

50376
1986

50376
1986
149

149 UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre 58

THESE

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

PRÉSENTÉE PAR

JAMAL KHALIFE

79 894
036 109 088

RESTRICTION ISOTYPIQUE DE LA FONCTION EFFECTRICE DES EOSINOPHILES

SOUTENUE LE 28 OCTOBRE 1986

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

<u>MEMBRES DU JURY</u> :	PRÉSIDENT :	M. M. PORCHET
	RAPPORTEUR :	ME M. CAPRON
	EXAMINATEURS :	M. A. CAPRON
		M. A. DHAINAUT
		M. W.H. FRIDMAN



Ce travail a été réalisé dans le Centre d'Immunologie et de
Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 162 - CNRS 624, Institut
Pasteur de LILLE, sous la direction du Professeur André CAPRON.

A mon Directeur de Recherches,

Monsieur le Professeur André CAPRON

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et honoré de votre confiance. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A mon Président de Thèse,

Monsieur le Professeur PORCHET

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde
gratitude.

A Madame le Docteur Monique CAPRON

Vous m'avez accueilli au sein de votre remarquable groupe de recherches, tout imprégné de votre dynamisme et de votre enthousiasme. Permettez moi de joindre à mes sentiments de grande admiration, l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance.

Aux Membres de mon Jury,

Qu'ils soient assurés de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin, m'ont aidé à mener à bien ce travail et en particulier :

- H. BAZIN (Université de Louvain, Belgique)
- A.E. BUTTERWORTH (Cambridge, U.K.)
- J.Y. CESBRON (C.I.B.P., Lille)
- J.M. GRZYCH (C.I.B.P., Lille)
- T. JOUAULT (C.I.B.P., Lille)
- L. PRIN (C.I.B.P., Lille)
- H. TAELEMAN (Institute of Tropical Medicine, Anvers, Belgique)
- P.C. TAI (St George's Hospital, Medical School, Londres)
- A.B. TONNEL (Service de Pneumo-Allergologie, Hôpital Calmette, Lille)

Je remercie tout particulièrement :

- C. COLSON
- G. MARCHANDISE
- M.F. MASSARD
- J.P. PAPIN
- S. TORRES
- H. VORNG

Ce travail a bénéficié de l'appui financier de :

- Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624
- C.E.E.
- Institut Pasteur de LILLE

Les travaux rapportés dans cette thèse ont donné lieu aux publications suivantes :

1. KHALIFE, J., CAPRON, M., GRZYCH, J.M., BAZIN, H. & CAPRON, A. 1985. Extracellular release of rat eosinophil peroxidase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J. Immunol.* **134** : 1968.
2. KHALIFE, J., CAPRON, M., GRZYCH, J.M., BAZIN, H. & CAPRON, A. 1985. Fc receptors on rat eosinophils : Isotype-dependent cell activation. *J. Immunol.* **135** : 2780.
3. KHALIFE, J., CAPRON, M., CESBRON, J.Y., TAI, P.C., TAEELMAN, H., PRIN, L. & CAPRON, A. 1986. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* **137** : 1659.
4. KHALIFE, J., CAPRON, M., CAPRON, A., GRZYCH, J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W. & OUMA, J.H. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.*, in press.
5. KHALIFE, J., CAPRON, M., CESBRON, J.Y., PRIN, L. & CAPRON, A. 1985. Selective release of peroxidase (EPO) after IgE dependent human eosinophil activation (abstr.). *Ann. Allergy* **55** : 250.
6. KHALIFE, J., CAPRON, M., GRZYCH, J.M. & CAPRON, A. 1986. Regulation of eosinophil-mediated cytotoxicity by IgM blocking antibodies. *Immunobiology* in press.
7. CAPRON, M., KUSNIERZ, J.P., PRIN, L., SPIEGELBERG, H.L., KHALIFE, J., TONNEL, A.B. & CAPRON, A. 1985. Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **77** : 246.
8. CAPRON, M., CAPRON, A., KHALIFE, J., BUTTERWORTH, A.E. & GRZYCH, J.M. 1986. Blocking antibodies and vaccine strategy in schistosomiasis. TDR Meeting on "Immunological Intervention in Human Schistosomiasis", O.M.S. Genève, 26 - 28/5/86.
9. GRZYCH, J.M., CAPRON, M., KHALIFE, J., DISSOUS, C. & CAPRON, A. 1986. Functions of a 38 Kd glycoprotein in the immune response to Schistosoma mansoni. 6ème Congrès International d'Immunologie, Toronto, Canada, 6 - 11 juillet 1986.
10. BUTTERWORTH, A.E., BENSTED-SMITH, A., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKI, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., ARAP SIONGOK, T.K. & STURROCK, R.F. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. Submitted for publication.
11. DESSAINT, J.P., GRZYCH, J.M., BALLOUL, J.M., DISSOUS, C., PIERCE, R., DISSOUS, C., AURIAULT, A., DAMONNEVILLE, M., KHALIFE, J., CAPRON, M. & CAPRON, A. 1986. Defined antigen vaccine for schistosomiasis. Research Co-ordination Meeting on the Use of Radiation and Radionuclides in the Development of a Defined Vaccine against Schistosomiasis. Brisbane, Australie, 25 - 28/8/86.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION.....	1
I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
A. <u>ASPECTS STRUCTURAUX DE L'EOSINOPHILE.....</u>	4
a.1. <u>Récepteurs de surface.....</u>	4
a.1.1. Récepteurs de membrane pour les immunoglobulines.....	
a.1.2. Récepteurs pour le complément.....	
a.2. <u>Les granules.....</u>	6
a.2.1. Major Basic Protein (MBP).....	
a.2.2. Eosinophil Cationic Protein (ECP).....	
a.2.3. Eosinophil-Derived Neurotoxine (EDN).....	
Cristaux de Charcot-Leyden (CLC).....	
a.2.4. Eosinophil peroxidase (EPO).....	
a.2.5. Autres enzymes associés à l'éosinophile.....	
a.3. <u>Cristaux de Charcot Leyden (CLC).....</u>	15
a.4. <u>Médiateurs néoformés.....</u>	17
B. <u>FONCTIONS DES EOSINOPHILES.....</u>	18
b.1. <u>La phagocytose.....</u>	18
b.2. <u>Les fonctions effectrices anti-parasitaires...</u>	18
b.2.1. Vis-à-vis des schistosomes.....	
- Chez l'homme.....	
- Dans l'infection expérimentale.....	
- Modulation de la fonction effectrice.....	
. Régulation par des immuns complexes.....	
. Modulation par des facteurs d'origine cellulaire.....	
. Modulation par des facteurs d'origine parasitaire.....	

(TABLE DES MATIERES - SUITE)

Page

b.2.2. Vis-à-vis d'autres parasites.....	
b.3. <u>Rôle de l'éosinophile en pathologie</u>	27
b.3.1. Rôle de l'éosinophile dans les pneumopathies.	
b.3.2 Rôle de l'éosinophile dans les cardiopathies..	
C. <u>ROLE DE L'EOSINOPHILE DANS L'IMMUNITE ANTI-PARASITAIRE</u>	30
BUT DU TRAVAIL.....	32
II. MATERIELS et METHODES	33
1. <u>CHEZ LE RAT</u>	33
A. Parasites et animaux.....	33
A.1. Cycle du parasite de <u>S. mansoni</u>	
A.2. Infestation des rats par <u>S. mansoni</u>	
B. Purification des différentes populations cellulaires de rat.....	35
B.1. Eosinophiles.....	
B.2. Neutrophiles.....	
B.3. Mastocytes.....	
C. Immunoglobulines et antisérums utilisés.....	37
C.1. Immunoglobulines myélomateuses.....	
C.2. Immunoglobulines monoclonales anti- <u>S. mansoni</u> ..	
C.3. Agrégation des immunoglobulines.....	
C.4. Antisérums.....	
D. Préparations d'extraits antigéniques parasitaires	39
D.1. Antigènes de <u>Schistosoma mansoni</u>	
D.2. Antigènes de <u>Toxoplasma gondii</u>	

E. Activation des éosinophiles <u>in vitro</u>	40
E.1. Activation en phase liquide.....	
E.2. Eosinophiles de rats sains.....	
E.3. Eosinophiles de rats infestés.....	
F. Activation en phase solide.....	42
G. Dosage de l'activité peroxydasique des éosinophiles EPO.....	43
H. Méthode d'étude des récepteurs Fc par la technique des rosettes.....	45
H.1. Préparation des globules rouges de mouton.....	
H.2. Sensibilisation des globules rouges.....	
H.3. La technique de rosettes proprement dite.....	
2. <u>CHEZ L'HOMME</u>	48
A. Patients.....	48
B. Préparation des éosinophiles humains.....	48
B.1. Prélèvement sanguin.....	
B.2. Purification des éosinophiles.....	
C. Immunoglobulines et antisérums.....	52
D. Sérums humains utilisés.....	52
E. Méthodes d'études des anticorps impliqués dans la fonction biologique.....	53
E.1. Traitement des sérums par chauffage.....	
E.2. Passage des sérums sur immunoabsorbant.....	
E.2.1. Préparation des colonnes d'immunoabsorbant..	
E.2.2. Epuisement du sérum.....	

E.3. Passage sur colonne de protéine A.....	
E.4. Séparation des différentes immunoglobulines par gel filtration.....	
F. Préparation des extraits antigéniques parasitaires.....	56
F.1. <u>Loa loa</u> et <u>D. perstans</u>	
F.2. <u>O. volvulus</u>	
G. Activation des éosinophiles humains.....	57
G.1. Dosage de la peroxydase (EPO).....	
G.2. Dosage de la lactate déhydrogénase (LDH).....	
G.3. Dosage de l' "Eosinophil Cationic Protein" (ECP).....	
H. Mesure de la fonction effectrice des éosinophiles	59
H.1. Préparation des schistosomules.....	
H.2. Test de cytotoxicité <u>in vitro</u>	
I. Mise en évidence des anticorps anti- <u>S. mansoni</u> ...	60
I.1. Technique d'immunofluorescence.....	
I.2. Technique ELISA.....	
J. Technique d'immunoprécipitation d'antigène radiomarqué (<u>S. mansoni</u>).....	63
III. RESULTATS.....	
A. <u>ACTIVATION DES EOSINOPHILES PAR DES IMMUNOGLOBULINES</u> <u>A PROPRIETES ANAPHYLACTIQUES</u>.....	66
A.1. <u>Chez le rat</u>	67
A.2. <u>Chez l'homme</u>	80

(TABLE DES MATIERES - SUITE)

PAGE

B. <u>RESTRICTION ISOTYPIQUE DE LA FONCTION EFFECTRICE DES EOSINOPHILES</u>	96
B.1. <u>Chez le rat</u>	97
B.2. <u>Chez l'homme</u>	110
IV. DISCUSSION	126
1. Activation d'éosinophiles par les anticorps anaphylactiques.....	127
2. Restriction isotypique de la fonction effectrice des éosinophiles.....	136
V. CONCLUSION	146
VI. BIBLIOGRAPHIE	151

INTRODUCTION

Bien que l'éosinophile fut identifié dès la fin du siècle dernier par sa morphologie et ses affinités tinctoriales, ses fonctions ne furent élucidées que plus tardivement. Une éosinophilie périphérique et tissulaire est fréquemment associée aux infections parasitaires (notamment les helminthiases), à des nombreuses situations allergiques et également à certains processus cancéreux. Les diverses fonctions des éosinophiles ont été plus particulièrement appréhendées dans deux situations immunopathologiques: les réactions d'hypersensibilité immédiate et les infections parasitaires. Deux fonctions majeures ont été attribuées à cette cellule : un rôle immunomodulateur dans l'hypersensibilité immédiate, grâce au contenu enzymatique capable de neutraliser certains médiateurs libérés au cours d'une réaction anaphylactique par les mastocytes ou les basophiles ; une fonction effectrice dépendante d'anticorps démontrée aussi bien in vitro qu'in vivo en liaison avec l'immunité au cours de certaines infections parasitaires et notamment dans la schistosomiase.

L'étude des mécanismes effecteurs dans les infections parasitaires a clairement établi le rôle essentiel de certains anticorps qui permettent l'adhésion de l'éosinophile à sa cible grâce à l'existence des récepteurs spécifiques à la surface de l'éosinophile. Parmi ces anticorps, seuls les anticorps à propriétés anaphylactiques possèdent la capacité d'induire ultérieurement la lyse de la cible par les éosinophiles. Ce mécanisme a été démontré dans le cas de cytotoxicité vis-à-vis de S.mansoni en présence d'éosinophiles et d'anticorps d'isotypes IgG2a et IgE chez le rat, IgG1 chez la souris et IgE chez l'homme. La sous-classe d'IgG effectrice dans ce mécanisme n'a pas encore été identifiée chez l'homme.

La mise en évidence d'une hétérogénéité fonctionnelle des éosinophiles humains dans ce mécanisme nous a conduit à l'étude de facteurs potentiels de régulation, d'une part au niveau de l'interaction entre anticorps et leurs récepteurs membranaires spécifiques et d'autre part au niveau de la variabilité de l'activation de l'éosinophile liée à une éventuelle hétérogénéité des populations.

Après un rappel bibliographique concernant les caractéristiques structurales de l'éosinophile notamment celles qui sont en rapport avec ses fonctions effectrices, nous envisagerons les différentes méthodes d'évaluation de l'activation de l'éosinophile aussi bien chez le rat que chez l'homme. Nous analyserons ensuite les interactions entre éosinophiles et anticorps anaphylactiques d'une part ainsi que le rôle modulateur de certains isotypes d'immunoglobulines.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

A. ASPECTS STRUCTURAUX DE L'EOSINOPHILE

Dans ce chapitre, nous avons voulu rapporter les connaissances actuelles sur le plan morphologique et structural de l'éosinophile nécessaires à la compréhension de ses fonctions.

a.1. Les récepteurs

a.1.1. Récepteurs de membrane pour les immunoglobulines

Les éosinophiles possèdent des récepteurs de membrane pour les immunoglobulines telles que les IgG et les IgE (1,2) qui participent directement à l'expression de la fonction effectrice.

Les études effectuées sur les éosinophiles humains utilisant la technique des rosettes avec des globules rouges sensibilisés par des IgG, ont montré que ces cellules possèdent des récepteurs pour les IgG (3). Quant au pourcentage d'éosinophiles formant les rosettes-IgG, il varie en fonction de l'IgG utilisée (30 % de rosettes obtenus avec l'IgG de rat ; 20 % avec l'IgG de lapin ; 8 % avec l'IgG humaine) (4) et en fonction de l'origine de l'éosinophile (45 à 89 % avec les éosinophiles humains obtenus chez les patients avec un taux élevé d'éosinophiles ; 3 à 10 % avec les éosinophiles de sujets normaux) (5).

Les éosinophiles humains possèdent des récepteurs pour les différentes sous-classes d'IgG sans que l'on aie pu identifier leur spécificité. Dans ce contexte, il a été révélé que les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 agrégées inhibent la fixation d'immunoglobulines non agrégées respectives (3). De plus, une inhibition de la fixation d'IgG4 par l'IgG1 agrégée a été soulignée (3).

Dans le cas de l'éosinophile de rat, nous avons montré que le site de fixation pour l'IgG1 de rat est différent du récepteur commun pour l'IgG2a et l'IgG2c (6).

Des études plus récentes ont démontré que les éosinophiles possèdent aussi des récepteurs spécifiques pour l'IgE. Par la technique des rosettes utilisant des érythrocytes sur lesquels est fixés chimiquement de l'IgE myélomateuse de rat, Capron et coll. démontrent qu'environ 40 % des éosinophiles péritonéaux de rat portent un récepteur pour l'IgE (2). Au cours de ces expériences, il a été démontré, par la technique de rosettes "mixtes", que le même éosinophile exprime des récepteurs spécifiques pour l'IgE et l'IgG. Des expériences similaires sur les éosinophiles humains révèlent également l'existence d'un récepteur spécifique pour l'IgE. De plus, l'utilisation de la microscopie électronique a permis de démontrer que les éosinophiles sont capables de fixer l'IgE marquée à l'I¹²⁵ (2). La capacité fonctionnelle in vivo de ce récepteur à fixer l'IgE a été confortée par la présence de l'IgE cytophile sur les éosinophiles dans certains situation pathologiques, au cours desquelles les taux d'IgE circulantes étaient élevés (7). En effet, 75 % des sujets hyperéosinophiliques possèdent l'IgE de surface et une association significative est retrouvée entre la présence d'IgE de surface et le taux d'IgE sériques. La structure de ce récepteur a pu récemment être étudiée grâce à la production d'un anticorps monoclonal spécifique de ce récepteur (Fc ϵ R). L'analyse moléculaire de ce récepteur, isolé par chromatographie d'affinité utilisant des immunoabsorbants réalisés soit avec l'IgE ou avec l'anticorps monoclonal anti-Fc ϵ R révèle la présence de deux composants majeurs l'un de 50 000 daltons et l'autre de 23 000 daltons (8).

Il n'a pas été détecté de récepteurs pour l'IgM à la surface des éosinophiles humains fraîchement préparés ais après 12 heures de culture les éosinophiles sont capables de former des rosettes avec des érythrocytes sensibilisés par l'IgM de lapin (le pourcentage de rosettes passe de 1.5 % avant culture à 27 % après culture) (9). Dans les mêmes conditions, le pourcentage de rosettes IgG ne varie pas. Les rosettes IgM sont spécifiquement inhibées par l'IgM humaine et non pas par l'IgG (9). Quant aux études consacrées aux récepteurs IgD et IgA, il semble que les éosinophiles n'aient pas de sites de fixation spécifiques (3).

a.1.2. Récepteurs pour le complément

Des récepteurs pour les composants C4 et C3b du complément ont été identifiés sur les éosinophiles humains par la technique de rosettes en présence de complément humain (1). Dans ces expériences, la fixation du complément semble être dépendante de la température. L'expression de ces récepteurs peut être augmentée par l'incubation des éosinophiles en présence des différents facteurs dont un facteur chimiotactique (ECF-A : Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis) ou ses analogues et l'histamine (10). Des travaux complémentaires associant la technique des rosettes et la fixation d'anticorps monoclonaux spécifiques des récepteurs complément ont récemment confirmé la présence sur les éosinophiles d'un récepteur pour le C3b (CRI), et l'existence d'un récepteur pour le fragment C3bi (CR3) (11). L'étude fonctionnelle de ces deux récepteurs a montré que seul le récepteur CR3 intervient dans la fonction effectrice des éosinophiles en synergie avec les récepteurs Fc, cela sur les éosinophiles activés (12).

a.2. Les granules

Les granules jouent un rôle important dans la fonction cytotoxique de l'éosinophile. Ces granules contiennent différentes molécules dont certaines possèdent des activités toxiques vis-à-vis de différentes cibles (parasites, cellules). Parmi ces molécules nous pouvons citer la protéine basique majeure (MBP) et d'autres protéines cationiques de l'éosinophile telles que la protéine cationique de l'éosinophile (ECP) et la peroxydase de l'éosinophile (EPO).

a.2.1. Protéine Basique Majeure = MBP (Major Basic Protein)

Seule protéine localisée dans le cristalloïde du granule ou "core", la MBP est la protéine majeure de la cellule (55 % du contenu granulaire) (13, 14). Les études effectuées sur les éosinophiles de cobaye montrent que cette molécule, formée d'une seule chaîne polypeptidique de 11 000 de poids moléculaire s'agrège et devient insoluble grâce à la formation de ponts disulfure entre plusieurs monomères (14). L'analyse des acides aminés de la MBP révèle la présence de 13 % d'arginine expliquant ainsi son caractère basique. Les études de microscopie électronique effectuées sur les éosinophiles humains révèlent la présence de la MBP dans le cristalloïde. Les mêmes travaux soulignent l'absence de cette protéine dans d'autres cellules comme le neutrophile, le mastocyte, le lymphocyte. Par contre, la MBP a été mise en évidence dans le basophile (15) .

La structure physicochimique de la MBP, et plus particulièrement son caractère basique et la présence de deux groupements de sulfhydryl libre, suggèrent que la MBP peut réagir avec différentes molécules acides et avec des enzymes dont l'activité dépend de groupements sulfhydryl. Dans ce contexte, la MBP augmente l'activité enzymatique de la papaïne, neutralise l'activité anticoagulante de l'héparine, mais ne possède ni activité antihistaminique ni activité antibactéricide (14). La MBP possède des propriétés lytiques vis-à-vis de différents parasites (S. mansoni, F. hepatica, T. spiralis, T. cruzi) (16-19) . Par ailleurs, des travaux ont révélé que les éosinophiles sont capables de libérer de la MBP en présence de schistosomules (cible d'attaque de la réponse immune) et des anticorps spécifiques (16). La MBP se trouve fixée à la surface de schistosomules de S. mansoni induisant leur lyse. De plus, la MBP purifiée à partir des éosinophiles humains exprime une toxicité vis-à-vis des schistosomules tout comme d'autres molécules basiques telles que la protamine (16) .

Cette activité lytique n'est pas spécifique d'une cible parasitaire, elle peut s'exprimer également vis-à-vis de cellules de mammifères comme les cellules intestinales, épidermiques, épithéliales, vasculaires, trachéales, spléniques et endothéliales (20,21). Les concentrations toxiques de la MBP utilisées dans ces expériences peuvent être effectivement détectées dans les liquides biologiques des patients ayant une éosinophilie suggérant que cette molécule puisse endommager in vivo les tissus. D'autre part, la MBP est capable d'activer les basophiles et mastocytes, ce qui se traduit par une libération de l'histamine (22).

Le dosage de MBP par une technique radioimmunométrique basée sur l'utilisation des anticorps spécifiques de la MBP d'éosinophiles a révélé la présence de MBP au niveau de sérums de sujets ayant des taux élevés d'éosinophiles et au niveau de crachats chez les sujets asthmatiques (23). De plus, des taux élevés de MBP ont été détectés dans les sérums de femmes enceintes (24). Ce taux sérique de MBP qui augmente pendant la grossesse pour atteindre un plateau à la 20ème semaine n'est pas corrélé au pourcentage d'éosinophiles sanguins. Des travaux ultérieurs utilisant la technique d'immunofluorescence ont mis en évidence la MBP dans le placenta. Ces résultats supportent l'hypothèse que le placenta puisse produire de la MBP (25).

a.2.2. Protéine cationique de l'éosinophile (Eosinophil Cationic Protein:ECP)

La protéine cationique de l'éosinophile ou l'ECP est localisée dans la matrice des granules.

Les études immunochimiques et physicochimiques effectuées sur les éosinophiles humains ont révélé que l'ECP et la MBP sont deux molécules cationiques distinctes. Cette conclusion est basée sur deux évidences : (i) les deux protéines montrent une différence importante de poids moléculaire (26), (ii) la composition en acides aminés est différente (27).

Dans le même contexte, une étude biochimique récente a permis de révéler une homologie structurale étroite entre l'ECP et l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) (28). Cette étude a indiqué que la structure de ces deux molécules est comparable à celle de la ribonucléase (RNase) et qu'elles peuvent exprimer une activité RNase " like" (28) .

Des anticorps monoclonaux dirigés contre de l'ECP purifiée à partir de granules d'éosinophiles humains ont révélé une différence entre deux formes d'ECP : l'une native, l'autre présente uniquement dans les conditions d'activation (dans les granules d'éosinophiles de sujets hyperéosinophiliques) (29). En effet, un anticorps monoclonal, EG1, reconnaît l'ECP sous les deux formes, tandis que le deuxième monoclonal EG2 ne reconnaît que la forme activée (29). Il semble donc que l'ECP subisse un changement de forme moléculaire au cours de l'activation de l'éosinophile. Des études récentes ont montré que les phagosomes d'amastigotes de T. cruzi phagocytés par les éosinophiles in vitro deviennent fluorescents en présence des anticorps anti-ECP (EG₂) (30). L'ECP est une molécule toxique pour les schistosomules de S. mansoni et cette activité est 8 à 10 fois supérieure à celle de la MBP (31,32) . De plus, l'ECP inhibe l'activité anticoagulante de l'héparine. L'ECP a également des propriétés neurotoxiques très puissantes. L'injection d'ECP chez le cobaye reproduit le phénomène de Gordon qui se traduit par une incoordination de mouvements, ataxie et une paralysie des membres postérieurs. (C'est Gordon qui décrit le premier la réaction neurotoxique due à l'éosinophile et le phénomène est connu sous le nom de "phénomène de Gordon".)

Sur le plan histologique, l'injection de l'ECP induit une réaction inflammatoire avec une infiltration de cellules sanguines et une destruction non sélective des tissus nerveux (33).

Le dosage d'ECP par une technique radioimmunométrique basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-ECP a permis de déceler cette protéine dans les liquides biologiques au cours de l'asthme allergique. En effet, le test de provocation par l'allergène augmente le taux d'ECP sérique pour atteindre un pic entre 30 et 60 min après la stimulation (34).

a.2.3. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)

L'éosinophile contient une autre molécule appelée Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) (35). Localisée aussi dans la matrice des granules, l'EDN injectée chez le lapin ou le cobaye provoque le phénomène de Gordon (35); l'EDN a été partiellement purifiée à partir des éosinophiles humains sur gel filtration (36). Les fractions contenant l'activité neurotoxique possèdent un poids moléculaire de 15 000 environ. Cette activité est détruite par chauffage à 90°C. Plus récemment, l'EDN a été purifiée sur colonne héparine-sépharose et la composition en acides aminés a été déterminée (28). L'EDN et l'ECP montrent une séquence homologue et 37 parmi les 54 acides aminés sont identiques. Comme, il a été signalé dans le chapitre précédent, l'EDN possède une homologie structurale avec la ribonucléase (28).

Par ailleurs, une autre protéine cationique appelée "Eosinophil Protein X" (EPX) a été décrite. Elle possède des analogies structurales et fonctionnelles avec l'EDN (37). Cette EPX produit, elle aussi, des réactions neurotoxiques (33). L'ensemble de ces travaux suggèrent que l'ECP, EDN/EPX pourraient être codées par le même gène ou des gènes associés. Bien que ces molécules possèdent des poids moléculaires variant entre 16 000 et 23 000 daltons, elles induisent des réactions neurotoxiques à différents degrés d'activité. Ces différences peuvent être liées à la composition en oligosaccharides.

Enfin, l'EDN possède également une activité toxique faible pour les schistosomules de S. mansoni (38). Au contraire, l'EPX est fortement toxique pour les schistosomules au stade pulmonaire (39).

a.2.4. Peroxydase de l'Eosinophile (EPO)

L'EPO est localisée dans la matrice des granules de l'éosinophile de différents animaux de laboratoire et chez l'homme (40,41). L'intensité de coloration de l'EPO permet une numération différentielle des éosinophiles dans une population leucocytaire (42). Certains éosinophiles, tels que ceux des félidés (lion, tigre et chat) ne contiennent pas de peroxydase (43). Du point de vue génétique, l'EPO est différente de la MPO (myéloperoxidase de neutrophiles). En effet, des sujets déficients en MPO présentent une activité peroxydasique dépendante de l'éosinophile (44). L'EPO a été purifiée à partir des éosinophiles humains (45,46). L'étude biochimique de cette molécule de 71 000 daltons, a révélé qu'elle est formée de 2 sous unités (58000 et 14000 daltons) (47).

La composition en acides aminés montre un pourcentage élevé en arginine, leucine et acide aspartique (46,47). Le point isoélectrique d'EPO est supérieur à 11 (46). La production d'un anticorps monospécifique de l'EPO a permis de démontrer qu'elle est différente de la MBP, l'ECP et l'EPX (46). Par dosage radioimmunométrique le contenu de l'éosinophile en EPO est de l'ordre de $15 \text{ ug}/10^6$ éosinophile (46).

Quant à la fonction de l'EPO, elle exprime un effet bactéricide en présence de l'eau oxygénée et un halogène (48). Des études ultérieures ont montré que ce même système $\text{EPO-H}_2\text{O}_2$ -halogène est capable de lyser les schistosomules (49), les toxoplasmes (50), les trypanosomes (51) et les cellules tumorales (52). De plus, l'EPO est capable d'induire la dégranulation mastocytaire et donc la libération d'histamine (53). Dans ce contexte, des études ont révélé la présence de l'EPO complexée à certains granules de mastocytes dont l'activité biologique est beaucoup plus élevée que celle de l'EPO libre (54). Ces observations suggèrent que l'EPO libérée de

l'éosinophile soit par exocytose soit par une lyse cellulaire, peut intervenir en présence de l'eau oxygénée et d'un halogène (concentrations physiologiques) dans l'activation des mastocytes et donc indirectement dans la réponse inflammatoire. Des études ultérieures effectuées sur le système EPO-H₂O₂-halogène ont indiqué que la fixation de l'EPO sur T. gondii (50) ou T. cruzi (51) augmente significativement la cytotoxicité dépendant des cellules phagocytaires mononucléées. Par ailleurs, les macrophages sont capables de lyser spontanément les cellules tumorales ayant adsorbé de l'EPO à leur surface (55). La lyse est inhibée par l'azide indiquant la nécessité de la présence de l'EPO active. Ces observations, en parallèle avec celles faites sur la MBP, suggèrent que l'éosinophile peut fonctionner comme une cellule bénéfique pour l'organisme en détruisant les cellules tumorales et en limitant leur dispersion.

Enfin, le système EPO-H₂O₂-halogène inhibe l'activité biologique des leukotriènes (LTC₄ et LTD₄). Cette activité peut s'exercer aussi sur le LTB₄ en inhibant son pouvoir chimiotactique (56). L'éosinophile, par l'intermédiaire de l'EPO, pourrait donc moduler l'action des leukotriènes au cours d'une réaction inflammatoire (Tableau A).

a.2.5. Autres enzymes associés à l'éosinophile

Une large variété d'enzymes communes à toutes les cellules ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles se trouvent la bêta-glucuronidase, l'arysulfatase, la phospholipase D et B et l'alcaline phosphatase (57). Certains de ces enzymes semblent jouer un rôle essentiel dans la régulation de la réaction d'hypersensibilité immédiate. C'est le cas de la phospholipase D qui inactive le PAF (Platelet Activating Factor) et l'histaminase qui inactive l'histamine (58,59). Il avait été démontré que l'arysulfatase, présente dans les microgranules de l'éosinophile chez les

primates uniquement était capable d'inactiver le SRS-A (Slow reacting substance of anaphylaxis) (60) . Il s'est avéré ultérieurement que cette fonction n'était pas retrouvée quand l'arylsulfatase était purifiée (rôle probable d'un contaminant) (61).

TABLEAU A : CARACTERISTIQUES DE DIFFERENTS COMPOSANTS GRANULAIRES DE L'EOSINOPHILE

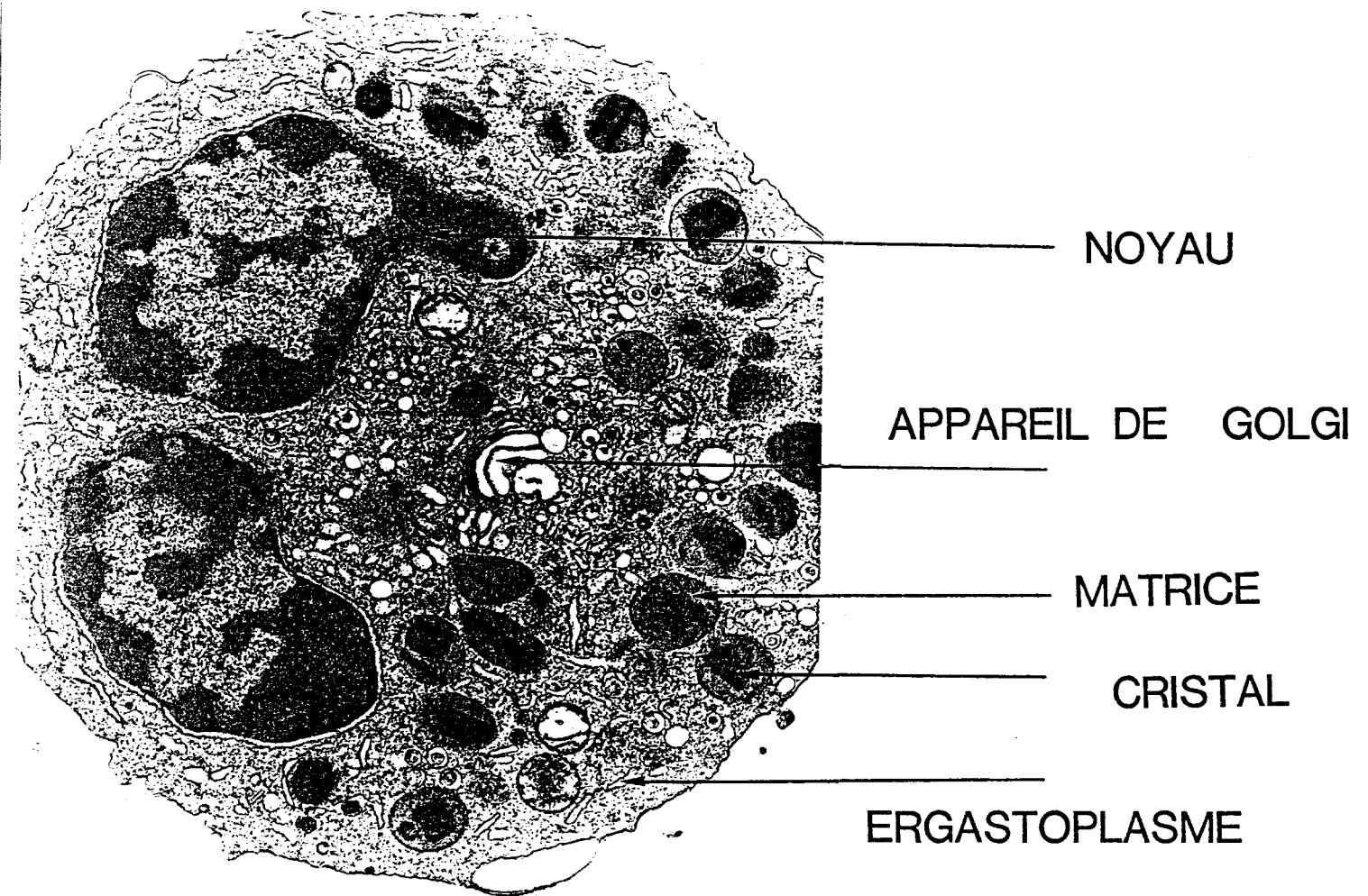
Nom des molécules	Localisation	Poids moléculaire (daltons)	Spécificité cellulaire	Fonction
Major Basic Protein (MBP)	Cristalloïde de granule ("core")	11 000	Eosinophiles Basophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Toxine pour différents parasites (<u>S. mansoni</u>, <u>T. spiralis</u>) - Toxine pour différentes cibles cellulaires de mammifères - Anticoagulante
Eosinophil Cationic Protein (ECP)	Matrice de granule	16 700 - 19 500	Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Helminthotoxine - Anticoagulante - Neurotoxine - Inhibiteur de prolifération lymphocytaire
Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN)	Matrice de granule	15 000 - 18 000	Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Neurotoxine - Activité enzymatique RNase "like"
Eosinophil Protein X (EPX)	Matrice de granule		Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Toxine pour les schistosomules pulmonaires - Neurotoxine
Eosinophil Peroxydase (EPO)	Matrice de granule	71 000	Eosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Activité toxique pour plusieurs cibles parasitaires (<u>S. mansoni</u>, Toxoplasmes, Trypanosomes) - Activité toxique vis-à-vis des cellules tumorales - Inducteur d'activation pour les mastocytes - Activateur de certaines fonctions de cellules mononucléées (lyse cible parasitaire et cellules tumorales) - Inhibiteur des fonctions biologiques de certains leukotriènes (LTB₄, LTC₄, LTD₄)



a.3. Cristaux de Charcot-Leyden (CLC)

Charcot et Robin notent pour la première fois la présence de cristaux caractéristiques dans la rate de patients leucémiques (62). Ultérieurement, Leyden décrit des cristaux similaires dans les crachats des patients asthmatiques (63). Ces cristaux, appelés cristaux de Charcot-Leyden (CLC) associés à différents symptômes liés à l'éosinophilie (64) sont formés au niveau de la membrane de l'éosinophile (65) (FigureA). Une étude comparative de leur structure avec celle de la MBP a révélé une différence dans la composition en acides aminés et en carbohydrates (66). Quant à leur fonction, les études effectuées sur des éosinophiles humains montrent que la CLC possède une activité lysophospholipase. En effet, les observations montrant que la lysophospholipase et la CLC possèdent les mêmes caractéristiques physicochimiques de taille et de charge et qu'ils forment des cristaux morphologiquement identiques, suggèrent que la lysophospholipase est un constituant majeur de la CLC (67). Comme dans le cas de la MBP, la CLC se retrouve également dans les basophiles (68). Plus récemment, des études comparatives biochimiques entre les basophiles et mastocytes humains ont souligné l'absence de ces cristaux au niveau des mastocytes (69). Ces observations suggèrent donc que les cristaux de CLC présents dans les tissus, pourraient être libérés spécifiquement par les éosinophiles tissulaires ou libérés par les basophiles dans le sang ensuite transportés dans les tissus. Le dosage de CLC, par une technique radioimmunométrique, dans les sérums des individus sains ou chez les patients ayant une éosinophilie supérieure à 30 % a révélé que le taux de CLC dans les sérums de ces derniers est significativement plus élevé que celui des sérums des sujets sains (70) .

ASPECT ULTRASTRUCTURAL D'UN EOSINOPHILE HUMAIN.



a.4. Médiateurs néoformés

Parmi les médiateurs néoformés, l'éosinophile peut générer certains leukotriènes qui constituent une partie des éléments actifs de la "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis") (SRS-A) (71). Ces leukotriènes sont formés par l'oxydation de l'acide arachidonique, dérivé de la phosphatidylcholine, par la voie de lipooxygénase (72). Les éosinophiles produisent préférentiellement du LTC₄ tandis que les neutrophiles produisent du LTB₄ (73). Une étude récente effectuée sur les éosinophiles humains à révélé que l'activation de ces cellules par des IgG induit la production de LTC₄ (74). L'étude de propriétés biologiques de leukotriènes révèlent que ces substances sont de puissants agents myotropes sur les voies respiratoires in vitro et produisent la broncho-constriction in vivo (75,76). D'autre part, par leur effet chimiotactique sur les cellules leucocytaires, les leukotriènes sont considérés comme médiateurs de la réaction inflammatoire (77).

Le précurseur des leukotriènes, l'acide arachidonique, par la voie de la cyclooxygénase peut produire également des prostaglandines, parmi lesquelles l'EDI (Eosinophil derived inhibitory) qui est capable d'inhiber la libération d'histamine (78,79).

L'éosinophile est aussi capable de produire un facteur activant les plaquettes (PAF : Platelet Activating Factor) (80). Plus récemment, la formation et la libération du PAF-acéther et du 2-lyso PAF-acéther, précurseur du PAF-acéther, ont été confirmées par une étude effectuée sur des éosinophiles humains révélant que le PAF-acéther est produit par l'éosinophile après une activation par le calcium ionophore (81).

B. FONCTIONS DES EOSINOPHILES

b.1. La phagocytose

Bien qu'il soit admis que les éosinophiles sont des cellules effectrices capables de tuer différentes cibles, et en particulier les parasites, les premières expériences étudiant les fonctions de l'éosinophile ont démontré que cette cellule est capable de phagocyter in vitro et in vivo les complexes immuns antigène-anticorps (82). Ni l'antigène seul, ni l'anticorps seul ne sont phagocytés par l'éosinophile (82). Par contre, les éosinophiles peuvent phagocyter des billes de latex couplées à un antigène en présence des IgG spécifiques (83).

b.2. Les fonctions effectrices anti-parasitaires

Des taux élevés d'éosinophiles sont classiquement associés à l'allergie et aux helminthiases. La mise en évidence de la fonction cytotoxique de l'éosinophile a permis de considérer l'éosinophile, non seulement comme une cellule phagocytaire ou une cellule modulant les réactions d'hypersensibilité immédiate, mais aussi comme cellule douée de fonction effectrice dans l'immunité antiparasitaire.

b.2.1. Vis-à-vis des schistosomes

Chez l'homme

Les premières études in vitro ont démontré que les éosinophiles périphériques humains sont cytotoxiques pour les schistosomules de S. mansoni (84). Dans ce système, les anticorps IgG sont nécessaires pour induire cette activité (85). Au cours de l'attaque du parasite par les

éosinophiles, deux étapes ont été identifiées (86,87) : la première étape réversible qui implique les anticorps spécifiques et les récepteurs Fc de l'éosinophile, aboutit à l'adhérence entre la cellule et la cible ; la deuxième est l'étape de dégranulation conduisant à la mort de la cible par la libération des protéines cationiques (86-88).

D'autre part, Capron et Coll. ont démontré que la fonction cytotoxique des éosinophiles peut s'exprimer également en présence d'anticorps de classe IgE spécifiques de S. mansoni (89). L'interaction entre l'IgE et son récepteur est indispensable comme il a été démontré grâce aux anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques dirigés contre le Fc R (8). Dans ce contexte, Capron et Coll. ont pu identifier pour la première fois l'existence de récepteurs pour l'IgE (Fc_εR2) sur des cellules distinctes des mastocytes et des basophiles (90). Ces travaux soulignent le rôle effecteur potentiel des anticorps IgE dans les mécanismes anti-parasitaires (90). De plus, l'étude approfondie de ce récepteur sur les éosinophiles humains a révélé l'existence d'une sous-population dite "hypodense" capable d'exprimer une capacité cytotoxique IgE-dépendante accrue par rapport à une sous-population dite "normodense". Lors de l'étude fonctionnelle des éosinophiles humains la purification de ces cellules sur gradients discontinus de métrizamide a révélé des variations considérables dans leur distribution (91). En effet, des éosinophiles de faible densité ou éosinophiles "hypodenses" (aspect dégranulé et vacuolé) ont pu être séparés des éosinophiles de densité normale ou éosinophiles "normodenses" (91). Les éosinophiles hypodenses représentent un pourcentage élevé des éosinophiles totaux non seulement dans les lavages bronchoalvéolaires, dans les épanchements pleuraux et dans le sang de patients ayant un syndrome hyperéosinophile idiopathique ($1,5 \times 10^9$ éosinophiles/litre ; durée 6 mois) (92) mais aussi dans le sang de patients infectés par certains parasites (helminthes). L'étude comparative fonctionnelle de ces deux

populations cellulaires révèle que, bien que les éosinophiles hypodenses présentent un contenu protéique granulaire moins important que les normodenses, ils expriment néanmoins une activité cytotoxique significativement plus intense vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni en présence d'IgE spécifique que celle observée pour les éosinophiles normodenses (89). Cette différence fonctionnelle pourrait s'expliquer par un nombre plus élevé de récepteurs Fc pour l'IgE ou/et une augmentation de l'affinité de ces derniers pour l'IgE (89). Ces observations confortent les travaux initiaux (91) démontrant que les éosinophiles hypodenses induisent la lyse d'hématies de mouton sensibilisés préalablement par des IgG de lapin (système hétérologue). Par ailleurs, dans un système homologue, l'activation des éosinophiles humains par les IgG induit des taux de libération de LTC₄ plus élevé que ceux des éosinophiles normodenses (93). L'ensemble de ces observations suggèrent que les sous-populations d'éosinophiles correspondent à différents stades d'activation ou/et de maturation in vivo.

Dans l'infection expérimentale

La cytotoxicité dépendante de l'éosinophile a été démontrée dans d'autres espèces. Chez le rat, Capron et Coll. (94), ont établi in vitro que les éosinophiles péritonéaux de rats sains, en présence d'anticorps spécifiques d'isotype IgG_{2a}, induisent la mort des schistosomules de S. mansoni. Dans ce mécanisme, la présence des mastocytes ou de surnageants mastocytaires solubles parmi lesquels, l'ECF-A (Eosinophil Chemiotactic Factor of Anaphylaxis) est nécessaire pour l'expression de la cytotoxicité. D'autre part, une étude effectuée sur les éosinophiles de rats infestés par S. mansoni a révélé qu'à certaines périodes d'infection, les éosinophiles sont capables d'exprimer une cytotoxicité directe vis-à-vis des schistosomules en absence d'anticorps (95). Ces résultats ont été confortés par les expériences de rosettes démontrant

la présence d'anticorps spécifiques d'isotype IgG2a à la surface de ces éosinophiles (95). De plus, le pourcentage de rosettes est significativement associé au pourcentage de cytotoxicité. Ces observations suggèrent donc, que les récepteurs Fc pour l'IgG2a présents à la surface des éosinophiles sont capables de fixer ces anticorps in vivo et par conséquent peuvent intervenir dans la réponse effectrice anti-S. mansoni. Les anticorps de classe IgE anti-S. mansoni de rat sont aussi capables d'armer l'éosinophile en cellule effectrice grâce à la présence de récepteurs Fc pour les IgE (96). C'est ainsi qu'une réponse biphasique a été mise en évidence au cours de l'infection expérimentale du rat (96). L'IgG2a produite précocement dans l'infection, est responsable de la cytotoxicité dans les premières semaines (4 semaines). Après cette période, c'est l'IgE qui intervient dans l'induction de la réponse effectrice.

L'ensemble de ces travaux réalisés d'abord dans le modèle expérimental rat et confirmés ensuite chez l'homme, ont permis de souligner l'interaction privilégiée entre éosinophiles et anticorps anaphylactiques, ce qui fut également démontré chez la souris (97).

Le rôle de ces classes d'anticorps a été confirmé par la production d'anticorps monoclonaux de rat anti-S. mansoni de classe IgG2a et IgE, capables de reproduire la même activité cytotoxique que celle induite par le sérum de rat infesté en présence d'éosinophiles (98,99). Ces travaux ont eu comme conséquence, l'identification des antigènes cibles de ces mécanismes de cytotoxicité (100).

La fonction effectrice de l'éosinophile a été démontrée in vivo au cours des expériences de transfert de cellules. Les éosinophiles de rats infectés par S. mansoni protègent les rats sains vis-à-vis d'une infection challenge par ce parasite à un degré comparable à celui induit par une première infection (101). Ces expériences, montrent que des facteurs sériques

effecteurs sont nécessaires à l'expression de cette protection. Le rôle de ces facteurs sériques in vivo (IgG2a, IgE) a été confirmé par le transfert passif des anticorps monoclonaux de rat (98,99).

Si la fonction effectrice de l'éosinophile vis-à-vis de schistosomules de S.mansoni a été mise en évidence chez l'homme, la schistosomiase expérimentale du rat a permis de mieux définir les différents paramètres de l'immunité qu'ils soit humoraux ou cellulaires dépendants d'anticorps (102) . Ces travaux permettant d'établir le rôle essentiel joué par l'éosinophile en présence d'anticorps dirigés contre différents antigènes cibles, suggèrent que l'éosinophile pourrait être utilisé comme une sonde dans l'établissement d'une réponse protectrice dans le cadre d'immunoprophylaxie de la schistosomiase.

Modulation de la fonction effectrice

Outre les anticorps et la présence de mastocytes nécessaires à l'expression de la cytotoxicité des éosinophiles, plusieurs facteurs ont été identifiés intervenant dans la régulation de la fonction effectrice de l'éosinophile.

Régulation par des immuns complexes : La présence des complexes immuns circulants représente un premier facteur de modulation. Chez le rat, l'étude cinétique de l'expression de la cytotoxicité au cours de l'infection par S. mansoni révèle des variations importantes (95). Deux situations ont été observées selon la période d'infection : à certaines périodes d'infection les éosinophiles sont cytotoxiques pour les schistosomules en présence en absence d'anticorps spécifiques. A d'autres périodes, les éosinophiles semblent être inhibés puisqu'ils sont incapables d'exprimer une cytotoxicité directe (vis-à-vis de schistosomules) ni même en présence d'anticorps

spécifiques. D'autre part, la sensibilisation passive des éosinophiles de rats sains par les complexes immuns obtenus à partir de sérums d'infection permet de reproduire les observations réalisées dans l'infection naturelle (95). Ces observations ont suggéré que la fonction de l'éosinophile est modulée par des complexes immuns soit activateurs, soit bloquants.

Des travaux récents sur les anticorps monoclonaux ont incriminé le rôle bloquant d'anticorps d'isotype IgG2c (anticorps monoclonal de rat dirigé contre un antigène de surface de schistosomules de S. mansoni de 38000 de poids moléculaire) (103). Une activité modulatrice de l'IgG2c a été mise en évidence sur l'expression de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile induite par l'anticorps IgG2a monoclonal de rat (dirigé aussi contre l'antigène de 38000). Une inhibition significative de l'activité cytotoxique d'anticorps IgG2a est obtenue par la préincubation soit des schistosomules, soit des éosinophiles en présence de l'IgG2c (103). Des études complémentaires sur le mécanisme d'inhibition utilisant les fragments F(ab')₂ ou Fc de l'anticorps IgG2c ont permis de démontrer qu'il existait un double système de blocage, l'un au niveau de la cible parasitaire par le F(ab')₂ et l'autre au niveau des récepteurs Fc de la cellule effectrice. Chez l'homme, la situation a été moins étudiée, cependant Butterworth et Coll. ont suggéré la présence de complexes immuns inhibant la fonction cytotoxique des éosinophiles humains (85).

Modulation par des facteurs d'origine cellulaire : Le rôle de facteurs d'origine cellulaire dans l'activation de l'éosinophile a été démontré pour la première fois par Capron et Coll. (94). C'est une observation microscopique qui est à l'origine de la mise en évidence du rôle accessoire du mastocyte dans la fonction cytotoxique de l'éosinophile de rat. L'ensemble de ces

travaux a révélé que les mastocytes, seuls, étaient incapables de tuer les schistosomules en présence d'anticorps spécifiques. Mais que la présence de mastocytes ou celle de surnageants mastocytaires sont nécessaires à l'expression de la cytotoxicité dépendante de l'IgG2a ou l'IgE induite par les éosinophiles (104). Parmi les médiateurs mastocytaires, l'ECF-A a été identifié comme facteur capable de reproduire l'effet de surnageants de mastocytes ; l'ECF-A agit sur les éosinophiles humains et ceux du rat en augmentant l'expression de Fc récepteurs pour l'IgG (104). Ce résultat élargit le spectre d'action de l'ECF-A qui est aussi capable d'augmenter le nombre de récepteurs pour le complément (10) et par conséquent l'activité cytotoxique d'éosinophiles dépendant du complément (105).

Plusieurs études in vitro ont décrit différents médiateurs immunologiques capables d'augmenter la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni. Le premier facteur est d'origine placentaire connu sous le nom de CSF- α (Colony Stimulating Factor- α) capable non seulement de stimuler la production d'éosinophiles (106) mais aussi d'augmenter la cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis de schistosomules en présence d'anticorps IgG ou du complément. Le CSF- α agit en augmentant l'adhérence d'éosinophile à la cible (le pourcentage de schistosomules enrobés par des éosinophiles incubés en présence de CSF- α est deux fois plus élevé que celui des éosinophiles incubés dans le milieu). De plus, le pourcentage de mortalité des schistosomules augmente dans les mêmes proportions (106). Quant à la spécificité d'action de ce facteur, il semble activer également les neutrophiles en augmentant leur capacité de tuer des cibles non parasitaires. Un second facteur d'origine placentaire, le CSF- β , est capable d'activer spécifiquement les neutrophiles (107).

Une substance protéique produite par les monocytes humains appelée l'EAF (Eosinophil Activating Factor) a été décrite (108). C'est également une molécule capable d'augmenter la cytotoxicité des éosinophiles dépendant d'anticorps IgG vis-à-vis des schistosomules (108). Elle semble intervenir dans l'activation de l'éosinophile en induisant sa dégranulation et par conséquent la libération des molécules toxiques. Un autre facteur également d'origine monocyttaire, le M-ECEF (Monokine Eosinophil Cytotoxicity Enhancing Factor) est doué d'une activité semblable à l'EAF(109). L'étude comparative entre le M-ECEF et une autre monokine, le TNF (Tumor Necrosis Factor) révèle des propriétés similaires (les deux facteurs sont produits à la fois par les monocytes et une lignée cellulaire humaine U937 et possèdent le même poids moléculaire) (110,111). Des études plus récentes ont démontré que le TNF synthétisé n'a pas d'action toxique directe sur les schistosomules de S. mansoni, mais augmente l'activité cytotoxique d'éosinophile en présence d'anticorps spécifiques (112). Contrairement à l'action du CSF- α , le TNF est spécifique de l'éosinophile.

Modulation par des facteurs d'origine parasitaire : Deux facteurs d'origine parasitaire ont été identifiés. Le premier est un produit d'incubation de schistosomules appelé "Schistosome Released Products" (SRP) de nature glycoprotéinique qui est capable d'augmenter l'activité cytotoxique des éosinophiles en présence d'anticorps : cette activation se traduit par une stimulation de l'expression des récepteurs Fc et une dégranulation de l'éosinophile (113,114). Le deuxième facteur est un produit d'incubation de schistosomes adultes et appelé "Schistosome derived Inhibitory Factor" (SDIF) (115). Ce facteur module la fonction effectrice de l'éosinophile (116), par l'intermédiaire du mastocyte, en inhibant sa dégranulation et par conséquent la fonction cytotoxique dépendant d'éosinophiles et d'anticorps.

Une deuxième voie de régulation faisant intervenir le schistosomule lui-même a été identifiée. Ce mécanisme implique les immunoglobulines IgG capables de se fixer à la surface du schistosomule par l'intermédiaire de récepteur Fc γ (117). Les IgG ainsi fixées subissent un clivage enzymatique par au moins deux enzymes protéolytiques sécrétés par le parasite (une endoprotéase avec une activité trypsin "like" et une métalloamino-peptidase) (118). Ce mécanisme vise à protéger indirectement la cible parasitaire d'une attaque cellulaire.

L'ensemble de ces réponses conduit à un équilibre entre l'hôte et le parasite qui fait que l'élimination de la population parasitaire d'une première infection n'est pas totale, elle s'exerce au niveau des formes larvaires de réinfection (infection secondaire). Ce phénomène immunitaire a été appelé l'immunité concomitante (119).

b.2.2. Vis -à-vis d'autres parasites

Les fonctions effectrices de l'éosinophile peuvent s'exercer à l'encontre d'autres parasites.

Dans les filarioses, de nombreux auteurs ont montré que les microfilaires de plusieurs espèces sont tuées in vitro par un mécanisme cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC). Ainsi Greens et al. montrent la destruction de la microfilaire d'Onchocerca volvulus par les éosinophiles humains en présence d'IgG spécifiques (120). Des observations similaires ont été établies dans le cas de microfilaires de Brugia malayi (121). D'autre part, des études in vitro ont montré que l'éosinophile de rat est capable d'adhérer à la surface de microfilaires de Dipetalonema viteae et de dégranuler en présence d'anticorps IgE spécifique (122). Enfin, une adhésion sélective a été soulignée entre les larves infestantes de Wuchereria bancrofti et les éosinophiles en présence d'anticorps spécifiques (123). Les éosinophiles

peuvent aussi jouer un rôle crucial dans la défense contre Trichinella Spiralis. Les éosinophiles de différentes espèces sont capables de tuer des larves de T. spiralis par un mécanisme dépendant d'anticorps spécifiques (124,125). Les études in vivo ont confirmé le rôle important induit par cette cellule grâce à l'utilisation de sérum anti-éosinophile (126).

Vis-à-vis d'infections par des cestodes et notamment par Taenia taeniaeformis, un ensemble de travaux réalisés chez le rat a révélé le rôle majeur joué par les éosinophiles en association avec les anticorps anaphylactiques (IgG2a et IgE) (127,128). D'autre part, une association entre l'immunité à la réinfection vis-à-vis de Fasciola hepatica et les éosinophiles a été établie (129-131). Les éosinophiles sont également toxiques pour les protozoaires en présence d'anticorps spécifiques. Une destruction effective par les éosinophiles a été souligné pour les formes épimastigotes de Trypanosoma Cruzi (132).

b.3. Rôle de l'éosinophile en pathologie

Si les éosinophiles ont été considérés comme cellules bénéfiques soit en modulant les réactions d'hypersensibilité immédiate soit par leurs capacités toxiques vis-à-vis de certains parasites, plusieurs auteurs ont consacré leur travaux à l'étude de leur rôle en pathologie. En effet, il existe une grande variété de syndrômes où on observe un infiltrat d'éosinophiles au sein de tissus tels que le poumon, le coeur et le système nerveux. De plus les protéines cationiques de l'éosinophile, MBP, ECP et le système EPO-H202-halogène semblent être toxiques pour ces tissus .

b.3.1. Rôle de l'éosinophile dans les pneumopathies

Sur le plan clinique, les pneumopathies sont souvent caractérisées par un infiltrat éosinophilique au sein du parenchyme pulmonaire. Sur le plan pathologique, il semble que certaines molécules de l'éosinophile soient toxiques pour ces tissus. Ce dernier point trouve une illustration dans certaines infections filariennes telles que les infections par les filaires lymphatiques, souvent associées à une éosinophilie pulmonaire dite "éosinophilie tropicale" et des taux d'IgE sériques élevées(133). Dans ce cas particulier, si l'éosinophile participe à l'élimination des microfilaires, il peut d'autre part endommager les tissus de l'hôte (134). Les molécules impliquées sont la peroxydase et la MBP. Des études complémentaires in vitro ont montré que ces molécules expriment une toxicité vis-à-vis de cellules parenchymateuses de poumon humain et de cellules épithéliales de trachée de cobaye (135,136). Plus récemment, il a été révélé l'existence de différentes populations d'éosinophiles dans le lavage bronchoalvéolaire de patients présentant une pneumopathie à éosinophiles. De cette observation, est né le concept d'hétérogénéité des éosinophiles (éosinophiles "hypodenses" et éosinophiles "normodenses") exprimant des capacités fonctionnelles et métaboliques différentes (91,92). De plus, la capacité toxique très élevée des éosinophiles hypodenses en présence d'anticorps et l'occupation de leurs récepteurs par de l'IgE de surface sont des éléments favorables qui suggèrent la participation de cette population dans certaines réactions néfastes.

Dans l'asthme allergique, le dosage des protéines cationiques telles que l'ECP, spécifique de l'éosinophile, suggère un rôle de cette cellule dans les réactions allergiques (137). Quant à l'implication de la MBP de l'éosinophile dans l'asthme bronchique, elle a été testée sur des prélèvements autopsiques des malades asthmatiques. Les résultats obtenus montrent un infiltrat éosinophilique et un dépôt de MBP, souvent associé aux lésions du tissu épithélial. Par contre les autopsies des tissus de malades non asthmatiques ne présentent ni infiltrat éosinophilique ni MBP extracellulaire(138).

b.3.2. Rôle de l'éosinophile dans les cardiopathies

L'implication des éosinophiles dans les cardiopathies a été largement étudiée au cours de ces dernières années (139-142). De ces travaux, il a été possible de souligner qu'un syndrome hyperéosinophilique (hyperéosinophilie élevée ($1,5 \times 10^9$ éosinophiles/litre et persistante 6 mois) est un risque dans le développement d'une cardiomyopathie ultérieure (143). Dans ce contexte, il a été établi par Spry et al. une étroite relation entre le nombre d'éosinophiles dégranulés et l'altération de l'endomyocarde (phénomène connu sous le nom de l'endomyocardite de Loeffler). Dans les modèles expérimentaux, ces mêmes auteurs ont démontré que les surnageants des éosinophiles activés sont toxiques pour les cellules cardiaques du rat (143). Par ailleurs, le syndrome hyperéosinophilique idiopathique semble provoquer différentes pathologies liées à une infiltration des éosinophiles périphériques dans des organes tels que le foie, la rate, les reins, la peau et le système nerveux (139).

C. Rôle de l'éosinophile dans l'immunité anti-parasitaire

L'association entre les éosinophiles et les infections par les helminthes a été admise depuis longtemps. Cependant la caractérisation du rôle effecteur de l'éosinophile n'est que récente. Cette démonstration est le résultat des études in vitro de l'interaction entre les eosinophiles le les larves de différents helminthes, en particulier les schistosomes. Dans ce chapitre nous allons résumer les connaissances actuelles sur le rôle de l'éosinophile dans l'immunité contre S.mansoni.

Chez le rat, les études de l'infection expérimentale par S.mansoni ont montré clairement que l'immunité à la réinfection était un mécanisme multifactoriel où plusieurs populations cellulaires, telles que les éosinophiles, les macrophages, les plaquettes, et les anticorps de classe IgG2a et IgE jouent un rôle majeur (144). L'étude de la fonction effectrice de l'éosinophile de rat a permis de suggérer un rôle dans l'immunité. En effet, les observations histopathologiques soulignaient l'accumulation d'éosinophiles autour des schistosomules de S.mansoni in vivo après une infection naturelle (145). De plus, l'injection d'un sérum anti-éosinophile chez les souris diminue l'immunité anti-S.mansoni(146). D'autre part, l'injection d'éosinophiles de rat immuns conduit à un niveau significatif de protection vis-à-vis d'une infection cercarienne chez le rat receveur(101). Outre cette première série d'observations, des arguments indirects soutendent le rôle protecteur des éosinophiles. L'injection d'un anticorps anti Fc récepteur chez le rat avant l'infestation par S.mansoni conduit à une élévation de charge parasitaire par rapport à un groupe de rats ayant subi un traitement similaire par des anticorps non spécifiques (M.Capron, communication personnelle). Cet ensemble de résultats représente un faisceau d'arguments convergeant en faveur du rôle essentiel joué par l'éosinophile dans le mécanisme de protection vis-a-vis de la schistosomiase.

Chez l'homme, une étude épidémiologique et immunologique a été entreprise par Butterworth et Coll. afin de définir les facteurs de résistance (immunité) chez des sujets chroniquement exposés aux cercaires de S.mansoni (147,148). Au cours de cette étude, 129 enfants vivant dans une zone d'hyperendémie bilharzienne au Kenya ont été traités par un médicament schistosomicide (oxamniquine) afin de ramener toute la population étudiée au même degré d'infection. L'intensité à la réinfection de chacun a été ensuite évaluée, en fonction du temps de contact avec l'eau (site d'infection). Vingt deux enfants ont montré des intensités de réinfection élevées (> 100 oeufs par gramme de selle) et sont considérés comme susceptibles à la réinfection. Parmi les 70 enfants qui ont montré des intensités de réinfection faibles durant la même période (< 30 oeufs par gramme), 35 enfants, ayant eu des temps de contact prolongés avec l'eau, sont considérés comme résistants. Les études de la réponse immune n'ont pas montré une nette corrélation avec la résistance à la réinfection. En effet, les deux groupes possèdent des anticorps (IgG) capables d'induire la fonction cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis des schistosomules de S.mansoni. De plus le taux d'IgE anti-schistosomules et le nombre d'eosinophiles, mesurés comme une estimation indirecte de la fonction effectrice des éosinophiles ne diffèrent pas entre les deux groupes. Ces résultats suggèrent que la présence des anticorps effecteurs et des cellules effectrices ne peuvent pas expliquer, à eux seuls, l'immunité chez l'homme.

BUT DU TRAVAIL

L'apparition de taux élevés d'anticorps au cours de l'infection par S.mansoni est un phénomène bien connu mais qui a pris toute sa valeur quand les études in vitro ont démontré que ces anticorps, et notamment les classes d'immunoglobulines anaphylactiques pouvaient induire en présence de cellules effectrices (les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes) une effet cytotoxique pour des larves parasitaires en culture (le schistosomule).

Les interactions entre éosinophiles et anticorps liées à la présence de récepteurs spécifiques nous ont conduit à l'étude des isotypes intervenant dans la fonction de l'éosinophile. Notre but est donc, tout au long de ce travail, d'étudier les anticorps intervenant dans le mécanisme d'activation de l'éosinophile in vitro tout en essayant de chercher parmi ces anticorps ceux qui sont capables de moduler cette activation. Parallèlement, nous avons essayé d'évaluer la participation réelle de cette régulation in vivo, afin de mieux élucider les mécanismes responsables de l'immunité ou l'absence d'immunité dans la schistosomiase.

MATERIEL ET METHODES

A. PARASITES ET ANIMAUX

A.1. Cyclé du parasite de S. mansoni

Les vers adultes de S. mansoni vivent et s'accouplent dans les veines mésentériques de l'hôte définitif. Les femelles pondent des oeufs qui traversent les parois intestinales et sont éliminés dans les selles. Dans l'eau, les oeufs éclosent et libèrent une larve ciliée, le miracidium, qui infecte l'hôte intermédiaire, un mollusque planorbide. Le miracidium se développe dans l'hôte intermédiaire et, après plusieurs multiplications asexuées, donne naissance à des sporocystes, formes intermédiaires qui se développent en milliers de furcocercaires matures qui seront émises dans le milieu aquatique. L'infection est réalisée par pénétration transcutanée active. A ce stade, la cercaire se transforme en schistosomule qui, transporté par le courant sanguin, migre dans le poumon (3 à 8 jours après pénétration), puis dans les veines mésentériques de l'hôte définitif où les vers adultes mâles et femelles s'accouplent et la ponte commence. Les phases de migration s'accompagnent de la maturation des parasites.

La souche de S. mansoni utilisée dans notre laboratoire est d'origine sud-américaine. L'hôte intermédiaire est le mollusque Biomphalaria glabrata. L'hôte définitif utilisé pour maintenir le cycle au laboratoire est le hamster doré Mesocricetus auratus.

A.2. Infestation des rats par S. mansoni

Des rats Fischer syngéniques mâles (250 - 300 gr environ) (Iffa Credo, L'Arbresle, France) ont été utilisés.

Les rats sont infestés selon la technique décrite par Smithers et al. (149). Les rats sont maintenus en décubitus dorsal. Sur l'abdomen rasé, on applique un cylindre métallique de 2 cm de diamètre maintenu par une bande adhésive. Dans ce cylindre, on place une suspension aqueuse contenant les furcocercaires de S. mansoni (1500 cercaires par rat). Le passage transcutané s'effectue pendant 30 minutes à l'obscurité.

B. PURIFICATION DE DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES DE RAT

B.1. Eosinophiles

Les éosinophiles sont prélevés par lavage de la cavité péritonéale des rats Fischer sains ou infectés par S. mansoni stimulés 48 heures auparavant par une injection intrapéritonéale de 10 ml d'eau physiologique (NaCl 0,9 %) (94). Le lavage est effectué par injection de 30 ml de milieu MEM additionnés de 150 µl d'anticoagulant (Calciparine Choay, Paris).

La suspension cellulaire est transférée dans un flacon de culture cellulaire de 75 ml (Corning, USA). Les flacons sont incubés dans une étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ 5 %. Après 2 heures, les cellules surnageantes enrichies en éosinophiles sont récupérées par centrifugation à 600 x g pendant 10 mn à + 4°C. Les éosinophiles sont numérés sur cellule de FUCHS après une dilution au 1/10e dans une solution de Discombe (150).

Le pourcentage d'éosinophiles dans les cellules surnageantes varie entre 48 % + 14 chez les rats sains. Le pourcentage d'éosinophiles obtenu chez les rats infectés par S. mansoni par la même méthode d'enrichissement varie entre 43 et 85 %.

B.2. Neutrophiles

Les neutrophiles sont obtenus par lavage de la cavité péritonéale de rats Fischers stimulés 4 heures auparavant par injection intrapéritonéale de 10 ml de glycogène (LABOSI Paris-France) à 10 % (p/v) dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,20.

Les cellules sont lavées 4 fois en milieu MEM. Le degré de pureté estimé après étalement de la préparation par cyto centrifugation à 500 tours pendant 2 mn et coloration au RAL est de 95 % (le RAL est composé de 3 solutions : du méthanol, une solution aqueuse d'éosine et une solution aqueuse de bleu de méthylène qui sont utilisées successivement pour fixer et colorer les préparations) (Société chimique Pointet- Girard, Villeneuve La Garnne-France).

B.3. Mastocytes

Ils sont obtenus par lavage de la cavité péritonéale de rats par 30 ml de milieu MEM additionnés de 150 μ l de calciparine. Les cellules sont centrifugées à 600 x g pendant 10 minutes à + 4°C puis remises en suspension dans 1 ml de MEM et déposées sur 2 ml d'une solution de métrizamide à 22,5 % (151). Le gradient ainsi préparé est centrifugé à 1500 tours (450 x g) à température ambiante. Dans ces conditions, les mastocytes sédimentent au fond du tube. Le culot ainsi obtenu est récupéré et lavé 2 fois en MEM.

Les mastocytes sont numérés sur une cellule de FUCHS après une coloration par une solution de bleu de Toluidine. Dans ces conditions, le degré de pureté en mastocytes est voisin de 90 %.

C. IMMUNOGLOBULINES ET ANTISERUMS UTILISES

C.1. Immunoglobulines myélomateuses

Ces immunoglobulines préparées et purifiées à partir des protéines myélomateuses selon une technique précédemment décrite nous ont été confiées par le Professeur H. Bazin (Université de Louvain - Bruxelles-Belgique). Cinq isotypes d'immunoglobulines de rat ont été utilisées : IgE, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG1 et IgM (152).

C.2. Immunoglobulines monoclonales anti-S. mansoni

Dans nos expériences, deux isotypes d'immunoglobulines monoclonales de rats ont été utilisées : IgG2a et IgG2c. Ces immunoglobulines douées d'une activité anticorps anti-S. mansoni sont produites par une hybridation cellulaire entre cellules spléniques de rats infectés depuis 30 à 35 jours et des cellules myélomateuses de rats (153). Les études fonctionnelles de ces deux anticorps monoclonaux ont montré que l'IgG2a, capable d'immunoprécipiter un antigène de surface de schistosomules de S. mansoni de 38000 daltons de poids moléculaire, induit une activité cytotoxique dépendant d'éosinophiles de rat vis-à-vis de schistosomules in vitro (cible d'attaque de la réponse immune). Cet anticorps monoclonal transfère un pourcentage de protection significatif contre une infection par S. mansoni chez le rat. Par contre, bien que l'IgG2c qui immunoprécipite le même antigène de 38000 soit incapable de reproduire la cytotoxicité induite par l'IgG2a en présence d'éosinophiles, il est capable d'inhiber le rôle effecteur joué par ce dernier (103).

C.3. Agrégation des immunoglobulines (Ig)

Les immunoglobulines sont agrégées chimiquement en présence de diméthyl suberimidate (DMSI , Pierce Chemicals Co, Rockford, IL). La technique consiste à incuber les Ig en présence de DMSI (41 µg/mg d'Ig) dans 0.2 M Tris HCl, pH 8,5, à 37°C pendant 2 hr sous agitation intermittente. Les Ig agrégées sont dialysées contre de l'eau pendant 3 heures, ensuite contre du PBS une nuit et contre du MEM pendant 3 heures afin d'éliminer les substances toxiques pour les cellules.

C.4. Antisérums

Les antisérums spécifiques de différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines de rats sont préparés par l'immunisation de chèvres ou de lapins par les immunoglobulines purifiées selon la technique décrite par Bazin et al. qui nous les a aimablement confiées (154).

Dans notre présent travail, nous avons utilisé cinq antisérums spécifiques de rats :

- Immunoglobulines de lapin anti-IgE de rat
- Immunoglobulines de chèvre anti-IgG2a de rat
- Immunoglobulines de lapin anti-IgG2c de rat
- Immunoglobulines de lapin anti-IgG2b de rat
- Immunoglobulines de lapin anti-IgG1 de rat
- Immunoglobulines de lapin anti-IgM de rat.

D. PREPARATIONS D'EXTRAITS ANTIGENIQUES PARASITAIRES

Les techniques décrites précédemment (155,156) permettent la préparation des extraits antigéniques bruts totaux de S. mansoni et de Toxoplasma gondii.

D.1. Antigènes de Schistosoma mansoni

Les vers adultes de S.mansoni isolés à partir des hamsters infestés depuis 40 jours par perfusion totale subissent 4 cycles de congélation- décongélation successifs dans une solution physiologique 1°/∞. . Après une centrifugation 1 heure à 40000 x g, les surnageants sont dialysés une nuit contre de l'eau distillée et lyophilisés.

D.2. Antigènes de Toxoplasma gondii

Les toxoplasmes obtenus à partir des ascites de souris infectées par T.gondii depuis 72 heures sont éclatés dans l'eau distillée à raison de 500x106 parasites/ml , soniqués pendant 30 minutes puis additionnés d'un 1/2 volume de solution physiologique 1% . Après une centrifugation pendant 1 heure à 10000 xg, les surnageants sont dialysés contre l'eau distillée et lyophilisés. Avant de les utiliser, les extraits antigéniques sont mis en solution dans du Hank's Wallace et dosés en protéine.

Remarque: Composition de milieu Hank's Wallace pour 1 litre d'eau distillée:
NaCl;8 gr , KCl;0,4 gr, CaCl₂.2H₂O;0,25 gr, MgSO₄.7H₂O;0,2 gr,
Na₂HPO₄.12H₂O;0,15 gr, KH₂PO₄;0,06 gr, NaHCO₃;0,98 gr, Glucose;1 gr.

E. ACTIVATION DES EOSINOPHILES IN VITRO

L'étude de l'activation cellulaire a été envisagée dans deux séries d'expériences : l'une utilisant des éosinophiles de rats sains, l'autre des éosinophiles de rats infectés prélevés à différentes périodes après l'infestation.

E.1. ACTIVATION EN PHASE LIQUIDE

E.1.1 Eosinophiles de rats sains

La réaction d'activation s'effectue en deux étapes :

a. Etape de sensibilisation passive

La première étape consiste à incuber des éosinophiles de rats sains avec différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines de rat purifiées. Cinq cent μ l d'une suspension cellulaire enrichie en éosinophiles (4×10^6 cellules /ml) sont incubés avec différentes concentrations d'immunoglobulines de rats pendant 1 heure à $+4^\circ\text{C}$ sous agitation intermittente.

b. Etape d'activation proprement dite

Cette étape est induite par des antisérums spécifiques de différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines de rats. Les éosinophiles sensibilisés par les immunoglobulines sont incubés avec les antisérums anti-immunoglobulines de rat (au préalable décomplémentés 1 heure à 56°C) pendant 3 heures sous atmosphère de CO_2 5 % à 37°C sous agitation intermittente.

Dans nos différentes manipulations, les témoins négatifs réalisés sont :

1. cellules incubées dans le milieu de culture
2. cellules sensibilisées par les Ig et incubées avec du sérum de rat sain décomplémenté
3. cellules non sensibilisées mais incubées avec l'antisérum anti-immunoglobuline décomplémenté.

E.1.2. Eosinophiles de rats infestés

Les éosinophiles purifiés comme décrit précédemment à partir d'animaux infectés par S. mansoni sont incubés directement avec différentes concentrations d'immunsérums anti-immunoglobulines spécifiques pendant 3 heures à 37°C sous atmosphère de CO₂ 5 % sous agitation intermittente. A certaines périodes d'infection les éosinophiles sont incubés avec différentes concentrations d'extrait antigénique spécifique (S. mansoni) ou non spécifique (Toxoplasma gondii).

F. ACTIVATION EN PHASE SOLIDE

Afin de vérifier que l'activation de l'éosinophile n'est pas due à une phagocytose de complexes antigène-anticorps mais à un phénomène d'exocytose, les complexes immuns sont fixés sur un support solide.

La technique consiste à couler une solution d'agar (Difco , Detroit, MI) à 1,2 % contenant différentes dilutions d'antigène de S. mansoni dans des puits de plaques de culture (diamètre : 1,5 cm, profondeur : 1,7 cm) (Nunc. Danemark) à raison de 1 ml/puits. Les couches d'agar sont ensuite séchées à 37°C pendant 2 hr (157). Avant utilisation, un anticorps monoclonal de rat spécifique de S.mansoni (IgG2a monoclonale anti-S. mansoni) est additionné dans chaque puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 3 hr. Dans certaines expériences, les puits sont incubés avec une immunoglobulines de rat (IgG1 myélomateuse) . Afin d'éliminer les complexes immuns non adsorbés, les puits sont lavés avant l'addition des éosinophiles (4×10^6 /ml) pendant une période d'incubation de 3 hr à 37°C. Le nombre des éosinophiles ayant adhéré est estimé par difference entre les éosinophiles ajoutés et les éosinophiles non adhérents. Les surnageants résultant d'une centrifugation à 600 x G pendant 10 minutes sont testés pour leur activité peroxydasique.

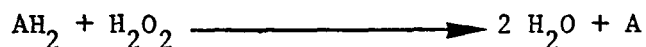
G. DOSAGE DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES EOSINOPHILES (EPO)

Quatre raisons nous ont conduit à l'utilisation de l'EPO comme marqueur d'activation:

- Sa spécificité de production par l'éosinophile.
- Sa présence dans le granule avec d'autres protéines permet d'envisager la libération d'EPO comme critère de dégranulation
- Son rôle cytolytique pour différentes cibles et donc sa participation à la fois aux fonctions bénéfiques et néfastes de l'éosinophile .
- La relative facilité de son dosage.

L'activité enzymatique de l'EPO étudiée dans notre présent travail est réalisée sur des surnageants de culture d'éosinophiles traités selon différents protocoles.

Les peroxydases possèdent la propriété de transférer l'oxygène des peroxydes à d'autres composés chimiques tels que les amines et les composés phénoliques. Le principe de la réaction peut être traduit :



H_2O_2 : eau oxygénée fournissant l'oxygène

AH_2 : donneur d'hydrogène.

La méthode utilisée s'inspire des travaux de Migler et al. (158). Les conditions optimales de dosage d'EPO de nos expériences ont été déterminées. Dans un ml de tampon phosphate 0,01 M pH 6 contenant 0,22 mM de H_2O_2 , on ajoute 25 μl de paraphénylène diamine à 1 % dans l'éthanol (p/v). Cinquante μl à 200 μl de suspension enzymatique sont ensuite additionnés selon les conditions d'expérience.

La cinétique de la réaction est étudiée en densité optique à 550 nm entre 0 et 3 minutes.

Dans chacune de nos expériences, nous avons utilisé une solution standard préparée en milieu Hank's Wallace à partir de peroxydase purifiée (horse radish peroxidase: HRP) (SIGMA) possédant une activité connue. Le dosage de l'activité enzymatique de l'EPO proprement dite se fait à PH= 6 afin d'éviter ce qui pourrait être dû à la peroxydase de neutrophiles (MPO) qui est elle active à pH supérieur à 7.

H. METHODE D'ETUDE DES RECEPTEURS Fc PAR LA TECHNIQUE DES ROSETTES

La méthode utilisée dans ce travail fait appel aux rosettes dites "EA" qui consiste à sensibiliser chimiquement des cellules indicatrices (erythrocytes de mouton) par des immunoglobulines. La présence d'un site récepteur pour l'immunoglobuline sur une cellule donnée se traduit par la formation de rosettes entre cette cellule et plusieurs globules rouges.

H.1. Préparation de globules rouges de mouton

La technique utilisée est celle décrite par Gonzales-Molina (159). Un volume de globules rouges à 10 % est traité par un volume de Trypsin (Trypsin TPCK : Worthington, Freehold, NJ) à 0,2 mg/ml pendant 30 min à 37°C sous agitation intermittente. La réaction est arrêtée par un volume d'inhibiteur de trypsine (0,2 mg/ml) (Soybean trypsin inhibiteur, Worthington Biochemical, Eurobio ,France).

Après 3 lavages en PBS, les cellules sont traitées par l'aldéhyde pyruvique à 3 % (qui est l'agent de couplage) pendant 20 heures sous agitation continue à température ambiante. Ensuite, les globules rouges sont lavés et incubés avec une solution de formaldéhyde à 3 % dans les mêmes conditions que l'étape précédente (étape de fixation). Enfin, les cellules sont lavées 5 fois avec du PBS avant l'étape de sensibilisation avec les immunoglobulines.

H.2. Sensibilisation de globules rouges

Les globules rouges fixés sont utilisés à 1 volume de globules rouges (8×10^8 /ml) pour 1 volume d'immunoglobuline (0,4 mg/ml). La réaction de sensibilisation se fait dans un tampon acétate 0,15 M pH 5,0 pendant 2 heures à température ambiante. Des érythrocytes fixés et sensibilisés dans les mêmes conditions avec une protéine différente (BSA: serumalbuminebovine) sont utilisés comme contrôle négatif.

H.3. La technique des rosettes proprement dite

Elle consiste à additionner la population cellulaire enrichie en éosinophiles purifiés à partir de rats sains ou infectés par S. mansoni (60 μ l d'une suspension cellulaire à 4×10^6 cellules/ml) avec 60 μ l de globules rouges sensibilisés ou contrôle (3×10^8 /ml). Ce mélange est centrifugé à 100 x g à +4°C pendant 10 min. Après une nuit d'incubation à +4°C, le culot cellulaire est resuspendu par une agitation modérée et colorée avec le colorant de Discombe (qui colore en Rose-orangé les éosinophiles). Le pourcentage d'éosinophiles formant des rosettes (entourés par au moins 3 globules rouges) est évalué au microscope par rapport au nombre total d'éosinophiles. On compte entre 200 - 300 cellules.

Afin d'étudier la spécificité de différents récepteurs, des expériences d'inhibition croisée de formation de rosettes ont été effectuées. Les éosinophiles de rats sains sont préincubés avec les différentes Ig agrégées comme décrit précédemment (0,5 mg/10⁶ cells). Après 1 heure d'incubation à +4°C, les cellules sont mélangées avec les globules rouges sensibilisés ou contrôles puis l'expérience de la formation de rosettes est réalisée. Le pourcentage d'inhibition est calculé suivant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (1 - \% \text{ RFC avec inhibiteur} / \% \text{ RFC sans inhibiteur}) \times 100$$

où RFC : cellules formant rosettes.

II - METHODES UTILISEES CHEZ L'HOMME

A. PATIENTS

Dans le cadre de l'exploration des éosinophiles périphériques et afin de surmonter le problème de quantité des éosinophiles (faible pourcentage chez les sujets sains) nous avons purifié les éosinophiles à partir des patients ayant une hyperéosinophilie d'étiologie connue : allergie (Service de Pneumo-Allergologie de l'Hôpital Calmette, LILLE, Pr.A.B.Tonnel), parasitaire (Institut de Médecine tropicale d'Anvers Dr H.Taelman) ou syndrome hyperéosinophilique idiopathique (HES) (Service de Médecine Interne, Hôpital de la Pitié Salpêtrière Pr. Godeau).

B. PREPARATION DES EOSINOPHILES HUMAINS

B.1. Prélèvement sanguin

Cinquante à soixante ml de sang périphérique sont prélevés dans une seringue contenant 0,2 ml d'héparine (Choay, Paris, France). La séparation des globules rouges et des leucocytes se fait par sédimentation pendant 30 min à température ambiante ou à 37°C dans un milieu Dextran à 4,5 % préparé dans l'eau physiologique (1 v de Dextran pour 5 v de sang) (Sigma Chemicals, St Louis, Mo). La suspension enrichie en leucocytes est récupérée et lavée dans du gel de Tyrode DNase et resuspendue à une concentration (50×10^6 /ml).

- Remarques : 1) Si la suspension leucocytaire contient des globules rouges, un choc osmotique peut être effectué en ajoutant 20 ml d'une solution NaCl 0,2 % sur le culot cellulaire. Après agitation constante pendant 15 secondes, on ajoute 20 ml d'une solution NaCl à 1,6 % afin de ramener la suspension cellulaire dans une solution physiologique 9%.
- 2) Composition du gel de tyrode DNase pour 1 litre d'eau distillée: NaCl;8 gr, KCl;0,2 gr, NaHCO₃;1 gr, NaH₂PO₄,2H₂O;0,05 gr, glucose;1 gr, gelatine;1 gr, DNase:0,03 gr (Desoxyribonuclease I Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.)

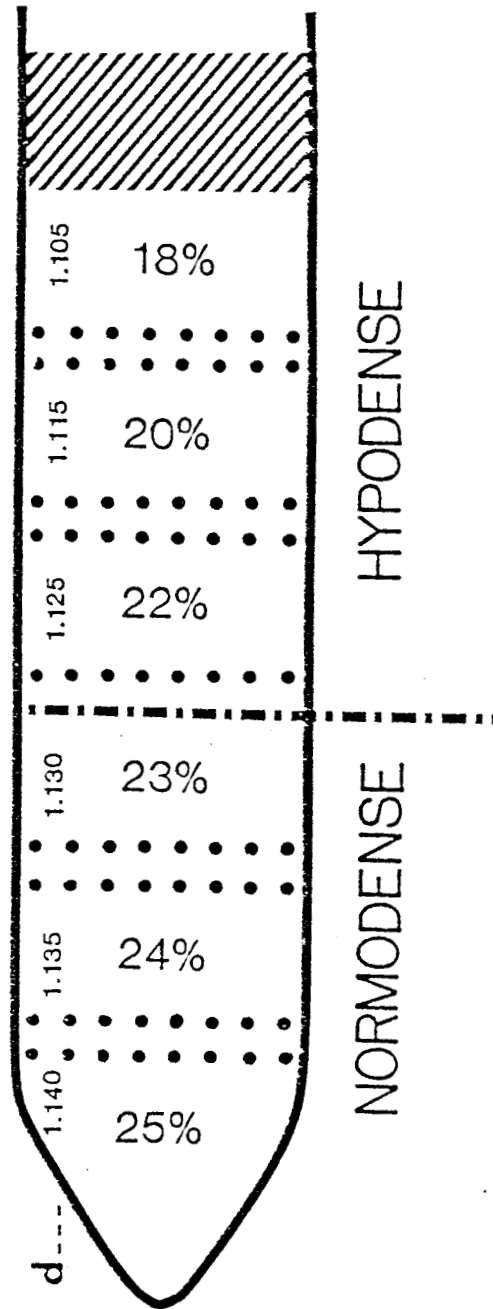
B.2. Purification des éosinophiles

La purification est réalisée par centrifugation des leucocytes totaux, préparés comme décrit ci-dessus, sur un gradient discontinu de métrizamide selon la technique de Vadas et al. (160). Le principe de cette technique est basé sur la différence de densité entre les populations leucocytaires.

Les différentes solutions de métrizamide aux concentrations de 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 20 et 18 %) préparées à partir d'une solution stock de métrizamide à 30 % dans du gel de Tyrode DNase, sont déposées successivement et délicatement dans un tube conique de 15 ml. Un volume de 2 ml de la suspension leucocytaire est ensuite déposé et les gradients sont centrifugés à 1200 x g pendant 45 min à 15°C. Chaque fraction leucocytaire est récoltée à l'interface des différentes couches et lavée, soit avec le milieu de Hanks Wallace ou milieu MEM. Le nombre total de cellules par fraction est évalué par un compteur de cellules "Coulter Counter" (Coultronics, Margency; France). Le pourcentage de pureté est estimé sur les préparations cytocentrifugées et colorées au RAL. Ce degré de pureté est supérieur à 90 %.

La répartition des éosinophiles sur gradients discontinus de métrizamide est variable suivant la pathologie. Il a été possible de séparer plusieurs "sous-populations" d'éosinophiles humains correspondant à des densités différentes(89) (Figure B).

Figure B: Distribution des éosinophiles humain après purification sur gradient de metrizamide.



METRIZAMIDE CONCENTRATION %



C. IMMUNOGLOBULINES ET ANTISERUMS

Les IgE myélomateuses humaines non agrégées ou agrégées par la bis-diaminodenzidine nous ont été confiées par le Dr H. Spiegelberg (La Jolla, CA) Quant aux IgG humaines normales (Cappel, Cochranville, PA), elles sont agrégées par le diméthyl suberimide comme décrit précédemment. Les antisérums anti-IgE humains (Fc_ε specific) ont été obtenus du laboratoire Miab(Uppsala, Suède) et les anti-IgG humains (Fc_γ specific) ont été obtenus du laboratoire Cappel (Cochranville, PA) .

D. SÉRUMS HUMAINS UTILISÉS

L'exploration des facteurs humoraux (anticorps) impliqués dans l'activation ou la fonction effectrice des éosinophiles a été effectuée sur deux types de sérums :

1. Sérums de sujets filariens obtenus à partir de patients infectés par Loa loa ou O. volvulus et sélectionnés pour leur taux élevé en IgE totales;

2. Sérums bilharziens obtenus à partir de patients infectés par S. mansoni faisant partie d'une étude épidémiologique et immunologique de la schistosomiase humaine au Kenya(147,148). Les sérums ont été obtenus chez différents patients traités par l'oxamniquine (30 mg/Kg) afin de ramener toute la population étudiée au même degré d'infection. La reinfection après traitement a été suivie par l'évaluation du nombre d'oeuf de S.mansoni dans les selles. Ces sérums ont été ensuite classés en fonction de différents paramètres: le temps de contact avec l'eau (site d'infection), le nombre d'oeufs dans les selles, leur taux d'IgE et leur capacité cytotoxique dépendant d' anticorps thermostables (anticorps IgG) et d'éosinophiles humains vis-à-vis de schistosomules de S.mansoni.

Les sérums normaux humains sont obtenus à partir de sujets sains. Tous les sérums sont conservés à -70°C.

E. METHODES D'ETUDE DES ANTICORPS IMPLIQUES DANS UNE FONCTION BIOLOGIQUE

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé 4 techniques différentes :

E.1. Traitement des sérums par chauffage

Les sérums sont chauffés à 56°C pendant 2 hr ce qui élimine ainsi un effet possible des facteurs thermolabiles (IgE, complément).

E.2. Passage des sérums sur immunoadsorbant

Cette technique permet l'adsorption spécifique des immunoglobulines d'un isotype donné à partir d'un sérum total.

E.2.1. Préparation des colonnes d'immunoadsorbant

Un gramme de sépharose activée au bromure de cyanogène (Pharmacia, Uppsala, Suède) est gonflé dans une solution d'HCl à pH 3. Le gel obtenu est lavé dans du tampon NaHCO_3 (0,1 M NaCl, 0,5 M). Un ml de gammaglobuline (1,3 mg/ml) (anti-IgG ou anti-IgE) est additionné et agité sur un plateau rotatif. Après 2 hr d'agitation, le gel est lavé dans du tampon NaHCO_3 . Les groupements cyanogènes libres sont alors inactivés par l'éthanolamine 1 M pH 8 pendant 2 hr. Ensuite, le gel est lavé avec :

- du tampon borate 0,1 M pH 8 NaCl 1 M
- du tampon acétate 0,1 M pH 4
- du PBS.

Le gel ainsi lavé est déposé dans une colonne et lavé avec du PBS.

E.2.2. Epuisement du sérum

Cinq cent μl de sérum sont passés sur la colonne. L'épuisement du sérum est vérifié selon l'immunoadsorbant réalisé, par mesure des taux d'IgG ou IgE totales par rapport au taux de départ.

E.3. Passage sur colonne de Protéine A

Cette technique est basée sur la capacité de la protéine "A" isolée à partir du Staphylococcus aureus de fixer certaines classes d'Ig par le biais d'un récepteur "naturel" pour la partie Fc des Ig. Cette capacité de fixation d'Ig varie selon l'isotype.

Chez l'homme le pourcentage de réactivité est résumé dans le tableau ci-dessous (161) :

Isotypes humains % de réactivité Fixation par le fragment

IgG1	100 %	Fc
IgG2	100 %	Fc
IgG3	35 %	Fc
IgG4	100 %	Fc
IgM	50 %	Fab'
IgA	14 %	Fab'
IgE	7 %	Fab'

La technique proprement dite

Cent µl de sérum dilué au 1/5e dans du MEM (contenant pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 ug/ml) sont mélangés avec 100 mg de protéine A sépharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Suède) précédemment gonflés et équilibrés avec du MEM. Les tubes sont agités sur un plateau rotatif à 4°C pendant une nuit. La fraction non absorbée (effluent SpA) est récupérée par centrifugation à 600 x g pendant 10 min. La fraction absorbée enrichie en IgG est éluée par 0.5 ml de

glycine 1 M pH 2,8 (éluat SpA) (161). La fraction éluée est tout de suite neutralisée avec NaOH 10 N et dialysée contre du PBS pendant 3 heures et une nuit contre du MEM.

E.4. Séparation des différentes immunoglobulines par gel filtration

La technique utilisée, basée sur la différence de poids moléculaire des isotopes, permet de séparer les IgG des IgM. La séparation faisant appel à l'utilisation d'un gel de filtration est effectué sous pression. Ce type de fractionnement nécessite un appareillage dit FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Pharmacia, Uppsala, Suède) (162). Brièvement, après avoir lavé la colonne de gel de filtration (superose 6) avec du PBS (50 mM, pH 7.2), 100 µl de sérum filtrés sur un filtre de 0,2 µm sont injectés dans la colonne par une valve. La pression utilisée est de 1 millipascal et le débit est de 0,5 ml/min. Le collecteur est programmé à 1 ml par fraction (Figure I).

F. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES PARASITAIRES

F.1. Loa loa et D. perstans

Les antigènes sont préparés à partir des microfilaires isolés par aphérèse à partir des patients infectés (163). Les microfilaires sont lavées dans une solution de NaCl à $1,7 \times 10^{-4}$ M et soniqués pendant 2 min par l'utilisation de Pons model 20 - 200 S (Subagnes, France) à 200 W. Les extraits sont centrifugés à 18,000 x g pendant 18 min et les surnageants sont dialysés contre du PBS 10^{-2} M, 9 ‰. Les protéines sont dosées par une technique de Biorad (Bio-Rad, Munich, Allemagne de l'Ouest).

F.2. O. volvulus

L'antigène est préparé à partir des vers adultes obtenus par dissection des nodules sous-cutanés enlevés chirurgicalement chez des patients infectés par O. volvulus. Ces parasites sont lavés dans une solution de NaCl 0,7 % et désintégrés par une presse hydraulique (x press bio ; LKB, Bomma, Suède). Les extraits bruts sont centrifugés à 15,000 x g pendant 30 min et les surnageants obtenus sont lyophilisés et resuspendus dans du Hanks Wallace. Le dosage des protéines est effectué par la technique de Biorad. Les antigènes de D. viteae, S. mansoni and Toxocara canis sont obtenus selon la même technique.

Les extraits antigéniques ainsi préparés sont utilisés dans les expériences d'activation cellulaire.

G. ACTIVATION DES EOSINOPHILES HUMAINS

La capacité d'activation a été étudiée sur des éosinophiles purifiés à partir des patients filariens. L'anti-IgE, l'anti-IgG humain ou l'antigène spécifique à différentes concentrations sont ajoutés à 0,5 ml d'une suspension d'éosinophiles dans du Hanks Wallace (6×10^6 éosinophiles/ml) et les tubes sont incubés à 37°C. Comme contrôle négatif, les éosinophiles sont incubés dans le milieu ou avec l'antigène non spécifique. Après 1 hr d'incubation, les surnageants sont récupérés par centrifugation à 600 x g pendant 10 min et différents dosages enzymatiques et protéiques sont réalisés.

G.1. Dosage de la peroxydase (EPO)

La détermination de l'EPO libérée dans les surnageants est dosée par une technique de chimioluminescence (C.L.) adaptée d'une technique décrite par

Whitehead et al. (164). Pour l'essai, 0,05 ml de surnageant est transféré dans un tube contenant 0,05 ml de H₂O₂ (1,35 mM). Ensuite, 0,05 ml de D-Luciferin (Boehringer, Allemagne) (160 µM dans du Tris-HCl 0,01 M pH 6) et 50 µl de Luminol (Serva, Heidelberg, Allemagne) (250 µg/ml dans du Tris HCl 0,01 M pH 6) sont additionnés. Chaque tube est introduit dans un photomètre (Nucléotimètre 107 ; Interbio CLV, Paris, France). Les photons, émis grâce à l'excitation du luminol par des radicaux libres dégagés à partir de l'H₂O₂ sous l'action de la peroxydase, sont mesurés et exprimés en Unité de CL (100 U de C.L. = 1 mV). Le dosage de l'EPO se fait à pH 6 afin d'éviter l'activité dû à la peroxydase de neutrophiles (MPO).

G.2. Dosage de la lactate déhydrogénase (LDH)

Afin de vérifier l'absence d'une lyse cellulaire au cours de la réaction d'activation par les anti-Ig ou les antigènes, nous avons dosé dans ces surnageants la lactate déhydrogénase (enzyme cytoplasmique). L'activité LDH a été dosée par l'incubation de 0,1 ml de surnageant de cellules activées avec 1 ml de phosphate de sodium (50 mM, pH 7,5) et 0,1 ml de nicotinamide-adénine dinucléotidase hydrogène (4 mM). La réaction est initiée par l'addition de 0,1 ml de pyruvate de sodium (10 mM). La présence de la LDH est suivie par la décroissance de la densité optique.

G.3. Dosage de l' "Eosinophil Cationic Protein" (ECP)

L'ECP est mesurée dans les surnageants par une technique radioimmunométrique utilisant un anticorps monoclonal anti-ECP (165). Cinquante µl de chaque surnageant sont incubés avec de l'anti-ECP (50 µl à 5 µg/ml) adsorbé sur plaque de polyvinylchloride (Becton Dickinson, CA). Après 1 hr à 37°C, la quantité d'ECP fixée est mesurée par l'addition de 50 µl d'ECP marqué à l'iode 125. Les résultats sont exprimés en µg/ml grâce à une courbe standard d'ECP purifiée.

H. MESURE DE LA FONCTION EFFECTRICE DES EOSINOPHILES

Afin d'évaluer les conséquences de l'activation d'éosinophiles, nous avons utilisé un test de cytotoxicité in vitro dont la cible est constituée par des schistosomules de S. mansoni.

H.1. Préparation de schistosomules

Les schistosomules sont préparés selon la technique de Clegg et Smithers (166) qui consiste à faire pénétrer des cercaires (formes infestantes de S. mansoni) au travers d'un fragment de peau abdominale de souris. La transformation en schistosomules s'effectue entre 2 à 3 hr à 37°C .

H.2. Test de cytotoxicité in vitro

Le test utilisé est décrit par Capron et al. (89). Cinquante μ l d'une suspension de schistosomules à 1000 schistosomules/ml (dans MEM/serum normal humain 1 %) sont incubés avec 50 μ l de sérum de patients infectés par S. mansoni à différentes dilutions) dans de puits de microplaques en plastique. Dans certaines expériences les anticorps correspondent à des fractions Ig obtenues à partir de sérum total. Les cellules effectrices (5000 éosinophiles/schistosomule) sont ensuite ajoutées. Dans les témoins négatifs, les sérums de patients infectés sont remplacés par des sérums normaux ou du milieu. Le volume final est de 200 μ l. Après 48 hr de contact, le pourcentage de cytotoxicité est évalué au microscope (les schistosomules morts sont immobiles et d'une apparence opaque et granuleuse).

I. MISE EN EVIDENCE DES ANTICORPS ANTI-S. MANSONI

Deux techniques ont été utilisées :

- l'immunofluorescence
- Une méthode immunoenzymatique (ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay).

I.1. Technique d'immunofluorescence

La mise en évidence des anticorps anti-S. mansoni a été envisagée sur coupes de schistosomules de 8 μ m. Les coupes sont préparées à partir de schistosomules (voir H.1.) lavés 2 fois en tampon cacodylate de sodium (0,1 M pH 7,2), fixés pendant 1 hr par une solution de glutaraldéhyde (0,4 %) et inclus en paraffine (Tissueteck, Labeck products, USA).

La réaction d'immunofluorescence se déroule en deux temps :

- Fixation de l'anticorps sur les coupes de parasite

- . 50 μ l de différentes dilutions de sérums humains infectés ou sains sont déposés sur les coupes de parasite (30 mn)
- . les lames sont lavées 3 fois en tampon phosphate 10 mM pH 7.2

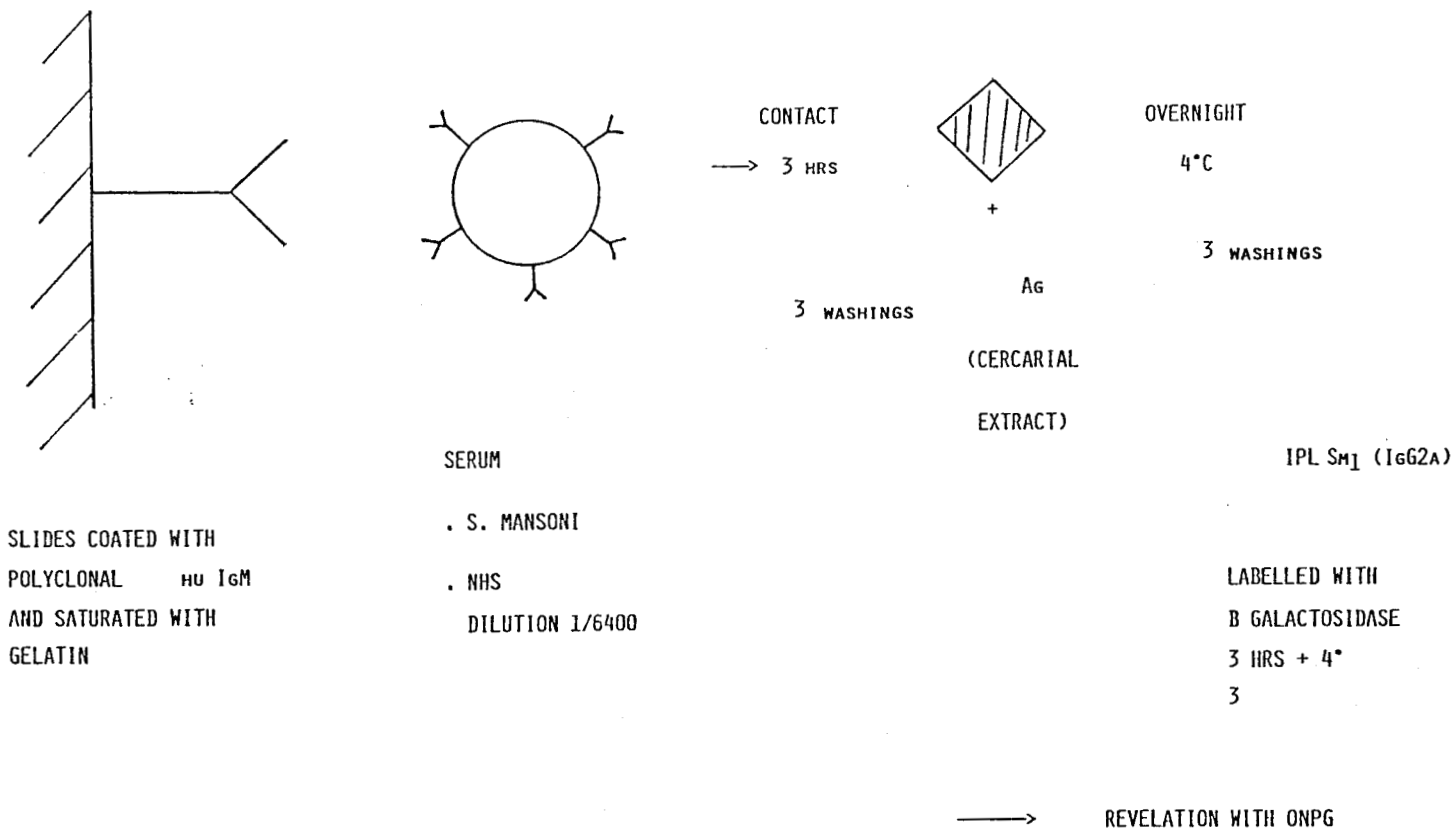
- Révélation de la fixation de l'anticorps

- . 50 μ l de sérum de chèvre anti-immunoglobulines humaines marqué à la fluorescéine (fraction IgG) (Cappel - USA) dilués au 1/20e sont déposés sur les coupes de parasite ;
- . Après 30 minutes de contact à l'obscurité, l'excès d'antisérum est éliminé par deux lavages de 10 minutes dans 50 μ l de tampon phosphate saline 10 mM pH 7,2 et par un lavage de 10 minutes dans une solution au 1/10,000 de Bleu Evans en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7.2 ;

- 1 goutte de glycérol à 50 % (v/v) en tampon phosphate pH 7,2 est placée sur chaque coupe
- Les lames recouvertes d'une lamelle sont observées au microscope équipé de lumière ultraviolette.

I.2. Technique ELISA

Les réactions immunoenzymatiques utilisent différents principes en fonction de leur finalité. Le principe de la réaction est de révéler l'anticorps spécifique fixé à l'antigène par un second anticorps marqué à un enzyme (167). Dans le cadre de nos expériences et afin d'éviter une compétition entre les anticorps vis-à-vis d'un antigène donné, nous avons utilisé un test de capture schématisé ci-dessous :



La réaction d'ELISA se déroule en 2 temps :

1) - Capture de l'anticorps par l'anti-Ig

- . 200 µl de sérum dilué en PBS sont incubés dans des puits de plaques coatés avec l'anti-Ig (anti-IgM) (Institut Pasteur production, Marnes la Coquette, France) préalablement lavées avec une solution NaCl 9 ‰ Tween 0,4 % (3 hr à température ambiante).
- . Les puits sont lavés 3 fois en tampon saline (9 ‰) et Tween (0,4 %)
- . 200 µl d'extrait antigénique de schistosomules préparés à l'aide du détergent Nonidet P40 (NP₄₀) (0,5 % dilution finale) à 100 µg/ml sont ajoutés.
- . Après une nuit d'incubation à 4°C, l'excès d'antigène est éliminé par 3 lavages de 5 min dans le tampon NaCl (9 ‰) Tween (0,4 %).

Remarque: L'extrait antigénique est obtenu par traitement de schistosomules (300000 schistosomules dans de 2 ml d'une solution phosphate 0,1M PH 6) par 75 µl de NP₄₀ à 20 % (BDH, England) en présence de 0,5 U/ml d'aprotinine (inhibiteur de protéase)(Sigma,USA).Après 30 minutes d'incubation à 0°C, le surnageant, obtenu par centrifugation pendant 5 minutes à 1200x g, est dialysé contre de l'eau physiologique(9 ‰ NaCl) pendant une nuit à 4°C.

2) Révélation de la fixation de l'antigène

- . 200 µl d'anticorps marqué à la B galactosidase sont ajoutés dans les puits (il s'agit d'un anticorps monoclonal de rat de classe IgG2a décrit précédemment).
- . Après 3 hr à 4°C les puits sont lavés 3 fois et incubés en présence de 200 µl de substrat (0,014 M 2 -Nitrophenyl-B-D-galactopyranaside, 0,003 M MgCl₂ et 0,1 M B-mercaptoethanol).
- . La réaction enzymatique est arrêtée après 1 hr de contact à 45°C par 300 µl de tampon Na₂CO₃ 1 M.

La densité optique est mesurée à 405 nm dans un titertek Multiskan (Flow Laboratories, McLean, V.A., USA). Chaque test est fait en double. Les résultats sont représentés par la moyenne de densité optique.

J. TECHNIQUE D'IMMUNOPRECIPITATION D'ANTIGENE RADIOMARQUE (S. MANSONI)

Le marquage à l' ^{125}I des antigènes présents sur les parasites vivants grâce à la lactoperoxidase nous permet l'étude des antigènes de surface impliqués directement dans la réponse anticorps.

J.1. Marquage de schistosomules et extraction d'antigènes

10^4 schistosomules préparés comme décrit ci-dessus (paragraphe H.1.), dans 250 μl de PBS (10 mM, NaCl, 0,15 M) sont incubés avec 12,5 μl de NaI (0,006 mg/ml), 1 mCi d'iode, 12,5 μl de Lactoperoxidase (1 mg/ml) (Sigma, St louis,, Missouri, USA) et 12,5 μl de H_2O_2 (1:10000 dans l'eau déminéralisée). Après une période d'incubation de 15 min à $+4^\circ\text{C}$ et sous une agitation continue à l'aide d'une pipette Pasteur, la réaction est arrêtée par 25 μl de NaI à 6 mg/ml. Les schistosomules ainsi marqués sont lavés abondamment avec du PBS. L'extraction d'antigène est effectuée par 30 minutes d'incubation à $+4^\circ\text{C}$ des schistosomules dans 0,5 ml de tampon Tris HCl 10 mM pH 6,8, contenant du Nonidet P40 à 0,5 % (détergent) (BDH, England) et 100 U/ml d'aprotinine (inhibiteur de protéase) (Sigma, USA).

L'extrait détergent est récupéré par centrifugation 1 min à 200 x g et ajusté à une concentration de 2 % de SDS puis placé dans un bain-marie à 100°C pendant 3 min avant la réaction de précipitation (168).

J.2. Réaction d'immunoprécipitation

Des aliquots d'extrait antigénique équivalent à 500 schistosomules sont incubés avec 10 µl de sérum de sujet infecté ou normal pendant 2 hr à 4°C puis transférés dans des tubes contenant 10 mg de Protéine A-Sépharose préalablement équilibrée dans le tampon d'adsorption (Tris-HCl 5 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Triton x 100 2 % et aprotinine 100 U/ml). Après une nuit d'incubation à 4°C, les billes sont lavées successivement par 3 x 1 ml de tampon d'adsorption, 3 x 1 ml de Tris HCl 5 mM pH 7.4 NaCl 150 mM et 3 x 1 ml de Tris-HCl 5 mM pH 7,4. Les complexes immuns sont élués par 40 µl de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 3 % saccharose 10 % à 100°C pendant 3 min. Les complexes immuns sont analysés en polyacrylamide SDS. L'électrophorèse est effectuée sur gel à 13 % après concentration des protéines sur gel de polyacrylamide de 5 %. Les gels sont ensuite séchés puis mis en contact avec un film (Kodak X - omat R) à - 70°C.

Remarque : Lorsque l'immunoprécipitation est destinée à la recherche de l'antigène reconnu par des anticorps ne fixant pas la protéine A-Sépharose, les billes sont préalablement incubées avec un anti-Ig (1/50) pendant 4 hr à température ambiante puis lavées.

RESULTATS

A. ACTIVATION DES EOSINOPHILES PAR DES IMMUNOGLOBULINES A PROPRIETES
ANAPHYLACTIQUES

A.1. Chez le rat

Les éosinophiles ont été identifiés comme cellules effectrices capables de détruire des larves parasites en culture . Les études in vitro ont démontrées que des IgG2a et des IgE de rat possédant une activité anticorps sont impliqués dans ce mécanisme en présence d'éosinophiles de rats sains . Dans ce mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps), la présence de mastocytes est indispensable pour l'obtention d'une cytotoxicité efficace des éosinophiles (94).

Sachant que la cytotoxicité est la résultante d'une activation de l'éosinophile par des anticorps et différents signaux d'origine cellulaire et afin de mieux percevoir les relations entre cellules effectrices et anticorps, nous avons étudié l'activation des éosinophiles par différentes immunoglobulines en mesurant la libération d'une enzyme granulaire (la peroxydase ou EPO) dans les surnageants.

La libération d'EPO induite par une première incubation de la population cellulaire enrichie en éosinophiles de rats sains en présence des différentes classes et sous classes d'Ig, suivie d'une seconde incubation avec l'anti-Ig, a été effectuée dans différentes conditions :

- par incubation de différents constituants en suspension ;
- ou après adhérence sur une surface non phagocytable afin de vérifier s'il agit d'une exocytose due à un signal d'activation et ou à une phagocytose de complexes immuns.

Le rôle du mastocyte a été envisagé indirectement par dépletion de ces cellules

Dans le cas des rats infectés par S. mansoni, les cellules sont incubées directement avec l'anti-Ig ou l'antigène.

1. Spécificité de la technique utilisée pour le dosage d'EPO.

Afin de vérifier que la peroxydase dosée est bien de l'EPO (eosinophil peroxidase), nous avons testé la peroxydase de différentes populations cellulaires selon le pourcentage d'eosinophiles. La figure 1 montre une faible activité peroxydasique dans les populations enrichies soit en neutrophiles soit en mastocytes, qui est probablement liée aux éosinophiles contaminant ces populations. Par contre la population enrichie en éosinophiles possède une activité importante en peroxydase. L'absence d'une activité peroxydasique dans les neutrophiles (MPO) peut être expliquée par le pH qui inhibe la MPO ou/et le donneur d'hydrogène utilisé qui a une affinité faible pour le site de fixation de l'enzyme.

2. Libération d'EPO par les eosinophiles de rats sains

Quand les éosinophiles de rats sains sont incubés avec différentes classes ou sous classes d'Ig puis avec les anti-Ig spécifiques, des quantités de peroxydase variant de 2 à 25% du contenu total sont libérées dans les surnageants. Le pourcentage le plus élevé est obtenu dans le cas des éosinophiles activés successivement par l'IgG2a et l'anti-IgG2a (27%) ou IgE et anti-IgE (25%), (Table 1). La libération d'EPO est dépendante de la concentration d'IgG2a ajoutée. Par contre, les surnageants des éosinophiles activés par IgG1, IgG2b, IgG2c, IgM et leur anti-Ig respectives montrent des activités peroxydasiques négligeables comparables aux témoins négatifs (cellules incubées dans le milieu ou avec l'anti-Ig seul) (Table 1).

Afin d'étudier la spécificité du second signal d'activation (incubation avec l'anti-Ig), des réactions croisées ont été envisagées. Seuls les réactions spécifiques IgG2a-anti-IgG2a et IgE anti-IgE sont capables d'induire une libération significative d'EPO (Table 2).

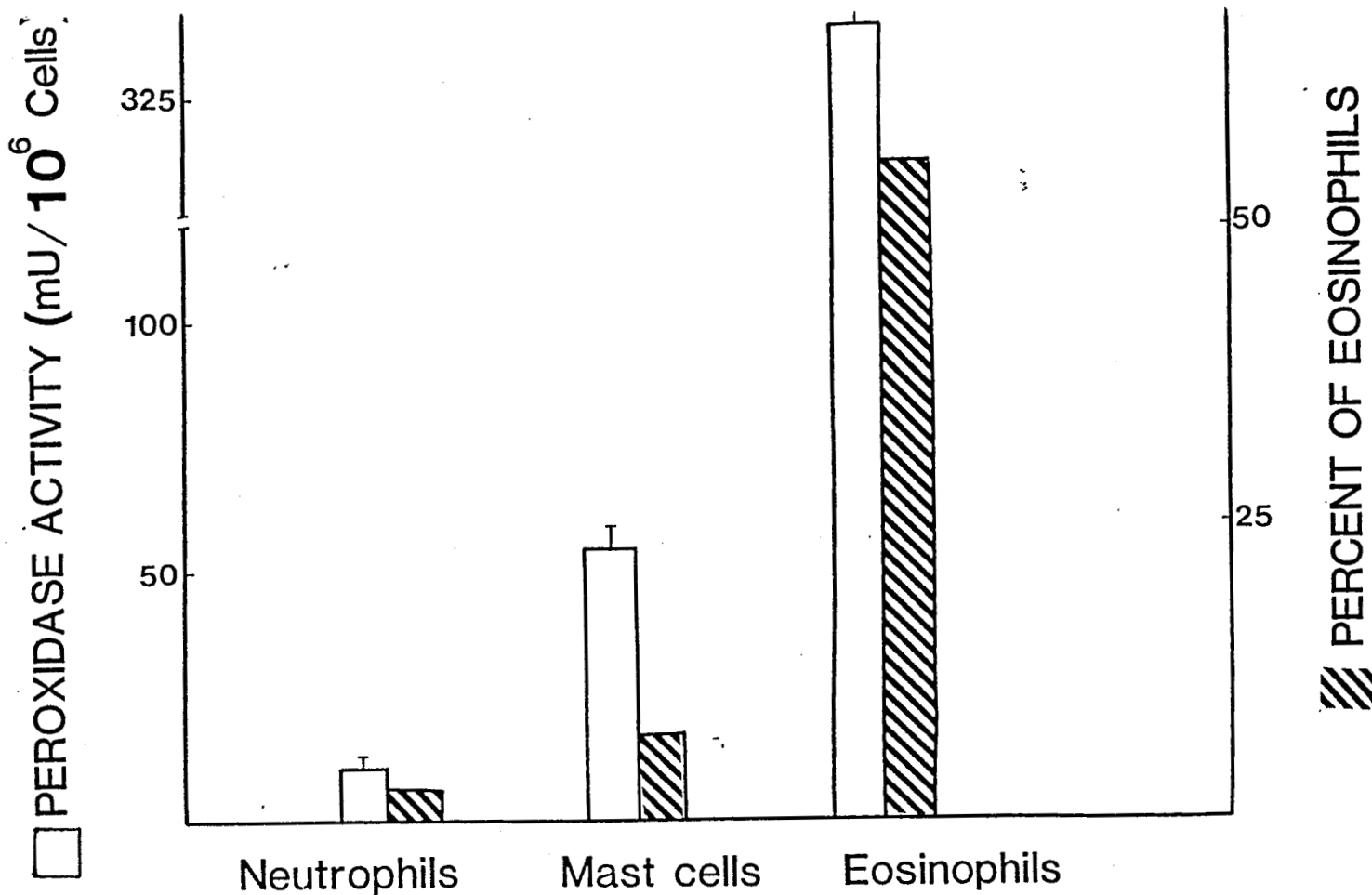


Figure 1 : Peroxidase activity of various rat cell populations according to the % contaminating eosinophils. Neutrophil-rich cells : 95 % neutrophils, 2 % eosinophils ; mast-cell enriched population : 90 % mast-cells, 7 % eosinophils ; eosinophil-rich cells : 55 % eosinophils ; 8 % mast cells ; 16 % macrophages ; 12 % lymphocytes ; 9 % neutrophils. Total intracellular EPO was determined after lysis of cells with 0.2 % Triton x-100. Results were expressed in milliunits/10⁶ cells (mean of three duplicate experiments \pm SD).

Table 1. Peroxidase release from normal rat eosinophils stimulated by various rat immunoglobulins and specific anti-immunoglobulins.

First incubation (1 h, +4°C) ^a	Second incubation (3 h, + 37°C) ^b	Peroxidase release % ^c
HBSS	HBSS	N.D. ^d
rat IgG ₁ myeloma protein (μg)		
500	anti-IgG ₁	N.D.
250	anti-IgG ₁	N.D.
none (HBSS)	anti-IgG ₁	N.D.
rat IgG _{2a} myeloma protein (μg)		
500	anti-IgG _{2a}	13 %
250	anti-IgG _{2a}	18.6 %
50	anti-IgG _{2a}	12.6 %
none (HBSS)	anti-IgG _{2a}	4.2 %
rat monoclonal IgG _{2a} anti- <i>S. mansoni</i> (μg)		
500	anti-IgG _{2a}	26.5 %
250	anti-IgG _{2a}	16.7 %
50	anti-IgG _{2a}	13.8 %
none (HBSS)	anti-IgG _{2a}	3.6 %
rat IgG _{2b} myeloma protein (μg)		
500	anti-IgG _{2b}	2.2 %
250	anti-IgG _{2b}	N.D.
none (HBSS)	anti-IgG _{2b}	N.D.
rat IgG _{2c} myeloma protein (μg)		
500	anti-IgG _{2c}	0.6 %
250	anti-IgG _{2c}	2.5 %
50	anti-IgG _{2c}	2.8 %
none (HBSS)	anti-IgG _{2c}	N.D.
rat IgE myeloma protein (μg)		
50	anti-IgE	24.8 %
25	anti-IgE	12.2 %
10	anti-IgE	6.3 %
none (HBSS)	anti-IgE	1.7 %
rat IgM protein (μg)		
500	anti-IgM	N.D.
250	anti-IgM	N.D.
none (HBSS)	anti-IgM	N.D.

^a Eosinophil-rich populations (2×10^6 cells/tube) were incubated with various concentrations of Ig in 500 μl HBSS

^b Without washings, the cells were further incubated for 3 h at 37°C with anti-Ig antisera (final dilution 1/10)

^c % of total EPO content measured after treatment by triton x-100 (mean of 3 to 5 experiments)

^d N.D. = not detectable



Table 2. EPO release : cross-reaction experiments of various Ig and anti-immunoglobulins.

First incubation (1h, + 4°C) ^a	Second incubation (3 h, + 37°C) ^b	Peroxidase activity (mu/10 ⁶ eos.) ^c
HBSS	HBSS	5.98 ± 0.4
rat IgG _{2a} myeloma protein (μg)		..
none (HBSS)	anti-IgG _{2a}	12.2 ± 2.3
250	anti-IgG _{2a}	43.6 ± 2.6 ^d
250	anti-IgE	9.7 ± 1.2
rat monoclonal IgG _{2a} anti- <u>S. mansoni</u> (μg)		
250	anti-IgG _{2a}	46 ± 3.1 ^d
250	anti-IgG _{2c}	11 ± 1.2
250	anti-IgE	6.2 ± 1.8
rat IgE myeloma protein (μg)		
none (HBSS)	anti-IgE	3.6 ± 0.3
50	anti-IgE	53 ± 1.8 ^d
50	anti-IgG _{2a}	19 ± 1.9
50	anti-IgG _{2c}	6.7 ± 0.75
rat IgG _{2c} myeloma protein (μg)		
none (HBSS)	anti-IgG _{2c}	N.D. ^e
250	anti-IgG _{2c}	12.9 ± 3.2
250	anti-IgG _{2a}	7.4 ± 1.5
250	anti-IgE	5.75 ± 1.1
Total EPO content ^f	-	278.3 ± 4

a 2 x 10⁶ cells/tube

b with medium or with 1/10 dilution of anti-serum

c Mean of 3 experiments ± SD

d Significantly different of the other groups (p < 0.001)

e N.D. = not detectable

f Total intracellular EPO was measured after treatment with triton x-100 at 0.2 %



3. Libération d'EPO par les éosinophiles normaux activés par des complexes immuns fixés.

Des précédents travaux ayant suggéré que l'exocytose d'EPO soit due à une phagocytose de complexes immuns par les eosinophiles (169), il était donc indispensable de vérifier si l'activation s'effectue par le biais d'un récepteur pour l'Ig et non par une phagocytose susceptible d'être non spécifique. Cette étude est rendue possible par l'utilisation d'une technique de fixation des immuns complexes sur une surface nonphagocytable (l'agar). Les eosinophiles adhèrent à cette surface sur laquelle un extrait antigénique de S.mansoni et un IgG2a monoclonal de rat anti-S.mansoni ont été préfixés.

Les résultats obtenus sont présentés en pourcentage de libération calculé par rapport au nombre d'eosinophiles adhérant à la surface d'agar.

Quand les eosinophiles sont incubés sur de l'agar prétraité avec l'IgG2a seule, 45% d'eosinophiles sont capables d'adhérer, mais la libération d'EPO est négligeable (Table 3). Par contre, l'adhérence des eosinophiles (45 à 64%) sur l'agar contenant l'antigène de S.mansoni et l'anticorps IgG2a spécifique est suivie d'une libération extracellulaire de peroxydase (15 à 36%). La libération d'EPO est dépendante de la concentration de l'antigène incorporé dans l'agar (% maximal quand le rapport antigène-anticorps est 1 : 10). En plus, une inhibition d'exocytose d'EPO est observée en présence d'excès d'antigène (Table 3). L'utilisation d'une immunoglobuline myélomateuse non spécifique de l'antigène (IgG1, myelomateuse) n'induit pas la libération d'EPO.

Table 3 EPO release from normal rat eosinophils attached to agar layers.

Treatment of agar layers		% eosinophil adherence ^a	EPO release % ^b
First incubation (24 h, + 37°C)	Second incubation (2 h, +37°C)		
HBSS	HBSS	0	N.D ^c
HBSS	IgG2a ^d	43 ± 7	6 ± 6
<u>S. mansoni</u> antigen (µg)			
50	HBSS	0	N.D
25	IgG2a ^d	45 ± 10	15 ± 3 ^e
50	IgG2a ^d	64 ± 5	36 ± 5.1 ^e
125	IgG2a ^d	58 ± 10	13 ± 3.5 ^e
50	IgG1 ^f	20 ± 5	1 ± 0.5

^a Mean of two experiments carried out in duplicate ± SD

^b % of total EPO content (mean ± SD)

^c N.D = Not detectable

^d Rat monoclonal anti-S. mansoni IgG2a (500 µg/1 x 10⁶ eosinophils)

^e Significantly different from the controls (p < 0.01)

^f IgG1 myeloma protein (500 µg/1 x 10⁶ eosinophils)



4. Rôle des mastocytes dans l'exocytose d'EPO

Les préparations des éosinophiles de rats sont souvent contaminées par d'autres populations cellulaires telles que les macrophages, les neutrophiles et les mastocytes. Sachant que les mastocytes interviennent dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles et qu'ils interagissent avec les mêmes isotypes d'immunoglobulines (Ig anaphylactiques), nous avons envisagé le rôle des mastocytes dans la libération d'EPO par déplétion ou reconstitution de la population d'éosinophiles en mastocytes. Les résultats obtenus (Figure 2) montrent que les surnageants des éosinophiles déplétés en mastocytes (< 1%) puis activés avec IgG2a-anti-IgG2a possèdent des activités peroxydasiques similaires à ceux reconstitués avec les mastocytes (3 à 30%). Au contraire, une diminution significative de la libération d'EPO est obtenue quand les éosinophiles sont activés avec l'IgE-anti-IgE en présence d'un pourcentage de mastocytes élevé (12 à 30%). Ces résultats suggèrent que les IgE se fixent sur les récepteurs IgE à plus forte affinité des mastocytes et sont moins fixés sur les récepteurs de l'éosinophile.

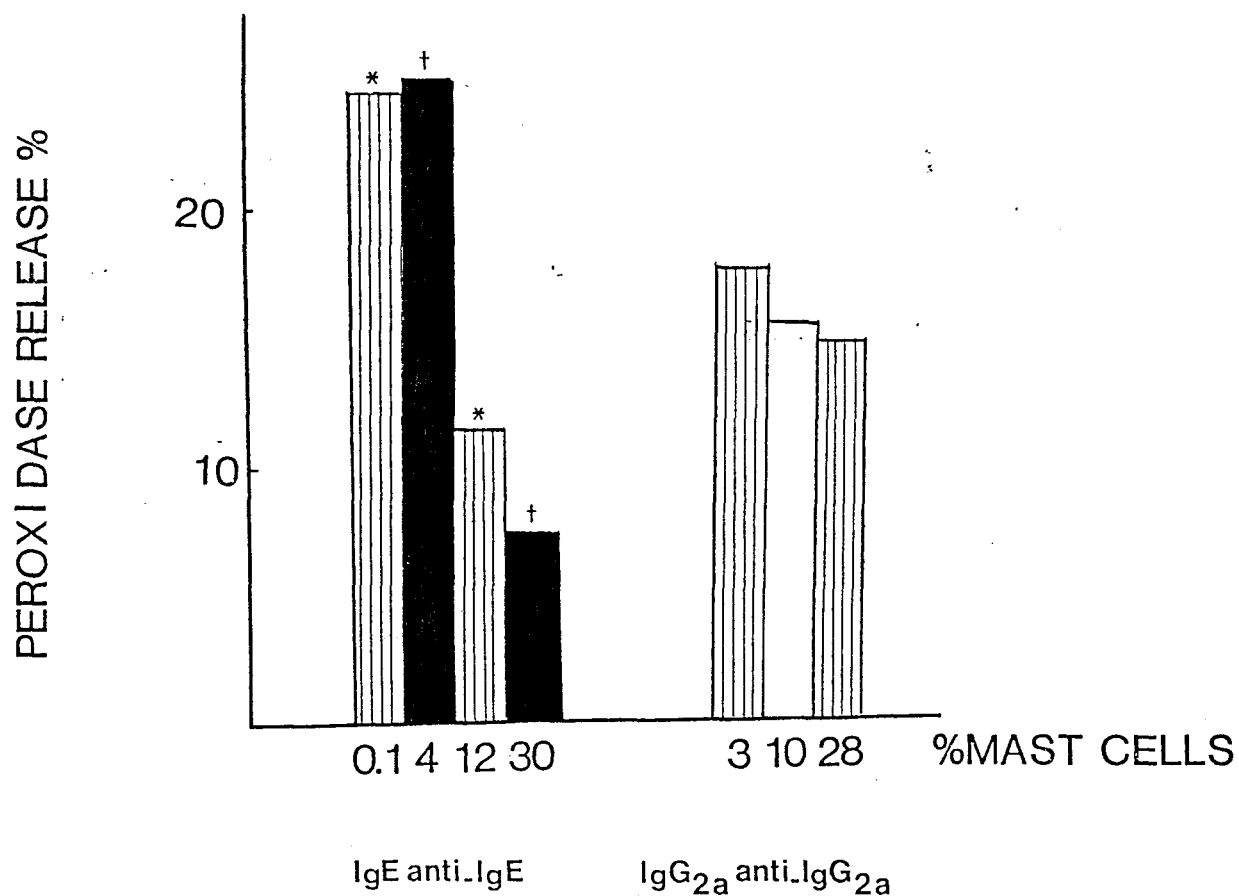


Figure 2 : Role of mast cells in EPO release from normal rat eosinophils. Various proportions of purified mast cells (10 to 30 %) were added to eosinophil-rich populations depleted of mast cells by centrifugation upon 22.5 % metrizamide (0.1 to 3 %). Results were expressed as % of total EPO content measured after treatment with 0.2 % Triton X-100.

* Significantly different from each other ($p < 0.01$).

+ Significantly different from each other ($p < 0.0001$).



5. Libération d'EPO par les éosinophiles de rats infectés

Les résultats précédents montrent que les éosinophiles de rats sains sont activables in vitro par la délivrance d'un signal d'activation constitué de l'Ig anaphylactique et de l'anti-Ig correspondante. Afin de démontrer la réalité de ce système et sur tout la pertinence biologique de ces mécanismes d'activation, des expériences ex vivo ont été envisagées. Ces essais qui sont basés sur la mise en évidence d'anticorps cytophiles à la surface des éosinophiles de rats infectés (95) consistent à incuber des eosinophiles de rats infectés par S.mansoni en présence de l'anti-IgG2a ou l'anti-IgE. En parallèle, le contenu total en EPO est évalué à différentes périodes d'infection. Les résultats présentés dans le tableau 4, montrent tout d'abord une diminution significative du contenu intracellulaire total en EPO des éosinophiles de rats infectés par rapport aux éosinophiles de rats sains. Quant à l'activation directe des éosinophiles de rats infectés, après une incubation de 3hr à 37°C en présence de l'anti-IgG2a ou l'anti-IgE, des taux significatifs d'EPO sont libérés dans les surnageants (Figure 3). Deux situations sont observées selon la période d'infection : à 28 et 42-49 jours après l'infection l'addition de l'anti-IGg2a induit une libération d'EPO (27-61%). L'anti-IgE est aussi capable d'activer ces éosinophiles (8 à 30% de l'EPO total). Ce pourcentage d'EPO est très faible à certaines périodes (35 et 56 jours après infection après l'addition de l'anti-IgE ou l'anti-IgG2a (figure 3).

L'ensemble de ces résultats non seulement confirme la présence, à certaines périodes d'infection d'anticorps cytophiles à la surface des éosinophiles mais aussi démontre la capacité de ces anticorps d'activer les cellules. Pour déterminer la spécificité anticorps de ces immunoglobulines cytophiles, les éosinophiles de rats infectés par S.mansoni sont incubés en présence d'un extrait antigénique de S.mansoni ou T.gondii. Les résultats présentés dans la figure 4 indiquent une libération d'EPO des éosinophiles activés par l'antigène spécifique (S. mansoni). Par contre, l'activation par l'antigène non spécifique n'induit pas cette libération.

Table 4. Peroxidase activity released by *S. mansoni* infected rat eosinophils after treatment with triton x-100.

Days after infection	Peroxidase activity ^a (mu/10 ⁶ eos.)
0 ^b	293 ± 3.04
21	127.8 ± 9.35 ^c
28	262.2 ± 5.51 ^c
35	186.7 ± 16.70 ^c
42	224.15 ± 3.42 ^c
49	130.9 ± 4.13 ^c
56	221 ± 10.04 ^c
63	146.6 ± 8.91 ^c

^a Total intracellular EPO was measured after treatment with triton x-100 at 0.2 % (mean of 3 experiments ± S.D).

^b Eosinophils recovered from normal rats.

^c $p < 0.01$ when compared to normal rat eosinophils.



SPECIFIC PEROXIDASE RELEASE (%)

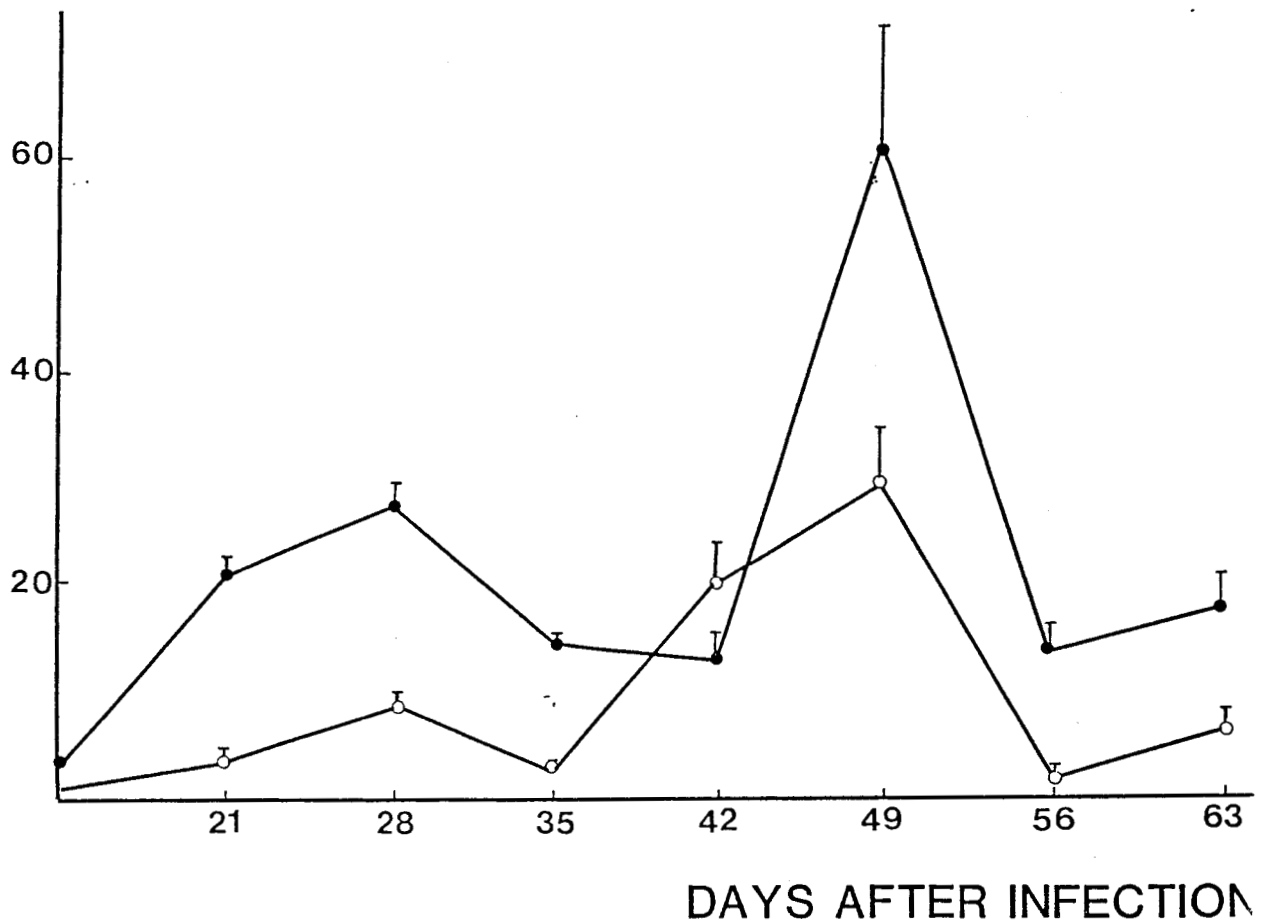


Figure 3 : Induction of EPO release by infected rat eosinophils stimulated either by anti-IgG_{2a} (●—●) or by antiIgE (○—○) according to the time after infection. Results were expressed as specific % of total EPO content measured after treatment with 0.2 % Triton X-100 (The spontaneous release has been subtracted). Each value represents the mean of three kinetic experiments ± SD).



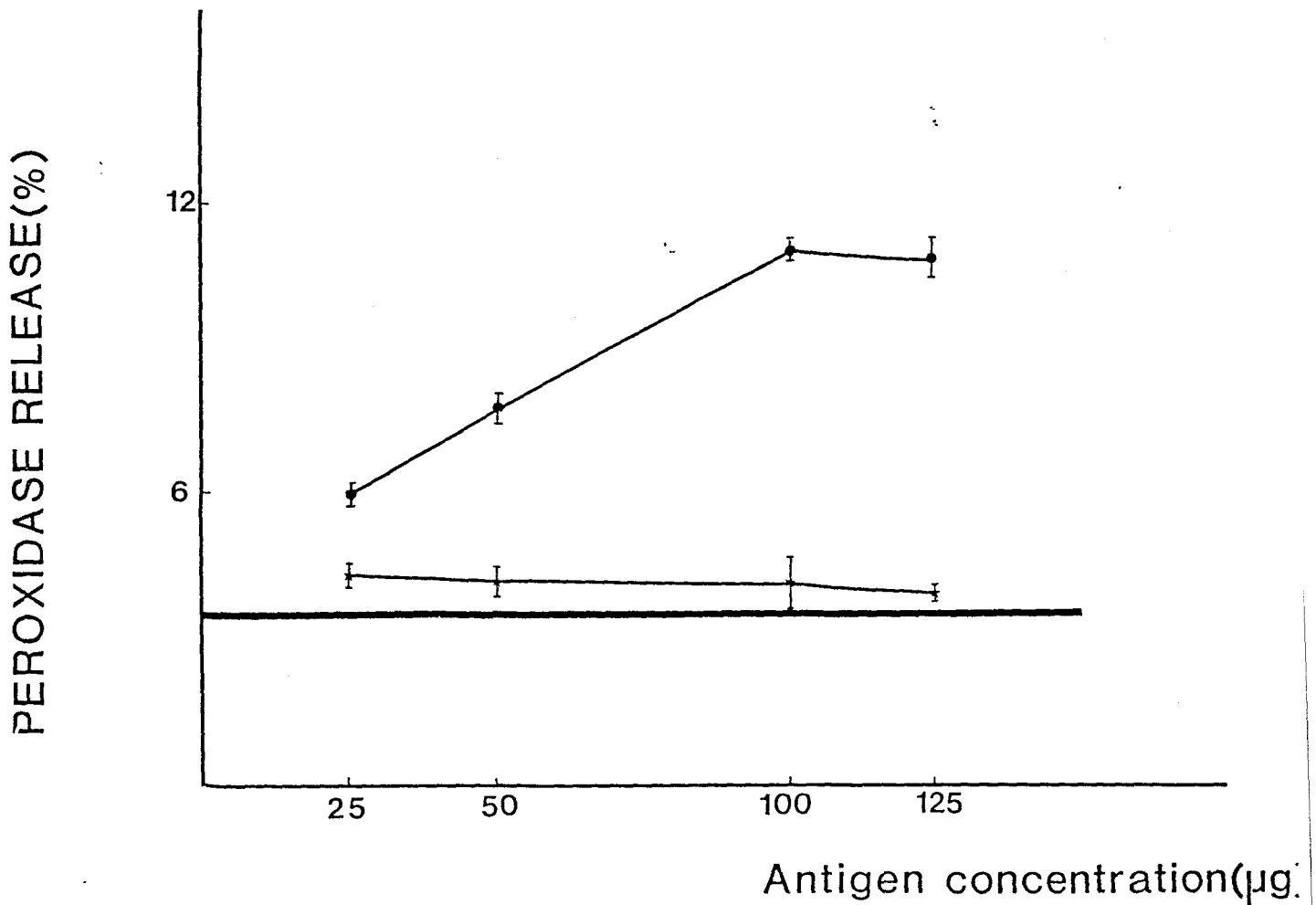


Figure 4 : Release of EPO from *S. mansoni* infected rat eosinophils (28 days after infection) incubated either with *S. mansoni* antigen (●—●) or with *Toxoplasma gondii* antigen (*—*). The bar (—) represents the percentage of EPO release % from infected rat eosinophils incubated with medium. Results were expressed as % of total EPO content measured after treatment with 0.2 % Triton X-100 (mean of triplicate \pm SD). For each concentration, the results were significantly higher with the specific antigen (*S. mansoni*) than with unrelated antigens (*T. gondii*) ($p < 0.01$).



A.2. Chez l'homme

L'étude du rôle des IgE dans l'activation des éosinophiles humains a été la conséquence d'un ensemble d'observations :

- i. L'existence de récepteurs pour l'IgE à la surface d'éosinophiles humains (Fc R2) et leur participation dans le mécanisme de cytotoxicité anti-parasitaire en présence d'IgE spécifique (8). Il faut noter que cette fonction effectrice varie en fonction de la population d'éosinophiles utilisée. En effet, Capron et al. (89) ont montré que les éosinophiles dits "hypodenses" expriment une cytotoxicité très importante en présence d'IgE par comparaison aux éosinophiles dits "normodenses".
- ii. La présence d'IgE à la surface d'éosinophiles périphériques ou tissulaires prélevés chez les patients hyperéosinophiliques au cours de certains processus pathologiques.
- iii. Enfin, les résultats précédents qui ont démontré la libération d'EPO après activation des éosinophiles de rats avec différents stimuli immunologiques confirment le rôle majeur joué par les immunoglobulines anaphylactiques. De plus, l'EPO semble représenter un bon marqueur d'activation cellulaire.

Dans le cas des éosinophiles humains il était indispensable de confirmer le rôle des IgE cytophiles dans l'activation et d'envisager leur fonction anticorps . Afin de faciliter cette étude, les expériences ont été effectuées sur des éosinophiles purifiés à partir des patients filariens chez lesquels il existe souvent l'association d'une hyperéosinophilie et d'un taux élevé d'IgE. Les conditions de purification et d'activation d'éosinophiles sont détaillées dans "Matériels et Méthodes".

1. Libération d'EPO par les éosinophiles humains après stimulation par l'anti-IgE

Le rôle des IgE dans l'activation des éosinophiles humains a été envisagé par le dosage d'EPO dans les surnageants après activation des éosinophiles hypodenses ou normodenses avec des anti-Ig. Les éosinophiles hypodenses purifiés à partir de patients filariens incubés directement avec l'anti-IgE humaine libèrent des taux significatifs d'EPO (supérieur à 5 %) (Tableau 5). Dans les mêmes conditions l'addition des anticorps anti-IgG n'a pas d'effet. Au contraire, les éosinophiles normodenses montrent une libération non significative (comparée au témoin milieu) en présence de l'anti-IgE, tandis que l'activation par l'anti-IgG n'induit que de faibles taux d'EPO .

Table 5. Release of EPO from different populations of eosinophils by various anti-human Ig antibodies.

Eosinophils incubated with ^a	EPO (C.L. units) ^b	
	Hypodense	Normodense
anti-IgE	7501 ± 2323 c (7)	691 ± 217 (3)
anti-IgG	1523 ± 860 (5)	1433 ± 107 (2)
HBSS	2351 ± 753 (7)	644 ± 202 (3)

^a purified eosinophils (> 90 %, 6 x 10⁶ cells/ml) were incubated with various anti-human Ig antibodies (final dilution 1 : 10) for 1 hr at 37°C

^b EPO activity in supernatants was tested in the presence of H₂O₂, luminol and luciferin. Results are expressed as C.L. units (mean ± SD). Numbers in parentheses are the numbers of experiments.

^c Significantly higher than controls (p < 0.001).



2. Activation par les antigènes

Pour démontrer une activité anticorps de ces IgE cytophiles, l'EPO est dosée dans les surnageants des éosinophiles de patients filariens activés par différents antigènes. Les résultats présentés dans la Figure 5, illustrant quatre expériences, montrent que l'incubation des éosinophiles hypodenses avec l'antigène spécifique (en relation avec l'infection) induit des taux de libération d'EPO élevés (10 à 20 % du contenu total). Cette libération d'EPO est dépendante de la concentration d'antigène spécifique ajouté. Quand les mêmes éosinophiles sont incubés avec des antigènes non spécifiques, les taux d'EPO libérée sont négligeables.

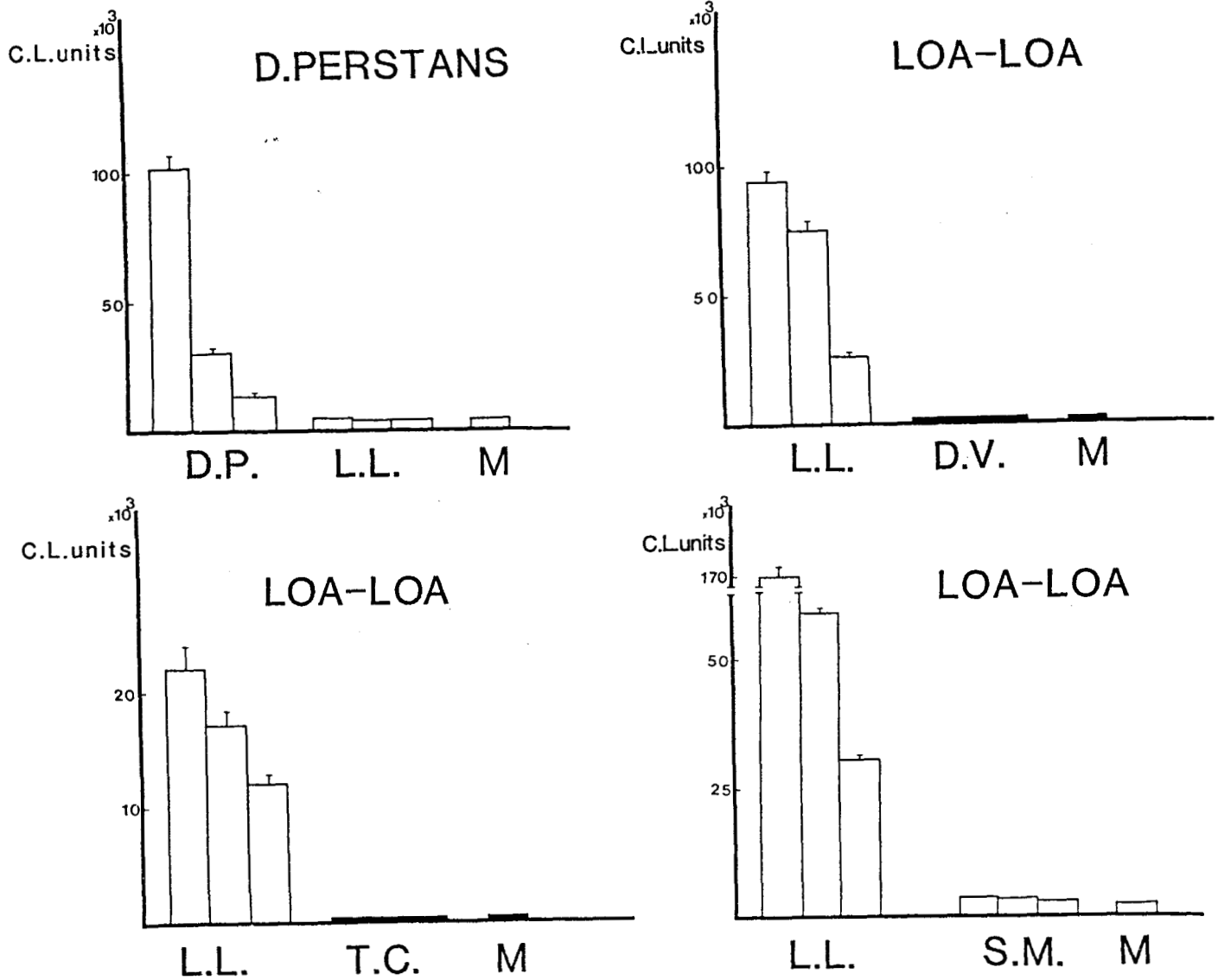


Figure 5 : Induction of EPO release by eosinophils purified from filariasis patients : 1, D. perstans ; 2, 3 and 4, Loa loa infection. Hypodense eosinophils were incubated with D. perstans (D.P.), Loa loa (L.L.), D. viteae (D.V.), T. canis (T.C.) or S. mansoni (S.M.) antigen (80, 40 or 20 $\mu\text{g}/6 \times 10^6$ cells respectively) or medium (M) for 1 hr at 37°C. EPO release in the supernatants were measured in the presence of H_2O_2 , luminol, luciferin. Results are expressed in C.L. units (mean of duplicate experiments \pm SD).

3. Etude cinétique de la libération d'EPO (peroxydase) et LDH (lactatedéhydrogénase)

Afin de vérifier si la libération d'EPO est une conséquence de l'activation des éosinophiles ou d'une lyse cellulaire, une étude cinétique de la libération d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déhydrogénase (LDH), a été envisagée. En parallèle, la libération d'EPO a été suivie. Les résultats obtenus (Figure 6) montrent une libération d'EPO à partir de 15 min d'incubation soit avec l'anti-IgE soit avec l'antigène spécifique et le plateau est atteint entre 60 - 90 min. De plus, le taux d'EPO libérée est plus élevé en présence de l'antigène qu'en présence de l'anti-IgE. Par contre, le dosage de la LDH dans les mêmes surnageants est négatif pendant toute la période de l'expérience confirmant ainsi l'absence d'une lyse cellulaire.

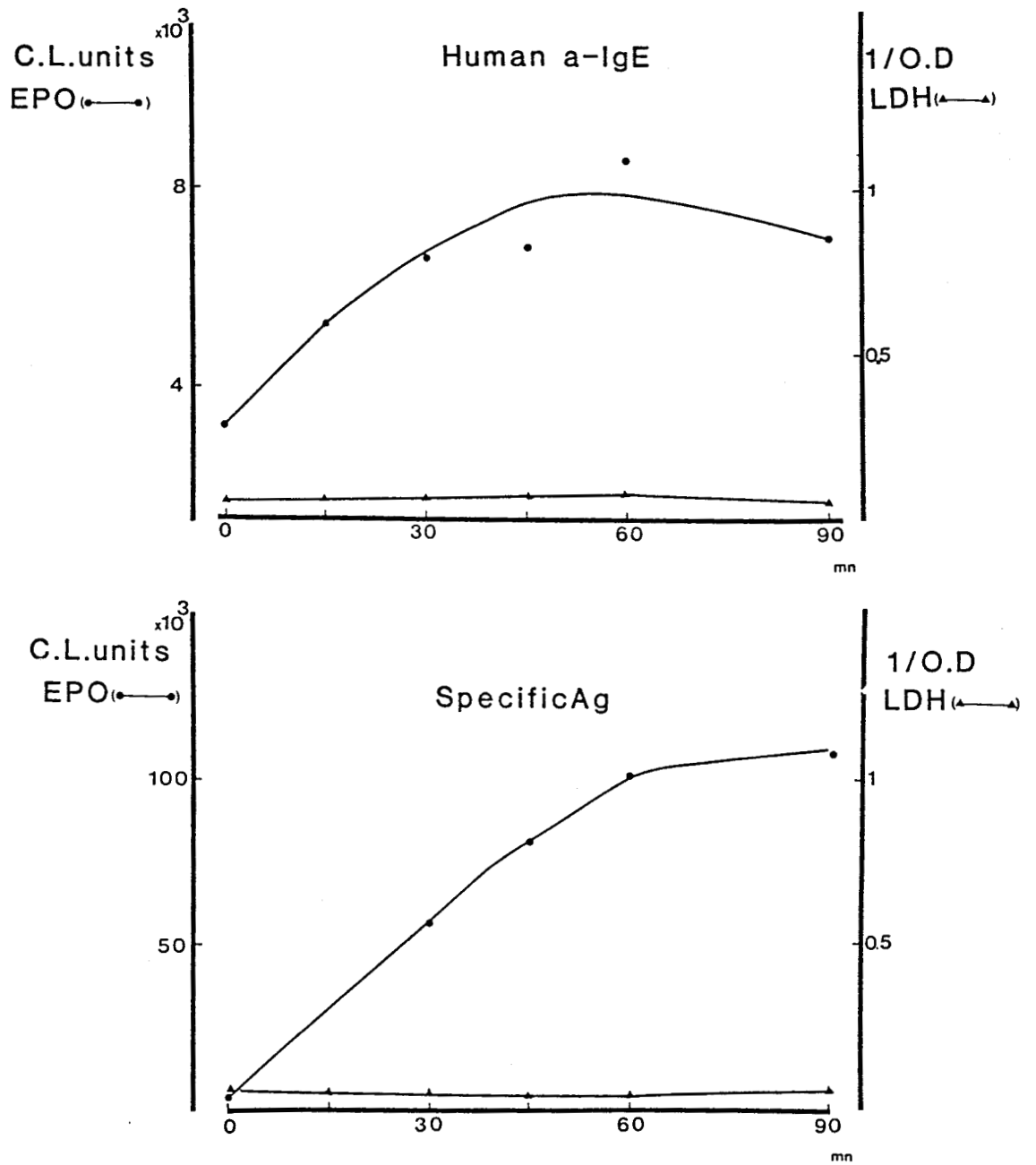


Figure 6 : Kinetics of EPO (●—●) and LDH (▲—▲) released by eosinophils from filariasis patients. Hypodense eosinophils were incubated with anti-human IgE (1:10 final dilution) or with specific antigen (80 $\mu\text{g}/6 \times 10^6$ cells) for 1 hr at 37°C. Results of EPO release are expressed as C.L. units and LDH as 1 : O.D.

4. Comparaison de l'activation des éosinophiles "hypodenses" et "normodenses"

Pour comparer la capacité d'activation des différentes populations d'éosinophiles et la relier à leurs fonctions cytotoxiques respectives, l'induction de la libération d'EPO par les éosinophiles hypodenses et normodenses en présence de l'antigène spécifique ou l'anti-Ig a été effectuée. Les résultats présentés dans le tableau 6 indiquent que seuls les éosinophiles hypodenses sont capables de libérer l'EPO en présence de l'antigène spécifique (O. volvulus) ou l'anti-IgE. Au contraire, l'addition de l'antigène ou l'anti-IgE en présence des eosinophiles nomodenses n'induit pas la liberation d'EPO. D'une façon identique aux résultats présentés dans le tableau 6, seuls les surnageants obtenus après l'incubation des éosinophiles normodenses en présence de l'anti-IgG humain montrent une activité peroxydasique significative.

Il est important de noter qu'après traitement avec le Triton X-100, les éosinophiles normodenses ont un contenu total intracellulaire d'EPO plus élevé que celui des éosinophiles hypodenses ce qui n'est donc pas la raison d'une libération plus faible par les éosinophiles normodenses activés.

Table 6 Comparison of EPO release from hypodense and normodense eosinophils purified from patients with O. volvulus.

Eosinophils incubated with ^a	EPO (C.L. units) ^b	
	Hypodense	Normodense
HBSS	861 ± 2	902 ± 25
<u>T. canis</u> ^c	618 ± 115	406 ± 78
<u>S. mansoni</u> ^c	706 ± 140	647 ± 64
<u>O. volvulus</u> ^c	5670 ± 112 ^d	1107 ± 200
anti-human IgE ^e	3417 ± 279 ^d	1225 ± 106
anti-human IgG ^e	888 ± 213	1541 ± 73
total EPO ^f	97065 ± 1945	127505 ± 12495

^a purified eosinophils were incubated for 1 hr at 37°C.

^b Results are expressed in units of C.L. (mean ± SD).

^c 30 µg of purified antigen were added per 6 x 10⁶ cells/ml.

^d Significantly higher than controls (p < 0.01).

^e anti-human Ig were used at 1 : 10 final dilution.

^f total intracellular EPO were obtained after lysis of the same quantity of eosinophils with Triton x 100 (0.2 % final dilution).



5. Mise en évidence du rôle direct des IgE cytophiles

Afin de démontrer clairement la participation directe des IgE cytophiles dans l'exocytose de la peroxydase dépendant de l'antigène, des expériences d'inhibition par des Ig agrégées ont été envisagées. La première étape d'incubation des éosinophiles purifiés à partir des patients filariens (60 min à 4 C°) avec les IgE myélomateuses agrégées induit une réduction de 80 % d'EPO libérée après l'addition de l'antigène spécifique (Figure 7). Au contraire, quand les éosinophiles sont préincubés avec un excès d'IgG agrégées (10 fois plus que la quantité d'IgE agrégées ajoutées), ils libèrent autant d'EPO que les éosinophiles préincubés avec le milieu puis activés avec l'antigène spécifique.

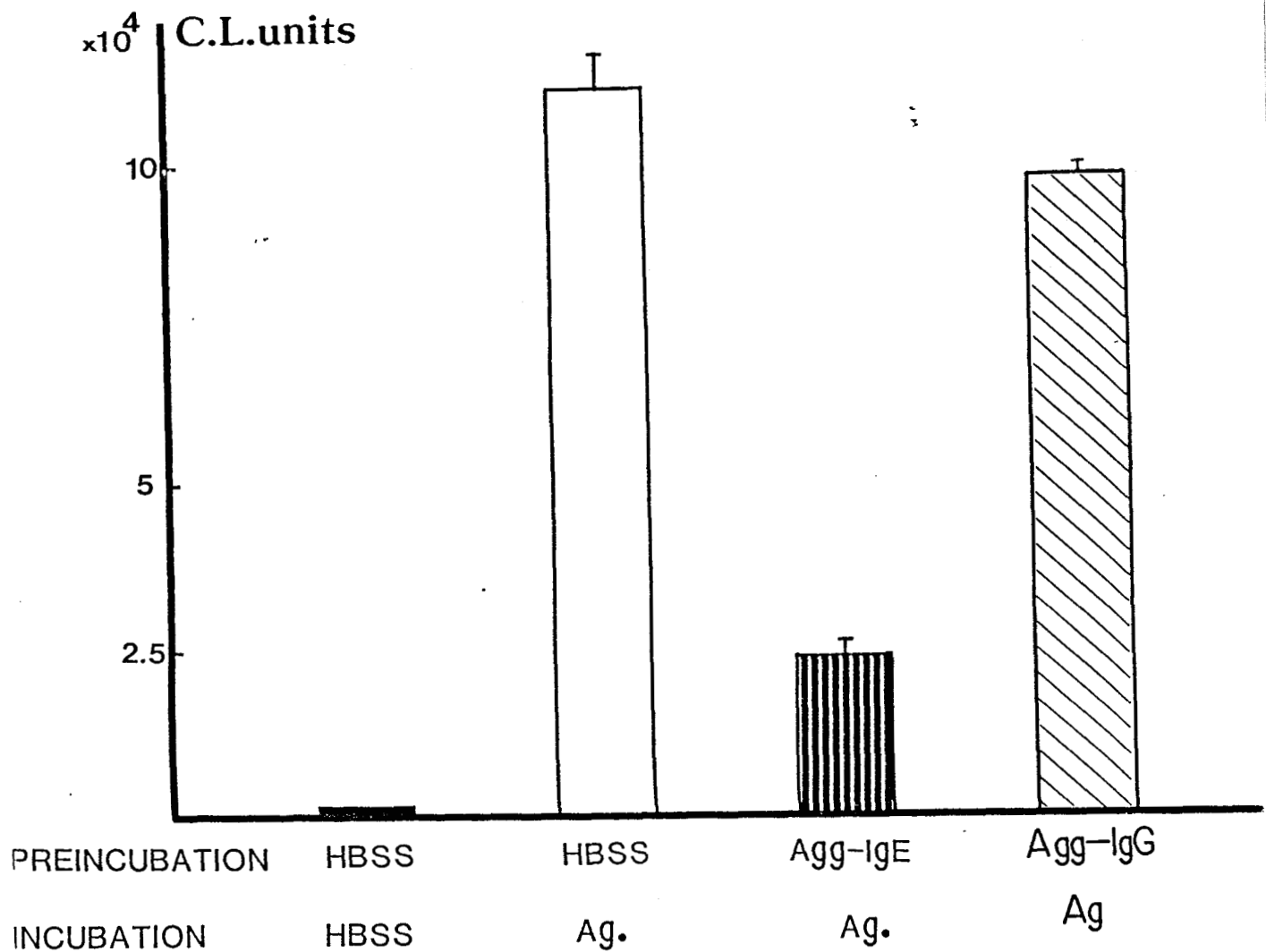


Figure 7 : Displacement of cytophilic IgE bound in vivo to eosinophils from filariasis patients. Hypodense eosinophils were preincubated with medium (HBSS), aggregated IgE (30 $\mu\text{g}/6 \times 10^6$ cells) or aggregated IgG (300 $\mu\text{g}/6 \times 10^6$ cells) for 1 hr at + 4°C and then with medium or specific antigen (80 $\mu\text{g}/6 \times 10^6$ cells) for 1 hr at 37°C. Results of EPO release are expressed as C.L. units (mean of two duplicate experiments \pm SD).



6. Dosage de l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) extracellulaire après activation des éosinophiles

Les éosinophiles semblent donc libérer de l'EPO extracellulaire après stimulation par l'anti-IgE ou l'antigène spécifique, il était donc nécessaire d'envisager si une autre protéine, l'ECP située dans le même compartiment granulaire (la matrice), peut être détectée dans les surnageants des éosinophiles activés dans les mêmes conditions. Les résultats de deux expériences représentatives, présentés dans le tableau 7 révèlent que les éosinophiles humains purifiés ne libèrent d'ECP ni en présence de l'anti-IgE ni avec l'antigène spécifique. Par contre, des taux significatifs d'ECP sont libérés après une stimulation des éosinophiles par l'anti-IgG humaine.

Table 7. Comparative release of EPO and ECP by hypodense eosinophils

Incubation for 60 min a at 37°C with	EPO		ECP (% of total) b
	C.L. units	(% of total) b	
<u>Experiment 1</u>			
HBSS	13208 ± 1478	(2.2)	0.42 ± 0.01 (2)
specific antigen (<u>Loa-loa</u>)d	55651 ± 2103	(11)d	0.59 ± 0.00 (2.8)
anti-IgEe	31615 ± 2993	(6.6)d	0.69 ± 0.08 (3.3)
anti-IgGe	18890 ± 390	(3.6)	2.13 ± 0.29 (10.3)d
Triton f	523360 ± 5113	-	20.16 ± 0.16 -
<u>Experiment 2</u>			
HBSS	2997 ± 436	(1.9)	0.32 ± 0.01 (0.6)
specific antigen (<u>Loa-loa</u>)e	20163 ± 112	(13.4)d	0.52 ± 0.01 (1.1)
anti-IgEe	7835 ± 257	(5.2)d	0.47 ± 0.01 (1.0)
anti-IgGe	2729 ± 430	(1.8)	1.23 ± 0.00 (2.6)d
Triton f	150386 ± 11923	-	46.53 ± 2.97 -

a Hypodense eosinophils were recovered from 20-22 % metrizamide layers.

b Percent of total = C.L. units or µg/ml obtained in the presence or absence of stimulus : C.L. units or µg/ml obtained after lysis of cells with Triton x-100.

c Specific antigen (Loa-loa) were used at 40 µg for 6 x 10⁶ cells/ml.

d Significantly higher than control (p < 0.01).

e Anti-human Ig antibodies were used at 1:10 final dilution.

f Total intracellular EPO and ECP were obtained after lysis of the same quantity of eosinophils with Triton x-100 (0.2 % final dilution).

7. Sensibilisation passive des éosinophiles par les IgE circulantes

L'ensemble des résultats précédents suggère que l'exocytose d'EPO par les éosinophiles hypodenses est liée à la présence des IgE cytophiles. Il était donc tentant de voir si des IgE "circulantes" (dans les sérums de patients riches en IgE) sont capables d'activer des éosinophiles après une stimulation antigénique spécifique. Pour vérifier cette hypothèse, les éosinophiles purifiés à partir des patients ayant une hyperéosinophilie sont préincubés 90 min à 4°C (étape de sensibilisation avec les IgE sériques) puis incubés 60 min à 37°C avec l'antigène spécifique. Les résultats figurés dans le tableau 8 montrent que les éosinophiles activés dans ces conditions sont capables de libérer de la peroxydase dans les surnageants. Le rôle des IgE dans ce mécanisme de sensibilisation passive est démontré par une diminution significative de l'exocytose d'EPO après épuisement des sérums sur colonnes d'immunoabsorbants d'anti-IgE. Identiquement aux résultats obtenus par l'activation directe, seuls des éosinophiles hypodenses sont capables d'être passivement sensibilisés par les IgE circulantes et par conséquent de libérer l'EPO en présence de l'antigène spécifique (Tableau 9).

Table 8. Passive sensitization of hypodense cells by serum from filariasis patients.

First incubation ^a (90 mn, 4°C)	Second incubation ^b	C.L. units ^c	P value
<u>Experiment 1</u>			
HBSS	HBSS	1293 ± 10	-
HBSS	30 µg <u>O. volvulus</u> antigen	2196 ± 53	N.S. ^e
<u>O. volvulus</u> serum ^d	HBSS	1991 ± 40	N.S. ^e
<u>O. volvulus</u> serum ^d	10 µg <u>O. volvulus</u> antigen	3151 ± 98	p < 0.01
<u>O. volvulus</u> serum ^d	30 µg <u>O. volvulus</u> antigen	3886 ± 146	p < 0.01
<u>O. volvulus</u> serum ^d	90 µg <u>O. volvulus</u> antigen	6205 ± 406	p < 0.001
IgE depleted <u>O. volvulus</u> serum ^d	90 µg <u>O. volvulus</u> antigen	1223 ± 64	N.S. ^e
<u>Experiment 2</u>			
HBSS	HBSS	1228 ± 113	-
HBSS	40 µg <u>Loa loa</u> antigen	1070 ± 28	N.S. ^e
<u>Loa loa</u> serum ^d	HBSS	1120 ± 83	N.S. ^e
<u>Loa loa</u> serum ^d	40 µg <u>Loa loa</u> antigen	3545 ± 148	p < 0.01
IgE-depleted <u>Loa loa</u> serum ^d	40 µg <u>Loa loa</u> antigen	1500 ± 99	N.S. ^e

^a Hypodense eosinophils were used at 6 x 10⁶ cells/ml.

^b Cells were incubated without washing, with HBSS or specific antigens for 1 hr at 37°C.

^c Results are expressed as units of C.L. (mean ± SD).

^d Total sera recovered from filariasis patients or IgE-depleted sera were used at 1:10 final dilution.

^e N.S. : not significant when compared to the control.



Table 9, Comparison of EPO release from hypodense and normodense eosinophils in the passive sensitization test.

First incubation (90 mn, 4°C) ^a	Second incubation (60 mn, 37°C)	C.L. units ^b	
		Hypodense cells	Normodense cells
HBSS	HBSS	1692 ± 154	408 ± 26
HBSS	30 µg <u>O. volvulus</u> antigen	1794 ± 121	N.D. ^c
<u>O. volvulus</u> serum ^d	HBSS	2302 ± 51	492 ± 30
<u>O. volvulus</u> serum ^d	30 µg <u>O. volvulus</u> antigen	6740 ± 327 ^e	288 ± 52

^a purified eosinophils were used at 6 x 10⁶ cells/ml

^b results are expressed in units of C.L. (mean ± S.D.)

^c N.D. = not done

^d Total sera recovered from patients with Onchocerca volvulus infection were used at 1:10 final dilution

^e significantly higher from controls (p < 0.01)



B. RESTRICTION ISOTYPIQUE DE L'ACTIVATION DES EOSINOPHILES

B.1. Chez le rat

Plusieurs études in vitro et in vivo ont démontré clairement la participation directe des anticorps anaphylactiques dans la fonction effectrice des éosinophiles (144). En effet, ces anticorps habituellement associés à une fonction néfaste dans le cadre de l'anaphylaxie jouent un rôle positif dans l'immunité de protection vis-à-vis de S. mansoni (IgG2a de rat ; IgE de rat et humaine).

Dans ce contexte, l'interaction entre le fragment Fc des anticorps et son récepteur présent à la surface des éosinophiles est une étape indispensable pour l'activation des éosinophiles qui conduit à leur effet cytotoxique . Grâce à cette interaction de l'Ig et de son récepteur, il a été démontré que les éosinophiles sont capables de s'activer et de dégranuler en présence des anticorps anaphylactiques (IgE, IgG2a) et de leur anti-Ig respective ou l'antigène spécifique. Par contre, les autres classes et sous-classes (IgG1, IgG2b, IgG2c et IgM) sont incapables d'induire l'exocytose de l'EPO. En parallèle, des études récentes ont montré qu'un anticorps monoclonal de rat anti-Schistosoma mansoni de classe IgG2c est capable d'inhiber fortement la cytotoxicité d'éosinophile dépendant d'IgG2a soit au niveau de l'antigène cible soit au niveau de son Fc récepteur. Cette inhibition par l'IgG2c semble être spécifiquement dirigée contre la cytotoxicité IgG2a-éosinophile, car la cytotoxicité d'éosinophile ou macrophage dépendant d'IgE n'est pas affectée (103).

L'ensemble de ces résultats et l'observation que le Fc récepteur des éosinophiles de rats infectés soit bloqué à certaines périodes d'infection, inhibant à la fois la cytotoxicité dépendant d'IgG et la protection des animaux par transfert passif (95), nous ont conduit à la recherche d'une

éventuelle régulation de l'activation cellulaire par les différents isotypes d'immunoglobulines. Grâce à la production dans notre laboratoire d'anticorps monoclonaux de rat (IgG2a et IgG2c spécifique de S. mansoni), nous avons comparé la spécificité de leur récepteur à la surface des éosinophiles de rats sains par la technique des rosettes. De plus, nous avons étudié l'effet inhibiteur de l'IgG2c sur l'activation cellulaire liée à l'IgG2a et l'IgE par le biais du dosage de l'EPO. Enfin, pour la relevance in vivo, nous avons suivi l'évolution cinétique de la présence d'IgG2a et d'IgG2c cytophiles sur les éosinophiles de rats infectés par Schistosoma mansoni au cours de l'infection, en fonction des périodes d'immunité ou d'absence d'immunité à la reinfection.

C.1. Formation de rosettes par les éosinophiles de rats sains

L'étude des récepteurs pour l'IgG2a et l'Ig2c a été envisagée par deux techniques :

- Rosettes "directes" : Consiste à incuber les érythrocytes de mouton sensibilisés par l'IgG2a ou l'IgG2c monoclonal de rat avec la population enrichie en éosinophiles ;
- Rosettes "indirectes" : consiste à préincuber la population d'éosinophiles avec l'IgG2a ou l'IgG2c (1. mg/10⁶ cellules) puis à incuber avec les érythrocytes sensibilisés par l'anti-IgG2a ou l'anti-IgG2c.



Les résultats présentés dans la figure 8 indiquent que 30 % d'éosinophiles forment des rosettes spécifiques avec les érythrocytes sensibilisés avec l'IgG2a ou l'IgG2c. Si les éosinophiles sont préincubés avec l'IgG2a ou l'IgG2c puis testés pour leur capacité à former des rosettes avec les érythrocytes sensibilisés avec l'anti-IgG2a ou l'anti-IgG2c, des proportions similaires de rosettes spécifiques sont obtenues (35 et 45 % respectivement) (figure 8). Par contre, le nombre de rosettes obtenus avec les éosinophiles préincubés avec le milieu puis les érythrocytes anti-IgG2a ou anti-IgG2c est négligeable.

L'ensemble de ces résultats suggère que les récepteurs pour ces deux sous-classes d'Ig peuvent être étudiés par formation de rosettes directe (Ig) ou indirecte (anti-Ig).

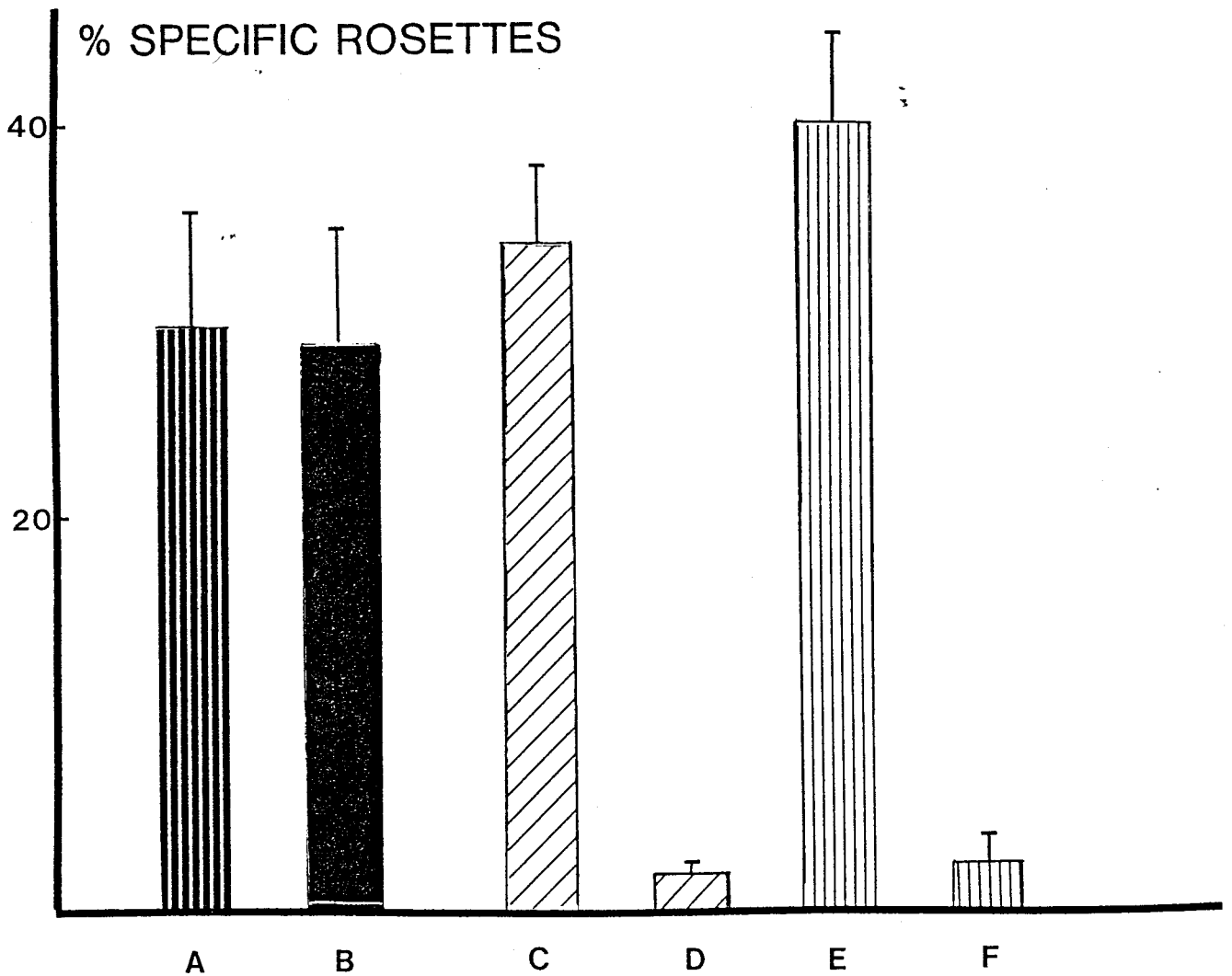


Figure 8. Rosette formation by normal rat eosinophils and fixed erythrocytes (SRBC) coated with various Ig or anti-Ig ; A, normal rat eosinophils and IgG2a coated SRBC ; B, idem with IgG2c-SRBC ; C, eosinophils sensitized with rat IgG2a and further incubated with anti-IgG2a-SRBC ; D, eosinophils and anti-IgG2a-SRBC ; E, eosinophils sensitized with IgG2c, and incubated with anti-IgG2c-SRBC ; F, eosinophils and anti-IgG2c SRBC (mean of 3 to 6 experiments \pm S.D.).

2. Spécificité des récepteurs pour les Fc des IgG sur les éosinophiles de rats

Afin d'étudier la spécificité de récepteurs pour le Fc de certaines sous-classes d'IgG sur l'éosinophile de rat, des expériences d'inhibition croisée par les sous classes d'IgG préalablement agrégées ont été envisagées . Comme l'indique le tableau 10, les rosettes IgG2a, IgG2c, IgG1 sont inhibées respectivement par la préincubation des éosinophiles avec l'IgG2a, l'IgG2c et l'IgG1 agrégées. De plus, une inhibition croisée entre l'IgG2a et l'IgG2c a été détectée. Au contraire, la préincubation avec l'IgG1 n'inhibe pas la formation de rosettes d'IgG2a et d'IgG2c, ce qui indique que l'IgG1 se lie à un récepteur différent de celui qui fixe l'IgG2a et l'IgG2c.

Table 10. Inhibition of IgG-rosettes after incubation of eosinophils with various aggregated rat Ig

Eosinophils preincubated (1 h at +4°) with	% Inhibition of Rosettes a		
	<u>SRBC-IgG2a</u>	<u>SRBC-IgG2c</u>	<u>SRBC-IgG1</u>
IgG2a ^b	74 ± 6 (3)	72 ± 9.5 (3)	8 ± 3.5 (2)
IgG2c ^b	81.5 ± 5 (3)	58 ± 9.8 (3)	5 ± 1.5 (2)
IgG1 ^b	1 ± 1 (3)	6.7 ± 2.9 (3)	73.3 ± 2.4 (3)

- a. Mean ± S.D. (numbers in parentheses represent the number of experiments) - The % inhibition was measured by comparison with eosinophils preincubated with medium (39 % IgG2a-SRBC ; 29 % IgG2c-SRBC ; 27 % IgG1-SRBC)
- b. Normal rat eosinophils were preincubated with 0.5 mg aggregated Ig/10⁶ cells. The aggregation of rat immunoglobulins was performed with DMSI.



3. Inhibition de la libération de peroxydase (EPO)

Sachant que l'IgG2c, incapable d'induire une libération d'EPO inhibe fortement la fonction effectrice des éosinophiles dépendant de l'IgG2a in vitro et in vivo (103), il est tentant d'étudier le rôle inhibiteur de l'IgG2c sur la libération d'EPO induit par l'IgG2a-anti-IgG2a ou l'IgE-anti-IgE. Si la population enrichie en éosinophiles est préincubée avec l'IgG2c (1 mg/8 x 10⁶ cellules) avant l'incubation en présence de l'IgG2a, ou incubée simultanément avec l'IgG2a et l'IgG2c, une inhibition significative de la libération d'EPO est obtenue après l'addition de l'anti-IgG2a (Tableau 11). Dans les mêmes conditions, l'IgG2c n'inhibe pas la libération d'EPO induite des éosinophiles par l'IgE-anti-IgE indiquant ainsi que le rôle inhibiteur de l'IgG2c s'effectue bien par une compétition croisée au niveau du récepteur IgG2a, tandis que le site de liaison pour l'IgE n'est pas inhibé.

Table 11. Inhibitory role of IgG_{2c} on EPO release from normal rat eosinophils

First incubation ^a (1 hr, +4°C)	Second preincubation (1 hr, +4°C)	Incubation for 3 hr at 37°C with	% inhibition of EPO release ^b	P value
medium	IgG _{2c} + IgG _{2a}	anti-IgG _{2a} ^d	66	p < 0.001
IgG _{2c}	IgG _{2a}	anti-IgG _{2a} ^d	76	p < 0.001
medium	IgG _{2c} + IgE ^c	anti-IgE ^d	19	N.S. ^e
IgG _{2c}	IgE ^c	anti-IgE ^d	15	N.S. ^e

a. In all experiments, IgG_{2a} and IgG_{2c} were used at 1 mg/8 x 10⁶ cells

b. Mean of three separate experiments

c. Eosinophil-rich populations were preincubated with IgE at 0.2 mg/8 x 10⁶ cells

d. Antisera were used at 1:10 (final dilution)

e. Not significant



4. Formation de rosettes par les éosinophiles de rats infectés

La présence des IgG2a et IgG2c cytophiles sur les éosinophiles de rats infectés par S. mansoni a été étudiée par la formation de rosettes avec des érythrocytes sensibilisés avec différentes immunoglobulines ou anti-Ig. Les résultats d'une étude cinétique présentés dans la figure 9A indiquent un étroit parallélisme entre le pourcentage de rosettes directes avec l'IgG2a et l'IgG2c, confirmant l'existence d'un récepteur commun pour l'IgG2a et l'IgG2c. Le pourcentage d'éosinophiles formant des rosettes avec des érythrocytes sensibilisés avec l'IgG2a ou l'IgG2c diminue significativement après 4 semaines d'infection ($p < 0.001$) par comparaison aux résultats obtenus avec les éosinophiles de rats sains).

Ces résultats suggèrent que les récepteurs IgG2a/IgG2c sont, soit diminués en nombre, soit devenus indétectables par leur occupation par des Ig durant la période d'infection. Cette dernière hypothèse a été vérifiée par la formation de rosettes entre les éosinophiles de rats infestés et des érythrocytes sensibilisés avec des anti-Ig.

La figure 9B montre que les récepteurs sont occupés tout d'abord par l'IgG2a entre 3 - 4 semaines d'infection ($p < 0.01$ par comparaison avec les résultats obtenus à 0 à 5 semaines). Puis, l'IgG2c est détectée sur les éosinophiles à 5 semaines ($p < 0.001$ par comparaison avec les résultats à 4 et 6 semaines) (Figure 9B).

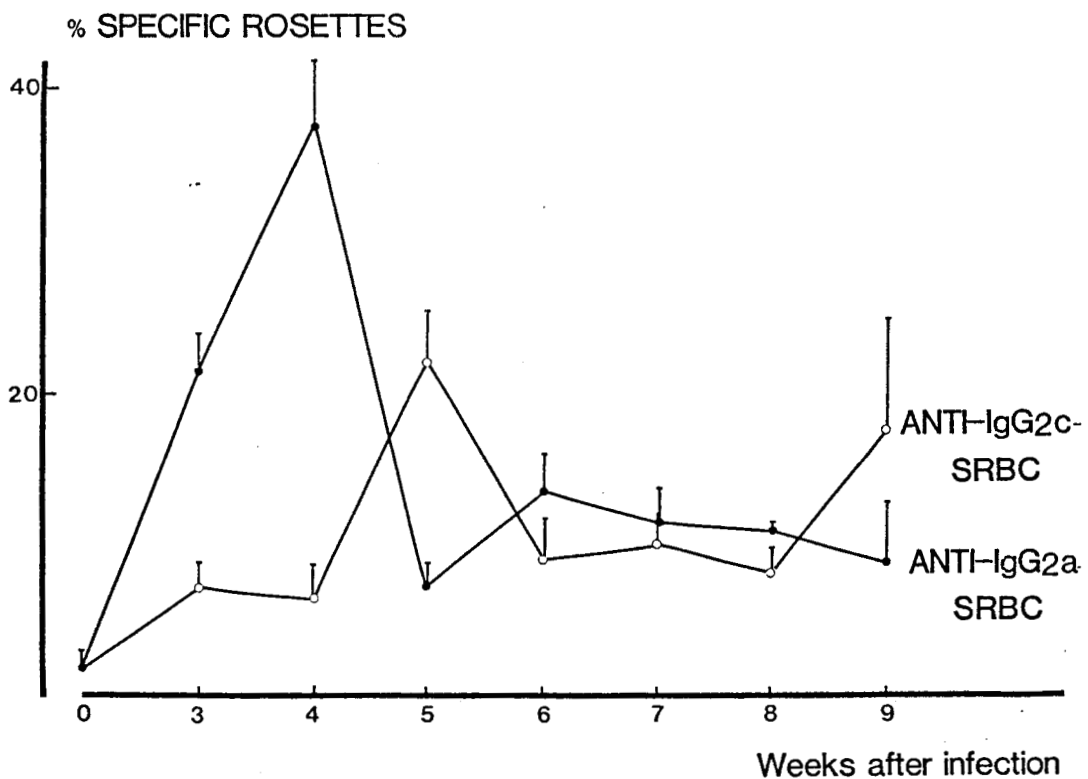
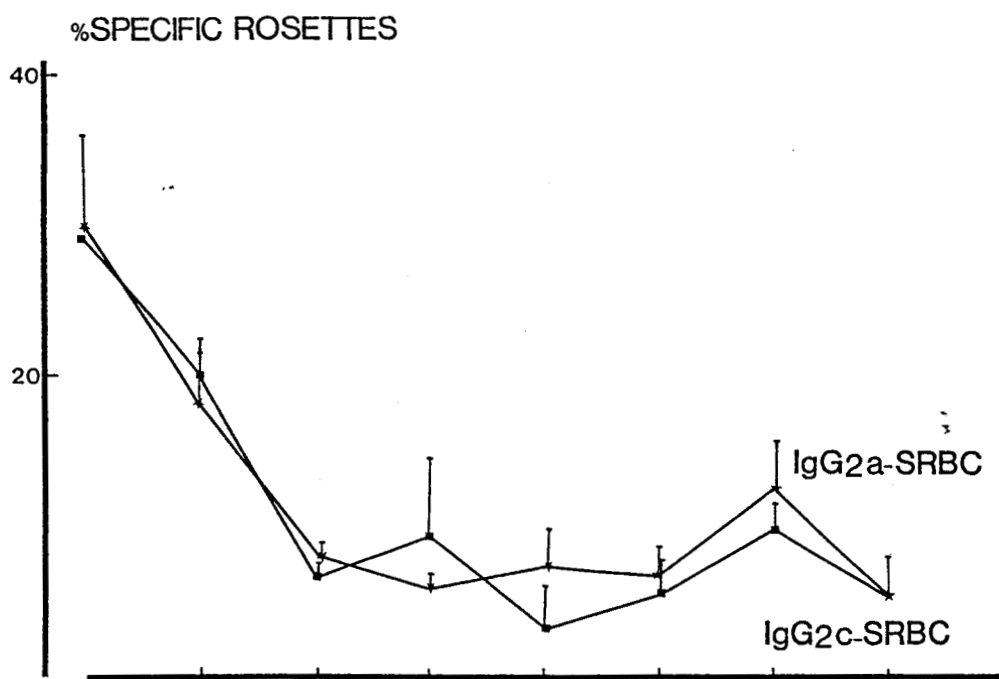
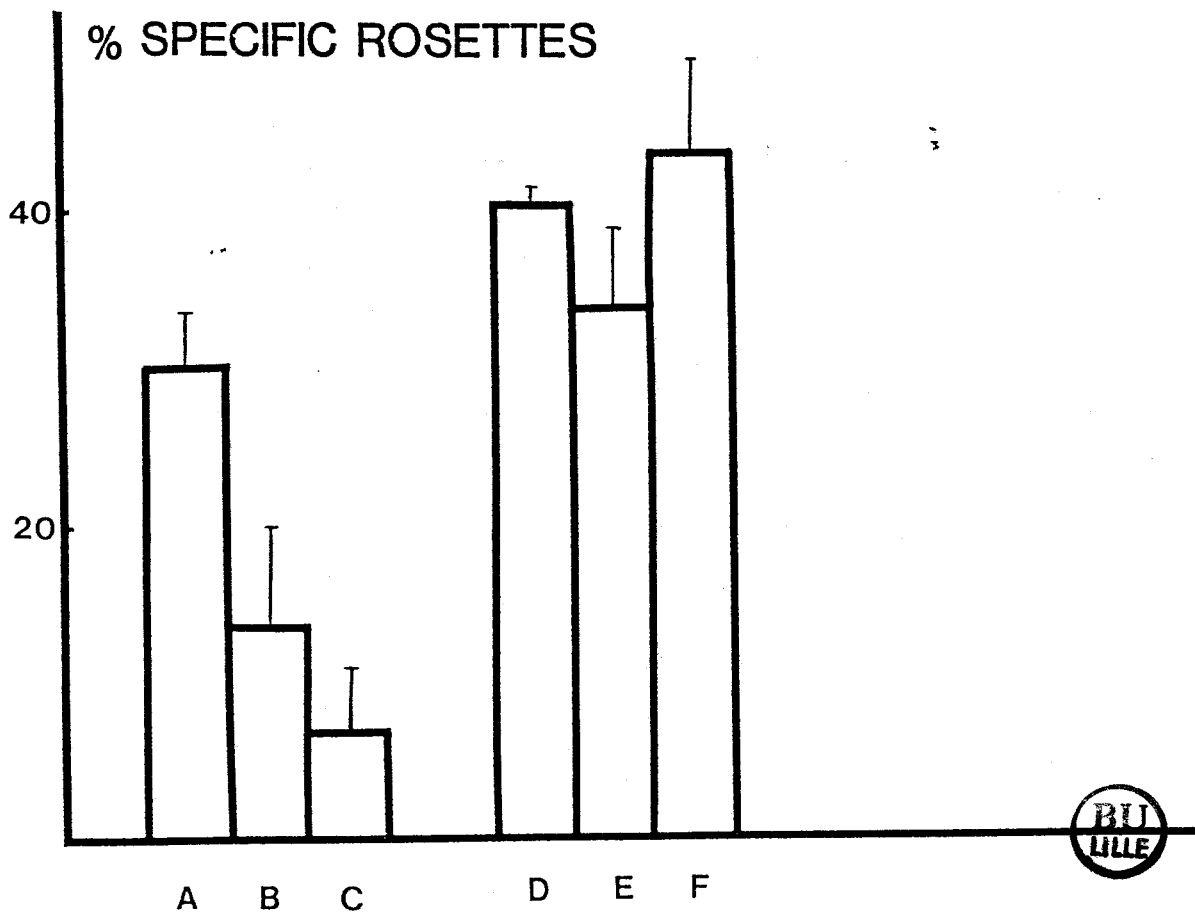


Figure 9. Kinetic study of IgG2a/IgG2c Fc receptor on rat eosinophils according to the time after infection with *S. mansoni*. Mean percentage of specific rosette-forming eosinophils in the presence of erythrocytes coated with (A), IgG2a (x—x); IgG2c (■—■); (B), anti-IgG2a (●—●) or (▲—▲) anti-IgG2c (mean of 3 experiments \pm S.D.).

5. Déplacement de l'IgG2a fixée in vitro et in vivo sur les éosinophiles

Pour expliquer la succession entre l'IgG2a et l'IgG2c à la surface des éosinophiles de rats infectés, des expériences de déplacement de l'IgG2a liée aux éosinophiles de rats sains par l'IgG2c ont été effectuées. Ces essais consistent à préincuber les éosinophiles de rats sains avec l'IgG2a ou l'IgG2c (1 mg/10⁶ cellules) pendant 1 hr à 4°C, puis une incubation avec l'IgG2c et l'IgG2a respectivement (1 h à 4°C, 1 mg/10⁶ cellules). Après cette seconde étape, les cellules sont testées pour leur capacité à former des rosettes avec les érythrocytes sensibilisés avec les anti-Ig. Alors qu'un pourcentage élevé de rosettes est obtenu par la sensibilisation des éosinophiles avec l'IgG2a et l'addition des érythrocytes anti-IgG2a (Figure 10), une seconde incubation avec l'IgG2c avant la formation de rosettes diminue significativement les rosettes anti-IgG2a (p 0.01). Cette diminution varie entre 50 à 80 % en fonction de la concentration d'IgG2c ajoutée. Par contre, les rosettes anti-IgG2c ne sont pas inhibées quand les éosinophiles sont sensibilisés avec l'IgG2c puis incubés avec l'IgG2a (Figure 10).

Afin de démontrer la réalité du déplacement de l'IgG2a par l'IgG2c, des éosinophiles de rats infectés ayant à leur surface des IgG2a cytophiles (à 4 semaines d'infection) sont incubés directement avec l'IgG2a ou l'IgG2c puis testés en formation de rosettes avec les érythrocytes anti-IgG2a ou anti-IgG2c. Les résultats présentés dans le tableau 12 montrent que l'incubation des éosinophiles de rats infectés depuis 4 semaines avec l'IgG2c inhibe significativement la formation de rosettes anti-IgG2a (p 0.01, une inhibition de 75 %), alors qu'une augmentation de rosettes anti-IgG2c est observée. L'incubation avec l'IgG1 n'induit aucune diminution de la formation de rosettes anti-IgG2a (Tableau 12).



ANTI-IgG2a-SRBC ANTI-IgG2c-SRBC

Figure 10. Displacement of IgG2a and IgG2c fixed in vitro on normal rat eosinophils. Results presented as % specific rosettes in the presence of anti-IgG2a-SRBC (A, B, C) or anti-IgG2c-SRBC (D, E, F) (mean of 3 experiments \pm SD). Normal rat eosinophils were preincubated with IgG2a ($1 \text{ mg}/10^6$ cells for 1 hr at $+4^\circ\text{C}$) and then with medium (A), IgG2c $0.5 \text{ mg}/10^6$ cells (B) or IgG2c, $1 \text{ mg}/10^6$ cells, for 1 hr at $+4^\circ\text{C}$. Eosinophils preincubated with IgG2c ($1 \text{ mg}/10^6$ cells for 1 hr at $+4^\circ\text{C}$) were further incubated for the same period with medium (D), with IgG2a $0.5 \text{ mg}/10^6$ cells (E), or with IgG2a, $1 \text{ mg}/10^6$ cells (F).

Table 12. Displacement assays of cytophilic IgG_{2a} on infected rat eosinophils by various rat immunoglobulins.

Eosinophils preincubated in (1 hr, 4°C) ^a	SRBC coated with ^b	% Rosettes ^c	% inhibition ^d
medium	BSA	7.4 ± 3.4	
medium	anti-IgG _{2a}	45.3 ± 6.1	
medium	anti-IgG _{2c}	16.6 ± 3.3	
IgG _{2a} (1 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2a}	58 ± 2.8	
IgG _{2c} (0.5 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2a}	24 ± 1.4	56
IgG _{2c} (1 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2a}	16.5 ± 2.1	76
IgG _{2c} (1 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2c}	38 ± 4.2	
IgG ₁ (0.5 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2a}	49 ± 2.8	
IgG ₁ (1 mg/10 ⁶ cells)	anti-IgG _{2a}	48.5 ± 4.9	

^a Eosinophils were recovered from rats infected by 1500 *S. mansoni* cercariae (4 wks)

^b Rosette assays were performed as described in Materials and Methods

^c Results presented as mean of two experiments ± S.D.

^d (%) represent the % of diminution = $1 - \frac{\% \text{ of specific rosettes in the presence of IgG}_{2c}}{\% \text{ of specific rosettes in the absence of IgG}_{2c}} \times 100$



B.2. Chez l'homme

Plusieurs étapes nous ont conduit à l'étude des anticorps bloquants au cours de l'infection humaine par Schistosoma mansoni .

1. L'existence de phases différentes d'immunité à la reinfection chez le rat correspondant à de larges variations dans la capacité cytotoxique des éosinophiles ou à leur rôle protecteur par transfert des cellules invivo. Cette variation a été attribuée à des complexes immuns isolés à partir de sérums de rats infectés et capables d'activer ou d'inhiber cette capacité (95).
2. Un anticorps monoclonal de rat de classe IgG2c est capable de bloquer la fonction effectrice des éosinophiles dépendants d'IgG2a. Cette activité inhibitrice liée aux IgG2c est retrouvée dans les sérums de rats infectés.
3. La mise en évidence au cours d'une étude épidémiologique et immunologique de la schistosomiase humaine (147,148) d'enfants susceptibles ou immuns à la reinfection successive à une chimiothérapie :
 - Le premier groupe de 22 enfants, ayant un degré d'intensité de réinfection très important (> 100 oeufs par gramme de selles) est considéré comme le groupe susceptible à la réinfection.
 - Le deuxième groupe de 35 enfants n'éliminant que peu d'oeufs dans les selles (< 30 oeufs) malgré le temps de contact élevé avec l'eau au niveau de site d'infection est considéré comme résistant à la réinfection.

Les études comparatives de divers paramètres de la réponse immune entre les deux groupes, tels que les anticorps responsables de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles ou la numération d'éosinophiles mesurée comme une estimation indirecte de la fonction effectrice d'éosinophiles ou la réponse IgE anti-schistosomules n'ont pas permis de mettre en évidence de différences.

Nous avons donc suspecté l'existence, au cours de la schistosomiase humaine, d'anticorps capables de moduler la fonction effectrice d'éosinophiles in vitro et envisagé leur participation dans la susceptibilité à la

réinfection. Il est important de noter que la cytotoxicité dépendant d'éosinophiles peut s'exprimer contre les schistosomules soit en présence d'IgG ou d'IgE spécifique. Dans le cadre de ce programme, qui a pu être réalisé grâce à la collaboration du Dr Butterworth (Medical Research Council Cambridge), nous nous sommes limités à l'étude de la régulation de la fonction effectrice d'éosinophiles dépendant d'anticorps IgG essentiellement par analogie avec le modèle expérimental du rat.

Les sérums bilharziens utilisés transmis par le Dr Butterworth, ont été sélectionnés au cours d'une étude épidémiologique et immunologique menée au Kenya dans une zone d'endémie bilharzienne .

1. Nature des isotypes à activité anti-S. mansoni

Les 53 sérums étudiés par immunofluorescence indirecte (dilution finale 1:50) en présence de l'anti-IgG ou anti-IgM humain marqué à la FITC, sur coupe de schistosomules, induisent une intense fluorescence au niveau de la membrane. Ces résultats traduisent l'existence des IgG et IgM dirigées contre la surface des schistosomules (Figure 11). Pour certains sérums dilués au 1/5e, une faible fluorescence est observée avec l'anti-IgA qui disparaît avec une dilution supérieure 1:10. Des résultats identiques sont obtenus avec les fractions IgG et IgM purifiées à partir de ces sérums sur Protéine A-Sépharose ou par le système de FPLC (Fast Protein liquid Chromatography). De plus, les réactions croisées entre les fractions sont absentes. Les contrôles de sérums normaux humains ou leurs Ig purifiées ne présentent aucune fluorescence ni avec l'anti-IgG ni avec l'anti-IgM humaines.

FIGURE 2A

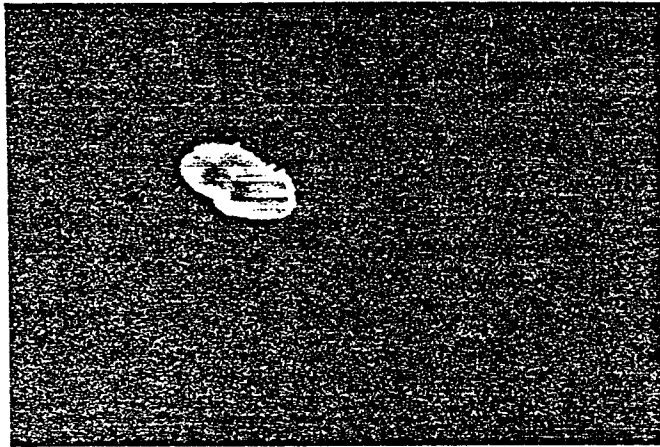


FIGURE 2B

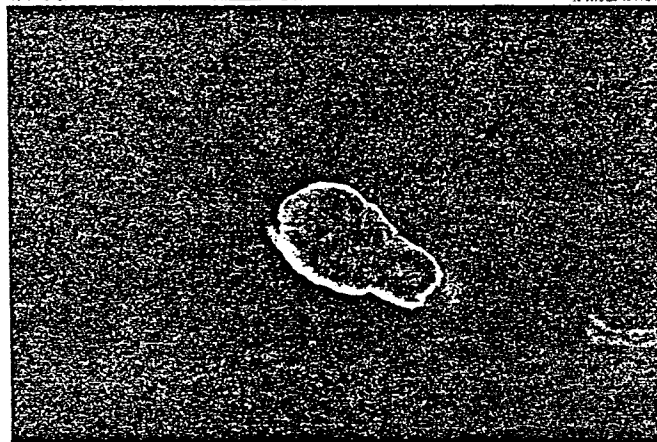


Figure 11. Localization of the antigenic sites recognized by total serum and Ig fractions. (A) indirect fluorescence on sections of S. mansoni schistosomula incubated with total serum and revealed by FITC-anti human IgG. (B) same as (A) using FITC-anti human IgM.

2. Activités biologiques des anticorps anti-S. mansoni

Afin de déterminer l'isotype nécessaire pour la cytotoxicité dépendant d'éosinophiles, 20 sérums bilharziens et 6 sérums normaux humains sont fractionnés soit par absorption sur protéine A-Sépharose, soit par séparation d'Ig sur FPLC et les fractions IgG et IgM sont récupérées. Chaque fraction est ensuite contrôlée par immunofluorescence indirecte puis testée pour sa capacité à induire la cytotoxicité dépendant d'éosinophiles contre les schistosomules de S. mansoni. Des pourcentages élevés de cytotoxicité sont détectés (Figure 12), quand les schistosomules sont incubés en présence des éosinophiles purifiés à partir des individus présentant une éosinophilie modérée, et du sérum bilharzien total chauffé 2 hr à 56°C. Ces résultats confirment les observations de Butterworth et al. (85).

Dans les expériences concernant les fractions purifiées, seule la fraction IgG (purifiée sur protéine A-Sépharose ou sur FPLC) révèle une activité cytotoxique en présence des éosinophiles humains (Figure 12). De plus, le pourcentage de cytotoxicité est plus élevé en présence des IgG purifiées qu'en présence du sérum total ($p < 0,01$) ce qui laisse suggérer que l'adsorption sur la protéine A-Sépharose a permis l'élimination d'un facteur non retenu sur la protéine A possédant une activité inhibitrice. Par contre, la fraction IgM n'induit pas d'activité cytotoxique dépendant d'éosinophiles. Les contrôles correspondant aux fractions purifiées en l'absence d'éosinophiles ou aux Ig purifiées de sérums normaux humains en présence d'éosinophiles) ne présentent pas d'activité cytotoxique vis-à-vis des schistosomules.

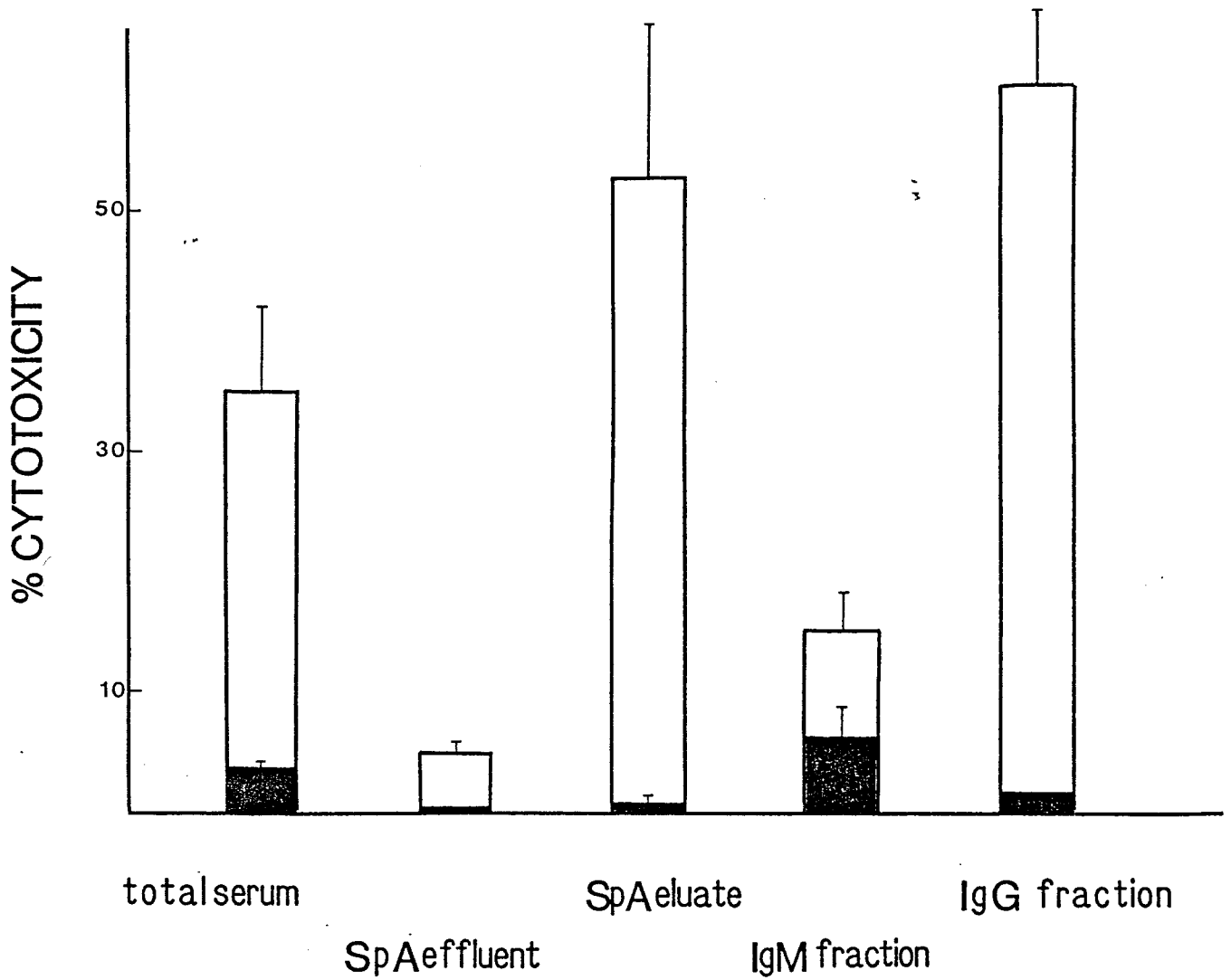


Figure 12. Eosinophil-dependent killing of S. mansoni schistosomula by various fractions of immune sera. The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48 hr contact with eosinophils. Sera or fractions obtained by SpA or FPLC separation (1:20 final dilution) were heat-inactivated for 2 hr at 56°C () immune serum ; () normal serum (mean of 6 experiments + SD).



3. Mise en évidence de l'activité "bloquante" de l'IgM

Sachant que les anticorps de classe IgM sont capables de se lier à un antigène présent à la surface du schistosomule (par immunofluorescence) et que ces mêmes anticorps n'induisent pas une activité cytotoxique, nous avons envisagé l'activité modulatrice de l'IgM sur l'expression de la cytotoxicité dépendante d'éosinophile induite par les IgG. Les schistosomules sont préincubés avec différentes dilutions de la fraction d'IgM pendant 2 hr à 37°C. Après 2 lavages, le sérum total décomplémenté ou la fraction IgG, les éosinophiles sont additionnés. L'activité cytotoxique est comparée à l'action cytotoxique induite par le sérum total seul ou la fraction IgG seule en présence des schistosomules préincubés dans le milieu et les éosinophiles. Dans ces conditions, une inhibition nette de l'activité cytotoxique de sérum total immun et de la fraction IgG est observée dans les puits contenant les schistosomules préincubés avec la fraction IgM purifiée à partir de sérums bilharziens (Tableau 13). Afin d'éviter une inhibition non spécifique, les schistosomules sont préincubés avec la fraction IgM de sérum normal humain. Dans ce dernier cas, Les résultats présentés dans le tableau 13 montrent une absence d'inhibition de la cytotoxicité induite par le sérum total immun. De plus, la préincubation des éosinophiles avec la fraction IgM de sérums immuns au lieu de l'incubation de schistosomules n'affecte pas l'action cytotoxique de sérum total immun, suggérant une action inhibitrice se manifestant au niveau de la cible (par le fragment $F_{ab}'_2$ de l'IgM) et non par une compétition au niveau de récepteur Fc de la cellule effectrice.

TABLE 13, Inhibitory role of IgM containing SpA effluents on IgG dependent cytotoxicity by human eosinophils.

Preincubation (2 hr, 37°C) ^a	Incubation (final dilution)	% cytotoxicity ^b
Medium	total N.S. ^c	2.7 ± 0.0
Medium	total I.S. ^d (1:20)	36.5 ± 10
Medium	SpA effluent ^e I.S. (1:20)	4.9 ± 0.6
Medium	SpA eluate ^f I.S. (1:20)	45.5 ± 9.9
SpA effluent I.S., (1:10)	total I.S. (1:20)	8.2 ± 3.9
SpA effluent I.S. (1:30)	total I.S. (1:20)	20.4 ± 4.6
SpA effluent I.S. (1:10)	SpA eluate I.S. (1:20)	11.1 ± 1.5
SpA effluent: N.S. (1:10)	total I.S. (1:20)	30 ± 5.2
SpA effluent I.S. ^g (1:10)	total I.S. (1:20)	35.7 ± 6.5

^a Schistosomula were preincubated for 2 hr at 37°C and washed twice with medium. The homologous serum or fractions were then added.

^b The percentage of cytotoxicity was measured after 48 hr contact with eosinophils (mean of 7 experiments ± SD).

^c N.S. : Normal Serum .

^d I.S. : Immune Serum

^e SpA effluent represents the unbound fraction to protein A - Sepharose

^f SpA eluate represents the bound fraction to protein A - Sepharose eluted with glycine 1 M

^g Eosinophils were preincubated with SpA effluent and then washed with medium.



4. Immunoprécipitation des antigènes reconnus par IgM et IgG anti-S. mansoni

Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que l'inhibition est effectuée au niveau de l'antigène cible et non pas au niveau de l'éosinophile. Afin de vérifier cette hypothèse, l'immunoprécipitation d'antigènes de surface a été envisagée. Les résultats révèlent une précipitation par les anticorps fixant la protéine A (les IgG) d'antigène dans la zone 30 - 40,000 daltons (100 % des sérums testés ; n = 17) (Figure 13). Des bandes additionnelles à 20 - 25,000 daltons sont observées dans 66 % des cas. Enfin, des bandes très faibles sont aussi détectées dans les hauts poids moléculaires (67,000 daltons). Les antigènes de surface précipités par les IgM de sérums de patients infectés se trouvent dans la région 30 - 40,000 daltons (100 % des sérums testés) et aussi dans la région 20 - 25,000 daltons (20 % des cas). Les expériences d'adsorption dans lesquelles les extraits antigéniques marqués sont d'abord adsorbés sur les IgG puis ensuite les antigènes non retenus sont précipités avec les IgM montrent une inhibition croisée entre ces deux classes d'anticorps (Figure 13, piste 5).

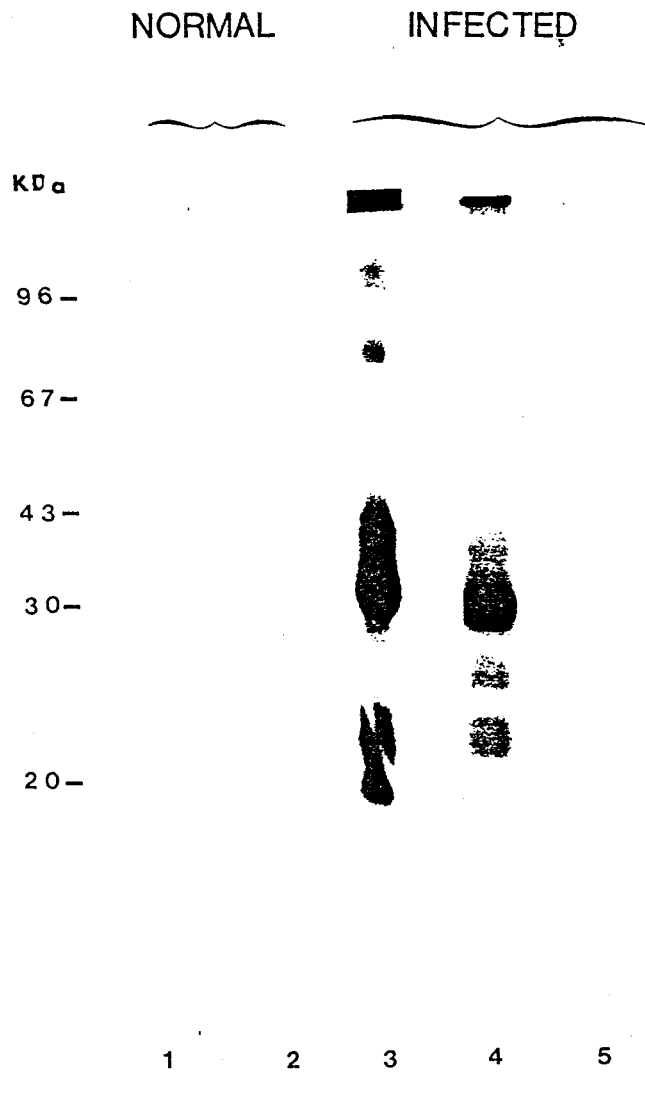


Figure 13. Immunoprecipitation of schistosomulum surface antigens by immune sera. Detergent extracts of 500 labelled skin schistosomula were incubated with 10 μ l of total serum or 100 μ l of SpA effluent fraction. Immune complexes of total serum were absorbed on protein A Sepharose and were analyzed, in lanes 1, 3. Protein A-unbound material from lane 3 was further incubated with SpA effluent fraction, and immune complexes were analyzed in lane 5. The immune complexes of SpA effluent fraction were absorbed on protein A Sepharose previously sensitized with 10 μ l (1mg/ml) of anti-human IgM (lanes 2, 4, 5).

5. Approche de l'activité bloquante de l'IgM au niveau du déterminant antigénique

Ces résultats suggèrent l'existence d'anticorps de classe IgM inhibant la cytotoxicité IgG dépendante des éosinophiles humains par un mécanisme de blocage au niveau d'un antigène cible présent à la surface des schistosomules. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, essentiellement au niveau du déterminant antigénique reconnu par les IgG et les IgM, nous avons fait appel à des anticorps monoclonaux de rats (IgG2a et IgG2c). Ces monoclonaux reconnaissent un antigène d'un poids moléculaire de 38,000 daltons (103). La technique utilisée consiste à fixer cet antigène sur des plaques de polyvinyl chloride par le biais d'un autre anticorps monoclonal qui ne croise ni avec l'IgG2a ni avec l'IgG2c monoclonal. Après 2 hr d'incubation, les plaques sont lavées en PBS 0,1 % BSA. Deux techniques d'inhibition ont été utilisées:

a. Inhibition de la fixation d'anticorps monoclonaux

Cette technique consiste à fixer un extrait détergent de schistosomule sur des plaques de polyvinyl chloride par le biais d'un anticorps monoclonal de rat préfixé sur ces plaques pendant 2 hr à température ambiante. Après 2 hr de contact, l'excès d'antigène est éliminé par 3 lavages en PBS BSA 0,1 %.

Pour les tests d'inhibition, 100 ul de sérum ou les fractions Ig (dilution finale 1:10) sont additionnés. Après 2 hr d'incubation à 37°C et 3 lavages, les plaques sont incubées avec l'IgG2a ou l'IgG2c marquée à l'¹²⁵I pendant 1 hr à 37°C et une nuit à 4°C puis les plaques sont lavées 3 fois.

b. Inhibition croisée entre les IgG et IgM anti-S. mansoni

Les plaques contenant l'antigène (cf technique ci-dessus) sont préincubées avec les fractions IgG et IgM non marquées pendant 2 hr à 37°C. Après 3 lavages, les plaques sont incubées avec les fractions homologues d'IgM et d'IgG marquées à l' ^{125}I pendant 1 hr à 37°C et une nuit à 4°C puis les plaques sont lavées 3 fois. Dans toutes les expériences, les puits sont découpés et comptés dans un compteur gamma.

Le pourcentage d'inhibition de fixation est calculé selon la formule :

$$[(a - b) / a] \times 100 \quad \text{où}$$

a = cpm obtenu sans l'inhibiteur

b = cpm obtenu en présence de l'inhibiteur

Les résultats présentés dans le tableau 14 révèlent que les deux fractions IgG et IgM sont capables d'inhiber séparément la fixation des anticorps monoclonaux IgG2a et IgG2c anti-38000, alors que l'inhibition liée au serum total contenant les anticorps IgG et IgM est deux fois plus élevée.

Les résultats présentés dans la Figure 14 A indiquent que la préincubation de l'antigène avec les IgG froides inhibe la fixation des IgM marquées purifiées à partir du même sérum. Dans les mêmes conditions, des taux d'inhibition plus élevés sont observés quand les IgM non marquées sont incubées avant les IgG marquées (Figure 14 B) suggérant une avidité plus importante des IgM pour le déterminant antigénique.

Table 14, Inhibition of binding to schistosomulum antigen of two rat monoclonal antibodies directed against the 38,000 antigen.

Preincubation with ^a	% inhibition ^b		
	Labeled-IgG2a ^c	Labeled-IgG2c ^c	
IgG fraction ^d	30 ± 2	38 ± 5.7	(17) ^e
IgM fraction ^d	23 ± 1.9	33 ± 3.7	(17) ^e
Total serum	55.8 ± 2.9	54.6 ± 4.1	(17) ^e

a. Plates precoated with antigen were preincubated with IgG, IgM fraction or total serum from infected patients (1:10 final dilution) for 2 hr at 37°C.

b. % inhibition was calculated as described in Materials and Methods (mean ± SD). Inhibition by Ig fraction of normal serum or total normal serum has been subtracted.

c. Purified anti-S. mansoni IgG2a and IgG2c rat monoclonal antibodies were labeled by ¹²⁵I according to the chloramine T method.

d. IgG and IgM fractions were obtained from total serum by fractionation with FPLC system.

e. Parentheses indicated the number of sera tested.

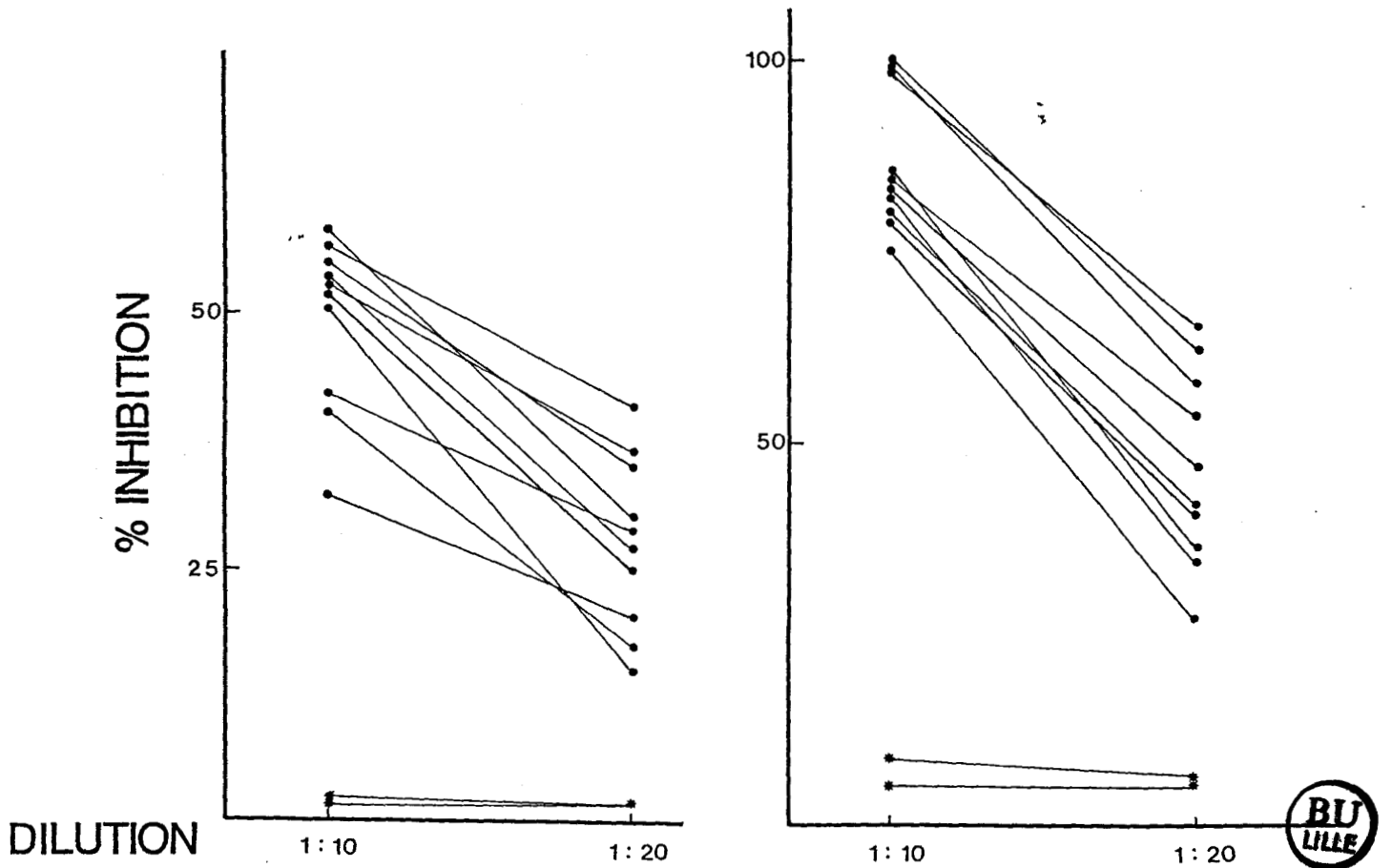


Figure 14. Cross inhibition of binding to antigen of IgG and IgM fractions from immune sera. Schistosomulum antigen bound to plates by using a rat monoclonal antibody (C3-109) were preincubated with IgG fraction (A) or with IgM fraction (B). After 2hr contact and 3 washes, homologous labelled-IgM or IgG were added to (A) and (B) respectively and incubated for 1 hr at 37°C and overnight at 4°C. Results are presented in % inhibition (see Material and Methods) (mean of duplicate \pm SD) (●—●) represents the inhibition between the Ig fractions of immune sera ; (★—★) represents the inhibition of Ig fractions of infected sera by Ig fractions of normal sera.

6. Rôle de l'IgM dans l'immunité à la réinfection

Afin de vérifier la réelle signification biologique de l'existence de tels anticorps de classe IgM bloquant l'activité effectrice des éosinophiles in vitro, nous avons envisagé l'évaluation des IgM anti-38,000 dans les sérums de sujets bilharziens classifiés comme résistants ou susceptibles à la réinfection selon les critères définis précédemment (147,148). Ces anticorps sont dosés par une technique de capture d'IgM (cf "Matériel et Méthodes") afin d'éviter une compétition avec les IgG anti-38,000. Les résultats présentés dans le tableau 15 montrent que la moyenne du taux d'anticorps IgM dans les sérums du groupe susceptible est significativement plus élevée que celle du groupe résistant, avant traitement et 12 mois après traitement. De plus, il existe une association positive entre le nombre d'oeufs dans le groupe de sujets "susceptibles" et le taux d'anticorps IgM anti-38000 à la même période.

Tableau 15. Relationship between the presence of IgM antibodies against the 38,000 schistosomulum surface antigen and the status of immunity to reinfection.

Blood sample a	after treatment		
	Pretreatment	5 weeks	12 months
Susceptible			
Optical density b	1.5 ± 0.09 c (19)	0.97 ± 0.12 d (21)	1.38 ± 0.11 e (21)
eggs per gram f	206	7	133
Resistant			
Optical density b	1.19 ± 0.1 c (34)	0.72 ± 0.1 d (24)	0.77 ± 0.07 e (32)
eggs per gram f	110	0	8

a Sera were selected from susceptible and resistant individuals using previously defined criteria.

b IgM antibodies were measured by a capture assay (see Materials and Methods). Preliminary studies, in which varying concentrations of the serum (1:100 to 1:12 800) were employed, indicated that a final dilution of 1:6400 would be the highest dilution to which the normal and immune serum showed a significant difference. Results are presented as mean ± S.E.M. (number of sera).

c p < 0.01 between the two groups.

d p > 0.05 between the two groups.

e p < 0.001 between the two groups.

f Egg counts were calculated by examination of duplicate Kato preparations (geometric mean)



D I S C U S S I O N

1. ACTIVATION D'EOSINOPHILES PAR LES ANTICORPS ANAPHYLACTIQUES

Afin d'étudier l'activation de l'éosinophile à la suite de l'interaction in vitro avec différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines, nous avons utilisé comme critère la libération de peroxydase. Le but de ce travail était donc double :

- vérifier l'existence des récepteurs fonctionnels pour les anticorps anaphylactiques l'IgE et l'IgG_{2a} à la surface de l'éosinophile

- comparer les relations entre éosinophiles-anticorps anaphylactiques et les autres sous-classes d'IgG sans activité anaphylactique connue.

Enfin, nous avons voulu, par une étude sur des éosinophiles de rats infestés par S. mansoni et porteurs d'anticorps de surface, vérifier la relevance in vivo de ce mécanisme.

Le présent travail indique que les éosinophiles de rats sains, sensibilisés passivement avec l'IgG_{2a} ou l'IgE de rat, sont capables de libérer des taux élevés de peroxydase après une incubation avec l'anti-IgG_{2a} ou l'anti-IgE respectivement. Ces résultats indiquent clairement que seuls ces deux isotypes à propriétés anaphylactiques (IgG_{2a} et IgE) induisent l'exocytose de l'EPO, tandis que les autres classes ou sous-classes étudiées IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2c} et l'IgM sont ineffectives (et cela malgré la présence de récepteur pour les autres sous-classes d'IgG). Les résultats obtenus apportent un argument direct en faveur d'une interaction entre les anticorps anaphylactiques et l'éosinophile et confirment les observations de Capron et al. (96) relatives à la fonction effectrice des éosinophiles en présence d'anticorps de classe IgG_{2a} ou IgE polyclonaux ou monoclonaux, vis-à-vis de schistosomules de S. mansoni. Dans le même contexte, d'autres travaux ont montré que ces isotypes sont aussi impliqués dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles vis-à-vis d'autres parasites. Taenia taeniaeformis (127) et D. viteae (122), et suggèrent aussi une interaction privilégiée entre les anticorps de classe IgG_{2a} et IgE et la fonction effectrice des éosinophiles.

Il est important de rappeler que cette association privilégiée entre ces anticorps anaphylactiques et les mastocytes ou les basophiles est bien connue. Bien que la présence sur les mastocytes de deux récepteurs distincts pour l'IgE et l'IgG_{2a} soit controversée (170,171), la situation semble être plus claire dans le cas de l'éosinophile. En effet, les expériences d'inhibition croisées ont révélé que l'éosinophile possède deux récepteurs spécifiques, l'un pour l'IgE et le second pour l'IgG_{2a} (2,96).

Outre la démonstration d'une activation des éosinophiles par les anticorps anaphylactiques, il était indispensable d'étudier le rôle des mastocytes dans cette activation pour deux raisons :

1 - la présence de mastocytes nécessaire à l'expression de la fonction effectrice des éosinophiles vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni

2 - l'interaction des mastocytes avec les anticorps de classe anaphylactiques (IgG_{2a} et IgE) capables d'induire la libération des médiateurs pouvant induire de manière indirecte l'activation des éosinophiles.

Dans la mesure où les populations d'éosinophiles sont souvent contaminées par des mastocytes, nous avons vérifié que l'activation de l'éosinophile était bien liée à une action directe des immunoglobulines aux récepteurs Fc de l'éosinophile et non à une réaction via les mastocytes. Pour ce faire, nous avons donc comparé la peroxydase libérée par des populations d'éosinophiles appauvries ou enrichies en mastocytes, à la suite de réactions IgE-anti-IgE, ou IgG_{2a}-anti-IgG_{2a}. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de libération d'EPO ne diminue pas si la population d'éosinophiles est appauvrie en mastocytes. Ces résultats suggèrent donc que la libération d'EPO n'est pas liée à la présence de mastocytes et que la dégranulation est induite par une interaction directe de l'IgE ou l'IgG_{2a} avec les éosinophiles. Par contre, quand l'activation dépendante d'IgE-anti-IgE est considérée, une diminution significative de la libération d'EPO est observée pour des taux élevés de mastocytes. Ces résultats peuvent être expliqués par une déviation de l'IgE à la surface de mastocytes qui ont une affinité beaucoup plus grande pour l'IgE que celle des éosinophiles (172).

Pour étudier le mécanisme précis de l'exocytose de l'EPO et pour vérifier si cette libération peut être induite en présence de complexes immuns (antigène-anticorps), nous avons utilisé un procédé expérimental dans lequel les complexes immuns impliquant un extrait antigénique de S. mansoni et un anticorps monoclonal de rat de classe IgG2a sont fixés sur une surface solide non phagocytable. Cet anticorps monoclonal, dirigé contre un antigène de 38.000 de poids moléculaire, présent à la surface des schistosomules, est capable d'induire la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni. Dans ces conditions d'expériences, le pourcentage de libération d'EPO calculé par rapport au nombre d'éosinophiles ayant adhéré à la surface atteint 36 %. Par contre, l'anticorps ou l'antigène seul n'induit pas cette libération. De même, un anticorps non spécifique de l'antigène est inefficace. Ces résultats révèlent que la libération d'EPO induit après une interaction des anticorps spécifiques avec l'antigène est similaire à celle obtenue avec l'anti-immunoglobuline, et que ce mécanisme est indépendant d'un phénomène de phagocytose. Des résultats similaires ont été obtenus avec des éosinophiles humains (169).

Dans le contexte de la relevance in vivo d'une telle activation cellulaire, nous avons envisagé l'utilisation d'EPO comme un marqueur d'activation des éosinophiles de rats infestés par S. mansoni afin de confirmer la présence des anticorps cytophiles et de vérifier leur fonction. Une étude cinétique a révélé que des taux élevés d'EPO sont libérés après l'addition de l'anti-IgG2a ou de l'anti-IgE. De plus, les éosinophiles de rats infestés libèrent de la peroxydase en présence d'antigène spécifique. Ces résultats suggèrent que les anticorps cytophiles détectés à la surface des éosinophiles de rats infestés participent à l'activation de l'éosinophile. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures faites in vitro et in vivo concernant la capacité des éosinophiles de rats infectés d'exprimer une cytotoxicité directe vis-à-vis de schistosomules et de protéger des rats sains contre une infection challenge (101). Par ailleurs, à certaines périodes

d'infection, les éosinophiles péritonéaux sont incapables de libérer leur EPO intracellulaire. Des études récentes indiquent la participation des anticorps bloquants capables d'inhiber cette activation (103).

Le dosage de l'activité de peroxydase totale obtenue par action d'un détergent comme le triton, à partir des éosinophiles de rats infestés, varie suivant l'infection. Cette variation dans le contenu en peroxydase pourrait s'expliquer par :

1) la libération spontanée de peroxydase in vivo induite soit par des complexes immuns, soit par des produits secrétés par le parasite capable de faire dégranuler les éosinophiles. En effet, il a été démontré que le SRP (Schistosome-Released Products) est capable d'induire la dégranulation des éosinophiles (113).

2) l'état de maturation de l'éosinophile (existence de différentes sous-populations) qui peut varier en fonction des stimuli conditionnant l'hyperéosinophilie.

Néanmoins, il apparaît intéressant de souligner qu'un pourcentage maximum très élevé de peroxydase (65 % de la peroxydase libérable par le TRITON) est obtenu précisément au moment où le contenu en peroxydase de la cellule est le plus faible (49 jours après infection). Ces résultats montrent que la libération d'EPO est indépendante de la quantité d'EPO intracellulaire et permet d'expliquer au moins en partie, la fonction effectrice très élevée des éosinophiles humains dits "hypodenses" (vacuolés et dégranulés) par rapport à des éosinophiles "normodenses" remplis de granules (89).

Nos travaux concernant l'activation de différentes sous-populations d'éosinophiles humains confirment leur hétérogénéité fonctionnelle. Seuls les éosinophiles hypodenses sont capables de libérer de la peroxydase intracellulaire en réponse à une activation par des anti-immunoglobulines (anti-IgE ou antigène spécifique). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus chez le rat et révèlent que la libération d'EPO humaine est aussi indépendante de la quantité totale d'EPO intracellulaire, car le contenu de la peroxydase est beaucoup plus élevé dans le cas des éosinophiles normodenses.

Outre l'intérêt de ces résultats dans la compréhension de la fonction effectrice élevée des éosinophiles humains "hypodenses", la libération de la peroxydase de ces cellules après stimulation par l'anti-IgE confirme l'existence des IgE cytophiles (7) et révèle leur implication dans l'activation cellulaire. Ces résultats, suggèrent donc, que le Fc R₂ (90) présent sur l'eosinophile possède une affinité suffisante pour lier l'IgE in vivo et intervient dans l'activation de l'eosinophile. Par ailleurs, la stimulation des eosinophiles hypodenses par l'anti-IgG n'induit pas une exocytose d'EPO. Le fait que l'EPO est libérée par un processus de sécrétion et non à la suite d'une lyse de l'éosinophile est mis en évidence par une étude cinétique de la libération d'EPO et de la LDH (lactate d'hydrogénase = enzyme cytoplasmique marqueur d'une lyse de la cellule). L'EPO est libérée à partir de 15 minutes après l'addition du stimulus et atteint un maximum à 90 minutes. Par contre, la LDH n'est pas détectée dans les surnageants des éosinophiles activés. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs concernant la libération d'EPO par le calcium ionophore (173) ou par des immuns complexes humains IgE-anti-IgE (169).

L'étude de la spécificité anticorps des IgE cytophiles a été envisagée sur des éosinophiles purifiés à partir des patients filariens où souvent une hyperéosinophilie et une production élevée d'IgE sont associées. De plus, l'utilisation d'antigènes spécifiques purifiés à partir de parasites provenant d'infections humaines était possible dans le laboratoire (163). Les résultats obtenus montrent que seuls les éosinophiles hypodenses, en présence de l'antigène spécifique, sont capables de libérer différentes proportions d'EPO intracellulaire (entre 5 et 20 % du contenu total). L'absence de libération d'EPO par les éosinophiles hypodenses incubés en présence d'antigène non lié à l'infection, même s'ils sont antigéniquement proches de l'antigène spécifique, tels que Loa loa ou D. perstans, révèle la spécificité stricte des IgE cytophiles. Ces observations démontrent, non seulement, l'activation des éosinophiles par l'antigène spécifique grâce aux IgE cytophiles, mais suggèrent la présence des déterminants antigéniques spécifiques d'espèce parasitaire reconnus par les anticorps IgE (174), alors que, les travaux concernant les anticorps IgG soulignent une large réactivité croisée (175). Cette spécificité liée aux IgE cytophiles pourrait s'expliquer par la liaison des IgE, sous une forme moléculaire donnée, probablement agrégée avec l'antigène, ayant une affinité plus importante pour le Fc R₂ (176).

Au cours de nos travaux, il est apparu que les différentes anti-IgE humaines utilisées induisaient toujours un pourcentage d'EPO libérée inférieur à celui obtenu avec l'antigène spécifique. Ces résultats nous ont conduit à vérifier si les IgE étaient les seules immunoglobulines cytophiles impliquées dans l'activation induite par l'antigène. Pour ce faire, nous avons utilisé des expériences de déplacement des immunoglobulines à activité anticorps. Alors que la préincubation des éosinophiles hypodenses avec un excès d'IgG agrégées avant l'addition de l'antigène spécifique n'induit aucune réduction de la peroxydase libérée, la préincubation avec de l'IgE myélomateuse agrégée inhibe significativement la libération d'EPO suggérant ainsi qu'au moins 80 % de la libération est due à l'IgE. Quant aux taux faibles d'EPO libérée par

l'anti-IgE, ils pourraient s'expliquer par une faible avidité des anti-IgE utilisées ou par un problème d'accessibilité au fragment Fc des IgE de surface. Dans le même contexte, l'activation par l'anti-IgE des éosinophiles normodenses n'induit aucune exocytose d'EPO malgré le taux intracellulaire élevé.

Cette hétérogénéité des éosinophiles détectée par le dosage d'EPO est en accord avec les précédents travaux démontrant que les cellules hypodenses sont plus cytotoxiques que les normodenses vis-à-vis de schistosomules de S.mansoni en présence d'anticorps IgE. De plus, de récentes observations ont souligné le rôle du mécanisme oxydatif dépendant de la peroxydase dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles et liée à l'IgE (177).

En rapport avec plusieurs travaux concernant la libération de MBP (major basic protein) et ECP (eosinophil cationic protein) qui sont des molécules toxiques pour des cibles variées, il était tentant de savoir si la libération d'EPO est sélective ou si d'autres molécules sont également libérées. Notre choix s'est porté sur le dosage d'ECP. Dans nos conditions expérimentales, aucune corrélation n'est détectée entre la libération d'EPO et d'ECP : en effet l'addition de l'anti-IgE ou d'antigène n'induit pas la libération d'ECP. Par contre, l'ECP est détectée dans les surnageants des éosinophiles hypodenses activés avec l'anti-IgG, tandis que l'EPO est absente. Ces observations seraient liées soit à l'hétérogénéité de sous-populations d'éosinophiles (hypodense/normodense) en réponse à un stimulus donné et/ou à une variabilité de réponse d'une sous-population donnée d'éosinophiles aux différents stimuli (IgE/IgG). Des résultats préliminaires ont également confirmé que la cinétique de libération d'ECP après stimulus IgG était différente de celle de la libération IgE dépendante d'EPO (M. Capron, communication personnelle).

Les résultats présentés ci-dessus révèlent donc que les IgE cytophiles sont capables d'activer l'éosinophile en présence d'antigène spécifique. Il était donc intéressant d'envisager si les anticorps circulants sont capables de sensibiliser des éosinophiles n'ayant pas d'immunoglobuline de surface. Les résultats d'expérience de sensibilisation passive sont comparables à ceux de l'activation directe. De plus les sérums épuisés en IgE n'induisent plus l'activation des éosinophiles hypodenses après l'addition de l'anti-IgE ou de l'antigène.

L'ensemble de ces travaux permet donc de souligner que les anticorps anaphylactiques n'activent pas seulement les mastocytes et les basophiles mais sont impliqués dans l'activation des éosinophiles aussi bien chez l'homme que chez le rat, confirmant ainsi le rôle majeur joué par les anticorps anaphylactiques et les éosinophiles dans divers mécanismes de défense. En ce qui concerne l'étude de l'activation des éosinophiles humains, nos résultats montrent que les IgE cytophiles sont capables d'activer les éosinophiles par l'antigène spécifique et par conséquent la libération d'EPO. Si le rôle lytique de l'EPO et de protéines cationiques vis-à-vis de parasites, bactéries, ou cellules tumorales (48,49,178,31) a été mis en évidence, permettant aux éosinophiles de participer aux réactions de défense, il est possible que la peroxydase, ECP et la MBP jouent un rôle dans différents processus pathologiques. En effet, de récents travaux ont révélé un rôle lytique de la peroxydase vis-à-vis de cellules pulmonaires (135,179). L'on peut donc envisager un rôle néfaste de cette interaction éosinophiles-anticorps lié à une libération sélective de molécules cytolytiques, selon qu'il y ait ou non augmentation des taux d'IgE.

2. RESTRICTION ISOTYPIQUE DE LA FONCTION EFFECTRICE DES EOSINOPHILES

Les résultats présentés précédemment montrent que les anticorps à propriétés anaphylactiques sont préférentiellement capables d'induire une activation des éosinophiles en présence des anti-immunoglobulines spécifiques ou de l'antigène. Chez le rat, les anticorps IgM, IgG_{2b}, IgG_{2c} et IgG₁ n'induisent pas une libération d'EPO, contrairement à l'IgG_{2a} et l'IgE qui activent la cellule. Dans ce contexte, des travaux réalisés dans la schistosomiase expérimentale, grâce à un anticorps monoclonal de rat de classe IgG_{2c} dépourvu d'activité cytotoxique, ont révélé que cet anticorps est capable d'inhiber l'activité effectrice de l'éosinophile portée par un deuxième anticorps monoclonal d'isotype IgG_{2a}, ceci in vitro et in vivo (98). Par ailleurs, Capron et al ont montré que le récepteur Fc de l'IgG_{2a} sur l'éosinophile, différent de celui de l'IgE (2), pouvait être bloqué à certaines périodes d'infection du rat par S.mansoni. L'ensemble de ces résultats nous ont conduit d'une part à comparer la spécificité des récepteurs pour l'IgG_{2a} et l'IgG_{2c} à la surface de l'éosinophile par l'utilisation de la technique de rosettes. D'autre part, nous avons envisagé l'étude du rôle bloquant de l'IgG_{2c} sur l'activation de l'éosinophile dans un système IgG_{2a}-anti-IgG_{2a}. Enfin, pour vérifier la réalité de ce système in vivo, la présence des anticorps cytophiles d'isotype IgG_{2a} et IgG_{2c} a été explorée dans une étude cinétique sur les éosinophiles de rats infestés par S.mansoni.

Les résultats obtenus montrent que les éosinophiles de rats sains forment des rosettes avec des globules rouges sensibilisés par l'IgG_{2a}, l'IgG_{2c} ou l'IgG₁. De plus, par l'intermédiaire de la technique de rosettes indirecte avec des érythrocytes sensibilisés par des anti-immunoglobulines, nous avons pu confirmer que le récepteur Fc pour les IgG (Fc R) peut fixer l'IgG_{2a} et

l'IgG2c. Les expériences d'inhibition croisée concernant l'étude de la spécificité du Fc R à la surface de l'éosinophile, ont révélé que les rosettes formées par l'IgG1 sont spécifiquement inhibées par l'IgG1 agrégée, par contre les rosettes IgG2a et IgG2c sont non seulement inhibées par l'IgG2a mais aussi par l'IgG2c. Ces résultats, associés aux travaux concernant le récepteur Fc d'IgE (2), suggèrent que les éosinophiles de rats possèdent au moins trois types de récepteurs Fc : l'un spécifique pour l'IgG1, le deuxième pour l'IgE et le troisième pour l'IgG2a et l'IgG2c. Dans le même contexte, il est intéressant de noter que plusieurs travaux sur les macrophages de rat ont montré que le récepteur Fc d'IgG2a est différent de celui de l'IgG1 et l'IgG2b, contrairement au récepteur Fc de l'IgE qui est inhibé par l'IgG1 et l'IgG2b (180). Par ailleurs, les macrophages de rats ne semblent pas former de rosettes IgG2c. L'incapacité de l'IgG2c de se lier aux macrophages pourrait s'expliquer par l'absence d'un récepteur, ou un nombre très faible indétectable par la technique des rosettes et/ou une faible affinité pour le récepteur. Des études similaires sur les macrophages de souris ont indiqué que le récepteur Fc de l'IgG2a est distinct de celui pour l'IgG2b (181).

Afin d'étudier davantage l'activité inhibitrice de l'IgG2c au niveau de l'éosinophile, le rôle bloquant de tels anticorps a été exploré sur l'activation de l'éosinophile dépendante du système IgG2a-anti-IgG2a ou IgE-anti-IgE. Les résultats indiquent que l'IgG2c inhibe significativement la libération de peroxydase induite par l'IgG2a-anti-IgG2a et ceci par préincubation des éosinophiles de rat avec l'IgG2c ou par l'addition simultanée de l'IgG2c et l'IgG2a. Par contre, l'IgG2c ne bloque pas l'activation due à l'IgE-anti-IgE. Ces résultats suggèrent que l'IgG2c, incapable d'induire une activation de l'éosinophile en présence de

l'anti-IgG2c, inhibe spécifiquement le système IgG2a-anti-IgG2a et confirment indirectement la spécificité du récepteur Fc de l'IgE. Ces observations et la démonstration de la capacité toxique de l'EPO pour des larves de S.mansoni (49) pourraient expliquer, au moins partiellement, le rôle inhibiteur de l'IgG2c ou de sa partie Fc dans la fonction effectrice de l'éosinophile.

Les éosinophiles portent donc un récepteur commun pour l'IgG2c et l'IgG2a, mais seul le dernier anticorps est capable d'induire une activation de la cellule. Pour vérifier la relevance in vivo de telles observations et afin d'expliquer l'incapacité de l'éosinophile à exprimer son activité cytotoxique à certaines périodes d'infection (95), nous avons suivi l'occupation des récepteurs de l'IgG2a et de l'IgG2c dans une étude cinétique, sur les éosinophiles de rats infestés par S.mansoni. Au cours de l'infection, il semble d'une part que l'évolution de ces deux récepteurs soit liée et, d'autre part, que le pourcentage de rosettes diminue significativement par comparaison avec les éosinophiles de rats sains. Les expériences utilisant des érythrocytes sensibilisés avec des anti-immunoglobulines ont conduit à l'identification de l'IgG2a cytophile présent sur les éosinophiles de rats infectés depuis 4 semaines. Ces observations suggèrent que, durant la phase précoce d'infection, le récepteur Fc pour IgG2a/IgG2c est occupé par l'IgG2a, expliquant ainsi la diminution du nombre de rosettes-IgG2a et IgG2c et la capacité cytotoxique directe de ces éosinophiles vis-à-vis des schistosomules non-opsonisés (95), leur rôle dans la protection in vivo (101), et la libération d'EPO à cette période induite par l'anti-IgG2a ou l'antigène spécifique (182).

La diminution après 4 semaines d'infection du nombre de rosettes des éosinophiles avec les globules rouges sensibilisés par l'anti-IgG2a pourrait-être due soit à la présence des immuns complexes à IgG2a et

l'antigène soit à l'apparition des IgG2c cytophiles. Les deux hypothèses semblent plausibles, car le pourcentage de rosettes formées avec des érythrocytes sensibilisés par l'anti-IgG2c (environ 20 %) n'explique pas, à lui seul, la diminution des rosettes anti-IgG2a. Il est important de noter que l'apparition de l'IgG2c, détectée par les rosettes anti-IgG2c, peut s'accompagner de formation de complexes immuns à IgG2c, expliquant la présence des facteurs bloquants à la surface de l'éosinophile et dans les sérums de rats infectés (95). L'ensemble des résultats indique que l'IgG2a pourrait être déplacée de son récepteur par l'IgG2c. Cette hypothèse a été vérifiée par les expériences de déplacement de l'IgG2a, soit fixée in vitro sur des éosinophiles de rats sains ou fixée in vivo sur des éosinophiles de rats infestés, par l'IgG2c. Il est d'ailleurs souligné que l'IgG2c passe de 2mg/ml dans le sérum de rats sains à 7mg/ml après 5 semaines d'infection par S. mansoni (183). Ces observations suggèrent que l'IgG2c peut être impliquée dans l'inhibition de la fonction effectrice des éosinophiles de rat au cours de l'infection, et pourrait donc être liée à la diminution de l'immunité de rats à la réinfection observée à cette période.

La démonstration d'un tel mécanisme dans la schistosomiase expérimentale du rat révèle un nouvel aspect de la réponse à médiation humorale, celui de la modulation de la fonction effectrice de l'éosinophile par l'intermédiaire d'un anticorps d'isotype donné. Par ailleurs, il soulève l'hypothèse de l'existence possible des anticorps bloquants capables de moduler la réponse immune en cours de la schistosomiase humaine (184). Dans ce contexte, les différents travaux relatifs aux mécanismes effecteurs, chez l'homme, dirigés contre les schistosomules de S.mansoni ont montré que les éosinophiles humains sont cytotoxiques en présence d'anticorps spécifiques de S.mansoni (102,185). Ces facteurs directement impliqués dans ce mécanisme sont des anticorps de classe IgG et IgE . Cependant, au cours d'une étude épidémiologique sur

l'immunité dans la schistosomiase humaine (147,148), l'étude comparative de taux d'anticorps IgG, IgE et la cytotoxicité dépendante de l'éosinophile mesurée comme estimation directe de la réponse immune, entre deux groupes d'individus considérés comme résistants et susceptibles à la réinfection, ne permettent pas d'expliquer le statut immunitaire de chaque groupe. L'ensemble des observations faites chez le rat et chez l'homme nous ont incité à envisager la présence des anticorps bloquants conduisant à la prévention d'un mécanisme effecteur donné au cours de la schistosomiase humaine.

Les sérums de patients infectés par S.mansoni étudiés par immunofluorescence indirecte sur coupe de schistosomules montrent que l'addition de l'anti-IgM ou l'anti-IgG induisent une intense fluorescence qui traduit la présence d'anticorps de classe IgM et IgG dirigés contre la surface de schistosomules. Les études in vitro de l'activité biologique d'un sérum total chauffé révèlent des taux significatifs de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles humains exprimés contre des schistosomules de S.mansoni. Cette observation confirme les résultats obtenus par Butterworth et al.. Dans les mêmes conditions, si les sérums de patients infectés sont fractionnés sur protéine A et sont testés pour leur capacité cytotoxique en présence d'éosinophiles, les résultats montrent que l'activité est associée à la fraction IgG éluée de protéine A, par contre la fraction non liée à la protéine A (et enrichie en IgM) n'exprime pas d'activité cytotoxique. Des résultats comparables sont obtenus avec les anticorps IgG et IgM fractionnés sur gel de filtration. De plus, la fraction IgG purifiée exprime des taux de cytotoxicité significativement plus élevés que le sérum total. Ces résultats confirment d'une part des travaux qui démontrent l'implication des anticorps d'isotype IgG (85) et, d'autre part, suggèrent que la déplétion des sérums d'un certain facteur inhibiteur non retenu sur la protéine A conduit à une augmentation de la cytotoxicité dépendante d'IgG.

Les résultats que nous venons de discuter montrant que, contrairement aux IgG, les IgM anti-S.mansoni n'ont pas d'activité effectrice tout en reconnaissant la surface de la cible parasitaire, nous avons donc envisagé une activité modulatrice de l'IgM sur l'expression de la cytotoxicité IgG éosinophile-dépendante. La préincubation des schistosomules en présence de l'effluent de protéine A ou la fraction contenant les IgM de sérum de patients infectés inhibe fortement la cytotoxicité induite par le sérum total ou la fraction éluée la protéine A (correspondant aux anticorps de classe IgG). L'absence d'inhibition en présence d'IgM purifiées à partir de sérum normal humain confirme que l'activité bloquante est bien liée aux anticorps anti-parasite et non pas à une inhibition non spécifique due à un encombrement stérique par l'IgM. Par contre, les résultats préliminaires montrent que les IgM de sérums de patients infectés n'inhibent pas la cytotoxicité dépendant d'IgE et d'éosinophile humains. L'explication de ces observations est que les anticorps IgM bloquants et que les anticorps IgG effecteurs reconnaissent le même antigène. Les anticorps IgE quant à eux, sont dirigés contre un autre antigène cible comme dans le cas de la schistosomiase expérimentale du rat (186). Il faut rappeler que la présence des anticorps bloquants de classe IgG capables d'inhiber la libération d'histamines par les basophiles en présence d'IgE a été démontrée au cours de la schistosomiase humaine (187). L'existence des anticorps bloquants (de classe IgM et IgG) a aussi été soulignée dans différentes maladies cancéreuses (188,189). Le présent travail indique que la préincubation des éosinophiles humains en présence des anticorps bloquants (IgM) au lieu des schistosomules, n'inhibe pas la cytotoxicité dépendante d'IgG, suggérant ainsi l'absence d'une réaction croisée entre l'IgG et l'IgM au niveau du récepteur de la cellule.

Cette observation nous a conduit à examiner l'antigène reconnu par les IgG et les IgM. Les antigènes de surface précipités par les IgG et les IgM de sérum de patients infectés se trouvent dans la zone 30-40000 daltons, avec des bandes additionnelles entre 20-25000. Les antigènes reconnus par les IgM peuvent être épuisés par adsorption préalable sur les IgG fixés sur la protéine A.

De plus, les expériences de compétition entre les IgM et les IgG pour l'antigène de 38000 (faisant partie des antigènes 30-40000), (190) révèlent une réactivité croisée directe pour cet antigène. Le complexe d'antigène 30-40000 représente donc un groupe d'antigènes étroitement liés entre eux. La liaison préférentielle de l'IgM avec l'antigène de 32 000 de poids moléculaire en comparaison avec l'IgG suggère une reconnaissance non-identique d'une famille d'épitopes portés sur les antigènes 32 000 et 38000.

Afin d'identifier plus en détail les épitopes reconnus par les IgG et les IgM, nous avons utilisé deux anticorps monoclonaux de rat : L'IgG2a; un anticorps protecteur chez le rat et un anticorps d'isotype IgG2c bloquant la fonction effectrice d'IgG2a. Ces deux anticorps reconnaissent des épitopes de nature glucidique portés par l'antigène de 38000 et possèdent une réactivité croisée pour cet antigène : de plus, l'IgG2c reconnaît des antigènes de poids moléculaire de 32000 et 20000 (103), suggérant soit que les deux anticorps reconnaissent des épitopes étroitement liés au niveau structural, soit qu'ils s'inhibent par un encombrement stérique. La liaison de l'IgG2a et l'IgG2c à l'antigène 38 000 est inhibée par les IgG et les IgM purifiées à partir de sérums de patients infectés.

Ces observations indiquent que les différentes populations d'anticorps de classe IgM et IgG dans les sérums de patients infectés sont dirigés contre des antigènes de surface de schistosomules de S.mansoni. Parmi ces antigènes, on trouve l'antigène 38000.

L'ensemble de ces résultats révèle la présence de deux anticorps anti S.mansoni dans les sérums de patients infectés particulièrement intéressants : le premier, d'isotype IgG, qui est capable d'induire la lyse des schistosomules de S.mansoni en présence d'éosinophiles humains ; le deuxième, d'isotype IgM, qui n'exerce aucun effet cytotoxique mais qui induit une inhibition effective de la cytotoxicité d'éosinophiles dépendante d'anticorps IgG. Pour évaluer l'importance biologique de telles observations réalisées invitro, nous avons voulu savoir si la présence d'anticorps IgM pouvait correspondre à une augmentation de l'intensité à la réinfection par S.mansoni. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de capture pour mesurer, dans les sérums de patients infectés, le taux d'IgM spécifique de l'épitope présent sur l'antigène 38000 par l'utilisation de la sonde IgG2a monoclonal de rat. Les résultats obtenus révèlent que la moyenne de taux d'anticorps IgM dans le groupe d'individus considérés comme susceptibles à la réinfection est significativement plus élevé que celle du groupe d'individu résistant : il existe une association positive entre les taux d'IgM et le nombre d'oeufs dans les selles avant traitement et 12 mois après traitement suggérant que les IgM sont liés à une infection ultérieure. L'association positive entre le taux d'IgM et le nombre d'oeufs à un temps donné suggère que les IgM sont associées à une réponse anti-oeuf et qu'ils fluctuent rapidement dans le temps (147). Ces résultats suggèrent que la production des IgM bloquantes pourrait être induite par un épitope commun au schistosomule et à l'oeuf. En effet, une analyse statistique ultérieure supporte cette hypothèse (191). Cette étude suggère qu'au cours de la schistosomiase humaine le stimulus antigénique majeur est l'oeuf. Les antigènes libérés par l'oeuf , notamment les polysaccharides, suscitent une réponse d'anticorps d'isotype IgM capables de bloquer les anticorps IgG effecteurs.

Nos observations quoique réalisées invitro apportent une première explication à l'existence d'une immunité à la réinfection au cours de la schistosomiase humaine. Elles suggèrent indirectement le rôle majeur joué par les anticorps IgG effecteurs dirigés contre l'antigène de 38 000. Le fait que cet anticorps soit nécessaire mais non un facteur limitant dans l'immunité associé à la mise en évidence d'anticorps bloquants supportent l'hypothèse que l'acquisition de l'immunité pourrait refléter la perte ou l'absence des anticorps bloquants, plutôt qu'une acquisition d'une réponse effectrice. La validité de ces informations est d'une importance considérable dans la définition d'un antigène vaccinal capable d'induire aussi bien une réponse effectrice et bloquante. Quoi qu'il en soit, une deuxième approche permettant d'expliquer l'absence d'immunité pourrait impliquer la régulation par le réseau idiotypique, mécanisme dans lequel les anticorps protecteurs seraient bloqués par des anticorps bloquant le site de fixation de l'anticorps spécifique à l'antigène cible.

C O N C L U S I O N

Le present travail s'est realisé dans le contexte de l'étude des fonctions effectrices de l'éosinophile. En effet l'identification des anticorps nécessaires à l'induction de l'éosinophile en cellule effectrice a permis de souligner le rôle majeur joué par les anticorps anaphylactiques et leur recepteurs membranaires indispensables à l'expression de cette fonction. L'objet de notre étude a concerné plus particulièrement les interactions entre l'éosinophile et les différentes isotypes d'immunoglobulines. Afin d'analyser cette interaction et d'expliquer le rôle effecteur de l'éosinophile en présence d'anticorps anaphylactiques, nous avons mis au point une technique de libération d'une protéine granulaire, la peroxydase de l'éosinophile (EPO) en réponse à différents stimuli immunologiques. Nos resultats ont tout d'abord été acquis grâce à des systèmes expérimentaux. Chez le rat, il a été possible de montrer que la peroxydase est libérée après l'activation des éosinophiles de rats normaux par l'IgG2a et l'IgE, suivie de l'addition des anti-immunoglobulines spécifiques. Les autres isotypes d'immunoglobulines (IgG1, IgG2b, IgG2c, IgM) sont incapables d'induire la libération d'EPO. Même en se basant sur la libération d'un seul médiateur, l'EPO, ces résultats confirment l'interaction privilégiée des éosinophiles avec les anticorps de classe anaphylactique. L'éosinophile est capable, en présence d'anticorps (IgE, IgG2a) de libérer de l'EPO doué de propriétés toxiques pour différentes cibles parasitaires ou cellulaires. Cette libération est un phénomène d'exocytose indépendant d'une phagocytose des complexes immuns. En effet, les éosinophiles activés par des complexes immuns fixés sur une surface non phagocytable libèrent de l'EPO. La relevance biologique in vivo de ces résultats a été confortée par les travaux effectués au cours de l'infection expérimentale du rat par S. mansoni. L'étude cinétique des éosinophiles purifiés à partir des rats infestés montre que des anticorps cytophiles de classe IgG2a et IgE fixés in vivo sur les cellules sont capables d'activer l'éosinophile soit en

présence des anti-Ig respectives, soit en présence d'antigène spécifique. Ces résultats confirment donc la spécificité anticorps de ces Ig cytophiles et permettent d'expliquer la capacité des éosinophiles de rat infectés d'exprimer une cytotoxicité directe vis-à-vis de schistosomules (cible de la réponse immune) ainsi que de protéger des rats sains contre une infection challenge .

Se basant sur ces résultats expérimentaux, nous avons utilisé ce même marqueur (EPO) pour mesurer l'activation des éosinophiles humains. Une sous-population d'éosinophiles humains est caractérisée par leur faible densité et la présence d'IgE de surface, notamment chez les sujets atteints d'infection parasitaire. Ces éosinophiles humains purifiés libèrent de l'EPO après addition d'anti-IgE et non d'anti-IgG. L'addition d'antigène spécifique induit également une dégranulation objectivée par la libération d'EPO, confirmant la spécificité anticorps des IgE cytophiles. Outre ces IgE de surface, des IgE circulantes ayant la même capacité d'activation sont détectées dans les sérums de patients filariens. Seuls les éosinophiles hypodenses sont activables confirmant ainsi l'hétérogénéité des éosinophiles humains.

L'étude comparative de la libération d'autres granules lytiques dosés par des techniques radioimmunologiques montre que l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) n'est libérée qu'après addition d'IgE. Ces résultats révèlent d'une part que les éosinophiles peuvent présenter au moins au cours de certaines pathologies des IgG cytophiles dont nous étudions actuellement s'il s'agit plus préférentiellement d'un isotype donné ; d'autre part, il est intéressant de souligner que deux molécules, l'EPO et l'ECP, sont présentes au moins à l'état normal dans le même compartiment du granule. Nos résultats permettent de penser qu'il peut exister des modifications dans le contenu des granules dans le cas des éosinophiles activés (ce qui est d'ailleurs suggéré par les observations morphologiques d'inversion de densité). On

pourrait donc observer une libération sélective de certains médiateurs variant en fonction du stimulus d'activation, ou de la cinétique d'activation, ou encore variant selon les différentes sous-populations cellulaires, ces trois hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives.

Nos résultats confirment le rôle majeur joué par l'interaction éosinophile-anticorps dans l'immunité anti-parasitaire. Mais, le spectre d'action non spécifique de ces molécules lytiques vis-à-vis de différentes cibles (telles que les cellules de mammifères) suggère que la présence de l'éosinophile au cours de situations pathologiques ne peut plus être considéré comme uniquement bénéfique. Le problème très intéressant qui n'est pas encore résolu est de savoir si ce sont les mêmes éosinophiles qui de bénéfiques peuvent devenir néfastes et si oui, dans quelles conditions.

En ce qui concerne l'étude de l'interaction entre l'éosinophile et d'autres immunoglobulines qui n'induisent pas une activation de l'éosinophile, nos résultats ont été également obtenus grâce à des systèmes expérimentaux. En effet, à certaines périodes d'infection, les éosinophiles purifiés étant incapables de libérer de l'EPO, nous avons envisagé l'hypothèse d'un mécanisme de blocage aboutissant à l'inhibition de la libération d'EPO. Cette hypothèse était étayée par 2 arguments expérimentaux : l'existence d'un anticorps monoclonal anti-S. mansoni (de classe IgG2c) capable d'inhiber spécifiquement l'activité effectrice dépendant d'éosinophiles et d'anticorps IgG2a à la fois in vitro et in vivo, ainsi que l'absence d'immunité à la réinfection à certaines périodes d'infection. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à l'étude comparative de l'affinité du Fc R récepteur de l'éosinophile de rat pour l'IgG2a et l'IgG2c. Les résultats obtenus démontrent que l'activation des éosinophiles peut être modulée par deux immunoglobulines d'isotypes différents (IgG2a, IgG2c) : l'IgG2c se fixe au même récepteur que

l'IgG2a et est capable d'inhiber spécifiquement la fixation d'IgG2a, et donc, l'activation des éosinophiles. Ces observations suggèrent que certains isotypes puissent être impliqués dans la modulation de la fonction effectrice des éosinophiles.

La démonstration d'un tel mécanisme dans la schistosomiase expérimentale du rat a soulevé l'hypothèse de l'existence des anticorps bloquants dans la schistosomiase humaine. Les résultats obtenus montrent qu'il existe, dans les sérums de patients infectés par S. mansoni, des anticorps de classe IgM capables d'inhiber la cytotoxicité dépendante d'anticorps IgG et d'éosinophiles. Dans un second temps, nous avons pu montrer que ces anticorps étaient présents à des taux significativement plus élevés chez les patients susceptibles que les patients résistants à la réinfection. Ces observations constituent la première mise en évidence de l'existence de certains facteurs responsables de l'absence de l'immunité vis-à-vis de S. mansoni chez l'homme et elles suggèrent indirectement le rôle majeur joué par l'éosinophile en présence d'anticorps effecteurs.

En conclusion, nos travaux ont permis la dissection fine de différentes modalités d'interaction entre éosinophiles et immunoglobulines, et ont confirmé leur rôle majeur dans la fonction effectrice de l'éosinophile. En liaison avec des récents résultats concernant le pouvoir protecteur de glycoprotéine ou de protéines de S. mansoni, il est extrêmement intéressant de souligner l'association très étroite entre mécanismes effecteurs dépendants d'éosinophiles in vitro et l'immunité in vivo, tout au moins dans la schistosomiase. S'il est capital de confirmer ces travaux dans d'autres situations, il est aussi à retenir que l'étude des mécanismes effecteurs dépendant d'éosinophiles puisse représenter une sonde très intéressante en cas de prophylaxie anti-parasitaire.

B I B L I O G R A P H I E

1. Anwar, A.R.E. & A.B. Kay. Membrane receptors for IgG and complement (C4, C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia. *J. Immunol.* 1977 119 : 976.
2. Capron, M., Capron, A., Dessaint, J.P., Torpier, G., Johansson, S.G.O. & L. Prin. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 1981 126 : 2087.
3. Walsh, G.M. & A.B. Kay. Binding of immunoglobulin classes and subclasses to human neutrophils and eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 1986 63 : 466.
4. Tai, P.C. and J.F. Spry. Enzymes altering the binding capacity of human blood eosinophils for IgG antibody-coated erythrocytes (EA). *Clin. Exp. Immunol.* 1980 40 : 206.
5. Tai, P.C. & J.F. Spry. Studies on blood eosinophils. I. Patients with a transient eosinophilia. *Clin. Exp. Immunol.* 1976 24 : 415.
6. Khalife, J., Capron, M., Grzych, J.M., Bazin, H. & A. Capron. Fc gamma receptors on rat eosinophils : Isotype cell activation. *J. Immunol.* 1985 135 : 2780.
7. Capron, M., Kusnierz, J.P., Prin, L., Spiegelberg, H.L., Ovlaque, G., Gosset, P., Tonnel, A.B. & A. Capron. Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils : Detection by flow microfluorometry and relation to serum IgE. *J. Immunol.* 1985 134 : 3013.
8. Capron, M., Jouault, T., Prin, L., Joseph, M., Ameisen, J.C., Butterworth, A.E., Papin, J.P., Kusnierz, J.P. & A. Capron. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc R2). *J. Exp. Med.* 1986 164 : 72.

9. De Simone, C., Donelli, G., Meli, D., Monilari, A., Rosati, F. & F. Sorice. Human peripheral eosinophils with receptors for IgM : demonstration and ultrastructural morphology. *Immunobiology* 1982 162 : 116.
10. Anwar, A.R.E. & A.B. Kay. Enhancement of human eosinophil complement receptors by pharmacologic mediators. *J. Immunol.* 1978 121 : 1245.
11. Fischer, E., Capron, M., Prin, L., Kusnierz, J.P. & M. Kazatchkine. Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell. Immunol.* 1986 97 : 297.
12. Capron, M., Kazatchkine, M., Fischer, E., Butterworth, A.E., Jouault, T., Kusnierz, J.P. & A. Capron. Role of membrane receptors in eosinophil effector function. 6th International Congress of Immunology. Toronto, Canada (6 - 11 July 1986).
13. Gleich, G., Loegering, D.A. & J. Maldonado. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* 1973 137 : 1459.
14. Gleich, G., Loegering, D.A., Kaepfers, F., Bajaj, P.S. & Mann K.G. Physicochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* 1974 140 : 313.
15. Ackerman, S.J., Kephart, G.M., Habermann, T.M., Greipp, P.R. & G.J. Gleich. Localization of eosinophil granule major basic protein in human basophils. *J. Exp. Med.* 1983 158 : 946.
16. Butterworth, A.E., Wassom D.L., Gleich, G.J., Loegering, D.A. & J.R. David. Damage to schistosomula of Schistosoma mansoni induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 1979 122 : 221.
17. Duffus, W.P.H., Thorne, K., R. Oliver. Killing of juvenile Fasciola hepatica by purified bovine eosinophil proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 1980 40 : 336.

18. Wassom, D.L. & G.J. Gleich. Damage to Trichinella spiralis newborn larvae by eosinophil major basic protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1979 28 : 860.
19. Kierszenbaum, F., Ackerman, S.J. & G.J. Gleich. Destruction of blood stream forms of Trypanosoma cruzi by eosinophil granule major basic protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1981 30: 775.
20. Gleich, G., Frigas, E., Loegering, D.A., Wassom, D.L. & Steinmuller, D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. J. Immunol. 1979 123 : 2925.
21. Frigas, E., Loegering, D.A. & Gleich, G. Cytotoxic effect of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. Lab. Invest. 1980 42 : 35.
22. O'Donnel, M.C., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. & L.L. Thomas. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. J. Exp. Med. 1983 157 : 1981.
23. Frigas, E., Dor. P.J. & G.J. Gleich. The usefulness of spectrum radioimmunoassay for the eosinophil major basic protein in the diagnosis of asthma. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Rome, 1983, Folia Allergologica et Immunologica Clinica, XXX, supplt 4.
24. Maddox, D.E., Butterfield, J.H., Ackerman, S.J., Goulam, G.B. & G.J. Gleich. Elevated serum levels in human pregnancy of a molecule immunochemically similar to eosinophil granule major basic protein. J. Exp. Med. 1983 158 : 1211.
25. Maddox, D.E., Kephart G.M., Goulam, C.B., Butterfield, J.H., Benirschke, K. & G.J. Gleich. Localization of a molecule immunochemically similar to eosinophil major basic protein in human placenta. J. Exp. Med. 1984 160 : 29.

26. Ackerman, S.J., Loegering, D.A., Venge, P., Olsson, I., Harley, J.B., Fauci, A.S. and G.J. Gleich. Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule : major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil derived neurotoxin. *J. Immunol.* 1983 131 : 2977.
27. Olsson, I. & P. Venge. Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells. *Blood* 1974 44 : 235.
28. Gleich, G.J., Loegering, D.A., Bell, M.P., Checkel, J.L., Ackerman, S.J. & D.J. McKean. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein : Homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986 83 : 3149.
29. Tai, P.C., Spry, C.J.F., Peterson, C., Venge, P. & I. Olsson. Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 1984 309 : 182.
30. Kierszenbaum, F., Villalta, F. & P.C. Tai. Role of inflammatory cells in Chagas'disease. III. Kinetics of human eosinophil activation upon interaction with parasites Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 1986 136 : 662.
31. McLaren, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venge, P. & A.B. Kay. Morphological studies on the killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro. *Parasite Immunol.* 1981 3 : 359.
32. Ackerman, S.J., Gleich, G.J., Loegering, D.A., Richardson, B.A. & A.E. Butterworth. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of Schistosoma mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985 34 : 735.
33. Fredens, K., Dahl, R. & P. Venge. The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1982 70 : 361.

34. Dahl, R., Venge, P. & I. Olsson. Variation of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma : studies during inhalation challenge test. *Allergy* 1978 33 : 211.
35. Gordon, M.H: Remarks on Hodgkin's disease. A pathogenic agent in the glands, and its application in diagnosis. *Br. Med. J.* 1933 1 : 641.
36. Durack, D.T., Sumi, S.M., S.J. Klebanoff. Neurotoxicity of human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 76 : 1443.
37. Peterson, C.G.B. & P. Venge. Purification and characterization of a new cationic protein-eosinophil protein-X (EPX) from granules of human eosinophils. *Immunology* 1983 50 : 19.
38. Ackerman, S.J., Gleich, G.J., Loegering, D.A., Richardson, B.A. & A.E. Butterworth. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of Schistosoma mansoni. *Am.J. trop. Med. Hyg.* 1985 34 : 735.
39. McLaren, D.J., Peterson, C.G.B. & P. Venge. Schistosoma mansoni : Further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins in vitro. *Parasitology* 1984 88 : 491.
40. Bainton, D.F. & M.G. Farquhar. Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. *J. Cell. Biol.* 1970 45 : 54.
41. Enomoto, T. & T. Kitani. Electron microscopic studies on peroxidase and acid phosphatase reaction in human leukocytes in normal and leukemic cells and on phagocytosis. *Acta Haemat. Jap.* 1966 29 : 554.
42. O'Brien, R., Cardenosa, G., Sambucetti, L. & P. Podolak. Spectral characteristics of hman leukocytes and their relevance to automated cell identification. III. Eosinophils, neutrophils and lymphocytes. *Acta Cytologica* 1979 23 : 231.
43. Presentey, B., Jerushalmy, Z., Ben-Bassat, M. & K. Perk. Genesis, ultrastructure and cytochemical study of the cat eosinophil. *Anat. Rec.* 1980 196 : 119.

44. Lehrer, R.I. & M.J. Cline. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis : the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J. Clin. Invest.* 1969 48 : 1487.
45. Olsen, R.L. & G. Little. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. *Biochem J.* 1983 209 : 781.
46. Carllson, M.G.C.H., Peterson, C.G.B. & P. Venge. Human eosinophil peroxidase : purification and characterization. *J. Immunol.* 1985 134 : 1875.
47. Bolscher, B.G.J.M., Plat, H. & R. Wever. Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochem. Biophys. Acta* 1984 784 : 177.
48. Jong, E.C., Henderson, W.R. & S.J. Klebanoff. Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J. Immunol.* 1980 124 : 1378.
49. Jong, E.C., Mahmoud, A.A.F. & S.J. Klebanoff. Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 1981 126 : 468.
50. Locksley, R.M., Wilson, C.B. & S.J. Klebanoff. Role of endogenous and acquired peroxidase in the toxoplasmacidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 1982 69 : 1099.
51. Nogueira, N.M., Klebanoff, S.J. & Z.A. Cohn. *Trypanosoma cruzi* : sensitization to macrophage killing tby eosinophil peroxidase. *J. Immunol.* 1982 128 : 1705.
52. Jong, E.C. & S.J. Klebanoff. Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity : Role of the peroxidase system. *J. Immunol.* 1980 124 : 1949.
53. Henderson, W.R., Chi, E.Y. & S.J. Klebanoff. Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J. Exp. Med.* 1980 152 : 265.

54. Henderson, W.R., Jong, E.C. & S.J. Klebanoff. Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. J. Immunol. 1980 124 : 1383.
55. Nathan, C.F. & S.J. Klebanoff. Augmentation of spontaneous macrophage-mediated cytotoxicity by eosinophil peroxidase. J. Exp. Med. 1982 155 : 1291.
56. Henderson, W.R., Jorg, A. & S.J. Klebanoff. Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B₄, C₄ and D₄. J. Immunol. 1982 128 : 2609.
57. Archer, G.T. & J.G. Hirsch. Isolation of granules from eosinophil leucocytes and study of their enzyme content. J. Exp. Med. 1963 118 : 277.
58. Kater, L.A., Goetzl, E.J. & K.F. Austen. Isolation of human eosinophil phospholipase D. J. Clin. Invest. 1976 57 : 1173.
59. Zeigler, R.S., Yurdin, D.L. & H.R. Colten. Histamine metabolism. II. Cellular and subcellular localization of the catabolic enzymes, histaminase and histamine methyl transferase, in human leukocytes. J. Allergy Clin. Immunol. 1976 58 : 172.
60. Wasserman, S.I., Goetzl, E.J. & K.F. Austen. Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulfatase. J. Immunol. 1975 114: 645.
61. Weller, P.F. & K.F. Austen Human eosinophil arylsulfatase B. Structure and activity of the purified tetrameric lysosomal hydrolase. J. Clin. Invest. 1983 71 : 114.
62. Charcot, J.M. & C. Robin. Observation de leucocythémie. C.R. Mem. Soc. Biol. 1853 5 : 44.
63. Leyden, E. Zur kenntniss des bronchial-asthma. Arch. Pathol. 1872 54 : 324.

64. Beaver, P.C. Biological and physiopathological ideas on eosinophilia. Observations of the nature of Charcot-Leyden crystals. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1962 55 : 471.
65. Weller, P.F., Wasserman, S.I. & K.F. Austen. Selected enzymes preferentially present in the eosinophil. In The Eosinophil in Health and Disease, A.A.F. Mahmoud & K.F. Austen (Eds), Grune & Stratton, N.Y., 1981:p.115 .
66. Gleich, G.J., Loegering, D.A., Mann, K.G. & J.E. Maldonado. Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. J. Clin. Invest. 1976 57 : 633.
67. Weller, P.F., Goetzl, E.J. & K.F. Austen. Identification of human eosinophil lysophospholipase as the constituent of Charcot-Leyden crystals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980 77 : 7440.
68. Weil, G.J., Leiserson, W.M. & T.M. Chused. Isolation of human basophils by flow microfluorometry. J. Immunol. Meth. 1983 58 : 359.
69. Leiferman, K.M., Gleich, G.J., Kephart, G.M., Hangen, H.S., Hisamatsu, K., Prous, D., Lichtenstein, L.M. & S.J. Ackerman. Differences between basophils and mast cells : Failure to detect Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) and eosinophil granule major basic protein in human mast cells. J. Immunol. 1986 136 : 852.
70. Ackerman, S.J., Loegering, D.A. & G.J. Gleich. The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein : biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay. J. Immunol. 1980 125 : 2118.
71. Jörg, A., Henderson, W.R., Murphy, R.C. & S.J. Klebanoff. Leukotriene generation by eosinophils. J. Exp. Med. 1982 155 : 390.
72. Sinois, P. & P. Borgeat. From slow reacting substance of anaphyaxis (SRS-A) to leukotriene D4 (LTD4). Int. J. Immunopharmacol. 1980 2 : 281.
73. Shaw, R.J., Cromwell, O. & A.B. Kay. Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils. Clin. Exp. Immunol. 1984 56 : 716.

74. Borgeat, P., Fruteau de laclos, B., Rainovitch. H., Picard. S., Braquet, P., Hebert, J., Laviolette, M. Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations characteristically release leukotriene C₄ on ionophore A23187 challenge . J.Allergy.Clin.Immunol. 1984 74: 310.
76. Sirois, P., Roy, S., Tétrault, J.P., Borgeat, P., Picard, S. & E.J. Corey. Pharmacological activity of leukotrienes A₄, B₄, and D₄ on selected guinea pig, rat, rabbit and human smooth muscles; Prostaglandins Med. 1981 74 : 327.
77. Samuelson, B. Leukotrienes : Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science 1983 220 : 568.
78. Hubscher, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. - E.D.I. an eosinophil-derived inhibitor of histamine release. J. Immunol. 1975 114 : 1379.
79. Hubscher, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. II. Release of prostaglandins from human eosinophilic leukocytes. J. Immunol. 1975 114 : 1389.
80. Lee, T.C., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L. & S.I. Wasserman. Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. J. Biol. Chem. 1984 259 : 5526.
81. Jouvin-Marche, E., Grzych, J.M., Boullet, C., Capron, M. & J. Benveniste. Formation of PAF-acether by human eosinophils. Fed. Proc.(abst) 1985 43 : 1924.
82. Litt, M. Studies in experimental eosinophilia. VI. Uptake of immune complexes by eosinophils. J. Cell. Biol. 1964 23 : 355.
83. Grover, w.H., Winkler, H.H. & D.E. Normansell. Phagocytic properties of isolated human eosinophils. J. Immunol. 1978 121 : 718.
84. Butterworth, A.E. Cell-mediated damage to helminths. Adv. Parasitol. 1984 23 : 143.

85. Butterworth, A.E., Remold, H.G., Houba, V., David, J.R., Franks, D., David, P.H. & R.F. Sturrock. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of Schistosoma mansoni : mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. J. Immunol. 1977 118 : 2230.
86. Vadas, M.A., Butterworth, A.E., Sherry, B., Desein, A., Hogan, M., Bout, D. & J.R. David. Interactions between human eosinophils and schistosomula of Schistosoma mansoni. I. Stable and reversible antibody-dependent adherence of eosinophils to schistosomula. J. Immunol. 1980 124 : 1441.
87. Butterworth, A.E., Vadas, M.A., Wassom, D.L., Desein, A., Hogan, M., Sherry, B., Gleich, G.J. & J.R. David. Interactions between human eosinophils and schistosomules of Schistosoma mansoni. II. The mechanisms of irreversible eosinophil adherence. J. Exp. Med. 1979 150 : 1456.
88. Glauert, A.M., Butterworth, A.E., Sturrock, R.F. & V. Houba. The mechanism of antibody-dependent, eosinophil-mediated damage to schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro : a study by phase-contrast and electron microscopy. J. Cell. Sci. 1978 34 : 173.
89. Capron, M., Spiegelberg, H.L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A.E., Pierce, R.J., Ouaiissi, M.A. & A. Capron. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. Immunol. 1984 132 : 462.
90. Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J.C. and A.B. Tonnel. From parasites to allergy : the second receptor for IgE (Fc R₂). Immunol. Today 1986 7 (I) : 15.
91. Prin, L., Capron, M., Tonnel, A.B., Blettry, O. & A. Capron. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils : variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 1983 72 : 336.

92. Prin, L., Capron, M., Gosset, P., Wallaert, B., Kusnierz, J.P., Bletry, O., Tonnel, A.B. & A. Capron. Eosinophilic lung disease : immunological studies of blood and alveolar eosinophils. Clin. Exp. Immunol. 1986 63 : 249.
93. Shaw, R.J., Walsh, G.M., Cromwell, O., Moqbel, R., Spry, C.J.F. & A.B. Kay. Activation human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. Nature 1985 316 : 150.
94. Capron, M., Capron, A., Torpier, G., Bazin, H., Bout, D. & M. Joseph. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. Eur; J. Immunol. 1978 8 : 127.
95. Capron, M., Torpier, G. & A. Capron. In vitro killing of S. mansoni schistosomula by eosinophils from infected rats : role of cytophilic antibodies. J. Immunol. 1979 123 : 2220.
96. Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. & A. Capron. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils; J. Immunol. 1981 126 : 1764.
97. Ramalho-Pinto, F.J., De Rossi, R. & S.R. Smithers. Murine schistosomiasis mansoni : antischistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. Parasite Immunol. 1979 1 : 295.
98. Grzych, J.M., Capron, M., Bazin, H. & A. Capron. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. J. Immunol. 1982 129: 2739.
99. Capron, M., Capron, A., Joseph, M. & C. Verwaerde. IgE receptors on phagocytic cells and immune response to schistosome infection. Monographs in Allergy 1983 18 : 33.
100. Capron, M. & A. Capron. Rats, mice and men : Models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. Parasit. Today 1986 2 : 69.
101. Capron, M., Nogueira-Queiroz, J.A., Papin, J.P. & A. Capron. Interactions between eosinophils and antibodies : in vivo protective role against rat schistosomiasis. Cell. Immunol. 1984 83 60.

102. Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M. & G. Torpier. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 1982 61 : 41.
103. Grzych, J.M., Capron, M., Dissous, C. & A. Capron. Blocking activity of a monoclonal antibody on effector mechanisms in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 1984 133 (2) : 998.
104. Capron, M., Capron, A., Goetzl, E.J. & K.F. Austen. Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. *Nature* 1981 289 : 71.
105. Anwar, A.R.E., McKean, J.R., Smithers, S.R. & A.B. Kay. Human eosinophil- and neutrophil-mediated killing of schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro. I. Enhancement of complement-dependent damage by mast cell-derived mediators and formyl-methionyl peptides. *J. Immunol.* 1980 124 : 1122.
106. Dessein, A.J., Vadas, M.A., Nicola, N.A., Metcalf, D. & J.R. David. Enhancement of human blood eosinophil cytotoxicity by semi-purified eosinophil colony-stimulating factor(s). *J. Exp. Med.* 1982 156 : 90.
107. Vadas, M.A., Nicola, N.A. & D. Metcalf. Activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony-stimulating factors. *J. Immunol.* 1983 130 : 795.
108. Veith, M.C. & A.E. Butterworth. Enhancement of human eosinophil-mediated killing of Schistosoma mansoni larvae by mononuclear cell products in vitro. *J. Exp. Med.* 1983 157 : 1828.
109. Dessein, A.J., Lenzi, H.L. & J.R. David. Modulation of the cytotoxicity of human blood eosinophils by factors secreted by monocytes and T lymphocytes. *Monogr Allergy* 1983 18 : 45.
110. Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. & D.V. Goeddel. Human tumour necrosis factor : precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984 312 : 724.

111. Mannel, D.N., Meltzer, M.S., S.E. Mergenhausen. Generation and characterization of a lipopolysaccharide-induced and serum-derived cytotoxic factor for tumor cells. *Infect. Immun.* 1980 28 : 204.
112. Silberstein, D.S. & J.R. David. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to Schistosoma mansoni larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986 83 : 1055.
113. Auriault, C., Capron, M. & A. Capron. Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by S. mansoni schistosomula. *Cell. Immunol.* 1982 66 : 59.
114. Auriault, C., Capron, M., Cesari, I.M. & A. Capron. Enhancement of eosinophil effector function by soluble factors released by S. mansoni : role of proteases. *J. Immunol.* 1983 131 : 464.
115. Mazingue, C., Camus, D., Dessaint, J.P., Capron, M. & A. Capron. In vitro and in vivo inhibition of mast cell degranulation by a factor from Schistosoma mansoni. *Int. Archs. All. appl. Immunol.* 1980 ___ : 178.
116. Capron, M., Rousseaux, J., Mazingue, C., Bazin, H. & A. Capron. Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to S. mansoni schistosomula. *J. Immunol.* 1978 121 : 2518.
117. Torpier, G., Capron, A. & M.A. Ouaiissi. Receptor for IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on S. mansoni schistosomula. *Nature* 1979 278 : 447.
118. Auriault, C., Ouaiissi, M.A., Torpier, G., Eisen, H. & A. Capron. Proteolytic cleavage of IgG bound to Fc receptor of S. mansoni schistosomula. *Parasit. Immunol.* 1981 3 : 33.
119. Smithers, S.R. & R.J. Terry. Immunity in schistosomiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1969 160 : 826.
120. Greene, B.M., Taylor, H.R. & M. Aikawa. Cellular killing of microfilariae of Onchocerca volvulus : eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J. Immunol.* 1981 127 : 1611.

121. Aiyar, S., Zaman, V. & C.S. Ha. Mechanism of destruction of Brugia malayi microfilariae in vitro : the role of antibody and leucocytes. Acta Tropica 1982 39 : 225.
122. Haque, A., Ouaisi, M.A., Joseph, M., Capron, M. & A. Capron. IgE antibody in eosinophil and macrophage-mediated in vitro killing of Dipetalonema viteae microfilariae. J. Immunol. 1981 127 : 716.
123. Higashi, G.I. & A.B. Chowdhury. In vitro adhesion of eosinophils to infective larvae of Wuchereria bancrofti. Immunology 1970 19 : 65.
124. Kazura, J.A. & D.I. Grove. Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of Trichinella spiralis. Nature 1978 274 : 588.
125. Mackenzie, C.D., Preston, P.M. & B.M. Ogilvie. Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. Nature 1978 276: 826.
126. Grove, D.I., Mahmoud, A.A.F. & K.S. Warren. Eosinophils and resistance to Trichinella spiralis. J. Exp. Med. 1977 145 : 755.
127. Ansari, A., Williams, J.F. & A.J. Musoke. Antibody-mediated secondary eosinophilic response to Taenia taeniaeformis in the rat. J. Parasit. 1976 62 : 737.
128. Leid, K.W. & J.F. Williams. The immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. II. Characterization of reaginic antibody and an allergen associated with the larval stage. Immunology 1974 27 : 209.
129. Doy, T.G., Hughes, D.L. & E. Harness. The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted F. hepatica in vitro. Res. Vet. Sci. 1980 29 : 98.
130. Davies, C. & J. Goose. Killing of newly excysted juveniles of Fasciola hepatica in sensitized rats. Parasite Immunol. 1981 3 : 81.
131. Burden, D.J., Bland, A.P., Hammet, N.C. & D.L. Hughes. F. hepatica : migration of newly excysted juveniles in resistant rats. Exp. Parasitol. 1983 56 : 277.

132. Sanderson, C.J., Lopez, A.F. & M.N. Bunmoreno. Eosinophils and not lymphoid K cells kill Trypanosoma cruzi epimastigotes. Nature 1977 268 : 340.
133. Ottesen, E.A., Neva, F.A., Penanjape, R.S., Tripathy, S.P., Thiruvengadam, K.V. & V.A. Beaven. Specific allergic sensitization to filarial antigens in tropical eosinophilia syndrome. Lancet 1979 i : 1158.
134. Guerra-Caceres, J.G., Bryceson, A.D., Quakyi, I. & C.J.F. Spry. Studies on the mechanism of adverse reactions produced by diethyl-carbamazine in patients with onchocerciasis. The Mazzoti Reaction. Parasite Immunol. 1980 2 121.
135. Davis, W.B., Fells, G.A., Sun, X.H., Gadek, J.E., Venet, A. & R.G. Crystal. Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophils in chronic inflammatory disorders of the lower respiratory tract. J. Clin. Invest. 1984 74 : 269.
136. Frigas, E., Loegering, D.A., G.J. Gleich. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. Lab. Invest. 1980 42 : 35.
137. Dahl, R., Venge, P. & I. Olsson. Variations of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma : studies during inhalation challenge test. Allergy 1978 33 : 211.
138. Filley, W.V., Holley, K.E., Kephart, G.M. & G.J. Gleich. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. Lancet 1982 2 : 11.
139. Fauci, A.S., Harley, J.B., Roberts, W.C., Fererans, V.J., Gralnick, H.R., B.H. Bjornson. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical, pathophysiologic and therapeutic considerations. Ann. Intern. Med. 1982 97 : 78.

140. Spry, C.J.F., Davies, J., Tai, P.C., Olsen, E.G.J., Oakley, C.M. & J.F. Goodwin. Clinical features of fifteen patients with the hypereosinophilic syndrome. *Quart. J. Med.* 1983 LII : 1.
141. Olson E.G.J. & C.J.F. Spry. Relation between eosinophilia and endomyocardial disease. *Prog. Cardiovas. Dis.* 1985 XXVII : 241.
142. Tai, P.C., Hayes, D.J., Clark J. & C.J.F. Spry. Toxic effects of human eosinophil secretion products on isolated rat heart cells in vitro. *Biochem. J.* 1982 204 : 75.
143. Spry, C.J.F. & P.C. Tai. Studies on blood eosinophils. II. Patients with Loeffler's cardiomyopathy. *Clin. Exp. Immunol.* 1976 24 : 423.
144. Capron, A. & J.P. Dessaint. Effector and regulatory mechanism in immunity to schistosomiasis. *Ann. Rev. Immunol.* 1985 3 455.
145. Von Lichtenberg, F., Sher, A., Gibbons, N. & B.L. Doughty. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to S. mansoni. *Am. J. Path.* 1976 84 : 479.
146. Mahmoud, A.A.F., Warren, K.S. & R.C. Graham. A role for the eosinophil in acquired resistance to S. mansoni infection as determined by anti-eosinophil serum. *J. Exp. Med.* 1975 142 : 805.
147. Butterworth, A.E., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Mugambi, M., Ouma, J.H., Richardson, B.A., arap Siongok, T.K. & R.F. Sturrock. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment observations and the results of treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984 78: 108.
148. Butterworth, A.E., Capron, M., Cordingley, J.S., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Kariuki, H.C., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J.H., Prentice, M.A., Richardson, B.A., arap Siongok, T.K., Sturrock, R.F. & D.W. Taylor.II. Immunity after treatment of human schistosomiasis. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985 79 : 393.

149. Smithers, S.R. & R.J. Terry. Naturally acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the Rhesus monkeys (*macaca mulatta*). *Parasitology* 1965 55 : 695.
150. Discombe, G. Criteria of eosinophilia. *Lancet* 1946 : 195.
151. Lynch, S.M., Austen, K.F. & S.I. Wasserman,. Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by non cytolytic secretory stimuli. *J. Immunol.* 1979 121 : 1394.
152. Bazin, H., Beckers, A. & P. Querinjean, P. Three classes and four sub-classes of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 1974 4 : 44.
153. Grzych, J.M.. Production d'anticorps monoclonaux contre Schistosoma mansoni. Etude de leur activité biologique. Thèse de 3ème cycle en Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille I, Juin 1982.
154. Bazin, H., Grzych, J.M., Verwaerde, C. & A. Capron. A Lou rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. *Ann. Immunol.* 1980 131D : 359.
155. Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. & D. Afchain. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite; *Path. Biol.* 1968 16 : 121.
156. Watre, P., Brule, R., Capron, A., Samaille, J. & J. Fruit. Analyse antigénique de Toxoplasma gondii et diagnostic immunologique de la toxoplasmose humaine. *Ann. Inst. Pasteur.* 1969 20 : 167.
157. Glauert, A.M.R., Oliver, C. & K.J. Thorne. The interaction of human eosinophils and neutrophils with non-phagocytosable surfaces : a model for studying cell-mediated immunity in schistosomiasis. *Parasitology* 1980 80 : 525.
158. Migler, R., Lawrence, R. & L.R. Dechatelet. Human eosinophilic peroxidase : Biochemical characterization. *Biochem. Med.* 1978 19 : 16.
159. Gonzalez-Molina, A. & H.L. Spiegelberg. A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE. *J. Clin. Invest.* 1977 59 : 616.

160. Vadas, M.A., David, J.R., Butterworth, A.E., Pisani, N.J. & Siongok T.A. 1979. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol. 1979 122 : 1228.
161. Lindmark, R., Thoren-Tolling, K. & J. Sjöquist. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. J. Immunol. Meth. 1983 61 : 1.
162. Sampson, I.A., Hodgen, A.N. & I.H. Arthur. The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography. J. Immunol. Meth. 1984 69 : 9.
163. Cesbron, J.Y., Chandenier, J., Taelman, H., Henry, D. & A. Capron. Density gradient separation of Loa loa and Dipetalonema perstans microfilariae of infected patients. Ann. Soc. belge Med. Trop. 1986 66 : 77.
164. Whitehead, J.P., Gary, A.G.T., Tianothy, J.N.C., Groucutt, C. & L.J. Kricha. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. Nature 1983 305 : 158.
165. Tai, P.C., Capron, M., Bakes, D.M., Barkans, J. & C.J.F. Spry. Monoclonal antibodies to human eosinophil plasma membrane antigens enhance the secretion of eosinophil cationic protein. Clin. Exp. Immunol. 1986 63 : 728.
166. Clegg, J.A. & S.R. Smithers. 1972. The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. Int. J. Parasitol. 1972 : 79.
167. Cesbron, J.Y., Capron, A., Ovlaque, G. & F. Santoro. Use of monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to Toxoplasma Gondii major surface protein (P30). J. Immunol. Meth. 1985 23 : 151.

168. Dissous, C., Dissous, C. & A. Capron. Isolation and characterization of surface antigens from S. mansoni schistosomula. Mol. Biochem. Parasit. 1981 3 : 215.
169. Takenaka, T., Okuda, M., Kawaboris, S. & K. Kubo. Extracellular release of peroxidase from eosinophils by interaction with immune complexes. Clin. Exp. Immunol. 1977, 28 : 56.
170. Bach, M.K., Bloch, K. & K.F. Austen. IgE and IgG2a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. I. Optimum conditions for in vitro preparation of target cells with antibody and challenge with antigen. J. Exp. Med. 1971, 133 : 752.
171. Halper, J. & H. Metzger. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. VI. Inhibition by IgG2a immune complexes. Immunochemistry 1976, 13 : 907.
172. Spiegelberg, A.L. Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes and macrophages. Adv. Immunol. 1984, 35 : 61.
173. Rhonda, C.O. & A.M. Glauert. Mechanism of Fc-mediated interaction of eosinophils with immobilized immune complexes. I. Effects of inhibitors and activators of eosinophil function. J. Cell. Sci. 1982, 56 : 337.
174. Weiss, N., Hussain, R. & E.A. Ottesen. IgE antibodies are more species-specific than IgG antibodies in human onchocerciasis and lymphatic filariasis. Immunology 1982, 45 : 129.
175. Neppert, J. Cross-reacting antigens among some filariae and other nematodes. Trop.nemad. Parasitol. 1974, 25 : 454.
176. Dessaint, J.P., Waksman, B.H., Metzger H. & A. Capron. Cytophilic binding of IgE to the macrophage. III. Involvement of cyclic GMP and calcium in macrophage activation by dimeric or aggregated rat myeloma IgE. Cell. Immunol. 1980, 51 : 280.
177. Khalife, J., Capron M., Cesbron J.Y., Prin L. & A. Capron. Selective release of peroxidase (EPO) after IgE-dependent human eosinophil activation. Ann. Allergy 1985, 55 : 250.

178. Klebanoff, S.J., Jolly, M., Henderson, W.R. & E.C. Jong. The eosinophil peroxidase : purification and biologic properties. Eosinophil in Health and Diseases. A.A.F. Mahmoud and K.F. Austen, ed. Grune and Stratton, New York, p. 99.
179. Agosti, J.N., Ayars, G.H., Altman, L.C., Klebanoff, S.J., Gleich, G.J. & D.A. Loegering. Eosinophil peroxidase (EPO) hydrogen peroxide (H_2O_2)-halide mediated pneumocyte injury. Ann. Allergy 1985, 55 : 251.
180. Boltz-Nitulescu, G., Bazin, H. & H.L. Spiegelberg. 1981. Specificity of Fc receptors for IgG2a, IgG1/IgG2b, and IgE on rat macrophages. J. Exp. Med. 1981, 154 : 374.
181. Walker, W.S. Separate Fc receptors for immunoglobulins IgG2a and IgG2b, on an established cell line of mouse macrophages. J. Immunol. 1976, 116 : 911.
182. Khalife, J., Capron, M., Grzych, J.M., Bazin, H. & A. Capron. Extracellular release of rat eosinophil peroxidase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. J. Immunol. 1985, 134 : 1968.
183. Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S.K., Bazin, H., Joseph, M. & S.M. Phillips. Immunologic response of athymic rats to Schistosoma mansoni infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. J. Immunol. 1983, 131 : 1983.
184. Capron, A., Capron, M., Joseph, M., Dissous, C. & C. Auriault. Vaccination against schistosomiasis : Dream or reality ? New approaches to vaccine development. Rosemary Bell, G. Torrigiani ed., Schwabe and Co. AG ed. Basel, 1983, pp 460-475.
185. Butterworth, A.E., Taylor, D.W., Veith, M.C., Vadas, M.A., Dessen, A., Sturrock, R.F. & E. Wells. Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis. Immunol. Rev. 1982, 61 : 5.

186. Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R., Joseph, M., Capron, M. & A. Capron. Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomula in vitro. Eur. J. Immunol. 1984, 14 : 132.
187. Hofstetter, M., Poindexter, R.W., Ruiz-Tiben, E. & E.A. Ottesen. Modulation of the host response in human schistosomiasis. III. Blocking antibodies specifically inhibit immediate hypersensitivity responses to parasite antigens. Immunology 1982, 46 : 777.
188. Steele, J.R., Amkerst, J., Sjögren, H.O., Vang, H. & O. Lannerstad. Absorption of blocking activity from human tumor-bearer sera by Staphylococcus aureus Cowan I. Int. J. Cancer 1975, 15 : 180.
189. Mathew, G.D., Qualtierre, L.F., Neel, H.B. & G.R. Pearson. IgA antibody, antibody-dependent cellular cytotoxicity and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer 1980, 27 : 175.
190. Dissous, C., Grzych, J.M. & A. Capron. Biochemical studies on the 30-40 kDa Schistosoma mansoni surface antigen. Mol. Biochem. Parasit. 1985, 16 : 277.
191. Butterworth, A.E., Bensted-Smith, R., Capron, A., Capron, M., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Grzych, J.M., Kariuki, H.C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J.H., Arap-Siongok, T.K. & R.F. Sturrock. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. 1986, submitted for publication.