2 (0,58 %)	0
TC/AA	12 (3,51 %)	2 (1,63 %)
TT/AA	26 (7,6 %)	3 (2,44 %)
22/114	20 (7,0 70)	5 (2,44 /0)

(Nombre de patientes et (%)).

Tableau XXVI Fréquences des génotypes regroupés en fonction du nombre d'allèles mutés dans le groupes cas (toutes les  $FC \le 10 \text{ SA}$ ) et contrôle (toutes les FC > 10 SA).

<b>Génotype</b> (-819C>T/-592C> <b>A</b> )		Cas (n=342)	Contrôles (n=123)	Valeur de <i>P</i>
2 SNP homozygotes normaux				
	-819CC / -592CC	128 (37,43 %)	77 (62,6 %)	< 0,0001
1 ou 2 SNP hétérozygote			•	
	-819TC / -592CC			
	CC / AC	170 (49,71 %)	41 (33,33 %)	
	TC / AC			
1 SNP homozygote muté et 1				
SNP hétérozygote ou homozygote normal				
normai	-819 <b>TT</b> / -592CC			
	TT / CA			
	CC / AA	18 (5,26 %)	2 (1,63 %)	
	CT / AA			
2 SNP homozygotes mutés				
	-819 <b>TT</b> / -592 <b>AA</b>	26 (7,60 %)	3 (2,44 %)	

(Nombre de patientes et (%); P < 0.05 est significatif; Test du  $\chi^2$ )

#### III.2.3.3.2Analyse multivariée

Nous avons proposé au modèle les variables significativement différentes (*P*<0,05) ou ayant tendance à être différentes (*P*<0,2) dans l'analyse univariée entre les deux groupes de patientes. Elles comprenaient : le taux en PS inférieur à 65%, la présence d'au moins un facteur de risque de thrombophilie, les anomalies chromosomiques, les allèles IL-10G8, G11, R3, -592A et –819T ainsi que les quatre groupes de génotypes décrits dans le **tableau XXVI**. Le modèle a retenu comme facteur de risque de survenue de fausses-couches avant 10 SA (groupe cas) les allèles –819T et IL-10G8 (**Tableau XXVII**). De plus le risque associé à l'allèle –819T doublait lorsque cet allèle était présent à l'état homozygote comparativement à l'état hétérozygote (OR=6,29 versus OR=3,41). L'allèle IL-10R3 était associé à la survenue de FC après 10 SA.

Tableau XXVII Variables dont les fréquences sont significativement différentes entre les deux groupes de patientes en analyse multivariée.

Variables		OR (95% IC)	Valeur de P
Allèle – 819T	C/C	1	
	C/T	3.41(2.19 - 5.31)	< 0.0001
	T/T	6.29 (1.86 – 21.26)	0.003
Allèle IL-10G8	Absent	1	
	Hétérozygote	1.87 (1.292 – 2.699)	0.0009
Allèle IL-10R3	Absent	1	
	Hétérozygote	0.38(0.153 - 0.966)	0.042

(OR : Odds Ratio ; IC : intervalle de confiance ; P<0,05 est significatif)

#### **III.2.3.4 Discussion**

Le but de notre étude était de corréler la période de survenue des FC à la présence de polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10. Nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit en l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire de type Th2, pourrait provoquer la survenue de FC. En effet plusieurs études ont démontré l'importance de l'environnement cytokinique à l'interface materno-fœtale (207) et ce dès l'implantation. La tolérance par l'organisme maternel du fœtus, qui constitue une semi-allogreffe, nécessite une immunité de type Th2, celle-ci neutralisant une réponse maternelle de type Th1 dirigée contre le fœtus. D'autre part, lors de l'apparition de la circulation artérielle ombilico-placentaire, mesurable à partir de la 10<sup>ème</sup> SA (253), le rôle de l'IL-10 dans le maintien de l'homéostasie de l'hémostase placentaire notamment via la régulation de l'expression du FT pourrait être primordial. Ainsi, un déficit en IL-10 pourrait entraîner une non tolérance immunitaire par l'organisme maternel et également une altération de la circulation ombilico-placentaire. Les polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10 pouvant être à l'origine de phénotype « bon » ou « mauvais producteur d'IL-10 », nous avons étudié les fréquences alléliques de quatre d'entre eux (les deux SNP -592C>A et -819C>T et les deux microsatellites IL-10G et IL-10R) dans une population de 465 patientes qui avaient toutes fait une ou plusieurs FC. Le placenta devenant la source essentielle d'approvisionnement sanguin à partir de la 10<sup>ème</sup> SA, nous avons divisé les 465 patientes en deux groupes : un groupe appelé « groupe cas » constitué de femmes ayant fait toutes leurs FC avant 10 SA et un groupe dénommé « groupe contrôle » constitué de femmes ayant fait toutes leurs FC après 10 SA.

Nous avons réalisé un test du  $\chi^2$  afin d'évaluer si les allèles des quatre polymorphismes génétiques analysés dans notre population de 465 femmes avaient des fréquences différentes de celle de la population générale selon la loi de Hardy-Weinberg. La distribution allélique n'était significativement pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour le microsatellite IL-10G (P<0,0001) et tendait à ne pas l'être pour le SNP –592 C>A (P<0,06). Ce résultat était attendu car notre population d'intérêt était par définition sélectionnée (femmes ayant présenté au moins une FC). Les allèles du microsatellite IL-10R et du SNP – 819C>T n'étaient pas en déséquilibre de liaison par rapport à la population générale, ceci ne

préjugeait pas de la répartition des génotypes de ces polymorphismes dans les deux sousgroupes de patientes définies par la période de survenue de leurs FC.

L'âge moyen des deux groupes de patientes n'était pas différent et ne constituait donc pas, dans notre étude, un facteur de risque corrélé à la période de survenue des FC (FC avant ou après 10 SA).

La majorité des patientes de notre étude, caractérisées par la survenue de toutes leurs FC avant ou après 10 SA, avaient consulté après deux ou trois épisodes de FC. De plus, ces femmes n'avaient jamais eu d'enfant et avait eu une exploration des principaux facteurs de risque de FC négative (chapitre matériel et méthode). Ces patientes sont représentatives des femmes susceptibles de bénéficier d'une exploration biologique des facteurs de risque hématologiques associés à la survenue de FC. Nous avons également observé, que lorsque le nombre de fausses-couches chez une même patiente était supérieur ou égal à six, ces interruptions de grossesse avaient lieu à la même période. Il se pourrait qu'un même mécanisme physiopathologique soit à l'origine de ces FC.

L'analyse des fréquences des anomalies biologiques montrait qu'un taux inférieur à 65% en PS était significativement plus fréquent chez les patientes faisant toutes leurs FC après 10 SA. Le test de Résistance à la protéine C activé (RPCA) était également fréquemment anormal dans ce groupe de femmes, mais la différence n'était pas significative (5,85% versus 3,25%; P=0,26). De plus, l'identification d'un facteur de risque de thrombophilie était également plus fréquente parmi les femmes de ce groupe (39,02 % versus 32,46%; p≤0,2). Ces résultats sont en adéquation avec l'évolution du placenta et l'apparition de la circulation artérielle ombilico-placentaire, un facteur de thrombophilie pouvant à cette période induire un état d'hypercoagulabilité associé à des dépôts de fibrine inadéquats et aboutir à un infarcissement du placenta. Plusieurs études épidémiologiques ont corrélé significativement les thrombophilies biologiques les plus fréquentes, la mutation Facteur V Leiden et la mutation 20210A>G de la prothrombine, à la survenue de perte de grossesse avec des valeurs de surrisque plus importantes pour les évènements tardifs (254-256). Dans son étude cas-témoin NOHA First avec appariement sur tous les facteurs confondants, Gris JC (257) montre un risque accru de FC inexpliquées ne survenant qu'à partir de la 10<sup>ème</sup> SA chez les Caucasiennes porteuses de la mutation facteur V Leiden ou de la mutation 20210A>G de la prothrombine. Ce risque a été évalué dans une population de femmes ayant fait une FC au cours de sa première grossesse. Notre recrutement, différent de celui de la NOHA car nous avons inclus de femmes ayant fait une ou plusieurs FC inexpliquées, peut expliquer les différences non significatives des fréquences des facteurs de risques de thrombophilie,

notamment le test de RPCA, entre nos deux groupes. Par ailleurs la recherche de la mutation de la prothrombine n'était pas réalisée les premières années du recrutement.

Notre analyse des anticorps anti-phospholipide / cofacteur n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes de patientes. Dans notre étude ces paramètres ont été codés de façon dichotomique : présence ou absence, les immunoglobulines M et G avaient été regroupées. Néanmoins, les fréquences de ces facteurs, similaires dans les deux groupes de patientes, sont proches de celles décrites dans la littérature (251). L'absence de stratification des valeurs quantitatives des dosages de ces anticorps anti-phospholipide / cofacteur est très certainement un élément limitant à l'interprétation de leur rôle possible ou non dans la survenue de FC en fonction du terme et notamment du seuil fixé à 10 SA. Les mécanismes physiopathologiques de survenue de FC en présence d'anticorps antiphospholipides sont de deux types : ils provoquent des coagulopathies et des thromboses du placenta (258), mais ils sont également à l'origine de dysrégulation du turn-over des trophoblastes. En effet, il a été montré qu'ils provoquent une augmentation de leur apoptose, notamment par activation du complément à la surface des trophoblastes (259), une diminution de leurs mitoses et de leur pouvoir invasif (260). Il a également été montré que les héparines d'une part diminuent le phénomène apoptotique et l'activation du complément induit par les anticoagulants lupique et d'autre part restaurent le pouvoir invasif des trophoblastes. Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que les anticorps anti-phospholipides / cofacteurs pourraient provoquer des FC très précoces (<4 SA), des FC précoces et des FC tardives.

La littérature décrivant le rôle des polymorphismes du promoteur du gène de l'IL-10 dans la survenue de FC n'est pas abondante (**Tableau XV**). En revanche de plus nombreuses études cliniques ont tenté de corréler les taux d'IL-10 à la survenue de fausses-couches (205) (250) (261). Les résultats décrits dans la littérature sont discordants. Les taux d'IL-10 identifiés chez des patientes ayant fait des fausses-couches récidivantes idiopathiques sont soit plus élevés (261) (262) soit plus bas (205) (250) que le groupe témoin. Ces discordances dans le dosage de l'IL-10 peuvent être imputées aux modèles expérimentaux utilisés qui diffèrent très souvent (dosage sérique, culture de cellules mononucléées en présence d'activateurs variables). Le statut infectieux des patientes, hormis les sérologies conventionnelles effectuées au cours des bilans de stérilité, n'est pas décrit. Ainsi l'état pré-activé des cellules de patientes ayant une infection au moment du prélèvement pourrait fausser les résultats des dosages d'IL-10. Enfin, les dates de réalisation des prélèvements sanguins des patientes sont très variables. Certains prélèvements sont effectués avant la fausse-couche (études prospectives avec dosage à terme constant), sans précision du délai écoulé entre le

prélèvement et la fausse-couche (262), parfois ils sont réalisés juste après la fausse-couche (261). Compte tenu des variations hormonales et physiologiques observées au cours des différents trimestres de la grossesse et en post-partum, les dosages doivent être effectués au même terme pour être comparables. Dans ce contexte, en émettant l'hypothèse que les polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 sont corrélés à son taux de synthèse, l'analyse de ces polymorphismes devrait permettre une interprétation moins controversée que celle des dosages. Le plus souvent les études ne montrent pas de corrélation entre la survenue de FC et les allèles des SNP. De plus, les allèles des microsatellites IL-10G et IL-10R n'ont jamais été analysés comme facteurs de risques de cette pathologie. La description des patientes incluses dans ces études ne montrant pas de corrélation révèle que les types de FC analysées sont hétérogènes. Les FC des patientes diffèrent sur au moins deux critères : les FC peuvent être primaires, secondaires ou les deux (209), le plus souvent ce critère n'est pas précisé, et le terme des FC n'est jamais précisé. Les patientes incluses dans notre étude n'ont jamais eu d'enfant, ce critère de recrutement permet de mieux évaluer les facteurs de risque génétiques et nous avons scindé notre groupe en deux sous-groupes en nous référant à l'évolution physiologique de la grossesse. Nous avons d'abord émis l'hypothèse que les polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10 peuvent, en tant que facteurs de risque de thrombose, provoquer des FC à partir de la 10<sup>ème</sup> SA, date à laquelle le placenta devient la seule source d'apport sanguin. Nous avons donc comparé deux groupes de patientes, chaque groupe comportant des patientes dont les FC étaient homogènes sur la date de survenue. Les patientes avaient eu toutes leurs FC avant ou après 10 SA. Ce critère de sélection a permis de mieux évaluer l'impact des polymorphismes sur la grossesse avant et après la mise en place de la circulation utéro-placentaire. Seule l'équipe de Zammiti W et al (213) a réalisé une analyse « polymorphismes de l'IL-10 et survenue de FC » en catégorisant les FC en fonction de leur terme de survenue. L'allèle -819T apparaît comme un facteur de risque significatif et dose dépendant de la survenue de FC avant 10 SA dans notre étude. Zammiti W et al (213) ont montré une corrélation significative entre la survenue de FC avant 10 SA et la présence des polymorphismes -592A et -819T. Ils ont regroupé les patientes qui portaient ces allèles sous forme hétérozygote et homozygote sans pouvoir montrer de dosedépendance. De plus il ne semble pas qu'ils aient comparé les fréquences des haplotypes formés par les SNP entre les deux sous-groupes (avant et après 10 SA) alors qu'ils avaient effectué cette comparaison entre leur groupe total de patientes et leurs contrôles (Tableau XV). Leur effectif ne leur permettait certainement pas d'avoir une représentation statistiquement interprétable des haplotypes rares. Nous avons également voulu observer

l'effet coopératif des deux SNP. Pour cela, nous avons préféré analyser les génotypes formés au lieu des haplotypes. Ce choix apporte une information plus complète puisque c'est l'effet des quatre allèles présents qui est prise en compte et non de deux allèles si on avait choisi une analyse par haplotype. Pour pouvoir réaliser l'analyse statistique des génotypes nous avons du les regrouper afin d'augmenter les effectifs des groupes (Tableaux XXV et XXVI). Les groupes étaient constitués en fonction du nombre d'allèles mutés. Lors de l'introduction dans notre régression des trois génotypes -819CC, CT ou TT et des génotypes formés par -819C>T/-592C>A, l'allèle -592A n'a pas été retenu comme facteur de risque contrairement à l'étude de Zammiti W et al (213). Les deux allèles mutés -819T et -592A semblent cependant fréquemment associés, un effectif plus important aurait permis d'évaluer si ces deux allèles sont en déséquilibre de liaison. Eskdale J et al (16) ont décrit trois sites de fixation de facteur de transcription YY1 et un site de fixation pour le facteur de transcription STAT1 à proximité du SNP -819C>T. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse que ce SNP pourrait réguler la transcription du gène de l'IL-10 en fonction de l'allèle présent. Cependant aucune étude n'a mis en évidence de corrélation entre l'allèle -819T seul et le taux de sécrétion d'IL-10. En revanche l'allèle -819T associé à l'allèle -592A et à l'allèle -1082A du polymorphisme G>A situé en position -1082 (haplotype ATA) semble associé à une diminution de la sécrétion d'IL-10 (196). Ce résultat est cohérent avec nos résultats. Les femmes porteuses de l'allèle -819T, associé à une diminution de capacité de sécrétion d'IL-10, pourraient présenter un déficit d'immuno-tolérance nécessaire au maintien de la gestation, déficit responsable dès les premières semaines de gestation, de fausses-couches.

La répartition des allèles du microsatellite IL-10G, dans notre population totale de patientes, n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg. La fréquence de l'allèle G9 dans notre population totale de patientes, contrairement aux fréquences déterminées à partir de populations saines décrites dans la littérature (**Tableau IV**), n'est pas la plus élevée des allèles du microsatellite IL-10G (263). La fréquence allélique la plus élevée déterminée dans notre population totale mais également dans nos deux sous-groupes est celle de l'allèle IL-10G8. Cet allèle pourrait être un facteur de risque de survenue de FC quel que soit le terme de la gestation. Nous avons identifié l'allèle G8 comme facteur de risque de FC avant 10 SA. L'interprétation du rôle des allèles du microsatellite Il-10G, et des microsatellites en général, sur l'activité transcriptionnelle d'un gène n'est pas facile à appréhender. Ce problème a déjà fait l'objet d'une discussion dans le chapitre précédent lorsque nous avons tenté de comprendre le mécanisme de régulation de la synthèse de l'IL-10 par les allèles du microsatellite IL-10G. Dans cette pathologie nous avions émis l'hypothèse que les allèles identifiés pouvaient

diminuer la sécrétion d'IL-10. Les deux allèles identifiés dans notre étude comme étant des facteurs de risque de thrombose veineuse (G10 et G13) sont différents de celui que nous avons identifié comme étant un facteur de risque de FC idiopathique. Leur nombre de répétitions de CA est plus élevé que celui de l'allèle IL-10G8. Une seule étude, effectuée sur une population de suédois atteints de myasthénie (244), a corrélé l'allèle G8 à un phénomène physiopathologique. Les patients porteurs de cet allèle étaient plus forts producteurs d'anticorps anti-récepteur de la N-acétylcholine. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces patients pourraient être de forts producteurs d'IL-10 ce qui aurait pour conséquence une stimulation des lymphocytes B et une sécrétion accrue d'immunoglobuline. Dans le cadre de cette hypothèse, une corrélation entre cet allèle, dont la fréquence est augmentée dans nos deux groupes de patientes, comparativement à une population de témoins sains, et la présence d'un phénomène dysimmunitaire de type anticorps anti-phospholipides / cofacteur pourrait être envisagée. Enfin la régression logistique a identifié l'allèle IL-10R3 comme facteur de risque de FC survenant après 10 SA. Sa fréquence très faible (1,75% et 4,06%) (Tableau XXIV) rend ce résultat à la limite de l'interprétation (P=0,042). Eskdale J et al (45) ont montré, dans un modèle de culture cellulaire, que les individus porteurs de cet allèle étaient de plus faibles producteurs d'IL-10 que les individus porteurs des allèles R2 et R4, allèles qui ont respectivement moins et plus de répétitions de CA que R3. Leur étude a cependant été réalisée sur un effectif réduit (44 individus porteurs de l'allèle R3 versus 39 individus non porteurs de cet allèle). De plus les variations inter-individuelles de sécrétion d'IL-10, à génotype identique, étaient importantes (1000 à 2000 pg/mL pour les porteurs de l'allèle IL-10R3 et 1500 à 4500 pg/mL pour les non porteurs). Ces données rendent l'interprétation de notre résultat aléatoire. Seul un modèle de transfection permettra de mettre en évidence le rôle des allèles des deux microsatellites IL-10G, IL-10R et des deux SNP -592A et -819T sur la sécrétion d'IL-10. Cette approche expérimentale est en cours de réalisation au laboratoire.

La répartition des fréquences des risques biologiques et des allèles des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 confirme que le seuil de 10 SA est pertinent. L'induction de l'immuno-tolérance maternelle par l'IL-10 semble être son rôle prédominant. En effet la fréquence de l'allèle muté –819T, susceptible de diminuer la sécrétion d'IL-10, est plus élevée dans notre groupe de patientes caractérisées par la survenue de toutes leur FC avant 10 SA. Une diminution de synthèse d'IL-10 dès le début de la gestation provoquerait la survenue de FC précoces. L'effet de l'IL-10 sur la régulation de l'hémostase de la circulation placentaire, via le facteur tissulaire, n'aurait pas de rôle dans la survenue de FC. Par ailleurs il a été montré que les cellules trophoblastiques, d'origine fœtale, sont capables de synthétisées de

l'IL-10 et son récepteur (203) (204). Cette observation rappelle la participation du génotype paternel dans la synthèse de l'IL-10 par les cellules placentaires mais également dans la synthèse de facteurs de risques de l'axe thrombo-embolique. Dans de prochaines études, l'identification de facteurs de risques génétique devra être réalisée à la fois sur le génotype maternel et le génotype paternel.

#### IV Conclusions et perspectives

L'hypothèse de départ de notre travail était que l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire régulant l'expression du FT, pourrait être un acteur de la maladie thrombo-embolique. De plus, il a été décrit dans la littérature des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 capables de moduler l'expression de cette dernière. Dans ce contexte, nous avons conduit deux études cliniques, l'une concernait la maladie thrombo-embolique veineuse et l'autre la pathologie obstétricale vasculo-placentaire, qui avaient pour objectif de déterminer si ces polymorphismes génétiques pouvaient constituer des facteurs de risques de ces deux pathologies. En parallèle, nous avons tenté de corréler, dans une population de témoins sains, certains polymorphismes génétiques à l'expression d'IL-10 dans un modèle de culture cellulaire. Nous avons également voulu mesurer par un test de génération de thrombine la modulation de l'expression du FT par l'IL-10.

Les résultats observés en culture cellulaire étaient d'interprétation difficile. En effet le nombre d'individus porteurs d'un génotype identique était faible. D'autre part, à génotype identique, les variations inter-individuelles étaient importantes. Ces deux écueils sont également rapportés dans les études publiées dans la littérature sur ce sujet. Les modèles de culture décrits dans la littérature étant très hétérogènes (type de cellules, d'activateur..), une généralisation des résultats obtenus n'est pas souhaitable. La corrélation entre un polymorphisme génétique et la capacité à sécréter de l'IL-10 pourra être prouvée grâce à des modèles de transfection analysant les multiples génotypes possibles formés par l'ensemble des polymorphismes génétiques. Un modèle de transfection du promoteur du gène de l'IL-10 en amont d'un gène rapporteur est en cours d'évaluation au laboratoire.

La régulation de l'expression du FT par l'IL-10 a été largement décrite dans la littérature. Cependant, l'objectivation de ce phénomène par un test de génération de thrombine (TGT) n'avait jamais été montrée. Ce test, réalisé à partir de monocytes activés, nous permettait de mesurer l'activité procoagulante globale de ces cellules ainsi que l'inhibition de cette dernière par l'IL-10. Par ailleurs, les études ayant décrit l'effet de l'IL-10 sur le FT utilisaient de l'IL-10 recombinante. Nous avons utilisé un modèle permettant d'évaluer l'effet de l'IL-10 endogène. Nos résultats montraient que le test de génération de thrombine était sensible à la modulation de l'activité procoagulante des monocytes par l'IL-10 et que cette modulation était le reflet de la diminution de l'expression du FT induite l'IL-10.

Notre modèle était sensible à la modulation induite par l'IL-10 exogène mais également endogène. En parallèle de ces TGT nous avons évalué l'impact de l'IL-10 sur l'expression du FT membranaire et du FT présent dans le surnageant des cultures. Nous avons observé que la neutralisation de l'IL-10 endogène provoquait une augmentation du facteur tissulaire dans le surnageant. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'IL-10 pourrait diminuer le phénomène de microvésiculation observé chez les monocytes activés et ainsi avoir une régulation sur l'expression du FT post-transcriptionnelle. L'étude du rôle de l'IL-10 sur la microvésiculation n'a jamais été décrite. Elle est en cours d'évaluation au laboratoire notamment à l'aide des TGT.

Nous avons conduit une étude prospective cas-témoin portant sur la corrélation de cinq polymorphismes génétiques du promoteur du gène de l'IL-10, -592C>A, -819C>T, -1082G>A, IL-10G et IL-10R, avec la survenue de thromboses veineuses. L'analyse de ces polymorphismes dans cette pathologie n'avait jamais été rapportée. Les résultats montraient que les allèles IL-10G10 et G13 étaient associés à la survenue de thromboses veineuse et que l'allèle G10 était plus fréquent dans la population de patients caractérisés par la survenue de thromboses récurrentes. Ces deux allèles ont été corrélés, dans la littérature, à la survenue de diverses pathologies dysimmunitaires. Ils ont également été associés à des taux hauts ou bas de synthèse d'Il-10. Encore une fois, l'interprétation de ces dosages reste difficile. Le microsatellite IL-10G ayant de multiples allèles caractérisés par des nombres de répétition de CA variables, le taux de transcription de l'IL-10 serait modifier en fonction de la taille de ce microsatellite. Une meilleure interprétation de ce phénomène nécessiterait de fixer un nombre de répétition de CA seuil, et d'analyser les fréquences des allèles en fonction de ce seuil.

L'étude clinique des polymorphismes génétiques du promoteur de l'IL-10 dans la pathologie obstétricale vasculo-placentaire était rétrospective. Elle portait sur la corrélation de quatre polymorphismes -592C>A, -819C>T, IL-10G et IL-10R avec le terme de survenue de fausses-couches (FC). Les polymorphismes génétiques des promoteurs IL-10G et IL-10R n'avaient jamais été étudiés dans cette pathologie. Le rôle de l'IL-10 dans le maintien de la gestation pourrait être soit l'induction d'une tolérance immune maternelle vis à vis du fœtus, dès la phase d'implantation soit la régulation de l'homéostasie de l'hémostase placentaire notamment via la régulation de l'expression du FT à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA). En effet, le placenta devient la source essentielle d'approvisionnement sanguin à partir de cette période du développement foeto-placentaire. Nous avons comparé les polymorphismes génétiques de l'IL-10 dans deux sous-groupes de patientes ayant fait toutes leurs FC à la même période, soit avant soit après 10 SA. Les facteurs de risques biologiques

de thrombophilie étaient également analysés. L'allèle muté –819T et l'allèle G8 étaient, dans cette étude corrélés avec la survenue de FC avant 10 SA alors que l'allèle R3 était corrélé avec la survenue de FC après 10 SA. La fréquence des facteurs de risque biologique de thrombophilie était plus élevée chez les patientes caractérisées par des FC après 10 SA. Ce paramètre, associé aux différences de fréquences alléliques entre les deux groupes de patientes nous a confortés dans le choix du seuil de 10 SA, celui-ci semblant corrélé avec la physio-pathologie. La définition du type de FC analysée est un critère important pour l'interprétation des facteurs de risques identifiés. L'absence de définition claire de ce paramètre ne permet pas de comparer les études et parfois empêche l'identification de facteurs de risques. Le rôle des polymorphismes identifiés sur l'activité transcriptionnelle du gène de l'IL-10 est en cours d'évaluation dans un modèle de transfection. Le génotype paternel participant au phénotype foeto-placentaire, sa détermination est nécessaire à l'identification de facteurs de risques de survenue de FC. Il devra être analysé au même titre que le génotype maternel lors de l'identification de facteurs de risques génétiques.

#### V Références

#### 1 OSNES LT, WESTVIK AB, JOO GB, OKKENHAUG C, KIERULF P.

Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13.

Cytokine. 1996; 8 (11): 822-7.

#### 2 ERNOFSSON M, TENNO T, SIEGBAHN A.

Inhibition of tissue factor surface expression in human peripheral blood monocytes exposed to cytokines.

Br J Haematol. 1996; 95 (2): 249-57.

#### 3 FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR.

Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.

J Exp Med. 1989; 170 (6): 2081-95.

#### 4 YANG X, GARTNER J, ZHU L, WANG S, BRUNHAM RC.

IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following Chlamydia trachomatis lung infection.

J Immunol. 1999; 162 (2): 1010-7.

#### 5 KUHN R, LOHLER J, RENNICK D, RAJEWSKY K, MULLER W.

Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.

Cell. 1993; 75 (2): 263-74.

#### 6 TOURNOY KG, KIPS JC, PAUWELS RA.

Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness.

Clin Exp Allergy. 2000; 30 (6): 775-83.

7 BERG DJ, LEACH MW, KUHN R, RAJEWSKY K, MULLER W, DAVIDSON NJ, *et al.* Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses.

J Exp Med. 1995; 182(1): 99-108.

8 GRUNIG G, CORRY DB, LEACH MW, SEYMOUR BW, KURUP VP, RENNICK DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis.

J Exp Med. 1997; 185 (6): 1089-99.

9 KIM JM, BRANNAN CI, COPELAND NG, JENKINS NA, KHAN TA, MOORE KW.

Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.

J Immunol. 1992; 148 (11): 3618-23.

#### 10 ZOU J, CLARK MS, SECOMBES CJ.

Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, Fugu rubripes.

Immunogenetics. 2003; 55 (5): 325-35.

#### 11 BREWER G, SACCANI S, SARKAR S, LEWIS A, PESTKA S.

Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1.

J Interferon Cytokine Res. 2003; 23 (10): 553-64.

### 12 MOORE KW, VIEIRA P, FIORENTINO DF, TROUNSTINE ML, KHAN TA, MOSMANN TR.

Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI.

Science. 1990; 248 (4960): 1230-4.

# 13 HSU DH, DE WAAL MALEFYT R, FIORENTINO DF, DANG MN, VIEIRA P, DE VRIES J, et al.

Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1.

Science. 1990; 250 (4982): 830-2.

### 14 RODE HJ, JANSSEN W, ROSEN-WOLFF A, BUGERT JJ, THEIN P, BECKER Y, et al.

The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene.

Virus Genes. 1993; 7(1): 111-6.

### 15 KUBE D, PLATZER C, VON KNETHEN A, STRAUB H, BOHLEN H, HAFNER M, et al.

Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines.

Cytokine. 1995; 7(1): 1-7.

#### 16 ESKDALE J, KUBE D, TESCH H, GALLAGHER G.

Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics. 1997; 46 (2): 120-8.

# 17 D'ALFONSO S, RAMPI M, ROLANDO V, GIORDANO M, MOMIGLIANO-RICHIARDI P.

New polymorphisms in the IL-10 promoter region.

Genes Immun. 2000; 1 (3): 231-3.

#### 18 KUBE D, RIETH H, ESKDALE J, KREMSNER PG, GALLAGHER G.

Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. Genes Immun. 2001; 2 (4): 181-90.

# 19 WESTENDORP RG, LANGERMANS JA, HUIZINGA TW, VERWEIJ CL, STURK A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease.

Lancet. 1997; 349 (9069): 1912-3.

## 20 WARLE MC, FARHAN A, METSELAAR HJ, HOP WC, PERREY C, ZONDERVAN PE. et al.

Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? Liver Transpl. 2003; 9 (2): 170-81.

#### 21 ESKDALE J, GALLAGHER G.

A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter.

Immunogenetics. 1995; 42 (5): 444-5.

#### 22 ESKDALE J, KUBE D, GALLAGHER G.

A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. Immunogenetics. 1996; 45 (1): 82-3.

## 23 TURNER DM, WILLIAMS DM, SANKARAN D, LAZARUS M, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV.

An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.

Eur J Immunogenet. 1997; 24(1): 1-8.

# 24 ESKDALE J, MCNICHOLL J, WORDSWORTH P, JONAS B, HUIZINGA T, FIELD M, et al.

Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility.

Lancet. 1998; 352 (9136): 1282-3.

#### 25 MACKAY K, MILICIC A, LEE D, TIKLY M, LAVAL S, SHATFORD J, et al.

Rheumatoid arthritis susceptibility and interleukin 10: a study of two ethnically diverse populations.

Rheumatology (Oxford). 2003; 42 (1): 149-53.

### 26 KUBE D, SCHMIDT D, MORMANN M, UHLEMANN AC, TOMIUK J, TESCH H, $\it et$ $\it al$

Semiautomated and simultaneous analysis of the interleukin-10 gene microsatellites IL-10G and IL-10R by fluorescence-based polymerase chain reaction reveals significant differences in allele distributions between Caucasians (Germany) and Africans (Gabon).

Eur Cytokine Netw. 2001; 12 (3): 537-44.

#### 27 REYNARD MP, TURNER D, NAVARRETE CV.

Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK.

Eur J Immunogenet. 2000; 27 (4): 241-9.

#### 28 PERREY C, PRAVICA V, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV.

Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report.

Transpl Immunol. 1998; 6(3): 193-7.

#### 29 KUBE D, MORMANN M, TOMIUK J, RIETH H, HUA TD, KREMSNER PG, et al.

Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction.

Genes Immun. 2003; 4 (7): 459-68.

#### 30 MOK CC, LANCHBURY JS, CHAN DW, LAU CS.

Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 1998; 41 (6): 1090-5.

### 31 D'ALFONSO S, RAMPI M, BOCCHIO D, COLOMBO G, SCORZA-SMERALDI R, MOMIGLIANO-RICHARDI P.

Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10.

Arthritis Rheum. 2000; 43 (1): 120-8.

# 32 KALUZA W, LEIRISALO-REPO M, MARKER-HERMANN E, WESTMAN P, REUSS E, HUG R, et al.

IL10.G microsatellites mark promoter haplotypes associated with protection against the development of reactive arthritis in Finnish patients.

Arthritis Rheum. 2001; 44 (5): 1209-14.

#### 33 ZHOU Y, GISCOMBE R, HUANG D, LEFVERT AK.

Novel genetic association of Wegener's granulomatosis with the interleukin 10 gene. J Rheumatol. 2002; 29 (2): 317-20.

### 34 YSSEL H, DE WAAL MALEFYT R, RONCAROLO MG, ABRAMS JS, LAHESMAA R, SPITS H, et al.

IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. J Immunol. 1992; 149 (7): 2378-84.

#### 35 HOWARD M, O'GARRA A.

Biological properties of interleukin 10.

Immunol Today. 1992; 13 (6): 198-200.

#### 36 DING L, LINSLEY PS, HUANG LY, GERMAIN RN, SHEVACH EM.

IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.

J Immunol. 1993; 151 (3): 1224-34.

### 37 THOMPSON-SNIPES L, DHAR V, BOND MW, MOSMANN TR, MOORE KW, RENNICK DM.

Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors.

J Exp Med. 1991; 173 (2): 507-10.

#### 38 ENK AH, KATZ SI.

Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10.

J Immunol. 1992; 149 (1): 92-5.

## 39 KLUIN-NELEMANS JC, KESTER MG, OVING I, CLUITMANS FH, WILLEMZE R, FALKENBURG JH.

Abnormally activated T lymphocytes in the spleen of patients with hairy-cell leukemia. Leukemia. 1994; 8 (12): 2095-101.

#### 40 OHSHIMA K, SUZUMIYA J, AKAMATU M, TAKESHITA M, KIKUCHI M.

Human and viral interleukin-10 in Hodgkin's disease, and its influence on CD4+ and CD8+ T lymphocytes.

Int J Cancer. 1995; 62 (1): 5-10.

#### 41 DUMMER R, HEALD PW, NESTLE FO, LUDWIG E, LAINE E, HEMMI S, et al.

Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain).

Blood. 1996; 88 (4): 1383-9.

#### 42 LU ZY, GU ZJ, ZHANG XG, WIJDENES J, NEDDERMANN P, ROSSI JF, et al.

Interleukin-10 induces interleukin-11 responsiveness in human myeloma cell lines.

FEBS Lett. 1995; 377 (3): 515-8.

### 43 SATO T, MCCUE P, MASUOKA K, SALWEN S, LATTIME EC, MASTRANGELO MJ. et al.

Interleukin 10 production by human melanoma.

Clin Cancer Res. 1996; 2 (8): 1383-90.

#### 44 MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A.

Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.

Annu Rev Immunol. 2001; 19: 683-765.

### 45 ESKDALE J, GALLAGHER G, VERWEIJ CL, KEIJSERS V, WESTENDORP RG, HUIZINGA TW.

Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95 (16): 9465-70.

#### 46 CRAWLEY E, KAY R, SILLIBOURNE J, PATEL P, HUTCHINSON I, WOO P.

Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum. 1999; 42 (6): 1101-8.

#### 47 HOU J, BAICHWAL V, CAO Z.

Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91 (24): 11641-5.

#### 48 DAVID M.

Transcription factors in interferon signaling.

Pharmacol Ther. 1995; 65 (2): 149-61.

#### 49 CAO S, LIU J, SONG L, MA X.

The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages.

J Immunol. 2005; 174 (6): 3484-92.

#### 50 OKAMOTO N, TEZUKA K, KATO M, ABE R, TSUJI T.

PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in AILIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production.

Biochem Biophys Res Commun. 2003; 310 (3): 691-702.

## 51 DAHLE MK, OVERLAND G, MYHRE AE, STUESTOL JF, HARTUNG T, KROHN CD, et al.

The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. Infect Immun. 2004; 72 (10): 5704-11.

#### 52 TONE M, POWELL MJ, TONE Y, THOMPSON SA, WALDMANN H.

IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3.

J Immunol. 2000; 165 (1): 286-91.

### 53 BENKHART EM, SIEDLAR M, WEDEL A, WERNER T, ZIEGLER-HEITBROCK HW.

Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression.

J Immunol. 2000; 165 (3): 1612-7.

#### 54 PLATZER C, DOCKE W, VOLK H, PROSCH S.

Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells.

J Neuroimmunol. 2000; 105 (1): 31-8.

#### 55 MA W, LIM W, GEE K, AUCOIN S, NANDAN D, KOZLOWSKI M, et al.

The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages.

J Biol Chem. 2001; 276 (17): 13664-74.

#### 56 YANG BC, LIN HK, HOR WS, HWANG JY, LIN YP, LIU MY, et al.

Mediation of enhanced transcription of the IL-10 gene in T cells, upon contact with human glioma cells, by Fas signaling through a protein kinase A-independent pathway.

J Immunol. 2003; 171 (8): 3947-54.

### 57 BRENNER S, PROSCH S, SCHENKE-LAYLAND K, RIESE U, GAUSMANN U, PLATZER C.

cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation.

J Biol Chem. 2003; 278 (8): 5597-604.

### 58 VEIOPOULOU C, KOGOPOULOU O, TZAKOS E, MAVROTHALASSITIS G, MITSIAS D, KARAFOULIDOU A, et al.

IL-2 and IL-10 production by human CD4+T cells is differentially regulated by p38: mode of stimulation-dependent regulation of IL-2.

Neuroimmunomodulation. 2004; 11 (4): 199-208.

## 59 VEGA MI, HUERTA-YEPAZ S, GARBAN H, JAZIREHI A, EMMANOUILIDES C, BONAVIDA B.

Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance.

Oncogene. 2004; 23 (20): 3530-40.

### 60 JACK CS, ARBOUR N, MANUSOW J, MONTGRAIN V, BLAIN M, MCCREA E, $\it{et}$ $\it{al}$

TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes.

J Immunol. 2005; 175 (7): 4320-30.

### 61 NEMETH ZH, LUTZ CS, CSOKA B, DEITCH EA, LEIBOVICH SJ, GAUSE WC, et al.

Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism.

J Immunol. 2005; 175 (12): 8260-70.

#### 62 KIM KY, KIM MY, CHOI HS, JIN BK, KIM SU, LEE YB.

Thrombin induces IL-10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF-alpha release.

Neuroreport. 2002; 13 (6): 849-52.

#### 63 LIU YW, TSENG HP, CHEN LC, CHEN BK, CHANG WC.

Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages.

J Immunol. 2003; 171 (2): 821-8.

#### 64 DAHLE MK, MYHRE AE, AASEN AO, WANG JE.

Effects of forskolin on Kupffer cell production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha differ from those of endogenous adenylyl cyclase activators: possible role for adenylyl cyclase 9.

Infect Immun. 2005; 73 (11): 7290-6.

# 65 HACKER H, REDECKE V, BLAGOEV B, KRATCHMAROVA I, HSU LC, WANG GG, et al.

Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6.

Nature. 2006; 439 (7073): 204-7.

### 66 ZDANOV A, SCHALK-HIHI C, GUSTCHINA A, TSANG M, WEATHERBEE J, WLODAWER A.

Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma.

Structure. 1995; 3 (6): 591-601.

#### 67 ZDANOV A, SCHALK-HIHI C, WLODAWER A.

Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 A resolution and a model of a complex with its soluble receptor.

Protein Sci. 1996; 5 (10): 1955-62.

#### 68 WALTER MR, NAGABHUSHAN TL.

Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold.

Biochemistry. 1995; 34 (38): 12118-25.

#### 69 FICKENSCHER H, HOR S, KUPERS H, KNAPPE A, WITTMANN S, STICHT H.

The interleukin-10 family of cytokines.

Trends Immunol. 2002; 23 (2): 89-96.

### 70 BACH EA, TANNER JW, MARSTERS S, ASHKENAZI A, AGUET M, SHAW AS, et al.

Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. Mol Cell Biol. 1996; 16 (6): 3214-21.

# 71 KRAUSE CD, MEI E, MIROCHNITCHENKO O, LAVNIKOVA N, XIE J, JIA Y, *et al.* Interactions among the components of the interleukin-10 receptor complex.

Biochem Biophys Res Commun. 2006; 340 (2): 377-85.

#### 72 JOSEPHSON K, LOGSDON NJ, WALTER MR.

Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. Immunity. 2001; 15 (1): 35-46.

#### 73 PLETNEV S, MAGRACHEVA E, WLODAWER A, ZDANOV A.

A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. BMC Struct Biol. 2005; 5:10.

#### 74 DONNELLY RP, DICKENSHEETS H, FINBLOOM DS.

The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes.

J Interferon Cytokine Res. 1999; 19 (6): 563-73.

#### 75 PESTKA S, KRAUSE CD, SARKAR D, WALTER MR, SHI Y, FISHER PB.

Interleukin-10 and related cytokines and receptors.

Annu Rev Immunol. 2004; 22: 929-79.

#### 76 FINBLOOM DS, WINESTOCK KD.

IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes.

J Immunol. 1995; 155 (3): 1079-90.

#### 77 HO AS, WEI SH, MUI AL, MIYAJIMA A, MOORE KW.

Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain.

Mol Cell Biol. 1995; 15 (9): 5043-53.

## 78 USACHEVA A, SANDOVAL R, DOMANSKI P, KOTENKO SV, NELMS K, GOLDSMITH MA, et al.

Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation.

J Biol Chem. 2002; 277 (50): 48220-6.

## 79 KOTENKO SV, IZOTOVA LS, POLLACK BP, MUTHUKUMARAN G, PAUKKU K, SILVENNOINEN O, et al.

Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon-gamma.

J Biol Chem. 1996; 271 (29): 17174-82.

### 80 WEBER-NORDT RM, RILEY JK, GREENLUND AC, MOORE KW, DARNELL JE, SCHREIBER RD.

Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain.

J Biol Chem. 1996; 271 (44): 27954-61.

#### 81 RILEY JK, TAKEDA K, AKIRA S, SCHREIBER RD.

Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action.

J Biol Chem. 1999; 274 (23): 16513-21.

### 82 WEHINGER J, GOUILLEUX F, GRONER B, FINKE J, MERTELSMANN R, WEBERNORDT RM.

IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes.

FEBS Lett. 1996; 394 (3): 365-70.

#### 83 DING Y, CHEN D, TARCSAFALVI A, SU R, QIN L, BROMBERG JS.

Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses.

J Immunol. 2003; 170 (3): 1383-91.

### 84 ALEXANDER WS, STARR R, FENNER JE, SCOTT CL, HANDMAN E, SPRIGG NS, et al.

SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine.

Cell. 1999; 98 (5): 597-608.

### 85 NAKA T, TSUTSUI H, FUJIMOTO M, KAWAZOE Y, KOHZAKI H, MORITA Y, $\it{et}$ $\it{al}$

SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo.

Immunity. 2001; 14 (5): 535-45.

### 86 YASUKAWA H, MISAWA H, SAKAMOTO H, MASUHARA M, SASAKI A, WAKIOKA T, et al.

The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop.

Embo J. 1999; 18 (5): 1309-20.

### 87 NIEMAND C, NIMMESGERN A, HAAN S, FISCHER P, SCHAPER F, ROSSAINT R, et al.

Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3.

J Immunol. 2003; 170 (6): 3263-72.

### 88 SHAMES BD, SELZMAN CH, MELDRUM DR, PULIDO EJ, BARTON HA, MENG X. et al.

Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes.

Shock. 1998; 10(6): 389-94.

#### 89 WANG P, WU P, SIEGEL MI, EGAN RW, BILLAH MM.

Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms.

J Biol Chem. 1995; 270 (16): 9558-63.

#### 90 WANG M, HU Y, STEARNS ME.

A novel IL-10 signalling mechanism regulates TIMP-1 expression in human prostate tumour cells

Br J Cancer. 2003; 88 (10): 1605-14.

#### 91 STEARNS ME, WANG M, HU Y, GARCIA FU.

Interleukin-10 activation of the interleukin-10E1 pathway and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression is enhanced by proteasome inhibitors in primary prostate tumor lines.

Mol Cancer Res. 2003; 1 (9): 631-42.

### 92 O'GARRA A, STAPLETON G, DHAR V, PEARCE M, SCHUMACHER J, RUGO H, et al.

Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10.

Int Immunol. 1990; 2(9): 821-32.

#### 93 MOCELLIN S, MARINCOLA F, ROSSI CR, NITTI D, LISE M.

The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle.

Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15 (1): 61-76.

## 94 FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, VIEIRA P, MOSMANN TR, HOWARD M, MOORE KW, et al.

IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.

J Immunol. 1991; 146 (10): 3444-51.

#### 95 MACATONIA SE, DOHERTY TM, KNIGHT SC, O'GARRA A.

Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production.

J Immunol. 1993; 150 (9): 3755-65.

#### 96 ENK AH, ANGELONI VL, UDEY MC, KATZ SI.

Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance.

J Immunol. 1993; 151 (5): 2390-8.

#### 97 KOPYDLOWSKI KM, SALKOWSKI CA, CODY MJ, VAN ROOIJEN N, MAJOR J, HAMILTON TA, et al.

Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. J Immunol. 1999; 163 (3): 1537-44.

#### 98 HART PH, HUNT EK, BONDER CS, WATSON CJ, FINLAY-JONES JJ.

Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10.

J Immunol. 1996; 157 (8): 3672-80.

#### 99 LINDERHOLM M, AHLM C, SETTERGREN B, WAAGE A, TARNVIK A.

Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis. 1996; 173 (1): 38-43.

#### 100 ANDREW DP, CHANG MS, MCNINCH J, WATHEN ST, RIHANEK M, TSENG J, et al.

STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. J Immunol. 1998; 161 (9): 5027-38.

#### 101 NIIRO H, OTSUKA T, TANABE T, HARA S, KUGA S, NEMOTO Y, et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-

stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. Blood. 1995; 85 (12): 3736-45.

#### 102 MERTZ PM, DEWITT DL, STETLER-STEVENSON WG, WAHL LM.

Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. J Biol Chem. 1994; 269 (33): 21322-9.

#### 103 DE WAAL MALEFYT R, HAANEN J, SPITS H, RONCAROLO MG, TE VELDE A, FIGDOR C, et al.

Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.

J Exp Med. 1991; 174 (4): 915-24.

### 104 TE VELDE AA, DE WAAL MALEFIJT R, HUIJBENS RJ, DE VRIES JE, FIGDOR CG.

IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. J Immunol. 1992; 149 (12): 4048-52.

#### 105 NIIRO H, OTSUKA T, ABE M, SATOH H, OGO T, NAKANO T, et al.

Epstein-Barr virus BCRF1 gene product (viral interleukin 10) inhibits superoxide anion production by human monocytes.

Lymphokine Cytokine Res. 1992; 11 (5): 209-14.

#### 106 LAICHALK LL, DANFORTH JM, STANDIFORD TJ.

Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity.

FEMS Immunol Med Microbiol. 1996; 15 (4): 181-7.

#### 107 MARIE C, PITTON C, FITTING C, CAVAILLON JM.

IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. Cytokine. 1996; 8 (2): 147-51.

#### 108 TAKANASKI S, NONAKA R, XING Z, O'BYRNE P, DOLOVICH J, JORDANA M.

Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils.

J Exp Med. 1994; 180 (2): 711-5.

#### 109 LEVY Y, BROUET JC.

Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein.

J Clin Invest. 1994; 93 (1): 424-8.

#### 110 ROUSSET F, GARCIA E, DEFRANCE T, PERONNE C, VEZZIO N, HSU DH, et al.

Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89 (5): 1890-3.

### 111 BURDIN N, VAN KOOTEN C, GALIBERT L, ABRAMS JS, WIJDENES J, BANCHEREAU J. et al.

Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes.

J Immunol. 1995; 154 (6): 2533-44.

#### 112 GARRONE P, GALIBERT L, ROUSSET F, FU SM, BANCHEREAU J.

Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen.

J Immunol. 1994; 152 (9): 4282-90.

#### 113 TAGA K, MOSTOWSKI H, TOSATO G.

Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth.

Blood. 1993; 81 (11): 2964-71.

### 114 SCHANDENE L, ALONSO-VEGA C, WILLEMS F, GERARD C, DELVAUX A, VELU T, et al.

B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. J Immunol. 1994; 152 (9): 4368-74.

#### 115 GROUX H, BIGLER M, DE VRIES JE, RONCAROLO MG.

Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med. 1996; 184 (1): 19-29.

#### 116 GROUX H, BIGLER M, DE VRIES JE, RONCAROLO MG.

Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.

J Immunol. 1998; 160 (7): 3188-93.

#### 117 ROWBOTTOM AW, LEPPER MA, GARLAND RJ, COX CV, CORLEY EG.

Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation.

Immunology. 1999; 98 (1): 80-9.

#### 118 CAI G, KASTELEIN RA, HUNTER CA.

IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18.

Eur J Immunol. 1999; 29 (9): 2658-65.

### 119 VIEIRA P, DE WAAL-MALEFYT R, DANG MN, JOHNSON KE, KASTELEIN R, FIORENTINO DF, et al.

Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88 (4): 1172-6.

### 120 PAWASHE AB, GOLINO P, AMBROSIO G, MIGLIACCIO F, RAGNI M, PASCUCCI I, et al.

A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries.

Circ Res. 1994; 74 (1): 56-63.

# 121 MEADE TW, MELLOWS S, BROZOVIC M, MILLER GJ, CHAKRABARTI RR, NORTH WR, et al.

Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study.

Lancet. 1986; 2 (8506): 533-7.

#### 122 OSTERUD B, BJORKLID E.

Sources of tissue factor.

Semin Thromb Hemost. 2006; 32 (1): 11-23.

#### 123 KIRCHHOFER D, TSCHOPP TB, HADVARY P, BAUMGARTNER HR.

Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors.

J Clin Invest. 1994; 93 (5): 2073-83.

### 124 MOOSBAUER C, MORGENSTERN E, CUVELIER SL, MANUKYAN D, BIDZHEKOV K, ALBRECHT S, et al.

Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure.

Blood 2006; 26: 26.

## 125 SCHECTER AD, SPIRN B, ROSSIKHINA M, GIESEN PL, BOGDANOV V, FALLON JT, et al.

Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells.

Circ Res. 2000; 87 (2): 126-32.

#### 126 CUI MZ, PARRY GC, EDGINGTON TS, MACKMAN N.

Regulation of tissue factor gene expression in epithelial cells. Induction by serum and phorbol 12-myristate 13-acetate.

Arterioscler Thromb. 1994; 14 (5): 807-14.

#### 127 EDGINGTON TS, MACKMAN N, BRAND K, RUF W.

The structural biology of expression and function of tissue factor.

Thromb Haemost. 1991; 66 (1): 67-79.

#### 128 BACH RR, MOLDOW CF.

Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells.

Blood. 1997; 89 (9): 3270-6.

#### 129 IAKHIAEV A, PENDURTHI UR, VOIGT J, EZBAN M, VIJAYA MOHAN RAO L.

Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor.

J Biol Chem. 1999; 274 (52): 36995-7003.

#### 130 HAMIK A, SETIADI H, BU G, MCEVER RP, MORRISSEY JH.

Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein.

J Biol Chem. 1999; 274 (8): 4962-9.

### 131 DEL PRETE G, DE CARLI M, LAMMEL RM, D'ELIOS MM, DANIEL KC, GIUSTI B. et al.

Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes.

Blood. 1995; 86(1): 250-7.

#### 132 VELTROP MH, LANGERMANS JA, THOMPSON J, BANCSI MJ.

Interleukin-10 regulates the tissue factor activity of monocytes in an in vitro model of bacterial endocarditis.

Infect Immun. 2001; 69 (5): 3197-202.

# 133 PAYSANT J, SORIA C, CORNILLET-LEFEBVRE P, NGUYEN P, LENORMAND B, MISHAL Z, et al.

Long-term incubation with IL-4 and IL-10 oppositely modifies procoagulant activity of monocytes and modulates the surface expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor.

Br J Haematol. 2005; 131 (3): 356-65.

#### 134 LINDMARK E, TENNO T, CHEN J, SIEGBAHN A.

IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. Br J Haematol. 1998; 102 (2): 597-604.

#### 135 WARNES G, BIGGERSTAFF JP, FRANCIS JL.

Monocyte B7 and Sialyl Lewis X modulates the efficacy of IL-10 down-regulation of LPS-induced monocyte tissue factor in whole blood.

Br J Haematol. 1998; 102(2): 588-96.

### 136 PRADIER O, GERARD C, DELVAUX A, LYBIN M, ABRAMOWICZ D, CAPEL P, et al.

Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide.

Eur J Immunol. 1993; 23 (10): 2700-3.

#### 137 RAMANI M, OLLIVIER V, KHECHAI F, VU T, TERNISIEN C, BRIDEY F, et al.

Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced tissue factor mRNA production by human monocytes.

FEBS Lett. 1993; 334 (1): 114-6.

# 138 PRADIER O, WILLEMS F, ABRAMOWICZ D, SCHANDENE L, DE BOER M, THIELEMANS K, et al.

CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway.

Eur J Immunol. 1996; 26 (12): 3048-54.

#### 139 CHU AJ, PRASAD JK.

Antagonism by IL-4 and IL-10 of endotoxin-induced tissue factor activation in monocytic THP-1 cells; activating role of CD14 ligation.

J Surg Res. 1998; 80 (1): 80-7.

### 140 NOBLE KE, WICKREMASINGHE RG, DECORNET C, PANAYIOTIDIS P, YONG KL.

Monocytes stimulate expression of the Bcl-2 family member, A1, in endothelial cells and confer protection against apoptosis.

J Immunol. 1999; 162 (3): 1376-83.

#### 141 VASSE M, PAYSANT I, SORIA J, MIRSHAHI SS, VANNIER JP, SORIA C.

Down-regulation of fibrinogen biosynthesis by IL-4, IL-10 and IL-13.

Br J Haematol. 1996; 93 (4): 955-61.

### 142 PAJKRT D, VAN DER POLL T, LEVI M, CUTLER DL, AFFRIME MB, VAN DEN ENDE A, et al.

Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. Blood. 1997; 89 (8): 2701-5.

#### 143 OKADA K, FUJITA T, MINAMOTO K, LIAO H, NAKA Y, PINSKY DJ.

Potentiation of endogenous fibrinolysis and rescue from lung ischemia/reperfusion injury in interleukin (IL)-10-reconstituted IL-10 null mice.

J Biol Chem. 2000; 275 (28): 21468-76.

### 144 KAMPER EF, KOPEIKINA LT, TRONTZAS P, POTAMIANOU A, TSIROGLOU E, STAVRIDIS JC.

The effect of disease activity related cytokines on the fibrinolytic potential and cICAM-1 expression in rheumatoid arthritis.

J Rheumatol. 2000; 27 (11): 2545-50.

### 145 OKOPIEN B, HABERKA M, CWALINA L, KOWALSKI J, BELOWSKI D, MADEJ A, et al.

Plasma cytokines as predictors of coronary heart disease.

Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2002; 112 (1-4): 5-15.

#### 146 KOHLER HP, GRANT PJ.

Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.

N Engl J Med. 2000; 342 (24): 1792-801.

#### 147 VAUGHAN DE

PAI-1 and atherothrombosis.

J Thromb Haemost. 2005; 3 (8): 1879-83.

# 148 DOWNING LJ, STRIETER RM, KADELL AM, WILKE CA, AUSTIN JC, HARE BD, et al.

IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis.

J Immunol. 1998; 161 (3): 1471-6.

# 149 HENKE PK, DEBRUNYE LA, STRIETER RM, BROMBERG JS, PRINCE M, KADELL AM, et al.

Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis.

J Immunol. 2000; 164 (4): 2131-41.

#### 150 FOX EA, KAHN SR.

The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies.

Thromb Haemost. 2005; 94 (2): 362-5.

# 151 MYERS D, JR., FARRIS D, HAWLEY A, WROBLESKI S, CHAPMAN A, STOOLMAN L, et al.

Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. J Surg Res. 2002; 108 (2): 212-21.

# 152 SULLIVAN VV, HAWLEY AE, FARRIS DM, KNIPP BS, VARGA AJ, WROBLESKI SK, et al.

Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice.

J Surg Res. 2003; 109 (1): 1-7.

## 153 MYERS DD, JR., HAWLEY AE, FARRIS DM, CHAPMAN AM, WROBLESKI SK, HENKE PK, et al.

Cellular IL-10 is more effective than viral IL-10 in decreasing venous thrombosis.

J Surg Res. 2003; 112(2): 168-74.

#### 154 ROSS R

Atherosclerosis--an inflammatory disease.

N Engl J Med. 1999; 340 (2): 115-26.

### 155 UYEMURA K, DEMER LL, CASTLE SC, JULLIEN D, BERLINER JA, GATELY MK. et al.

Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis.

J Clin Invest. 1996; 97 (9): 2130-8.

#### 156 MALLAT Z, HEYMES C, OHAN J, FAGGIN E, LESECHE G, TEDGUI A.

Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19 (3): 611-6.

#### 157 LENTSCH AB, SHANLEY TP, SARMA V, WARD PA.

In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13.

J Clin Invest. 1997; 100 (10): 2443-8.

#### 158 LACRAZ S, NICOD LP, CHICHEPORTICHE R, WELGUS HG, DAYER JM.

IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes.

J Clin Invest. 1995; 96 (5): 2304-10.

# 159 HOLVEN KB, HALVORSEN B, BJERKELI V, DAMAS JK, RETTERSTOL K, MORKRID L, et al.

Impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from hyperhomocysteinemic subjects.

Stroke. 2006; 37 (7): 1731-6.

#### 160 STEARNS ME, GARCIA FU, FUDGE K, RHIM J, WANG M.

Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice.

Clin Cancer Res. 1999; 5(3): 711-20.

#### 161 JUNGI TW, BRCIC M, EPERON S, ALBRECHT S.

Transforming growth factor-beta and interleukin-10, but not interleukin-4, down-regulate procoagulant activity and tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. Thromb Res. 1994; 76 (5): 463-74.

162 PAYVANDI F, WU L, HALEY M, SCHAFER PH, ZHANG LH, CHEN RS, *et al.* Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-alpha, IL-1beta, and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. Cell Immunol. 2004; 230 (2): 81-8.

#### 163 COHEN SB, CRAWLEY JB, KAHAN MC, FELDMANN M, FOXWELL BM.

Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2.

Immunology. 1997; 92 (1): 1-5.

## 164 CALIGIURI G, RUDLING M, OLLIVIER V, JACOB MP, MICHEL JB, HANSSON GK, et al.

Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice.

Mol Med. 2003; 9 (1-2): 10-7.

## 165 MALLAT Z, BESNARD S, DURIEZ M, DELEUZE V, EMMANUEL F, BUREAU MF, et al.

Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis.

Circ Res. 1999; 85 (8): e17-24.

# 166 PINDERSKI OSLUND LJ, HEDRICK CC, OLVERA T, HAGENBAUGH A, TERRITO M, BERLINER JA, et al.

Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19 (12): 2847-53.

# 167 HAGENBAUGH A, SHARMA S, DUBINETT SM, WEI SH, ARANDA R, CHEROUTRE H, et al.

Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice.

J Exp Med. 1997; 185 (12): 2101-10.

# 168 VON DER THUSEN JH, KUIPER J, FEKKES ML, DE VOS P, VAN BERKEL TJ, BIESSEN EA.

Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr-/- mice.

Faseb J. 2001; 15 (14): 2730-2.

#### 169 GALIS ZS, KHATRI JJ.

Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.

Circ Res. 2002; 90 (3): 251-62.

#### 170 TEN CATE JW, VAN DER POLL T, LEVI M, TEN CATE H, VAN DEVENTER SJ.

Cytokines: triggers of clinical thrombotic disease.

Thromb Haemost. 1997; 78 (1): 415-9.

#### 171 TEDGUI A, MALLAT Z.

Atherosclerose: inflammation et desinflammation.

Sang Thrombose Vaisseaux. 2000; 12: 199-201.

#### 172 LOWE PR, GALLEY HF, ABDEL-FATTAH A, WEBSTER NR.

Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients.

Crit Care Med. 2003; 31 (1): 34-8.

## 173 GALLAGHER PM, LOWE G, FITZGERALD T, BELLA A, GREENE CM, MCELVANEY NG, et al.

Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia.

Thorax. 2003; 58 (2): 154-6.

#### 174 REID CL, PERREY C, PRAVICA V, HUTCHINSON IV, CAMPBELL IT.

Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome.

Crit Care Med. 2002; 30 (10): 2216-21.

#### 175 CHOE J, CHOI YS.

IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells.

Eur J Immunol. 1998; 28 (2): 508-15.

#### 176 BEATTY PR, KRAMS SM, MARTINEZ OM.

Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines.

J Immunol. 1997; 158 (9): 4045-51.

# 177 ZHENG C, HUANG D, LIU L, WU R, BERGENBRANT GLAS S, OSTERBORG A, et al.

Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma.

Int J Cancer. 2001; 95 (3): 184-8.

# 178 MAZUR G, BOGUNIA-KUBIK K, WROBEL T, KARABON L, POLAK M, KULICZKOWSKI K, et al.

IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma.

Immunol Lett. 2005; 96 (2): 241-6.

# 179 LU ZY, ZHANG XG, RODRIGUEZ C, WIJDENES J, GU ZJ, MOREL-FOURNIER B, et al.

Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells

Blood. 1995; 85 (9): 2521-7.

#### 180 GU ZJ, COSTES V, LU ZY, ZHANG XG, PITARD V, MOREAU JF, et al.

Interleukin-10 is a growth factor for human myeloma cells by induction of an oncostatin M autocrine loop.

Blood. 1996; 88 (10): 3972-86.

#### 181 KLEIN B, LU ZY, GU ZJ, COSTES V, JOURDAN M, ROSSI JF.

Interleukin-10 and Gp130 cytokines in human multiple myeloma.

Leuk Lymphoma. 1999; 34 (1-2): 63-70.

#### 182 DURIE BG, SALMON SE.

A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.

Cancer. 1975; 36 (3): 842-54.

# 183 MASOOD R, ZHANG Y, BOND MW, SCADDEN DT, MOUDGIL T, LAW RE, *et al.* Interleukin-10 is an autocrine growth factor for acquired immunodeficiency syndrome-related B-cell lymphoma.

Blood. 1995; 85 (12): 3423-30.

#### 184 BENJAMIN D, KNOBLOCH TJ, DAYTON MA.

Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10.

Blood. 1992; 80 (5): 1289-98.

#### 185 BLAY JY, BURDIN N, ROUSSET F, LENOIR G, BIRON P, PHILIP T, et al.

Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor.

Blood. 1993; 82 (7): 2169-74.

### 186 VOORZANGER N, TOUITOU R, GARCIA E, DELECLUSE HJ, ROUSSET F, JOAB I, et al.

Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors.

Cancer Res. 1996; 56 (23): 5499-505.

# 187 STASI R, ZINZANI L, GALIENI P, LAUTA VM, DAMASIO E, DISPENSA E, et al. Clinical implications of cytokine and soluble receptor measurements in patients with newly-diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma.

Eur J Haematol. 1995; 54 (1): 9-17.

#### 188 CORTES JE, TALPAZ M, CABANILLAS F, SEYMOUR JF, KURZROCK R.

Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma: lack of correlation with prognosis.

Blood. 1995; 85 (9): 2516-20.

# 189 LECH-MARANDA E, BASEGGIO L, BIENVENU J, CHARLOT C, BERGER F, RIGAL D, $et\ al.$

Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma.

Blood. 2004; 103 (9): 3529-34.

190 ROTHMAN N, SKIBOLA CF, WANG SS, MORGAN G, LAN Q, SMITH MT, *et al.* Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium.

Lancet Oncol. 2006; 7(1): 27-38.

## 191 LLORENTE L, RICHAUD-PATIN Y, WIJDENES J, ALCOCER-VARELA J, MAILLOT MC, DURAND-GASSELIN I, et al.

Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus.

Eur Cytokine Netw. 1993; 4(6): 421-7.

#### 192 BOEHME MW, RAETH U, GALLE PR, STREMMEL W, SCHERBAUM WA.

Serum thrombomodulin-a reliable marker of disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE): advantage over established serological parameters to indicate disease activity. Clin Exp Immunol. 2000; 119 (1): 189-95.

#### 193 PARK YB, LEE SK, KIM DS, LEE J, LEE CH, SONG CH.

Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.

Clin Exp Rheumatol. 1998; 16 (3): 283-8.

# 194 GRONDAL G, KRISTJANSDOTTIR H, GUNNLAUGSDOTTIR B, ARNASON A, LUNDBERG I, KLARESKOG L, et al.

Increased number of interleukin-10-producing cells in systemic lupus erythematosus patients and their first-degree relatives and spouses in Icelandic multicase families.

Arthritis Rheum. 1999; 42 (8): 1649-54.

### 195 LAZARUS M, HAJEER AH, TURNER D, SINNOTT P, WORTHINGTON J, OLLIER WE, et al.

Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1997; 24 (12): 2314-7.

#### 196 CRAWLEY E, WOO P, ISENBERG DA.

Single nucleotide polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region are not associated with renal disease or serology in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 1999; 42 (9): 2017-8.

#### 197 ESKDALE J, WORDSWORTH P, BOWMAN S, FIELD M, GALLAGHER G.

Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus.

Tissue Antigens. 1997; 49 (6): 635-9.

### 198 MEHRIAN R, QUISMORIO FP, JR., STRASSMANN G, STIMMLER MM, HORWITZ DA, KITRIDOU RC, et al.

Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 1998; 41 (4): 596-602.

### 199 GIBSON AW, EDBERG JC, WU J, WESTENDORP RG, HUIZINGA TW, KIMBERLY RP.

Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus.

J Immunol. 2001; 166 (6): 3915-22.

#### 200 JOKHI PP, KING A, LOKE YW.

Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface.

Cytokine. 1997; 9(2): 126-37.

#### 201 WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR.

Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?

Immunol Today. 1993; 14 (7): 353-6.

### 202 RAGHUPATHY R, MAKHSEED M, AZIZIEH F, HASSAN N, AL-AZEMI M, ALSHAMALI E.

Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions.

Cell Immunol. 1999; 196 (2): 122-30.

### 203 HANNA N, HANNA I, HLEB M, WAGNER E, DOUGHERTY J, BALKUNDI D, et al.

Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts.

J Immunol. 2000; 164 (11): 5721-8.

#### 204 VIGANO P, SOMIGLIANA E, MANGIONI S, VIGNALI M, DI BLASIO AM.

Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium.

J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87 (12): 5730-6.

### 205 MARZI M, VIGANO A, TRABATTONI D, VILLA ML, SALVAGGIO A, CLERICI E. et al.

Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy.

Clin Exp Immunol. 1996; 106 (1): 127-33.

### 206 MOREAU P, ADRIAN-CABESTRE F, MENIER C, GUIARD V, GOURAND L, DAUSSET J. et al.

IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes.

Int Immunol. 1999; 11 (5): 803-11.

#### 207 RAGHUPATHY R.

Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.

Immunol Today. 1997; 18 (10): 478-82.

### 208 BABBAGE SJ, ARKWRIGHT PD, VINCE GS, PERREY C, PRAVICA V, QUENBY S, et al.

Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss.

J Reprod Immunol. 2001; 51 (1): 21-7.

#### 209 KARHUKORPI J, LAITINEN T, KARTTUNEN R, TIILIKAINEN AS.

The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G-->A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions.

Mol Hum Reprod. 2001; 7(2): 201-3.

#### 210 KAMALI-SARVESTANI E, ZOLGHADRI J, GHARESI-FARD B, SARVARI J.

Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women.

J Reprod Immunol. 2005; 65 (2): 171-8.

### 211 DAHER S, SHULZHENKO N, MORGUN A, MATTAR R, RAMPIM GF, CAMANO L, et al.

Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss.

J Reprod Immunol. 2003; 58 (1): 69-77.

### 212 HOFFMANN SC, STANLEY EM, DARRIN COX E, CRAIGHEAD N, DIMERCURIO BS, KOZIOL DE, et al.

Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes.

Transplantation. 2001; 72 (8): 1444-50.

### 213 ZAMMITI W, MTIRAOUI N, COCHERY-NOUVELLON E, MAHJOUB T, ALMAWI WY, GRIS JC.

Association of -592C/A, -819C/T and -1082A/G interleukin-10 promoter polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion.

Mol Hum Reprod 2006; 13:13.

#### 214 CRILLY A, HAMILTON J, CLARK CJ, JARDINE A, MADHOK R.

Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis.

Rheumatology (Oxford). 2003; 42 (11): 1295-8.

### 215 DONGER C, GEORGES JL, NICAUD V, MORRISON C, EVANS A, KEE F, et al.

New polymorphisms in the interleukin-10 gene--relationships to myocardial infarction.

Eur J Clin Invest. 2001; 31(1): 9-14.

### 216 KOCH W, KASTRATI A, BOTTIGER C, MEHILLI J, VON BECKERATH N, SCHOMIG A.

Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction.

Atherosclerosis. 2001; 159 (1): 137-44.

#### 217 NGUYEN P, BROUSSAS M, CORNILLET-LEFEBVRE P, POTRON G.

Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide.

Transfusion. 1999; 39 (9): 975-82.

#### 218 TANAKA KA, SZLAM F, KATORI N, VEGA JD, LEVY JH.

Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic activation in vitro.

Thromb Res. 2004; 113 (5): 333-9.

### 219 HEMKER HC, GIESEN PL, RAMJEE M, WAGENVOORD R, BEGUIN S.

The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.

Thromb Haemost. 2000; 83 (4): 589-91.

#### 220 NIEMETZ J, MARCUS AJ.

The stimulatory effect of platelets and platelet membranes on the procoagulant activity of leukocytes.

J Clin Invest. 1974; 54 (6): 1437-43.

#### 221 VAN DER LOGT CP, DIRVEN RJ, REITSMA PH, BERTINA RM.

Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbolester.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1994; 5 (2): 211-20.

### 222 KAMIMURA M, VIEDT C, DALPKE A, ROSENFELD ME, MACKMAN N, COHEN DM, et al.

Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. Circ Res. 2005; 97 (4): 305-13.

# 223 SATTA N, TOTI F, FEUGEAS O, BOHBOT A, DACHARY-PRIGENT J, ESCHWEGE V, et al.

Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. J Immunol. 1994; 153 (7): 3245-55.

### 224 EGORINA EM, SOVERSHAEV MA, BJORKOY G, GRUBER FX, OLSEN JO, PARHAMI-SEREN B, et al.

Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25 (7): 1493-8.

#### 225 SCHOTTELIUS AJ, MAYO MW, SARTOR RB, BALDWIN AS JR.

Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding.

J Biol Chem. 1999; 274 (45): 31868-74.

### 226 MISUMI K, OGAWA H, YASUE H, SOEJIMA H, SUEFUJI H, NISHIYAMA K, et al.

Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris.

Am J Cardiol. 1998; 81 (1): 22-6.

### 227 SUEFUJI H, OGAWA H, YASUE H, KAIKITA K, SOEJIMA H, MOTOYAMA T, et al.

Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction.

Am Heart J. 1997; 134 (2 Pt 1): 253-9.

### 228 ASAKURA H, KAMIKUBO Y, GOTO A, SHIRATORI Y, YAMAZAKI M, JOKAJI H $\it{et\,al}$

Role of tissue factor in disseminated intravascular coagulation.

Thromb Res. 1995; 80 (3): 217-24.

#### 229 MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF.

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic Acids Res. 1988; 16 (3): 1215.

#### 230 HEZARD N, CORNILLET P, DROULLE C, GILLOT L, POTRON G, NGUYEN P.

Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position.

Thromb Res. 1997; 88 (1): 59-66.

## 231 DE GROOTE D, ZANGERLE PF, GEVAERT Y, FASSOTTE MF, BEGUIN Y, NOIZAT-PIRENNE F, et al.

Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation.

Cytokine. 1992; 4(3): 239-48.

#### 232 POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM.

A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996; 88 (10): 3698-703.

#### 233 DE STEFANO V, FINAZZI G, MANNUCCI PM.

Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management.

Blood. 1996; 87 (9): 3531-44.

#### 234 WHITE RH.

The epidemiology of venous thromboembolism.

Circulation. 2003; 107 (23 Suppl 1): I4-8.

#### 235 WHITE RH, ZHOU H, MURIN S, HARVEY D.

Effect of ethnicity and gender on the incidence of venous thromboembolism in a diverse population in California in 1996.

Thromb Haemost. 2005; 93 (2): 298-305.

#### 236 KEARON C.

Epidemiology of venous thromboembolism.

Semin Vasc Med. 2001; 1(1): 7-26.

### 237 ASADULLAH K, ESKDALE J, WIESE A, GALLAGHER G, FRIEDRICH M, STERRY W.

Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis.

J Invest Dermatol. 2001; 116 (6): 975-8.

### 238 LLORENTE L, RICHAUD-PATIN Y, FIOR R, ALCOCER-VARELA J, WIJDENES J, FOURRIER BM. et al.

In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity.

Arthritis Rheum. 1994; 37 (11): 1647-55.

### 239 HENSEN P, ASADULLAH K, WINDEMUTH C, RUSCHENDORF F, HUFFMEIER U, STANDER M, et al.

Interleukin-10 promoter polymorphism IL10.G and familial early onset psoriasis.

Br J Dermatol. 2003; 149 (2): 381-5.

### 240 SCHOTTE H, SCHLUTER B, DRYNDA S, WILLEKE P, TIDOW N, ASSMANN G, et al.

Interleukin 10 promoter microsatellite polymorphisms are associated with response to long term treatment with etanercept in patients with rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 2005; 64 (4): 575-81.

#### 241 MIDDLETON PG, TAYLOR PR, JACKSON G, PROCTOR SJ, DICKINSON AM.

Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants.

Blood. 1998; 92 (10): 3943-8.

### 242 CAVET J, MIDDLETON PG, SEGALL M, NOREEN H, DAVIES SM, DICKINSON AM.

Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants.

Blood. 1999; 94 (11): 3941-6.

# 243 TAKAHASHI H, FURUKAWA T, HASHIMOTO S, SUZUKI N, KUROHA T, YAMAZAKI F, et al.

Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplant. 2000; 26 (12): 1317-23.

#### 244 HUANG DR, ZHOU YH, XIA SQ, LIU L, PIRSKANEN R, LEFVERT AK.

Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease.

J Neuroimmunol. 1999; 94 (1-2): 82-7.

#### 245 HENNIG BJ, PARKHILL JM, CHAPPLE IL, HEASMAN PA, TAYLOR JJ.

Dinucleotide repeat polymorphism in the interleukin-10 gene promoter (IL-10.G) and genetic susceptibility to early-onset periodontal disease.

Genes Immun. 2000; 1 (6): 402-4.

#### 246 ANAYA JM, CORREA PA, HERRERA M, ESKDALE J, GALLAGHER G.

Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjogren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism.

J Rheumatol. 2002; 29 (9): 1874-6.

#### 247 STIRRAT GM.

Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management.

Lancet. 1990; 336 (8717): 728-33.

#### 248 STIRRAT GM.

Recurrent miscarriage.

Lancet. 1990; 336 (8716): 673-5.

#### 249 STEPHENSON MD.

Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples.

Fertil Steril. 1996; 66 (1): 24-9.

#### 250 HILL JA.

T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women.

Hum Reprod. 1995; 10 (Suppl 2): 114-20.

### 251 GRIS JC, PERNEGER TV, QUERE I, MERCIER E, FABBRO-PERAY P, LAVIGNE-LISSALDE G, et al.

Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. Blood. 2003; 102 (10): 3504-13.

### 252 LISSALDE-LAVIGNE G, COCHERY-NOUVELLON E, MERCIER E, QUERE I, DAUZAT M. MARES P. et al.

The association between hereditary thrombophilias and pregnancy loss.

Haematologica. 2005; 90 (9): 1223-30.

#### 253 MAKIKALLIO K, TEKAY A, JOUPPILA P.

Yolk sac and umbilicoplacental hemodynamics during early human embryonic development. Ultrasound Obstet Gynecol. 1999; 14 (3): 175-9.

#### 254 REY E, KAHN SR, DAVID M, SHRIER I.

Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis.

Lancet. 2003; 361 (9361): 901-8.

#### 255 KOVALEVSKY G, GRACIA CR, BERLIN JA, SAMMEL MD, BARNHART KT.

Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis.

Arch Intern Med. 2004; 164 (5): 558-63.

#### 256 DUDDING TE, ATTIA J.

The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis.

Thromb Haemost. 2004; 91 (4): 700-11.

### 257 LISSALDE-LAVIGNE G, FABBRO-PERAY P, COCHERY-NOUVELLON E, MERCIER E, RIPART-NEVEU S, BALDUCCHI JP, et al.

Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control 'NOHA first' study.

J Thromb Haemost. 2005; 3 (10): 2178-84.

#### 258 RAND JH, WU XX, ANDREE HA, LOCKWOOD CJ, GULLER S, SCHER J, et al.

Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism.

N Engl J Med. 1997; 337 (3): 154-60.

#### 259 GIRARDI G, REDECHA P, SALMON JE.

Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation.

Nat Med. 2004; 10 (11): 1222-6.

#### 260 BOSE P, BLACK S, KADYROV M, BARTZ C, SHLEBAK A, REGAN L, et al.

Adverse effects of lupus anticoagulant positive blood sera on placental viability can be prevented by heparin in vitro.

Am J Obstet Gynecol. 2004; 191 (6): 2125-31.

### 261 MAKHSEED M, RAGHUPATHY R, AZIZIEH F, FARHAT R, HASSAN N, BANDAR A.

Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions.

Hum Reprod. 2000; 15 (9): 2011-7.

#### 262 BATES MD, QUENBY S, TAKAKUWA K, JOHNSON PM, VINCE GS.

Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?

Hum Reprod. 2002; 17 (9): 2439-44.

### 263 COCHERY-NOUVELLON E, VITRY F, CORNILLET-LEFEBVRE P, HEZARD N, GILLOT L, NGUYEN P.

Interleukin-10 promoter polymorphism and venous thrombosis: a case-control study.

Thromb Haemost. 2006; 96 (1): 24-8.

### VI Annexe 1 : Zammiti et al (Mol Hum Reprod, 2006)

#### ARTICLE IN PRESS

Molecular Human Reproduction Page 1 of 6

doi:10.1093/molehr/gal084

# Association of -592C/A, -819C/T and -1082A/G interleukin-10 promoter polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion

### W.Zammiti<sup>1</sup>, N.Mtiraoui<sup>1</sup>, E.Cochery-Nouvellon<sup>2</sup>, T.Mahjoub<sup>1</sup>, W.Y.Almawi<sup>3,4</sup> and J.-C.Gris<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research unit of Haematological and Autoimmune diseases, Faculty of Pharmacy, Monastir, Center University, <sup>2</sup>Faculty of Biological and Pharmaceutical Sciences, Montpellier-1 University, Montpellier, France and <sup>3</sup>Department of Medical Biochemistry, Arabian Gulf University, Manama, Bahrain

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed at: Department of Medical Biochemistry, College of Medicine and Medical Sciences, Arabian Gulf University, PO Box 22979, Manama, Bahrain. E-mail. wyalmawi@yahoo.co.uk

Increasing evidence supports a role for altered T helper 1 (Th1)—Th2 cytokine balance in idiopathic recurrent spontaneous abortion (RSA). The aim of this study was to investigate the association of the interleukin 10 (IL-10) promoter polymorphisms -592C/A, -819C/T and -1082A/G with RSA. Women (n = 350) with at least three consecutive spontaneous abortions (RSA cases) and 200 control women with at least two successful pregnancies were included. The frequency of the -819T allele [P = 0.05, odds ratio (OR) = 1.51], but not other single-nucleotide polymorphisms (SNPs), was higher among RSA patients. Complete linkage disequilibrium (LD) was seen between -592C and -819C and -1082G alleles, as well as between -592A and -819T and between -819C and -1082G alleles only among patients. Although the genotype frequencies (except for -819C/C) of the three polymorphisms were comparable between patients and controls, higher frequency of -592A/-819T/-1082A haplotype (OR = 4.01, 95% CI = 1.83–7.95) was seen in cases versus controls. Regression analysis indicated that, after adjusting for potential variables, -592C/A (OR = 3.32, 95% CI = 1.76–6.27) and -819C/T (OR = 5.06, 95% CI = 2.59–9.91) were associated with exclusively early but not exclusively late RSA, where negative association for both was noted. This supports the notion of involvement of IL-10-592C/A and -819C/T polymorphisms as inherited risk factors of idiopathic RSA.

Key words: autoimmunity/autoantibodies/IL-10/recurrent abortion

#### Introduction

Spontaneous abortion is a frequent common complication of pregnancy, which afflicts healthy women, with 0.5-2% of women experiencing recurrent spontaneous abortion (RSA), defined as three or more consecutive pregnancy losses before the 20th week of gestation (Choudhury and Knapp, 2000; Sierra and Stephenson, 2006). Whereas inherited (Carp et al., 2006; Sierra and Stephenson, 2006) and acquired (infec-30 tions, smoking, etc.) factors have been implicated in the aetiology of RSA (Kishore et al., 2003; Pandey et al., 2005), most (50-60%) of the cases remain idiopathic. In the face of unknown aetiological factor(s), dysregulated immunity was proposed as a potential mechanism underlying RSA (Jenkins et al., 2000; Raghupathy, 2001; Wu and Stephenson, 2006). This reportedly included autoimmune abnormalities (positive anti-phospholipid, anti-nuclear and anti-microsomal antibodies) (Arnold et al., 2001; Zammiti et al., 2006), increased cellular immunity (Ntrivalas et al., 2005; Wold and Arici, 2005) and altered T helper 1 (Th1)-Th2 balance (Makhseed et al., 2001; Kwak-Kim et al., 2005).

T helper cell activation results in the differentiation of naive Th0 cells into Th1 and Th2 cells, with unique cytokine profile and effector functions (Mosmann and Sad, 1996). Th1 cells produce interleukin 2 (IL-2), interferon (IFN)- $\gamma$  and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and are involved in cell-mediated responses and delayed-type hypersensitivity reactions, whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 and evoke humoral immunity (Mosmann and Sad, 1996). Th1 and Th2

cells reciprocally regulate each other's function through their respective cytokines (Liberman *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2005). Among Th2 cytokines, IL-10 plays a key role in Th2 immunity. Located on human chromosome 1 (1q31–q32), many single-nucleotide poly-50 morphisms (SNPs) were reported in the proximal (at position -1082A/G, -819T/C and -592A/C) and distal (D'Alfonso *et al.*, 2000; Mormann *et al.*, 2004) regions of the IL-10 gene and were reportedly involved in IL-10 transcription rate, thereby directly affecting its production level (Eskdale *et al.*, 1998; Mormann *et al.*, 2004).

Previous studies demonstrated that successful pregnancy is dependant on shifting of maternal immune response from (proinflammatory) Th1 towards (anti-inflammatory) Th2 phenotypes (Hill and Choi, 2000; Makhseed *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005). This was evidenced by findings that higher levels of IL-6 and IL-10 were detected in healthy parous women compared with women with idiopathic RSA (Jenkins *et al.*, 2000; Daher *et al.*, 2003), and increased IFN-γ expression was seen in RSA but not in control women (Jenkins *et al.*, 2000). In addition, infiltration by natural killer (NK) cells and activated macrophages were detected in resorption sites, and administration of Th1 cytokines (IFN-γ, TNF-α) to normal pregnant mice increased fetal resorption (Clark and Croitoru, 2001; Zhu *et al.*, 2005), possibly by precipitating prothrombotic and/or inflammatory events (Clark and Croitoru, 2001).

Previous studies suggested that the incidence and frequencies of 70 RSA are partly under genetic control and that successful pregnancy

© The Author 2006. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

#### W.Zammiti et al.

depends on a Th2 cytokine response, whereas a poor pregnancy outcome is associated with increased Th1 cytokines accompanied by reduced Th2 cytokines expression. Insofar as polymorphisms in cytokine genes, especially in their promoter regions, correlated with cytokines levels (Prigoshin et al., 2004), polymorphisms in Th1 cytokine genes were reportedly more pronounced in RSA women compared with control parous women in some studies (Reid et al., 2001; Daher et al., 2003) but not others (Bates et al., 2002). The association of Th2 cytokine genes with RSA also remains to be determined, with Th2 (IL-4 and IL-10) cytokines shown to be associated with RSA in some studies (Bates et al., 2002; Daher et al., 2003) but not in other reports (Prigoshin et al., 2004). In view of the critical role of IL-10 in regulation of Th2 development and maintenance of pregnancy, we investigated the IL-10 promoter gene polymorphisms -592C/A, -819C/T and -1082A/G in RSA women and multiparous women, who served as controls.

#### Materials and methods

#### Study subjects

This was a case-control retrospective study, performed at the Maternity Center of Hôpital Farhat Hached of Sousse, Tunisia. Data collection procedures were the same for patients and control subjects. Cases comprised 350 fertile women with three or more RSA of unknown aetiology with the same partner. Exclusion criteria included anatomical abnormalities, previously known systemic disease, endocrine disorders including diabetes mellitus [glycated haemoglobin (HbA1c) levels <6.00 for patients and controls], previous venous or arterial thrombosis or a family history of thromboembolism. Chromosomal aberrations and Rh incompatibility were ruled out before inclusion in the study. As infection was linked with RSA, all subjects included were confirmed )0 to be negative for the TORCH agents *Toxoplasma gondii*, rubella, cytomegalovirus (CMV), herpes simplex viruses (HSV-1 and HSV-2), varicella zoster virus (VZV) and human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2) by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Transvaginal ultrasound was performed to confirm spontaneous abortion (no heartbeat detection). Pregnancy losses were classified as early (5-10 weeks) and late (11-30 weeks) (Table I). Control subjects comprised 200 women with uneventful pregnancies and were matched with patients according to several risk factors (smoking, alcohol consumption and oral contraceptive use); age distribution was comparable between RSA cases (mean age 28.9 ±  $10^{-10}$  5.9 years) and normal fertile controls (mean age  $28.4 \pm 3.8$  years) (Table I). All cases and control subjects were required to sign an informed consent before entering the study that was conducted after all institutional ethics requirements were met. Blood samples were obtained from study participants in EDTA tubes and were processed shortly thereafter.

#### IL-10 gene polymorphisms

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the phenolchloroform method. Cytokine gene polymorphisms were determined by PCRallele-specific amplification (PCR-ASA). Briefly, for the -592C/A SNP, DNA was amplified using a common reverse primer (5'-GCTCACTATAAAAATA-GAGACGG-3') and specific forward primers for the C (5'-CTGGCTTCCTA-CAGG-3') and the A (5'-GACTGGCTTCCTACAGT-3') alleles. Similarly, for the -819C/T SNP, DNA was amplified using a common reverse primer (5'-CTTCTTCCACCCCATCT-3') and specific forward primers for the C (5'-GCTCACTATAAAAATAGAGACGG-3') and the T (5'-AACTGAG-GCACAGAGATA-3') alleles. The IL10-1082G/A SNP was detected with  $\ ^{125}$ PCR-ASA, as previously described (Karhukorpi et al., 2001).

Quality control for the DNA amplification was performed using Factor IX gene as described (Hezard et al., 1997). Positive controls were selected by amplifying and sequencing two regions of the IL-10 promoter. The first containing the -592 and -819 SNPs, and the following primers were used: 5'AATCCAGACAACACTACTAAGG-3'(sense) and 5'-TTCCATTTTACTT-TCCAGAGA-3' (antisense). The second contained -1082 SNP, using the following primers: (sense) 5'-GTAAGCTTCTGTGGCTGGAGT-3' and (antisense) 5'-TTTCCAGATATCTGAAGAAGTCCTG-3'

#### Statistical analysis

Quantitative data are presented by their mean and standard deviation (SD). Pearson chi-square and Fisher's exact tests were used to compare the allele and genotype frequencies. Statistical analysis was performed on SPSS v. 13.0 statistics software. Linkage disequilibrium (LD) analysis, the non-random association between two loci, was calculated using the HLAStat 2000 software. 140 Logistic regression analysis, performed in a monoparametric and then in a multiparametric way, taking the control women as the reference group, was performed to determine the crude odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) associated with the risk of recurrent idiopathic pregnancy loss. Statistical significance was set at P < 0.05.

#### Results

#### IL-10 polymorphisms analysis

The distribution of IL-10-592C/A, -819C/T and -1082A/G genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium among controls. The frequency of IL-10-592A (0.28 versus 0.23; P = 0.06) and C (0.72 versus 0.77; 150 P = 0.50) alleles, together with IL-10-1082A (0.54 versus 0.51; P =0.76) and G (0.46 versus 0.49; P = 0.91) alleles were similar between patients and controls (Table II). In contrast, the frequency of the IL-10-819 (mutant) T allele (0.31 versus 0.24; P = 0.02; OR = 1.51), but not C allele (0.69 versus 0.76; P = 0.15), was higher among patients 155 (Table II). With the exception of the -819C/C genotype, which was

Table I. Clinical characteristics of patients and controls

	Cases <sup>1</sup>	Controls <sup>1</sup>	P	OR	95% CI
Age	28.9 ± 5.9	28.4 ± 3.8	$0.27^{2}$		
Smokers	23 (6.6)	9 (4.5)	$0.35^{3}$	1.49	0.68-3.29
Alcohol	10(2.9)	5 (2.5)	$1.00^{3}$	1.15	0.39-3.40
BMI	$25.8 \pm 4.0$	$24.6 \pm 3.8$	0.01		
Oral contraceptives	93 (26.6)	46 (23.0)	$0.42^{3}$	1.21	0.81 - 1.82
Number of pregnancies	$4.1 \pm 1.4$	$3.8 \pm 1.4$	$0.02^{2}$		
Number of children	$0.51 \pm 0.72$	$3.8 \pm 1.4$	< 0.0012		
Abortions	$3.6 \pm 1.1$	$0.0 \pm 0.0$	< 0.0012		
Pregnancy loss					
Early loss	71 (20.3)	$0.0 \pm 0.0$			
Late loss	79 (22.6)	$0.0 \pm 0.0$			
Early-late loss	200 (57.1)	$0.0 \pm 0.0$			

BMI, body mass index (kg/m2); CI, confidence interval; OR, odds ratio.

<sup>3</sup>Pearson's chi-square test.

Page 2 of 6

A total of 350 patients and 200 controls were included.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Fisher's exact test

#### IL-10 polymorphism in idiopathic recurrent abortion

Table II. Allele and genotype frequencies of the interleukin-10 polymorphisms						
SNP	Genotypes		Alleles			
-592C/A	C/C	C/A	A/A	С	A	
Patients <sup>1</sup>	$206 (58.9)^2$	93 (26.6)	51 (14.1)	$0.72 \pm 0.02^3$	$0.28 \pm 0.02$	
Controls <sup>1</sup>	134 (67.0)	41 (20.5)	25 (12.5)	$0.77 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.02$	
P	0.07	0.14	0.58	0.50	0.06	
OR (95% CI)	0.7 (0.5-1.0)	1.4 (0.9-2.1)	1.2 (0.7-1.0)	0.84	1.42	
-819C/T	C/C	C/T	T/T	C	T	
Patients	182 (52.0)	120 (34.3)	48 (13.7)	$0.69 \pm 0.02$	$0.31 \pm 0.02$	
Controls	124 (62.0)	57 (28.5)	19 (9.5)	$0.76 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.02$	

0.03 0.19 0.15 0.02 OR (95% CI) 0.7 (0.5-1.0) 1.3 (0.9-1.9) 1.5 (0.9-2.6) 0.66 1.51 -1084A/G G/A G/G 185 (52.9)  $0.53 \pm 0.02$  $0.47 \pm 0.02$ 87 (26.6) 72 (20.6) Patients Controls 54 (27.0) 107 (53.5) 39 (19.5)  $0.54 \pm 0.02$  $0.46 \pm 0.02$ 0.65 0.62 0.84 0.76 0.91 OR (95% CI) 1.1 (0.8–1.6) 1.1 (0.7–1.7) 1.02

lower among patients than controls (P = 0.03; OR = 0.7; 95% CI = 0.5-1.0), the frequencies of IL-10-592C/A, -819C/T and -1082A/G genotypes were comparable between patients and controls (Table II).

#### 160 LD analysis

LD analysis, defined by the delta (D') coefficient, was determined for the IL-10-592C/A, -819C/T and -1084A/G SNPs. Complete LD was noted for the -592A and -819T (D' = 0.084; P < 0.001) and for the -592C with both of -819C (D' = 0.079; P < 0.001) and -1082G (D' = 0.060; P = 0.001) and for -819C with -1082G alleles (D' = 0.048; P =0.011) among patients, and a weak LD was seen in controls for the -592C and -1082G alleles (D' = 0.049; P = 0.056) (Table III). No significant LD was noted among other loci among patients or control subjects.

#### 170 IL-10 haplotype distribution

The prevalence of the IL-10 haplotypes was examined. Higher prevalence of the -592A/-819T/-1084A haplotypes was seen in patients (OR = 4.01; 95% CI = 1.83-7.95), thereby assigning a susceptible nature to this haplotype. Although it did not reach statistical significance, higher prevalence of the -592C/-819T/-1084A was noted among controls (OR = 0.67; 95% CI = 0.44-1.02), thereby assigning a protective role for this haplotype. The prevalence of the other haplotypes was comparable between cases and controls (Table IV).

Table III. Linkage disequilibrium analysis

Locus 1	Locus 2	Patients <sup>2</sup>			Controls <sup>2</sup>		
		Delta	$\chi^2$	P	Delta	$\chi^2$	P
-592 <b>A</b>	-819 <b>T</b>	0.084	57.51	< 0.001	-0.004	0.112	0.738
-592C	-819C	0.079	19.42	< 0.001	0.049	3.664	0.056
-592C	-1082G	0.060	10.5	0.001	0.028	1.174	0.279
-819C	-1082G	0.048	6.497	0.011	-0.019	0.377	0.539

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Determined using HLAStat 2000 software

Table IV. Interleukin-10 haplotypes distribution among cases and controls

Haplotype (-592/-819/-1084)	Patients <sup>1</sup>	Controls <sup>1</sup>	$P^2$	OR (95% CI)		
CCA	0.324	0.325	0.97	1.00 (0.77–1.29)		
CCG	0.276	0.273	0.96	1.02 (0.77-1.34)		
C <i>T</i> A	0.079	0.113	0.08	0.67 (0.44-1.02)		
CTG	0.073	0.063	0.60	1.18 (0.71-1.91)		
$A \subset A$	0.070	0.098	0.13	0.70 (0.49-1.08)		
$A \subset G$	0.076	0.093	0.39	0.80 (0.52-1.24)		
ATA	0.076	0.020	< 0.001	4.01 (1.83-7.95)		
ATG	0.027	0.018	0.42	1.57 (0.64–3.52)		

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

#### Risk factors for pregnancy loss

Predictors of early, late and early-late RSA were determined by performing three logistic regression analysis models with the dependent variable being early, late and early-late RSA and the independent confounding variables being age, smoking, use of oral contraceptives, body mass index (BMI), and IL-10-592C/A, -819C/T and -1082G/A 185 SNPs (Table V). The only variables that were selected using this technique, for the first outcome (early RSA) was -592C/A (OR = 3.32;

Table V. Regression analysis

Factor	Early		Late		Early + Late	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
Age	1.00	0.94-1.06	1.00	0.95-1.05	0.99	0.95-1.03
Smoker	0.48	0.13 - 1.71	1.30	0.32 - 5.21	0.55	0.22 - 1.38
Oral contraceptive	0.67	0.32 - 1.41	0.67	0.37 - 1.23	0.92	0.56-1.50
BMI	0.85	0.78-0.93	0.91	0.85 - 0.98	0.94	0.89 - 1.00
IL10 [-592]1	3.32	1.76-6.27	0.51	0.26-0.99	1.49	0.96 - 2.31
IL 10 [-819] <sup>1</sup>	5.06	2.59-9.91	0.42	0.22 - 0.81	1.42	0.93 - 2.17
IL 10 [-1082] <sup>1</sup>	1.44	0.63 - 3.26	0.77	0.38 - 1.55	0.77	0.46-1.27

BMI, body mass index; CI, confidence interval; IL, interleukin; OR, odds

Page 3 of 6

CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism

Study subjects comprised 350 patients and 200 control subjects

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Percentage of total. <sup>3</sup>Allele frequency ± SE.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Study subjects comprised 350 patients and 200 control subjects.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Study subjects comprised 350 patients and 200 control subjects.
<sup>2</sup>Pearson chi-square test.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Homozygote + heterozygote carriers.

#### **ARTICLE IN PRESS**

#### W.Zammiti et al.

95% CI = 1.76--6.27) and -819C/T (OR =  $5.06;\,95\%$  CI = 2.59--9.91), whereas for the second outcome (late RPL), it was BMI (OR =  $0.91;\,95\%$  CI =  $0.85\text{--}0.98),\,-592\text{C/A}$  (OR =  $0.51;\,95\%$  CI = 0.26--0.99) and -819C/T (OR =  $0.42;\,95\%$  CI = 0.22--0.81) and for the third outcome (early + late), it was BMI (OR =  $0.94;\,95\%$  CI = 0.89--1.00). Adjusting for the variables selected, -1082G/A SNP was not associated with any of the stages of idiopathic RSA.

#### Discussion

Successful pregnancy is dependent on maintaining a fine balance between Th1 and Th2 immunity (El-Shazly *et al.*, 2004). This was reportedly characterized by a shift to Th2 (humoral) immunity, which involves augmentation in Th2 cytokine (IL-4 and IL-10) production (Jenkins *et al.*, 2000; Makhseed *et al.*, 2001) accompanied with attenuation of Th1 cytokine synthesis (El-Shazly *et al.*, 2004). Insofar as cytokine production is under genetic control and as IL-10 promoter polymorphisms were implicated in RSA pathogenesis (Daher *et al.*, 2003; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005), here we investigated IL-10 gene polymorphisms in RSA and control multiparous women. Our results demonstrated a role for -592C/A and -819C/T but not for -1084A/G, IL-10 promoter polymorphisms in idiopathic RSA.

Insofar as RSA is a heterogeneous condition precipitated by acquired and inherited risk factors, patients were selected with three or more RSA of unknown aetiology with the same partner. All subjects did not have personal or family history of venous and arterial thromboembolic events and were normoglycemic (HbA1c  $\leq$  6.00), thereby ruling out hyperglycaemia as a potential complication (Kalter, 1999; Temple *et al.*, 2002). As bacterial, viral and toxoplasma infections may impact pregnancy outcome, all subjects included were negative for the TORCH agents screened. Several studies indicated that none of the classic TORCH agents were significant causes of RSA (Paukku *et al.*, 1999; Kavalier, 2005), thereby prompting The Royal College to recommend abandoning TORCH screening for infection from RSA investigation (Kavalier, 2005).

The lack of association of -1084A/G SNP with RSA was reminiscent of previous findings, which did not find any association between this SNP and RSA (Babbage et al., 2001; Karhukorpi et al., 2001; Daher et al., 2003; Costeas et al., 2004; Kamali-Sarvestani et al., 2005). Regression analysis demonstrated that -592C/A (OR = 3.32) and -819C/T (OR = 5.06) SNPs were associated with exclusively early RSA. This was in partial agreement with a study of Iranian RSA women where the -592C/A, but not -819C/T, SNP was associated with RSA (Kamali-Sarvestani et al., 2005) and in apparent disagreement with other findings that failed to demonstrate any association of these SNPs with RSA (Costeas et al., 2004; Prigoshin et al., 2004). In the latter studies, several factors such as disease type, acquired or inherited factors (including ethnic differences) were largely ignored (Costeas et al., 2004; Prigoshin et al., 2004), thereby questioning the validity of the analysis. Accordingly, these discrepancies may be reconciled by differences in ethnicities (Costeas et al., 2004; Prigoshin et al., 2004; Kamali-Sarvestani et al., 2005) and sample size which ranged in the above-cited studies from 38 to 69 patients (and 54-108 controls), compared with the 350 RSA cases and 200 control parous subjects investigated here.

It was suggested that Th1, but not Th2, cytokine gene polymorphisms were associated with RSA, an indication that heightened Th1 cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) adversely affected pregnancy outcome. This was exemplified by the findings that the IFN- $\gamma$  A874T (Daher *et al.*, 2003; Prigoshin *et al.*, 2004) and TNF- $\alpha$  -308G/A (Costeas *et al.*, 2004) polymorphisms were linked with RSA. In view of the differential effect of the IL-10 SNPs in regulating IL-10 mRNA expression and protein secretion (Crilly *et al.*, 2003; Suarez *et al.*, 2003; Yilmaz

et al., 2005), coupled with ethnic variation in the effect of IL-10 polymorphisms on IL-10 expression (Rees et al., 2002; Suarez et al., 250 2003), this suggests an indirect role for IL-10 in the up-regulation of the expression of proinflammatory Th1 cytokines. In addition, the lack of discordance between genotype and protein levels reported by some studies is largely because of the presence of serum inhibitors, coupled with varied assay sensitivities which may mask a true finding, 255 as was suggested (Rees et al., 2002; Suarez et al., 2003).

IL-10 haplotype distribution demonstrated increased prevalence of the ATA haplotype (OR = 4.01) among patients. Previous studies documented strong LD between the -1082A/G, -819T/C and -592A/C SNPs (D'Alfonso et al., 2000), with only three haplotypes (ACC, 260 ATA and GCC) being the most prevalent (of the possible maximum of eight haplotypes). Insofar as the ATA haplotype is associated with reduced IL-10 transcription compared with the GCC or ACC haplotypes (Crilly et al., 2003; Temple et al., 2003; Costeas et al., 2004), this suggests that RSA is associated with reduced Th2 (IL-10) expression and an accompanying enhanced Th1 cytokine expression. In agreement with results presented here was a recent report that also documented increased ATA haplotype prevalence in RSA cases compared with controls, which was in turn associated with reduced IL-10 secretion (Costeas et al., 2004). Consequently, this may predispose to 270 heightened Th1 responses; prompting the conclusion that specific IL-10 haplotype may be indicative of abortion-prone conditions.

Insofar as its production varies as per the specific polymorphism (Crilly et al., 2003; Costeas et al., 2004), the role of IL-10 in RSA pathogenesis remains controversial. It was suggested that increased 275 IL-10 expression was associated with successful pregnancy, whereas low levels were linked with recurrent fetal loss (Jenkins et al., 2000). Others suggested the opposite, that enhanced IL-10 production was seen in RSA cases compared with fertile women (Vives et al., 1999; Bates et al., 2002). Others claimed that IL-10, absent in the serum of 280 healthy pregnant women, was detected during abortion and labour (Makhseed et al., 2001). Although explanation for these discrepancies remains to be seen, the complexity of cytokine balance within the endometrium and decidua (Lin et al., 2003), coupled with the influence of maternal hormones, dictates the Th1 and Th2 cytokine bal- 285 ance during pregnancy. For example, progesterone facilitates Th2 cell development, which when coupled with an inherent defect in cytokine production because of a genetic polymorphism suggests that the immune system in RSA women may be compromised before pregnancy occurs.

Discordance between cytokine production in the circulation and at the maternal-fetal interface was previously demonstrated (Vince and Johnson, 1996; Vives et al., 1999). In addition, an imbalance in the innate-acquired immunity, exemplified by the lack of proper HLA class I (and class II) expression, and in the presence of cellular infiltrates comprising large granular lymphocytes and monocytes, suggested a greater role for the innate as opposed to the acquired immunity in RSA (Sacks et al., 1999; Babbage et al., 2001). Insofar as fetal-maternal relationship depends on presentation of fetal antigens, recognition of fetally derived antigens induces the immune system to 300 precipitate protective mechanisms, and consequently inadequate recognition of fetal antigens reportedly resulted in abortion. In these regards, it was shown that non-polymorphic (class I) HLA-G, expressed by trophoblast and fetal endothelial cells in chorionic villi and amnion cells/amniotic fluid, presents antigens for γ/δ T cells, 305 leading to protection of the trophoblast from cytotoxic effector mechanisms. Although placental antigen expression determines maternal cytokine pattern, decidual γ/δ T cells (which have a smaller receptor repertoire than  $\alpha/\beta$  T cells) recognize unprocessed foreign antigens on the trophoblast in a major histocompatibility complex (MHC)-non- 310 restricted manner (Szekeres-Bartho, 2002). More recently, IL-10 was

Page 4 of 6

#### **ARTICLE IN PRESS**

#### IL-10 polymorphism in idiopathic recurrent abortion

described to contribute to successful pregnancies by relaxing decidual stromal cells through reducing the incorporation of α-SA actin into their stress fibres, which becomes relevant in maintaining successful pregnancy (Kimatrai *et al.*, 2005).

Idiopathic RSA is a multifactorial condition with immune and nonimmune causes. This study demonstrated an association between IL-10-592C/A and -819C/T promoter polymorphisms in idiopathic RSA among Tunisian patients. Further study investigating IL-10 production as per genotype together with interaction with Th1 cytokines is required to characterize the involvement of IL-10 more precisely, further supporting the notion of Th1-Th2 cytokine imbalance in the

#### References

pathogenesis of RSA.

- Arnold J, Holmes Z, Pickering W, Farmer C, Regan L and Cohen H (2001) Anti-β2 glycoprotein 1 and anti-annexin V antibodies in women with recurrent miscarriage. Br J Haematol 113,911–914.
- Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS, Perrey C, Pravica V, Querby S, Bates M and Hutchinson IV (2001) Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol 51,21–27.
- Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM and Vince GS (2002) Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? Hum Reprod 17,2439–2444.
- Carp H, Guetta E, Dorf H, Soriano D, Barkai G and Schiff E (2006) Embryonic karyotype in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations. Fertil Steril 85,446–450.
- Choudhury SR and Knapp LA (2000) Human reproductive failure. I. Immunological factors. Hum Reprod Update 7,113–134.

  Clark DA and Croitoru K (2001) TH1/TH2.3 imbalance due to cytokine pro-
- Clark DA and Croitoru K (2001) TH1/TH2.3 imbalance due to cytokine producing NK, gammadelta T and NK-γô T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. Am J Reprod Immunol 45,257–265.
- in success or failure of pregnancy. Am J Reprod Immunol 45,257–265.

  Costeas PA, Koumouli A, Giantsiou-Kyriakou A, Papaloizou A and Koumas L
  (2004) Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss.

  Hum Immunol 65,135–141.
- Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A and Madhok R (2003) Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford) 42,1295–1298.
- Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L and DeLima MG (2003) Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol 58,69–77.
- D'Alfonso S, Rampi M, Rolando V, Giordano M and Momigliano-Richiardi P (2000) New polymorphisms in the IL-10 promoter region. Genes Immun 1,231–233.
- El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F and Raghupathy R (2004) Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. Am J Reprod Immunol 52,45–52.
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG and Huizinga TW (1998) Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA 95,9465–9470.
- Hezard N, Comillet P, Droulle C, Gillot L, Potron G and Nguyen P (1997) Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in anterpenultimate position. Thromb Res 88.59–66.
- Hill JA and Choi BC (2000) Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. J Reprod Fertil Suppl 55,91–97.
- Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J and Walker J (2000) Evidence of a TH1 type response associated with recurrent miscarriage. Fertil Steril 73,1206–1208.
- Kalter H (1999) Diabetes and the risk of miscarriage. Nat Med 4,126–127.
- Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Gharesi-Fard B and Sarvari J (2005) Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J Reprod Immunol 65,171–178.
- Karhukorpi J, Laitinen T, Karttunen R and Tiilikainen AS (2001) The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G→A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions. Mol Hum Reprod 7,201–203.
- Kavalier F (2005) Investigation of recurrent miscarriages. BMJ 331,121–122.
  Kimatrai M, Blanco O, Munoz-Fernandez R, Tirado I, Martin F, Abadia-Molina AC and Olivares EG (2005) Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. J Clin Endocrinol Metab 90.6126–6130.

- Kishore J, Agarwal J, Agrawal S and Ayyagari A (2003) Seroanalysis of Chlamydia trachomatis and S-TORCH agents in women with recurrent spontaneous abortions. Indian J Pathol Microbiol 46,684–687.
- Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A and Kim CE (2005) T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. Chem Immunol Allergy 88,64–79.
- Liberman AC, Refojo D and Arzt E (2003) Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 51,351–365.
- Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ and Hansen JA (2003) Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic cell transplantation. N Engl J Med 4,2201–2210.
- Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E and Ashkanani L (2001) Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. Hum Reprod 16,2219–2226.
- Matsuzaki J, Tsuji T, Imazeki I, Ikeda H and Nishimura T (2005) Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases. Autoimmunity 38,369–375.
- Mormann M, Rieth H, Hua TD, Assohou C, Roupelieva M, Hu SL, Kremsner PG, Luty AJ and Kube D (2004) Mosaics of gene variations in the interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. Genes Immun 5,246–255.
- Mosmann TR and Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets. Immunol Today 7,138-146.
- Ntrivalas EI, Bowser CR, Kwak-Kim J, Beaman KD and Gilman-Sachs A (2005) Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. Am J Reprod Immunol 53,215–221.
- Pandey MK, Rani R and Agrawal S (2005) An update in recurrent spontaneous abortion. Arch Gynecol Obstet 272,95–108.
- Paukku M, Tulppala M, Puolakkainen M, Anttila T and Paavonen J (1999) Lack of association between serum antibodies to Chlamydia trachomatis and a history of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 72,427–430.
- Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S and Testa R (2004) Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. Am J Reprod Immunol 52,36–41.
- Raghupathy R (2001) Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Semin Immunol 13,219–227.
- Rees LE, Wood NA, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K and Mathieson PW (2002) The interleukin-10-1082G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. Cell Mol Life Sci 59,560–560
- Reid JG, Simpson NA, Walker RG, Economidou O, Shillito J, Gooi HC, Duffy SR and Walker JJ (2001) The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol 45,35– 40
- Sacks G, Sargent I and Redman C (1999) An innate view of human pregnancy. Immunol Today 20,114–118.
- Sierra S and Stephenson M (2006) Genetics of recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 24,17–24.
- Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L and Gutierrez C (2003) Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. Transplantation 75,711– 717
- Szekeres-Bartho J (2002) Immunological relationship between the mother and the fetus. Int Rev Immunol 21,471–495.
- Temple R, Aldridge V, Greenwood R, Heyburn P, Sampson M and Stanley K (2002) Association between outcome of pregnancy and glycaemic control in early pregnancy in type 1 diabetes: population based study. BMJ 325,1275–1276
- Temple SE, Lim E, Cheong KY, Almeida CA, Price P, Ardlie KG and Waterer GW (2003) Allele carried at positions -819 and -592 of the IL-10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with streptococcus pneumoniae. Immunogenetics 55,629–632.
- Vince GS and Johnson PM (1996) Is there a Th2 bias in human pregnancy? J Reprod Immunol 32,101–104.
- Vives A, Balasch J, Yague J, Quinto L, Ordi J and Vanrell JA (1999) Type-1 and type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Am J Reprod Immunol 42,361–368.
- Wold AS and Arici A (2005) Natural killer cells and reproductive failure. Curr Opin Obstet Gynecol 17,237–241.

Page 5 of 6

#### W.Zammiti et al.

- Wu S and Stephenson MD (2006) Obstetrical antiphospholipid syndrome. Semin Reprod Med 24,40–53.

  Yilmaz V, Yentur SP and Saruhan-Direskeneli G (2005) IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. Cytokine 30,188–194.

  Zammiti W, Mtiraoui N, Kallel C, Mercier E, Almawi WY and Mahjoub T (2006) A case-control study on the association of idiopathic recurrent pregnancy loss with autoantibodies against β2-glycoprotein I and annexin V. Reproduction 131,817–822.
- Zhu X-Y, Zhou Y-H, Wang M-Y, Jin L-P, Yuan M-M and Li D-J (2005) Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses. Biol Reprod 72,338–345.

Submitted on August 8, 2006; accepted on September 7, 2006

189

COCHERY-NOUVELLON (Eva). Régulation de la génération de thrombine par l'IL-10 ; polymorphismes de l'IL-10 et risque vasculaire.

#### **RESUME**

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine jouant un rôle primordial dans la régulation des réactions immunitaires et inflammatoires. Bien que de nombreux arguments expérimentaux et des modèles animaux plaident en faveur d'un rôle de l'IL-10 dans la régulation de l'hémostase, l'implication de cette cytokine en pathologie vasculaire est peu appréhendée. Des polymorphismes génétiques situés sur le promoteur du gène de l'IL-10 ont été rapportés comme influençant son taux de sécrétion. Par ailleurs, certains polymorphismes sont associés à un risque de pathologie dysimmunitaire

Dans ce contexte, nous avons mis au point plusieurs modèles de culture cellulaire afin d'analyser la sécrétion d'IL-10 chez 20 volontaires sains, de génotype connu. L'IL-10 étant connue pour réguler l'expression du facteur tissulaire (FT), nous avons mis au point un modèle original d'étude de l'effet de l'IL-10 sur la cinétique de génération de thrombine induite par le monocyte activé. Nous avons ainsi montré le rôle modulateur de la sécrétion d'IL-10 endogène sur la génération de thrombine. En parallèle, deux études cliniques ont été menées. La première étude porte sur le risque de la maladie thromboembolique veineuse et montre que le polymorphisme IL-10 G13 est associé à un risque de thrombose veineuse (Thromb Haemost 2006;96:24-8). La seconde étude concerne le risque de pathologie vasculo-placentaire. L'étude montre que le polymorphisme de substitution d'acide nucléique (-819T) est associé à la survenue de fausses couches précoces. Ces arguments plaident en faveur d'un rôle de l'IL-10 en pathologie vasculaire.

#### MOTS CLES

Interleukine 10, polymorphismes génétiques, thrombose veineuse, avortement spontané.

#### MEMBRES DU JURY

- Pr Marie-Christine ALESSI (rapporteur)
- Pr Marc VASSE (rapporteur)
- Pr Philippe NGUYEN (directeur)
- Pr Jean-Christophe GRIS (assesseur)
- Pr Philippe de MOERLOOSE (assesseur)
- Pr Anne LONG (assesseur)
- Dr Nathalie HEZARD (assesseur)

#### ADRESSE DE L'AUTEUR

89, chemin du pont de la république. 30900 Nîmes.