

50376
1987
267

50376
1987
267

N° d'ordre 169

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

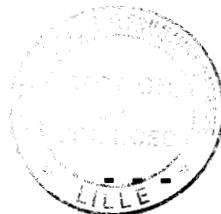
THÈSE

Pour l'obtention du titre
de Docteur en Biologie et Physiologie Animales

présentée par

Véronique PANCRE

Régulation des fonctions immunes des plaquettes sanguines
par les lymphocytes T



soutenue le 19 novembre 1987

devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : Président : M M. PORCHET
Rapporteurs : M C. AURIAULT
Mme J. WIETZERBIN
Examinateurs : M A. CAPRON
M M. JOSEPH
M A. TARTAR

L'ensemble de ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l' INSTITUT PASTEUR DE LILLE (INSERM U 167 - CNRS 624) sous la direction de Monsieur le professeur André CAPRON.

Je dédie cette thèse
à mes parents
à mes proches et amis
en témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A mon directeur de recherches,

Monsieur le Professeur André CAPRON,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et honorée de votre confiance.
Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse
admiration.

A Monsieur le Docteur Michel JOSEPH,

Qui m'avez acceuillie si gentiment au sein de votre groupe de recherches et
m'avez fait bénéficier de votre expérience.

Permettez moi de joindre à mes sentiments de grande admiration,
l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Claude AURIAULT,

Qui avec son dynamisme et son enthousiasme constant m'a guidée dans mes recherches.

Acceptez l'expression de ma profonde amitié.

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur PORCHET,

Qui m'a fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse.

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie tout particulièrement

Madame le Docteur Juana WIETZERBIN et
Monsieur le Professeur André TARTAR
Qui ont accepté de juger cette thèse.
Qu'ils soient assurés de mon amitié et de ma profonde gratitude.

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

Jean-Yves CESBRON

Claudine COLSON

Anne DELANOYE

Christian DROLEZ

Didier HENRY

Jean-Pierre KUSNIERZ

Marie-France MASSARD

et surtout Han VORNG qui constamment m'a fait bénéficier de ses grandes qualités humaines et de sa remarquable expérience technique.

ABREVIATIONS

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

Con A : Concanavalin A

CRP : Protéine C réactive (C-Reactive Protein)

Fc ϵ RII : Récepteur de classe II pour l'IgE

IFN α : Interféron alpha

IFN γ : Interféron gamma

MIF : Facteur inhibiteur des macrophages (Macrophage Inhibitory Factor)

MM : Masse moléculaire

PASL : Lymphokine suppressive de l'activité plaquettaire (Platelet Activity Suppressive Lymphokine)

pHi : point isoélectrique

TNF : Facteur de nécrose des tumeurs (Tumour Necrosis Factor)

RESUME

Plusieurs mécanismes cytotoxiques mis en jeu contre le parasite *Schistosoma mansoni* ont été décrits, impliquant des cellules et des facteurs humoraux. Parmi ceux-ci, l'intervention efficace des plaquettes sanguines a été démontrée. En effet, des plaquettes prélevées à des rats infectés par *S. mansoni* ou à des patients atteints de schistosomiase sont capables de tuer *in vitro* les jeunes larves de schistosome. Les plaquettes de rats ou d'individus sains n'ont pas cette faculté, mais peuvent acquérir des propriétés cytotoxiques en présence de sérum d'individus infectés ; dans ce mécanisme, les IgE jouent un rôle prépondérant. L'activation IgE-dépendante des plaquettes fait intervenir un récepteur spécifique pour cet isotype sur la membrane plaquettaire.

L'une des questions importante qui se pose concerne la modulation des fonctions effectrices des plaquettes par les lymphocytes T, par l'intermédiaire de lymphokines libérées après stimulation de ces cellules. Nous avons mis en évidence que des lymphocytes exprimant le marqueur de surface CD4⁺/CD8⁻, stimulés par des mitogènes ou des antigènes correspondant à leur spécificité libèrent des facteurs capables d'induire des plaquettes, prélevées à des individus sains, en cellules cytotoxiques pour les schistosomules en absence d'anticorps spécifiques du parasite. L'un de ces facteurs a été identifié comme étant l'interféron γ . Cet interféron est, de plus, capable d'augmenter l'expression du récepteur pour l'IgE à la surface de la plaquette. Par ailleurs, l'existence d'une lymphokine d'un pH_i plus acide (6,2-6,5) a également été démontrée.

D'autre part, une lymphokine produite par des lymphocytes T CD8⁺/CD4⁻, est capable d'inhiber l'activité cytotoxique IgE-dépendante des plaquettes. La production de métabolites de l'oxygène par des plaquettes stimulées par une réaction IgE/anti-IgE est également inhibée par ce facteur. Cette lymphokine restrictive, dénommée PASL (Platelet Activity Suppressive Lymphokine) a un poids moléculaire de 15-20 kDa et un pH_i de 4,6. Elle est thermo- et acido-stable et sensible aux enzymes protéolytiques. L'activité restrictive est absorbée par un culot plaquettaire et non par d'autres lignées cellulaires testées, suggérant l'existence d'un récepteur pour la PASL sur la membrane des plaquettes.

et sa possible spécificité pour cette cellule. Alors que des plaquettes d'animaux immuns transférées passivement à des rats sains protègent ceux-ci d'une infestation ultérieure par *S. mansoni*, on observe que l'incubation de ces mêmes plaquettes dans un surnageant de lymphocytes CD8⁺/CD4⁻ stimulés par la Con A abroge totalement la protection habituellement observée.

L'ensemble de ces travaux montre donc que, comme pour la plupart des cellules du système immunitaire, les fonctions effectrices des plaquettes sont régulées par les lymphocytes T et que les lymphokines en cause sont produites par des sous populations cellulaires différentes.

INTRODUCTION

L'organisme humain dispose de plusieurs stratégies pour se défendre contre les agressions extérieures. Certaines défenses sont assez peu spécifiques : c'est le cas de la fièvre. Les seules défenses réellement efficaces contre ce qui est reconnu comme "étranger" sont les réponses spécifiques. Singulières et adaptées à chaque agent agresseur, elles sont assurées par le système immunitaire.

La notion de défense immunitaire spécifique recouvre en réalité un enchevêtrement de mécanismes complexes que l'immunologie moderne commence seulement à cerner. Dès que l'agent agresseur est reconnu comme tel, une série d'événements se succèdent qui aboutissent d'une part à la production d'anticorps, spécifiques de l'agresseur et capables de le neutraliser, d'autre part à la multiplication de globules blancs, les lymphocytes T tueurs, eux aussi spécifiques de la cible étrangère et également capables de la détruire. Immunité humorale et cellulaire concourent donc à l'élimination de l'agresseur et de lui seul, laissant intacts les autres composants de l'organisme. Une des questions centrales de l'immunologie est donc de comprendre ce qui se passe entre le moment où l'agresseur est perçu comme tel et celui où il est détruit grâce à une réponse immunitaire spécifique. Une étape importante vers cette compréhension fut, au cours de ces vingt dernières années, la découverte que tous les types de cellules du système immunitaire coopèrent les uns avec les autres pour la production d'une réponse cellulaire spécifique de "l'étranger" ou antigène. Pendant des années, les recherches ont surtout porté sur l'identification des cellules impliquées dans chaque type de réponse.

Ainsi, la plaquette dont on connaissait le rôle important dans l'hémostase est aussi un des combattants à part entière du système immunitaire dans sa lutte contre les parasites. Cette participation directe de la plaquette aux réactions de défense de l'organisme, de découverte récente dans notre laboratoire, s'inscrit dans le cadre général des mécanismes de l'immunité antiparasitaire, et en particulier antihelminthes, dont l'étude a révélé depuis une dizaine d'années la profonde originalité. Au cours de ces infections, les systèmes classiques de défense sont en effet peu ou pas efficaces. Interviennent en revanche les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (Capron A. et coll., 1982) mettant en jeu des cellules inflammatoires (monocytes, macrophages et éosinophiles) et des anticorps de classe IgE, dits anaphylactiques dont le seul rôle antérieurement connu était la

participation dans les maladies allergiques. Les plaquettes sont elles aussi, par un mécanisme semblable impliquant l'IgE, capables de tuer *in vivo* et *in vitro* des parasites (Joseph M. et coll., 1983). Cette fonction plaquettaire a été mise en évidence à ce jour dans deux helminthiases majeures, la bilharziose et la filariose. Ces observations suggèrent l'existence d'un rôle général des plaquettes dans les processus de défense de l'organisme. Le problème posé alors était de savoir si, comme c'est le cas pour les autres cellules dites immunocompétentes, les fonctions immunes des plaquettes peuvent être régulées ou induites par des facteurs d'origine lymphocytaire. C'est pour répondre à cette question que nous avons entrepris les travaux décrits dans ce mémoire.

GENERALITES

LYMPHOKINES, MONOKINES, CYTOKINES ET INTERLEUKINES

C'est en 1969 qu'est apparu le terme de **lymphokine** pour définir les médiateurs solubles sécrétés par les lymphocytes T et activant les macrophages.

Puis on a utilisé le terme de **monokines** pour désigner les médiateurs sécrétés par les monocytes et les macrophages.

En 1979 est créé le terme d'**interleukine**, pour désigner les facteurs solubles assurant les interactions entre les leucocytes.

Nombre de ces facteurs sécrétés par des cellules du système immunitaire sont également sécrétés par d'autres types de cellules. C'est pourquoi on a parfois recours au terme plus général de **cytokines** pour désigner l'ensemble des médiateurs produits par des cellules.

Les lymphokines/interleukines sont donc des produits sécrétés par des cellules immunocompétentes. L'induction de leur synthèse et leurs activités ne sont pas spécifiques de l'antigène (les immunoglobulines ne sont donc pas des lymphokines).

Elles agissent plutôt comme des hormones, bien qu'elles ne soient pas produites par des glandes. Leur action est surtout locale. Elles exercent cependant parfois une action systémique.

Certaines lymphokines peuvent être assimilées à des facteurs de croissance, puisqu'elles stimulent la prolifération cellulaire en se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques.

A. LES LYMPHOKINES.

I. HISTORIQUE

Les réponses immunitaires sont la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types de cellules (lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages, polynucléaires etc...) qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de facteurs solubles, appelés maintenant lymphokines, interleukines ou cytokines, véritables signaux captés et décodés par des récepteurs cellulaires (Oppenheim J. et Cohen S., 1983).

L'histoire des lymphokines a commencé il y a tout juste 20 ans. En 1966, David puis Bloom et Bennet mettaient en évidence, dans le surnageant de culture de lymphocytes activés, un facteur inhibant la migration des macrophages. Ils lui donnèrent le nom de MIF (Migration Inhibitory Factor). On s'aperçut par la suite que les lymphocytes sécrètent bien d'autres facteurs, produisant d'autres effets. Plus d'une centaine ont été décrits à ce jour. Tous ont été mis en évidence par leur fonction et par leur effet sur différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Le nombre réel de molécules distinctes est cependant très probablement inférieur à celui des activités biologiques dont plusieurs peuvent être dues à l'action d'une même molécule. Inversement plusieurs molécules différentes (mais possédant toutefois un certain niveau d'homologie) présentent la même gamme d'activité. Ce problème essentiel s'est longtemps heurté aux difficultés d'identification biochimique des lymphokines liées à la très faible concentration de ces facteurs. Les progrès récents de la biologie moléculaire, et notamment le clonage des gènes dans des vecteurs d'expression, sont venus apporter une solution à ce problème. Ainsi il est possible maintenant d'isoler les gènes codant pour certaines lymphokines, et de les faire exprimer dans des bactéries ou des cellules eucaryotes. On peut ainsi obtenir des quantités importantes de lymphokines actives plus faciles à purifier. On va donc pouvoir

APPELLATIONS DES PRINCIPALES LYMPHOKINES

Interleukine-1 (IL-1)

BAF (B Cell Activating Factor)
LAF (Lymphocyte Activating Factor)
TAF (Thymocyte Activating Factor)
TPF (Thymocyte Proliferation Factor)
MP (Mutagenic Protein)
MCF (Mononuclear Cell-derived Factor)
PIF (Proteolysis Inducing Factor)
EP (Endogenous Pyrogen)
LEM (Leucocyte Endogenous Mediator)
SAA Inducer (Serum Amyloid A Inducer)
Cataboline
ETAF (Epidermal T Cell Activating Factor)

Interleukine-2 (IL-2)

TCGF (T Cell Growth Factor)

Interleukine-3 (IL-3)

HCGF (Haemopoietic Cell Growth Factor)
MCGF (Mast Cell Growth Factor)
PCGF (P-Cell Growth Factor)
Pluripoïétine
Hématopoïétine-2
Multi-colony Stimulating Factor

Tumor Necrosis Factor (TNF)

TNF α : Cachectine
TNF β : Lymphotoxine

Colony Stimulating Factor (CSF)

CSF-1: M-CSF (Macrophage-CSF)
CSF-2: GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-CSF)

Interleukine-4 (IL-4)

BSF-1 (B Cell Stimulating Factor 1)
BCDF γ (B Cell Differentiation Factor γ)

Interleukine-5 (IL-5)

Eosinophil Differentiating Factor
BCGF-2 (B Cell Growth Factor 2)

étudier ces facteurs et explorer cet immense réseau de communication intercellulaire. Les données exposées ici reflètent l'état actuel des connaissances, et sont donc sujettes à des modifications entraînant une évolution rapide dans la nomenclature.

II. ROLE DES LYMPHOKINES

Les lymphokines interviennent essentiellement à deux niveaux : dans la production des cellules sanguines et dans le développement et l'expression de la réponse immunitaire. Mais elles peuvent agir également sur d'autres systèmes biologiques (sur l'hypothalamus, les ostéoclastes, les cellules synoviales, etc...).

1. ROLE DANS LA MULTIPLICATION ET LA MATURATION DES CELLULES SANGUINES

Les cellules sanguines sont en perpétuel renouvellement. Elles dérivent toutes des mêmes cellules souches de la moelle osseuse. Ces cellules souches sont pluripotentes: elles peuvent se régénérer et se différencier dans l'une ou l'autre des lignées sanguines. Elles donnent des cellules précurseurs engagées de façon irréversible dans la différenciation. Les cellules précurseurs se divisent à leur tour, donnent des clones de cellules qui, après différents stades de multiplication, de différenciation et de maturation, forment les cellules sanguines circulantes. Cette prolifération et cette différenciation sont contrôlées par une série de lymphokines regroupées sous le terme général de CSF (Colony Stimulating Factors)(Metcalf D. ,1977; Nicola N. et Vadas M. , 1984). Seuls quelques uns d'entre eux ont été identifiés. On a mis en évidence des CSF, produits par les lymphocytes, les macrophages et par de nombreux types de cellules (fibroblastes, cellules endothéliales), qui contrôlent les lignées de granulocytes et de macrophages. Ils stimulent la division cellulaire, engagent les cellules précurseurs de façon irréversible dans la lignée granulocytaire ou macrophagique et stimulent l'activité fonctionnelle des cellules différenciées.Ces

facteurs ont été particulièrement bien étudiés chez la souris . On peut distinguer le M-CSF (Stanley E. et Heard P. , 1977) actif sur les précurseurs des macrophages et le GM-CSF (Burgess A. et coll. ,1977) actif sur les précurseurs bipotentiels des macrophages et des granulocytes. Existe également un G-CSF, qui à faible concentration induit une prolifération des colonies de cellules granulocytaires mais qui à forte concentration est capable d' induire à la fois celle des colonies granulocytaires et celle des colonies macrophagiques (Metcalf D. et Nicola N. , 1983). D'autre part, l'IL3 identifiée et clonée pour l'instant uniquement chez la souris (Fung M. et coll., 1984), sécrétée par les lymphocytes T activés recouvre l'activité des facteurs appelés Hématopoïétine-2 , Facteur stimulant des mastocytes, Facteur de croissance des cellules hématopoïétiques (Ihle J. et coll., 1983). Appelée également Multi-CSF, elle stimule la croissance des cellules souches pluripotentes de la moelle et stimule la production d'érythrocytes, de granulocytes, de macrophages et de mastocytes (Ihle J. et coll. , 1982). Une lymphokine active à la fois sur la différenciation des éosinophiles et sur la prolifération des lymphocytes B vient d'être isolée à partir d'un clone de cellules T murines. Appelée IL5, elle recouvre les activités attribuées à l'Eosinophil Differentiating Factor et au B Cell Growth Factor (BCGF-2) (Sanderson C. et coll., 1986).

2. ROLE DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE

L'introduction d'un antigène dans l'organisme entraîne une cascade de réactions impliquant différents types de cellules. Cette réponse immunitaire est régulée par des lymphokines. L'antigène est capté par les macrophages qui "présentent" cet antigène aux lymphocytes (Unanue E. et Cerottini J., 1970). Ces macrophages sécrètent de l'IL1(Oppenheim J. et coll., 1982). Les lymphocytes T reconnaissent à la fois l'antigène étranger et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (de classe II) présents à la surface des macrophages et sont activés par l'IL1. Certains (essentiellement les lymphocytes T helpers) produisent de l'IL2 (Morgan D. et coll., 1976) et vont exprimer des récepteurs spécifiques pour l'IL2 alors que d'autres exprimeront les récepteurs mais ne produiront pas d' IL2 (lymphocytes T cytotoxiques). La production d' IL2

entraîne la prolifération des lymphocytes T spécialement dirigés contre l'antigène et maintient leur état d'activation. Elle déclenche également la prolifération des lymphocytes B, l'activation des cellules NK (Natural Killer) (Henney C. et coll., 1981) et de cellules lymphoïdes qui deviennent des cellules LAK (Lymphokine Activated Killer) (Tilden A. et coll., 1987) qui possèdent la capacité de détruire certaines cellules tumorales. Sous l'action de l'IL2 des lymphocytes T auxiliaires activés vont à leur tour sécréter d'autres lymphokines :

- des facteurs induisant la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétaires d'anticorps (B Cell Growth et B Cell Differentiating Factor) (Cambier J., 1986).
- des facteurs actifs sur les macrophages comme le MIF ou le MAF (Macrophage Activating Factor) (David J. et coll., 1983).
- de la lymphotoxine (ou Tumor Necrosis Factor β) (Old L., 1985).
- de l'interféron γ (IFN- γ) (Shoham J., 1983).

L'IFN- γ active à son tour les cellules NK, les lymphocytes T et les macrophages chez qui il induit la production de TNF (Toy J., 1983).

Les lymphocytes B activés de façon spécifique par contact avec l'antigène expriment les récepteurs qui vont pouvoir capter les lymphokines (Paul W., 1984). Ils prolifèrent sous l'action des facteurs de croissance (BCGF) parmi lesquels l'IL1 et l'IL2, puis se différencient en plasmocytes sécrétaires d'anticorps sous l'action des facteurs de différenciation (BCDF's). Parmi ceux-ci ont été identifiés : le BCDF μ qui induit la sécrétion d'IgM (Howard M. et coll., 1982) et le BCDF γ qui induit la sécrétion d'IgG1 (Vitetta E. et coll., 1984; Sideras P. et coll., 1986). Des études récentes ont montré qu'en réalité la prolifération et la différenciation sont activées par plusieurs lymphokines à action BCGF ou BCDF et qu'une même lymphokine peut agir comme BCGF ou BCDF. C'est probablement le cas de l'IL2. Une lymphokine nouvellement clonée à partir de lymphocytes T murins et appelée IL4 induit l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécrétaires d'IgG1 (Noma X. et coll., 1986). Elle correspond probablement aux facteurs identifiés précédemment sous les noms de BSF-1 (B Cell Stimulating Factor 1) et de BCDF γ (Vitetta E. et coll., 1985). Les macrophages, dont les monocytes

représentent la forme immature circulante, sont des cellules phagocytaires. Ils ingèrent et digèrent des particules étrangères. Ils sécrètent de l'IL1 en réponse à différentes stimulations . Ils sont activés à leur tour par les lymphokines sécrétées par les lymphocytes T : MIF, MAF, IFN- γ . Les macrophages activés produisent alors de l'IFN- α et du TNF- α .

III. PRINCIPALES LYMPHOKINES

1. CARACTERES COMMUNS

Les lymphokines possèdent plusieurs points communs importants :

- a. Ce sont toutes des glycoprotéines d'un poids moléculaire supérieur à 10 kD. Bien que l'existence d'un précurseur commun puisse être envisagée pour certaines familles de lymphokines, elles ne possèdent pas, contrairement aux immunoglobulines, de structure moléculaire de base.
- b. Elles sont toutes synthétisées *de novo*. On ne les retrouve pas en général dans les lymphocytes au repos et elles ne sont produites que lorsque les lymphocytes sont stimulés par des agents qui provoquent leur activation soit spécifiquement (antigènes), soit non spécifiquement (mitogènes). Leur production ne s'accompagne cependant pas nécessairement d'une réponse proliférative des lymphocytes.
- c. Leur production nécessite une synthèse d'ARN et de protéines mais pas celle d'ADN. Leur production peut être modulée soit de façon positive par certains immunomodulateurs (par exemple, les hormones thymiques pour l'IL2 et l'IFN- γ , le levamisole pour le MIF, le MAF et l'IFN- γ etc...), soit de façon négative par des facteurs suppresseurs tels que ceux produits par certains lymphocytes (Histamine-Induced Suppressor Factor; Prostaglandin-Induced T Cell-Derived Suppressor).
- d. Plusieurs lymphokines peuvent être produites par un même lymphocyte.
- e. Les lymphokines agissent en majorité sur leur(s) cellule(s) cible(s) par un mécanisme analogue à celui des hormones peptidiques : fixation sur un récepteur membranaire; mise en action d'un second messager intracellulaire et induction d'une séquence d'événements biochimiques aboutissant à l'effet spécifique de la lymphokine.

2. CLASSIFICATION DES PRINCIPALES LYMPHOKINES

	Page
Basophil Chemotactic Factor	25
B Cell Differentiating Factor	26
B Cell Growth Factor	26
Eosinophil Chemotactic Factor	25
Eosinophil Stimulation Promoter	25
Granulocyte CSF	27
Granulocyte-Macrophage CSF	27
Histamine Producing Cell Stimulating Factor	27
Histamine Releasing Activity	25
Interferon	28
Interleukine 2	26
Interleukine 3 ou Multi CSF	27
Interleukine 4	26
Leucocyte Inhibitory Factor	25
Macrophage Activating Factor	24
Macrophage Chemotactic Factor	24
Macrophage Fusion Factor	24
Macrophage CSF	27
Migration Inhibitory Factor	24
Neutrophil Chemotactic Factor	25
Tumor Necrosis Factor	28
Soluble Immune Response Suppressor	26

CELLULES CIBLES	APPELATION DU FACTEUR	CARACTÉRISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES	ACTIVITÉS BILOGIQUES
	Migration Inhibitory Factor (MIF) (Remold H. & Mednis A., 1977)	Hétérogénéité du PM et du PI MIF pH5 (23-40 kD) MIF pH3 (65 kD)	Inhibe la migration des macrophages
		sensible à la chymotrypsine et à la neuraminidase Insensibles à la Trypsine	
	Macrophage Activating Factor (MAF) (Andrew P. et coll., 1984)	PM 20-30 kD PI : Hétérogène (4 à 6,5)	
			Induit une cytotoxicité contre des cellules tumorales, quelques cellules normales et des microorganismes
			Induit des modifications morphologiques:
			Augmente l'adhérence cellulaire
			Augmente l'incorporation de glucosamine
			Augmente la pinocytose
			Augmente la production de l'activateur du plasminogène
			Augmente la production de facteurs du complément
			Augmente l'entrée de Ca^{2+} intracellulaire
			Augmente la production de prostaglandines (PGE2)
			Modifie de nombreuses activités enzymatiques(enzymes lysosomiales)
	Macrophage Chemoattractant Factor (MCF) (Ward P. et coll., 1969)	se distingue du MIF par sa résistance à la Neuraminidase	Provoque la migration des macrophages ou des monocytes à travers les pores d'une membrane
	Macrophage Fusion Factor (MFf) (Sone S., 1984)		Induit la formation de cellules géantes multinucléées au rôle mal déterminé incapables d'acquérir des fonctions cytotoxiques mais conservant la capacité de produire de l'IIL

CELLULES CIBLES	APPELATION DU FACTEUR	CARACTÉRISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES	ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
Leucocyte Inhibitory Factor (LIF) (Lommitzer R. et coll., 1975)	Diffrérent du MIF PM : 68 kD Possède les propriétés d'une estérase	Inhibe la migration des leucocytes	
	<u>Facteurs chimiotactiques</u>		
	<ul style="list-style-type: none"> • Basophil Chemotactic Factor (BCF) (Ward P. et coll., 1975) • Neutrophil Chemotactic Factor (NCF) (Kawataki E. et coll., 1986) • Eosinophil Chemotactic Factor (ECF) (Grotz E. & Austen K., 1975) • Eosinophil Stimulator Promoter (ESP) (Greene B & Colley D., 1974) 	<p>Attirent les différents types de polynucléaires</p> <p>Résulte de l'effet d'une ou plusieurs lymphokines thermorésistantes détruites par la trypsin et chymotrypsine et insensibles à l'effet des nucléases et de la neuraminidase</p> <p>Induit le relargage de l'histamine stockée dans les basophiles</p> <p>A ces lymphokines correspondent en fait plusieurs molécules de poids moléculaire compris entre 15 et 50 kD</p>	



CELLULES
CIBLES

APPELATION DU FACTEUR

CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES

ACTIVITES BIOLOGIQUES

Interleukine 2 (IL2)auparavant**T Cell Growth Factor
(TCCF)**
(Robb R., 1984)

PM 15 - 17 kD

Chaîne polypeptidique de 133 AA

PI variable selon la glycosylation
(O glycosylation) sur le résidu
thréonine en position 3Pas de site possible de N-Glycosy-
lationPont disulfure entre les cystéines
en position 58 et 105 indispensable
à l'activité biologiqueRécepteur membranaire de forte
affinité (Tac)(kD = 3 à 5.10⁻¹²)Induit la production d'autres lympho-
kines par les cellules T ayant un
récepteur pour l'IL2 (IFN γ , BCGF, BSF)Induit une augmentation de l'activité
NK (Natural Killer Cell) et LAK (Lympha-
kine Activated Killer Cell)Agit directement sur les cellules B qui
possèdent un récepteur pour l'IL2**B cell Growth Factor
(BCCF)**(Vitteta E. et coll., 1985 ;
Sanderson C. et coll., 1986)

BCGF1 = BSF1 = IL4

PM : 15 - 20 kD

PI : 6,5

BCGF2 = IL5

PM 50 kD

Induit la prolifération des cellules B
activées

26

**B Cell Differentiating
Factor (BCDF)**(Howard M. et coll., 1982) ;
Vitteta C. et coll., 1984)

PM : 17 kD

PI : 5,8

Existence d'un BCDF spécifique pour
chaque chaîne lourde (α , ϵ , γ ou μ)Induit la différenciation des cellules B
activées en cellules productrices
d'anticorps**Soluble Immune Response
Suppressor
SIRS (SIRS ox)**
(Webb D. et coll., 1985)**Interleukine 4**
= BSF1 B Cell Stimulating
Factor
= BCGF I
(Noma X. et coll., 1986)

PM 14 et 21 kD

Doit être oxydé pour devenir
biologiquement actif

PM = 20 kD

Clonée chez l'homme

Diminue la réponse immunitaire, cellu-
laire et humorale

Inhibe la prolifération cellulaire

Costimulant de l'entrée des lymphocytes B
en phase S après stimulation par AntiIg
Augmente l'expression des Ag de classe II
du CMH sur B quiescentsAugmente la sécrétion d'IgG1 et IgE
par les Lc B stimulés (= BCDF γ)Costimulant des cellules T stimulées par
PMA

CELLULES CIBLES	APPELATION DU FACTEUR	CARACTÉRISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES	ACTIVITÉS BIOLOGIQUES
M	Macrophage CSF (M-CSF) (Stanley E. & Heard P., 1977)	PM : 70 kD	Induit une prolifération des colonies de cellules macrophagiques
M	Granulocyte CSF (G-CSF) (Metcalfe D. & Nicola N., 1983)	PM : 25 kD	Induit une prolifération des colonies de cellules granulocytaires
I	Granulocyte-Macrophage CFS (GM-CSF) (Burgess A. et coll., 1977)	PM : 23 kD	Induit une prolifération des colonies de cellules macrophagiques et granulocytaires
H	Interleukine 3 ou multi GFS (Hule J. et coll., 1982, 1983)	PM : 28 kD PI : très hétérogènes 4 sites de N-glycosylation Chaîne polypeptidique de 134 acides aminés	Agit sur l'autorenouvellement des cellules souches pluripotentes (CFU-S) Agit sur la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CFU-C) de toutes sortes
P O I	Récepteur membranaire (kD = 1,7 à 5,4.10-11 M)	Séquencée clonée chez la souris uniquement	Induit une augmentation de synthèse d'histamine dans les organes hématopoïétiques
T O P A T	Histamine Producing Cell Stimulating Factor (HCSF) (Dy M. et coll., 1981)	PM : 30 kD PI : 4,7	Augmente l'activité arginase et ornithine décarboxylase des cellules hématopoïétiques Induit une augmentation de la synthèse d'histamine principalement dans les cellules provenant d'organes hématopoïétiques



CELLULES CIBLES	APPELLATION DES FACTEURS	CARACTÉRISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES	ACTIVITÉS BILOGIQUES
S E S R E I V E S L U S E L L U C E	Interféron γ (IFN γ) (Shoham J., 1983)	Chaîne polypeptidique de 146 acides aminés PM : 17,11.kD 2 sites de N-glycosylation possibles Existerait sous forme de polymère ou associé à des protéines porteuses pI : 8,6 - 8,7 Thermolabile et instable à pH 2	Diminue la réplication et l'effet cytopathogène des virus sur les cellules NK Augmente l'activité des cellules NK Induit la protection des cellules normales contre la cytotoxicité NK Inhibe la division cellulaire (plus particulièrement sur les cellules transformées) Induit ou augmente l'expression des récepteurs Fc pour les Immunoglobulines Augmente l'expression des antigènes de classe I du CMH sur la majorité des cellules Augmente l'expression des antigènes de classe II du CMH sur certains types de cellules (macrophages, cellules B, mastocytes T dépendants)
E			Inhibe la synthèse des IgE
Tumor Necrosis Factor (Old L., 1985 ; Beutler B. & Cerami A., 1986)	α ou cachectine produit par les macrophages β ou lymphotoxine produit par lymphocytes T	Accélère la croissance des cellules normales Cytotoxique in vitro envers un certain nombre de lignées de cellules tumorales Effet antitumoral potentialisé par l'IFN γ qui augmente le nombre de récepteurs sur les cellules cibles mêmes récepteurs	BU LILLE

IV. CONCLUSION

Grâce à l'essor des différentes techniques immunologiques, biochimiques et génétiques, les connaissances sur les lymphokines et leur rôle au cours des réponses immunitaires et inflammatoires connaissent un développement fulgurant. Les résultats accumulés au cours des dernières années permettent d'envisager la naissance d'une "néoendocrinologie" étudiant la nature et la fonction des facteurs solubles assurant les communications entre les différents types cellulaires du système immunitaire.

Nous nous sommes intéressé aux effets de tels facteurs solubles sur une cellule du sang circulant:

B. LA PLAQUETTE

I. ORIGINE ET DUREE DE VIE

La première description de la plaquette sanguine a été faite par Donne en 1842. La plus petite de nos cellules circulantes est issue du mégacaryocyte par fragmentation de son cytoplasme (Harker L. et coll., 1969). On sait depuis longtemps, grâce à des études faites en microcinématographie, que les mégacaryocytes prêts à libérer les plaquettes, développent de nombreux bras un peu à la manière d'une pieuvre. Chacune de ces longues expansions contient des petits renflements représentant les futures plaquettes qui se libèreront par cassure (Thiery J.P. et coll., 1956). Cette libération des plaquettes n'intervient pas en général dans la moelle osseuse. En effet, le mégacaryocyte mature est capable de traverser la paroi du sinusoïde et de pénétrer dans la circulation (Kaufman R. et coll., 1965).

La plaquette normale à l'état de repos se présente sous forme d'un ellipsoïde de révolution très aplatie. Elle mesure de 2 à 4 μm dans son grand axe et de 0,5 à 1 μ dans son petit axe et son volume moyen est de l'ordre de 5 à 7 μm^3 . On note d'ailleurs une certaine hétérogénéité de la taille et de la densité des plaquettes circulantes (Penington D., 1981). Le taux moyen des plaquettes dans le sang

circulant périphérique de l'homme est de l'ordre de 250 000/mm³. Leur temps de présence dans la circulation est de 7 à 10 jours. Leur élimination est assurée par phagocytose par le système réticulo - endothérial lorsqu'elles sont sénescentes ou a lieu par consommation lors d'une activation accidentelle des mécanismes de l'hémostase.

II. MORPHOLOGIE PLAQUETTAIRE

L'étude morphologique des plaquettes en microscopie électronique révèle des structures complexes subdivisées en quatre zones qui sont la membrane plasmique, les membranes intracellulaires, les organelles et le cytoplasme.

1. LA MEMBRANE PLASMIQUE

Sa structure correspond au modèle de mosaïque fluide des cellules eucaryotes.

Les phospholipides

La matrice lipidique est formée de cinq phospholipides majeurs distribués de façon asymétrique entre les deux feuillets de la membrane (Sphingomyeline, phosphatidylsérine (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholine (PC) et Phosphatidyléthanolamine (PE))(Marcus A., 1975). Ils interviennent dans au moins deux fonctions majeures des plaquettes:

- La transmission et l'amplification du signal membranaire responsable de l'activation plaquettaire.
- Le développement d'une activité procoagulante à la surface de la membrane plasmique (Walsh P. et Lipscomb M., 1976).

Les glycolipides

Les glycolipides sont un groupe hétérogène de lipides glycosylés présents en faible concentration dans la membrane. Les glycolipides neutres constituent 6 % des lipides plaquettaires alors que les glycolipides acides, appelés gangliosides constituent 0,5 % des lipides totaux (ils pourraient jouer un rôle dans le transport transmembranaire de la sérotonine).

Les protéines et glycoprotéines plaquettaires

Les protéines membranaires sont appelées périphériques ou intégrales selon leur localisation dans la matrice lipidique (Marchesi S. et Chasis J., 1979).

Parmi les protéines périphériques il faut mentionner certains facteurs de la coagulation comme le fibrinogène, les facteurs V, VIII, XI et XII ainsi que la glycoprotéine V.

Certaines des protéines intégrales sont transmembranaires comme les Gp Ib, IIb et IIIa. Les chaînes glucidiques forment une épaisse couche à la surface de la membrane plasmique appelée glycocalix.

Le nombre important de glycoprotéines reflète la complexité de la membrane plaquettaire dotée de structures de grande spécificité moléculaire pour pouvoir effectuer les différentes fonctions des plaquettes dans l'hémostase. Outre ces fonctions spécialisées, la membrane plasmique plaquettaire assure également les fonctions communes aux cellules eucaryotes et contient de nombreuses enzymes (phosphodiesterases, ATPases, adénylate cyclase) et des constituants responsables des processus de transport actif (Na^+ , K^+ , glucose par exemple).

2. LES MEMBRANES INTERPLAQUETTAIRES

Elles comprennent:

Le système canaliculaire ouvert (SCO)

Il correspond à des invaginations de la membrane plasmique externe qui forment un réseau de canalicules à travers tout le cytoplasme plaquettaire en communication avec le milieu extracellulaire (White J. et Clawson C., 1980).

Le système tubulaire dense (STD)

Il forme des tubules étroits qui ne communiquent pas avec le milieu extracellulaire, possède une activité peroxydase et constitue un site important de stockage du calcium (Breton-Gorius J. et Guichard J., 1972).

Les complexes membranaires qui résultent de l'interdigitation du SCO avec le STD, ont des similitudes morphologiques avec le sarcolemme des cellules musculaires. Ils pourraient jouer un rôle dans la contraction cellulaire en régulant le taux de Ca^{++} cytoplasmique. Le transport calcique du STD vers le cytoplasme serait stimulé par certains dérivés de l'acide arachidonique tels les endopéroxydes ou les thromboxanes. Le restockage du Ca^{++} cytoplasmique dans le STD serait assuré par une pompe ATPasique Ca^{++} et Mg^{++} dépendante.

3. LES ORGANELLES PLAQUETTAIRES

Outre les grains de glycogène qui constituent la réserve énergétique des plaquettes et les mitochondries, facilement reconnaissables par leur structure caractéristique, une population hétérogène de granules constitue les éléments les plus nombreux. Selon l'aspect morphologique, la taille et le contenu, on en distingue 4 types :

Les granules denses

6 à 10 par plaquette. Opaques aux électrons, ils constituent le lieu de stockage de concentrations élevées de sérotonine, histamine et autres amines, de pyrophosphate, de nucléotides adényliques et de Ca^{++} (White J., 1968).

Les granules α

Beaucoup plus nombreux. De structure plus irrégulière, moins denses aux électrons ils présentent parfois une zone centrale sombre caractéristique, appelée nucléoïde. Ils constituent le lieu de stockage des substances protéiques comme la bêta-thromboglobuline, le PF4, le PDGF, le fibrinogène ou la fibronectine (Kaplan K. et coll., 1979).

Les lysosomes

Particulièrement riches en hydrolases acides (phosphatase acide, β .N. acétyl glucosaminidase, β glucuronidase et β galactosidase) qui sont libérées au cours de l'activation plaquettaire (Sixma J. et coll., 1985).

CONSTITUANTS DU GRANULE DENSE

CONSTITUANTS	CONCENTRATION GRANULAIRE
ATP	436 mM
ADP	653 mM
Pyrophosphate	326 mM
Ca ⁺⁺	2181 mM
Sérotonine	65 mM

CONSTITUANTS DU GRANULE α

Facteur plaquettaire 4 (PF4)
 β -thromboglobuline (β TG)
 Facteur de croissance (PDGF)
 Fibrinogène
 Fibronectine
 Facteur von Willebrand (vWF)
 Thrombospondine
 Albumine
 Immunoglobulines
 Facteur V

Les granules à catalase

Ils correspondent aux peroxysomes des autres cellules (Breton- Gorius J. et coll, 1978).

4. LE CYTOPLASME

Les constituants majeurs du cytoplasme sont les protéines du cytosquelette qui assurent le maintien et l'architecture des plaquettes, la formation des pseudopodes, la contraction cellulaire et la sécrétion.

Les microtubules

Ils résultent de la polymérisation d'une protéine dimérique, la tubuline et confèrent à la plaquette au repos sa forme discoïde. L'activation des plaquettes provoque une dépolymérisation passagère des microtubules (Sixma J. et Molenaar J., 1966).

Les microfilaments

Bien que d'aspects distincts, ils sont essentiellement formés d'actine associée à d'autres protéines (Sixma J. et Moleenar I., 1966).

La thrombosténine

Elle constitue le gel contractil et résulte de l'interaction de l'actine avec la myosine. La fonction essentielle du complexe actine-myosine étant la contraction, il joue un rôle important dans la formation des pseudopodes, la centralisation des granules, la sécrétion et la rétraction du caillot (Lebowitz E. et Cooke R., 1978).

III. LES INTERACTIONS PLAQUETTAIRES

Dès la rupture d'un vaisseau, une vasoconstriction limite l'ampleur de la brèche ralentissant ainsi le flux sanguin. Cette réaction est favorisée par les amines vasopressivesadrénaline et noradrénaline. Cette réaction première nécessite outre l'intégrité du vaisseau pour se contracter, la participation de la

plaquette par les amines qu'elle contient. En quelques secondes une recherche de contact paroi-plaquette va s'opérer. Ces cellules adhèrent aux structures sous-endothéliales, sécrètent des facteurs qui font agréger d'autres plaquettes, induisent la régénération du tissu cellulaire lésé et finalement participent à la rétraction du caillot.

Pour faciliter l'exposé, nous examineront successivement les différentes étapes de l'intervention des plaquettes.

1. L'ADHESION

C'est un phénomène rapide, qui dure quelques fractions de seconde, irréversible et mal connu quant à son mécanisme. L'altération du vaisseau laisse apparaître les structures sous-endothéliales : lame basale, microfibrilles, fibres de collagène et élastine. Parmi les constituants du sous-endothélium susceptibles de soutenir l'adhésion des plaquettes, le collagène et un matériel hétérogène microfibrillaire semblent être les éléments les plus importants, capables d'induire l'activation et la sécrétion des plaquettes. En effet, l'adhésion dépendrait du degré de polymérisation du collagène (Caen J.P. et coll., 1969). Mais même après destruction du collagène par une collagénase spécifique, les plaquettes continuent à adhérer au vaisseau par contact avec les microfibrilles ce qui suggère l'existence de deux voies dans l'adhésion. Néanmoins, la présence du facteur VIII de Willebrand (vWF), élaboré par les cellules endothéliales est indispensable à l'adhésion en agissant comme cofacteur plasmatique (Sakariassen K. et coll., 1979).

2. LE CHANGEMENT DE FORME

C'est un état transitoire de la plaquette (Nachmias V., 1983). En effet, après adhésion au collagène, la membrane de la plaquette subit alors une modification de structure et de perméabilité qui conduit à une entrée d'eau et de sodium, ainsi qu'à une centralisation des granules. Des pseudopodes plus ou moins importants sont émis par la membrane et donnent à la cellule un aspect hérisssé dû à la

polymérisation de l'actine ce qui la rend cohésible alors qu'à l'état de repos sa surface lisse l'empêche d'adhérer et d'agréger (Crawford N. et coll., 1980). Si quelque inversion venait à s'opérer dans l'organisme dont elle fait partie et afin de ne pas entamer inutilement le capital hémostasique, la plaquette peut encore à ce stade inverser le cours de ses réactions et revenir à l'état discoïde initial de relaxation et être ainsi à nouveau disponible.

3. L'AGREGATION

La membrane plasmique possède des récepteurs pour un grand nombre d'agonistes tels l'ADP, l'adrénaline, la sérotonine, la thrombine, le collagène, les prostaglandines et même les immunoglobulines agrégées ou les complexes immuns qui agissent comme inducteurs de l'activation plaquettaire médiée par la transmission du signal membranaire vers le cytoplasme.

La réponse plaquettaire varie en fonction de l'inducteur et de l'intensité du signal produit et deux voies majeures d'activation et d'agrégation peuvent être distinguées :

- Celle de l'ADP ou de l'adrénaline qui induit l'agrégation en l'absence de sécrétion (Skosa L. et coll., 1967)

L'ADP interagit avec des récepteurs membranaires (récepteurs primaires) de la plaquette au repos et induit le changement de forme. Cette étape est indépendante du Ca^{++} exogène et conduit à l'expression de récepteurs secondaires. Le fibrinogène, molécule symétrique bivalente, réagit avec les récepteurs secondaires de deux plaquettes adjacentes et crée des pontages protéiques responsables de l'agrégation, cette étape étant Ca dépendante.

- Celle de la thrombine, du collagène et des thromboxanes qui induisent l'agrégation plaquettaire sécrétion dépendante (Packham M. et coll., 1973)

En effet, la thrombine en l'absence de tout cofacteur exogène déclenche la synthèse de thromboxanes et la sécrétion des constituants de tous les granules de stockage.

Mais si l'on bloque ces deux voies par des inhibiteurs appropriés (Adénosine, Aspirine) il est encore possible dans certaines conditions d'activer les plaquettes. Une molécule de découverte plus récente le Platelet Activating Factor

(PAF) serait alors responsable de l'activation plaquettaire (Benveniste J. et coll., 1975).

Rôle des glycoprotéines membranaires dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires

L'adhésion et l'agrégation plaquettaires constituent deux exemples d'interactions cellulaires médiées par des glycoprotéines membranaires (Nurden A. et Caen J.P., 1975).

La glycoprotéine Ib

De PM 170 000, elle est formée de deux sous-unités $Ib\alpha$ et $Ib\beta$ reliées entre elles par une ou plusieurs liaisons disulfures. L'absence de la Gp Ib des plaquettes de patients atteints de la maladie de Bernard-Soulier, désordre congénital caractérisé par une incapacité des plaquettes à adhérer au sous-endothélium et à s'agglutiner en présence de facteur von Willebrand et de ristocétine a suggéré un rôle fonctionnel de la Gp Ib dans ces mécanismes (Jenkins C. et coll., 1976) et de nombreux arguments sont en faveur de la Gp Ib comme récepteur du facteur vWF cofacteur plasmatique indispensable à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium.

Les glycoprotéines IIb et IIIa

La Gp IIIa est formée d'une seule chaîne polypeptidique de PM 96 000 alors que la IIb de PM 142 000 est formée de deux sous-unités $IIb\alpha$ et $IIb\beta$ reliées par ponts disulfures. Ces glycoprotéines existent sous forme de complexe et le Ca^{++} joue un rôle important dans la formation de ce complexe.

Ces glycoprotéines sont absentes dans le cas des plaquettes de thrombasthéniques incapables d'agrégger entre elles et de lier le fibrinogène. Le récepteur n'est fonctionnel que si les glycoprotéines sont associées en complexe (Gogstad G. et coll., 1982; Nachman R. et coll., 1984).

Les protéines adhésives cofacteurs des interactions plaquettaires

Parmi les protéines adhésives qui interviennent dans l'hémostase, le fibrinogène, le vWF, la fibronectine et la thrombospondine, présentent un intérêt particulier. Ce sont des glycoprotéines plasmatiques de haut poids moléculaire présentes dans les granules des plaquettes et révélées au cours de l'activation plaquettaire. Chacune de ces protéines semble intervenir dans le mécanisme d'adhésion et d'agrégation plaquettaire.

Le fibrinogène

De PM 340 000, c'est une molécule dimérique, formée de 6 chaînes polypeptidiques, et identiques 2 à 2. Après l'activation des plaquettes par l'ADP, des récepteurs spécifiques du fibrinogène sont exprimés. En l'absence de Ca⁺⁺ exogène, 4700 molécules de fibrinogène interagissent avec chaque plaquette activée. L'addition de Ca⁺⁺ exogène fait augmenter ce chiffre à 40 000 molécules.

La fibronectine

De PM 445 000, formée de deux chaînes polypeptidiques de 220 000 et 215 000, elle est synthétisée par les fibroblastes et les cellules endothéliales. L'activation des plaquettes par la thrombine mais non par l'ADP expose des récepteurs membranaires spécifiques pour la fibronectine. Environ 120 000 molécules de fibronectine exogène peuvent se fixer par plaquette.

Le facteur Von Willebrand (vWF)

C'est une glycoprotéine multimérique dont le PM varie entre 8.10^5 et 2.10^6 . L'activation des plaquettes par la thrombine provoque la libération du vWF dont les multimères de haut PM se réassocient à la membrane plasmique en présence de Ca⁺⁺. L'expression des récepteurs pour le facteur vWF est induite aussi bien par l'ADP que par la thrombine. Il existe aussi à côté de la Gp Ib un deuxième type de récepteur pour le vWF qui ne sont exposés qu'après activation plaquettaire. L'expression de ces derniers récepteurs semble dépendre des Gp IIb

et IIIa puisqu'un anticorps monoclonal anti IIb-IIIa inhibe la liaison du facteur vWF aux plaquettes activées.

La thrombospondine

C'est une molécule polymérique, formée de trois chaînes polypeptidiques reliées entre elles par des ponts disulfures. Les trois chaînes ont un PM identique de 190 000. Les plaquettes activées par la thrombine expriment une activité lectine capable d'agglutiner les globules rouges de boeuf ou de mouton. Cette activité hémagglutinante est inhibée par l'arginine, la lysine et les sucres aminés. Le fait que ces mêmes substances sont également des inhibiteurs de l'agrégation induite par la thrombine suggère un rôle fonctionnel important de cette lectine dans l'agrégation plaquettaire. Récemment, la thrombospondine a été identifiée comme étant l'activité lectine endogène des plaquettes (Jaffe E. et coll., 1982). La preuve définitive du rôle de la thrombospondine dans l'agrégation des plaquettes induite par la thrombine a été donnée puisque des fragments Fab anti-thrombospondine inhibent de façon spécifique l'agrégation des plaquettes par la thrombine.

IV. LES ANOMALIES PLAQUETTAIRES

Constitutionnelles ou acquises, les anomalies plaquettaires peuvent être d'ordre quantitatif ou qualitatif. On peut distinguer:

1. LES THROMBOPENIES

Les thrombopénies sont caractérisées par une baisse des plaquettes dont le taux est inférieur à 100 000/mm³. Elles peuvent être dues soit à un défaut de production (origine centrale) soit à une hyperdestruction (origine périphérique).

- *L'insuffisance de production* peut être:

*d'origine familiale: syndrome d'Aldrich, maladie de Fanconi
anomalie de May-Hegglin.

ou * être de forme acquise : aplasies médullaires médicamenteuses ou toxiques (professionnelles, solvants, rayonnements ionisants), carences en acide folique ou vitamine B12.

- *L'hyperdestruction*

Le purpura, engendré par la thrombopénie peut être:

*immunologique après un épisode infectieux (angine, rhinopharyngite, varicelle, rubéole).

ou *d'origine médicamenteuse et d'installation rapide.

2. LES HYPERPLAQUETTOSES

Lorsque le chiffre des plaquettes circulantes est supérieur à 500 000/mm³, on parle de:

- *Thrombocytoses*

quand le taux est inférieur à 1 000 000/mm³ ce qui correspond à un état réactionnel et transitoire après une splénectomie ou un épisode infectieux.

- *Thrombocytémies*

quand le taux est supérieur à 1 000 000/mm³. Elles s'accompagnent d'une hyperplasie des mégacaryocytes. L'étiologie peut en être primitive (thrombocytémie essentielle rare), ou révélatrice d'un syndrome myéloprolifératif.

3. LES THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES

Sont celles qui présentent une anomalie au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des composants intraplaquettaires et qui s'accompagnent d'un défaut d'adhésion ou d'agrégation.

Le syndrome de Bernard-Soulier

Maladie hémorragique rare transmise selon le mode autosomique récessif. Elle se caractérise par une thrombopénie modérée, des hémorragies spontanées et un

allongement du temps de saignement. Les plaquettes, de taille géante, à nombre de granules denses augmenté n'adhèrent pas au sous-endothélium *in vitro* mais présentent une agrégation normale à l'ADP et au collagène. Leur principal défaut biochimique est l'absence de Gp Ib, V et IX.

La thrombasthénie de Glanzman

Maladie hémorragique rare également transmise selon le mode autosomal récessif. Le nombre de plaquettes est normal mais ces cellules ont un déficit complet d'agrégation. Du point de vue biochimique, il y a déficit en Gp IIb et IIIa. On note une certaine hétérogénéité au niveau des déficits fonctionnels et biochimiques, ce qui permet d'envisager l'existence de deux types de thrombasthénies:

- *Le type I caractérisé par une absence totale de IIb et IIIa et une rétraction du caillot nulle.
- *Le type II caractérisé par une présence de 10 à 15 % des Gp IIb et IIIa sur la plaquette et une rétraction du caillot normale.

Le syndrome des plaquettes grises

Maladie héréditaire grave caractérisée par une thrombopénie et une tendance hémorragique. Adhésion et agrégation sont normales. L'anomalie majeure de ces plaquettes est le défaut de libération des constituants protéiques du granule dû à une absence de granules α .

La maladie du pool vide

Très rarement observée à ce jour. Le temps de saignement est allongé. L'agrégation en présence de collagène est nulle ou très diminuée. Il s'agit d'une diminution du contenu des corps denses en nucléotides (ADP).

V. DES PARASITES AUX MALADIES ALLERGIQUES: DE NOUVELLES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

1. PLAQUETTES ET PARASITES

L'étude des mécanismes de défense contre les parasites helminthes et particulièrement contre les schistosomes a démontré le rôle crucial des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps avec une participation privilégiée des macrophages et des éosinophiles et l'aide d'anticorps anaphylactiques (Capron M. et Capron A., 1986). Dans le cadre de ces recherches, l'implication des plaquettes sanguines dans la mort des jeunes larves d'helminthes a pu être démontrée.

a. Schistosomiase

Des plaquettes prélevées à des rats infectés par *Schistosoma mansoni* ou à des patients atteints de schistosomiase sont capables de tuer *in vitro* les jeunes larves de schistosomes (schistosomules), alors que les plaquettes de rats ou de donneurs sains n'ont pas cette faculté (Joseph M. et coll., 1983). Il est apparu que ces plaquettes peuvent acquérir des propriétés cytotoxiques en présence du sérum d'individus infectés. Cependant, après immunoabsorption des IgE de ces sérums immuns ou préincubation des plaquettes des individus sains avec une IgE myelomateuse non spécifique cet effet n'est plus observé, suggérant ainsi une implication des IgE dans ce mécanisme. Cette activation IgE-dépendante des plaquettes fait intervenir un récepteur spécifique pour cet isotype sur la membrane plaquettaire et conduit donc à la libération de médiateurs léthaux pour les schistosomes (Joseph M. et coll., 1986). Il est intéressant de noter que ce récepteur, qui permet la participation de la plaquette, au même titre que le monocyte, le macrophage et l'éosinophile, aux mécanismes de défense antiparasitaire présente de multiples analogies avec le récepteur de faible affinité pour l'IgE ($K_a = 10^{-7} M^{-1}$) ou $Fc\epsilon RII$ de ces cellules inflammatoires (Capron A. et coll., 1986), récepteur différent du récepteur de forte affinité pour l'IgE ou $Fc\epsilon RI$ des basophiles et des mastocytes. Ce récepteur plaquettaire

pour l'IgE présente une particularité: en effet, l'étude de patients atteints de thrombopathies héréditaires et l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de certaines glycoprotéines de la membrane plaquettaire ont permis de mettre en évidence une association étroite entre le récepteur plaquettaire pour l'IgE et le complexe glycoprotéinique IIb IIIa qui joue un rôle majeur dans les mécanismes d'agrégation plaquettaire et l'hémostase (Ameisen J.C. et coll., 1986).

La pertinence *in vivo* de cet effet cytotoxique des plaquettes a pu être établie dans le cas de la schistosomiase expérimentale du rat. En effet, les plaquettes d'animaux immuns transférées passivement à des rats sains protègent ceux-ci d'une infestation ultérieure par *S. mansoni* (Joseph M. et coll., 1983).

Un contact étroit entre plaquettes et schistosomules n'est pas nécessaire puisque la cytotoxicité peut-être obtenue même si un filtre de 0,2 µ de porosité sépare les effecteurs des cibles (Joseph M. et coll., 1984). Ceci implique la génération de médiateurs cytocides induite par la liaison des antigènes parasites solubles aux IgE spécifiques fixées à la surface de la plaquette. Ces médiateurs cytocides n'ont pas été identifiés à ce jour mais on s'oriente vers l'hypothèse d'une émission de radicaux libres dépendants de l'oxygène par la plaquette. D'autre part l'interaction de l'IgE *in vitro* avec des plaquettes humaines ou de rats aboutit à la production de métabolites de l'oxygène, quantifiée par chimiluminescence, dans les mêmes conditions où l'on induit une cytotoxicité plaquettaire. Ainsi, l'émission de lumière est obtenue quand les plaquettes immunes (ou les plaquettes normales prétraitées par le sérum d'individus immuns) sont incubées avec le ligand spécifique de l'IgE fixée à la surface plaquettaire (anti-IgE ou antigènes parasites) (Joseph M. et coll., 1985).

b.Filariose

Des observations similaires ont été faites dans le cas des filarioSES. En effet des plaquettes de rats sains sont capables de tuer *in vitro* des microfilaries de *Dipetalonema viteae* lorsqu'on les met en présence du sérum de rats infectés par *D. viteae*. Ce mécanisme de destruction, où les IgE sont à nouveau impliquées, n'est spécifique ni du stade ni de l'espèce puisque des microfilaries (L_1) de *Brugia malayi* ou de *Loa loa* et des larves infestantes (L_3) de *D. viteae* ou de

B. malayi peuvent être tuées par des plaquettes incubées avec des IgE anti *D. viteae* (Haque A. et coll., 1985).

D'autre part des expériences préliminaires suggèrent l'existence d'une cytotoxicité IgE-dépendante des plaquettes humaines au cours des infections filariennes.

Ces résultats amenaient à reconsidérer le mode d'action de la diéthylcarbamazine (DEC), une drogue connue depuis 40 ans et utilisée dans le traitement des filariose. Aucun mécanisme, jusqu'à présent, n'avait été proposé pour expliquer l'action rapide et efficace de ce composé sur les microfilaries du sang. Il a été montré récemment que la DEC exerce probablement son effet curatif par les plaquettes, en présence d'un signal additionnel représenté par un antigène excrété par les filaires. Ce mécanisme est indépendant d'anticorps et implique la participation de radicaux libres (Cesbron J.Y. et coll., 1987).

c. Trypanosomiase

Des études réalisées chez des souris infectées par *Trypanosoma musculi* ont révélé l'existence *in vitro* d'une interaction entre plaquettes et trypanosomes, interaction aboutissant à la mort en quelques minutes puis à la lyse du parasite mais aucune hypothèse suggérant un support de cette activité par un facteur sérique n'a été avancée (Viens P. et coll., 1983).

2. PLAQUETTES, ALLERGIE ET ASTHME

Un certain nombre de travaux antérieurs ont suggéré la possibilité d'une participation indirecte des plaquettes aux pathologies de l'hypersensibilité immédiate et particulièrement à l'asthme.

Chez les patients présentant des maladies allergiques et en particulier un asthme, le pourcentage de plaquettes portant un récepteur pour l'IgE est augmenté et les plaquettes peuvent être directement activées *in vitro* par l'addition de l'allergène correspondant.

- En effet, les plaquettes de patients présentant un asthme induit par les pollens, ayant des tests cutanés positifs à l'allergène et des taux élevés d'IgE

spécifique produisent des métabolites de l'oxygène, quantifiables par chimioluminescence, lorsqu'elles sont incubées avec de l'anti-IgE où l'allergène spécifique purifié mais pas avec de l'anti-IgG ou des allergènes non spécifiques (Joseph M. et coll., 1984). Dans chaque cas ou une chimioluminescence peut être induite, les mêmes plaquettes sécrètent des médiateurs cytoides conduisant à la mort des cibles parasitaires. Des résultats similaires peuvent être obtenus avec les plaquettes de donneurs sains incubées avec le sérum de patients allergiques et mises en présence d'anti-IgE ou de l'allergène spécifique. La disparition de ces effets après immunoabsorption des IgE du sérum ou après préincubation des plaquettes avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-Fc ϵ RII démontre là encore une implication des IgE (Joseph M. et coll., 1986).

- De façon identique, les plaquettes de patients présentant une hypersensibilité aux venins d'hyménoptères (guêpe ou abeille) génèrent des quantités significatives de métabolites de l'oxygène et excrètent des médiateurs cytotoxiques pour les larves parasitaires après l'addition des allergènes purifiés (Joseph M. et coll., 1986). Cependant, en ce qui concerne cette pathologie, la plus importante observation reste la totale disparition de l'émission de lumière ou de la génération de médiateurs cytotoxiques après la désensibilisation de ces patients obtenue après immunothérapie spécifique (Tsicopoulos A. et coll., 1987).

Ainsi la fonction cytotoxique antiparasitaire n'est qu'un des témoins de l'activation des plaquettes dans les processus pathologiques où interviennent des anticorps anaphylactiques. Ces observations suggèrent la possibilité d'une participation directe, jusqu'alors insoupçonnée des plaquettes, par l' intermédiaire de leur récepteur pour l'IgE, à la pathogénie des maladies allergiques. L'identification des médiateurs libérés par les plaquettes devrait permettre de mieux apprécier le rôle que peuvent jouer ces cellules dans ces affections.

- D'autre part, des études récentes concernant un syndrome asthmatique d'origine non immunologique , l'asthme à l'aspirine , laissent entrevoir la possibilité d'un rôle plus général de la plaquette dans la maladie asthmatique. Les plaquettes de patients asthmatiques à l'aspirine présentent une anomalie fonctionnelle spécifique, caractérisée par la libération de médiateurs cytocides à l'égard de parasites et la génération de métabolites de l'oxygène, en présence des antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS) dont l'ingestion provoque chez ces malades des crises d'asthme (Ameisen J.C. et coll., 1985). Cette réponse anormale n'est pas d'origine immunologique, mais en rapport avec l'effet de ces médicaments sur le métabolisme de l'acide arachidonique et semble restreinte aux plaquettes puisqu'elle n'est obtenue, ni avec les leucocytes totaux ni avec leur population purifiée (Ameisen J.C. et coll.,1986).

Ces résultats suggèrent que les capacités fonctionnelles plaquettaires mises en jeu par les mécanismes IgE-dépendants peuvent aussi participer à des états pathologiques non immunologiques.

3.PLAQUETTES ET INFLAMMATION

Les observations précédentes suggéraient l'existence d'un rôle général des plaquettes dans les processus de défense de l'organisme. Il a été montré que les thrombocytes peuvent participer à la réponse immunoinflammatoire (Oxolm P. et Winther K., 1986) et sont impliqués dans certains types d'inflammations chroniques (Willis A., 1978). D'autre part, on peut les retrouver au niveau des lésions inflammatoires ou dans les exudats inflammatoires (Kravis T. et Henson P., 1977; Zawilska K. et coll., 1973).

Récemment D. Bout et coll. (1986) ont démontré qu'une protéine majeure de l'inflammation, la Protéine C-Réactive (CRP), était aussi capable, par un mécanisme indépendant d'anticorps, de conférer aux plaquettes humaines comme aux plaquettes de rats des propriétés cytotoxiques antiparasitaires .

4. AUTRES TRAVAUX

Dès 1958, on a parlé des propriétés bactéricides des thrombocytes (Shulman N., 1958; Kahn R. et Flinton L., 1974) puis plus tard d'une participation des plaquettes et d'anticorps d'isotypes variés à l'inhibition de croissance des tumeurs et à la lyse cellulaire (Soper W. et coll., 1982; Ibele G. et coll., 1985).

V. CONCLUSION

Cet ensemble d'observations met en évidence de nouveaux mécanismes d'activation et de nouvelles fonctions plaquettaires. Les plaquettes apparaissent ainsi bénéfiques dans le cadre des défenses de l'organisme et néfastes dans la genèse des maladies allergiques, dualité qui se manifeste aussi dans sa double participation à l'hémostase et à la maladie thrombotique. On entrevoit ainsi un rôle possible des plaquettes dans de nombreux processus pathologiques, rendant d'autant plus importante l'analyse d'une régulation de leurs fonctions par les lymphocytes et leurs produits.

TRAVAUX PERSONNELS

Lorsque nous avons débuté ce travail, la question essentielle que nous nous sommes posée était la suivante: **Est ce que, comme c'est le cas pour les autres cellules immunocompétentes, les fonctions effectrices des plaquettes peuvent être régulées par les lymphocytes T et ceci par l'intermédiaire de lymphokines libérées après stimulation par des mitogènes ou des antigènes correspondant à leur spécificité ?**

Notre modèle d'étude principal a été le paramètre de la cytotoxicité développée par les plaquettes sanguines à l'encontre des jeunes larves de parasites helminthes.

La première partie de ce travail a été consacrée à la mise en évidence d'un facteur capable *in vitro* comme *in vivo* d'inhiber les fonctions cytotoxiques des plaquettes vis-à-vis des larves parasitaires. Dans une seconde partie nous avons abordé l'étude d'une lymphokine capable non seulement d'induire les fonctions cytotoxiques des plaquettes mais aussi d'entraîner une modification de l'expression du récepteur pour l'IgE à la surface de la plaquette.

Article 1**Une lymphokine suppressive des fonctions cytotoxiques plaquettaires.**

Dans ce premier article nous avons étudié l'effet de surnageants obtenus après stimulation des lymphocytes de sujets normaux par mitogène (Con A) ou des lymphocytes d'un patient atteint d'échinococcose par antigène spécifique (*E. granulosus*) sur la cytotoxicité plaquettaire développée à l'encontre des larves du parasite *Schistosoma mansoni*.

C'est ainsi que nous avons mis en évidence la production par des lymphocytes CD4⁻CD8⁺ d'un facteur capable d'inhiber l'activité cytotoxique IgE-dépendante des plaquettes. La production de métabolites de l'oxygène par ces mêmes cellules stimulées par une réaction IgE-anti-IgE est également complètement inhibée par cette lymphokine que nous avons nommée **PASL** pour **Platelet Activity Suppressive Lymphokine**.

L'étude préliminaire des caractéristiques physicochimiques de ce facteur a permis de montrer que la PASL de MM de 15-20 kDa, d'un pH de 4,6 est thermo- et acido-stable, sensible à la trypsine et à la protéinase K mais que le traitement à la neuraminidase ne modifie pas l'effet inhibiteur.

L'activité suppressive est absorbée par un culot plaquettaire et non par d'autres lignées cellulaires (K 562, U 937, myelome à IgE) ou population cellulaire (macrophages bronchoalvéolaires) testées, ce qui suggère l'existence d'un récepteur pour la **PASL** sur la membrane des plaquettes et sa possible spécificité pour cette cellule.

En résumé, la PASL, polypeptide produit par une sous population lymphocytaire suppressive, est capable de moduler les fonctions effectrices des plaquettes sanguines en agissant probablement par le biais d'un récepteur spécifique présent à la surface de ces cellules.

Les articles 2 et 3 sont présentés page 58.

0022-1767/86/1372-0585\$02.00/0

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Copyright © 1986 by The American Association of Immunologists

Vol. 137, No. 2, July 15, 1986
Printed in U.S.A.A SUPPRESSIVE LYMPHOKINE OF PLATELET CYTOTOXIC FUNCTIONS¹VÉRONIQUE PANCRÉ,² CLAUDE AURIAULT, MICHEL JOSEPH, JEAN-YVES CESBRON,
JEAN-PIERRE KUSNIERZ, AND ANDRÉ CAPRON

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Pr A. Calmette, 59019 Lille Cedex, France

The in vitro stimulation of mononuclear cells from human peripheral blood with mitogens is known to induce the release of factors (monokines and lymphokines) that possess distinct biologic activities. The present data describe the presence in Con A- and antigen-stimulated T cell supernatants (of man or rat) of a factor able to inhibit, in a dose-dependent manner, the platelet cytotoxicity toward the young larvae of *Schistosoma mansoni*. The production of oxygen metabolites by IgE-coated platelets, stimulated by anti-IgE or the specific antigen, was, likewise, strongly inhibited by this lymphokine. The producing T lymphocyte subpopulation was identified as OKT 8*. This suppressive lymphokine of platelet functions had an m.w. of 15,000 to 20,000 and a pI of 4.6. It was heat- and acid-stable and sensitive to trypsin and proteinase K, but neuraminidase had no effect on its activity. This platelet suppressive activity was specifically absorbed by platelet membrane, suggesting its action through the binding to a receptor.

A variety of factors have been identified that enhance immune response, such as transfer factor (1), lymphocyte mitogenic factor(s) (2), interferon (3, 4), and leukocyte chemotactic factor (5). In addition, other soluble mediators that specifically inhibit the immune response have been characterized, including lymphotoxins (6), interferon (7, 8), migration inhibitory factor (MIF)³ (9, 10), and soluble immune response suppressor (SIRS) (11, 12). Recently, platelets have been shown to exhibit killing properties against larvae of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo (13–15). The protective mechanism described in this parasitic disease required the presence of specific IgE antibodies that interacted with a membrane receptor on blood platelets. The interaction of membrane-bound IgE with the specific antigen led to the production of cytoidal factors, among which oxygen metabolites were measured by chemiluminescence (14, 15). These findings have extended our knowledge of blood platelets by their

implication in the anti-parasite immunity and by opening new immunologic potentialities. The question arose whether, like other immune cells, platelets could be regulated by lymphokines. Therefore, we studied the effect of Con A- and antigen-stimulated T cell supernatants on platelet cytotoxicity and chemiluminescence. This resulted in the demonstration and the characterization of a lymphokine able to modulate the effector functions of blood platelets.

MATERIALS AND METHODS

Chemical. Luminol was purchased from Serva (Heidelberg, West Germany); D-luciferin from *Photinus pyralis* was obtained from Boehringer (Mannheim, West Germany); prostaglandin E1 (PGE1) and horseradish peroxidase type I were obtained from Sigma (St. Louis, MO); *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Apis mellifera*, and *Vespa* allergens were supplied by Laboratoire des Stalergènes (94260 Fresnes, France). Purified interferon-γ was a gift from Dr. Falloff (Institut Curie, Paris, France).

Immunoglobulins and immunologic reagents. Human γ-globulin fraction II was obtained from Miles Laboratories (Eikhart, IN); goat polyclonal anti-human IgE antiserum and rabbit FITC-conjugated IgG anti-mouse IgG were provided by Miles-Yeda (Rehovot, Israel); monoclonal antibodies OKT3, OKT4, OKT8, OKM1, and OKL1 were obtained from Ortho Diagnostic Systems Inc. (Raritan, NJ, USA); and mouse polyclonal anti-human IgG was produced in our laboratory.

Lymphocyte culture medium. For all cultures, RPMI-1640 (Flow Laboratories, Asnières, France) was supplemented with 5.10⁻³ M 2-β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 2 mM Glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Courbevoie, France), antibiotics (1000 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin), 10 mM HEPES (Sigma, St. Louis, MO), and 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco) (RPMI-FCS).

Enrichment of T cells. For human T cells, 3 sources were used: a) the spleen from a patient with echinococcosis, squeezed in RPMI-FCS. The cell suspension was treated with ammonium chloride for 5 min in the cold; b) tonsils from normal patients; and c) venous blood from healthy adult volunteers was diluted with an equal volume of PBS, layered on a Ficoll gradient, and centrifuged for 45 min at 500 × G. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), washed three times with PBS, were enriched in T cells by passing through an IgG-anti-IgG-coated glass bead column. Fisher rat T cells were obtained by squeezing the mesenteric and splenic lymph nodes in RPMI-FCS and passing the cell suspension through a nylon wool column. The cell suspension was treated with ammonium chloride (0.15 M) in the cold.

The enriched T cell population was controlled by flow cytometry with the use of monoclonal antibodies against T cell subsets: OKT3 (for pan T), OKT4 (for helper/inducer), OKT8 (for suppressor/killer), OKM1 (for monocytes), and OKL1 (for B cells) as control. Enriched T cells, suspended in PBS at 5.10⁶ cells/ml, were incubated with monoclonal antibody for 30 min at 4°C, washed three times with PBS, and then labeled with fluorescein-conjugated rabbit antibodies to mouse IgG. The population of fluorescein-labeled cells was quantified by an automated biologic cell analysis and sorting system (50-H Cytofluorograf Ortho Instrument, Westwood, MA). The enriched T cell population contained 56% OKT3*, 38% OKT4*, 15% OKT8*, 0.1% OKM1*, and 0% OKL1*.

Depletion of T cell subsets. For depletion of T cell subsets, a complement-dependent cytotoxicity assay with specific monoclonal antibody was performed. T cells were incubated with 1/40 diluted

Received for publication January 28, 1986.

Accepted for publication April 15, 1986.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

*This work was supported by INSERM 167-CNRS 624.

Address correspondence to: Véronique Pancré, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, B.P. 245, 59019 LILLE CEDEX (France).

³Abbreviations used in this paper: EMEM, Eagle's minimum essential medium; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; MIF, migration inhibitory factor; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin; pl, isoelectric point.

PLATELET ACTIVITY SUPPRESSIVE LYMPHOKINE

monoclonal antibodies against T cell subset (OKT4 or OKT8) for 30 min at 4°C, washed with PBS, pH 7.4, and then incubated for 60 min at 37°C in the presence of 1/2 diluted rabbit serum as a source of complement. The efficiency of the depletion was controlled by flow cytometry with the use of fluorescein-labeled monoclonal antibodies specific for T cell subsets by the procedure described above. Helper cell-depleted T populations contained 10% OKT4⁺ and 73% OKT8⁺ cells. Suppressive cell-depleted T populations contained 4% OKT8⁺ and 75% OKT4⁺ cells.

Indomethacin treatment. In some experiments, human T cells were cultured with indomethacin (10⁻⁵ M final concentration) (Sigma, St. Louis, MO) in the presence of 1- to 5-μg Con A/ml. After 24 hr, the culture supernatants were harvested, filtered through 0.22-μm membranes (Millipore), and stored at -20°C.

Preparation of T lymphocyte supernatants. By mitogenic stimulation: Human tonsil or peripheral T cells 3.10⁶ in RPMI-FCS were incubated with Con A (0.01 to 5 μg/ml) at 37°C in flat-bottom culture clusters (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 hr in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were then washed in order to eliminate Con A and were cultured for 24 hr. Supernatants from each well were recovered, centrifuged at 400 × G, and filtered through 0.22-μm membranes before storage at -20°C until use. Rat lymph node lymphocytes, 1.10⁶, were used. The supernatants were prepared by the procedure described above.

By antigenic stimulation: The human T cell stimulation from the patient with echinococcosis was performed in RPMI-FCS by addition of crude extracts from *Echinococcus granulosus* (5-, 40-, or 100-μg/ml final concentration) in the presence of autologous irradiated (2000 rad, 2 min) PBMC. After 24 hr in a humidified atmosphere, cells were washed in order to eliminate the extracts and cultured for 4 days. The culture supernatant was recovered, filtered through a 0.22-μm membrane, and stored at -20°C.

T cells obtained from *S. mansoni* infected rat lymph nodes (14, 35, or 56 days of infection) were incubated in RPMI-FCS supplemented with IL2 (prepared in our laboratory), rat irradiated thymic cells (APC), and *S. mansoni* adult worm antigen (prepared in our laboratory) (50 μg/ml final concentration) in flat-bottom culture clusters in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. This stimulation was performed every 5 days, and at the 15th day supernatants were recovered, centrifuged to remove any contaminating cells, and filtered through 0.22-μm membranes before storage at -20°C. Simultaneously, the proliferative response of the T cells was measured in these conditions, after a 16-hr pulse with 1 μCi of [³H]thymidine (1 Ci/mmol CEA), the incorporated radioactivity was determined by filtrating the culture through Millipore membranes and counting the filters in a liquid scintillation fluid in a betaspectrometer (ISOCAP 300, Nuclear Chicago Division).

Platelet isolation. The overall procedure for isolation of platelets was carried out at room temperature. Human venous blood (6 vol) collected on ACD-C (1 vol) (16) was centrifuged for 15 min at 120 × G in 5-ml aliquots; the platelet-rich plasma (PRP) was collected in a single volume and centrifuged at 2000 × G for 15 min. Avoiding the recovery of the lowest part of the pellet when contaminated with red cells, the platelets were resuspended for three washing steps at 2000 × G in saline supplemented with citric acid (36 mM), glucose (5 mM), calcium (2 mM), magnesium (1 mM), BSA (0.35%), and PGE1 (100 nM) (17, 18). The last pellet was resuspended, and the platelets were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after a 1/20 dilution with 1% ammonium oxalate and were adjusted to the appropriate concentration.

Platelets isolated from normal rats were prepared from 2-ml heparinized blood, diluted with 3-ml heparinized Eagle's minimum essential medium (EMEM), and centrifuged for 15 min at 4°C and 400 × G. Platelets in the supernatant were washed with heparinized EMEM and centrifuged for 20 min at 4°C and 5000 × G. They were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after a 1/20 dilution in London stain.

The observation of undiluted platelet suspensions with interference contrast microscopy repeatedly confirmed that the leukocyte contamination never exceeded 10 per 10⁶ platelets.

Anti-schistosome cytotoxicity. The platelets were isolated by the procedure described above. At the end of the washing steps, the pellet was resuspended in EMEM. Human, 150.10⁶, or rat, 200.10⁶, platelets from uninfected individuals were incubated in flat-bottom microplates (Nunc) in 50-μl MEM supplemented with 20-μl serum either from normal individuals or from patients and rats with schistosomiasis, 50 μl of lymphocyte supernatant or MEM, and 75 *S. mansoni* schistosomula in 80-μl EMEM. After 24 hr at 37°C in 5% CO₂ in air, motionless and dark dead larvae were easily distinguished from mobile and refringent living schistosomula by optical microscopy (14, 15). The experimental procedure was identical for platelets from allergic patients and for platelets from healthy donors incubated with 20-μl serum from allergic asthmatics with high levels of

circulating IgE. The killing process, in this latter case, was induced by the addition of either anti-IgE (sheep polyclonal anti-human IgE: 10-μg IgG/ml) or the allergen specific to the patient sensitivity (*D. pteronyssinus*, *A. mellifera*, *Vespa*: 10 ng/ml). Each experiment was made in duplicate, and results expressed as the mean ± SD of dead larvae. Occasionally, platelets could also be separated from the target larvae by a 0.2-μm polycarbonate filter (Nuclepore, Pleasanton, CA) in chemotaxis blind well chambers (14).

Chemiluminescence. The generation of oxygen metabolites by platelets was estimated by chemiluminescence in a modification of an enhancing procedure (14, 15). A 1-hr incubation of 3.10⁷ platelets in 200 μl of PBS with 50 μl of lymphocyte supernatant or medium was followed after washing by a 30-min incubation of the same platelets with 20-μl IgE-rich serum from allergic asthmatics. Platelets were centrifuged for 15 min at 200 × G in the washing medium and resuspended in PBS, pH 7.7. To 5.10⁵ platelets in PBS were added luminol (418 μM final concentration), luciferin (30 μM final concentration), horseradish peroxidase (720 mU), and the triggering reagent (allergen or anti-IgE) in a final volume of 200 μl. Results in millivolts were the maximum value of light emission obtained during 5-min measures in a Nucleotimer 107 (Interbio, 95500 Le Thillay, France). The observed chemiluminescence was a consequence of the stimulation of the platelets themselves and not of contaminating cells, as verified by the absence of light emission with purified leukocytes in the reagents used. The inhibition of luminescence by lymphocyte supernatants was controlled over a 20-min period.

Enzyme treatment. Trypsin digestion was carried out by incubating supernatants with 11-U trypsin/ml (Boehringer, Mannheim, West Germany) for 3 hr at 37°C. Proteinase K treatment was performed by adding 2-U proteinase K/ml (Boehringer) for 1 hr at 37°C. Neuraminidase treatment was performed by adding 0.43-IU neuraminidase/ml (Sigma, St. Louis, MO) for 1 hr at 37°C.

Sephadex G-75 filtration. The concentrated Con A supernatant (2 ml) was filtered through a Sephadex G-75 column (1.8 × 38 cm) and eluted with PBS at a flow rate of 5 ml/hr. The lymphokine activity of each fraction (5 ml) was assayed as described above. To determine the m.w. of the lymphokine, the chromatogram was calibrated with a low m.w. calibration kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) containing bovine serum albumin (BSA m.w. 67,000), ovalbumin (m.w. 43,000), chymotrypsinogen A (m.w. 25,000), and ribonuclease A (m.w. 13,700).

Isoelectric focusing. Preparative horizontal-bed isoelectric focusing was carried out with an LKB Multiphor apparatus. Focusing of the lymphocyte supernatant was performed in a 10-ml bed of Sephadex G-75 containing 5% carrier ampholines, pH range 1 to 13, for 16 hr at 8-W constant power. The gel bed was divided into 30 sections with a LKB template. Each gel fraction was eluted with 2-ml water in 10-ml syringe barrels fitted with a porous plastic sinter. After direct pH determination, the eluted fractions were dialysed overnight against PBS 0.1 M, pH 7.0, containing 0.15 M NaCl to remove ampholines. Each fraction was tested for its suppressive activity.

RESULTS

Effect of supernatant on platelet cytotoxicity. The supernatants obtained after stimulating normal human peripheral or tonsil T lymphocytes by Con A (0.01 to 5 μg/ml), or splenic T lymphocytes from a patient with echinococcosis by antigens from *E. granulosus* (5 to 100 μg/ml), have been tested in cytotoxic processes of platelet towards schistosomula (Table I).

A 60% inhibition was observed in the presence of such supernatants when normal platelets, incubated with the serum of patients with schistosomiasis, were used as effector cells. Moreover, the same inhibition was observed when supernatant-treated platelets were incubated in the sera of allergic patients with high level of circulating IgE and stimulated by anti-IgE or by the specific allergen. The supernatants were active directly on platelet functions and not by a protection of the targets, because the separate preincubation of the effector platelets or of the schistosomula with the T lymphocyte supernatants, followed by a cytotoxicity assay in which platelets and parasites were separated by a 0.2-μm polycarbonate membrane, led to the expected inhibition only

PLATELET ACTIVITY SUPPRESSIVE LYMPHOKINE

587

TABLE I
Effect of PASL on IgE-dependent anti-parasite cytotoxicity of rat and human platelets from infected and allergic individuals^a

Cytotoxicity	Man ^b	Rat ^c
	A	B
In activating medium	72.7 ± 2.9	81.7 ± 5.5
With ConA supernatant	20.5 ± 2.1	22.1 ± 4.0
With Ag supernatant	35.0 ± 15.0	33.6 ± 6.1
With lymphocyte culture medium	70.2 ± 3.2	81.5 ± 4.6
		78.0 ± 7.0

^a In all cases, platelet cytotoxicity with normal human or rat sera never exceed 9.5 ± 7.3.

^b Purified platelets were incubated with serum A (from patients with schistosomiasis mansoni) or B (from allergic donors) in the presence of S. mansoni larvae (schistosomula). Lymphocyte supernatant or lymphocyte culture medium and anti-IgE or the corresponding allergen in the case of incubation in serum from allergic donors were added, and the cytotoxicity was appreciated as percent of dead schistosomula at the end of a 24-hr incubation at 37°C (mean ± SD).

^c Purified platelets were incubated with serum from rats with schistosomiasis mansoni in the presence of S. mansoni larvae (schistosomula). Lymphocyte supernatant or lymphocyte culture medium was added, and cytotoxicity was appreciated as percent of dead schistosomula at the end of a 24-hr incubation at 37°C (mean ± SD).

TABLE II
Direct action of PASL on human platelets^a

	P/S	P [*] /S	P/S*
IgE/anti-IgE Cytotoxicity	92.3 ± 5.1	14.6 ± 9.2	71.5 ± 6.3

^a Human platelets (P) and schistosomula (S), treated (*) or not by lymphocyte supernatant, were separated by a 0.22-μ polycarbonate filter/ in chemotaxis blind well chambers. Cytotoxicity was appreciated as percent of dead schistosomula at the end of a 24-hr incubation at 37°C (mean ± SD).

% INHIBITION CYTOTOXICITY

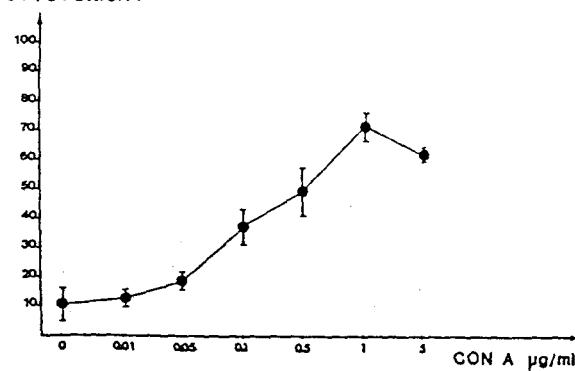


Figure 1. Production of PASL by Con-A-stimulated lymphocytes. T cells were incubated with Con A (0.01 to 5 μg/ml) for 24 hr in a humidified atmosphere 5% CO₂, washed to eliminate Con A, and cultured for another 24-hr period. Supernatants were recovered and tested for their capacity to inhibit the IgE-dependent cytotoxicity toward schistosomula.

in the case of the platelet preincubation and not that of the larvae (Table II). Furthermore, this inhibition was not the consequence of a toxic effect of the T lymphocyte supernatant because no LDH could be detected in the platelet suspension. The mitogenic stimulation of rat splenic T lymphocytes either with Con A or PHA (2 μg/ml) or the antigenic stimulation of mesenteric or splenic T lymphocytes from S. mansoni infected rat with adult schistosome antigen produced supernatants which inhibited the IgE-dependent cytotoxicity of rat platelets (40 to 60% inhibition). Therefore, as described in the human model, rat T lymphocytes also secreted a platelet inhibitory factor.

As shown in Figure 1, the inhibitory effect was propor-

tional to the dose of Con A used for the T cell stimulation, and the optimal effect was obtained at a final dose of 1 μg/ml. Supernatants produced in the absence of Con A also expressed suppressive activity, but consistently lower than that observed with lectin-activated supernatants (20 to 25%). As seen in Figure 2, the supernatant acted in a dose-dependent manner, reaching a plateau with 50 μl (1:4 final dilution), which was the dose used for all of the following experiments. The effect of supernatant addition at different periods before and after the beginning of the cytotoxic process is represented in Figure 3. The optimal inhibition was obtained when the T cell supernatant was added during the first hour of contact between the effector platelets and schistosomula.

Binding structure on platelets. T cell supernatant contained a factor able to inhibit the killing properties of platelet toward schistosomula. Three successive incuba-

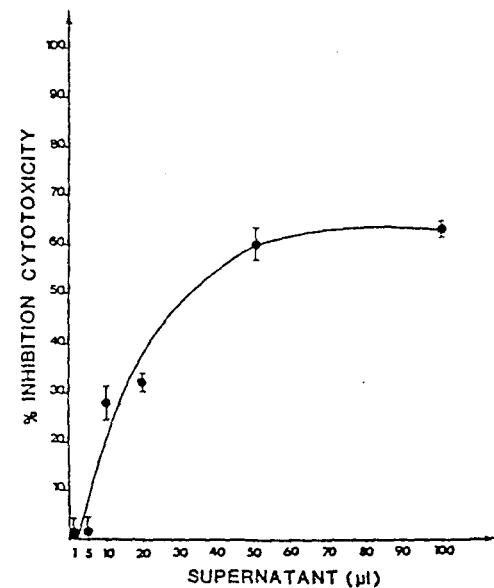


Figure 2. Dose response of lymphocyte supernatant for the suppression of the IgE-dependent platelet cytotoxicity towards schistosomula.

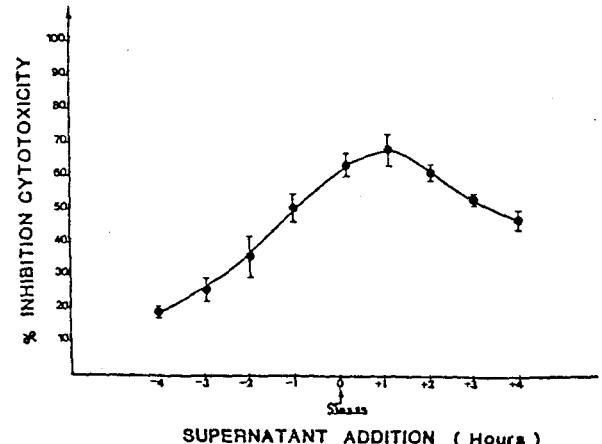


Figure 3. Kinetic of PASL addition. Fifty microliters of lymphocyte supernatant were added at different periods before and after the beginning of the IgE-dependent cytotoxicity assay toward schistosomula.

tions of this supernatant with platelet pellets abrogated its inhibitory activity of the platelet cytotoxicity; this absorption of the suppressive factor by the platelets suggested the existence of a binding structure.

Effect of supernatant on platelet chemiluminescence. It had been shown previously, in the IgE-dependent cytotoxicity against schistosomula, that the production of oxygen metabolites by human platelet measured by chemiluminescence could be obtained (14, 15). The effect of the supernatant of Con-A-stimulated T lymphocytes (1 µg/ml) on platelet chemiluminescence was thus tested. As seen in Figure 4, a 1 hr-incubation of platelets with T lymphocyte supernatant, at a final dilution of 1:4, strongly decreased (60%) the oxygen metabolite production observed when normal platelets were stimulated by IgE-anti-IgE reaction or when platelets from allergic patients were stimulated with the corresponding allergen, confirming the direct role of the lymphokine toward the platelets themselves.

Characterization of the cells involved in the suppressive lymphokine production. In order to define the cell type responsible for the inhibitory factor production, we investigated the effect of selective T subpopulation depletion. T cells were treated with OKT4 monoclonal antibody (for helper/inducer subsets) or OKT8 monoclonal antibody (for suppressor/killer subsets) in the presence of complement. The cells were then stimulated by Con A and examined for the production of the suppressive lymphokine. As shown in Figure 5, the depletion of OKT8⁺ T lymphocytes suppressed the production of the inhibitory factor, and the depletion of OKT4⁺ cells did not modify its generation. This observation suggested the production, by a suppressive T cell subpopulation, of the factor responsible for the observed inhibition of the platelet effector functions.

Effect of the indomethacin treatment of T cells in the production of the inhibitory lymphokine. It has been reported that prostaglandins play a role in the induction of nonspecific suppressor T cells during mitogen- or antigen-stimulation of lymphocytes (19, 20). Therefore, we

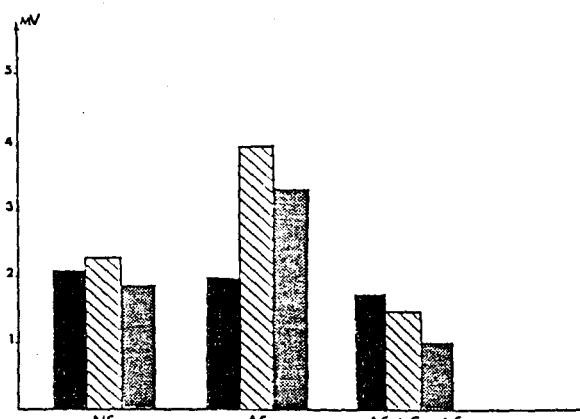


Figure 4. Effect of PASL on IgE-dependent chemiluminescence of platelets from normal donors. NS, incubated in normal serum; AS, incubated in serum from allergic patients; AS + Con A Sup, incubated in serum from allergic patients and lymphocyte supernatant. The peak activity of luminol/luciferin chemiluminescence of 5×10^6 platelets in PBS was registered within 5 min after the addition of the medium (HW) □ or of the triggering agent. Anti-IgE (10 µg antibody/ml) Q; allergens (10 ng/ml) □.

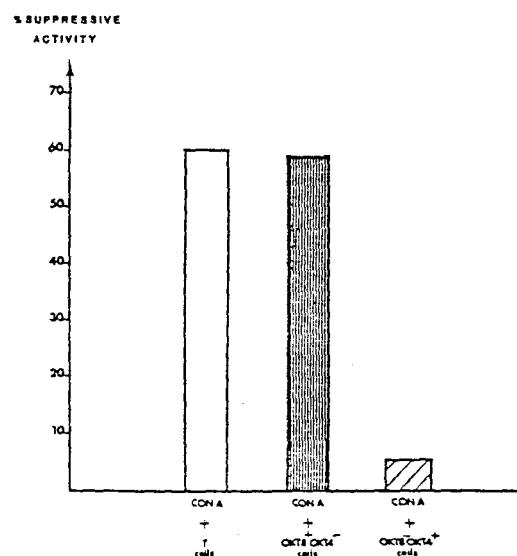


Figure 5. Production of PASL by different cellular subpopulations. PASL was obtained after Con A activation of OKT8⁺OKT4⁺ and OKT8⁺OKT4⁺ cells as described in Materials and Methods. The data are given as the mean percent suppression of the IgE-dependent cytotoxicity toward schistosomula.

TABLE III
Physicochemical properties of PASL*

Treatment	Inhibition Index (%)
—	64.0 ± 1.4
Heating	
120 min at 56°C	65.7 ± 5.6
5 min at 100°C	74.8 ± 8.8
Dialysis 24 hr	64.3 ± 3.6
Acid treatment 24 hr	68.5 ± 2.5

* All PASL preparations were tested for activity in the platelet cytotoxicity assay as described in Materials and Methods. Heat-stability of PASL was evaluated by heating the supernatants in a water bath at 56°C for 120 min or at 100°C for 5 to 10 min. Dialysed PASL was prepared by dialysis of the supernatant at 4°C for 24 hr against PBS with multiple changes of medium. Acid-treated supernatants were prepared by dialysis at 4°C for 24 hr against pH 2 glycine buffer followed by an additional 24-hr dialysis against PBS to remove excess acid.

treated lymphocytes with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis (10^{-5} M final concentration) and examined the mitogen-induced production of the inhibitory lymphokine. The production of this factor remained unaltered in these conditions ($48.0 \pm 3.0\%$ suppressive activity with indomethacin and $45.0 \pm 2.5\%$ without indomethacin).

Physicochemical characteristics of the platelet inhibitory lymphokine. The suppressive effect remained unchanged after dialysis of the lymphocyte supernatant for 24 hr against PBS. The inhibitory factor appeared to be heat- (56°C for 1 hr or 100°C for 5 min) and acid-stable, because dialysis for 24 hr against pH 2 buffer did not alter its suppressive effect (Table III). As seen in Figure 6, this lymphokine was sensitive to trypsin and proteinase K, but neuraminidase had no effect on its activity. A chromatographic profile of this platelet inhibitory lymphokine on G-75 Sephadex molecular sieve is shown in Figure 7. The suppressive activity was detected in two peaks, but the optimal activity was found in the second and smaller peak, migrating in the 25,000 m.w. range; the first and major peak might correspond to an

PLATELET ACTIVITY SUPPRESSIVE LYMPHOKINE

589

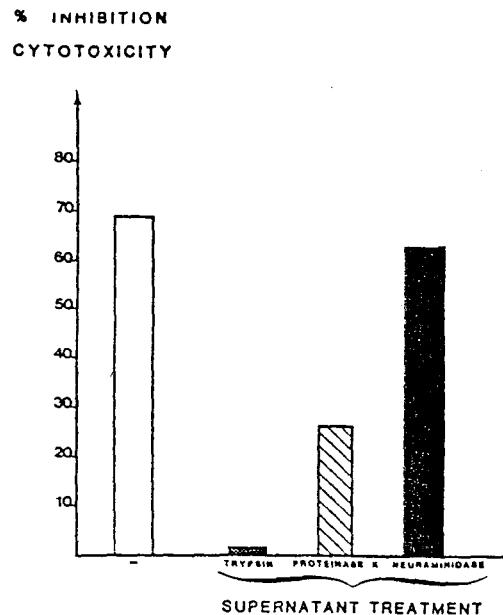


Figure 6. Enzyme sensitivity of PASL activity. After incubation of PASL for 3 hr at 37°C with trypsin (11 U/ml) or 1 hr at 37°C with proteinase K (2 U/ml) or with neuraminidase (0.43 U/ml), PASL activity was evaluated by the suppression of the IgE-dependent platelet cytotoxicity against schistosomula.

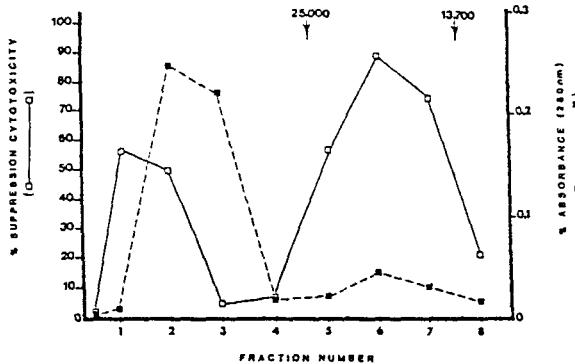


Figure 7. Molecular sieve chromatography of PASL. PASL was fractionated on a Sephadex G-75 column prepared in phosphate buffer (pH 7.4). Eluted fractions were tested for PASL activity in anti-schistosome IgE-dependent platelet cytotoxicity. The volumes of elution for the standard calibration proteins used are indicated.

aggregated form of the molecule. The electric charge of the platelet inhibitory lymphokine was examined. the activity focusing at the isoelectric point (pi) of 4.1 to 4.6 (Fig. 8).

DISCUSSION

Stimulated T cells have been shown to excrete a number of soluble factors, some of which are able to regulate the functions of effector cells. We demonstrate here that Con A- or antigen-stimulated T cells also released a factor able to inhibit, in a dose-dependent manner, the IgE-dependent platelet cytotoxicity toward the young larvae of *S. mansoni* recently described (13-15). Moreover, the chemiluminescence of platelets in an IgE-anti-IgE reaction, a correlate of the antiparasite cytotoxicity, was also

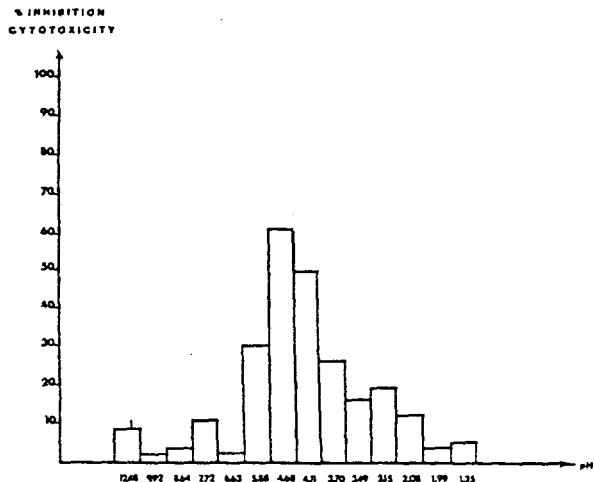


Figure 8. Isoelectric focusing of PASL was performed in a bed of Sephadex G-75 containing 5% carrier ampholines, pH range 3.5 to 10 for 16 hr at 8-W constant power. Each gel fraction was eluted, dialysed overnight against PBS containing NaCl to remove ampholines, and then tested for its suppressive activity on IgE-dependent platelet cytotoxicity toward schistosomula.

strongly decreased by this factor that was termed platelet activity suppressive lymphokine (PASL). The cells producing PASL have been identified as OKT8⁺ T lymphocytes.

The suppression of the platelet cytotoxicity by Con A-activated supernatants was not due to the presence of Con A, because 1) supernatants markedly depleted of Con A continued to provide inhibitory effects on proliferation, 2) the inhibition of the platelet cytotoxicity by PASL was not reversed by methyl-D-mannoside, a known antagonist of Con A binding, and 3) additions of equivalent amounts of soluble Con A (as present in the PASL supernatants) to the platelet cytotoxicity or chemiluminescence assay failed to produce the suppression of these biologic activities. The observed inhibition was not the consequence of a toxic effect of this T lymphocyte supernatant on platelets because no LDH could be detected in the platelet suspension. So PASL seemed to act directly on platelet function and was furthermore absorbed by platelet membrane, demonstrating the existence of a binding structure and suggesting the action of PASL through its binding to a receptor on platelet membrane. The specificity of the supernatant absorption was confirmed by the inefficiency of different cell lines (K562, U937, IgE myeloma) or population (broncho-alveolar macrophages) to absorb PASL, suggesting the absence of a binding structure for PASL on the membranes of these cells and the specificity of this factor for platelets.

The mediation of prostaglandins for the regulation of immune reactions has been reported (19, 20). To know whether prostaglandins regulated the production of PASL from Con A- or antigen-stimulated T cells, we added indomethacin, an inhibitor of the cyclo-oxygenase and, thus, of the prostaglandin synthesis, to Con A- or antigen-stimulated T cells and examined the production of PASL. The treatment of Con A- or antigen-stimulated T cells with indomethacin at 10^{-5} M had no effect on PASL production, indicating that prostaglandins were not involved in the production of the inhibitory factor.

The question arose whether PASL was similar to some already known suppressor factors. The physicochemical properties of PASL indicated that it was heat- and acid-stable. Treatment with neuraminidase had negligible effect on PASL activity, whereas the activity was abrogated by trypsin and proteinase K treatment. These results indicated that PASL had a polypeptidic nature, with an m.w. of 15,000 to 20,000, as determined by molecular sieve chromatography, and a pI of 4.6. Although the supernatants of activated lymphocytes may contain a broad array of biologically active soluble mediators, our preliminary data suggest that PASL differed in several respects from various previously described lymphokines. For example, human α lymphotoxin is stable at 56°C but has an m.w. of 80,000 to 100,000 (21), whereas human β lymphotoxin which is also heat-stable has an m.w. of 40,000. Recently, a lymphotoxin with an m.w. of 18,000 and a pI of 5.8 has been described from the lymphoblastoid 1788 cell line and cloned (22, 23). However, in contrast to these cytotoxic molecules, no lytic effect of PASL was detected in our assay system. Various authors have also reported the presence of interferon in the supernatants of Con A- or PHA-activated lymphocyte cultures (24). Interferon- γ , which was preferentially produced by lymphocytes activated with mitogenic lectins (25) did not appear to be responsible for the suppressive activity of PASL because 1) interferon- γ , unlike PASL, was labile in acid (25), suggesting the nonidentity of these two soluble factors; 2) purified interferon- γ , tested at different doses, did not inhibit platelet cytotoxicity or chemiluminescence in our assays; and 3) before isoelectric focusing, the Con A-stimulated T lymphocyte supernatant was passed on trisacryl blue in order to eliminate BSA, and, although interferon- γ is absorbed by this ligand, the inhibitory activity was preserved. Thus, based on differences in functional and physicochemical characteristics, it does not appear that PASL resulted from interferon activity. Remold and Mednis (26) have described two species of migration inhibitory factor (MIF), isolated by preparative sucrose density gradient, electrophoresis, and isoelectric focusing. One species (m.w. 65,000) has a pI of 3 and is resistant to trypsin; the second species (m.w. 25,000) has a pI of 5.5 but is degraded by trypsin. Therefore, these two species of MIF differ in several respects from PASL. A variety of other soluble suppressor factors elaborated by activated human lymphocytes have been reported (27-31) but their involvement as modulators of platelet activity has not been reported. Nevertheless, the role of PASL in the regulation of other cell populations cannot be excluded.

We have recently demonstrated that blood platelets, taken from *S. mansoni* infected rats, expressed direct antiparasite killing properties in vitro, increasing during the course of the infection (13). The maximum of cytotoxicity was observed when rats expressed a high level of immunity to reinfection. This platelet cytotoxicity declined rapidly after 8 wk of infection, in spite of the presence of IgE antibodies in the serum of these infected rats. Therefore, the participation of T cell factors, such as PASL, produced after stimulation of T suppressor cells by *S. mansoni* circulating antigens may be considered in such a decrease. This mechanism would appear as a feedback regulation of the platelet immune functions in the rat infection. Similarly, human platelets could be

induced into cytotoxic effectors against schistosomula by incubation with the IgE-rich serum of either patients infected with schistosomiasis or allergic asthmatic patients, the cytotoxic process being triggered in this latter case by the addition of anti-IgE or of specific allergen (14, 15). In both situations, PASL inhibited the effector functions of platelets, opening the possibility of its potential role in the regulation of immunopathologic disorders in which IgE level was increased, namely in atopic allergies and more particularly asthma. Studies are underway to isolate and further characterize PASL, to define the support of its platelet specificity, and to clarify the nature and the role of the PASL binding structure.

Acknowledgments. We are indebted to H. Vorng for expert technical assistance; to M. Capron, D. Henry, G. Ovalque, and J. Pestel for generous supply of technical facilities, assistance, or reagents; and to C. Colson for secretarial assistance.

REFERENCES

- Visa, D., J. M. Goust, R. Moulias, L. K. Frejdosiewicz, A. Collard, and N. Muller-Berat. 1975. In vitro production of transfer factor by lymphoblastoid cell lines. *Transplant. Proc.* 8:329.
- Geha, R. S., and E. Merler. 1974. Human lymphocyte mitogenic factor: synthesis by sensitized thymus-derived lymphocytes, dependence of expression on the presence of antigen. *Cell. Immunol.* 10:86.
- Lindahl, B., P. Leary, and I. Gresser. 1972. Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:721.
- Djeu, J. Y., J. A. Heinbaugh, H. T. Holden, and R. B. Herberman. 1979. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* 122:175.
- Ward, P. A., H. G. Remold, and J. R. David. 1970. The production of a leukocytic factor distinct from migration inhibitory factor. *Cell. Immunol.* 1:162.
- Granger, G. A., R. S. Yamamoto, D. S. Fair, and J. C. Hiserodt. 1978. The human LT system. I. Physicochemical heterogeneity of LT molecules released by mitogen-activated human lymphocytes in vitro. *Cell. Immunol.* 38:388.
- Brodeur, B. R., and T. C. Merigan. 1974. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J. Immunol.* 113:1319.
- Parker, M. A., A. D. Mandel, and G. Sonnenfeld. 1980. Modulation of human in vitro antibody response by human leukocyte interferon. *Fed. Proc.* 39:1161 (Abstr.).
- Remold, H. G., A. B. Katz, E. Haber, and J. R. David. 1970. Study of migration inhibitory factor (MIF): recovery of MIF activity after purification by gel filtration. *Cell. Immunol.* 1:133.
- Papageorgiou, P. S., C. F. Sorokin, and P. R. Grade. 1975. Similarity of migration inhibitory factors produced by a human lymphoid cell line and phytohemagglutinin and tuberculin-stimulated human peripheral lymphocytes. *J. Immunol.* 112:675.
- Tadakuma, T., and C. W. Pierce. 1978. Mode of action of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by Concanavalin A-activated spleen cells. *J. Immunol.* 120:481.
- Aune, T. M., D. R. Webb, and C. W. Pierce. 1983. Purification and initial characterization of the lymphokine, soluble immune response suppressor. *J. Immunol.* 131:2848.
- Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810.
- Joseph, M., J. C. Ameisen, J. P. Kusnierz, V. Pancré, M. Capron, and A. Capron. 1984. Participation du récepteur pour l'IgE à la toxicité des plaquettes sanguines contre les schistosomes. *C.R. Acad. Sci. Paris* 298:55.
- Joseph, M., A. Capron, J. C. Ameisen, M. Capron, H. Vorng, V. Pancré, J. P. Kusnierz, and C. Auriault. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16:306.
- Caen, J. P., A. T. Nurden, and C. Jeanneau. 1976. Bernard-Soulier syndrome, a new platelet glycoprotein abnormality: its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the FVIII von Willebrand protein. *J. Lab. Clin. Med.* 87:586.
- Patschke, H., and P. Wörner. 1978. Platelet activation detected by turbidometric shape-change analysis: differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E₁. *Thromb. Res.* 12:485.
- Patschke, H. 1981. Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10:14.
- Fischer, A., A. Durandy, and C. Griscelli. 1981. Role of prostaglan-

PLATELET ACTIVITY SUPPRESSIVE LYMPHOKINE

- din E₂ in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. *J. Immunol.* 126:1452.
20. Baker, P. E., J. V. Fahey, and A. Munck. 1981. Prostaglandin inhibition of T cell proliferation is mediated at two levels. *Cell. Immunol.* 61:52.
21. Ware, C., and G. A. Granger. 1979. A physicochemical and immunologic comparison of the cell growth inhibitory activity of human lymphotoxins and interferon in vitro. *J. Immunol.* 122:1763.
22. Aggarwal, B. B., B. Moffat, and R. N. Harkins. 1984. Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line; purification and initial characterization. *J. Biol. Chem.* 259:686.
23. Aggarwal, B. B., W. J. Henzel, B. Moffat, W. J. Kohr, and R. N. Harkins. 1985. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J. Biol. Chem.* 260:2334.
24. Wallen, W. C., J. H. Dean, and D. O. Lucas. 1973. Interferon and the cellular immune response: separation of interferon-producing cells from DNA synthetic cells. *Cell. Immunol.* 6:110.
25. Valle, M. J., G. W. Jordan, S. Haahr, and T. C. Merigan. 1975. Characteristics of immune interferon produced by human lymphocyte cultures compared to other human interferons. *J. Immunol.* 155:230.
26. Remold, H. G., and A. D. Mednis. 1977. Two migration inhibitory factors with different chromatographic behavior and isoelectric points. *J. Immunol.* 118:2015.
27. Badger, A. M., S. R. Cooperband, and J. A. Green. 1974. Studies on the mechanism of action of proliferation inhibitory factor [PIF]. *Cell. Immunol.* 13:335.
28. Wolf, R. L., H. Whitsed, F. S. Rosen, and E. Merler. 1978. A soluble inhibitor of B and T cell proliferation and antibody synthesis produced by dividing human T cells. *Cell. Immunol.* 36:231.
29. Tibbets, L. M., P. R. Glade, and P. S. Papageorgiou. 1975. Presence of a reversible inhibitor for human lymphoid cell DNA synthesis in the extracts of human peripheral lymphocytes. *Cell. Immunol.* 18:384.
30. Greene, W. C., T. A. Fleisher, and T. A. Waldmann. 1981. Soluble suppressor supernatants elaborated by Concanavalin A-activated human mononuclear cells. I. Characterization of a soluble suppressor of T cell proliferation. *J. Immunol.* 126:1185.
31. Fleisher, T. A., W. C. Greene, R. M. Blaese, and T. A. Waldmann. 1981. Soluble suppressor supernatants elaborated by Concanavalin A-activated human mononuclear cells. II. Characterization of a soluble suppressor of B cell immunoglobulin production. *J. Immunol.* 126:1192.

Article 2 et 3

Article 2: Modulation par les lymphocytes T des fonctions effectrices des plaquettes dans la schistosomiase humaine et la schistosomiase expérimentale du rat.

Article 3: Destruction IgE-dépendante des microfilaires de *Brugia malayi* par les plaquettes humaines: modulation par des produits lymphocytaires T.

Dans les deux articles qui vont suivre nous avons étendu l'étude de la PASL à deux helminthiases majeures: la bilharziose à *S. mansoni* et la filariose à *B. malayi*.

Article 2: Bilharziose à *S. mansoni*.

Dans cet article, après avoir reproduit les travaux de M. Joseph et coll. démontrant l'existence d'une activité cytotoxique IgE-dépendante des plaquettes d'individus bilharziens (homme et rat), nous avons étudié l'effet de surnageants lymphocytaires sur cette cytotoxicité plaquettaire. Nous avons ainsi montré que:

- Chez des patients bilharziens on observe, après stimulation de leurs lymphocytes CD4⁻CD8⁺ par des antigènes de *S. mansoni*, la production d'un facteur inhibiteur de la cytotoxicité développée par des plaquettes de donneurs sains incubées dans le sérum des mêmes patients.
- Des observations similaires ont été faites chez des rats infectés par *S. mansoni* où un maximum de production du facteur inhibiteur par des lymphocytes T porteurs du marqueur OX8 est obtenue au 61^{ième} jour d'infection précisément au moment où l'on observe une disparition des propriétés cytotoxiques plaquettaires. De plus, on constate, toujours à J 61 d'infection par *S. mansoni* une modification du rapport cellules "helpers" sur cellules "suppressives" dans le sens d'une augmentation de la population suppressive responsable de la production du facteur inhibiteur.

Grâce à l'absence de spécificité d'espèce du surnageant lymphocytaire, la pertinence *in vivo* de l'effet modulant de la PASL a pu être étudiée dans le modèle rat. Ainsi, alors que des plaquettes d'animaux immuns transférées passivement à des rats sains protègent ceux-ci d'une infestation ultérieure par *S. mansoni*, nous

observons que l'incubation de ces mêmes plaquettes dans un surnageant de lymphocytes CD4⁻CD8⁺ stimulés par la ConA abroge totalement la protection habituellement observée.

La suite de ce travail est présentée page 90 (Article 3).

Full title : Modulation of platelet effector functions by T lymphocytes
in human and rat schistosomiasis mansoni.

61

2

Running title : Modulation of platelet effector functions in schistosomiasis.

Véronique PANCRE¹, Michel JOSEPH¹, Jean-Yves CESBRON¹, André CAPRON¹,
Michel BARBIER², Jean-Pierre KUSNIERZ¹, Han VORNG¹ and Claude AURIAULT¹.

1. from the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

INSERM 167 - CNRS 624

Institut Pasteur

1, rue du Pr A. Calmette

59019 Lille Cedex, France.

2. from the Hôpital International de l'Université de Paris

Service de Pathologie Exotique et Parasitaire

42, bd Jourdan

75014 Paris, France

Footnotes

Address correspondence to Véronique PANCRE
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Institut Pasteur
B.P. 245
59019 Lille (France)

Key-words : *Schistosoma mansoni*, platelets, lymphokine.

SUMMARY

The *in vitro* stimulation of T lymphocytes is known to induce the release of factors that possess distinct biological activities. In the present report, we describe the presence, in *Schistosoma mansoni* antigen-stimulated T cell supernatants (of human or rat), of a factor able to inhibit the IgE-dependent platelet cytotoxicity toward the young larvae of *S. mansoni*. The producing T lymphocyte subpopulation was identified as expressing the marker of the suppressive subset. Because of the absence of species restriction, the *in vivo* relevance of this factor was carried out in the rat model. We demonstrated that this inhibitory factor was able to abolish the protection conferred by the passive transfer of immune platelets and that its production was maximal exactly when the platelet cytotoxicity declined.

During the last decade, a growing interest has been devoted to parasite immunology and, more precisely, to the analysis of effector mechanisms against helminths (Capron et al., 1982). It was so demonstrated that blood platelets could be, both *in vivo* and *in vitro*, potent killer cells against parasite targets (Joseph et al., 1983). A physiological concentration of blood platelets, taken from *Schistosoma mansoni*-infected rats, expressed *in vitro* anti-*S. mansoni* larval killing properties that increased during the course of infection, with a maximum when rats expressed a high level of immunity to reinfection. Similarly, human platelets taken from *S. mansoni*-infected patients were highly cytotoxic *in vitro* against *S. mansoni* larvae. This mechanism required the presence of specific IgE antibodies interacting with a membrane receptor bound on blood platelets. This interaction led to the production of cytocidal factors (Joseph et al., 1986). Platelets from normal rats or from healthy human donors showed however no cytotoxic activity, whereas their prior incubation with IgE-enriched sera from, respectively, immune rats or *S. mansoni*-infected individuals was able to induce a highly significant degree of parasite killing (Joseph et al., 1986). In addition, it was shown that the involvement of platelets as anti-parasite effector cells was not restricted to this *in vitro* killing of *S. mansoni*. Indeed, the biological relevance of these *in vitro* observations, could be established by the direct demonstration that the intravenous passive transfer of platelets from immune to naive rats, conferred a high degree of protection towards a challenge infection, whereas the transfer of an equivalent amount of normal platelets was inefficient (Joseph et al., 1983). The demonstration of the effector functions of platelets rose the question of their possible regulation, particularly by T cell products. We have recently demonstrated that ConA-stimulated CD4⁺ CD8⁺ T lymphocytes from normal donors and ConA- or antigen-stimulated T lymphocytes from a patient with echinococcosis released a factor termed Platelet Activity Suppressive Lymphokine (PASL) able to inhibit the IgE-dependent platelet cytotoxicity toward the young larvae of *S. mansoni* (Pancre et al., 1986). This suppressive lymphokine with an m.w. of 15,000 to 20,000, an isoelectric point of 4.6 was heat- and acid-stable, sensitive to trypsin and specifically absorbed by the platelet membrane, suggesting its action through the binding to a receptor. In the present work, we studied the existence of such a factor in the human and rat schistosomiasis *mansoni*. So *S. mansoni* antigens-stimulated T lymphocyte supernatants from *S. mansoni*-infected individuals were tested for their capacity to inhibit the IgE-dependent platelet killing properties. Because of the absence of species

restriction of this platelet cytotoxicity inhibitory factor, the *in vivo* relevance of the modulatory effect was carried out in the rat model.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and preparation of schistosomula

A puerto-rican strain of *Schistosoma mansoni* was used throughout the study ; its maintenance is described elsewhere (Ramalho-Pinto et al., 1974) : schistosomula for the cytotoxicity assay were obtained *in vitro* from cercariae by the skin penetration method of Clegg and Smithers (Clegg & Smithers, 1972).

Immunoglobulins and immunologic reagents

Human γ -globulin fraction II was obtained from Miles Laboratories (Elkhart, IN) ; goat polyclonal anti-human IgE antiserum and rabbit FITC-conjugated IgG anti-mouse IgG were provided by Miles-Yeda (Rehovot, Israël) ; monoclonal antibodies OKT3, OKT4, OKT8, OKM1 and OKIal were obtained from Ortho Diagnostic Systems Inc. (Raritan, NJ, USA) ; monoclonal antibodies W3/13, W3/25 and OX8 were obtained from Sera Laboratories (Crawley Down, England) ; mouse polyclonal anti human IgG was produced in our laboratory.

Lymphocyte culture medium

For all cultures RPMI-1640 (Flow Laboratories, Asnières, France) was supplemented with $5 \cdot 10^{-5}$ M 2- β Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 2 mM Glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Courbevoie, France), antibiotics (1000 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 10 mM HEPES (Sigma, St Louis, MO) and 5 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco) (RPMI-FCS).

Enrichment of T cells

Blood samples were obtained from students with active *S. mansoni* infection diagnosed by stool examination. Blood, diluted with an equal volume of PBS, was layered on a Ficoll gradient and centrifuged, at room temperature, for 45 min at 500 x g.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), washed 3 times with PBS, were enriched in T cells by passing through an IgG-anti-IgG-coated glass bead column. The enriched T cell population was controlled by flow cytometry with the use of monoclonal antibodies against T cell subsets : OKT3 (for pan T), OKT4 (for helper/inducer), OKT8 (for suppressor/killer), OKM1 (for monocytes) and

OKIa1 (for B cells) as control. 5.10^6 cells/ml in PBS were incubated with monoclonal antibody for 30 min at 4°C, washed three times with PBS, and then labeled with fluorescein-conjugated rabbit antibodies to mouse IgG. The population of fluorescein-labeled cells was quantified by an automated biologic cell analysis and sorting system (50-H Cytofluorograf, Ortho Instrument, Westwood, MA). The enriched T cell population contained 56 % OKT3+, 38 % OKT4+, 15 % OKT8+, 0,1 % OKM1+ and 0 % OKIa1+.

T cells from *S. mansoni*-infected Fischer rats were obtained by squeezing the mesenteric and splenic lymph nodes in RPMI-FCS and passing the cell suspension through a nylon wool column. The cell suspension was treated with ammonium chloride (0.15 M) in the cold.

T cell subsets in the enriched T cell population were assayed by means of flow cytometry with the use of monoclonal mouse antibody against rat T cells subsets : W3/13 (for pan T), W3/25 (for helper/inducer) and OX8 (for suppressor/killer) by the procedure described above. The enriched T cell population contained 90 % W3/13+, 62 % W3/25+ and 38 % OX8+.

Depletion of human T cell subsets

For the depletion of human T cell subset, a complement-dependent cytotoxicity assay with specific monoclonal antibody was performed.

T cells were incubated with 1/40 diluted monoclonal antibodies against T cell subset (OKT4 or OKT8) for 30 min at 4°C, washed with PBS and then incubated for 60 min at 37°C in the presence of 1/2 diluted rabbit serum as source of complement. The efficiency of the depletion was controlled by flow cytometry with the use of fluorescein-labeled monoclonal antibodies specific for T cells subsets by the procedure described above. Helper cell-depleted T populations contained 10 % OKT4+ and 73 % OKT8+ cells. Suppressive cell-depleted T populations contained 4 % OKT8+ and 76 % OKT4+ cells.

Separation of rat T cell subsets

Cells bearing markers recognized by monoclonal antibodies were separated by a modification of a panning technique (Sopori et al., 1984). Briefly, cells were washed and suspended in PBS to a concentration of 4.10^7 /ml and incubated with a saturating concentration of monoclonal antibody (W3/25 or OX8) for 30 min at room temperature. The cells were washed twice in PBS to remove unbound antibody. The cells were allowed to bind to polystyrene dishes coated with affinity-purified goat anti-mouse IgG at 4°C for 90 min. The non-adherent cells

were gently rinsed off and the adherent cells were removed by treating the plates with PBS containing 0.02 % of EDTA. The level of cross-contamination in each cell fraction was generally low (< 3 %) as detected by indirect immunofluorescence.

Preparation of T lymphocyte supernatants

- By mitogenic stimulation

In human, $3 \cdot 10^6$ peripheral T cells from patients with schistosomiasis *mansi* in RPMI-FCS were incubated with ConA (5 µg/ml) at 37°C in flat-bottom culture clusters (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 hr in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. The cells were then washed in order to eliminate ConA and cultured for a 24 hr period. Supernatants from each well were recovered, centrifuged at 400 x g, and filtered through 0.22 µ membrane before storage at -20°C until use.

In *S. mansoni*-infected rats, $1 \cdot 10^6$ lymph node lymphocytes (8, 15, 26, 33, 40, 47, 54, 61 day of infection) were used. The supernatants were prepared by the procedure described above.

- By antigenic stimulation

The human T cell stimulation from patients with schistosomiasis *mansi* was performed in RPMI-FCS by addition of crude extracts from *S. mansoni* adult worms (100 µg/ml final concentration) in the presence of autologous irradiated (2000 rad, 2 min) PBMC and mouse IL2 (prepared in our laboratory). After 24 hr in a humidified atmosphere, cells were washed in order to eliminate the extracts and cultured for 4 days. The culture supernatant was recovered, filtered through 0.22 µ membrane and stored at -20°C.

T cells obtained from *S. mansoni*-infected rat lymph nodes (8, 15, 26, 33, 40, 47, 54, 61 days of infection) were incubated in RPMI-FCS supplemented with mouse IL2, rat irradiated thymic cells (APC) and *S. mansoni* adult worm antigen (50 µg/ml final concentration) in flat-bottom culture clusters in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂.

Simultaneously, the proliferative response of the T cells was measured in these conditions, after a 16 hr pulse with 1 µCi of ³H-Thymidine (5 Ci/nmol CEA), the incorporated radioactivity being determined by filtrating the culture through Millipore membranes and counting the filters in a liquid scintillation fluid in a beta-spectrometer (ISOCAP 300, Nuclear Chicago Division).

Platelet isolation

The overall procedure for isolation of platelets was carried out at room temperature.

Human venous blood from patients with schistosomiasis *mansi* or from healthy adult volunteers (6 vol) collected on ACD-A (1 vol) (Caen, Nurden & Jeanneau, 1976)) was centrifuged for 15 min at 120 x g in 5 ml aliquots, the platelet-rich plasma (PRP) collected in a single volume and centrifuged at 2000 x g for 15 min. Avoiding the recovery of the lowest part of the pellet when contaminated with red cells, the platelets were resuspended for three washing steps at 2000 x g in saline supplemented with citric acid (36 mM), glucose (5 mM), calcium (2 mM), magnesium (1 mM), BSA (0.35 %) and PGE1 (100 nM) (Patschke & Wörner, 1978 ; Patschke, 1981). The last pellet was resuspended and the platelets were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after a 1/20 dilution with 1 % ammonium oxalate, and adjusted to the appropriate concentration.

Platelets isolated from normal or *S. mansoni*-infected rats were prepared from 2 ml heparinized blood diluted with 3 ml heparinized Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) and centrifuged for 15 min at 4°C and 400 x g. Platelets in the supernatant were washed with heparinized EMEM and centrifuged for 20 min at 4°C and 5000 x g. They were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after 1/20 dilution in London stain.

The observation of undiluted platelet suspensions with interferential contrast microscopy repeatedly confirmed that the leukocyte contamination never exceeded 10 per 10^6 platelets.

Anti-schistosome cytotoxicity

The platelets were isolated by the procedure described above. At the end of the washing steps, the pellet was resuspended in EMEM. 150.10^6 (Human) or 200.10^6 (Rat) platelets were incubated in flat-bottom microplates (Nunc) in 50 μ l EMEM supplemented either with 20 μ l serum from normal individuals or from patients and rats with Schistosomiasis, 50 μ l of lymphocyte supernatant or EMEM, and 75 *S. mansoni* schistosomula in 80 μ l EMEM. After 24 hr at 37°C in 5 % CO₂ in air, motionless and dark dead larvae were easily distinguished from mobile and refringent living schistosomula by optical microscopy (Joseph et al., 1986). Each experiment was made in duplicate and results expressed as the mean \pm S.D. of dead larvae.

Passive transfer experiment

Normal or immune rat platelets (1.4×10^9) treated or not 1 hr by the T lymphocyte supernatant were washed and then injected intravenously to uninfected female Fischer rats 1 hr before infection by percutaneous exposure to 1000 *S. mansoni* cercariae. Liver perfusion for worm enumeration was performed 21 days later.

RESULTS

Effect of human T lymphocyte supernatants on human platelet cytotoxicity

Human platelets taken from *S. mansoni*-infected patients expressed high cytotoxic properties *in vitro* against *S. mansoni* larvae (schistosomula) (Joseph et al., 1986). We confirmed here this observation with a greater number of patients (n=11). Their platelets showed important killing properties ($73 \pm 22\%$) toward the larvae. Moreover, the serum from these 11 infected patients, selected for high IgE levels (mean of 1200 IU/ml) gave a significant killing effect ($68 \pm 12\%$) in the presence of platelets from healthy donors normally inactive on schistosomula (Figure 1).

The supernatants obtained after stimulating peripheral T lymphocytes from the same 11 *S. mansoni*-infected individuals by antigens from *S. mansoni* (100 µ/ml) have been tested in cytotoxic processes of platelets toward schistosomula (Figure 2). The cytotoxicity failed to $20 \pm 9\%$ in the presence of such supernatants when normal platelets, incubated with the corresponding serum of patients with schistosomiasis were used as effector cells. This important inhibition (70 %) of the platelet cytotoxicity was not the consequence of a toxic effect of the T lymphocyte supernatant because no LDH could be detected in the platelet suspension.

The supernatants were active directly on platelet functions and not by a protection of the targets because the separate preincubation of the effector platelets or of the schistosomula with the T lymphocyte supernatants, followed by a cytotoxic assay in which platelets and parasites were separated by a 0,22 µ polycarbonate membrane, led to the expected inhibition only in the case of the platelet preincubation and not that of the larvae (Table 1).

Effect of rat T lymphocyte supernatants on rat platelet cytotoxicity

During infection platelets from *S. mansoni*-infected rats showed increased killing properties (Joseph et al., 1983). We confirmed this observation demonstrating a maximum of rat platelet cytotoxicity (up to 85 %) at day 47 when rats expressed a high level of immunity to reinfection. This platelet cytotoxicity declined rapidly after 8 weeks of infection (Figure 3). The mitogenic stimulation with ConA (2 µg/ml) or the antigenic stimulation with adult schistosome antigens of mesenteric T lymphocytes from *S. mansoni*-infected rats produced supernatants which strongly inhibited the cytotoxicity of rat

platelets observed at day 47 of infection by *S. mansoni* (Figure 4). This inhibition increased during the course of the infection reaching a maximum ($45 \pm 8\%$ for the mitogenic-stimulation and $76 \pm 12\%$ for the antigenic-stimulation) when mesenteric T lymphocytes were obtained from 61 day-infected rats.

Therefore, as described in the human model, rat T lymphocytes also secreted a platelet inhibitory factor, with a maximal production at day 61 of infection by *S. mansoni*, at the period when an important decrease of the platelet cytotoxicity was observed.

Absence of species restriction of the inhibitory effect on the platelet cytotoxicity

The human platelet inhibitory factor was able to inhibit the rat platelet cytotoxicity (Table 2). Inversely, the same inhibition of human platelet cytotoxicity was observed in the presence of rat-stimulated T cell supernatants.

Because of the absence of species restriction of the platelet cytotoxicity inhibitory factor, the *in vivo* relevance of the modulatory effect was studied in the rat model.

Effect of T lymphocyte supernatant on passive transfer of immunity

The passive transfer of immune platelets from 46-day-infected rats to normal syngeneic recipients on the day of a challenge infection led to a high degree of protection (Joseph et al., 1983). The incubation of these day-46 immune platelets in lectin-stimulated T cell supernatant before injection to uninfected rats completely abrogated the protection normally observed (from 73 % without incubation to 10 % with incubation) (Table 3).

Characterization of the cells involved in suppressive lymphokine production

T cell subsets were tested for their capacity to produce the platelet cytotoxicity inhibitory factor (Table 4).

In human, the production of the inhibitory factor was abrogated after the depletion of the CD8⁺ T lymphocyte subpopulation whereas the depletion of CD4⁺ cells did not modify its generation.

In rat, only the cells bearing the OX8 marker were able to produce the inhibitory factor.

These observations suggested the production by the T cell subpopulation which belongs to the suppressive subset of the factor responsible for the observed inhibition of the platelet effector functions.

Moreover, a study of the T cell subpopulation evolution in rat experimental schistosomiasis had allowed to establish a modification of the helper cells/suppressive cells ratio during the course of the infection (Table 5). At day 61, when the production of the platelet cytotoxicity inhibitory factor reached a maximum, a modification of this ratio in the sense of an increase of the suppressive cell subpopulation implicated in the production of this factor was observed.

DISCUSSION

Human platelets taken from *S. mansoni*-infected patients expressed high cytotoxic properties *in vitro* against *S. mansoni* larvae (Joseph et al., 1986). In the present work, we confirmed this observation of a platelet cytotoxicity with a greater number of patients. Similarly, we observed in agreement with a previous work (Joseph et al., 1983), that platelets taken from *S. mansoni*-infected rats showed *in vitro* anti-parasite killing properties which increased during the course of the infection. A maximum was reached when rats expressed a high level of immunity to reinfection but this platelet cytotoxicity declined rapidly after 2 weeks of infection. These observations of effector functions for platelets in parasitic diseases rose the question of their possible regulation by other immunocompetent cells and particularly by the T lymphocytes. We demonstrate here that *S. mansoni*-infected individuals (human and rat) produced a factor able to inhibit the IgE-dependent platelet cytotoxicity of the same individuals. This factor acted directly on platelet functions and not by a protection of the targets. The *in vivo* relevance of such a factor could be established by the demonstration of a complete abolition of the high degree of protection normally conferred towards a challenge infection by the intravenous passive transfer of platelets from immune animals to normal rats. The T cell subpopulation belonging to the suppressive subset was identified as responsible for the production of the inhibitory factor both in human and rat models. The maximal production of this inhibitory factor of platelet functions was observed 61 days after infection of rats by *S. mansoni*. This corresponds to the period when a rapid decrease of the platelet cytotoxicity was observed suggesting the hypothesis of a participation of T cell factors produced after stimulation of T suppressor cells by *S. mansoni* circulating antigens. Moreover, the passive transfer of platelets from day-61 infected rats to normal rats on the day of a challenge infection led only to a small degree of protection (Joseph et al., 1983), comparatively to that obtained with the passive transfer of day-46 platelets suggesting a possible inactivation of platelets at this time of infection. In agreement with this hypothesis, we observed at day 61 of *S. mansoni* infection, a modification of the helper/suppressor cell ratio in the sense of an increase of the suppressive population responsible for the inhibitory factor production.

These results should be compared to that observed with the Platelet Activity Suppressive Lymphokine (PASL) previously described (Pancré et al., 1986). Indeed, this factor produced by mitogen -or antigen- stimulated CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes was able to inhibit the IgE-dependent platelet cytotoxicity toward the young larvae of *S. mansoni*, as well as the chemiluminescence of these blood elements in an IgE-antiIgE reaction. PASL could therefore regulate the platelet immune functions by a feedback inhibition of the activating process. This factor acted directly on platelet function and was furthermore absorbed by the platelet membrane demonstrating the existence of a binding to a receptor on the platelet membrane. The purification, the sequencing and the molecular cloning of PASL are at present underway. The study of the direct role of PASL in schistosomiasis, suggested by the observations described above, might be possible only by the use of monospecific antibodies directed against this purified lymphokine.

The results presented here provide additional support for the role of T cell factors in the regulation of cell-mediated response in schistosomiasis. The participation of lymphokines in the control of platelet immune functions appears as important as their involvement in the modulation of the other effector cell populations (Bout et al., 1981, James et al., 1982 ; Weith & Butterworth, 1983 ; Weith et al., 1985). This observation also raises the question of a potential role for such a lymphokine in the regulation of immunopathological disorders. PASL, with apparently a deleterious effect in schistosomiasis by the inhibition of platelet cytotoxic functions, could conversely represent a substance of great interest in the case of atopic diseases, and more particularly asthma, or in various inflammatory reactions where platelets increasingly appear to be involved (Capron et al., 1986 ; Oxholm & Winther, 1986)

REFERENCES

- BOUT D., JOSEPH M., DAVID J.R. & CAPRON A. (1981) *In vitro killing of S. mansoni schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages.* *J. Immunol.* 127, 1.
- CAEN J.P., NURDEN, A.T. & JEANNEAU C. (1976) Bernard-Soulier syndrome, a new platelet glycoprotein abnormality : its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the FVIII von Willebrand protein. *J. Lab. Clin. Med.* 87, 586.
- CAPRON A., DESSAINT J.P., HAQUE A. and CAPRON M. (1982) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against parasites. *Progr. Allergy* 31, 234.
- CAPRON A., JOSEPH M., AMEISEN J.C., CAPRON M., PANCRE V. & AURIAULT C. (1986) Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, in press.
- CLEGG J.A. & SMITHERS S.R. (1972) The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2, 79.
- JAMES S.L., LAZDINS S.K., MELTZER M.S. & SHER A. (1982) Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 67, 255.
- JOSEPH M., AURIAULT C., CAPRON A., VORNG H. & VIENS P. (1983) A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 810.
- JOSEPH M., CAPRON A., AMEISEN J.C., CAPRON M., VORNG H., PANCRE V., KUSNIERZ J.P. & AURIAULT C. (1986) The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16, 306.
- OXHOLM P. & WINTHER K. (1986) Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy* 41, 1.
- PANCRE V., AURIAULT C., JOSEPH M., CESBRON J.Y., KUSNIERZ J.P. & CAPRON A. (1986) A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* 137, 585.
- PATSCHEKE H. & WORNER P. (1978) Platelet activation detected by turbidometric shape change analysis : differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E1. *Thromb. Res.* 12, 485.
- PATSCHEKE H. (1981) Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10, 14.

- RAMALHO-PINTO G., GAZZINELLI G., HOWELLS R.E., MOTTA-SANTOS T.A., FIGUEIREDO E.A. & PELLEGRINO J. (1974) *Schistosoma mansoni* : defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomule *in vitro*. *J. Exp. Parasitol.* 36, 360.
- SOPORI M.L., COHEN D.A., CHERIAN S., ROSZMAN T.L. & KAPLAN A.. (1984) T lymphocyte heterogeneity in the rat : separation of distinct rat T lymphocyte populations which respond in syngeneic and allogeneic mixed lymphocyte reactions. *Cell. Immunol.* 87, 177.
- VEITH M.C. & BUTTERWORTH A.E. (1983) Enhancement of human eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae by mononuclear cell products *in vitro*. *J. Exp. Med.* 157, 1828.
- VEITH M., PESTEL J., LOISEAU S., CAPRON M. & CAPRON A. (1985) Eosinophil activation by lymphokines and T cell clone products in the rat. *Eur. J. Immunol.* 15, 1244.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank A. Delanoy, D. Henry and C. Mazingue for generous supply of technical facilities and assistance. The secretarial assistance of C. Colson and M.F. Massard was appreciated.

Table 1

Direct action of the T lymphocyte supernatant on the human platelets

	P/S	P*/S	P/S*
% Platelet cytotoxicity	75,5 ± 6,2	13,3 ± 7,8	70,4 ± 3,0

Human platelets (P) and schistosomula (S), treated (*) or not by lymphocyte supernatant, were separated by a 0,22 µ polycarbonate filter (/) in chemotaxis blind well chambers. Cytotoxicity was appreciated as percent of dead schistosomula at the end of a 24-hr incubation at 37°C (mean ± S.D.).



Table 2

	<u>Supernatant</u>		<u>% inhibition</u>	
	A	B	A	B
Human	69.6 ± 9.3		60.0 ± 2.1	
Rat	55.5 ± 6.2		76.0 ± 7.0	

Human and rat T cell supernatants were tested for their suppressive activity on IgE-dependent human (A) or rat (B) platelet cytotoxicity toward schistosomula.



Table 3

Effect of platelet cytotoxicity inhibitory factor on transfer of immunity to normal rats

Transfer of	Worm number	% Protection
	124.0 ± 23.6	-
Normal platelets	119.3 ± 49.1	3
Treated normal platelets *	97.2 ± 24.7	21
Day 46 immune platelets	33.5 ± 15.9	73
Treated day 46 immune platelets *	110.7 ± 19.0	10

Uninfected female Fischer rats were injected intravenously, 1 hr before infection by percutaneous exposure to 1,000 *S. mansoni* cercariae, with 1.4×10^9 platelets treated (*) or not by the T lymphocyte supernatant. Liver perfusion for worm enumeration was performed 21 days later. Results are the mean ± S.D. of five rats in each group.

Table 4

Characterization of the cells involved in suppressive lymphokine production

Supernatant	% inhibition Cytotoxicity	
	Man	Rat
pan T	69.6 ± 9.3	76.0 ± 7.0
helper T cells	18.5 ± 9.7	10.5 ± 3.5
suppressive T cells	60.0 ± 7.5	55.5 ± 0.7

The platelet cytotoxicity suppressive lymphokine was obtained after *S. mansoni* antigen activation of human and rat total T, helper or suppressive T cells as described in Materials and Methods. The data are given as the mean percent suppression of the human or rat IgE-dependent platelet cytotoxicity toward schistosomula.



Table 5

Evolution of the helper/suppressive cell ratio
in rat experimental schistosomiasis

<i>S. mansoni</i> infected rats	W3/25/0X8 Ratio
Day 0	1.77
Day 8	1.66
Day 33	2.01
Day 61	1.42



LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. The IgE-dependent cytotoxicity of human platelets.

- A. Cytotoxicity of platelets from patients with schistosomiasis *mansonii*
- B. Cytotoxicity of platelets from normal donors incubated in serum from patients with schistosomiasis *mansonii*.

Figure 2. Inhibition of the IgE-dependent cytotoxicity of human platelets by T lymphocyte supernatants.

- Platelets from normal donors incubated
- A. with serum from patients with schistosomiasis *mansonii*
 - B. with serum and antigen-stimulated T lymphocyte supernatant from the same patients ($p < 0.05$).

Figure 3. Killing properties of rat platelets against schistosomula at different periods of *S. mansoni* infection.

Figure 4. Effect of stimulated T lymphocyte supernatants recovered at different periods of infection on rat platelet cytotoxicity.

- Mitogenic stimulation
- ▲—▲ Antigenic stimulation

FIGURE 1

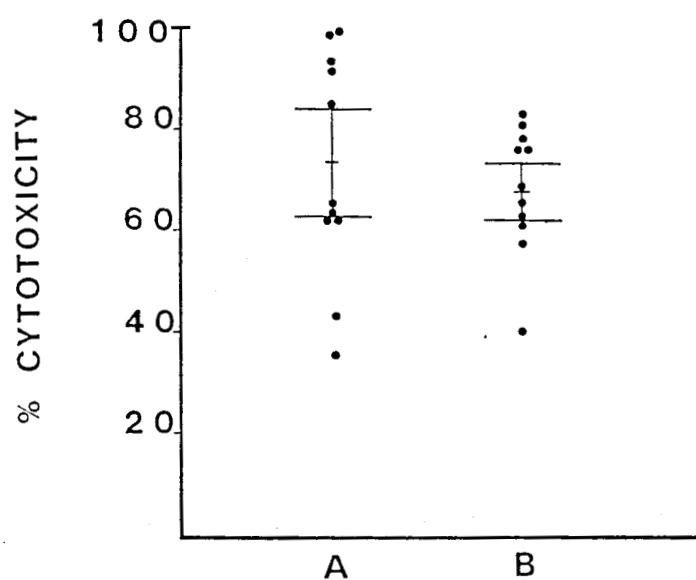


FIGURE 2

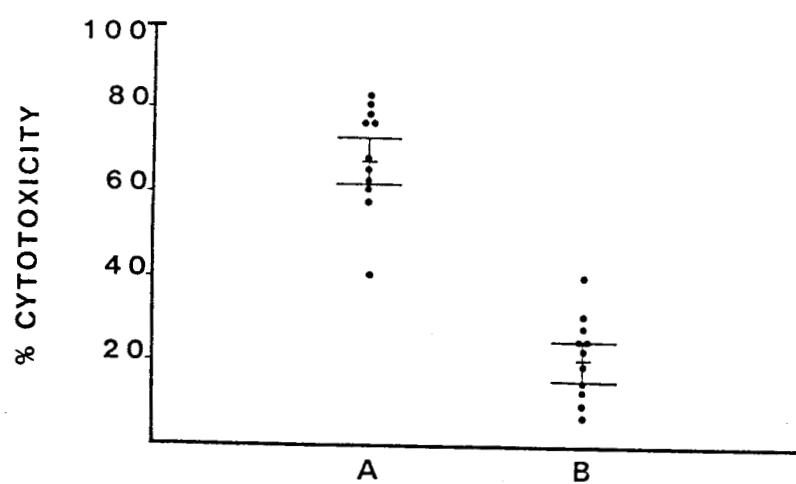


FIGURE 3

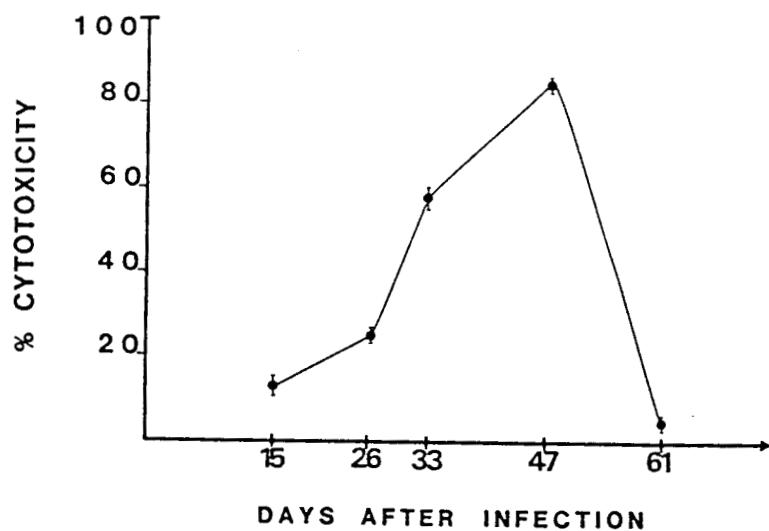
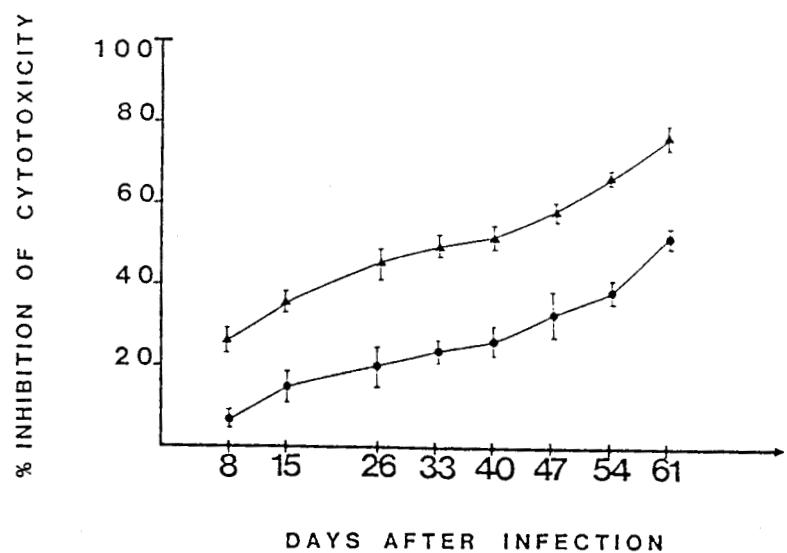


FIGURE 4



BU
LILLE

Article 3: filariose

Dans la première partie de ce travail, nous avons rapporté l'existence d'une cytotoxicité plaquettaire IgE-dépendante des plaquettes humaines au cours des infections filariennes. Ainsi, des plaquettes de patients infectés par *B. malayi* sont capables *in vitro* de tuer des microfilières de *B. malayi*.

Nous avons démontré ensuite que cette activité cytotoxique des plaquettes pouvait être modulée par des facteurs d'origine lymphocytaire. En effet des surnageants obtenus après stimulation antigénique des lymphocytes T de patients infectés par *B. malayi* inhibent complètement la cytotoxicité plaquettaire vis-à-vis des microfilières de *B. malayi* si des plaquettes de sujets normaux incubées dans le sérum des mêmes patients sont utilisées comme cellules effectrices.

En conclusion la PASL est donc capable, dans deux infections parasitaires majeures, de moduler *in vitro* comme *in vivo* les fonctions immunes des plaquettes sanguines.

L'article 4 est présenté page 111.

Full title: IgE-DEPENDENT KILLING OF *B. MALAYI* MICROFILARIAE BY HUMAN PLATELETS AND ITS MODULATION BY T CELL PRODUCTS

Running title: THE IgE-DEPENDENT KILLING OF MICROFILARIAE
AND ITS MODULATION

V. Pancré^{*}, J.Y. Cesbron^{*}, C. Auriault^{*}, M. Joseph^{*}, J. Chandenier[°] and A. Capron^{*}

^{*}From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624
Institut Pasteur
1, rue du Pr A. Calmette
59019 Lille Cédex (France)

[°]From the Département des Maladies Tropicales et Parasitaires
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière
(Professeur M. Gentilini)
Paris (France)

Footnotes

Address correspondence to :

Véronique Pancré
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Institut Pasteur
B.P. 245
59019 Lille (France)

Abstract

Platelets isolated from patients infected with filariasis were cytotoxic for microfilariae *in vitro*. Moreover, platelets from normal donors acquired killing properties in the presence of serum from infected individuals. The humoral factor involved in this cytotoxic process was shown to be IgE. This IgE-dependent cytotoxicity of platelets was strongly inhibited by antigen-stimulated T lymphocyte supernatants from filarial patients.

More than 400 million people in the world are infected by filarial parasites, leading to a wide range of pathologies. The capacity of the immune system to deal with nematodes parasites has been well documented in reviews (1, 2) which raised the question of how parasite elimination may be accomplished. Filarial parasites are susceptible to immune-mediated killing *in vitro*, at least at the microfilarial stage of their life-cycle and this mechanism may be viewed as one general model of nematode elimination. Macrophages, neutrophils and eosinophils have all been shown to exhibit cytotoxic properties toward microfilariae of various filarial species (3).

Recently, Haque *et al.* (4) demonstrated that *Dipetalonema viteae* microfilariae can be killed by normal rat platelets in the presence of IgE antibodies. The same IgE antibodies present in the anti-serum obtained from rats infected with *D. viteae* can also mediate killing of microfilariae of *Brugia malayi* and *Loa loa* by platelets. These blood elements by virtue of their size, number and dissemination represent for circulating microfilariae the first and most permanent contact with host tissues. In the present work, we have investigated the role of platelets from patients with active filariasis in the killing of microfilariae of *B. malayi* and the possible regulation of this platelet-mediated killing by T cell products as previously described in schistosomiasis (5).

Materials and Methods

Parasites and preparation of microfilariae

B. malayi was maintained in our laboratory according to the method of Sänger (6). Microfilariae were produced *in vitro* by gravid female worms that were kept in culture in a serum-free Basal Eagle's Medium (Gibco, cat. n° 6-13, USA) as previously described (7).

Immunoglobulins and immunologic reagents

Human IgE myeloma protein was purchased from Bennett Laboratories (Buena Park, CA) and was further purified by gel filtration and ion-exchange chromatography according to a technique described elsewhere (8). Human γ -globulin fraction II was obtained from Miles Laboratories (Elkhart, IN) ; goat polyclonal anti-human IgE antiserum and rabbit FITC-conjugated IgG anti-mouse IgG were provided by Miles-Yeda (Rehovot, Israël) ; monoclonal antibodies OKT3, OKT4, OKT8, OKM1 and OKIa1 were obtained from Ortho Diagnostic Systems Inc. (Raritan, NJ, USA).

Lymphocyte culture medium

For all cultures RPMI-1640 (Flow Laboratories, Asnières, France) was supplemented with $5 \cdot 10^{-5}$ M 2- β mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 2 mM glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Courbevoie, France), antibiotics (1000 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 10 mM HEPES (Sigma, St-Louis, MO) and 5 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco) (RPMI-FCS).

Enrichment of T cells

Blood samples were obtained from non-treated patients with active filariasis (*Brugia malayi*) diagnosed by direct examination. Blood, diluted with an equal volume of PBS, was layered on a Ficoll gradient and centrifuged, at room temperature for 45 min at 500 x g.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), washed 3 times with PBS, were enriched for T cells by passing through an IgG-anti IgG-coated glass bead column. The enriched T cell population was controlled by flow cytometry using

monoclonal antibodies against T cell subsets : OKT3 (for pan T), OKT4 (for helper/inducer), OKT8 (for suppressor/killer), OKM1 (for monocytes) and OKIa1 (for B cells) as control. Cells ($5 \cdot 10^6$ /ml) in PBS were incubated with monoclonal antibody for 30 min at 4°C, washed three times with PBS, and then labeled with fluorescein-conjugated rabbit antibodies to mouse IgG. The population of fluorescein-conjugated cells was quantified by an automated biologic cell analysis and sorting system (50-H Cytofluorograf, Ortho Instrument, Westwood, MA). The enriched T cell population contained 56 % OKT3⁺, 38 % OKT4⁺, 15 % OKT8⁺, 0,1 % OKM1⁺ and 0 % OKIa1⁺.

Preparation of T lymphocyte supernatants

The stimulation of patient T cells was performed in RPMI-FCS by addition of purified *B. malayi* antigens (100 µg/ml final concentration) in the presence of autologous irradiated (2000 Rads, 2 min) PBMC and mouse IL2 (produced in our laboratory). After 24 hr in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂, cells were washed in order to eliminate the extracts and cultured for 4 days. The culture supernatant was recovered, filtered through 0.22 µ membrane and stored at -20°C.

Platelet isolation

The overall procedure for isolation of platelets was carried out at room temperature as previously described (9).

Briefly, human venous blood from *B. malayi* -infected patients or from healthy adult volunteers (6 vol) collected on ACD-A (1 vol) (10) was centrifuged for 15 min at 120 x g in 5 ml aliquots, the platelet-rich plasma (PRP) collected in a single volume and centrifuged at 2000 x g for 15 min. The lowest part of the pellet was not recovered when contaminated with red cells and the platelets were resuspended and washed for three times at 2000 x g in saline supplemented with citric acid (36 mM), glucose (5 mM), calcium (2 mM), magnesium (1 mM), BSA (0.35 %) and PGE1 (100 nM) (11, 12). The last pellet was resuspended and the platelets were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after a 1/20 dilution with 1 % ammonium oxalate, and adjusted to the appropriate concentration.

The observation of undiluted platelet suspensions with interferential contrast microscopy repeatedly confirmed that the leucocyte contamination never exceeded 10 per 10^6 platelets.

Anti-microfilariae cytotoxicity

The anti-microfilariae cytotoxicity tests were carried out as previously described (7). Platelets ($150 \cdot 10^6$) from *B. malayi*-infected patients or from normal individuals were incubated in flat-bottomed microplates in 50 μl EMEM supplemented with 20 μl serum from infected patients, 50 μl lymphocyte supernatant or medium, and with 150 to 200 *B. malayi* microfilariae (L1). The cytotoxic activity was tested after 18 hr at 37°C in 5 % CO₂ in air. The dying larvae became granular, stiff and immobile, and after 18hr were undetectable by optical microscopy ; only the living, mobile and refringent microfilariae were counted. The number of larvae in each well was determined before assay, and each experiment was performed in duplicate. The results are expressed as mean \pm s.e.m. of the percentage of dead larvae.

Flow cytofluorometry

Human blood (9 volumes) was collected on EDTA 5 % in water (1 volume) and platelets were isolated by the procedure described above, with washes in PBS containing 0.01 M EDTA, a buffer also used for the following washing steps. Platelets (2.10^7) in 100 μl PBS were incubated at 37°C for 30 min each, first with 10 μg human myeloma IgE protein, then, after washing, with 10 μg mouse monoclonal IgG anti-human IgE and finally, after washing, with 10 μl rabbit FITC-IgG anti-mouse IgG. For the detection of IgE bound *in vivo* on platelets, the first incubation with myeloma IgE was omitted. In each case, after a final washing step, the platelets were resuspended in 500 μl PBS, containing 0.01 M EDTA and the percentage of fluorescent platelets was measured in a 50-H Cytofluorograf (Ortho Diagnostic Systems, Westwood, Ma, USA). The background of non-specific binding of the fluorescent antibody on untreated platelets (less than 5 %) was subtracted from all the results.

Results

The IgE-dependence of the anti-parasite activity of platelets (Figure 1)

Platelets from filariasis patients were highly cytotoxic ($87 \pm 12\%$) *in vitro* against *B. malayi* microfilariae (Fig. 1A). This killing effect resulted from the stimulation of platelet effector functions by a humoral factor since normal platelets, previously inactive against microfilariae, acquired cytotoxic properties ($73 \pm 7\%$) after incubation in sera from infected patients selected for high IgE levels (mean of 1160 IU/ml) (Fig. 1B1). The humoral factor involved was IgE since heating (Fig. 1B2) as well as immunoabsorption of IgE in a solid-phase system (Fig. 1B3) abrogated the cytotoxicity.

This suggested that specific IgE played a crucial role in the induction of the platelet cytotoxic functions as already described in schistosomiasis (13). Moreover, platelets from filariasis patients expressed very low levels of cytotoxicity ($26 \pm 8\%$) *in vitro* against *S. mansoni* larvae suggesting a species specificity of the IgE-dependent platelet killing.

Cytofluorometric analysis (Table 1)

A cytofluorometric analysis was performed with the platelets taken from *B. malayi*-infected patients. All the patients exhibited a significant increase in platelets bearing membrane IgE (17 %) when compared to normal subjects (8 %). This percentage was doubled after a preincubation of platelets with myeloma IgE prior to fluorescent labelling (30 %).

Effect of T lymphocyte supernatants on the IgE-dependent platelet cytotoxicity (Figure 2)

The supernatants obtained after stimulating peripheral T lymphocytes from *B. malayi*-infected patients with *B. malayi* antigens (100 µg/ml) were tested in the cytotoxicity assay of platelets toward microfilariae.

A marked inhibition (73 %) of platelet cytotoxicity was observed in the presence of such supernatants when normal platelets, incubated with the corresponding serum of infected patients, were used as effector cells. The absence of

lactate dehydrogenase (LDH Biochemica test, Boehringer) in the medium after the incubation of the platelets with the T cell supernatants indicated that the decrease of the cytotoxicity observed was not due to a toxic effect on the platelets, but to an inhibition of their capacity to be activated.

Discussion

We demonstrate here that platelets taken from *B. malayi*-infected patients were able to kill *B. malayi* microfilariae *in vitro*. Moreover, platelets from normal donors acquired toxic properties toward the same target in the presence of serum from infected patients. Heating as well as IgE-depletion led to the abolition of the activating properties of such serum, strongly suggesting the involvement of IgE in this cytotoxic process.

These results may be compared to the observations of Haque *et al.* (4) who demonstrated that platelets from normal rats interacted with microfilariae of *Dipetalonema vitae*, *in vitro*, in the presence of IgE antibodies, leading to the killing of the parasite.

Moreover, platelets from filariasis patients were not cytotoxic for the larvae of another helminth parasite, *S. mansoni*. These data which demonstrated that IgE-bearing platelets could be activated only by specific antigens confirmed the restricted antibody specificity of IgE in filariasis (14). In addition it was recently reported that the effect of diethylcarbamazine (DEC), used in therapy and control of filariasis, is mediated via an antibody-independent mechanism which involves the participation of free radicals (7). The comparison between these two cytotoxic mechanisms mediated by platelets is underway.

The participation of platelets in the immune response raised the question of the interaction of platelets with the other immunocompetent cells, and particularly with T lymphocytes. Antigen-stimulated T lymphocyte supernatants from *B. malayi*-infected patients inhibited the IgE-dependent cytotoxicity developed by platelets toward the microfilariae of *B. malayi*. These results were similar to those observed in human schistosomiasis in *in vitro* studies which showed that platelets taken from *Schistosoma mansoni*-infected patients were highly cytotoxic against *S. mansoni* larvae (9). We observed that ConA- and antigen-stimulated CD4⁺/CD8⁺ T cells released a factor, termed Platelet Activity Suppressive Lymphokine (PASL), able to inhibit this IgE-dependent platelet cytotoxicity toward schistosomula (5,15).

Thus, the present results suggest that in filariasis, as in schistosomiasis, PASL probably controls platelet immune functions by exerting a feedback

regulation on the IgE-stimulated platelet activity. We have, moreover, demonstrated that other lymphokines, and in particular IFN- γ , produced by CD4 $^{+}$ /CD8 $^{-}$ T cells were able to induce normal human platelets to become efficient effector cells toward schistosomula (16). The role of these lymphokines in filariasis is presently under investigation. Thus, specific IgE, but also IFN- γ production by antigen-specific CD4 $^{+}$ /CD8 $^{-}$ T lymphocytes, could induce platelets to become cytotoxic effectors, while a feedback regulation of the platelet immune functions would be under the control of CD4 $^{-}$ /CD8 $^{+}$ stimulated T cells by means of PASL.

The results presented here extend our knowledge of anti-microfilarial immunity with the demonstration of the participation of blood platelets and provide additional support for a role of T cell factors in the regulation of a platelet-mediated response in helminth diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank D. Henry and H. Vorng for expert technical assistance and Doctor J.P. Kusnierz for flow cytofluorometry analysis; J.P. Gazet for maintaining the *B. malayi* cycle ; Doctors M. Barbier (Hôpital International de Paris) and H. Taelman (Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, Belgium) for access to filariasis patients. The secretarial assistance of C. Colson and M.F. Massard was appreciated.

This work was supported, in part, by funds from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ID 860073).

References

1. Olgivie, B.M. ; Love R.J. : Cooperation between antibodies and cells in immunity to a nematode parasite. *Transplant. Rev.* , 19: 147-162 (1974).
2. Wakelin, D. : Immunity to intestinal parasites. *Nature*, 273: 617-620 (1978).
3. Maizels, R.M. ; Philipp, M. ; Olgivie, B.M. : Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* , 61: 109-136 (1982).
4. Haque, A. ; Cuna, W. ; Bonnel, B. ; Capron, A. ; Joseph, M. : Platelet-mediated killing of larvae from different filarial species in the presence of *Dipetalonema viteae* stimulated IgE antibodies. *Parasite Immunol.* , 7: 517-525 (1985).
5. Pancré, V. ; Joseph, M. ; Cesbron, J.Y. ; Capron, A. ; Barbier, M. ; Kusnierz, J.P. ; Vorng, H. ; Auriault, C. : Modulation of platelet effector function by T lymphocytes in human and rat schistosomiasis mansoni. Submitted for publication (1987).
6. Sänger, I. ; Lämmler, G. ; Kimming, P. : Filarial infections of *Mastomys natalensis* and their relevance for experimental chemotherapy. *Acta Tropica*, 38: 277-288 (1981).
7. Cesbron, J.Y. ; Capron, A. ; Vargaftig, B. ; Lagarde, M. ; Pincemail, J. ; Braquet, P. Taelman, H. ; Joseph, M. : Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*, 325: 533-536 (1987).
8. Laurence, D.A. ; Weigle, W.O. ; Spiegelberg, H.L. : Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J. Clin. Investig.* , 55: 368-376 (1975).
9. Joseph, M. ; Capron, A. ; Ameisen, J.C. ; Capron, M. ; Vorng, H. ; Pancré, V. ; Kusnierz, J.P. ; Auriault, C. : The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* , 16: 306-312 (1986).
10. Caen, J.P. ; Nurden, A.T. ; Jeanneau, C. : Bernard-Soulier syndrome, a new platelet glycoprotein abnormality: its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the FVII von Willebrand protein. *J. Lab. Clin. Med.* , 87: 586-596 (1976).
11. Patscheke, H. ; Wörner, P. : Platelet activation detected by turbidometric shape change analysis: differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E1. *Thrombo. Res.* , 12: 485-496 (1978).

12. Patscheke, H. : Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Hemostasis*, 10: 14-23 (1981).
13. Joseph, M. ; Auriault, C. ; Capron, A. ; Vorng, H. ; Viens, P. : A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 303: 810-812 (1983).
14. Khalife, J. ; Capron, M. ; Cesbron, J.Y. ; Taï, P.C. ; Taelman, H. ; Prin, L. ; Capron, A. : Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* , 137: 1659-1664 (1986).
15. Pancré, V. ; Auriault, C. ; Joseph, M. ; Cesbron, J.Y. ; Kusnierz, J.P. ; Capron, A. A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* , 137: 585-591 (1986).
16. Pancré, V. ; Joseph, M. ; Mazingue, C. ; Wietzerbin, J. ; Capron, A. ; Auriault, C. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of gamma interferon. *J. Immunol.* , 138: 4490-4495 (1987).

Legends to figures

- Figure 1. The IgE-dependent cytotoxicity of platelets against *B. malayi* microfilariae
- A. Cytotoxicity of platelets from *B. malayi*-infected patients
 - B. Cytotoxicity of platelets from normal donors incubated in the serum from the same patients
 - 1. Untreated
 - 2. Heated 3 hr at 56°C ($p < 0.05$)
 - 3. Depleted in IgE ($p < 0.05$).
- Figure 2. Inhibition of the IgE-dependent cytotoxicity of platelets by T lymphocyte supernatants.
- Platelets from normal donors incubated :
- A. with serum from *B. malayi*-infected patients
 - B. with both serum and antigen-stimulated T lymphocyte supernatant from the same infected patients ($p < 0.05$).

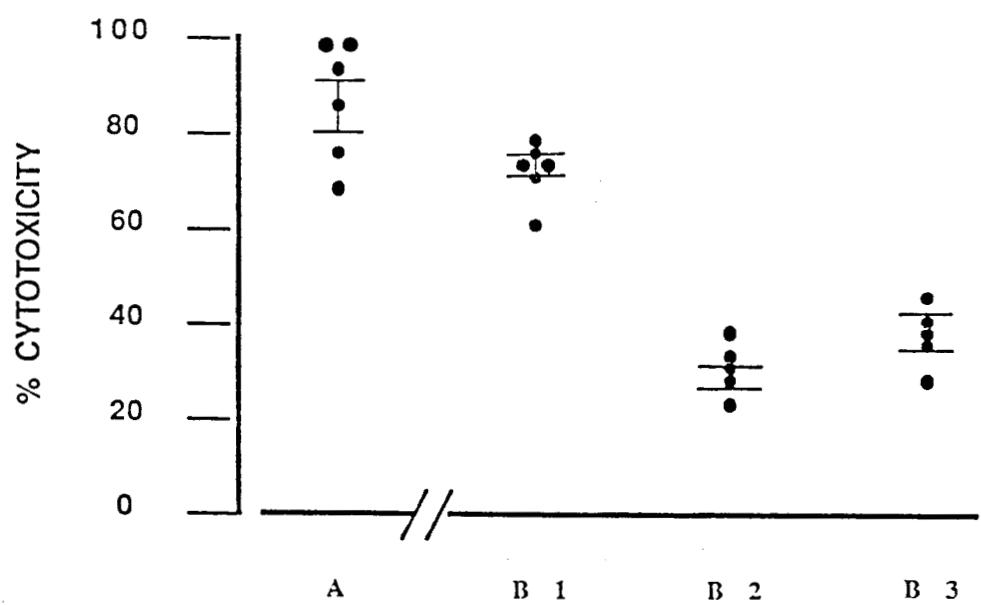


FIGURE 1



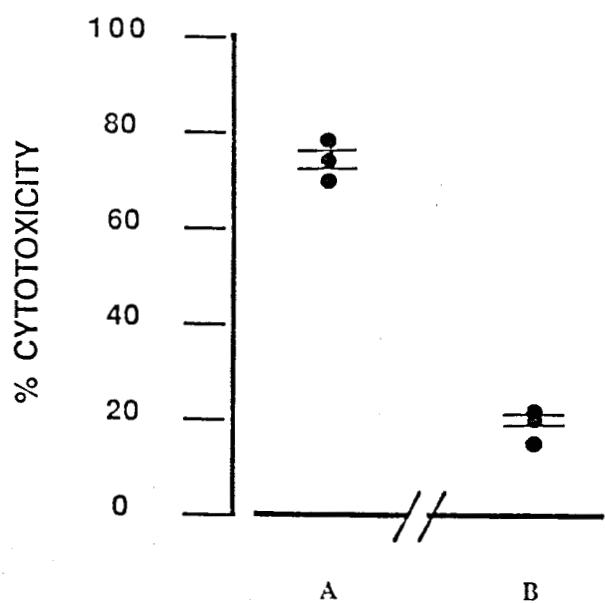


FIGURE 2

Table 1. Percentage of IgE⁺ - platelets determined by flow cytofluorometry

Platelets from	Before IgE preincubation	After	n
Healthy donors	8,0 ± 3,2	12,0 ± 2,1	5
Filarial patients	17,4 ± 6,4	30,0 ± 11,7	5

110

20



Article 4**Induction des fonctions cytotoxiques des plaquettes par des lymphokines: rôle de l'interféron gamma.**

Suite à la mise en évidence d'une activité inhibitrice des fonctions cytotoxiques plaquettaires, nous avons tenté de voir si parallèlement existait une activité stimulante des fonctions effectrices des plaquettes. Nous nous sommes donc placés dans des conditions expérimentales différentes puisque cette fois nous avons testé l'effet de surnageants de lymphocytes T de sujets sains stimulés par mitogène (Con A) ou de lymphocytes de sujets bilharziens stimulés par antigène spécifique (*S. mansoni*) sur des plaquettes de sujets sains.

Dans cet article, nous avons démontré que les lymphocytes T exprimant les marqueurs de surface CD4⁺CD8⁻ libèrent dans ces conditions des facteurs capables d'induire de façon dose-dépendante des plaquettes prélevées à des individus sains, et normalement inactives, en cellules cytotoxiques pour les schistosomules et ceci en l'absence d'anticorps anti-parasitaires.

La cinétique d'induction de la cytotoxicité plaquettaire est comparable à celle obtenue après stimulation de la même population cellulaire par un sérum riche en IgE.

Les lymphokines stimulantes étant détectées dans deux pics d'électrofocalisation, le premier au point isoélectrique 6,2-6,5 et le second au point isoélectrique 8,7-8,8 cela suggère qu'**au moins deux facteurs pouvaient être responsables de l'effet inducteur observé.**

La forte sensibilité au traitement acide, l'absorption observée sur bleu cibacron et le point isoélectrique basique de l'une des activités stimulantes étaient des propriétés physicochimiques qui suggéraient que l'**IFN- γ** pouvait être l'un des facteurs responsables de l'induction observée. La neutralisation de l'activité cytotoxique par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ , la présence d'**IFN- γ** dans les surnageants lymphocytaires et surtout l'effet inducteur direct de l'**IFN- γ** recombinant, à des doses physiologiques avec ce qui est présent dans les surnageants confirment cette

hypothèse et démontrent que l'IFN- γ est bien l'un des facteurs responsables de l'induction des fonctions cytotoxiques des plaquettes sanguines.

L'article 5 est présenté page 119.

0022-1767/87/13812-4490\$02.00/0
 THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY
 Copyright © 1987 by The American Association of Immunologists

Vol. 138, 4490-4495, No. 12, June 15, 1987
 Printed in U.S.A.

INDUCTION OF PLATELET CYTOTOXIC FUNCTIONS BY LYMPHOKINES: ROLE OF INTERFERON- γ ¹

VÉRONIQUE PANCRE,^{2*} MICHEL JOSEPH,^{*} CHRISTINE MAZINGUE,^{*} JUANA WIETZERBIN,^{*} ANDRÉ CAPRON,^{*} AND CLAUDE AURIAULT^{*}

From the ^{*}Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Pr A. Calmette, 59109 Lille Cedex, France; and the ²Section de Biologie, INSERM 196, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France

Antigen- or mitogen-stimulated CD4⁺/CD⁻ lymphocytes produced factors able to induce normal human platelets into cytotoxic effectors toward the young larvae of *Schistosoma mansoni*. The neutralization by monoclonal anti-IFN- γ antibody of the induction of the platelet killer effect, the presence of IFN- γ in the CD4⁺/CD8⁻ lymphocyte supernatant, and, finally, the direct inducer effect of recombinant IFN- γ clearly demonstrated that IFN- γ was one of the factors responsible for the induction of platelet cytotoxic functions.

In recent years, considerable progress has been made in identifying components that mediate the interaction between cells involved in the immune processes against many different pathogens. A variety of soluble factors have been described which induce or potentiate the immune response, such as interleukins 1 and 2 (1, 2), interferons (IFN) (3), or B cell growth factors (4). A few years ago, we showed that a physiological concentration of highly purified blood platelets taken from *Schistosoma mansoni*-infected patients or immune rats expressed direct anti-parasite killing properties in vitro (5). Moreover, the i.v. passive transfer of platelets from immune animals to naive rats conferred a high degree of protection toward a challenge infection (5). The killing properties of the platelets were shown to be due, in part, to the presence of specific IgE bound to Fc ϵ receptors (6) present on the platelet membrane (7), because the prior incubation of normal human or rat platelets with specific IgE-rich sera was able to induce a significant degree of parasite killing. This observation of a participation of platelets in the immune response extended our knowledge of the anti-parasite immunity, and raised the question of the interaction of platelets with the other immunocompetent cells, particularly with T lymphocytes. We have demonstrated recently that Con A- and antigen-stimulated CD4⁺/CD8⁻ T cells released a factor able to inhibit the IgE-induced cytotoxic properties of platelets toward *S. mansoni* larvae (schistosomula) as well as the chemiluminescence of these cells obtained in an IgE-anti-

IgE reaction (8). This factor was termed platelet activity suppressive lymphokine (PASL).³ In the present work, we demonstrated that CD4⁺/CD8⁻ and not CD4⁻/CD8⁺ T lymphocytes produced at least two factors able to induce, in the absence of antibodies, anti-parasite properties into platelets from healthy donors, spontaneously inactive on schistosomula. One of these factors has been identified as IFN- γ .

MATERIALS AND METHODS

Immunoglobulins and immunologic reagents. Monoclonal antibodies OKT3, OKT4, OKT8, OKM1, and OKIa1 were obtained from Ortho Diagnostic Systems Inc. (Raritan, NJ); human γ -globulin Fraction II was obtained from Miles Laboratories (Elkhart, IN); mouse polyclonal anti-human IgG was produced in our laboratory; rabbit FITC-conjugated IgG anti-mouse IgG was provided by Miles-Yeda (Rehovot, Israel); and pure recombinant human IFN- γ with a specific activity of 2×10^9 U/mg proteins, goat serum to natural human IFN- γ , and mouse monoclonal antibody to recombinant human IFN- γ (9) were gifts from Dr. E. Falcoff (Institut Curie, Paris, France).

Lymphocyte culture medium. For all cultures, RPMI 1640 (Flow Laboratories, Asnières, France) was supplemented with 5×10^{-5} M 2- β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 2 mM glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO, Courbevoie, France), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 10 mM HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and 5% heat-inactivated FCS (GIBCO) (RPMI-FCS).

Enrichment of T cells. Venous blood from patients with *S. mansoni* or from healthy adult volunteers was diluted with an equal volume of PBS, was layered on Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and was centrifuged at room temperature for 45 min at 500 \times G. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), washed three times with PBS, were enriched in T cells by passing through an IgG-anti-IgG-coated glass bead column.

The enriched T cell population was controlled by flow cytometry with the use of monoclonal antibodies against T cell subsets: OKT3 (for pan-T), OKT4 (for helper/inducer), OKT8 (for suppressor/killer), OKM1 (for monocytes), and OKIa1 (for B cells) as controls. Enriched T cells, suspended in PBS at 5×10^6 cells/ml, were incubated with monoclonal antibody for 30 min at 4°C, were washed three times with PBS, and were then labeled with fluorescein-conjugated rabbit antibodies to mouse IgG. The population of fluorescein-labeled cells was quantified by an automated biological cell analysis and sorting system (50-H Cytofluorograf; Ortho Instruments, Westwood, MA). The enriched T cell population contained 56% OKT3⁺, 38% OKT4⁺, 15% OKT8⁺, 0.1% OKM1⁺, and 0% OKIa1⁺ cells.

Depletion of T cell subsets. For depletion of T cell subsets, a complement-dependent cytotoxicity assay with specific monoclonal antibody was performed. T cells were incubated with 1/40 diluted monoclonal antibodies against CD4⁺ or CD8⁺ T cell subsets for 30 min at 4°C, were washed with PBS, pH 7.4, and were then incubated for 1 hr at 37°C in the presence of 1/2 diluted rabbit serum as a source of complement. The efficiency of the depletion was controlled by flow cytometry with the use of fluorescein-labeled monoclonal antibodies specific for T cell subsets by the procedure described above. Suppressive cell-depleted T populations contained 93% CD3⁺.

* Abbreviations used in this paper: PASL, platelet activity suppressive lymphokine; EMEM, Eagle's minimum essential medium; CRP, C-reactive protein; PCIF, platelet cytotoxicity-inducing factors.

Received for publication December 11, 1986.

Accepted for publication March 13, 1987.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by INSERM 167-CNRS 624.

²Address correspondence to: Véronique Pancré, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, B.P. 245, 59019 Lille, France.

91% CD4⁺, and 7% CD8⁺ cells. Helper cell-depleted T populations contained 93% CD3⁺, 83% CD8⁺, and 10% CD4⁺ cells.

Preparation of T lymphocyte supernatants: by mitogenic stimulation. 3×10^6 peripheral CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8⁺, or pan-T cells from patients with *S. mansoni* or healthy donors were incubated with Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C in flat-bottomed clusters (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 hr in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Supernatants from each well were recovered, were centrifuged at 400 $\times G$, and were filtered through 0.22- μm membranes before storage at -70°C until use.

By antigenic stimulation. CD4⁺/CD8⁻, CD4⁻/CD8⁺, or pan-T cell stimulation from a patient with *S. mansoni* was performed in RPMI-FCS by the addition of crude extracts from *S. mansoni* adult worms (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of autologous irradiated (2000 rad, 2 min) PBMC and conditioned medium, in flat-bottomed culture clusters and in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 24 hr, cells were washed to eliminate the antigenic extracts and were cultured for 4 days. The culture supernatant was recovered, was filtered through a 0.22- μm membrane, and was stored at -70°C. Simultaneously, the proliferative response of the T cells was measured in these conditions, after a 16-hr pulse with 1 μCi of [³H]-thymidine (5 Ci/mmol; CEA, Paris, France), the incorporated radioactivity being determined by filtrating the cultures through Millipore membranes and counting the filters in a liquid scintillation fluid in a beta-spectrometer (ISOCAP 300; Nuclear Chicago Division). The incorporation of [³H]-thymidine reached the value of 47.438 \pm 2.304 cpm with stimulated T cells (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), but never exceeded 1328 \pm 234 cpm with unstimulated T cells.

Platelet isolation. The overall procedure for the isolation of platelets was carried out at room temperature. Venous blood (6 vol) collected on ACD-C (1 vol) (10) was centrifuged for 15 min at 120 $\times G$ in 5-ml aliquots; the platelet-rich plasma was collected in a single volume, and was centrifuged at 2000 $\times G$ for 15 min. Avoiding the recovery of the lowest part of the pellet when contaminated with red cells, the platelets were resuspended for three washing steps at 2000 $\times G$ in saline supplemented with citric acid (36 mM), glucose (5 mM), calcium (2 mM), magnesium (1 mM), BSA (0.35%), and PGE1 (100 nM) (11, 12). The last pellet was resuspended and the platelets were counted in a hemocytometer under phase-contrast microscopy after a 1/20 dilution with 1% ammonium oxalate, and were adjusted to the appropriate concentration.

The observation of undiluted platelet suspensions with differential contrast microscopy repeatedly confirmed that the leukocyte contamination never exceeded 10 per 10⁶ platelets.

Anti-schistosome cytotoxicity. The platelets were isolated by the procedure described above. At the end of the washing steps, the pellet was resuspended in Eagle's minimal essential medium (EMEM). Platelets (150 $\times 10^6$) from normal donors were incubated in flat-bottomed microplates (Nunc) in 50 μl EMEM supplemented with 20 μl serum from normal individuals, 50 μl of lymphocyte supernatant or EMEM, and 75 *S. mansoni* schistosomula in 80 μl EMEM. After 24 hr incubation at 37°C in 5% CO₂ in air, motionless and dark, dead larvae were easily distinguished from mobile and refringent living schistosomula by optical microscopy (5). Platelet aggregation was never observed during the assays.

Isoelectric focusing. Preparative horizontal bed isoelectric focusing was carried out by using an LKB Multiphor apparatus. Focusing of the lymphocyte supernatant was performed in a 10-ml bed of Sephadex G-75 containing 5% carrier ampholines, pH range 1 to 13, for 16 hr at 8 W constant power. The gel bed was divided into 30 sections by using an LKB template. Each gel fraction was eluted with 2 ml water in 10-ml syringe barrels fitted with a porous plastic sinter. After direct pH determination, the eluted fractions were then dialyzed overnight against PBS, 0.1 M, pH 7, to remove ampholines. Each fraction was tested for its activity on platelet cytotoxicity.

Enzyme treatment. Trypsin digestion was carried out by incubating supernatants with 11 IU trypsin/ml (Boehringer, Mannheim, FRG) for 3 hr at 37°C. Proteinase K treatment was performed by adding 2 IU proteinase K/ml (Boehringer) for 1 hr at 37°C.

IFN assay. T lymphocyte supernatants were titrated, as reported previously (13), on Wish cell monolayers by a cytopathogenic inhibition test using vesicular stomatitis virus as challenge. IFN- γ titers were expressed in international units, using NIH reference as standard.

RESULTS

Induction of platelet cytotoxic properties by T lymphocyte supernatants. The supernatants obtained after stimulating total, CD4⁺/CD8⁻, or CD4⁻/CD8⁺ T lymphocyte populations from patients with *S. mansoni* by anti-

gens from *S. mansoni* (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or by Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were tested for their capacity to induce platelets from normal donors into cytotoxic effectors toward schistosomula (Table I).

A significant induction of cytotoxicity was observed when normal platelets were incubated with supernatants obtained after stimulation of the CD4⁺/CD8⁻ T cell subpopulation either by the lectin or by *S. mansoni* antigens. In contrast, the supernatants of activated total T lymphocytes, or the CD4⁻/CD8⁺ T cell subpopulation, were unable to induce normal platelets into cytotoxic effectors toward the larvae. Moreover, the induction of the platelet cytotoxicity by the CD4⁺/CD8⁻ T cell supernatant was strongly inhibited by the addition, during the cytotoxic assay, of these pan-T or CD4⁻/CD8⁺ T cell supernatants (respectively, from 42% \pm 1.4 to 14.5% \pm 1.4 and from 42% \pm 1.4 to 19% \pm 1.4). Similar results were obtained with lymphocytes from normal donors stimulated by mitogen (Table I). For this reason, supernatants referred to below were produced after Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimulation of CD4⁺/CD8⁻ peripheral T cells from normal donors.

The observed cytotoxicity was neither the consequence of a lytic effect of the CD4⁺/CD8⁻ T lymphocyte supernatant, because no lactate dehydrogenase could be detected in the platelet suspension, nor of a toxic effect because, in the absence of platelets, the CD4⁺/CD8⁻ supernatant was without effect on schistosomula. As shown in Figure 1, this supernatant acted in a dose-dependent manner, reaching a plateau with the dose of 50 μl (1/4 final dilution), the dose used for all of the following experiments. Nevertheless, the doses of 5 and 10 μl also induced significant cytotoxicity.

The time course of the induction of the platelet cytotoxicity by the CD4⁺/CD8⁻ T lymphocyte supernatants was compared to the activation of the same platelet population by IgE-rich sera from *S. mansoni*-infected patients (5) (Fig. 2). It appeared that in regard to their killing progression, the curves could be compared, although the cytotoxicity of the platelets stimulated by the T lymphocyte factors was slightly lower.

Binding structure on platelet. It was possible to absorb the factors present in the supernatant of Con A-stimulated CD4⁺/CD8⁻ peripheral T cells. Three successive incubations of this supernatant with platelet pellets almost completely abrogated its inducing effect. The cytotoxicity was reduced from 40.9% \pm 9.4 to 20.5% \pm 3.6.

TABLE I
Induction by T lymphocyte supernatants of anti-parasite cytotoxic properties in platelets from normal donors

Stimulation of T Lymphocytes	% Platelet Cytotoxicity ^a		
	pan-T	CD4 ⁺ /CD8 ⁻	CD4 ⁻ /CD8 ⁺
From patients with <i>S. mansoni</i> schistosomiasis			
with Con A	13.1 \pm 3.6	43.5 \pm 0.7 ^b	17.0 \pm 1.4 ^c
with <i>S. mansoni</i> antigens	14.0 \pm 4.2	38.0 \pm 1.4 ^b	12. \pm 1.4 ^c
From normal patients			
with Con A	11.7 \pm 2.4	41.5 \pm 3.5 ^b	14.0 \pm 1.4 ^c

^a Purified platelets were incubated with serum from normal donors in the presence of *S. mansoni* larvae (schistosomula). Supernatants from Con A or *S. mansoni* antigen-stimulated lymphocytes were added and the cytotoxicity was appreciated as percent of dead schistosomula at the end of a 24-hr incubation at 37°C (mean \pm SD). Platelet cytotoxicity never exceeded 11.3 \pm 3.3 in the absence of lymphocyte supernatants and 18 \pm 1.3 in the presence of unstimulated T lymphocyte supernatants.

^b Significantly different from unfractionated lymphocytes ($p < 0.05$).

^c Nonsignificantly different from unfractionated lymphocytes ($p > 0.05$).

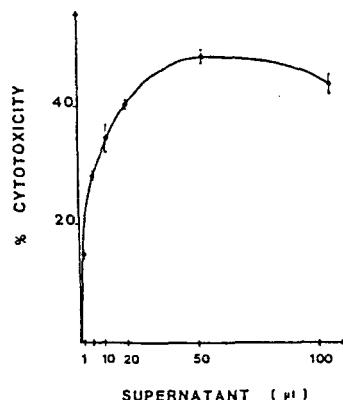


Figure 1. Dose response of the Con A-stimulated CD4+/CD8- lymphocyte supernatant for the induction of the platelet cytotoxicity toward schistosomula.

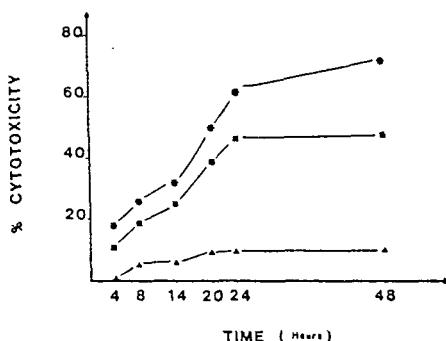


Figure 2. Time course of the platelet cytotoxicity induction by: serum from patient with *S. mansoni* (—); CD4+/CD8- lymphocyte supernatant (■—■); serum from normal donor (▲—▲).

after absorption (control $11.3\% \pm 3.4$). This absorption of the factor(s) by the platelets suggested the existence of a binding structure on the platelet membrane.

Physicochemical properties of the platelet-stimulating factors. We investigated the physicochemical properties of the factor inducing platelet cytotoxicity, produced in vitro, by Con A (5 μ g/ml)-stimulated CD4+/CD8- peripheral lymphocytes. As shown in Table II, the platelet cytotoxicity induction was diminished by heating (56°C for 120 min or 100°C for 5 min) but was not modified by dialysis. The activity contained in the supernatant was acid-labile and sensitive to trypsin. The high sensitivity to acid treatment suggested that IFN- γ , known to be produced by mitogenic stimulation of T cells (13), could play a role in the induction of platelet cytotoxic functions. Several factors including IFN- γ bind to immobilized Cibacron Blue F₃GA (13–15). For that reason, the affinity of the supernatant for this chromophore was tested and the adsorption of the inducer effect was observed after filtration through a Blue Sepharose gel, a sorbent which contains Cibacron Blue F₃GA as a ligand.

After isoelectric focusing, the platelet cytotoxicity-inducing activity was detected in two peaks at the isoelectric points (pI) 6.2 to 6.5 and 8.7 to 8.8 (Fig. 3). Each peak was heated at 56°C for 120 min or was treated by acid. The activity focusing in the second peak, with a pI similar to that reported for natural IFN- γ (13), was strongly diminished by heating (from $35\% \pm 1.4$ to $12\% \pm 1.4$),

TABLE II
Physicochemical properties of the platelet cytotoxicity-inducing factors toward *S. mansoni* larvae^a

Treatment	% Cytotoxicity	p
None	40.9 ± 9.4	—
Heating		
120 min ak 56°C	29.0 ± 1.4	$p < 0.05$
5 min ak 100°C	31.5 ± 6.3	$p < 0.05$
Dialysis	40.0 ± 2.8	$p > 0.05$
Acid treatment	17.5 ± 10.6	$p < 0.05$
Absorption by Cibacron Blue F ₃ GA	15.0 ± 1.4	$p < 0.05$
Enzyme treatment		
Trypsin	21.0 ± 1.4	$p < 0.05$
Proteinase K	34.0 ± 3.9	$p > 0.05$

^a All CD4+/CD8- supernatant preparations were tested for activity in the platelet cytotoxicity induction assay as described in Materials and Methods. Platelet cytotoxicity in the absence of supernatant preparations never exceeded 11.3 ± 3.3 . Heat stability of the CD4+/CD8- supernatants was evaluated by heating the supernatant in a water bath at 56°C for 120 min, or at 100°C for 5 to 10 min. Dialyzed supernatant was prepared by dialysis at 4°C for 24 hr against PBS with multiple changes of medium. Acid-treated supernatant was prepared by dialysis at 4°C for 24 hr against pH 2 glycine buffer, followed by an additional 24-hr dialysis against PBS to remove excess acid. The affinity for Cibacron Blue was evaluated by filtration of the CD4+/CD8- supernatant through a Blue Sepharose gel. Enzyme sensitivity was evaluated by incubation of the CD4+/CD8- supernatant at 37°C with trypsin (11 IU/ml) or 1 hr at 37°C with proteinase K (2 IU/ml).

% CYTOTOXICITY

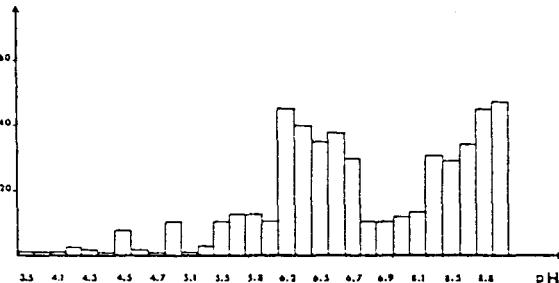


Figure 3. Isoelectric focusing of the Con A-stimulated CD4+/CD8- lymphocyte supernatant was performed in a bed of Sephadex G-75 containing 5% carrier ampholines, pH range 3.5 to 10, for 16 hr, at 8 W constant power. was dialyzed overnight against PBS to remove ampholines, and was then tested for its inducing activity of the platelet cytotoxicity toward schistosomula.

TABLE III
IFN activity in the T lymphocyte supernatants^a

Supernatant of	IFN* (U/ml)
Pan-T cells	4000
CD4+/CD8- cells	3000
CD4-/CD8+ cells	40

^a T lymphocyte supernatants were titrated as described in Materials and Methods.

* IFN- γ titers (mean of three simultaneous titrations) were expressed in International units, using NIH reference as standard.

whereas the activity in the first peak was not modified ($31\% \pm 1.4$ to $27\% \pm 1.4$). In contrast, the acid treatment considerably affected the stimulating effect of the two peaks because, after treatment, the observed cytotoxicity never exceeded $17\% \pm 1.4$ for the first activity and $10\% \pm 1.4$ for the second activity.

Role of IFN- γ as inducer of the platelet-killing activity. IFN activity was measured after Con A stimulation (5 μ g/ml) of pan-T, CD4+/CD8-, and CD4-/CD8+ T cells (Table III). In our experimental conditions, it appeared that a large amount of IFN activity was evidenced in pan-T and CD4+/CD8- T cell supernatants (3000 U/ml) and no significant activity in the CD4-/CD8+ T cell superna-

tants. The IFN activity in the CD4⁺/CD8⁻ cell supernatant was reduced to 200 U/ml after absorption on platelet pellets.

The physicochemical properties of the active factors and the identification of IFN activity in the active supernatants suggested strongly that IFN- γ could be responsible for one of the platelet cytotoxicity-inducing activities identified by isoelectric focusing and present in the stimulated CD4⁺/CD8⁻ lymphocyte supernatants. To control this hypothesis, polyclonal and monoclonal antibodies against IFN- γ were used. The first was a goat serum directed against natural human IFN- γ ; the second was a mouse monoclonal antibody specific for recombinant human IFN- γ prepared by Dr. Falloff and co-workers (9). Both have been shown to inhibit the antiviral activity induced by natural and recombinant IFN- γ . The goat serum was used at the dilutions of 1/50,000 and 1/30,000 and the monoclonal antibody was used at the dilutions of 1/100 and 1/1,000. Normal goat serum and irrelevant monoclonal antibody were used at the same dilutions as controls. The results (Fig. 4) indicated that both anti-IFN- γ antibodies neutralized, in a large part, the platelet cytotoxicity-inducing activity of the CD4⁺/CD8⁻ T lymphocyte supernatants, whereas the controls did not modify the cytotoxicity observed.

The effect of the anti-IFN- γ monoclonal antibody on the two peaks of activity detected by isoelectric focusing has been tested. This antibody was able to neutralize the stimulating activity focused at the pI range 8.7 to 8.8 (from 35% \pm 1.4 to 11.5% \pm 0.7), but had no effect on the fraction focusing at the pI range 6.2 to 6.5 (from 31% \pm 1.4 to 25% \pm 0.7).

Finally, the direct effect of recombinant IFN- γ , with a specific activity of 2×10^8 U/mg proteins, as inducer of platelet cytotoxic functions was tested (Fig. 5). The results demonstrated clearly that, as suggested strongly in the above experiments, IFN- γ acted as a platelet cytotoxicity-inducing factor. The cytotoxicity toward schistosomula obtained with 200 to 500 U/well of recombinant human IFN- γ was comparable to that observed with the CD4⁺/CD8⁻ T lymphocyte supernatant. The addition of recombinant human IFN- γ (200 U/well) to the serum of patients with *S. mansoni* in the conditions of platelet cytotoxicity induction (7) showed an additive effect of IFN- γ and IgE in the capacity to induce platelets into cytotoxic effectors toward schistosomula (Fig. 6).

Finally, this IFN- γ -induced cytotoxicity was strongly inhibited by the addition, during the assay, of pan-T or CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte supernatants (respectively,

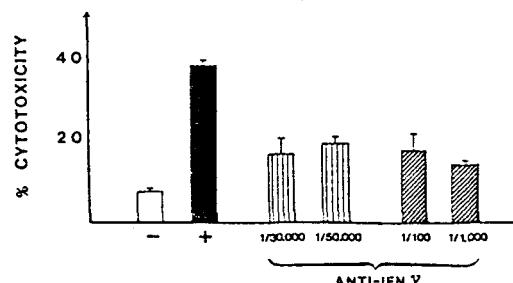


Figure 4. Neutralization of the platelet cytotoxic functions inducing activity (■) by: goat serum anti-human natural IFN- γ (▨); monoclonal anti-human recombinant IFN- γ (▨).

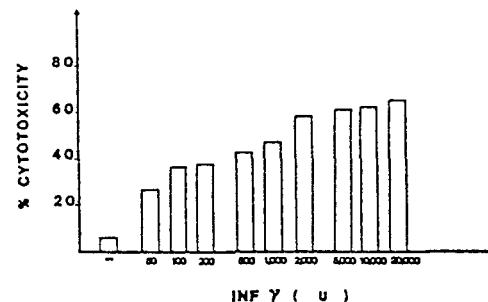


Figure 5. Dose response of human recombinant IFN- γ for the induction of platelet cytotoxicity toward schistosomula (IFN- γ is expressed as U/well).

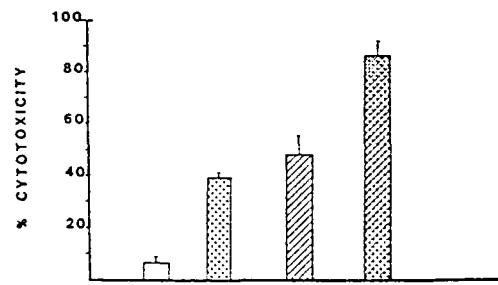


Figure 6. Additive effect of IFN- γ on IgE-induced platelet cytotoxicity toward schistosomula. Platelet cytotoxicity induced by: recombinant IFN- γ (500 U/well) (□); serum from patient with *S. mansoni* (10%) (▨); serum from patient with *S. mansoni* (10%) + recombinant IFN- γ (500 U/well) (▨).

from 45.5% \pm 3.5 to 20% \pm 1.4 and from 45.5% \pm 3.5 to 11.5% \pm 1.4).

DISCUSSION

Numerous works have demonstrated that stimulated T cells excrete a number of soluble factors, among which some are able to regulate the functions of various effector cells (1-4). The present work shows that *S. mansoni* antigen- or Con A-stimulated CD4⁺/CD8⁻ T cells release factors able to induce, in a dose-dependent manner, the platelet cytotoxicity toward the young larvae of *S. mansoni*. This induction of the platelet cytotoxicity by Con A- or antigen-stimulated T cell supernatants was not due to the presence of Con A or indefinite inducer present in the antigenic preparation because supernatants markedly depleted of Con A still provided the observed inducing effect. Moreover, the antigenic preparation by itself failed to induce any platelet cytotoxicity.

The physicochemical approach of the platelet cytotoxicity-inducing lymphokines showed that at least two factors, exhibiting distinct pI, were responsible for the inducing effect. The first had a neutral pI, the second a basic pI similar to that reported for IFN- γ (13). Various authors have demonstrated the presence of IFN- γ in the supernatants of lectin- or antigen-stimulated T lymphocytes (16). Our results suggested that the basic activity evidenced by isoelectric focusing was IFN- γ . Indeed, the acid and heat sensitivities, the affinity for Cibacron Blue, and the neutralization of the inducing activity by anti-IFN- γ antibodies argued in favor of this hypothesis. This was confirmed by the presence, at relevant concentra-

tions, of IFN- γ activity in the pan-T and CD4 $^+$ /CD8 $^-$ T lymphocyte supernatants in contrast to that observed in the CD4 $^-$ /CD8 $^+$ T lymphocyte supernatants. Moreover, human recombinant IFN- γ , at the dose present in the active supernatants, had a direct inducing effect of the platelet cytotoxic function, and acted similarly in a dose-dependent manner.

The second inducing activity, evidenced by isoelectric focusing, has not been identified, but studies are under way to isolate and further characterize the factor(s) responsible for this cytotoxic inducing effect on platelets.

Several laboratories have demonstrated that IFN- γ induces a broad range of functional and biochemical modifications in various cell populations (17) and particularly in the macrophage, one of the main effector cells in mouse, rat, and human schistosomiasis (18, 19). The present observation supports the view that IFN- γ targeted the release of toxic metabolite(s) by normal platelets. This led to the destruction of the *S. mansoni* larvae, the classical targets of the effector cells involved in the immune processes directed against this parasite.

Moreover, IFN- γ produced by stimulated T cells expressing the helper subpopulation marker acted directly on the platelets, probably through the presence of a binding structure on their membrane, because the stimulating activity was absorbed by a platelet pellet. This was confirmed by the recent identification of high affinity receptors for IFN- γ on the platelet membrane (20).

The present demonstration of platelet stimulation by IFN- γ broadens the involvement of these blood elements in effector functions against parasites. Indeed, in the context of helminth infections, two cytotoxic mechanisms implicating platelets have already been described in vitro, one requiring the participation of parasite-specific IgG antibody (5), the other that of C-reactive protein (CRP) (21). The reactivity of platelets to three triggering signals requires the need for a regulation process. In fact, in a previous work, we demonstrated that Con A- or antigen-stimulated CD4 $^-$ /CD8 $^+$ T cells released a factor able to inhibit the IgE-dependent platelet cytotoxicity toward schistosomula of *S. mansoni*, as well as the chemiluminescence of the platelets in an IgE-anti-IgE reaction (8). We observed that this factor, PASL, was likewise able to inhibit the IFN- γ -induced platelet cytotoxicity. The balance between IFN- γ , other platelet cytotoxicity-inducing factor(s) (PCIF), or CRP, and PASL probably determine and control the platelet immune functions during parasite infections, and particularly schistosomiasis, in which platelets express, in vitro and in vivo, anti-parasite-killing properties. Thus, specific IgE, but also IFN- γ and PCIF production by *S. mansoni* antigen-specific CD4 $^+$ /CD8 $^-$ T lymphocytes, could induce platelets into cytotoxic effectors, while a feedback regulation of the platelet immune functions should be under the control of CD4 $^-$ /CD8 $^+$ -stimulated T cells by the mean of PASL.

The results presented here provide additional support for the role of T cell factors in the regulation of cell-mediated response in infectious diseases. The participation of lymphokines in the control of platelet immune functions appears as important as their involvement in the modulation of the other effector cell populations (22-25).

This observation raises the question of a potential role for such lymphokines in the regulation of immunopath-

ological disorders, namely, in atopic diseases, more particularly asthma, or in various inflammatory reactions in which platelets increasingly appear to be involved (26). The analysis of the interactions between these lymphokines are of great interest, and works are currently under way to isolate, characterize, and precisely define their mode of action and the support of their platelet specificity in comparison with the other cell populations.

Acknowledgments. We are indebted to Mrs. A. Delanoye and Mr. H. Vorng for expert technical assistance; to Dr. Barbier, Dr. M. Capron, Dr. J. Y. Cesbron, Prof. E. Falcoff, Dr. J. P. Kusnierz, Dr. H. Taelman, and Mrs. F. de Ziegler for helpful advice and for the generous supplies of technical facilities or reagents. The secretarial assistance of Mrs. C. Colson, M. F. Massard, and L. Perguet was appreciated.

REFERENCES

- Mizel, S. B. 1982. Interleukin 1 and T cell activation. *Immunol. Rev.* 63:51.
- Farrar, J. J., W. R. Benjamin, M. L. Hilfiker, M. Howard, W. L. Farrar, and J. Fuller-Farrar. 1982. The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* 63:129.
- Levy, H. B., and F. L. Riley. 1983. A comparison of immune modulating effects of interferon and interferon inducers. In *Lymphokines*. Edgar Pick, ed.
- Mayer, L., S. M. Fu, and H. G. Kunkel. 1984. Regulation of B cell activation and differentiation with factors generated by human T cell hybridoma. *Immunol. Rev.* 78:119.
- Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, J. C. Ameisen, and A. B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunol. Today* 7:15.
- Joseph, M., A. Capron, J. C. Ameisen, M. Capron, H. Vorng, V. Pancré, J. P. Kusnierz, and C. Auriault. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16:306.
- Pancré, V., C. Auriault, M. Joseph, J. Y. Cesbron, J. P. Kusnierz, and A. Capron. 1986. A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* 137:585.
- Stefanos, S., J. Wietzberin, L. Catinot, R. Devos, and R. Falcoff. 1985. Characterization of antibodies against recombinant Hu IFN- γ produced by hybridoma cells. *J. Interferon Res.* 5:455.
- Caen, J. P., A. T. Nurden, and C. Jeanteau. 1976. Bernard-Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality. Its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the FVIII von Willebrand protein. *J. Lab. Clin. Med.* 87:586.
- Patschke, H., and P. Wörner. 1978. Platelet activation detected by turbidometric shape-change analysis. Differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E1. *Thromb. Res.* 12:485.
- Patschke, H. 1981. Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10:14.
- Wietzberin, J., J. P. Kolb, A. Senik, L. Der Stepani, G. Andreu, E. Falcoff, and R. Falcoff. 1984. Studies on the purification of human gamma interferon: chromatographic behaviour of accompanying IL2 and B cell helper activity. *J. Interferon Res.* 4:141.
- Jankowski, W., J. W. Von Muenchhausen, E. Sulkowski, and W. A. Carter. 1976. Binding of human interferon to immobilized Cibacron Blue F3GA: the nature of molecular interaction. *Biochemistry* 15:5182.
- De Mayer-Guignard, J., and E. De Maeyer. 1976. Le chromophore du Blue Dextran: un ligand puissant pour la purification de l'interféron par chromatographie d'affinité. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 283:706.
- Epstein, L. B. 1984. The special significance of Interferon gamma. In *Interferon. Vol. 2. Interferon and the Immune System*. J. Vilcek and E. E. Maeyer, eds. Elsevier, Amsterdam. P. 185.
- Adams, D. O., and T. A. Hamilton. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2:283.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, and G. Torpier. 1982. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 61:41.
- Dessaint, J. P., A. Capron, C. Auriault, and M. Joseph. 1984. Interaction of schistosomes and macrophages. *Proc. 5th Leiden Conferences on Mononuclear Phagocytes*.
- Molinis, F. C., J. Wietzberin, and E. Falcoff. 1987. Human platelets possess receptors for a lymphokine: demonstration of high specific

PLATELET CYTOTOXIC FUNCTIONS INDUCER

4495

- receptors for HuIFN- γ . *J. Immunol.* In press.
21. Bout, D., M. Joseph, M. Pontet, H. Vorng, D. Deslee, and A. Capron. 1986. Rat resistance to schistosomiasis: platelet mediated cytotoxicity induced by C-Reactive Protein. *Science* 131:153.
 22. James, S. L., S. K. Lazzins, M. S. Meltzer, and A. Sher. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 67:255.
 23. Bout, D., M. Joseph, J. R. David, and A. Capron. 1981. *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages. *J. Immunol.* 127:1.
 24. Veith, M. C., and A. E. Butterworth. 1983. Enhancement of human eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae by mononuclear cell products *in vitro*. *J. Exp. Med.* 157:1828.
 25. Veith, M., J. Pestel, S. Loiseau, M. Capron, and A. Capron. 1985. Eosinophil activation by lymphokines and T cell clone products in the rat. *Eur. J. Immunol.* 15:1244.
 26. Oxholm, P., and K. Winther. 1986. Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy* 41:1.

Article 5**L'interféron gamma recombinant augmente l'expression du récepteur pour l'IgE des plaquettes humaines.**

Le récepteur pour l'IgE étant essentiel à l'induction des propriétés cytotoxiques IgE-dépendantes des plaquettes, tout facteur capable d'influencer son expression semblait important pour la régulation de l'activité cytotoxique. L'IFN- γ pouvant moduler l'expression des récepteurs pour l'IgE et l'IgG de certaines populations cellulaires, nous avons testé son effet sur l'expression du récepteur pour l'IgE de la plaquette.

Dans cet article, nous avons montré, grâce aux méthodes de scatchard et de cytofluorimétrie, que l'IFN- γ recombinant était capable d'augmenter l'expression du récepteur pour les IgE sur la membrane des plaquettes mais que la constante d'affinité du récepteur pour l'IgE n'était pas modifiée.

L'étude de l'effet de l'IFN- γ sur d'autres déterminants de la membrane plaquettaire a montré une modification au niveau du complexe glycoprotéinique IIbIIIa mais aucun effet au niveau de la glycoprotéine Ib.

Parallèlement nous avons constaté que l'IFN- α recombinant, qui est incapable d'induire une cytotoxicité plaquettaire, n'entraîne aucune modification ni de l'expression du récepteur pour l'IgE ni de celle d'autres déterminants de surface de la plaquette.

En conclusion nous avons donc démontré que l'IFN- γ recombinant, en plus de l'induction directe des fonctions antiparasitaires des plaquettes, pouvait exercer une activité non négligeable sur l'activation plaquettaire IgE-dépendante en augmentant l'expression des récepteurs pour les IgE sur la membrane des plaquettes ce qui a pour effet une potentialisation de leurs facultés cytotoxiques.

Full title: Recombinant human immune interferon induces increased IgE receptor expression on human platelets

Running title: IFN- γ increases IgE receptors on human platelets

Véronique PANCRE¹, Michel JOSEPH¹, André CAPRON¹, Juana WIETZERBIN²,
Jean-Pierre KUSNIERZ¹, Han VORNG¹ and Claude AURIAULT¹

1. From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

INSERM 167 - CNRS 624
Institut Pasteur
1, rue du Pr A. Calmette
59019 LILLE CEDEX (France)

2. From the Section de Biologie

INSERM 196
Institut Curie
26, rue d'Ulm
75231 PARIS CEDEX 05 (France)

Footnotes

1. This work was supported by INSERM 167 - CNRS 624

2. Address correspondence to:

Véronique PANCRE

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Institut Pasteur

B.P. 245

59019 LILLE (France)

3. Abbreviations used in this paper:

EMEM, Eagle's minimum essential medium; IFN- α , alpha interferon; IFN- γ , gamma interferon; PBS, phosphate buffer saline.

SUMMARY

Human recombinant gamma interferon (IFN- γ) significantly increased expression of receptors for IgE (Fc ϵ RII) on blood platelets. Fc ϵ RII were measured by specific binding of 125 I labeled IgE or flow cytometry experiments. Scatchard analysis of 125 I-IgE binding curves revealed that IFN- γ treatment increased the number of Fc ϵ RII but did not change the value of the association constant of Fc ϵ RII for 125 I-IgE. IFN- α had no effect on the expression or affinity of Fc ϵ RII. In addition to Fc ϵ RII, IFN- γ also modified the expression of another surface determinant of platelets : the IIb-IIIa glycoprotein complex.

Interferons α , β and γ are proteins that share a common antiviral activity in animal cells (1). IFN- γ differs from IFN- α and IFN- β in regard to its structure, cellular origin and biological properties (2). Produced by activated T cells (3,4), this lymphokine plays an important role in the regulation of immune response, including cell-mediated cytotoxicity (3, 5, 6). In this context, we have recently demonstrated that IFN- γ was able to induce blood platelets into cytotoxic effectors toward the young larvae of *Schistosoma mansoni* (7). IFN- γ acts by means of a high specific receptor identified on the platelet membrane by Molinas and coworkers (8) which parallely observed a lack of high specific receptor for IFN- α . We had previously reported the existence of another type of platelet cytotoxicity induction, mediated by the binding of IgE antibody to specific receptor (Fc ϵ RII) on the platelet membrane (9). Because Fc ϵ RII on platelets appear as very efficient inducers of cytotoxicity, factors which influence their expression might be important in the regulation of the cytotoxic activity. IFN- γ is known to enhance Fc γ receptor-mediated phagocytosis by macrophages (10), the number and density of IgG receptors on human monocytes (11) and mouse macrophages (12), and also to increase the IgE receptor expression on human monocytic cell line U937 (13). The aim of the present study was to investigate whether recombinant IFN- α or recombinant IFN- γ could alter the number and/or binding affinity of Fc ϵ RII on blood platelets, and consequently could modify the cytotoxic potential of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Immunoglobulins and immunologic reagents

Human IgE myeloma protein was purchased from Bennett Laboratories (Buena Park, CA) and was further purified by gel filtration and ion-exchange chromatography according to a technique described elsewhere (14). The radiolabeling of the purified human IgE was carried out by the chloramin-T method using 100 µg unaggregated Ig, 25 µg chloramin T, 3.7 MBq of carrier-free Na¹²⁵I (C.E.A., Gif-sur-Yvette, France), and the reaction stopped with 50 µg Na₂S₂O₅. The preparation was filtered on a PD G25 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and the radiolabeled material quantified with enzyme-labeled paper immunosorbent test (Phadezym IgE PRIST, Pharmacia). Goat polyclonal anti-human IgE antiserum and rabbit FITC-conjugated IgG anti-mouse IgG were provided by Miles-Yeda (Rehovot, Israël); rabbit FITC-conjugated IgG anti-goat IgG was provided by Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Netherlands).

Interferons

Pure recombinant human IFN-γ (r IFN-γ) with a specific activity of 2.10⁸U/mg proteins, produced by Roussel UCLAF-France, and pure recombinant human IFN-α (r IFN-α) with a specific activity of 1.10⁸U/mg proteins, produced by Hoffman-LaRoche, were gifts from Dr Falloff (Institut Curie, Paris, France).

Platelet isolation

The overall procedure for isolation of platelets was carried out at room temperature. Human venous blood from healthy adult volunteers (6 vol) collected on ACD-A (1 vol) (15) was centrifuged for 15 min at 120 x g in 5 ml aliquots, the platelet-rich plasma (PRP) collected in a single volume and centrifuged at 2000 x g for 15 min. Avoiding the recovery of the lowest part of the pellet when contaminated with red cells, the platelets were resuspended for three washing steps at 2000 x g in saline supplemented with citric acid (36

mM), glucose (5 mM), calcium (2 mM), magnesium (1 mM), BSA (0.35 %) and PGE1 (100 nM) (16-17). The last pellet was resuspended and the platelets were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after a 1/20 dilution with 1% ammonium oxalate, and adjusted to the appropriate concentration. The observation of undiluted platelet suspensions with interferential contrast microscopy repeatedly confirmed that the leucocyte contamination never exceeded 10 per 10^6 .

Anti-schistosome cytotoxicity

S. mansoni schistosomula prepared by the skin penetration procedure (18) were the targets of the cytotoxicity assay. The platelets were isolated by the procedure described above. At the end of the washing steps, the pellet was resuspended in EMEM. Platelets ($150 \cdot 10^6$) were incubated in flat-bottom microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) in 50 μ l EMEM supplemented either with 20 μ l serum from normal individuals, with r IFN- γ or r IFN- α or MEM, and 75 *S. mansoni* schistosomula in 80 μ l EMEM. After 24 hr at 37° in 5% CO₂ in air, motionless and dark dead larvae were easily distinguished from mobile and refringent living schistosomula by optical microscopy (19). Each experiment was made in duplicate and results expressed as the mean \pm S.D. of dead larvae.

Analysis of Fc ϵ RII

Measurements of IgE receptors were performed either by flow cytometry, or by using ¹²⁵I-labeled human IgE.

For flow cytometry, the human blood (9 vol) was collected on EDTA 5% in water (1 vol). Platelets in PRP were incubated at 37° with r IFN- γ or r IFN- α . After 12 hr, platelets were isolated as described above, with washings in PBS containing 0.01 M EDTA, a buffer also used for the next washing steps. Platelets ($2 \cdot 10^7$) in 100 μ l PBS were incubated at 37° for 30 min each, first with 10 μ g human myeloma IgE protein, then, after washing, with 10 μ g mouse monoclonal IgG anti-mouse IgE and finally after washing, with 10 μ l rabbit

FITC-IgG anti-mouse IgG. After a final washing step, the platelets were resuspended in 500 μ l PBS, containing 0.01 M EDTA and the percentage of fluorescent platelets was measured in a 50-H Cytofluorograph (Ortho Instrument, Westwood, MA). The background of non-specific binding of the fluorescent antibody on untreated platelets (less than 5%) was subtracted from all the results.

For binding assay, platelets in PRP were incubated at 37° C with r IFN- γ or r IFN- α . After 12 hr platelets were isolated as previously described, except that the pellet of the last washing was resuspended in PBS. Washed platelets (8.10^7) in 200 μ l PBS were incubated, without stirring, in plastic tubes for 90 min at room temperature with 125 I-labeled IgE (spec. act. 150 mCi/mM). Additional tubes were run containing 100-fold excess of unlabeled IgE. At the end of the labeling procedure, the platelets were separated from unbound Ig by centrifugation at 8500 x g for 2 min through 1 ml 25% sucrose in a Microfuge (Beckman, Palo Alto, CA). The tubes were then cut above the cell sediment with a razor blade and cell-bound and free radioactivity was measured by a CG 4000 gamma counter (Intertechnique, Plaisir, France). Specific IgE binding was calculated by subtracting radioactivity measured in samples incubated with unlabelled IgE. Binding data were analysed according to Scatchard (20).

Monoclonal antibody-defined surface markers

The following monoclonal antibodies were used to evaluate the effect of r IFN- γ or r IFN- α on other surface determinants of platelets in addition to Fc ϵ receptors : mouse monoclonal antibody AP2 (21) which reacts specifically with the Gp IIb-IIIa complex; mouse monoclonal antibody AN51 (22) directed against Gp Ib.

After incubation with IFN or control medium for 12 hr at 37°, platelets in PRP were washed and resuspended in PBS. Cells (2.10^7) were then incubated at 37° for 30 min first, with the appropriate monoclonal antibody and, after washing, with 10 μ l FITC-IgG anti-mouse IgG. After a final washing step, the

platelets were resuspended in 500 μ l PBS containing 0.01 M EDTA and the percentage of fluorescent platelets was measured in a 50-H Cytofluorograph.

RESULTS

Comparative effect of IFN- γ and IFN- δ as inducer of platelet cytotoxicity

Recombinant human IFN- γ being able to induce platelets from normal donors, normally inactives, into cytotoxic effectors toward the young larvae of *S. mansoni* (7), we studied the effect of recombinant human IFN- δ in the same conditions. We observed a dose-dependent induction of platelet cytotoxicity with r IFN- γ , reaching a plateau with the dose of 5000 to 10 000 U IFN- γ / well (Figure 1). In contrast r IFN- δ , in the range 50 to 20 000 U / well, failed to induce platelets into cytotoxic effectors toward the larvae.

Binding of 125 I-labeled IgE

Scatchard analysis of 125 I-labeled IgE binding to platelets from normal donors revealed the presence of a single binding site in control as in r IFN- γ or r IFN- δ -treated platelets (Figure 2). In six experiments, the association constant for 125 I-IgE did not change significantly after incubation with r IFN- γ for 12 hr. So, the K_a for IgE was $1.75 \times 10^7 M^{-1}$ for control and $1.81 \times 10^7 M^{-1}$ for r IFN- γ -treated platelets. But the number of IgE binding sites increased from 806 ± 10 to 1529 ± 35 ($p < 0,01$) (Figure 2). In contrast, r IFN- δ had very low effect on Fc ϵ R expression. So, we obtained a K_a for IgE of $1.0 \times 10^7 M^{-1}$ and a number of IgE binding sites of 990 ± 10 after incubation of platelets with r IFN- δ .

Cytofluorometric analysis

Only 18 % of the platelets isolated from human donors with normal IgE level, showed a specific fluorescence for IgE after a preincubation with myeloma IgE prior to the fluorescent labeling. This percentage was doubled after a preincubation of platelets with r IFN- γ but not modified after a preincubation with r IFN- δ (Figure 3).

In further experiments, we studied the effect of r IFN- γ or r FN- δ on other surface determinants of platelets, in addition to Fc ϵ receptors. A specific marker of the platelets, the membrane glycoprotein complex IIb-IIIa,

recognized by the monoclonal antibody AP2, was present on 96 % of the platelets. The number of AP2-positive platelets failed to 67 % after preincubation with r IFN- γ but was not modified after preincubation with r IFN- α (Table 1). Another specific marker of the platelets, the membrane glycoprotein Ib, recognized by the monoclonal antibody AN51, was present on 68 % of the platelets. Neither the preincubation with r IFN- γ nor the preincubation with r IFN- α did modify the percentage of AN51-positive platelets (Table 1).

DISCUSSION

In the present work, we have investigated the effect of recombinant human IFN- γ or recombinant human IFN- δ on human platelets. In a previous work (7) we had shown that r IFN- γ could induce platelets from normal donors into cytotoxic effectors for *S. mansoni* larvae. We demonstrate here that r IFN- δ had not this capacity. Moreover, r IFN- γ significantly enhanced the expression of receptors for IgE (Fc ϵ RII) on human platelets. This effect appeared specific for r IFN- γ since r IFN- δ had only marginal effects. These observations are in agreement with those of Molinas and col. (8) who demonstrated the presence of high affinity receptors for IFN- γ but the lack of high affinity receptors for IFN- δ , and give a biological significance for this specific receptor for IFN- γ .

The results presented here indicate that the enhancement of IgE binding onto platelets is a consequence of an IFN- γ -induced change in the number of Fc ϵ receptors and not of the affinity of Fc ϵ RII for IgE. We have reported that blood platelets could interact with IgE antibodies through this membrane receptor for IgE and that this interaction led to the release of toxic metabolites for *S. mansoni* larvae (9). In the context of the anti-parasite immunity, IFN- γ can act on platelets, either directly by its own inducer effect of cytotoxicity, or by an enhancement of the number of Fc ϵ RII, increasing their potentiality of interaction with specific IgE antibodies. The study of the effect of r IFN- γ on other cell surface markers, in addition to Fc ϵ RII, showed an important decrease in the number of Gp IIb-IIIa-positive platelets (recognized by the monoclonal antibody AP2) but no modification was observed in the number of Gp Ib-positive platelets (recognized by the monoclonal antibody AN51). This suggests either a diminution of the number of the IIb-IIIa glycoprotein complex on the platelet membrane or an inhibition of the recognition of the complex by the monoclonal antibody AP2. The first hypothesis involves an enhancement of the Fc ϵ RII on the platelet membrane and a parallel inhibition of the IIb-IIIa glycoprotein complex. Previous investigations with studies of various congenital diseases and

the use of appropriate monoclonal antibodies (23) have demonstrated a close relationship between the binding site for IgE and the membrane glycoprotein complex IIb-IIIa suggesting a role of this complex in the expression of Fc ϵ RII and IgE-dependent platelet functions. Our results would be in opposition with these observations and would represent a possible dissociation between these two membrane structures. The second hypothesis supposes the existence of a functional interaction between the IFN- γ receptor and the IIb-IIIa glycoprotein complex. Studies are currently underway for identifying the nature of this interaction.

From the present results, it is difficult to draw conclusions whether IFN- γ is also able to increase Fc ϵ RII expression on platelets *in vivo*, and further studies will be needed to settle this question. If the same phenomenon should occur *in vivo*, it might have biologic relevance in the pathogenesis of allergic diseases. So, the identification of specific receptors for IgE on the human platelets had led to the discovery of new mechanisms of platelet activation and functions suggesting that platelets, through the expression of Fc ϵ RII and the presence of cytophilic IgE can directly (and not accessorially as previously supposed) participate as effector cells in the pathology of allergic reactions (24, 25). So, IFN- γ , if produced in higher concentration in atopic diseases, would cause deleterious effects in allergic patients by its double action on platelets, either by its own inducing effect or by its enhancing effect of Fc ϵ RII expression. In contrast IFN- γ could represent a substance of great interest in the case of parasitic diseases, particularly schistosomiasis, by the stimulation of platelet effector functions.

References

1. Stewart, W.E. , II. 1979. The interferon system. Springer Verlag. Wien.
2. The Interferon Nomenclature Commitee. 1983. Interferon Nomenclature. *Arch. Virol.* 77: 283.
3. Falcoff, E. , J. , Wietzerbin, S. , Stefanos, M. , Lucero, C. , Billardon, L. , Catinot, F. , Besançon and H. , Ankel. 1980. Properties of immune T-interferon (type II). *Ann. NY Acad. Sci.* 350: 145.
4. Wietzerbin, J. , J.P. , Kolb, A. , Senik, L. , Der Stepani, G. , Andreu, E. , Falcoff and R. , Falcoff. 1984. Studies on the purification of human gamma interferon: chromatographic behaviour of accompanying IL2 and B cell helper activity. *J. Interferon Res.* 4: 141.
5. Epstein, L.B. 1984. The special significance of interferon gamma. In *Interferon . Vol. 2. Interferon and the immune system.* J. Vilcek and E.E. Maeyer, eds, Elsevier, Amsterdam. P. 185.
6. Sonnenfeld, G. 1980. Modulation of immunity by interferon. In *Lymphokine Reports.* E. Pick, ed. Academic Press Inc., New York. P. 113.
7. Pancré, V. , M. , Joseph, C. , Mazingue, J. , Wietzerbin, A. , Capron and C. , Auriault. 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon γ . *J. Immunol.* 138: 4490.
8. Molinas, F. , J. , Wietzerbin and E. , Falcoff. 1987. Human platelets possess receptors for a lymphokine: demonstration of high specific receptors for HuIFN- γ . *J. Immunol.* 138: 802.
9. Joseph, M. , A. , Capron, J.C. , Ameisen, M. , Capron, H. , Vorng, V. , Pancré, J.P. , Kusnierz and C. Auriault. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16: 306.
10. Hamburg, S.I. , H.B. , Fleit, J.C. , Unkeless and M. , Rabinovitch. 1980. Mononuclear phagocytes: responders to and producers of interferon. *Ann. NY Acad. Sci.* 350:72.

11. Guyre, P.M. , P.M. , Morganelli and R. , Miller. 1983. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 72: 393.
12. Vogel, S.N. , D.S. , Finbloom, K.E. , English, D.L. , Rosenstreich and S.G. , Langreth. 1983. Interferon-induced enhancement of macrophage Fc receptor expression: γ -interferon treatment of C3H/HeJ macrophages results in increase numbers and density of Fc receptors. *J. Immunol.* 130: 1210.
13. Naray-Fejes-Toth, A. and P.M. , Guyre. 1984. Recombinant human immune interferon induce increased IgE receptor expression on the human monocyte cell line U-937. *J. Immunol.* 133: 1914.
14. Lawrence, D.A. , W.O. , Weigle and H.L. , Spiegelberg. 1975. Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J. Clin. Invest.* 55: 368.
15. Caen, J.P. , A.T. , Nurden and C. , Jeanneau. 1976. Bernard-Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality. Its relationship with the FVIII von Willebrand protein. *J. Lab. Clin. Med.* 87: 586.
16. Patscheke, H. and P. , Wörner. 1978. Platelet activation detected by turbidometric shape-change analysis. Differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E1. *Throm. Res.* 12: 485.
17. Patscheke, H. 1981. Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis.* 10: 14.
18. Clegg, J.A. and S.R. , Smithers. 1972. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.* 2: 79.
19. Joseph, M. , C. , Auriault, A. , Capron, H. , Vorng and P. , Viens. 1983. A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes . *Nature.* 303: 810.
20. Scatchard, G. 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660.

21. Montgomery, R.R. , T.J. , Kunicki, C. , Taves, D. , Pidard and M. , Corcoran. 1983. Diagnosis of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia with a monoclonal assay on whole blood. *J. Clin. Invest.* 71:385.
22. Mc Michael, A.J. , N.A. , Rust, J.R. , Pilch, R. , Solchynski, J., Morton,D.Y. , Mason, C. , Ruan, G. , Tobelem and J.P. , Caen. 1981. Monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I. I. Immunological study. *Br. J. Haematol.* 49: 501.
23. Ameisen, J.C. , M. , Joseph, M. , Capron, J. , Caen and A. , Capron. 1986. Monoclonal antibodies as probes for platelet immune effector functions. In Monoclonal Antibodies and Human Blood Platelets. Inserm symposium N°27. Elsevier Science Publishers. Biomedical edition. P. 289.
24. Capron, A. , J.P. , Dessaint, M. , Capron, M. , Joseph, J.C. , Ameisen and A.B., Tonnel. 1986. From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunology Today* 7:15.
25. Capron, A. , M. , Joseph, J.C. , Ameisen, M. , Capron, V. , Pancré and C. Auriault. 1987. Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions. *Int. Archs. All. appl. Immunol.* 82: 307.

Legends to figures

Figure 1. Comparative effect of recombinant IFN- γ () or recombinant IFN- α () as inducers of platelet cytotoxicity.

Figure 2. Scatchard plots of ^{125}I -labeled IgE binding to normal human blood platelets. After a 12-hr incubation in control medium ($\blacktriangle-\blacktriangle$) or in r IFN- γ ($\star-\star$) or r IFN- α ($\bullet-\bullet$), platelets ($8 \cdot 10^7$) in $200 \mu\text{l}$ were incubated for 90 min at room temperature with increasing amounts of radiolabeled IgE. Bound ligand was separated from free by centrifugation on 25 % sucrose at $8000 \times g$. Nonspecific binding was substrated. $K_a = (B/F) - B$ (mol/liter units). Mol. wt. of IgE = 190 000. B = amount of IgE bound. F = free IgE (total - bound). K_a for IgE was $1,75 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for control, $1,81 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for r IFN- γ -treated platelets and $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for r IFN- α -treated platelets. Insert : Binding of labeled IgE on non-treated ($\blacktriangle-\blacktriangle$) or r IFN- γ ($\star-\star$) or r IFN- α ($\bullet-\bullet$)- treated platelets without other addition. Leukocyte contamination was less than $10/10^6$ platelets.

Figure 3. Comparative effect of r IFN- γ and r IFN- α on specific fluorescence for IgE on normal human platelets.

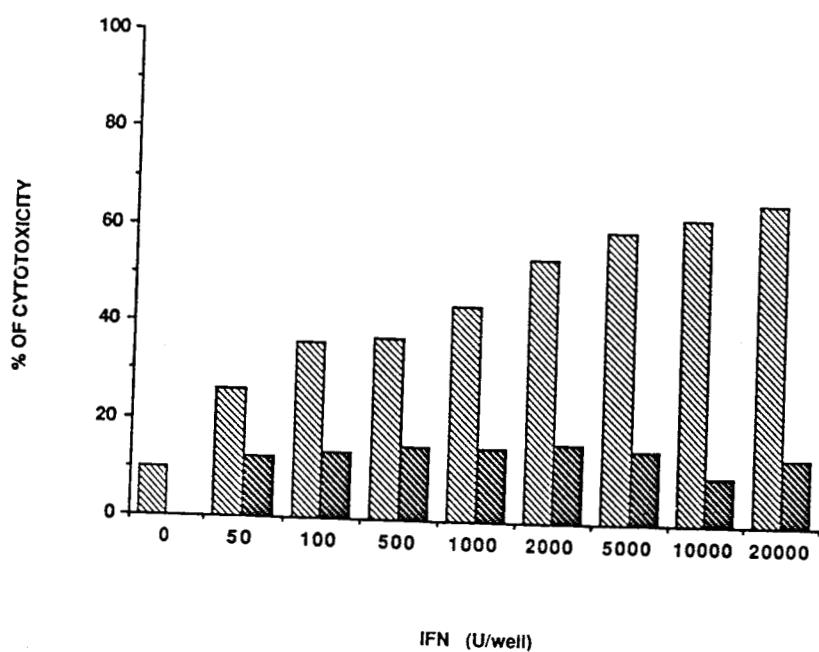
FIGURE 1

FIGURE 2

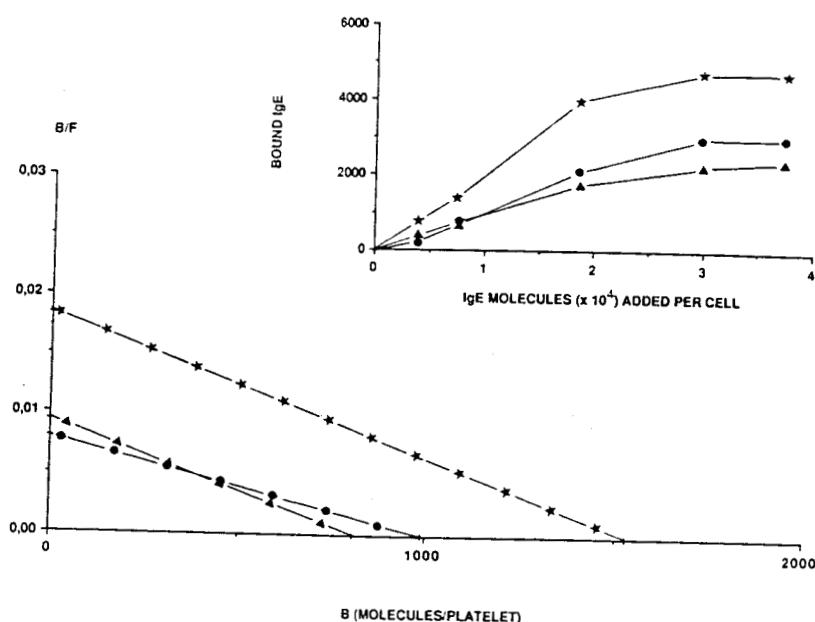


FIGURE 3

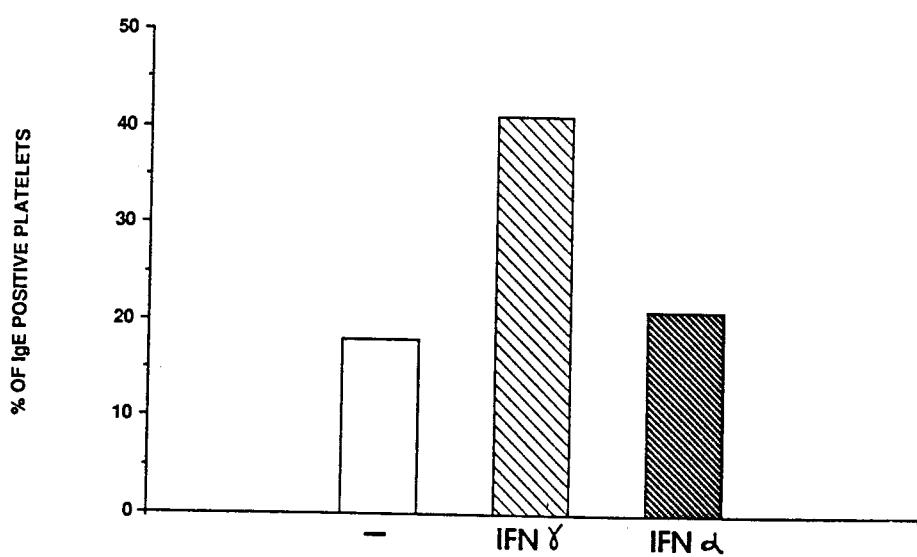


Table 1Effect of r IFN- γ or r IFN- α on cell membrane determinants of platelets^a

	% Positive platelets		
	Control	IFN- γ	IFN- α
AP2 ^b	96	67	93
AN51 ^c	68	65	71



- a. Binding of monoclonal antibody by control, IFN- γ or IFN- α -treated platelets was measured by flow cytometry.
- b. Mouse monoclonal antibody which reacts specifically with the Gp IIb-IIIa complex.
- c. Mouse monoclonal antibody directed against Gp Ib.

142

DISCUSSION CONCLUSION

Ces dernières années de nouveaux mécanismes d'activation et de nouvelles fonctions plaquettaires ont été mis en évidence. Ainsi les plaquettes dont le rôle semble bénéfique dans les infections parasitaires pourraient intervenir dans la physiopathologie des maladies allergiques. Ces observations rendaient d'autant plus importante l'étude de la modulation des fonctions effectrices des plaquettes par les autres cellules immunocompétentes et particulièrement les lymphocytes T. C'est la raison pour laquelle, au cours de ce travail, nous avons testé l'effet des lymphokines, libérées après stimulation des lymphocytes T par des mitogènes ou par des antigènes correspondant à leur spécificité, sur les fonctions effectrices plaquettaires.

Nous commencerons par discuter les résultats obtenus ainsi que les informations qu'ils apportent, avant de conclure sur le modèle biologique plus général dans lequel ils s'inscrivent.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence deux types de modulation des fonctions effectrices des plaquettes sanguines par des facteurs d'origine lymphocytaire T:

- modulation "**positive**", d'une part, par le biais de facteurs produits par les **lymphocytes T exprimant les marqueurs CD4⁺CD8⁻**, et
- modulation "**négative**" d'autre part, par le biais d'un facteur produit par les **lymphocytes T exprimant les marqueurs CD4⁻ CD8⁺**.

A. Modulation positive par le biais de facteurs produits par les lymphocytes T exprimant les marqueurs CD4⁺CD8⁻

En effet, nous avons démontré que les lymphocytes T exprimant les marqueurs de surface CD4⁺CD8⁻ libèrent, après stimulation par mitogène (Con A) ou par des antigènes correspondant à leur spécificité, **au moins deux facteurs** capables de transformer, proportionnellement à la dose, des plaquettes prélevées à des individus sains, et normallement inactives, en cellules cytotoxiques pour les schistosomules et ceci en l'absence d'anticorps anti-parasitaires. La cinétique d'induction de la cytotoxicité plaquettaire est comparable à celle obtenue après stimulation de la

même population plaquettaire par un sérum riche en IgE. Certaines propriétés physicochimiques suggéraient que l'IFN- γ pouvait être l'un des facteurs responsables de l'activation plaquettaire. La neutralisation de l'activité cytotoxique par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ , la présence d'IFN- γ dans les surnageants lymphocytaires et surtout l'effet inducteur direct de l'IFN- γ recombinant, à des doses pertinentes avec celle présente dans les surnageants, confirment cette hypothèse et démontrent que **l'IFN- γ est bien l'une des lymphokines en cause**. Nous avions constaté que l'effet inducteur observé disparaissait après passage du surnageant lymphocytaire sur culots plaquettaires suggérant ainsi la présence d'une structure de liaison pour l'IFN- γ sur la membrane plaquettaire. La caractérisation récente par Molinas F. et coll. (1986) d'un récepteur pour l'IFN- γ sur la membrane plaquettaire confirme cette observation et démontre ainsi que **c'est après la liaison de l'IFN- γ sur cette structure réceptrice que la plaquette activée libère des molécules schistosomicides**. Les plaquettes humaines ont donc un récepteur de forte affinité pour l'IFN- γ avec une constante de dissociation de $2 \times 10^{-10} M$ du même ordre que celle retrouvée dans le cas des lymphocytes ou des autres cellules possédant un récepteur pour l'IFN- γ (Aguet M. et coll., 1983). Le nombre de récepteurs spécifiques pour l'IFN- γ sur la membrane plaquettaire varie de 150 à 200. Si on évalue le nombre de plaquettes à $2,5 \times 10^8/ml$ de sang, le nombre de récepteurs disponibles pour l'IFN- γ atteindrait $4,5 \times 10^{10}/ml$. On peut rappeler que dans le cas des lymphocytes humains le nombre de récepteurs pour l'IFN- γ est approximativement de 500 par cellule (Merlin G. et coll., 1985; Faltinek C. et coll., 1986). Or, si on estime le nombre de lymphocytes circulants à $3,8 \times 10^6/ml$, la quantité de récepteurs pour l'IFN- γ portée par ces cellules atteindrait alors $1,9 \times 10^9/ml$. Cette répartition est très inattendue. Elle impliquerait que **dans un même volume de sang les plaquettes humaines possèderaient un nombre plus élevé de récepteurs pour l'IFN- γ que les lymphocytes T**. La signification biologique d'une telle abondance de récepteurs reste à déterminer.

Ce mécanisme de l'activation plaquettaire mis en évidence avec des cellules humaines a été conforté dans un modèle expérimental: le rat (résultats non publiés). C'est ainsi que des plaquettes d'animaux sains deviennent cytotoxiques pour les schistosomules

en présence d'interféron γ recombinant de rat, ce qui nous a notamment permis de démontrer la **pertinence in vivo d'un tel mécanisme**. En effet la préincubation des plaquettes de rats sains avec de l'interféron recombinant de rat, à cause de la stricte spécificité d'espèce de cette lymphokine, avant leur transfert à des animaux ultérieurement infectés, confère à ces derniers une protection significative (50 à 60 %) en comparaison avec des animaux ayant reçu la même quantité de plaquettes saines non traitées. Les plaquettes d'animaux immuns transférées passivement à des rats sains protègent également ceux-ci d'une infestation ultérieure par *S. mansoni*. Cette protection est encore augmentée après traitement des plaquettes immunes par l'IFN- γ . L'IFN- γ pourrait donc exercer *in vitro* et *in vivo* un effet protecteur dans la schistosomiase. D'autre part l'IFN- γ recombinant, en plus de l'induction directe des fonctions anti-parasitaires des plaquettes, peut **exercer une activité non négligeable sur l'activation plaquettaire IgE-dépendante** en augmentant l'expression du récepteur pour l'IgE sur la membrane des plaquettes ce qui a pour effet une potentialisation de leurs facultés cytotoxiques. On peut également prévoir un effet semblable de l'IFN- γ sur d'autres récepteurs de surface de la plaquette comme les récepteurs pour les substances inflammatoires ou autres protéines activatrices de cette cellule. L'étude de l'effet de l'IFN- γ sur d'autres déterminants majeurs de la membrane plaquettaire a montré **une modification au niveau du complexe glycoprotéinique IIb IIIa**, se traduisant par une diminution du nombre de plaquettes reconnues par l'anticorps monoclonal AP2, anticorps réagissant de façon spécifique avec ce complexe glycoprotéinique. Cette modification soulève deux hypothèses. La première serait une diminution de l'expression du complexe à la surface de la plaquette observée parallèlement à l'augmentation du nombre de récepteurs pour l'IgE. Or des études réalisées au laboratoire avaient démontré une étroite relation entre le site de liaison de l'IgE et le complexe glycoprotéinique IIb IIIa et suggéré un rôle de ce complexe dans l'expression du récepteur pour l'IgE et dans celle des fonctions plaquettaires dépendantes de l'IgE (Ameisen J.C. et coll., 1986). Nos résultats seraient donc en opposition avec ces précédentes observations et impliqueraient une dissociation entre ces structures membranaires. La seconde hypothèse supposerait l'existence d'une

interaction fonctionnelle entre le récepteur pour l'IFN- γ et le complexe glycoprotéinique IIb IIIa mais des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature exacte de cette interaction.

En revanche, il est intéressant de noter que l'IFN- α est incapable d'induire une cytotoxicité plaquettaire et n'entraîne aucune modification ni de l'expression du récepteur pour l'IgE ni de celle d'autres déterminants de surface de la plaquette. Ces observations vont dans le sens de celle faite par Molinas F. et coll. (1986) qui n'ont pu mettre en évidence de récepteurs spécifiques pour l'IFN- α à la surface de la plaquette. C'est la première fois que **la présence de récepteurs spécifiques pour l'IFN- γ en l'absence de récepteurs spécifiques pour l'IFN- α** est décrite sur des cellules normales.

Le deuxième facteur inducteur de la cytotoxicité plaquettaire, de point isoélectrique plus acide, **a été caractérisé comme étant le Tumor Necrosis Factor (TNF)**(Damonnevile M. et coll. , 1987). En effet le TNF- β recombinant comme le TNF- α recombinant sont capables d'induire les plaquettes en effecteurs cytotoxiques pour les schistosomules. Ces deux cytokines induisent une réponse identique vis-à-vis des cellules tumorales et reconnaissent le même récepteur (Aggarval B. et coll. , 1985), ce qui expliquerait les résultats obtenus. Silberstein D. et coll. (1986) ont, par ailleurs, démontré une augmentation par le TNF- β recombinant des fonctions effectrices des éosinophiles vis-à-vis des larves de *S. mansoni*. Ainsi **le TNF ne serait pas seulement impliqué dans la destruction des cellules tumorales mais aussi dans l'augmentation des propriétés effectrices des cellules participant efficacement à la réponse immune développée contre les parasites helminthes**. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer s'il existe ou non un récepteur spécifique pour le TNF à la surface des plaquettes humaines.

Des résultats préliminaires semblent indiquer un effet additif du TNF et de l'IgE d'une part et du TNF et de l'IFN- γ d'autre part en ce qui concerne l'induction des fonctions effectrices plaquettaires. Le TNF et les interférons ont souvent été montrés comme agissant en **synergie** dans leur action cytotoxique (Vilcek J. et coll. , 1986) et cet effet est plus particulièrement vrai en ce qui concerne l'IFN- γ .

(Williamson B. et coll. , 1983), ce que nous confirmons cette fois encore avec les plaquettes. D'autre part, il semble que ces molécules soient **les deux seules lymphokines inductrices des fonctions effectrices plaquettaires** puisqu'on ne retrouve que deux pics d'activité après isoélectrofocalisation d'un surnageant de lymphocytes CD4⁺CD8⁻ activés.

Le mécanisme d'induction de la cytotoxicité plaquettaire par l'IFN-γ ou le TNF reste à élucider. Son étude sera facilitée par le fait que ce sont des lymphokines déjà clonées et à notre disposition sous leur forme recombinantes. Nous envisageons d'étudier *les voies métaboliques* qui aboutissent à la génération de médiateurs cytocides par la plaquette. Ceci nous amènera à analyser la *cascade enzymatique* déclenchée après fixation de l'IFN-γ à son récepteur, ou celle du TNF si l'existence d'un récepteur spécifique est démontrée. Le mode d'action de ces deux lymphokines pourra alors être comparé à celui de l'IgE.

D'autre part, l'ensemble de nos résultats suggère que **l'IFN-γ pourrait exercer in vitro et in vivo un effet protecteur dans la schistosomiase sans se limiter à un effet sur les plaquettes.** L'augmentation du récepteur pour l'IgE sera étudiée sur d'autres populations cellulaires effectrices, comme les macrophages et les éosinophiles, afin de mettre en évidence un effet général de l'IFN-γ sur l'immunité anti-schistosome. Ce mécanisme mis en évidence dans la schistosomiase pourrait également intervenir dans d'autres parasitoses, notamment les leishmanioses, la maladie de Chagas et la toxoplasmose. Nous proposons donc une *extension de ces études à la parasitologie humaine* afin de souligner d'une part *l'efficacité de l'IFN-γ dans ces parasitoses* et d'autre part *le rôle du mécanisme interféron-plaquettes dans l'immunité protectrice*. En ce qui concerne la schistosomiase, cette approche devrait nous permettre, dans le cadre de la stratégie vaccinale que notre laboratoire a entreprise, d'évaluer l'utilisation d'un immunostimulant comme l'IFN-γ, préalablement à une vaccination, chez des patients la plupart du temps immunodéprimés. *En ce qui concerne le TNF, sa pertinence in vivo dans la schistosomiase comme dans les autres parasitoses reste à étudier.* Il sera surtout intéressant de voir si une synergie entre IFN-γ et TNF est retrouvée pour l'ensemble des paramètres étudiés.

B. Modulation négative par le biais d'un facteur produit par les lymphocytes T exprimant les marqueurs CD4⁻CD8⁺

Nous avons apporté au cours de ces travaux, la démonstration que la cytotoxicité plaquettaire induite par l'IgE, l'IFN- γ ou les TNF- α et β pouvait être complètement inhibée par des surnageants de lymphocytes exprimant les marqueurs de surface CD4⁻CD8⁺. En effet, après l'incubation des plaquettes activées par l'IgE dans un surnageant obtenu par stimulation des lymphocytes de sujets normaux avec des mitogènes, ou des lymphocytes d'un patient atteint d'échinococcose avec l'antigène spécifique, on n'observe plus aucun effet cytotoxique de ces cellules. Le même résultat est obtenu si les plaquettes sont activées par d'autres inducteurs, notamment l'IFN- γ ou le TNF. Les surnageants semblent agir directement sur la plaquette puisqu'ils inhibent également la production, par cette cellule, des métabolites de l'oxygène au cours d'une stimulation IgE/anti-IgE. L'isoélectrofocalisation des surnageants a révélé l'**existence d'une seule activité inhibitrice des fonctions cytotoxiques plaquettaires** au point isoélectrique 4,6. Cette lymphokine suppressive que nous avons appelée **PASL pour "Platelet Activity Suppressive Lymphokine"** est un polypeptide de 15-20 kD. L'activité suppressive est absorbée par un culot plaquettaire et non par d'autres lignées cellulaires (K562, U937, myelome à IgE) ou population cellulaire (macrophages bronchoalvéolaires) que nous avons testées ce qui suggère **l'existence d'un site de liaison pour la PASL** sur la membrane des plaquettes et sa **possible spécificité** pour cette cellule.

L'étude de la PASL a été ensuite étendue à deux helminthiases majeures, la bilharziose à *S. mansoni* et la filariose à *B. malayi*. Chez des patients bilharziens, nous avons observé après stimulation de leurs lymphocytes CD4⁻CD8⁺ par des antigènes de *S. mansoni*, la production d'un facteur inhibiteur de la cytotoxicité développée par des plaquettes de donneurs sains incubées dans le sérum des mêmes patients. Des observations similaires ont été effectuées chez des rats infectés par *S. mansoni* où un maximum de production du facteur inhibiteur par des lymphocytes T porteurs du marqueur OX8⁺ (correspondant au CD8⁺ humain) est obtenue au 61^{ème} jour

d'infection précisément au moment où l'on observe une **disparition des propriétés cytotoxiques des plaquettes**. Ceci suggérait fortement, à ce moment de l'infection, la **participation des facteurs d'origine lymphocytaire T**, produits après stimulation des cellules T suppressives par des antigènes circulants de *S. mansoni*, expliquant ainsi la diminution des fonctions effectrices plaquettaires. En accord avec cette hypothèse, nous observons au jour 61 d'infection par *S. mansoni* une modification du rapport cellules helpers sur cellules suppressives dans le sens d'une augmentation de la population expressive responsable de la production du facteur inhibiteur. Grâce à l'absence de spécificité d'espèce du surnageant lymphocytaire, la **pertinence *in vivo* de l'effet modulateur de la PASL** a pu être étudiée dans le modèle rat. Alors que des plaquettes d'animaux immuns transférées passivement à des rats sains protègent ceux-ci d'une infestation ultérieure par *S. mansoni*, nous avons observé que l'incubation de ces mêmes plaquettes dans un surnageant de lymphocytes CD4⁻CD8⁺ stimulés par la Con A abroge totalement la protection habituellement observée. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de la filariose à *B. malayi*. Un facteur comme la PASL semble donc jouer un rôle néfaste dans les infections parasitaires où il agit en inhibant les fonctions effectrices des plaquettes. C'est une lymphokine dont nous envisageons la **purification et le clonage** afin de pouvoir étudier son mode d'action réel. Pour ce, deux approches sont envisagées:

-D'une part, *une purification qui permettra d'aboutir à la séquence peptidique de la molécule*. Le protocole idéal de purification à partir d'un surnageant lymphocytaire a déjà été établi. Après une filtration sur gel, une chromatographie d'échange d'ions et un passage sur HPLC, il aboutira à la détermination de la séquence N terminale de la PASL à l'aide d'un microsequençage d'acides aminés. Jusqu'à présent, le seul obstacle à ce type de purification était la quantité insuffisante de PASL présente dans les surnageants lymphocytaires et nous n'avions jamais pu atteindre le stade de la microsequençage. Des résultats tous récents tendent à montrer que la **PASL serait également produite par un lymphome T: la lignée JURCAT**. En effet, un facteur inhibiteur de la cytotoxicité plaquettaire, d'un point isoélectrique 4,5-5,0 et ayant le comportement de la PASL dans les différents systèmes chromatographiques, a

été retrouvé dans les surnageants de la lignée JURCAT. On peut donc envisager une purification de la PASL à partir de plusieurs litres de ces surnageants comme cela a été le cas pour les lymphokines déjà clonées. On peut constater dans la littérature que les quantités de surnageant qui ont été nécessaires pour purifier certaines lymphokines sont considérables. Deux exemples sont particulièrement frappants: il aura fallu 71,5 litres de surnageant de culture pour purifier 4 µg de BSF-1 (Grabstein K. et coll. , 1986) et 50 litres pour obtenir 35 µg d'IL2 (Stern A. et coll., 1984). Par la suite, la confection d'un peptide synthétique qui sera injecté à un lapin permettra d'obtenir des sondes polyclonales spécifiques.

-D'autre part, à l'aide des techniques de la biologie moléculaire, le clonage des gènes de la molécule qui aboutira à la préparation des sondes d'ADN permettant la détection directe de l'ARN messager de cette lymphokine dans les cellules productrices.

Ceci devrait nous permettre d'établir si la PASL correspond à un facteur déjà connu pour lequel nous démontrerions ainsi **une activité biologique nouvelle**, ou bien s'il s'agit d'une **lymphokine totalement nouvelle** pour laquelle un champ de recherche important sera ainsi ouvert.

Une fois la molécule sous sa forme recombinante, nous pourrons étudier son mode d'action au niveau de la plaquette et caractériser son récepteur au niveau de la membrane plaquettaire , récepteur dont l'existence a été fortement suggérée par des expériences préliminaires d'absorption sur culots plaquettaires. Restera à confirmer la spécificité de la PASL pour la plaquette.

Un facteur comme la PASL, dont le rôle semble néfaste dans les infections parasitaires, aurait par contre une **application thérapeutique importante dans le cas où les plaquettes réagissent de façon anormale (pathologies plaquettaires, manifestations allergiques et asthme)**. En effet, les plaquettes semblent impliquées de manière directe d'une part dans l'asthme à l'aspirine, caractérisé par la libération de médiateurs cytocides et la génération de métabolites de l'oxygène en présence des antiinflammatoires non stéroïdiens, et d'autre part dans l'hypersensibilité aux venins d'hyménoptères (guêpe ou abeille) où

le même phénomène est observé après l'addition des allergènes purifiés correspondants. Dans ces deux pathologies, la PASL pourrait jouer un **rôle majeur dans l'immunothérapie spécifique** par le biais de son action inhibitrice des fonctions effectrices plaquettaires.

Dans le contexte des infections par les helminthes, deux mécanismes de cytotoxicité impliquant des plaquettes avaient déjà été décrits *in vitro*. Comme nous l'avons rappelé précédemment, le premier nécessite la participation des IgE, le second implique la **protéine C réactive (CRP)**, protéine majeure de l'inflammation. Nous pouvons maintenant ajouter à ces deux activateurs plaquettaires l'**IFN- γ** et les **TNF α et β** . La réactivité des plaquettes à ces signaux nécessite l'existence d'un processus de régulation. Nous savons que la **PASL** est capable d'inhiber la cytotoxicité induite par l'IgE, l'**IFN- γ** et les **TNF α et β** . **L'équilibre entre ces différentes lymphokines détermine et contrôle probablement les fonctions immunes des plaquettes au cours des infections parasitaires.** On pourrait imaginer que les IgE spécifiques, mais aussi l'**IFN- γ** ou les **TNF α et β** produits après stimulation des lymphocytes **CD4 $^+$ CD8 $^-$** par des antigènes de *S. mansoni*, pourraient induire les plaquettes en effecteurs cytotoxiques alors qu'un rétro-contrôle négatif des fonctions immunes plaquettaires serait effectué par des lymphocytes **CD4 $^-$ CD8 $^+$** par le biais de la **PASL**. Les résultats présentés ici apportent donc de nouvelles preuves du rôle des produits d'origine lymphocytaire T dans la régulation de l'immunité cellulaire anti-parasitaire. La participation des lymphokines dans le contrôle des fonctions immunes plaquettaires apparaît aussi importante que leur implication dans la régulation des autres populations effectrices. Toutes ces observations posent aussi la question du rôle possible de ces lymphokines dans la **régulation des désordres immunopathologiques ou des réactions inflammatoires** dans lesquels les plaquettes apparaissent depuis peu impliquées. Là encore, bien connaître comment elles agissent au niveau de ces cellules, apparaît de première importance. On pourrait imaginer que, dans certaines circonstances, les **mécanismes dépendants de l'IgE** prédomineraient alors que dans d'autres cas il

y aurait action préférentielle des **mécanismes dépendants de l'IFN- γ et/ou du TNF- β** ; le tout, bien sûr, sous le **contrôle de la PASL**. Les travaux récents de Mossman T. et coll. (1986) ont montré que des cellules T helper de souris pouvaient être séparées en deux types, en fonction de leur production en lymphokines. Le premier type de cellules T helper (TH_1) produit de l'IL2, de l'IFN- γ , du GM-CSF et de l'IL3 en réponse à une stimulation mitogénique ou antigénique. Le deuxième type (TH_2), quant à lui, produit de l'IL3, du BSF-1 (IL4), un facteur de croissance des mastocytes différent de l'IL3 et un facteur de croissance des cellules T différent de l'IL2. Les cellules TH_2 produisent donc des facteurs qui augmentent la production d'IgE et, par conséquent, augmentent le nombre des IgE disponibles pour les réactions immunes, alors que les cellules TH_1 produisent de l'IFN- γ qui inhibe fortement l'activité amplificatrice des surnageants de culture TH_2 . Le relais réel de ces différents mécanismes reste donc à élucider.

D'autre part, nos résultats sont à rapprocher de ceux de Geissler D. et coll. (1986) qui ont étudié les facteurs cellulaires et humoraux qui contrôlent la prolifération et la différenciation des précurseurs mégacaryocytaires. Ils démontrent que des lymphocytes T porteurs du marqueur CD4 $^{+}$ sont capables d'augmenter la formation des colonies de mégacaryocytes induites par le Megakaryocyte Colony Stimulating Factor alors que les lymphocytes porteurs du marqueur CD8 $^{+}$ semblent au contraire l'inhiber. Cette **dichotomie de l'activité des facteurs d'origine CD4 $^{+}$ ou CD8 $^{+}$** sur les mégacaryocytes et, d'après nos propres travaux, sur leur produit final de différenciation, suggère que, peut-être, les mêmes facteurs pourraient intervenir à différents stades du développement des plaquettes, régulant à la fois leur recrutement et leurs fonctions effectrices.

Les différents travaux qui ont été rapportés dans ce mémoire permettent l'ébauche du schéma de la régulation des fonctions effectrices des plaquettes sanguines par des facteurs d'origine lymphocytaire T. Nous espérons pouvoir préciser bientôt le mode d'action de ces différentes lymphokines au niveau plaquettaire ce qui devrait nous permettre de revenir à l'effet de tels facteurs sur des paramètres d'activation plaquettaire plus classiques concernant la coagulation sanguine ou la formation du thrombus et fournir un schéma de régulation des fonctions effectrices de ces éléments sanguins dans les processus physiopathologiques de l'allergie et de l'inflammation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggarwal, B.B. , Essalut, T.E. & Hass, P.E. (1985). Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by interferon. *Nature* . **318**: 665.
- Aguet, M. & Mogensen, K.E. (1983). Interferon receptors. In Interferon 5. Gresser ed. Academic Press. London. p.1.
- Ameisen, J.C. , Capron, A. , Joseph, M., Maclouf, J. , Vorng, H. , Pancré, V. , Fournier , E. , Wallaert, B. & Tonnel, A.B. (1985). Aspirin-sensitive asthma : abnormal platelet response to drugs inducing asthmatic attacks. Diagnostic and physiopathological implications. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **78**:438.
- Ameisen, J.C. , Capron, A. , Joseph, M. , & Tonnel, A.B. (1986). Platelets and aspirin-induced asthma. In Kay A.B. (ed). Asthma: Clinical Pharmacology and Therapeutic Progress. Oxford, Blackwell p. 226.
- Ameisen, J.C. , Joseph, M. , Caen, J.P. , Kusnierz, J.P. , Capron, M. , Boisard, B., Wautier, J.L. , Levy-Toledano, S. , Vorng, H. & Capron, A. (1986). A role for glycoprotein IIbIIIa complex in the binding of IgE to human platelets and in platelet IgE-dependent cytotoxic functions. *Brit. J. Haemat* . **64**: 21.
- Andrew, P.W. , Rees, A.D. , Scoging, A. , Dobson, N. , Matthews, R. , Whitthall, J.T. , Coates, A.R.M. & Lowrie, D.B. (1984). Secretion of a macrophage-activating factor distinct from interferon- γ by human T cell clones. *Eur. J. Immunol.* **14**: 962.
- Benveniste, J. , Lecouedic, J.P. & Kamoun, P. (1975). Aggregation of human platelets by platelet activating factor. *Lancet* .**1**: 344.

Beutler, B. & Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. **320**: 584.

Bloom, B.R. & Bennet, B. (1966). Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. **153**: 80.

Bout, D. , Joseph, M. , Pontet, M., Vorng, H. , Deslee, D. & Capron, A. (1986). Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science*. **231**: 153.

Breton-Gorius, J. & Guichard, J. (1972). Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelet and megakaryocytes. *Am. J. Pathol.* **66**: 277.

Breton-Gorius, J. , Coquin, Y. & Guichard, J. (1978). Cytochemical distinction between azurophils and catalase containing granules in leucocytes. *Lab. Invest.* **38**: 21.

Burgess, A.W. , Camakaris, J. & Metcalf, D. (1977). Purification and properties of Colony Stimulating Factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.* **252**: 1998.

Caen, J.P. , Legrand, Y. & David, J.L. (1969). Role of subendothelium components in thrombosis. In dynamics of thrombus formation and dissolution. Philadelphie. J.B. Lippincott ed. p. 95.

Cambier, J.C. (1986). Seing the way to B-cell growth. *Nature*. **319**: 620.

Capron, A. , Dessaint, J.P. , Haque, A. & Capron, M. (1982). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against parasites. *Progr. Allergy*. **31**: 234.

- Capron, M. & Capron, A. (1986). Rats, mice and men: models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitology Today*. **2**: 69.
- Capron, A. , Dessaint, J.P. , Capron, M. , Joseph, M. , Ameisen, J.C. & Tonnel, A.B. (1986). From parasites to allergy : a second receptor for IgE. *Immunology Today* . **7**: 15.
- Cesbron, J.Y. , Capron, A. , Vargaftig, B. , Lagarde, M. , Pincemail, J. , Braquet, P. , Taelman, H. & Joseph, M. (1987). Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*. **325**: 533.
- Crawford, N. , Amos, L.A. & Castle, A.G. (1980). Platelet microtubule subunit proteins: assembly and disassembly factors. In: platelet cellular response mechanisms and their biological significance. Rotman A., Meyer F.A., Gitler C. & Silberberg C. . John Wiley & Sons, New-York, p. 171.
- Damonneville, M. , Wietzerbin, J. , Pancré, V. , Joseph, M. , Delanoye, A. , Capron, A. & Auriault C. (1987). Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to schistosoma mansoni larvae. Soumis pour publication.
- David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity *in vitro* : its mediation by cell-free substances formed by lymphoïd cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **56**: 72.
- David, J.R. , Remold, H.G. , Liu, D.Y. , Weiser, W.Y. & David, R.A. (1983). Lymphokines and macrophages. *Cell. Immunol.* **82**: 75.
- Dy, M. , Lebel, B. , Kamoun, P. & Hamburger, J. (1981). Histamine production during the anti-allograft response. Demonstration of a new lymphokine enhancing histamine synthesis. *J. Exp. Med.* **153**: 293.

- Faltinek, C.R. , Princler, G.L. & Ortaldo J.R. (1986). Expression of IFN- α and IFN- γ receptors on normal human small resting T lymphocytes and large granular lymphocytes. *J. Immunol.* **136**: 4134.
- Fung, M.C. , Hapel, A.J. , Ymer, S. , Cohen, D.R. , Johnson, R.M. , Campbell, H.D. & Young, I.G. (1984). Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. *Nature*. **307**: 233.
- Geissler, D. , Lu, L. , Bruno, E. , Yang, H. , Broxmeyer, H. & Hoffman, R. (1986). The influence of T lymphocyte subsets and humoral factors on colony formation by human bone marrow and blood megakaryocyte progenitor cells *in vitro* . *J. Immunol.* **137**: 2508.
- Goetzl, E.J. & Austen, K.F. (1975). Purification and synthesis of eosinophilatactic tetrapeptides of human lung tissue: identification as eosinophil chemotactic factor of anaphilaxy . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**: 4123.
- Gogstad, G.O. , Brosstad, F. , Krutnes, M.B. , Hagen, I. & Solum, N.O. (1982). Fibrinogen-binding properties of the human platelet glycoprotein IIb/IIIa complex: a study using crossed-radioimmunolectrophoresis. *Blood*. **60**:663.
- Grabstein, K. , Eisenman, J. , Mochizuki, D. , Shanebeck, K. , Conlon, P. , Hopp, T. , March, C. & Gillis, S. (1986). Purification to homogeneity of B Cell Stimulating Factor. *J. Exp. Med.* **163**: 1405.
- Greene, B.M. & Colley, D.G. (1974). Eosinophils and immune mechanisms. II. Partial characterization of the lymphokine eosinophil stimulation promoter. *J. Immunol.* **113** : 910.

- Gruber, B. , Poznansky, M. , Boss, E. , Partin, J. , Gorevic, P. & Kaplan, A.P. (1986). Characterization and functional studies of rheumatoid synovial mast cells. Activation by secretagogues, anti-IgE, and a histamine-releasing lymphokine. *Arthritis and Rheumatism* . **29**: 944.
- Haque, A. , Cuna, W. , Bonnel, B. , Capron, A. & Joseph, M. (1985). Platelet mediated killing of larvae from different filarial species in the presence of *Dipetalonema viteae* stimulated IgE antibodies. *Parasite Immunol*. **7**: 517.
- Harker, L.A. & Finch, C.A. (1969). Thrombokinetics in man. *J. Clin. Invest.* **48**: 963.
- Henney, C.S. , Kuribayashi, K. , Kern, D.E. & Gillis, S. (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* . **291**: 335.
- Hewitt, R.I. , Kushner, S. , Stewart, H.W. , White, D.E. , Wallace, W.S. & Subba Row, Y. (1947). Experimental chemotherapy of filariasis. III. Effect of 1-diethyl-carbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. *J. Lab. Clin. Med.* **32**: 1314.
- Howard, M. , Farrar, J. , Hilfiker, M. , Johnson, B. , Takatsu, K. , Hamaoka, T. & Paul, W. (1982). Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukine 2. *J. Exp. Med.* **155**: 914.
- Ibele, G.M. , Kay, N.E. , Johnson, G.J. , & Jacob, H.S. (1985). Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* . **65**: 1252.
- Ihle, J.N. , Keller J. , Henderson, L. , Klein, F. & Palaszynski, E. (1982). Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J. Immunol.* **129**: 2431.

- Ihle, J.N. , Keller, J. , Oroszlan, S. , Henderson, L.E. , Copeland, T.D. , Fitch, F. , Prystowsky, M.B. , Goldwasser, E. , Schrader, J.W. , Palaszynski, E. , Dy, M. & Lebel, B. (1983). Biologic properties of homogeneous interleukin 3. 1. Demonstration of WEHI-3 Growth Factor Activity, Mast Cell Growth Factor Activity, P Cell-Stimulating Factor Activity, and Histamine-Producing Cell-Stimulating Factor Activity . *J. Immunol.* **131:** 282.
- Jaffe, E.A. , Leung, L.L.K. , Nachman, R.L. , Levin, R.I. & Mosher, D.F. (1982). Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature.* **295:** 246.
- Jenkins, C.S.P. , Phillips, D.R. , Clemetson, K.J. , Meyer, D. , Larrieu, M.J. & Luscher, E.G. (1976). Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies of protein on platelets from patients with Bernard-Soulier syndrome and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* **57:** 112.
- Johnson, R.J. , Pasternak, G.R. & Shin, H.S. (1977). Antibody-mediate suppression of tumor growth. II. Macrophage and platelet cooperation with murine IgG1 isolated from alloantiserum. *J. Immunol.* **118:** 494.
- Joseph, M. , Auriault, C. , Capron, A. , Vorng, H. & Viens, P. (1983). A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* **303:** 810.
- Joseph, M. , Ameisen , J.C. , Kusnierz , J.P. , Pancré , V. , Capron , M. & Capron, A. (1984). Participation of the IgE receptor in the toxicity of blood platelets against schistosomes. *CR. Acad. Sc. Paris.* **298:** 55.

- Joseph, M. , Capron, A. , Ameisen, J.C. , Caen, J.P. , Tsicopoulos, A. & Tonnel, A.B. (1985). The IgE-dependent participation of platelets to cellular mechanisms in Allergy. In Proc. XII Intern. Conf. Allergy Clin. Immunol. , Washington.
- Joseph, M. , Auriault, C. , Capron, M. , Ameisen, J.C. , Pancré, V. , Torpier, G. , Kusnierz, J.P. , Ovlaque, G. & Capron A. (1985). IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminths. *Adv. Exp. Med. Biol.* **184**: 23.
- Joseph, M. , Capron, A. , Ameisen, J.C. , Capron, M. , Vorng, H. , Pancré, V. , Kusnierz, J.P. & Auriault, C. (1986). The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* **16**: 306.
- Kahn, R.A. & Flinton, L.J. (1974). The relationship between platelets and bacteria. *Blood* . **44**: 715.
- Kaplan, K.L. , Broekman, M.J. , Chernoff, A. , Lesznik, G.R. & Drilling, M. (1979). Platelet α -granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* . **53**: 604.
- Kaufman, R.M. , Hiro, R. , Pollack, S. & Crosby, W.A. (1965). Circulating megacaryocytes and platelet release in the lung. *Blood* . **26**: 720.
- Kownatski, E. , Kapp, A. & Ulrich, S. (1986). Novel neutrophil chemotactic factor derived from human peripheral blood mononuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **64**: 214.
- Kravis, T. & Henson, P.M. (1977). Accumulation of platelets at sites of antigen-antibody-mediated injury. *J. Immunol.* **118**: 1569.

- Lebowitz, E.A. & Cooke, R. (1978). Contractil properties of actomyosin from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **253**: 5443.
- Lomnitzer, R. , Rabson, A.R. & Koornhof H.J. (1975). Production of leucocyte inhibitory factor (LIF) and macrophage inhibitory factor (MIF) by PHA-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **22**: 522.
- Marchesi, S.L. & Chasis, J.A. (1979). Isolation of human platelet glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* . **555**: 442.
- Marcus, A.J. (1975). The platelets as source of phospholipids. S. Karger ed. , Basel, p. 49.
- Merlin, G. , Falcoff, E. & Aguet, M. (1985). ^{125}I -labeled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor binding data. *J. Gen. Virol.* **66**: 1149.
- Metcalf, D. (1977). Hemopoietic colonies. Springer-Verlag, Berlin.
- Molinas, F.C. , Wietzerbin, J. & Falcoff, E. (1987). Human platelets possess receptors for a lymphokine: demonstration of high specific receptors for Hu IFN- γ . *J. Immunol.* **138**: 802.
- Morgan, D.A. , Ruscetti, F.W. & Gallo, R.C. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. **193**: 1007.
- Mossman, T. , Cherwinski, H. , Bond, M. , Giedlin, M. & Coffman, R. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**: 2348.

- Nachman, R.L. , Leung, L.L.K. , Kloczewiak, M. & Hawiger, J. (1984). Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with the fibrinogen D domain. *J. Biol. Chem.* .**259**: 8584.
- Nachmias, V.T. (1983). Platelet and megacaryocytes shape change: triggered alterations in cytoskeleton. *Semin. Hematol.* **20**: 261.
- Nicola, N.A. & Vadas, M. (1984). Hemopoietic colony stimulating factors. *Immunology Today*. **5**: 76.
- Noma, Y. , Sideras, P. , Naito, T. , Bergstedt-Lindqvist, S. , Azuma, C. Severinson, E. , Tanabe, T. , Kinashi, T. , Matsuda, F. , Yaoita, Y. & Honjo, T. (1986). Cloning of c DNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* . **319**: 640.
- Nurden, A.T. & Caen, J.P. (1975). Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* . **255**: 720.
- Old, L.J. (1985). Tumor Necrosis Factor. *Science* . **230**: 630.
- Oppenheim, J.J. , Stadler, B.M. , Siraganian, R.P. , Mage, M. & Mathieson, B. (1982). Lymphokines: their role in lymphocyte responses. Properties of interleukin 1. *Fed. Proc.* **41**: 257.
- Oppenheim, J.J. & Cohen, S. eds. (1983). Interleukines, lymphokines, cytokines. Academic Press, New York.
- Oxholm, P. & Winther, K. (1986). Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy*. **41**: 1.

- Packhan, M.A. , Guccione, M.A. , Chang, P.L. & Mustard, J.F. (1973). Platelet aggregation and release: effects of low concentrations of thrombin or collagen. *Am. J. Physiol.* **225**: 38.
- Paul, W.E. (1984). Nomenclature of lymphokines which regulate B-lymphocytes. *Mol. Immunol.* **21**: 343.
- Penington, D.G. (1981). Formation of platelets. In Platelets in biology and pathology 2. Gordon, J.L. eds., Cambridge. P. 19. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. New-York. Oxford.
- Remold, H.G. & Mednis, A.D. (1977). Two migration inhibitory factors with different chromatographic behaviour and isoelectric points. *J. Immunol.* **118**: 2015.
- Robb, R.J. (1984). Interleukin 2: the molecule and its function. *Immunology Today*. **5**: 203.
- Sakariassen, K.S. , Bolhuis, P.A. & Sixma, J.J. (1979). Adhesion of human blood platelets to human artery subendothelium is mediated by factor VIII von Willebrand factor bound to subendothelium. *Nature*. **279**: 636.
- Sanderson, C.J. , O'Garra, A. , Warren, D.J. & Klaus, G.G.B. (1986). Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 437.
- Shoham, J. (1983). Production of human immune interferon. In *Adv. Biotechnol. Processes*. **2**: 21.

- Shulman, N.R. (1958). Immunoreactions involving platelets. I. A steric and kinetic model for formation of a complex from human antibody, quinidine as a hapten, and platelets; and for fixation of complement by the complex. *J. Exp. Med.* **107**: 665.
- Sideras, P. , Bergstedt-Lindquist, S. & Severinson, E. (1985). Partial biochemical characterization of IgG1-inducing factor . *Eur. J. Immunol.* **15**: 593.
- Silberstein, D.S. & David, J.R. (1986). Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 1055.
- Sixma, J.J. & Molenaar, I. (1966). Microtubules and microfibrils in human platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **16**: 153.
- Sixma, J.J. , Van de Berg, A. , Geuze, J.J. , Hasilik, A. & Von Figera, K. (1985). Immunolectron microscopical demonstration of lysosomes in megakaryocytes and platelets with anti-cathepsin. *Blood.* **65**: 1287.
- Skosa, L. , Zucker, M.B. , Jerushalmi, Z. & Grant, R. (1967). Kinetic studies of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate and its inhibition by chelating agents, guanidine compounds and adenosine. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **18**: 713.
- Sone, S. (1984). Functions of multinucleated giant cells formed by fusing rat alveolar macrophages with lymphokines containing macrophage fusion factor. *Lymphokine Research.* **3**: 163.

- Soper, W.D. , Barlett, S.P. & Winn, H.J. (1982). Lysis of antibody-coated cells by platelets. *J. Exp. Med.* **156**: 1210.
- Stahl, K. , Themann, H. & Dame, W.R. (1978). Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets. *Haemostasis* . **7**: 242.
- Stanley, E.R. & Heard, P.M. (1977). Factors regulating macrophage production and growth. *J. Biol. Chem.* **252**: 4305.
- Stern, A.S. , Pan, Y.C.E. , Urdal, D.L. , Mochizuki, D.Y. , De Chiara, S. , Blacher, R. , Wideman, J. & Gillis, S. (1984). Purification to homogeneity and partial characterization of interleukin 2 from a human T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 871.
- Thiéry, J.P. & Bessis, M. (1956). Mécanisme de la plaquettagénèse. Etude *in vitro* par la microcinématographie. *Rev. Hématol.* **11**: 162.
- Tilden, A.B. , Itoh, K. & Balch, C.M. (1987). Human lymphokine-activated killer (LAK) cells: identification of two types of effector cells. *J. Immunol.* **138**: 1068.
- Toy, J.L. (1983). The interferons. *Clin. Exp. Immunol.* **54**: 1.
- Tsicopoulos, A. , Tonnel, A.B. , Wallaert, B. , Joseph, M. , Ameisen, J.C. , Ramon, P. , Dessaint, J.P. & Capron A. (1987). Decrease of IgE-dependent platelet activation in hymenoptera hypersensitivity after specific immunotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* . Sous presse.
- Viens, P. , Dubois, R. & Kongshavn, P. (1983). Platelet activity in immune lysis of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **13**: 527.

Vilcek, J. , Henriksen-De Stefano, D. , Palombella, V.J. & Tsujimoto, M. (1986). Interaction between tumor necrosis factor and interferons. In the Biology of the Interferon System 1985. Edited by H. Schellekens and W.E. Stewart. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 249.

Vitetta, E.S. , Brooks, K. , Chen, Y.W. , Isakson, P. , Jones, S. , Layton, J. Mishra, G.C, Pure, E. , Weiss, E. , Word, C. , Yuan, D. , Tucker, P. , Uhr, J.W. & Krammer, P.H. (1984). T cell-derived lymphokines that induce IgM and IgG secretion in activated murine B cells. *Immun. Rev.* **78**: 137.

Vitetta, E.S. , Ohara, J. , Myers, C. , Layton, J. , Krammer, P.H. & Paul, W. (1985). Serological, biochemical and functionnal identity of B cell Stimulatory factor-1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* **162**: 1726.

Walsh, P.N. & Lipscomb, M.S. (1976). Comparison of the coagulant activities of platelets and phospholipids. *Br. J. Haematol.* **33**: 9.

Ward, P.A. , Remold, H.G. & David, J.R. (1969). leukotactic factor produced by sensitized lymphocytes. *Science*. **163**: 1079.

Ward, P.A. , Dvorak, H.F. , Cohen, S. , Yoshida, T. , Data, R. & Selvaggio, S.S. (1975). Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms. *J. Immunol.* **114**: 1523.

Webb, D.R. , Mason, K. , Semenuk, G. , Aune, T.M. & Pierce, C.W. (1985). Purification and analysis of isoforms of soluble immune response suppressor (SIRS). *J. Immunol.* **135**: 3238.

Weksler, B.B. & Nachman, R.L. (1971). Rabbit platelet bactericidal protein. *J. Exp. Med.* **134**: 1114.

- White, J.G. (1968). The dense bodies of human platelets. Inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood*. **33**: 598.
- White, J.G. & Clawson, C.C. (1980). The surface connected canalicular system of blood platelets: a fenestrated membrane system. *Am. J. Pathol.* **101**: 353.
- Williamson, B.D. , Carswell, E.A. , Rubin, B.Y. , Prendergast, J.S. & Old, L.J. (1983). Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines/ Synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 5397.
- Willis, A.L. (1978). Platelet aggregation mechanisms and their implications in haemostasis and inflammatory disease. In Vane, J.R. & Ferreira, S.H. eds. Inflammation, Vol 50, p. 138. Springer Verlag, Berlin.
- Zawilska, K. , Giroud, J.P. , Timsit, S. & Caen, J.P. (1973). Plaquettes et inflammation. *Pathol. Biol.* **21**: 51.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

- * M. JOSEPH , J.C. AMEISEN , J.P. KUSNIERZ , V. PANCRE , M. CAPRON & A. CAPRON. 1984. Participation du récepteur pour l'IgE à la toxicité des plaquettes sanguines contre les schistosomes. *C. R. Acad. Sc. Paris.* **298**, 55-60.
- * M. JOSEPH, C. AURIAULT, M. CAPRON, J.C. AMEISEN, V. PANCRE, G. TORPIER, J.P. KUSNIERZ, G. Ovlaque & A. CAPRON. 1985. IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminths. *Adv. Exp. Med. Biol.* **184**, 23-31.
- * J.C. AMEISEN, M. JOSEPH, A.B. TONNEL, H. VORNG, V. PANCRE, E. FOURNIER, B. WALLAERT & A. CAPRON. 1985. Mise en évidence d'une anomalie fonctionnelle plaquettaire spécifique dans l'asthme à l'aspirine; conséquences diagnostiques. *C. R. Acad. Sc. Paris.* **300**, 137-142.
- * J.C. AMEISEN, A. CAPRON, M. JOSEPH, J. MACLOUF, H. VORNG, V. PANCRE, E. FOURNIER, B. WALLAERT & A.B TONNEL. 1985. Aspirin-sensitive asthma : abnormal response to drugs inducing asthmatic attacks. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **78**, 438-446.
- * M. JOSEPH, A. CAPRON, J.C. AMEISEN, M. CAPRON, H. VORNG, V. PANCRE, J.P. KUSNIERZ & C. AURIAULT. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* **16**, 306-312.
- V. PANCRE, C. AURIAULT, M. JOSEPH, J.Y. CESBRON, J.P. KUSNIERZ & A. CAPRON. 1986. A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* **137**, 585-591.
- * A. CAPRON, M. JOSEPH, J.C. AMEISEN, M. CAPRON, V. PANCRE & C. AURIAULT. 1987. Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **82**, 307-312.
- V. PANCRE, M. JOSEPH, C. MAZINGUE, J. WIETZERBIN, A. CAPRON & C. AURIAULT. 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of gamma interferon. *J. Immunol.* **138**, 4490-4495.

C. AURIAULT, V. PANCRE, M. JOSEPH, M. DAMONNEVILLE, E. FALCOFF & A. CAPRON.

1987. Effector functions of platelets are induced and regulated by T lymphocytes. *Ann. Immun. Inst. Pasteur.* 138, 585-597.

V. PANCRE, M. JOSEPH, J.Y. CESBRON, M. BARBIER, J.P. KUSNIERZ, H. VORNG, A. CAPRON & C. AURIAULT. Modulation of platelet effector functions by lymphocytes in human and rat schistosomiasis mansoni. Soumis pour publication à *Parasite Immunology*.

V. PANCRE, J.Y. CESBRON, C. AURIAULT, M. JOSEPH, J. CHANDENIER & A. CAPRON. IgE-dependent killing of *B. malayi* microfilariae by human platelets and its modulation by T cell products. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* Sous presse.

* M. DAMONNEVILLE, J. WIETZERBIN, V. PANCRE, M. JOSEPH, A. CAPRON, A. DELANOYE & C. AURIAULT. Induction of platelet effector functions by Tumor Necrosis Factor. Soumis pour publication à *J. Immunol.*

V. PANCRE, M. JOSEPH, A. CAPRON, J. WIETZERBIN, J.P. KUSNIERZ, H. VORNG & C. AURIAULT. Recombinant human immune interferon induces increased IgE receptor expression on human platelets. Soumis pour publication à *J. Immunol.*

Communications:

C. AURIAULT, V. PANCRE, M. JOSEPH & A. CAPRON. Regulation of platelet immune functions by T lymphocytes. 7th European Immunol. meeting. 8-12 Septembre 1985. Jerusalem. Israël.

M. JOSEPH, A. CAPRON, A. TSICOPOULOS, V. PANCRE, J.B. MARTINOT & A.B. TONNEL. Platelet activation by IgE and aspirin. "Platelet, analgesics and asthma". 3rd International Symposium. 7-9 Septembre 1986. Davos. Suisse.

V. PANCRE, C. AURIAULT, M. JOSEPH & A. CAPRON. Regulation of platelet effector functions by T cell factors. Réunion commune société suisse d'Allergologie et d'Immunologie, société française d'immunologie, société française d'Allergologie. 23-25 Avril 1987. Genève. Suisse. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* Vol 83, suppl. 1, Abstract N° 113.

V. PANCRE, C. AURIAULT, M. JOSEPH, J.Y. CESBRON & A. CAPRON. Regulation of platelet effector functions by T cell factors. 8th European Immunol. meeting. 1-5 Septembre 1987. Zagreb. Yugoslavia.

Les références précédées d'un astérisque ne figurent pas dans le chapitre des résultats de cette thèse.

172

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	7
RESUME	9
INTRODUCTION	12
GENERALITES	15
A. LES LYMPHOKINES	17
I HISTORIQUE	17
II ROLE DES LYMPHOKINES	19
1. Dans la multiplication et la maturation des cellules sanguines	19
2. Dans la réponse immunitaire	20
III PRINCIPALES LYMPHOKINES	22
1. Caractères communs	22
2. Classification des principales lymphokines	23
IV CONCLUSIONS	29
B. LA PLAQUETTE	29
I ORIGINE ET DUREE DE VIE	29
II MORPHOLOGIE PLAQUETTAIRE	30
1. La membrane plasmique	30
2. Les membranes intraplaquettaires	31
3. Les organelles plaquettaires	32
4. Le cytoplasme	34
III LES INTERACTIONS PLAQUETTAIRES	34
1. L'adhésion	35
2. Le changement de forme	35
3. L'agrégation	36

IV LES ANOMALIES PLAQUETTAIRES	39
1. Les thrombopénies	39
2. Les hyperplaquetoses	40
3. Les thrombopathies	40
V DES PARASITES AUX MALADIES ALLERGIQUES: DE NOUVELLES FONCTIONS PLAQUETTAIRES	42
1. Plaquettes et parasites	42
2. Plaquettes, allergie et asthme	44
3. Plaquettes et inflammation	46
4. Autres travaux	47
VI CONCLUSION	47
TRAVAUX PERSONNELS	48
ARTICLE 1: Une lymphokine suppressive des fonctions cytotoxiques plaquettaires	50
ARTICLE 2: Modulation par les lymphocytes T des fonctions effectrices des plaquettes dans la schistosomiase humaine et dans la schistosomiase expérimentale du rat	58
ARTICLE 3: Destruction IgE-dépendante des microfilaires de <i>Brugia malayi</i> par les plaquettes humaines: modulation par des produits lymphocytaires T	90
ARTICLE 4: Induction des fonctions cytotoxiques des plaquettes par les lymphokines: rôle de l'interféron gamma	111
ARTICLE 5: L'interféron gamma recombinant augmente l'expression du récepteur pour l'IgE des plaquettes humaines	119
DISCUSSION CONCLUSION	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	154

175

PUBLICATIONS PERSONNELLES

169

TABLE DES MATIERES

172