

50376
1990
83

69546

50376
1990
83

N° d'ordre: 555

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS**

THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du titre de

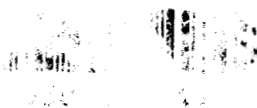
Docteur en SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Valérie GRUART



**ETUDE DE L'ACTIVATION CELLULAIRE DES EOSINOPHILES EN
RELATION AVEC LEUR HETEROGENEITE: CARACTERISATION
MOLECULAIRE DE MARQUEURS D'ACTIVATION ET DE
DIFFERENCIATION**



Présentée le 29 juin 1990 devant la commission d'examen:

Président : Mr M. PORCHET
Rapporteurs : Mme M. CAPRON
Mr A. DHAINAUT
Examineurs : Mr A. CAPRON
Mr A. B. KAY

Je dédie ce travail,

à Fabrice,

à mes parents,

à ma famille,

à tous mes amis.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, Unité mixte INSERM U167-CNRS 624 (1, rue du Pr. Calmette, LILLE) sous la direction de Monsieur le Professeur André Capron, dans le groupe " Etude des mécanismes effecteurs" dirigé par Madame le Docteur Monique Capron.

Je tiens à remercier très vivement:

Monsieur le Professeur A. Capron, qui m'a accueillie et aidée tout au long de ces années passées dans son laboratoire. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de toute ma gratitude.

Madame le Docteur M. Capron, qui par son enthousiasme communicatif, m'a fait profiter de ses connaissances sur l'éosinophile. Qu'il me soit permis en cette occasion de lui exprimer tous mes remerciements pour l'accueil qu'elle m'a réservé dans son équipe.

Messieurs les Professeurs M. Porchet, A. Dhainaut et A. B. Kay d'avoir accepté de juger l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse. Qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance.

Que toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue dans ce travail trouvent, dans ces pages le témoignage de ma profonde gratitude.

MERCI A TOUS.

Publications et Communications

Gruart V., Balloul J.M., Prin L., Tomassini M., Loiseau S., Capron A. & Capron M. (1989)
Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. *J. Immunol.*, 142 : 4416-4421.

Granette C., Gruart V., Ouaisi M.A., Rizvi F., Delespesse G., Capron A. & Capron M.
(1989) IgE receptors on human eosinophils (Fc_εR_{II}) : Comparison with B CD23 and association with an
adhesion molecule. *J. Immunol.* 143 : 3580-3588.

Capron M., Gruart V., Prin L. & Tonnel A.B. (sous presse) L'éosinophile : récepteurs et médiateurs.
Revue Française d'Allergologie (Lille, octobre 1989).

Chihara J., Gruart V., Plumas J., Kusnierz JP., Torpier G., Prin L., Capron A. &
Capron M. (*soumis*) Induction of CD23, CD25, and CD4 expression on an eosinophilic cell line (EoL-3) by
interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5.

Prin L., Lefebvre P., Gruart V., Capron M., Storme L., Formstecher P., Loiseau S. &
Capron A. (1989) Heterogeneity of human eosinophil glucocorticoid receptor expression in hypereosinophilic
patients : absence of detectable receptor correlates with resistance to corticotherapy. *Clin. exp. Immunol.* 78:
383-389.

Gosset P., Pestel J., Gruart V., Prin L., Tonnel A.B. & Capron A. (1986) Chemotactic factor for
granulocytes (GCF) in hypereosinophilic sera. *Excepta Medica*, International Congress, Toronto.

Lassalle P., Gosset P., Gruart V., Prin L., Capron M., Lagrue G., Kusnierz J.P., Tonnel
A.B. & Capron A. Presence of antibodies against endothelial cells in the sera of patients with episodic
angioedema and hypereosinophilia. *Clin. exp. Immunol.* (sous presse).

Prin L., Ameisen J.C., Plumas J., Gruart V., Loiseau S., Bletry O., Fenaux P., Capron M. & Capron A. (1990) High levels of soluble interleukin-2 receptor in the serum of 30 patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Brit. J. Haematol.* 74: 233-237.

Prin L., Bletry O., Tonnel A.B., Gruart V., Bodemer C., Capron M., Guillevin L., Godeau P. & Capron A. (1987) Lésions viscérales des hyperéosinophilies. *Presse Médicale* 16 : 945-949.

Chihara J., Plumas J., Tavernier J., Gruart V., Prin L., Capron A. & Capron M. (soumis)
Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils : Variable expression and induction by granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

Moreau J.F., Bonneville M., Godard A., Gascan H., Gruart V., Moore M.A. & Soullilou J.P. (1984) Characterization of a factor produced by human T cell clones exhibiting eosinophil-activating and burst promoting activities. *J. Immunol.* 138 : 3844-3849.

Activation sélective des éosinophiles dépendante d'une lymphokine (HILDA). Congrès de Médecine Interne, Nantes, 1987 (Prix de Poster).

Activation of human eosinophils by a new lymphokine called HILDA. Société Française d'Immunologie, 1988 (Poster).

Bases moléculaires de l'hétérogénéité des éosinophiles. Société Française d'Immunologie, 1988 (Poster).

ABREVIATIONS

AA	:	Acides Aminés
ADCC	:	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante d'Anticorps
ARNm	:	ARN messenger
ADNc	:	ADN complémentaire
Bq	:	Becquerel (1 curie= 37 GBq)
BFU	:	Burst Forming Unit
CFU	:	"Colony Forming Unit" ou unité de formation de colonies
CL	:	Chimioluminescence
CSF	:	"Colony Stimulating Factor" ou facteur de croissance
ECP	:	"Eosinophil Cationic Protein" ou protéine cationique de l'éosinophile
EDN	:	"Eosinophil Derived Neurotoxin" ou neurotoxine de l'éosinophile
EPO	:	"Eosinophil Peroxidase" ou peroxydase de l'éosinophile
fMLP	:	Formylméthionine-leucine-phénylalanine
GM-CSF	:	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HES	:	Syndrome hyperéosinophilique
IEF	:	Isoélectrofocalisation
IL-3r	:	Interleukine-3 recombinante
IL-5r	:	Interleukine-5 recombinante
kD	:	kilo Dalton
MBP	:	"Major Basic Protein" ou protéine basique majeure
MPO	:	Myéloperoxydase
NEPHGE	:	Gel électrophorèse en gradient de pH non équilibré
PAF	:	Platelet Activating Factor

PBS	:	tampon phosphate, NaCl
pi	:	point isoélectrique
PMA	:	Phorbol Myristate Acetate
TCA	:	Acide trichloracétique

RESUME

Les données de la littérature mettent l'accent sur l'existence de sous-populations d'éosinophiles activés et toxiques associés à des lésions viscérales (cardiopathies, neuropathies...) dans les syndromes hyperéosinophiliques. La purification de ces sous-populations sur gradient de densité a permis d'isoler des éosinophiles activés, de faible densité ou hypodenses distincts des éosinophiles de densité plus élevée ou normodenses. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la définition de marqueurs d'activation de ces sous-populations. La lymphokine HILDA a été utilisée comme modèle d'activation biologique. HILDA est une glycoprotéine de 41 kD isolée à partir de clones T alloréactifs issus de rejet de greffe de rein. Après avoir démontré l'activité potentiatrice d'HILDA sur de nombreuses fonctions de l'éosinophile (cytotoxicité, chimioluminescence, chimiotactisme, libération de médiateurs) en fonction de différentes populations d'éosinophiles, nous avons étudié les répercussions biochimiques d'une telle activation. Pour cela, une comparaison des profils protéiques d'extraits cellulaires d'éosinophiles hypodenses et normodenses a d'abord été effectuée en électrophorèse mono et bidimensionnelle. L'analyse comparative a permis de mettre en évidence une protéine de 51 kD de pI très basique, détectée dans les éosinophiles normodenses. La révélation par un anticorps anti-EPO, d'une protéine de 51-53 kD dans ces éosinophiles, corrélée à une activité peroxydasique plus importante, suggère que cette protéine pourrait être l'EPO. A l'inverse, des protéines de 23 et 41 kD sont présentes au niveau des éosinophiles hypodenses et non détectables sur les éosinophiles normodenses. La protéine de 23 kD est néosynthétisée dans les éosinophiles hypodenses, alors que la protéine de 51 kD ne l'est pas. L'étude des profils a permis d'établir que l'activation par HILDA ne modifiait pas, de façon importante, le métabolisme protéique. Seule, une néosynthèse de la protéine de 23 kD a pu être observée dans les éosinophiles normodenses, traduisant ainsi la participation de cette protéine dans le mécanisme d'activation de l'éosinophile. L'absence de néosynthèse de la protéine de 51 kD a pu être corrélée à une expression très faible et souvent non détectable des ARNm codant pour l'EPO. La détection d'ARNm codant pour l'ECP montre que ce phénomène n'est pas valable pour toutes les protéines cationiques. L'absence d'ARNm codant pour l'EPO n'est pas liée à la faible quantité d'ARN exprimés dans ces cellules différenciées, puisque des ARNm codant pour

le CD4 et pour les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ont été décelés chez tous les patients. L'hypothèse d'une "down-régulation" de la synthèse de l'expression de l'ARNm codant pour l'EPO au cours de la différenciation a alors été testée. Les précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical d'une part et la lignée EoL-3 d'autre part ont été utilisées comme modèle d'étude. Dans le premier système, nous avons pu établir que l'ARNm codant pour l'EPO était présent dans les cellules immatures éosinophiles, obtenues en cultivant les cellules en IL-3, GM-CSF et IL-5 et disparaissait progressivement au cours de la différenciation vers l'éosinophile mature. Dans le modèle de la lignée EoL-3, en présence des mêmes interleukines, l'EPO n'a pas pu être détectée. Cependant, la différenciation de ces cellules a conduit à l'expression d'autres marqueurs intéressant l'éosinophile tels que le CD23, le CD25 et le CD4. L'apparition de ces marqueurs à la surface de la cellule est corrélée à la synthèse des ARNm correspondant.

L'ensemble des données sur l'expression des protéines et des ARNm suggère que l'éosinophile hypodense est le stade final de la cascade d'activation et de différenciation cellulaire.

GENERALITES

L'éosinophile est un polynucléaire sanguin qui se distingue des autres granulocytes par son affinité tinctoriale vis-à-vis de l'éosine qui lui confère une couleur rouge-orangé. Ce granulocyte est présent en très petit nombre dans la circulation sanguine (1 à 4 % des leucocytes) et possède un tropisme tissulaire élevé. Le rapport des cellules sanguines sur les cellules tissulaires est égal à 1 % chez l'homme. Les sites privilégiés de localisation sont les tissus où se développent de fréquentes réactions immunitaires telles que les sous-muqueuses de surface ou les sites de contact avec l'environnement (peau, tractus gastrointestinal, bronches...).

L'éosinophile a été découvert en 1879 par Ehrlich et, depuis, de nombreuses études ont été entreprises pour définir l'origine, la structure et le rôle de ces cellules.

I- LA GRANULOPOIESE EOSINOPHILE

A- LA LIGNEE EOSINOPHILE

L'éosinophile se développe à partir de cellules souches qui se différencient puis subissent une maturation progressive. Il proviendrait d'une lignée médullaire autonome distincte de celle des neutrophiles. Certains arguments penchent plutôt en faveur d'un précurseur commun aux basophiles. Ces notions proviennent d'observations cliniques telles que :

- la description chez un patient d'une diminution cyclique de la production médullaire de neutrophiles et monocytes, sans atteinte de la production des éosinophiles (1).

- la description chez certains patients de déficits simultanés en éosinophiles et basophiles (2, 3).

- l'apparition *in vivo* dans certaines leucémies (4), ainsi que dans des cultures de cellules de sang de cordon *in vitro* (5) de cellules contenant les deux types de granules (éosinophiles et basophiles)

Ces cellules souches subissent, dans la moëlle osseuse, quatre à cinq mitoses au cours

desquelles elles élaborent progressivement leurs granulations spécifiques, tout en présentant des changements profonds dans leur taille, la forme de leur noyau et la basophilie de leur cytoplasme. L'ensemble des critères morphologiques permet de déterminer plusieurs stades caractéristiques : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte et granulocyte mûr ou polynucléaire éosinophile. C'est au stade de promyélocyte qu'apparaissent les granules orangés. Ces granules se forment dans des cellules ayant des caractères communs aux autres jeunes granulocytes, c'est-à-dire la présence en microscopie optique d'un noyau plus ou moins rond, volumineux, excentré, et d'un cytoplasme abondant contenant les granules. En microscopie électronique, ces cellules se distinguent par la présence d'un ou plusieurs nucléoles mais surtout par la présence d'un appareil de Golgi très développé.

Sur frottis coloré, le myélocyte éosinophile est bien individualisé par ses granules rouge-orangés très nombreux. Au stade suivant, représenté par le métamyélocyte, un mélange de granulations immatures et matures est observé. En effet, cette maturation s'accompagne d'une modification (observable en microscopie électronique) dans la morphologie des granulations. Un corps dense de forme variable, trapézoïdale ou rectangulaire apparaît dans la zone centrale. Enfin, des changements dans la forme du noyau interviennent pour parvenir au granulocyte mûr avec son noyau bilobé et ses granulations spécifiques.

Une moëlle humaine normale contient 3 à 3,5 % d'éosinophiles répartis comme suit, en différents stades : 37 % de myélocytes, 26 % de métamyélocytes et 37 % de granulocytes. La cinétique d'apparition des éosinophiles dans le sang, à partir de la dernière division est normalement de 2,5 jours. Des études utilisant les techniques de marquage à la thymidine tritiée ont permis de calculer le turn-over des éosinophiles et ont montré que l'importante réserve en éosinophiles médullaires permettait de comprendre l'élévation rapide du taux d'éosinophiles sanguins (6).

L'étude de ces stades de différenciation est rendue difficile par la difficulté d'obtention et la rareté du matériel biologique. Dans cette perspective, la possibilité d'utilisation de lignées d'éosinophiles semble intéressante. Jusqu'à ce jour deux lignées ont été décrites.

La première est la lignée HL60, développée à partir de cellules d'un patient ayant une leucémie aigue à promyélocytes. Cette lignée peut se différencier en éosinophile en présence d'acide butyrique 0,5 M à pH 7,4, mais peut également donner naissance à des neutrophiles en présence de diméthyl sulfoxyde à 176 mM et à des monocytes en présence de vitamine D3 (7). Une lignée stable de cellules HL60 différenciées en éosinophiles a pu être obtenue, c'est le clone 3+c-5.

La deuxième lignée est la lignée EoL-3 établie par Saito. Elle dérive de cellules d'un patient ayant "une leucémie à éosinophiles" (8). Peu d'études ont été réalisées sur cette lignée.

B-FACTEURS INTERVENANT DANS L'EOSINOPHILOPOIESE

La notion de thymodépendance de la réponse éosinophile a été établie à partir des travaux de Basten et de Mc Garry (9,10). Le rôle des lymphocytes T dans le recrutement des éosinophiles a été évoqué grâce à des expériences de thymectomie néonatale, de drainage du canal thoracique et d'irradiation subléthale réalisées par Basten et Beeson. Ces traitements empêchent toute réponse éosinophile lors d'une sollicitation antigénique appropriée, telle que l'injection de larves de *Trichinella spiralis* (10). Par la suite, l'implantation *in vivo* de chambres de diffusion chez les animaux a permis d'établir l'existence de facteurs lymphocytaires diffusibles capables de stimuler la réponse éosinophile (10).

Un ensemble de données permettait donc d'établir le rôle des lymphocytes dans la régulation de la production d'éosinophiles. Cette activité dénommée "Colony Stimulating Factor" ou CSF a été démontrée, dans un premier temps pour les granulocytes et les monocytes (GM-CSF) (11). Puis en 1974, Parker et Metcalf ont décrit une activité CSF spécifique de l'éosinophile ou "Eo-CSF" (12).

D'autres activités "Eo-CSF" ont été décrites par la suite dans différents modèles :

- Une activité "Eo-CSF" a été retrouvée dans des surnageants de lymphocytes T sensibilisés de patients ayant une aspergillose bronchopulmonaire allergique (13).
- de même, en 1985, Sanderson et Warren ont décrit l'existence d'une molécule appelée

"Eosinophil Differentiating Factor", ou EDF, capable de stimuler la différenciation des éosinophiles. Cet EDF a été isolé dans des surnageants de clones de souris, obtenus par hybridation entre une lignée tumorale et des cellules spléniques de souris infectées par *Mesocestoides cortii* (14). Cet EDF murin est capable de stimuler la différenciation des éosinophiles murins et humains (15) et possède une activité sur la croissance des lymphocytes B de souris (BCGF_{II}) (16).

Parallèlement à ces activités "Eo-CSF" détectées dans les surnageants cellulaires, le clonage de différentes interleukines a permis de tester ces molécules sur la différenciation de l'éosinophile. Parmi les cytokines recombinantes humaines décrites, les suivantes possèdent une activité sur l'éosinophilopoïèse :

Tout d'abord le GM-CSF et l'IL-3 qui agissent sur les cellules souches pluripotentes ou sur les cellules précurseurs immatures et ne sont pas spécifiques d'une lignée en particulier. Elles stimulent la prolifération et la différenciation des colonies d'éosinophiles à partir de cellules de moëlle humaine en culture (17-19).

L'IL-5 favorise également la production d'éosinophiles mais, contrairement, à l'IL-3 et au GM-CSF qui agissent sur différentes cellules souches hématopoïétiques, son activité sur la différenciation cellulaire s'exerce spécifiquement sur la lignée éosinophile. Le clonage de l'IL-5 murine et humaine dénommée préalablement BCGF_{II} et TRF, effectué par Honjo et coll. (20,21), a permis de démontrer l'identité entre IL5 et EDF décrit plus haut. La production de cette molécule en vecteur d'expression a conduit à l'obtention d'IL5 recombinante (22). Les caractéristiques de ces 3 interleukines sont détaillées dans le tableau I.

Les études effectuées avec les autres interleukines ne montrent pas d'effet direct sur l'éosinophilopoïèse. Cependant, il a été démontré que l'injection d'IL-2 chez des patients peut entraîner une éosinophilie (23). Certains faits expérimentaux seraient plutôt en faveur d'un effet indirect passant par les lymphocytes T. Une étude *in vitro*, montre que des cellules T de patients hyperéosinophiliques produisent de l'IL-5 lors d'une stimulation par l'IL-2 (24).

L'effet de l'IL-1 a été étudié en association avec IL-3 et IL-5. Warren et coll. ont ainsi

TABLEAU I

PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE DES EOSINOPHILES HUMAINS

	IL-3	GM-CSF	IL-5
PM	15 kD	23 KD	25 KD
ACIDES AMINES	133	127	112
GLYCOSYLATION	++	++	++
GENE *	1 gène localisé sur le chromosome 5 bandes 5q23.3 -5q32	1 gène localisé sur le chromosome 5 bandes 5q21-5q32	1 gène localisé sur le chromosome 5 bande 5q31
CIBLES	CFU-mix CFU-GM BFU-E CFU-G CFU-M CFU-Eo CFU-még Eosinophiles	CFU-GM vers G en conc. élevée vers M en conc. faible BFU-E CFU-mix CFU-Eo CFU-még Neutrophiles Monocytes Eosinophiles	CFU-Eo Eosinophiles **

* L'organisation du gène est comparable pour les 3 interleukines (25).

** L'activité sur les lymphocytes B (BCGF II) et sur les lymphocytes T (TRF) décrit chez la souris n'a pas été retrouvée chez l'homme (25).

démontré que IL-1, IL-3 et IL-5 agissaient en synergie sur la production d'éosinophiles *in vitro* à partir de cellules pluripotentes (26).

La cinétique d'action et les cibles préférentielles des interleukines affectant la différenciation de l'éosinophile sont illustrées figure 1.

A la suite de l'action des diverses cytokines, des cellules souches médullaires pluripotentes donnent naissance à des éosinophiles matures pouvant passer dans la circulation sanguine. Le nombre d'éosinophiles est inférieur à 400/mm³ de sang chez les sujets normaux

II- ETUDE STRUCTURALE DE L'EOSINOPHILE

A- LE NOYAU

L'éosinophile possède un noyau bilobé caractéristique en bissac avec une chromatine dense et aucun nucléole. Dans certaines situations pathologiques, des auteurs ont démontré que le nombre de lobes nucléaires des éosinophiles sanguins pouvait augmenter (27).

Cette hypersegmentation a pu être observée dans le cadre d'éosinophiles tissulaires tels que les éosinophiles de lavage bronchoalvéolaire (28). Elle est inductible par des agents chimioattractants (histamine, eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis, PAF) mais aussi par des interleukines (Interféron, IL-3, GM-CSF) (29).

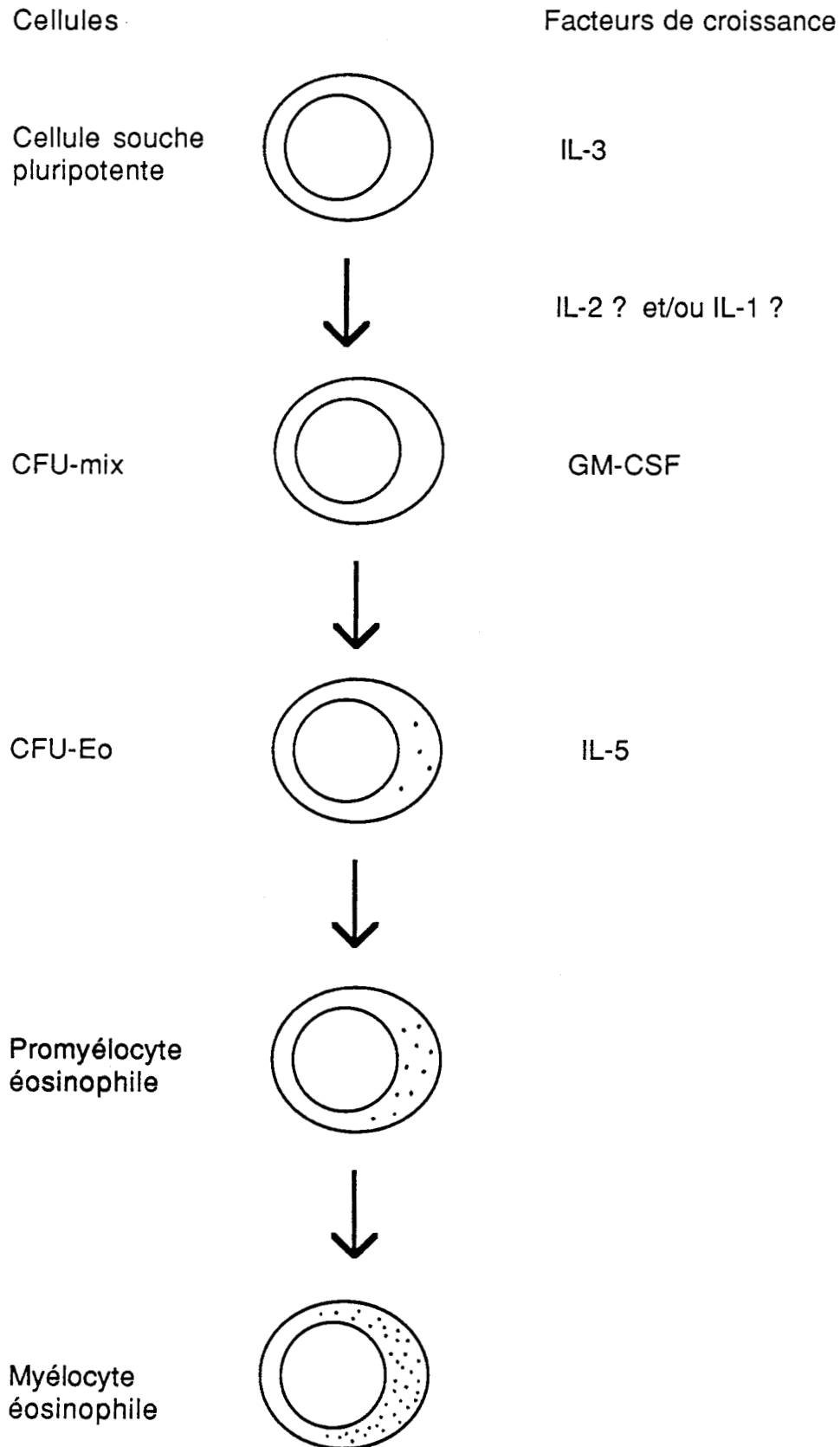
B- LES CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES

L'éosinophile possède tous les organites "classiques" nécessaires au métabolisme cellulaire. Les études en microscopie électronique révèlent la présence de mitochondries, d'un appareil de Golgi, d'un réticulum endoplasmique rugueux et surtout la présence de granules.

1- Les granules

Ces granules qui donnent l'aspect caractéristique aux éosinophiles, sont formés d'une matrice périphérique et d'une zone centrale, appelée core ou crystalloid (30). C'est dans ces

Figure 1 : Cibles des facteurs de croissance de l'éosinophile humain
(d'après C.J.F. SPRY (32))



granules que se trouvent les 4 protéines cationiques majeures de l'éosinophile. La matrice est le site de localisation de l'EPO ou "peroxydase de l'éosinophile", ainsi que de l'ECP (protéine cationique de l'éosinophile) et de l'EDN (neurotoxine de l'éosinophile), le core, lui, est essentiellement constitué de MBP, ou "protéine basique majeure". Ces granules possèdent également un équipement enzymatique assez riche. A côté de ces granules spécifiques, se trouvent des granules de plus petite taille, denses, et homogènes contenant de nombreux enzymes (31).

a) Les protéines cationiques.

De nombreuses études ont été effectuées sur ces protéines cationiques. Elles sont maintenant toutes caractérisées et clonées. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau II.

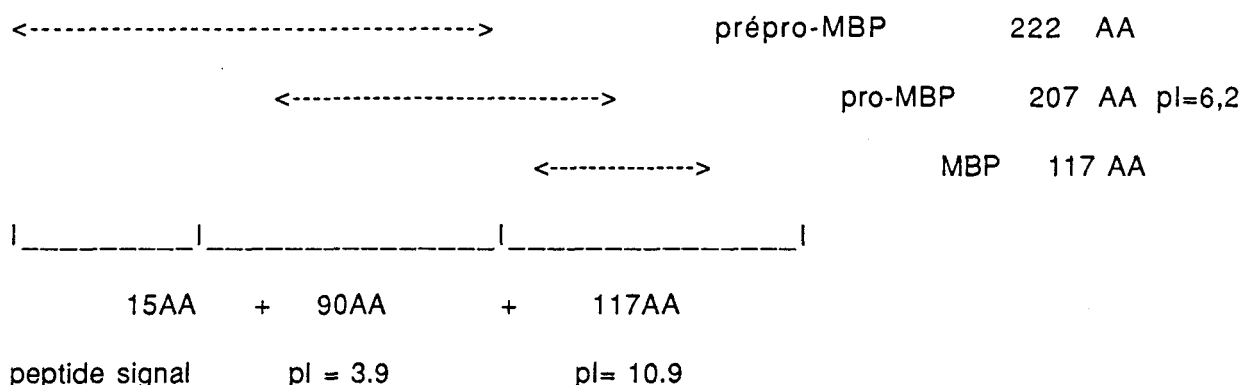
-La MBP

La MBP a d'abord été isolée puis étudiée à partir d'éosinophiles de cobaye par Gleich et coll. (33). Elle possède un poids moléculaire de 11 kD chez le cobaye (34) et de 13,8 kD chez l'homme (35). Le pI de cette protéine est très élevé (= 10,9). C'est une protéine très riche en arginine qui a tendance à polymériser *in vitro*. Le taux de MBP a été évalué à 8 µg/10⁶ cellules (36). Cette protéine a été localisée dans le core des granules par immunomarquage en microscopie électronique, tout d'abord chez le cobaye (37), puis chez l'homme (38).

En 1988, la MBP a pu être clonée puis séquencée à partir d'une banque d'ADNc de la lignée HL60 (39-40) par deux équipes différentes. La lignée HL60 constitue un outil pratique dans le clonage des protéines de l'éosinophile. Dans les deux cas, les sondes utilisées pour le criblage étaient des sondes oligonucléotidiques dont la séquence avait été déduite d'un microséquençage préalable de la protéine isolée (41).

Le clonage de la MBP montre que cette protéine est synthétisée sous forme de pro-MBP (23 kD) qui serait ensuite clivée pour donner une protéine mature de 14 kD. La

structure est la suivante :



La prépro-protéine contient un peptide signal présent classiquement chez les protéines sécrétées. La traduction de la MBP sous forme de pro-protéine masquerait les effets toxiques de la protéine vis-à-vis de l'éosinophile lui-même. Plusieurs hypothèses existent pour le clivage de la pro-MBP en MBP :

- le clivage peut s'effectuer durant le transport du réticulum endoplasmique vers le granule où la MBP est stockée
- la pro-MBP peut être stockée dans les granules puis clivée en MBP qui cristallise alors pour former le core
- le clivage pourrait intervenir juste avant la sécrétion des protéines.

La présence de MBP dans le core des granules favorise la deuxième hypothèse.

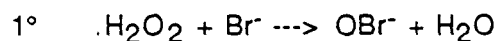
Les études effectuées en Northern blot montrent que l'ARNm codant pour la MBP possède une taille de 1 Kb. L'analyse en Southern blot permet de déterminer que le gène est < 3 Kb et possède un seul intron. Récemment, des études de comparaison de séquence, par une méthode mise au point par Patty, montre que la MBP possède une homologie de séquence avec le récepteur $Fc_\epsilon RII$. Cette méthode est basée sur l'établissement de séquences consensus à partir de séquences de protéines d'une même famille (42). Aucune donnée expérimentale, n'a pu jusqu'à ce jour, démontrer l'importance réelle de cette homologie.

La fonction principale de la MBP consiste en un effet toxique de la protéine vis-à-vis de nombreuses cibles cellulaires. Cette activité s'explique par la nature très basique de la protéine qui favorise sa liaison à la surface des cibles. Cet effet a d'abord été démontré

vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni* (43), puis vis-à-vis des larves de *Trichinella spiralis* (44), ainsi que sur le *Trypanosoma cruzi* (45). La MBP possède une activité toxique sur des cellules tumorales murines, ainsi que sur des pneumocytes (46) et sur des cellules épithéliales de la trachée (47).

-L'EPO

L'EPO est une protéine localisée dans la matrice des granules de l'éosinophile (48). Cette peroxydase est distincte des autres peroxydases en particulier celle du neutrophile (49). Elle consiste en 2 sous-unités de masse moléculaire respective de 14 kD et 58 kD. La quantité d'EPO a été évaluée à 15 µg/10⁶ éosinophiles (50). Cette protéine de pI > 11 possède une activité peroxydasique comme son nom l'indique. C'est une métalloenzyme dont le groupement prosthétique est l'hème. Elle catalyse deux types de réaction selon que le donneur d'électrons est un halogène ou non :



La formation d'un hypohalogénure dans la première réaction explique le rôle toxique de l'EPO.

Cette enzyme du point de vue de la réaction catalytique est proche de la lactoperoxydase (51).

La protéine a commencé à être microséquencée (52) mais c'est le clonage et le séquençage qui ont permis d'obtenir la séquence complète. Le clonage de l'EPO a été effectué récemment à partir d'une banque d'ADNc de cellules de sang de cordon, différenciées en éosinophiles par un surnageant de lymphocytes T activés (53). La séquence possède un cadre ouvert de lecture de 2106 pb codant pour une proséquence contenant successivement la chaîne légère puis la chaîne lourde. Ce clonage révèle une homologie partielle avec la séquence de la myéloperoxydase ou MPO ainsi qu'avec la thyroperoxydase ou TPO suggérant l'existence d'une famille de gènes. L'EPO est codée par un gène de 12 kb contenant 12 exons et 11 introns. Ce gène se situerait sur le chromosome 17 chez l'homme (54). Les études en Northern blot indiquent que les ARNm sont présents uniquement dans la lignée HL60 différenciée en

éosinophiles (54).

Le rôle de l'EPO dans la cellule est lié à sa fonction enzymatique de peroxydation d'un grand nombre de molécules. L'EPO intervient dans les mécanismes de toxicité, surtout en présence d'halogènes et d' H_2O_2 . En effet, lorsque l'halogène est le chlore, il y a formation d'hypochlorite très réactif et toxique. L'intervention de l'EPO dans les mécanismes de toxicité a été démontrée vis-à-vis de cibles variées telles que les parasites, les bactéries, et des cibles tumorales (55-58).

-L'ECP

L'ECP se situe comme l'EPO dans la matrice des granules (38). Le poids moléculaire de cette protéine est variable (17 - 20 kD) et semble lié au degré de glycosylation. La forme principale a un poids moléculaire de 21 kD. Le pI de cette protéine est > 11 (59). Deux formes d'ECP (ECP1 : 18,3 kD et ECP2 : 21,4 kD) ont été caractérisées à l'aide de deux anticorps monoclonaux différents que sont l'EG1 et l'EG2. L'EG1 reconnaît la forme stockée et sécrétée, l'EG2 ne reconnaît que la forme sécrétée (60) Le séquençage des protéines ECP1 et ECP2 ont montré que les molécules étaient identiques et des expériences de déglycosylation ont indiqué que les sucres intervenaient dans la différence de poids moléculaire. Le séquençage a aussi révélé une homologie entre ECP, EDN et ribonucléase (61).

Le clonage de l'ECP a permis de confirmer ces homologies. L'ECP a été clonée à partir de cellules d'un patient ayant une "leucémie à éosinophiles" d'une part (62), et de cellules de sang de cordon, d'autre part (63). L'ADNc codant pour l'ECP contient un cadre ouvert de lecture de 160 acides aminés et l'ARNm reconnu mesure 1kb environ. Celui-ci n'est pas présent dans la lignée HL60 différenciée en éosinophile mais apparaît lorsque celle-ci est stimulée par l'IL-5. Aucun ARNm n'est détecté dans la lignée HL60 indifférenciée et différenciée en neutrophiles, ni dans les polynucléaires neutrophiles, ni dans les monocytes.

La composition de cette protéine lui confère son pouvoir toxique. Le mécanisme de toxicité de l'ECP a été attribué à la capacité de cette protéine à se lier à la membrane et

entraîner la formation de canaux voltage indépendant et non sélectif pour les ions (64). Cette protéine est cytotoxique pour certains parasites tels que *Schistosoma mansoni* (65). L'activité ribonucléasique de cette molécule n'a pas encore été très bien étudiée, mais soulève de nombreuses questions.

-L'EDN ou EPX

L'EDN et l'EPX, longtemps considérées comme deux molécules distinctes sont en fait une seule et même molécule (66). Il s'agit d'une protéine présente dans la matrice des granules et ayant un poids moléculaire de 18 kD (67). La microséquence de la protéine a révélé les homologues avec l'ECP et les ribonucléases (61).

Le clonage de cette molécule a été effectué à partir d'une banque d'ADNc de cellules de patients ayant une "leucémie à éosinophiles" (68). Il n'existe pas de différence de taille entre l'ARNm de l'ECP et celui de l'EDN. Les séquences sont homologues à 88 %. La régulation de l'expression des messagers par contre semble être différente. En effet, l'ARNm de l'EDN est détectable dans la lignée HL60 indifférenciée et différenciée en éosinophile contrairement à l'ECP. Le taux d'ARNm augmente lorsque ces dernières sont cultivées en présence d'IL-5. L'ARNm codant pour l'EDN se trouve également dans les neutrophiles et de façon controversée dans les monocytes.

C'est l'étude du phénomène de Gordon qui a permis la description de cette molécule. Gordon a constaté qu'un extrait d'homogénat de ganglion hodgkinien injecté dans les citernes ventriculaires d'animaux provoquait une encéphalite. Le rôle de l'éosinophile et surtout des granules spécifiques dans ce processus pathogène a ensuite été démontré. Durack et coll ont alors décrit l'existence d'une neurotoxine ou EDN (69). Depuis, l'homologie structurale avec les ribonucléases a ouvert un autre axe d'étude. L'EDN, à la concentration de $5,7 \times 10^{-10}$, est capable de dégrader de l'ARN de transfert (70). La relevance de cette activité n'a pas encore été étudiée *in vivo*.

TABLEAU II

PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES PROTEINES CATIONIQUES DE
L'EOSINOPHILE

	MBP	EPO	EDN/EPX	ECP
PM	13,8 kD	72 kD 2 sous-unités de 14 et 58 kD	18 kD	17-20 kD
pl	10,9	>11	>11	>11
QUANTITE	8 µg/10 ⁶ cell.	15µg/10 ⁶ cell.	10 µg/10 ⁶ cell.	>25 µg/10 ⁶ cell.
LOCALISATION	CORE	MATRICE	MATRICE	MATRICE
ARNm	1 kb	3,2-3,5 kb	1 kb	1 kb
GENE	<3 kb	12 kb	-	-
SPECIFICITE CELLULAIRE	HL60 indifférenciées éosinophiles basophiles	HL60 éosinophiles*	HL60 indifférenciées HL60 éosinophiles* HL60 neutrophiles* HL60 monocytes* éosinophiles neutrophiles	HL60 éosinophiles* cultivée en IL-5 éosinophiles
FONCTION	-toxique pour les parasites et les cellules de mammifères -neutralise l'héparine -induit la dégranulation des basophiles et des mastocytes	-activité peroxidasiq -toxique pour les microorganismes et les cellules tumorales -induit la dégranulation des mastocytes	-neurotoxine -activité ribonucléasique	-toxique pour les parasites -induit la libération d'histamine -activité ribonucléasique faible

* HL60 éosinophiles : lignée HL60 différenciée en éosinophiles par des agents chimiques

HL60 neutrophiles et monocytes : lignée HL60 différenciée soit en neutrophiles ou en monocytes

b) Les enzymes.

De nombreux enzymes lysosomiaux ont été décrits dans les éosinophiles. Parmi ceux-ci, des phosphatases acides qui se trouvent dans les petits granules sous forme inactive, des collagénases capables de dégrader les collagènes de type 1 et 3 ainsi que de l'arylsulfatase B (PM= 60 kD) jouant un rôle dans le catabolisme des protéoglycanes, et des glycosaminoglycanes. Les éosinophiles possèdent également de l'histaminase et de la phospholipase D. La catalase est également présente et joue un rôle dans les mécanismes de détoxification cellulaire. Elle catalyse la dismutation de l'hydroperoxyde.

Un autre élément typique, retrouvé dans le cytoplasme des éosinophiles, ou associé aux infiltrats tissulaires d'éosinophiles est le cristal de Charcot-Leyden (71). Ces cristaux hexagonaux bipyramidaux sont constitués de lysophospholipase polymérisée (PM = 17 kD) (72). C'est une protéine associée à la membrane, dont la polymérisation est à l'origine de la formation des cristaux. Des travaux récents réalisés en microscopie électronique laissent supposer qu'en l'absence de formation de cristal, les protéines constitutives sont plutôt dispersées dans le cytoplasme (G. Torpier; M. Capron, manuscrit en préparation).

La lysophospholipase protégerait la cellule contre les effets toxiques des phospholipides ainsi que d'autres métabolites toxiques tels que le Platelet Activating Factor ou PAF.

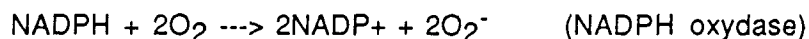
2- Les métabolismes.

a) le métabolisme oxydatif :

Exposés à certains stimuli (PMA, fMLP, interleukines...), les éosinophiles voient leur consommation d'oxygène augmenter. Ils commencent à produire de grandes quantités d'anions superoxydes et d'hydroperoxyde. On constate en même temps un accroissement de l'oxydation du glucose. Cette série d'évènements connue sous le nom de "Respiratory Burst" produit de l'énergie, mais entraîne également la génération de puissants agents cytotoxiques. Le

système oxydatif, situé dans la membrane, utilise des enzymes qui oxydent le NADPH et réduisent l'O₂, entraînant la production d'hydroperoxyde (H₂O₂) et d'anion superoxyde O₂⁻

(73) selon les réactions suivantes:



Le NADPH donneur d'électrons provient du shunt des hexoses monophosphates. La NADPH oxydase est un assemblage de plusieurs constituants dont le cytochrome b-245 et une flavoprotéine. L'O₂⁻ et l'H₂O₂ produits, sont des espèces oxygénées hautement réactives et toxiques car ils initient des réactions de peroxydation des lipides détruisant les structures membranaires. L'H₂O₂ est également le substrat de la peroxydase. En présence de Cl ou de Br, la réaction aboutit à la formation d'hypochlorite ou d'hypobromide très toxique.

Ce métabolisme est souvent lié à la voie énergétique du glucose.

b) le métabolisme de l'acide arachidonique :

Il fait intervenir des phospholipides membranaires, résultat de l'activité de la phospholipase A₂. L'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la cyclooxygénase et conduire à la formation de prostaglandine E₁ et E₂ (74). Il peut conduire aussi par la voie de la 5-lipooxygénase à la formation de leucotriènes (LTC₄, LTB₄, LTD₄) (75). Le LTC₄ est produit préférentiellement par les éosinophiles, contrairement aux neutrophiles qui produisent du LTB₄ (76).

D'autres substances peuvent être élaborées par les éosinophiles, en particulier le Platelet Activating Factor ou PAF ou 1-O-alkyl-2-acetyl-Sn-glycero-3-phosphocholine (77-78). Les Leucotriènes et le PAF jouent un rôle dans l'inflammation, la bronchoconstriction, l'activation cellulaire.

c) le métabolisme protéique :

Cet aspect a été très peu étudié. Des marquages métaboliques ont pu mettre en évidence la synthèse de protéine de PM 24, 46, 60 kD lors d'une stimulation par du zymosan opsonisé (79).

Les médiateurs et molécules précités ont très souvent été étudiés lors de l'activation cellulaire par divers stimuli tels que les immunoglobulines, les interleukines, les agents chimiotactiques etc.... Ces facteurs permettent la libération des médiateurs et des protéines cationiques en se fixant sur les récepteurs présents à la surface de l'éosinophile.

C-LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES ET CYTOSOLIQUES. ANTIGENES ET MOLECULES DE SURFACE.

1- Les récepteurs pour les Immunoglobulines

L'éosinophile possède un récepteur pour le fragment Fc de plusieurs isotypes d'immunoglobulines : pour les IgG (Fc γ R), pour les IgE (Fc ϵ R), pour les IgA (Fc α R).

La présence d'un récepteur pour le Fc des IgG a été suggérée par des techniques de rosettes (80, 81). L'isolement du récepteur par immunoprécipitation permet d'établir le poids moléculaire à 43 kD. Cette molécule est reconnue par un anticorps monoclonal (IV3) dirigé contre le Fc γ R $_{II}$ (CDW32) (82,83). Des études sur l'ontogénie du récepteur Fc γ montre que la différenciation myéloïde de la lignée HL60 entraîne une perte du récepteur de forte affinité Fc γ R $_I$ avec apparition sur les cellules matures du récepteur de faible affinité fixant l'anticorps (84).

L'affinité de ce récepteur pour différentes sous-classes d'IgG a été étudiée. Chez l'homme, l'éosinophile peut être stimulé par des particules recouvertes avec IgG1, IgG2, IgG3

et IgG4 séparément entraînant la production d'H₂O₂ (85). Chez le rat, la mise en évidence d'un récepteur pour l'IgG1, différent de celui commun à IgG2a et IgG2c a pu être démontrée (86).

La présence d'un Fc_εR, suggérée par Hubscher en 1975 (87), a été clairement établie par Capron et coll., par l'utilisation de techniques de rosettes et de fixation d'IgE radiomarquée (88). Les études fonctionnelles ont montré le rôle de ce récepteur dans un système de cytotoxicité cellulaire dépendante d'IgE vis-à-vis de cibles parasitaires (89,90). Ce récepteur de faible affinité a été dénommé Fc_εR_{II} pour le différencier du récepteur de forte affinité ou Fc_εR_I (91). Il possède une affinité pour l'IgE monomérique de l'ordre de 10⁷ M⁻¹ (90). La présence d'IgE cytophile a pu être détectée sur des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques par cytofluorométrie (92). Elle est en relation avec le taux d'IgE circulantes (93). Ce récepteur a été caractérisé par passage d'extraits cellulaires d'éosinophiles sur immunoabsorbant IgE (94). Il possède un composant de PM 45-50 kD et un composant de 23 kD. Des produits de clivage (15-18 kD) sont également observés dans certaines conditions (95). Un anticorps monoclonal (BB10) dirigé contre le Fc_εR_{II} des éosinophiles a pu être effectué à partir d'éosinophiles activés (96). L'étude des épitopes reconnus par BB10, ainsi que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur Ig E des lymphocytes B (CD 23), ont permis de démontrer certaines analogies entre le récepteur Ig E de l'éosinophile et le CD23 (97). L'utilisation d'un anticorps anti-fibronectine reconnaissant le térapeptide RGDS, présent dans de nombreuses protéines d'adhésion, a permis de montrer que cette séquence était contenue dans celle du récepteur Ig E de l'éosinophile (97).

C'est le récepteur pour le Fc des IgA qui a été le plus récemment identifié. 5 à 60 % des éosinophiles purifiés à partir de sujets hyperéosinophiliques sont capables de lier l'IgA monomère sérique en cytofluorométrie (98). Les études effectuées suggèrent une affinité plus forte du récepteur pour l'Ig A polymère.

2- Les récepteurs pour le complément

L'éosinophile possède des récepteurs capables de fixer certains composants du fragment C3 du complément. Tout d'abord, le CR1 (CD35), molécule de 200 kD qui fixe le C3b, ainsi que le CR3 (CD11b) qui fixe le C3b inactivé (C3bi) (81, 99, 100). Le CR3 est un récepteur constitué d'une chaîne α (185 kD) et d'une chaîne β (95 kD) liée de façon non covalente (101). La participation de la chaîne α du CR3 dans l'adhérence et la cytotoxicité IgE-dépendante vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* a été démontrée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-chaîne α tels que l'OKM1 (102). D'autres récepteurs ont été également identifiés à la surface des éosinophiles, en particulier les récepteurs pour les anaphylatoxines (C3a-C5a) ou pour la fraction C1q (103,104).

3- Les récepteurs pour les interleukines

De nombreux travaux décrivent l'effet des différentes interleukines sur les éosinophiles. IL-3, IL-5, IL-4, IL-1, GM-CSF, tumor necrosis factor et interféron sont capables d'induire ou d'inhiber certaines fonctions de l'éosinophile telles que la cytotoxicité, la chimioluminescence, le chimiotactisme ou la différenciation. Toutes ces activités suggèrent très fortement la présence de récepteurs appropriés sur ces cellules mais jusqu'alors aucun d'entre eux n'a été isolé sur l'éosinophile. Seules, des études de Scatchard avec des ligands marqués à l'iode 125 ont démontré un site de fixation de l'IL3 (k_D : 470 pM, 370 récepteurs/cellule) et du GM-CSF (k_D : 44 pM, 600-800 récepteurs/cellule). L'IL3 et le

GM-CSF semblent interagir entre eux. La liaison de l'IL3 à son récepteur est partiellement inhibée par le GM-CSF et inversement (105). Les études en Scatchard montrent également l'existence d'un site de liaison spécifique pour l'IL-5 (k_D : 510 pM à 25 pM, 450 récepteurs/cellules)(106).

4- Les récepteurs pour les stéroïdes

L'étude en Scatchard réalisée à l'aide de dexaméthasone tritiée a révélé un site de liaison sur les éosinophiles humains de l'ordre de $10.8 \pm 13 \times 10^3$ sites/cellule avec un k_D de $15,3 \pm 0,6$ nM. Le cortisol est capable de rentrer en compétition avec la dexaméthasone, contrairement à la progestérone, l'oestradiol, l'oestriol et la testostérone (107). Tchernitchin et coll. ont démontré l'existence de récepteurs pour les oestrogènes dans de nombreuses espèces dont l'homme. Ces travaux indiquent que les oestrogènes sont capables de faire dégranuler des éosinophiles et peuvent, chez les rongeurs, jouer un rôle dans l'oestrus (108,109). Récemment, un défaut d'expression du récepteur pour les glucocorticoïdes a pu être mis en évidence sur des éosinophiles de patients. L'absence de récepteur est corrélée à un état de corticorésistance relative de l'hyperéosinophilie (110).

5- Les antigènes et molécules de surface

L'éosinophile possède à sa surface les molécules décrites dans l'adhésion inter cellulaire telles que LFA-1 α (CD11a), CR3 α (CD11b), p150,95- α (CD11c) ainsi que la chaîne β de 95 kD associée et commune à ces trois molécules (83). Les éosinophiles n'expriment pas la molécule d'adhésion ICAM (83).

Un certain nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de neutrophiles, de lymphocytes et de plaquettes reconnaissent la surface des éosinophiles (32). Certains reconnaissent de façon préférentielle les éosinophiles activés et peuvent induire la

libération d'ECP (111). Les antigènes reconnus n'ont pas été caractérisés biochimiquement.

Le marqueur membranaire CD4 a été trouvé à la surface des éosinophiles par des études en cytofluorométrie et par immunoprécipitation de cette protéine de 55 kD à la surface de ces cellules (112). Des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité ont été détectés, par les mêmes auteurs, sur des éosinophiles de sujets hyperéosinophiliques. Le rôle de ces marqueurs à la surface des éosinophiles n'est pas encore établi (113).

Un schéma, illustrant les divers structures, antigènes et récepteurs de surface est présenté figure 2. Les études effectuées sur l'expression de ces récepteurs et molécules de surface, montrent que celle-ci varie selon les populations cellulaires d'éosinophiles testées et selon l'importance de l'éosinophilie. En effet, de nombreux auteurs ont, depuis longtemps, constaté l'existence d'altérations morphologiques et cytologiques affectant le cytoplasme (hypogranulation, vacuolisation...) mais également le noyau (plurilobé, arrondi...) des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques soulignant ainsi une hétérogénéité des éosinophiles.

III- HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DES EOSINOPHILES

Les techniques de purification des éosinophiles sur différents gradients de densité (percoll, métrizamide) ont conforté la notion d'hétérogénéité, en permettant la caractérisation de sous-populations d'éosinophiles. Différentes sous-populations ont pu être identifiées. Des éosinophiles activés de faible densité ou "hypodenses", sont distingués des éosinophiles "normodenses" recueillis dans les couches de densité plus élevée (114-118). Les éosinophiles normodenses sont présents chez les sujets témoins ou chez les sujets présentant une éosinophilie modérée. Les éosinophiles hypodenses sont retrouvés en grande quantité dans certaines situations cliniques soit dans le courant circulatoire, soit dans les tissus (éosinophiles alvéolaires), soit enfin dans les foyers inflammatoires (éosinophiles pleuraux).

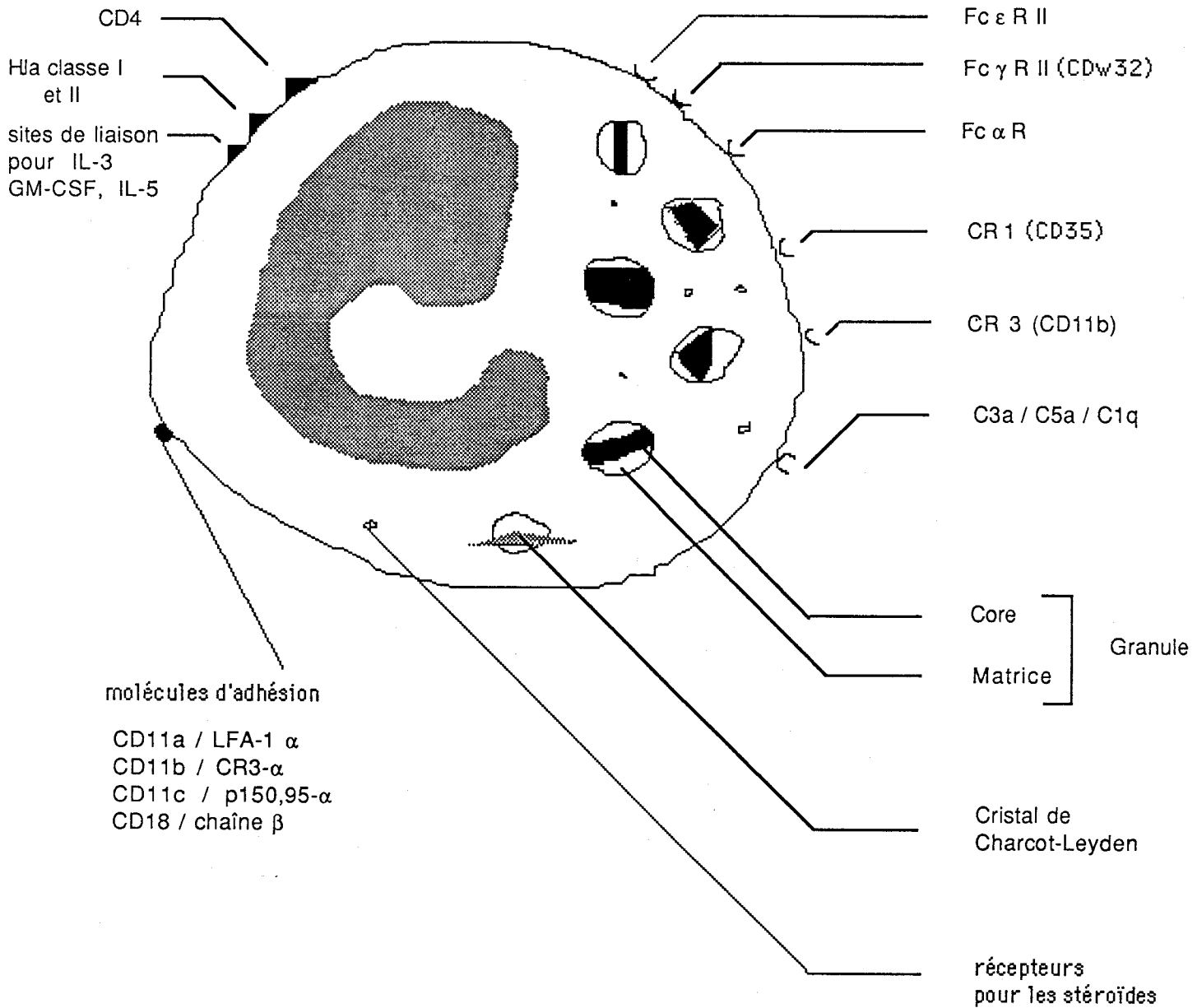


Figure 2 : Représentation schématique des composants spécifiques de l'éosinophile et des principaux récepteurs et antigènes de surface.

La majorité des éosinophiles hypodenses présente des altérations morphologiques où domine l'aspect d'hypogranulation cytoplasmique. Ces populations cellulaires ont alors été étudiées d'un point de vue fonctionnel (métabolisme oxydatif, cytotoxicité...). L'ensemble des études comparatives effectuées, indique qu'au critère de morphologie et de densité, s'associe une hétérogénéité fonctionnelle importante (tableau III).

A- LES METABOLISMES

Différents métabolismes (oxydatif, lipidique..) ont été étudiés chez ces sous-populations et des variations dans le niveau d'activation ont été observées.

Les premières études ont montré que la consommation en oxygène et en glucose était accrue dans les cellules de faible densité ou hypodenses (117,118). Par la suite, la méthode de chimioluminescence (CL) a été utilisée. Celle-ci apprécie le métabolisme oxydatif global de la cellule et reflète ainsi le niveau d'activation cellulaire. Ces travaux ont montré que la CL basale des éosinophiles hypodenses était significativement plus élevée que celle des éosinophiles normodenses. L'inverse est observé lors d'une activation PMA-dépendante (119).

Une étude concernant la production de leucotriènes a permis d'établir que les éosinophiles hypodenses produisaient une quantité plus importante de LTC₄ par rapport aux éosinophiles normodenses (120,121).

La production de PAF est également plus élevée dans les éosinophiles de faible densité après stimulation au calcium ionophore, le C5A, le fMLP (122).

Une hétérogénéité est également observée du point de vue métabolisme protéique. Certaines protéines apparaissent plus spécifiques des éosinophiles hypodenses (23 kD, 43 kD) et d'autres plus spécifiques d'éosinophiles moins activés (51kD) (123).

TABLEAU III

HETEROGENEITE DES EOSINOPHILES

	EOSINOPHILES NORMODENSES	EOSINOPHILES HYPODENSES
Consommation d'oxygène	+	++
Captation d'hexose membranaire	+	++
Chimioluminescence spontanée	+	++
Chimioluminescence après activation par le PMA	+++	+
Récepteurs pour les Ig G (CDw32)	++	++
Récepteurs pour les Ig E	-	++
CD11a / LFA-1	++	++
CD11b / CR3	+++	+++
CD11c / p 150,95	+	+
CD18 (chaîne β)	+++	++
CD35 / CR1	+	+
Cytotoxicité	Ig G dépendante	Ig E dépendante
Libération d'EPO (Ig E dépendante)	\pm	++
Libération de leucotriènes	+	++
Libération de PAF	+	++

B- LES FONCTIONS CYTOTOXIQUES.

La fonction cytotoxique de l'éosinophile a été étudiée grâce à des modèles de cytotoxicité *in vitro* dont le principal est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant d'anticorps ou ADCC. Celui-ci consiste à mettre des cellules effectrices (éosinophiles) avec des cellules cibles en présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la cellule cible. Butterworth et coll. démontrèrent les premiers que les éosinophiles étaient capables de tuer les larves de *Schistosoma mansoni* dans un système d'ADCC dépendant d'IgG (124,125). Dans ce modèle, le mécanisme aboutissant à la lyse de la cible parasitaire a pu être éclairci. Trois étapes peuvent être individualisées : une première étape d'adhérence très étroite avec la cible, faisant intervenir différents facteurs (anticorps, complément...), une deuxième étape de dégranulation, puis une dernière étape de lyse de la cible par l'intermédiaire des molécules effectrices (MBP) contenues dans les granules (43, 126, 127). De nombreuses études indiquent que le métabolisme oxydatif n'a pas un rôle capital dans ce mécanisme de cytotoxicité (128). Par la suite, la toxicité des éosinophiles a été démontrée vis-à-vis de nombreux autres parasites (129).

Le deuxième mécanisme d'ADCC décrit fut le mécanisme de cytotoxicité IgE-dépendant, étudié par Capron et coll. Le rôle de l'IgE dans les mécanismes d'ADCC fut d'abord mis en évidence chez le rat dans un système de cytotoxicité faisant intervenir les macrophages comme cellule effectrice en présence de sérum de rat immunisé contre *Schistosoma mansoni* (130). Ce mécanisme a ensuite été démontré avec les éosinophiles de rat (89), puis les éosinophiles humains. Le système d'ADCC IgE-dépendant chez l'homme a été effectué avec des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques en présence d'un sérum non chauffé de sujet infecté par *Schistosoma mansoni* (90). Le rôle de l'IgE fut suspecté par la labilité du facteur à la chaleur présent dans le sérum, par une analyse révélant une corrélation entre le pourcentage de cytotoxicité et la présence d'IgE spécifique, par une inhibition spécifique de la cytotoxicité avec de l'IgE agrégée (95). Ce mécanisme, contrairement à la cytotoxicité IgG-dépendante, est

restreint aux éosinophiles hypodenses. Ce phénomène semble être lié au nombre de récepteurs pour le Fc des IgE, plus important sur les éosinophiles hypodenses, par rapport aux éosinophiles normodenses (92). Ce mécanisme a été confirmé par une inhibition de la cytotoxicité par des anticorps monoclonaux dirigé contre le récepteur IgE (BB10, anti-CD23).

La participation d'anticorps de classe Ig A dans un mécanisme d'ADCC a été également étudiée. Cependant, aucune relation entre la densité des éosinophiles et la présence du récepteur pour l'Ig A à la surface de ces cellules n'a encore été établie .

A coté de ce mécanisme d'ADCC existe un mécanisme de cytotoxicité ne nécessitant pas la présence d'anticorps. Les cellules de mammifères ainsi que certains tissus peuvent être la cible des éosinophiles. Le mécanisme évoqué dans cette lyse fait intervenir directement les protéines cationiques et le système oxydatif des éosinophiles. L'éosinophile peut être lytique vis-à-vis de cibles aussi diverses que le cellules épithéliales, endothéliales, épidermiques, intestinales, tumorales... (46,47,131,132).

C- LIBERATION DE MEDIEATEURS.

L'importance des protéines cationiques dans l'éosinotoxicité a été démontrée dans de nombreux laboratoires. De nombreux activateurs conduisent à la libération de médiateurs, mais très peu de données sont connues en ce qui concerne les mécanismes responsables de cette exocytose.

Les premières études ont permis de démontrer que la stimulation IgE-dépendante des éosinophiles hypodenses entraînait l'exocytose d'EPO mesurée par activité enzymatique, mais pas la sécrétion d'ECP, alors que l'activation dépendante d'IgG n'avait aucun effet dans ce système. Inversement, une stimulation IgG-dépendante provoque la sécrétion d'ECP (133). La sécrétion d'EPO est également obtenue lors d'une stimulation spécifique d'antigène, corrélée à une stimulation IgE-dépendante des éosinophiles de patients allergiques (134).

Ces expériences mettent en évidence la notion de sélectivité dans la libération de ces

protéines cationiques. Il est intéressant, dans ce contexte, de signaler que l'activation Ig A dépendante induit à la fois la libération d'EPO (98) mais aussi d'EDN (135). Cette notion de sélectivité est confortée par des données immuno-histopathologiques. Il a été possible grâce à une technique d'immunodétection utilisant des anticorps spécifiques des différentes protéines cationiques, de visualiser la libération de ces médiateurs, *in situ*, sur coupe de tissus. La diffusion intracytoplasmique de la MBP associée à une destruction du cristalloïde, alors que l'EPO et l'ECP étaient toujours détectées dans la matrice des granules a pu être révélée dans les éosinophiles de la muqueuse duodénale d'un sujet atteint de gastroentérite à éosinophiles (136).

La génération de médiateurs néoformés est également observée. La stimulation des éosinophiles par des IgG couplées à des billes de sépharose entraîne la libération de LTC₄ (137). Des expériences ont également montré un relargage préférentiel des médiateurs néoformés tels que le PAF et le LTC₄ lors d'une stimulation par l'IgE des éosinophiles hypodenses, alors que les éosinophiles normodenses répondent à une activité Ig G dépendante (95). Récemment, la production de LTC₄ a pu être mesurée dans des surnageants d'éosinophiles mis en contact avec des schistosomules en présence d' Ig E spécifique dirigée contre *Schistosoma mansoni*. Cette libération de LTC₄ lors d'une stimulation Ig E n'est observée qu'avec les éosinophiles hypodenses tandis que la stimulation IgG entraîne la production de LTC₄ chez tous les éosinophiles (138).

D- LE CHIMIOTACTISME

L'effet chimiotactique d'un facteur présent dans le sérum de sujets hyperéosinophiliques, testé sur des éosinophiles de densités différentes, montre que les éosinophiles normodenses possèdent un niveau de chimiotactisme spontané plus faible que les éosinophiles hypodenses (139). Il existe un processus d'activation-déactivation de la cellule qui une fois stimulée et recrutée au site inflammatoire, n'est plus sensible à l'action des

facteurs chimiotactiques vis à vis desquels elle a déjà été sensibilisée. Ce phénomène est détaillé dans le cas du chimiotactisme du facteur sérique. Les éosinophiles sont sensibles à l'action de nombreux facteurs chimiotactiques : Eosinophil-Chemotactic Factor of Anaphylaxis (mastocyte) (140), PAF, leucotriènes, cytokines, facteur sérique, le fMLP....

Cette fonction paraît essentielle dans le recrutement des cellules au sein d'un tissu et précède toute activation cellulaire.

E- FACTEURS INTERVENANT DANS L'ACTIVATION DE L'EOSINOPHILE.

L'hétérogénéité des éosinophiles peut s'expliquer à la fois par des différences de maturation (les éosinophiles hypodenses sanguins ou tissulaires seraient plus matures que les éosinophiles normodenses) ou d'activation (les éosinophiles de faible densité auraient déjà été soumis *in vivo* à l'influence de facteurs d'activation). De nombreuses équipes essaient de déterminer les mécanismes pouvant les activer et conduire à la libération de leurs médiateurs.

L'éosinophile peut être la cible de nombreux activateurs parmi lesquels le PMA, le calcium ionophore, le fMLP, le PAF, les leucotriènes, les produits de clivage du complément activé et les facteurs cellulaires comme les cytokines.

Parmi ces facteurs cellulaires, on peut distinguer les facteurs peu caractérisés biochimiquement non clonés, et les interleukines clonées et bien répertoriées.

Dans la première catégorie, il existe :

- les facteurs sériques avec, par exemple, l'activité chimiotactique mise en évidence dans le sérum de patients atteints d'HES (139) ou de fasciite à éosinophiles (141).

- les facteurs issus de tumeurs (142,143).

- un facteur isolé à partir de macrophages alvéolaires de patients asthmatiques (144).

- les facteurs issus de cellules endothéliales qui prolongent la survie des éosinophiles (145) .

- les facteurs monocytaires mieux caractérisés sur le plan biochimique comme le M-ECEF, composé de plusieurs molécules dont le TNF ou tumor necrosis factor (146) et l'EAF. L'EAF est un facteur monocytaire de PM 37 kD, pI 4.4 capable de potentialiser la cytotoxicité de l'éosinophile, l'expression de récepteur de surface, d'augmenter la dégranulation ainsi que la production de leucotriène et de la chimioluminescence (147).

- Enfin, HILDA, glycoprotéine de 41 kD purifiée à partir de clones lymphocytaires T provenant de rejet de greffe de rein et nommée ainsi pour son activité sur la lignée de souris DA2 (Human Interleukin DA). HILDA augmente le chimiotactisme *in vivo* des éosinophiles murins et active la chimioluminescence des éosinophiles humains (148).

Dans la catégorie des facteurs clonés et bien répertoriés, les cytokines suivantes ont une activité :

- l'IL-1 module la chimioluminescence et la dégranulation des éosinophiles lorsque ceux-ci sont préstimulés soit par le PMA, soit par le calcium ionophore (149).

- l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont capables de stimuler la cytotoxicité des éosinophiles, la production d'anion superoxyde, ainsi que la dégranulation des éosinophiles, mesurée par libération de l'EDN, en présence d'IgG et IgA (19, 146, 150-152). Ces interleukines induisent également une élévation du taux de la synthèse des protéoglycanes par augmentation de leur taille (153). Elles ont toutes les trois une activité CSF pour les éosinophiles et récemment une prolongation dans la survie des éosinophiles a pu être obtenue en présence de celles-ci. Dans ce contexte, elles peuvent induire la transformation d'éosinophiles normodenses en éosinophiles hypodenses ayant les marqueurs de cellules activées. Après 7 ou 14 jours de culture, les éosinophiles deviennent plus cytotoxiques, produisent plus de LTC₄ et leur densité diminue lorsqu'ils sont repassés sur gradient (154-156).

- l'IFN α potentialise la production de leucotriènes en réponse au zymosan opsonisé par le C3b (157). L'IFN γ inhibe la dégranulation de l'EDN induite par IgA-sécrétoire (152)

- le TNF est un facteur capable de stimuler la cytotoxicité des éosinophiles. Ces

caractéristiques physicochimiques ont permis d'établir qu'il pouvait être le constituant majeur du M-ECF (158).

L'ensemble de ces facteurs (récepteurs de membrane, médiateurs préformés ou néoformés) participe à la dualité fonctionnelle de l'éosinophile : fonction bénéfique (antiparasitaire, antitumorale) et fonction néfaste (proinflammatoire).

IV- ROLE DES EOSINOPHILES ACTIVES EN PATHOLOGIE HUMAINE

Tout d'abord considéré comme une cellule "immunomodulatrice" limitant les effets liés au développement de certaines réactions d'hypersensibilité, l'éosinophile est maintenant surtout considéré pour sa fonction de cellule effectrice à potentialité cytotoxique.

A- EOSINOPHILE. CELLULE REGULATRICE DES REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE

Son rôle de cellule "immunomodulatrice" a été lié à sa capacité de phagocytose des granules mastocytaires et de neutralisation des médiateurs anaphylactiques (159). Mais ces travaux effectués *in vitro* n'ont jamais trouvé de relevance réelle *in vivo* (160). Ainsi, l'arylsulfatase de l'éosinophile, une fois purifiée, n'exerce pas l'activité inhibitrice, précédemment décrite sur le SRS-A.

A la notion initiale de limitation des réactions d'hypersensibilité immédiate (HSI) se substitue peu à peu la notion inverse d'amplification de l'HSI par l'éosinophile. Certains de ces composants facilitent en effet l'histaminolibération des mastocytes et des basophiles (MBP, ECP, EPO), augmentent le processus inflammatoire (LTC₄, PAF...) ou interviennent sur l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme allergique (129).

La mise en évidence d'un récepteur pour l'Ig E, notamment au niveau des éosinophiles tissulaires, suivie de la démonstration qu'une activation Ig E dépendante induit la libération

sélective de médiateurs tels que l'EPO, la MBP ou le PAF, a permis de conférer à l'éosinophile un rôle majeur dans les réactions d'hypersensibilité Ig E dépendante (95).

B- EOSINOPHILE, CELLULE EFFECTRICE

C'est à la suite des travaux de Butterworth qu'a été caractérisée, dans un modèle parasitaire, la fonction effectrice de l'éosinophile (124). Le polynucléaire éosinophile est en effet capable de lyser des larves de parasites selon un mécanisme d'ADCC Ig G et Ig E dépendant. Après avoir isolé la MBP et défini son rôle toxique sur les parasites, Gleich et coll. ont montré que cette activité cytolytique pouvait être élargie à de très nombreuses cibles cellulaires(129). Les autres protéines cationiques présentent aussi cette propriété toxique *in vitro* (toxicité de l'EPO vis-à-vis de cellules du parenchyme pulmonaire ; activité neurotoxique de l'EDN/EPX). Ces aspects offrent un champ d'investigation nouveau sur le rôle de l'éosinophile en pathologie humaine.

C- RELATION AVEC LA PATHOLOGIE

C'est Gordon qui a le premier établi la relation éosinophile-encéphalite. Puis, Seiler et coll., en 1969, ont démontré le rôle des granules dans les processus lésionnels qui touchent le système nerveux (161). Une relation entre éosinophilie et bronchopneumopathie a été mise en évidence dans l'asthme bronchique par Gleich (162). Prin et coll. ont, de leur côté, trouvé des éosinophiles activés dans le lavage bronchoalvéolaire de patients ayant une pneumopathie à éosinophiles (163). Dans le cadre des cardiomyopathies, Spry et coll. démontrent l'intervention cytotoxique directe de l'éosinophile vis-à-vis des tissus cardiaques (164). Enfin, on constate dans le cas du Syndrome hyperéosinophilique, qu'associées à une éosinophilie élevée et durable, se développent à long terme des atteintes viscérales variées (coeur, poumon, vaisseaux...).

La présence d'éosinophiles est décrite et associée à de multiples situations pathologiques qui recouvrent les maladies parasitaires, bactériennes, virales, les cancers, les maladies du système digestif, respiratoire, musculaire, cardiovasculaire (32). Celle-ci, longtemps considérée comme une réaction secondaire passive, apparaît maintenant comme un processus actif pouvant rendre compte de certaines lésions dans diverses pathologies.

Dans cette perspective, une définition encore plus précise des marqueurs d'activation cellulaires et moléculaires se révèle intéressante pour examiner les mécanismes et les molécules intervenant dans la transformation de l'éosinophile en cellule effectrice cytotoxique.

MATERIEL ET METHODES

I- LES CELLULES

A- PURIFICATION DES EOSINOPHILES

L'isolement et la purification des éosinophiles s'effectue selon la méthode décrite par Vadas (114). Un prélèvement de sang veineux périphérique est recueilli sur 0,25 ml de calciparine. Un volume de dextran à 3 % (Sigma St Louis, USA) est ajouté à 5 volumes de sang pour permettre la sédimentation des hématies. Le plasma contenant les leucocytes est ensuite prélevé et centrifugé à 500 g pendant 8 minutes. Un choc osmotique est effectué sur le culot cellulaire à l'aide d'une solution de NaCl 0,2 % pendant 20 secondes. L'osmolarité est ensuite restaurée par une solution de NaCl 1,6 %. Les cellules sont resuspendues à 5×10^7 /ml dans du gel de Tyrode et déposées sur gradients discontinus de métrizamide (Nyegaard Co., Oslo, Norvège). Après centrifugation à 1200 x g pendant 45 min à 15°C, les différentes populations cellulaires séparées selon leur densité sont récupérées, lavées 3 fois, et reprises dans de l'HBSS (Gibco, Paisley, Ecosse). Le degré de pureté et la morphologie des cellules sont déterminés par cyto-centrifugation des cellules de chaque couche et coloration des lames par Giemsa (RAL 555, Société Chimique Pointet Girard, Clichy, France). Les gradients de métrizamide sont effectués comme suit : 2 ml de solution de métrizamide de densité 1,140 ; 1,135 ; 1,130 ; 1,25 ; 1,115 ; 1,105 g/l correspondant à 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 20 %, 18 % de métrizamide sont déposés lentement en couches discontinues en commençant par la plus dense. Les cellules récupérées sont répertoriées en couches :

couche I :	Interface Tyrode 18 %
couche II :	interface 18 à 20 %
couche III :	interface 20 à 22 %
couche IV :	interface 22 à 23 %
couche V :	interface 23 à 24 %
couche VI :	interface 24 à 25 %

Les éosinophiles sont appelés "hypodenses" dans les couches de faible densité correspondant aux couches II et III, intermédiaires dans la couche IV et "normodenses" dans les

couches V et VI. La viabilité des cellules, effectuée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan est supérieure à 85 %. Les expériences ont été réalisées sur des éosinophiles provenant de différents patients. Pour des raisons pratiques, nous avons numéroté les éosinophiles utilisés dans les différentes expériences (chimiluminescence, chimiotactisme, libération de peroxydase et marquage métabolique) de 1 à 16 sans tenir compte de l'origine (patient) des éosinophiles.

B- PURIFICATION DES NEUTROPHILES

Les polynucléaires neutrophiles sont préparés selon la technique décrite par Böyum (165). Les prélèvements de sang veineux sont effectués en présence de calciparine (20 unités calciparine/ml de sang). Le sang (40 ml) dilué au 1/2 en PBS est déposé sur un coussin de 12 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia, Suède) et centrifugé à 400 x g pendant 30 minutes à 18°C. Après centrifugation, le culot contenant les hématies et les granulocytes est dilué dans du plasma (recueilli dans la partie supérieure du tube) et dans du dextran 3% (1 volume de culot cellulaire + 1 volume de plasma + 2 volumes de dextran). Les hématies sédimentent au fond du tube et le surnageant contenant les cellules polynucléées est recueilli après 20 minutes. Les hématies restantes sont éliminées par deux chocs hypotoniques. Les cellules sont ensuite lavées par deux centrifugations successives et resuspendues en HBSS.

C- CULTURE ET DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE EOL-3

La lignée éosinophile EoL-3, établie par Saito à partir des cellules d'un patient ayant une "leucémie à éosinophiles", est cultivée en RPMI (10 % sérum de veau foetal). Dans cette étude, les cellules négatives pour le CD23, CD25 et CD4 sont cultivées à 3×10^5 /ml. La différenciation de la lignée EoL-3 est obtenue par addition d'IL-3r, IL-5r et GM-CSFr selon le protocole suivant :

Pendant les 6 premiers jours, de l'IL-3r est additionnée à la culture à la concentration finale de 2×10^{-10} M. Le milieu est ensuite renouvelé par du milieu contenant de l'IL-3 et du GM-CSF (5×10^{-10} M) pendant les 6 jours suivants. Enfin, l'IL-5 (2×10^{-10} M) est ajouté, en plus de l'IL-3 et du GM-CSF, lors du renouvellement du milieu

pendant les 6 ou 12 derniers jours de culture.

D- CULTURE DE CELLULES DE SANG DE CORDON

Les cellules sont obtenues à partir de 20 ml de sang de cordon ombilical recueilli sur 0,1 ml d'héparine de Ca (Choay, Paris). Le sang est déposé sur un gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia, New-Jersey) à raison de 12 ml de Ficoll pour 40 ml de sang dilué au 1/2 dans du PBS. Après centrifugation à 400 g pendant 30 minutes à 15°C, les cellules mononucléées sont récupérées à l'interface Ficoll/sang. Après un choc osmotique, les cellules sont lavées deux fois par centrifugations successives, puis mises en culture à raison de 2×10^6 cellules/ml. La différenciation en éosinophiles est obtenue par les interleukines recombinantes IL-3 (2×10^{-10} M), GM-CSF (2×10^{-10} M) et IL-5 (2×10^{-10} M) ajoutées ensemble au premier jour de la mise en culture.

II- TESTS BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELS

A- COLORATION SPECIFIQUE DE LA PEROXYDASE

Cette méthode est basée sur la résistance de l'activité enzymatique de la peroxydase de l'éosinophile (EPO) en présence de cyanure (166). La myéloperoxidase du neutrophile n'est pas détectable dans cette technique puisque son activité est sensible au cyanure. Après cyto-centrifugation (1×10^5 cellules), les lames sont fixées pendant 30 secondes dans une solution constituée de 20 mg de Na_2HPO_4 , 100 mg de KH_2PO_4 , 30 ml d' H_2O , 45 ml d'acétone et 25 ml de formaldéhyde pH 6.6. La peroxydase est révélée par incubation des lames pendant 10 minutes dans 100 ml de PBS pH 7,5 contenant 75 mg de 3'3' diaminobenzidine tétrachloride, 39,2 mg de NaCN et 30 μl d' H_2O_2 . Puis les cellules sont colorées par une solution d'hématoxyline pendant 1 minute. Entre chaque étape, les lames sont rincées à l'eau et séchées à l'air.

B- ACTIVITE CYTOTOXIQUE

La méthode utilisée évalue la cytotoxicité Ig E-dépendante. Ce test est effectué selon le protocole décrit par Capron et coll (90). En bref, 50 schistosomules, fraîchement préparés par pénétration de cercaires de *Schistosoma mansoni* à travers un fragment de peau de souris, sont incubés en MEM en présence de sérum riche en Ig E et de 3×10^5 éosinophiles. HILDA est ensuite ajoutée dans les puits dans des conditions suboptimales afin de pouvoir détecter une stimulation de la cytotoxicité. Le volume final est de 200 μ l. Le pourcentage de cytotoxicité est évalué au microscope optique au bout de 24-48 heures d'incubation dans une étuve à 37° C contenant 5 % de CO₂. Les expériences sont effectuées en duplicate et les résultats présentés en moyenne de pourcentage de cytotoxicité \pm SEM.

C- TEST DE CHIMIO-LUMINESCENCE

La méthode utilisée est celle préalablement décrite par Descamps-Latscha (167). Elle apprécie le métabolisme oxydatif de la cellule. 100 μ l d'éosinophiles à $1,5 \times 10^6$ / ml en HBSS sont placés dans un tube de comptage, ainsi que 50 μ l de luminol (5-amino-2,3 dihydro 1,4 phtalazinedione, SIGMA, St Louis, USA) dilué au 1/10e en HBSS à partir d'une solution mère à 2 mg/ml en diméthyl sulfoxyde (Merck - Darmstadt). A la suspension cellulaire sont ajoutés 50 μ l d'HILDA à différentes concentrations ou 50 μ l d'HBSS. Les tubes sont placés dans un bain-marie sec à 37°C puis introduits dans un chimioluminomètre (Nucléotimètre 107, Interbio CLV, Paris). La lecture est faite au bout de 15 minutes, ou 30, 45, 60 minutes selon les cas, en intégration sur 30 secondes. L'émission de lumière est exprimée en unités de chimioluminescence (100 unités de CL = 1 mV).

D- TEST DE CHIMIOTACTISME

Ce test se fait dans une chambre de chimiotactisme (Neuro Probe, Cabinjohn, Md, USA) dans laquelle la partie supérieure contient les éosinophiles ou neutrophiles à 1×10^6 /ml et la chambre inférieure, le stimulus. Les deux compartiments sont séparés par un filtre de 5 μ m pour les éosinophiles et 3 μ m pour les neutrophiles (Nucléopore, Co

Pleasanton, USA). L'agent activateur est soit HILDA (10 à 200 U/ml), le fMLP (10^{-6} M) ou le PAF (10^{-6} M). La migration est effectuée pendant 2 heures pour les éosinophiles et 1 heure pour les neutrophiles à 37° C, en atmosphère humide + 5% CO₂. Le dispositif est ensuite démonté puis le filtre est fixé et coloré au RAL (RAL 555, société chimique Pointet Girard, Clichy, France). Le nombre de cellules est ensuite compté au microscope. Quatre champs sont numérotés pour chaque puits et les expériences sont effectuées en quadruplicate.

E- DOSAGE DE L'EPO PAR CHIMIO-LUMINESCENCE

La libération d'EPO est mesurée par chimioluminescence dans les surnageants d'éosinophiles selon la méthode décrite par Khalife et coll. (86). Les cellules à la concentration de 6×10^6 / ml sont incubées en HBSS à 37 ° C pendant 1h30 en présence d'HILDA. Le test s'effectue sur 50 µl de surnageant, transférés dans un tube de chimioluminomètre contenant 50 µl d'H₂O₂ (1,35 mM). Puis 50 µl de D luciférine (160 µM en tris-HCl 0,01 M pH 6; Boehringer) et 50 µl de luminol (250 µg/ml en tris-HCl pH 6; Serva, Heidelberg) sont ajoutés avant introduction des tubes dans le chimioluminomètre. Les résultats sont exprimés en unités de CL. L'EPO n'est pas dosée immédiatement afin d'éviter toute interférence avec le singulet de l'oxygène qui possède une courte durée de vie.

E- CYTOFLUORIMETRIE

100 µl de suspension cellulaire à 5×10^6 cellules/ml en HBSS sont incubés 30 min. à 4°C en présence du premier anticorps. Les anticorps monoclonaux sont utilisés à la concentration finale de 5 µg/ml (anti-CD23, anti-CD4 et anti CD-71), 2 µg/ml (anti-CD25), 20 µg/ml (anti-CR3). Après 3 lavages en HBSS, l'anti-Ig G de souris (Tago Inc., Burlingame, Ca) est ajouté pendant 30 min. à 4°C. Une analyse de la fluorescence est effectuée après 2 lavages en HBSS par passage des cellules au cytofluorimètre (Ortho Diagnostic System Inc. Raritan, NJ).

III- ANALYSE DES PROTEINES

A- PREPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES

Les éosinophiles sont ou non incubés en RPMI à 37°C pendant 16 h avant la lyse. Les cellules (20×10^7 /ml) sont lysées dans un tampon en présence de détergent non ionique (0,5 % NP40, tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0,14 M). Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les noyaux et la membrane résiduelle sont éliminés par centrifugation à 10.000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant contenant les protéines cytosoliques et membranaires est alors récupéré. Les extraits de lignées cellulaires ou de neutrophiles sont effectués dans les mêmes conditions.

B- DOSAGE DES PROTEINES

La technique du Biorad (168) est employée pour le dosage des protéines. L'albumine sérique humaine est utilisée comme gamme-étalon.

C- DETECTION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DANS LES EXTRAITS CELLULAIRES

Cette activité est détectée à l'aide d'un substrat spécifique de la peroxydase qui est le chloronaphtol. Les extraits sont déposés sur la nitrocellulose (Schleicher et Schull 0,45 µm) sous forme de goutte. La révélation se fait par incubation des filtres de nitrocellulose dans le tampon suivant : 60 ng de chloronaphtol, 20 ml de méthanol froid, 80 ml de PBS, 1 % d'H₂O₂. La présence de peroxydase donne immédiatement une couleur bleue à la nitrocellulose proportionnelle à la quantité de peroxydase contenue dans l'extrait (123).

D- PRECIPITATION DES PROTEINES

Une hydrolyse alcaline en présence d'H₂O₂ est d'abord effectuée sur le prélèvement. Pour cela, les protéines sont diluées dans 500 µl d'H₂O auxquels sont ajoutés 280 µl d'une solution NaOH 1M contenant 0,68% d'H₂O₂. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, le mélange est précipité par 1 ml de TCA 25 % froid puis filtré sur fibre de verre. Les filtres sont rincés par une solution de TCA 8 % puis par de l'eau, et mis à compter (compteur LKB WALLACE).

E- MARQUAGE METABOLIQUE

Les éosinophiles (2×10^6 /ml) sont mis en culture pendant 16 heures à 37° C dans un milieu ne contenant pas de méthionine (Gibco) auquel on rajoute la méthionine ³⁵S (4,77 TBq/m mole Amersham, U.K.) comme traceur radioactif (18,5 MBq / 20×10^6 cellules). Après culture, les cellules sont centrifugées et un extrait NP40 est effectué sur le culot cellulaire. Une précipitation au TCA est effectuée sur un aliquot de l'extrait cellulaire, mais également sur les surnageants pour déterminer le nombre de cpm.

F- ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE ET BIDIMENSIONNELLE

L'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE est effectuée selon la méthode décrite par Laemmli (169). Les protéines sont tout d'abord concentrées dans un gel polyacrylamide à 5 % pH 6,8 puis fractionnées sur un gel réticulé de manière homogène à 13 % pH 8,8.

L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée dans les conditions décrites par Garrels (170). L'isoélectrofocalisation ou IEF et la NEPHGE sont utilisées. Au cours de la première dimension, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans un gel d'acrylamide-urée dans lequel un gradient a ou non été préformé (IEF ou NEPHGE). L'IEF est réalisée dans les conditions classiques pour la première dimension, et la NEPHGE

s'effectue à 500 V pendant 180 minutes. Dans les deux cas (IEF ou NEPHGE), une électrophorèse en gel 13 % SDS-PAGE est réalisée dans la seconde dimension afin de séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

G- COLORATION DES GELS

Les protéines sont colorées, soit par la méthode au bleu de Coomassie, soit par la méthode au nitrate d'argent dont le degré de sensibilité est plus élevé.

La coloration au Coomassie s'effectue par incubation des gels dans une solution contenant 0,85 g pour 1000 de bleu Brillant de Coomassie, 50 % de méthanol et 10 % d'acide acétique. Une heure après, les gels sont mis à décolorer toute la nuit dans une solution contenant 20 % de méthanol et 8 % d'acide acétique.

Les gels sont colorés par le nitrate d'argent après fixation à la glutaraldéhyde et réduction par le dithiothréitol selon la méthode décrite par Morrissey (171).

H- WESTERN BLOT

La technique de Western blot décrite par Towbin est utilisée pour transférer les protéines sur filtre de nitrocellulose (172). La feuille de nitrocellulose est préalablement trempée dans le tampon de transfert : Tris 20 mM, glycine 150 mM, méthanol 20 %. Le gel SDS-PAGE effectué auparavant est mis en contact avec cette feuille. L'ensemble est placé en "sandwich" entre deux feuilles de papier whatman n°3 équilibrées dans le tampon de transfert. L'électrotransfert est réalisé à 200 mA durant 2 heures à 4°C.

Après transfert, la membrane est lavée 2 fois pendant 15 minutes à température ambiante dans du tampon PBS-Tween 0,03 %. La feuille est alors saturée pendant 30 minutes sous agitation dans du PBS contenant 5 % de lait en poudre écrémé. Le sérum à tester est ajouté à la dilution adéquate. L'incubation s'effectue 2 heures à température ambiante sous agitation. Les membranes sont lavées trois fois en PBS-Tween, puis incubées avec un anticorps anti-Ig de rat ou un anti-Ig de lapin conjugué à la peroxydase. Les complexes

immuns ainsi constitués sont révélés par incubation subséquente, après trois lavages, avec le substrat de la peroxydase. Le substrat utilisé est le 4-chloro-1-naphtol (60 mg/100 ml de PBS) en présence d' H_2O_2 (60 μ l/100 ml de PBS). La révélation dure environ 20 minutes.

IV- ANALYSE DES ARNm

A- EXTRACTION DES ARN TOTAUX

Les cellules sont lysées dans un tampon contenant 4M de guanidine thiocyanate, 1 mM EDTA pH 7,4, 5 mM d'acétate de Na, 0,7 M de β -mercaptoéthanol et 6,8 mM de N-Lauroyl-sarcosine. Après passage à travers une aiguille pour casser les molécules d'ADN, l'homogénat est déposé sur 2,5 ml de chlorure de césium (5,1 M CsCl, 25 mM NaOAc pH 5). Les tubes sont ultracentrifugés à 28 000 t pendant 20 h à 20°C (Beckman, L8-70M Rotor SW41Ti). Le culot d'ARN translucide est alors dissout dans de l'eau. L'ARN est précipité en présence de 1/10 V de NaOAc 3M pH 5 et de 2,5 V d'éthanol. La concentration en acides nucléiques est mesurée en UV à la DO de 260 nm. Le matériel et les solutions (sauf la solution de guanidium) sont autoclavés à 180°C pendant 2 heures afin d'éliminer la présence éventuelle de ribonucléases.

B- TRADUCTION IN VITRO

21 μ l de réticulocytes de lapin (Proméga, Madison, USA) sont mis en présence de 3,7 μ l de méthionine ^{35}S (3,5 MBq/ml) (4,77 TBq/mme, Amersham, UK.), 1,5 μ l d'une solution d'acides aminés à 1 mM sans méthionine (Proméga, Madison, USA) et de 4 μ l d'une solution d'ARN à 2 μ g/ μ l. Le mélange est incubé pendant 1h30 à 30°C. Un aliquot est ensuite prélevé pour effectuer une précipitation au TCA permettant le comptage de méthionine ^{35}S incorporée.

C-NORTHERN BLOT

La technique utilisée est celle décrite par Lehrach et coll. (173). Les ARN sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 2 minutes, en présence de 20 µl de tampon d'électrophorèse (0,72 ml formamide désionisée, 0,16 ml de tampon MOPS x 10, 0,26 ml formaldéhyde à 37 %, 0,18 ml H₂O, 0,1 ml glycérol à 80 % et 0,08 ml d'une solution saturée de bleue de bromophénol).

Les ARN (10 µg/point) sont séparés sur gel d'agarose 1,2 % en présence de 18 % de formaldéhyde à 37 %. Le gel et la migration se font en tampon MOPS [0,02 M MOPS (3-[N-morpholine] propane sulfonic acid), 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA]. L'électrophorèse terminée, le gel est rincé dans du SSC x 20 et l'ARN est transféré sur nitrocellulose pendant la nuit selon la méthode de Southern (174). Ce transfert est réalisé en tampon SSC x 10 (SSC x 20 = NaCl 3 M, Citrate de trisodium 0,3 M). Le filtre de nitrocellulose est porté à 80°C pendant 2 heures afin de fixer irréversiblement l'ARN sur le filtre. Celui-ci peut être alors ainsi conservé jusqu'à l'hybridation.

D- HYBRIDATION

Les filtres de nitrocellulose sont préhybridés pendant 2 heures à 42°C dans un tampon contenant 40 % de formamide désionisée, 10 % de sulfate de dextran, SSC x 4, 20 mM Tris pH 7,4; 2 µg/ml de DNA de sperme de hareng et 1 % de solution de denhardt x 100 (2 % BSA, 2 % Ficoll, 2 % polyvinylpyrididone). Après dénaturation pendant 5 minutes à 100°C, puis passage sur la glace, la sonde marquée au ³²P est additionnée à la solution d'hybridation contenant les filtres. L'incubation est effectuée pendant la nuit, à 42°C.

Les lavages des filtres sont effectués en SSC et 0,05 % SDS. Les conditions de stringence sont variables selon les sondes utilisées, et selon leur degré d'homologie avec le messager recherché. On peut ainsi faire varier la concentration en SSC de 2 à 0,1 x SSC et la température de 42°C à 65°C. Après lavages, les filtres sont mis en autoradiographie.

Ces mêmes filtres peuvent être déshybridés en les incubant dans une solution

contenant 50 % de formamide, 0,1 % SDS et 20 mM de tampon phosphate pH 6,8 pendant 2 heures à 80°C et être ainsi réutilisés avec d'autres sondes.

E- MARQUAGE DES SONDÉS

Pour les sondes d'ADNc, la technique de marquage selon la méthode de "random priming" est utilisée (175). 30 ng d'ADN et 1,85 MBq dCTP ^{32}P (111 TBq/mme, Amersham, U.K.) suffisent pour un marquage de 2 à 5 heures à température ambiante en présence de fragment Klenow de l'ADN polymérase I.

Pour les oligonucléotides, le marquage se fait par addition d'un phosphore radioactif du côté 5'. Le mélange réactionnel contient 1,5 μl d'oligonucléotide à 10 pmole/ μl , 20 μl d' H_2O , 3 μl de tampon de phosphorylation, 1 μl de DTT 100 mM, 1,85 MBq dATP ^{32}P (185 TBq/mme, Amersham, U.K.) et 1 μl (5 unités) de polynucléotide kinase (Boehringer).

V- BANQUE D'ADNc, CRIBLAGE ET SEQUENCAGE

A- CONSTRUCTION DE LA BANQUE

La banque d'ADNc d'éosinophiles a été réalisée à l'aide des kits Amersham, suivant les protocoles indiqués. Le kit de synthèse de l'ADNc (cDNA Synthesis System Plus, RPN.1256) et le kit de clonage (cDNA cloning system, $\lambda\text{gt}11$, RPN.1257) permettant d'insérer les ADNc synthétisés dans le vecteur d'expression $\lambda\text{gt}11$ au site Eco RI ont été utilisés. L'ADNc a été synthétisé à partir de 100 μg d'ARN total d'éosinophiles de deux sujets hyperéosinophiliques. Les phages recombinants ont été inoculés sur la souche *E.coli* Y1090.

B- CRIBLAGE DE LA BANQUE

La banque d'expression a été criblée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin. Après une phase de prolifération à 42°C durant deux heures, l'expression de la protéine de fusion, sous le contrôle du promoteur lac Z, est induite à 37°C en présence d'un inducteur métabolique (isopropyl- α -D-thiogalactopyranoside). Les protéines néosynthétisées sont adsorbées sur filtre de nitrocellulose. Les filtres sont saturés par du lait écrémé à 5 % en PBS, puis incubés en présence de sérum de lapin dilué au 1/100 en PBS pendant 2 heures à 20°C ou 16 heures à 4°C. Le sérum est préalablement épuisé sur un lysat bactérien Y1090. Après incubation, les filtres sont lavés en PBS puis incubés pendant 2 h avec l'anticorps anti-lapin couplé à la biotine. Le complexe ainsi constitué est révélé par addition de peroxydase couplée à la streptavidine, suivie d'une révélation enzymatique en présence de 4 chloro-1-naphtol et d'H₂O₂ (cf, technique western blot).

Les clones positifs sont purifiés. Les inserts sont isolés par digestion enzymatique Eco RI d'une préparation d'ADN phagique recombinant.

C- SEQUENCAGE

Les kits Amersham (M13 cloning kit, N.4501 et M13 sequencing kit, N. 4502) ont été utilisés pour le séquençage.

VI- REACTIFS

IL-5 recombinante humaine : Dr J. Tavernier (Roche Research, Gent, Belgique).

IL-3 recombinante humaine : Dr K. Rüedi (Sandoz L.T.D. Bale, Suisse).

GM-CSF recombinant humain : Dr Coffman (DNAX Institute, Palo Alto, Ca)

ADNc codant pour le CD23 : plasmide p CAL3-delta, Dr Hofstetter (CIBA-GEIGY, Suisse)

ADNc codant pour le CD25 : plasmide pIL2R2, Dr W. Greene (Duke University, NC).

ADNc codant pour le CD4 : plasmide p T4B.

Anti-CD23 monoclonal (H107, Ig G2b de souris, et 3-5, Ig G1 de souris) : Dr Yodoi (Kyoto University, Japon) et Dr Suemura (Osaka University).

Anticorps polyclonaux de lapin anti-protéines cationiques :

-anti-ECP, anti-EDN, anti-MBP : Dr G. Gleich, Rochester, MN.

-anti-EPO : Dr venge, Uppsala, Suède.

BUT DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail a été de préciser d'un point de vue biochimique et moléculaire l'hétérogénéité des éosinophiles. En effet, de nombreuses données existent sur la caractérisation biologique et fonctionnelle des éosinophiles activés de faible densité, alors que l'aspect moléculaire reste peu documenté.

Dans une première partie, nous étudierons l'effet d'une cytokine HILDA sur les fonctions biologiques de l'éosinophile afin de préciser certains paramètres d'activation cellulaire sur les différentes sous-populations. Nous examinerons l'effet de cette molécule sur le métabolisme oxydatif, le chimiotactisme, la libération de médiateur, la cytotoxicité et la synthèse protéique.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude biochimique et moléculaire de ces sous-populations cellulaires. Pour cela, les profils protéiques de différentes sous-populations seront réalisés en électrophorèse mono et bidimensionnelle. La comparaison de ces profils permettra l'étude éventuelle de marqueurs d'activation cellulaire. Le modèle d'activation par HILDA sera utilisé afin d'examiner les répercussions biochimiques d'une telle activation.

Dans un dernier volet, nous nous intéresserons à l'expression des ARNm correspondants à divers marqueurs d'activation de l'éosinophile. Une approche de l'expression de ces messagers au cours de la différenciation sera entreprise grâce au modèle d'étude représenté par la lignée d'éosinophile EoL-3 et grâce à un système plus proche de la physiologie qu'est la culture des précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical.

RESULTATS

I- ETUDE DE L'ACTIVATION CELLULAIRE DES EOSINOPHILES PAR HILDA: RELATION AVEC LEUR HETEROGENEITE.

Les résultats de ce chapitre sont présentés partiellement dans l'article suivant : Moreau, J.F., Bonneville, M., Godard, A., Gascan, H., Gruart, V., Moore, M.A. & Soullou, J.P. Characterization of a factor produced by human T cell clones exhibiting eosinophil activating and burst promoting activities. J. Immunol., 1987, 138 : 3844-3849.

HILDA a été isolée et purifiée par Moreau et coll. HILDA induit la prolifération d'une lignée murine nommée DA2, dérivée de la lignée DA1, IL-3 dépendante. C'est une glycoprotéine de 41 kD provenant de clones de lymphocytes T issus de rejet de greffe de rein (148). La présence d'une éosinophilie précédant la survenue des rejets a amené cette équipe à s'intéresser à l'effet de cette molécule sur les fonctions de l'éosinophile. Les résultats présentés ici, ont été obtenus avec la molécule native. L'existence d'une seule bande en gel SDS-PAGE, après coloration au nitrate d'argent confirmait la pureté de la préparation. Les tests biologiques permettaient, dans la mesure de leur sensibilité, de conclure qu'HILDA ne contenait ni ne ressemblait à aucune autre interleukine connue.

Les effets d'HILDA sur les différentes fonctions de l'éosinophile ont alors été successivement examinés en comparant son activité sur les éosinophiles de densité variable.

A- EFFET D'HILDA SUR LE METABOLISME OXYDATIF

L'activité d'HILDA sur le métabolisme oxydatif des éosinophiles a été mesurée par chimioluminescence (CL). Les expériences ont été faites en parallèle sur une autre population de granulocytes que sont les neutrophiles afin de tester la spécificité de cette molécule.

La figure 3-a illustre la réponse des éosinophiles et des neutrophiles, à la stimulation par des doses croissantes d'HILDA allant de 0 à 100 U/ml. Dans ces expériences, la CL est mesurée après 15 min. d'incubation à 37°C. Quelque soit le niveau de CL de base, et la densité de la population testée, tous les éosinophiles répondent de manière dose-dépendante à cette molécule. Il existe une grande dispersion dans l'indice de stimulation (CL HILDA - CL de base/ CL de base) qui peut varier de 15 à 122 pour une dose d'HILDA de 100 U/ml dans les cas présentés. De ce fait, la représentation par expérience a été choisie. Aucune corrélation n'a pu être obtenue entre l'indice de stimulation et la densité des éosinophiles. Les cellules très activables par HILDA peuvent être des éosinophiles de faible densité ou de densité plus élevée. Les expériences choisies sont représentatives de 16 expériences. Aucun effet significatif n'est observé sur les neutrophiles.

Une étude cinétique a ensuite été réalisée (fig. 3b). La CL a été mesurée à 15, 30, 45 et 60 min. pour les éosinophiles et neutrophiles. Une expérience représentative de deux sous-populations différentes d'éosinophiles est présentée : des éosinophiles ayant un niveau de base de CL faible (normodenses, éosinophiles 1) et des éosinophiles activés ayant un niveau de base de CL élevé (hypodenses, éosinophiles 2) ont été testés. La cinétique de réponse obtenue est différente selon les cas. La CL observée en réponse à l'activation par HILDA diminue au cours du temps pour les éosinophiles activés hypodenses, alors qu'elle augmente pour les éosinophiles normodenses. Aucun effet n'est observé sur les neutrophiles.

Afin de vérifier que les mécanismes de CL, étaient bien mis en jeu lors de cette activation, les principaux enzymes inhibiteurs de la CL (super oxyde dismutase, catalase) ont été utilisés. Les résultats sont présentés dans le tableau IV. Une inhibition significative de 99% pour la SOD et 83% pour la catalase a pu être obtenue lors de la stimulation par HILDA à 50 U/ml.

Unités CL

FIGURE 3-a

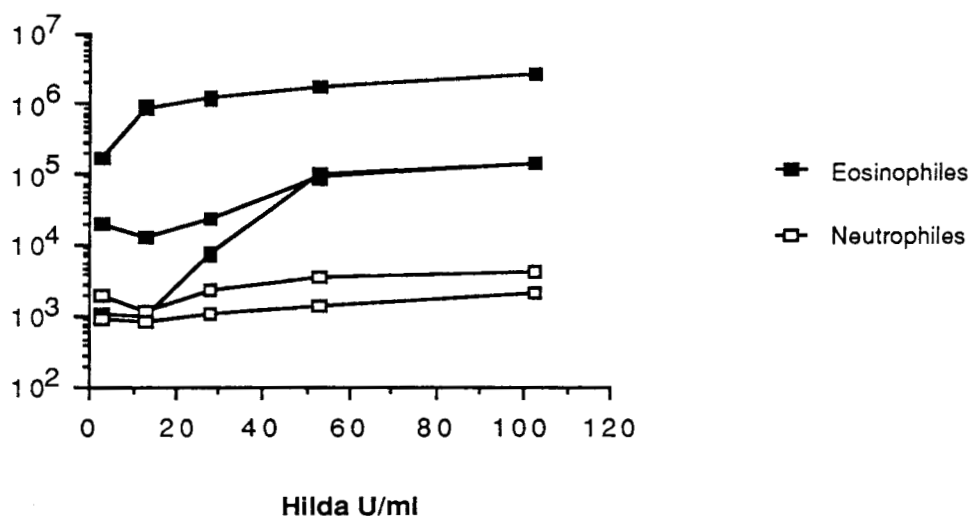


Figure 3-a : Courbe dose- réponse de la chimioluminescence (CL) des éosinophiles et des neutrophiles lors de la stimulation par HILDA. Les éosinophiles de 3 patients hyperéosinophiliques et les neutrophiles de 2 sujets témoins ont été testés. La CL est mesurée à 15 minutes.

FIGURE 3-b

Unités CL

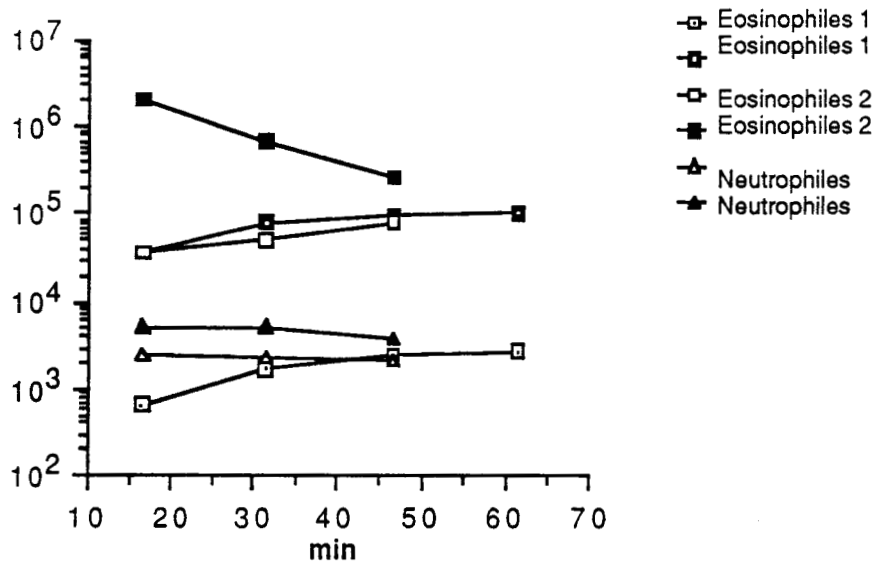


Figure 3-b : Etude cinétique de la CL produite lors de la stimulation par HILDA à 100 U/ml. La cinétique de réponse est comparée avant et après stimulation :

(□, □, △) : cellules non stimulées

(■, ■, ▲) : cellules stimulées.

TABLEAU IVINHIBITION DE LA CHIMIO-LUMINESCENCE DES EOSINOPHILES INDUITE
PAR HILDA *

	EOSINOPHILES 3	EOSINOPHILES 4	EOSINOPHILES 5	EOSINOPHILES 6
TEMOIN	14 720	785	5 383	570
HILDA 50 U/ML	62 662	67 123	92 065	80 863
HILDA 50 U/ML + SOD	1 209	602	-	-
HILDA 50 U/ML + CATALASE	-	11 173	-	-

* La chimioluminescence est mesurée après 15 minutes d'incubation à 37°C, les résultats sont exprimés en unités de CL.

SOD: Super Oxyde Dismutase: 250 U/ML.

CATALASE: 2 500 U/ML.

B- ETUDE DU CHIMIOTACTISME

Le deuxième paramètre étudié a été le chimiotactisme. Les expériences ont été réalisées *in vitro* dans des chambres de chimiotactisme. La figure 4 illustre les résultats obtenus avec des éosinophiles et des neutrophiles pour des concentrations d'HILDA variant de 0 à 200 U/ml. Les éosinophiles testés ont été classés en deux séries. "Les éosinophiles 7" sont représentatifs des cellules ayant un chimiotactisme spontané faible ($12,6 \pm 5,9$ cellules/hpf $n=3$) et " les éosinophiles 8", celles, ayant un chimiotactisme spontané élevé ($36,9 \pm 10,4$ cellules/hpf $n=4$). Il est à noter que les éosinophiles proviennent tous de la même couche de métrizamide (couche IV), soulignant une hétérogénéité à l'intérieur d'une même sous-population. Les résultats indiquent que la stimulation par HILDA multiplie par 6 le chimiotactisme des "éosinophiles 7" alors qu'il ne le multiplie que de 2 fois pour les "éosinophiles 8" à la dose maximale de 200 U/ml. A 100 U/ml l'activation par HILDA est supérieure à celle obtenue par le PAF. Aucune activité significative sur la réponse des neutrophiles n'a pu être soulignée. La figure 5 illustre l'activité chimiotactique d'HILDA observée au microscope photonique. Elle se traduit par un accroissement du nombre d'éosinophiles visibles sur les filtres.

Figure 4

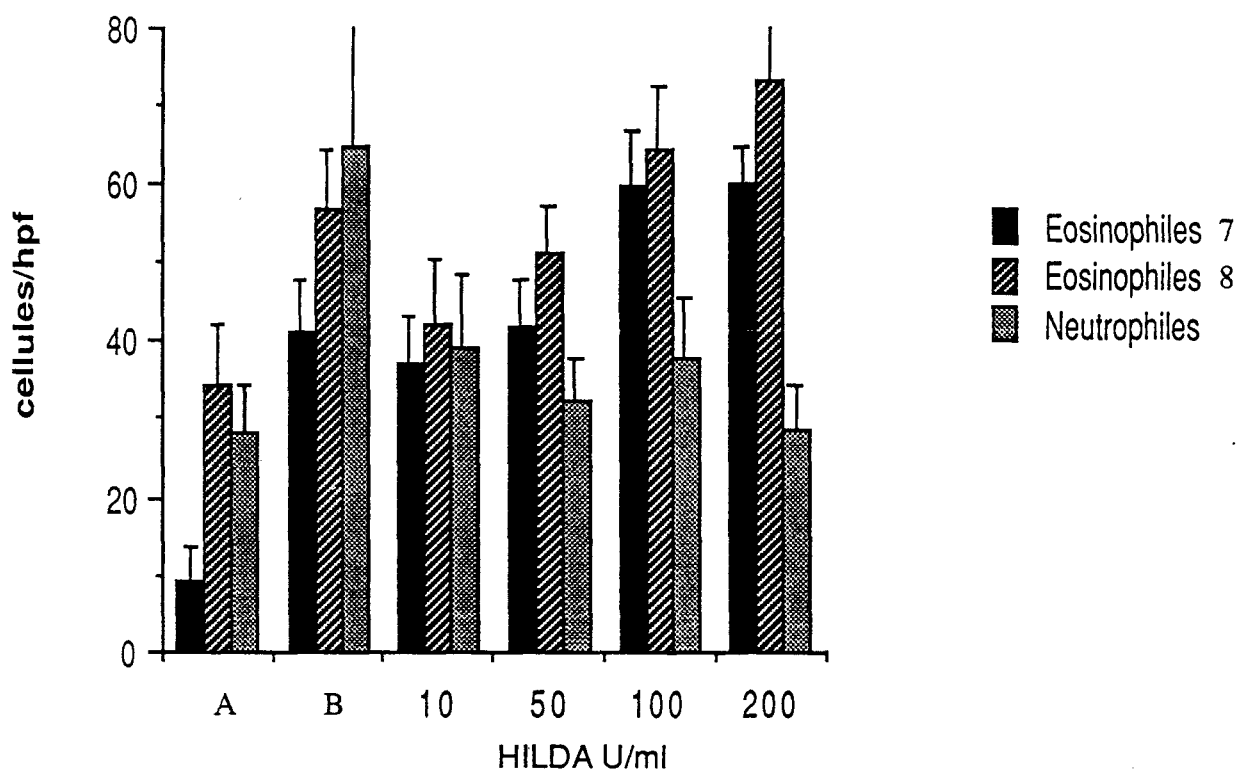


Figure 4 : Etude du chimiotactisme des éosinophiles et des neutrophiles. Une expérience représentative de deux sous-populations différentes d'éosinophiles est présentée. "Les éosinophiles 7" sont représentatifs des cellules dont le chimiotactisme spontané est faible, "les éosinophiles 8", ceux dont le chimiotactisme spontané est élevé. Le chimiotactisme spontané est représenté en A. En B, le PAF est utilisé à 10^{-6} M comme contrôle positif pour les éosinophiles et le fMLP à 10^{-5} M pour les neutrophiles. L'effet d'HILDA pour des concentrations de 10 à 200 U/ml est testé sur les cellules.

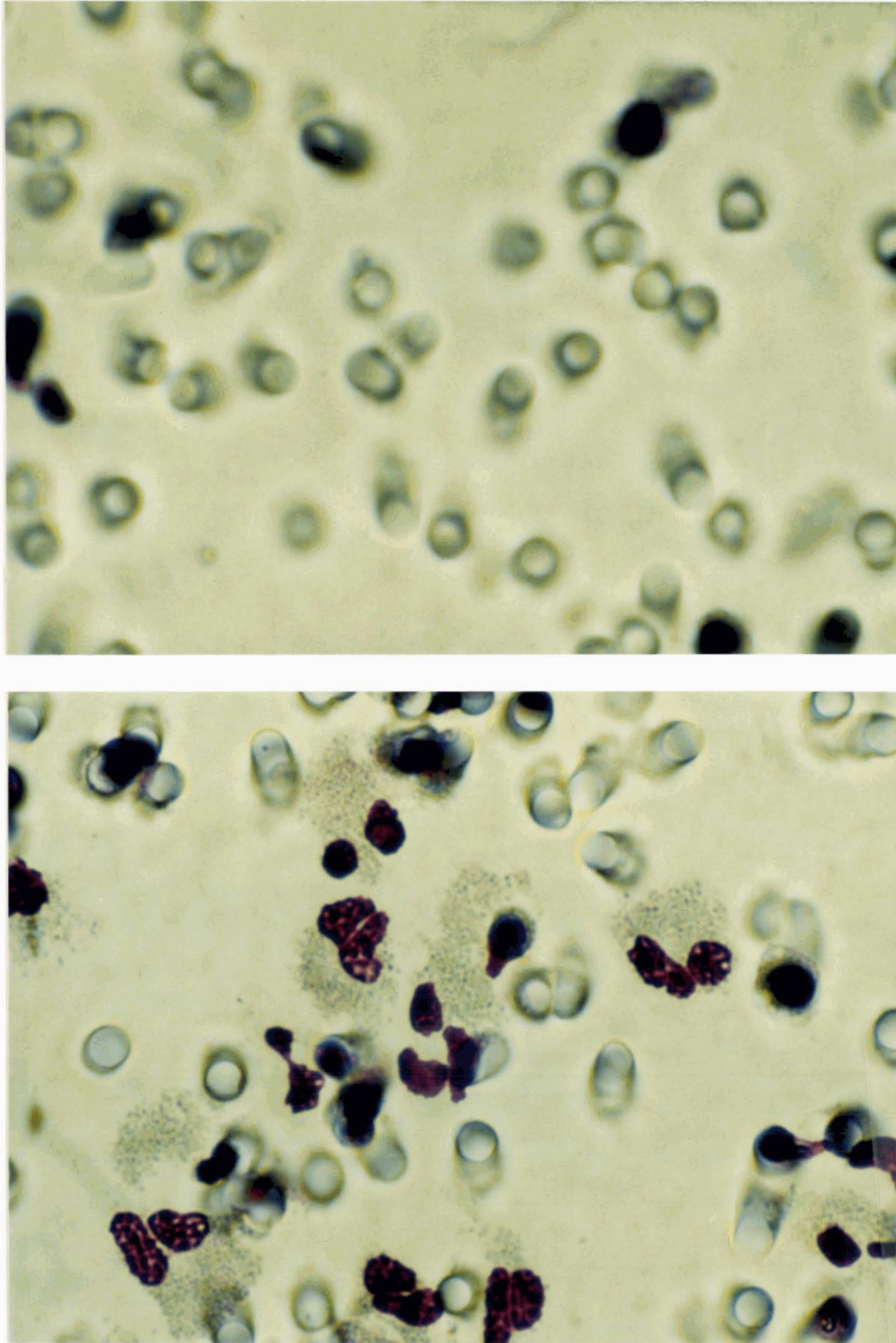


Figure 5 : Illustration de la technique d'étude du chimiotactisme. Les photographies représentent les filtres utilisés pour les expériences. Les pores des filtres sont nettement distingués. Les filtres sont fixés et colorés au RAL permettant ainsi la visualisation des éosinophiles. La photographie du haut représente le chimiotactisme des cellules en milieu témoin et celle du bas, le chimiotactisme des éosinophiles en présence d'HILDA à 50 U/ml. Les filtres sont observés à l'aide de l'objectif à immersion (x100).

C- ETUDE DE LA LIBERATION DE L'EPO

Etant donné l'importance des protéines cationiques dans les fonctions de l'éosinophile, il nous semblait important de déterminer l'effet d'HILDA sur leur libération. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la libération de l'EPO par dosage de l'activité enzymatique dans les surnageants d'éosinophiles activés. Les résultats présentés dans le tableau V sont exprimés en unités de CL mais également sous forme d'index de libération. Le test est considéré positif lorsque l'index est supérieur à 2. Dans ce test la pureté en éosinophiles est élevée et comparable dans toutes les expériences (91% à 95% dans les 4 cas). La capacité d'HILDA à stimuler la libération d'EPO est démontrée par les index variant de 2,5 à 10,66. Le nombre d'unités de CL reflète directement le niveau d'activation des cellules. Celui-ci est 10 fois plus élevé pour les éosinophiles 9 que pour les éosinophiles 11. Tous les éosinophiles proviennent de la même couche IV, soulignant de nouveau l'hétérogénéité de cette sous-population. Nous pouvons observer que les index de stimulation lors de l'activation par HILDA sont corrélés au niveau de libération spontané de l'éosinophile. Plus celui-ci est faible, plus l'index de stimulation est grand. Une dose-réponse est observée pour des concentrations d'HILDA allant de 10 à 200 U/ml.

D- ETUDE DE LA CYTOTOXICITE

La démonstration de la capacité d'HILDA à stimuler la libération d'EPO et la connaissance des effets cytotoxiques de cette molécule, nous ont incité à étudier l'activité d'HILDA sur la fonction cytotoxique de l'éosinophile. Ces expériences ont été effectuées dans un système d'ADCC Ig E dépendant. Nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales suboptimales afin de pouvoir détecter une éventuelle potentialisation de la cytotoxicité. La figure 6 illustre deux expériences effectuées sur des cellules de patients différents avec des concentrations d'HILDA variant de 10 à 200 U/ml. Une augmentation dose-dépendante de la cytotoxicité peut être observée à 100 et 200 U/ml.

TABLEAU V

MESURE DE LA LIBERATION D'EPO

	EOSINOPHILES 9		EOSINOPHILES 10		EOSINOPHILES 11		EOSINOPHILES 12	
	UNITES CL	INDEX *	UNITES CL	INDEX *	UNITES CL	INDEX *	UNITES CL	INDEX *
TEMOIN	11 860	1	7170	1	1058	1	10 063	1
HILDA U/ML								
200	38 876	3,27	-	-	-	-	-	-
100	37 161	3,13	39 535	5,51	-	-	-	-
50	29 776	2,5	36 565	5,07	11 288	10,66	21 683	2,15
25	-	-	32 045	4,47	-	-	-	-
10	-	-	27 881	3,88	-	-	16 301	1,62

* Expression des résultats sous forme d'index : $\text{index} = \text{CL HILDA} / \text{CL TEMOIN}$

Figure 6

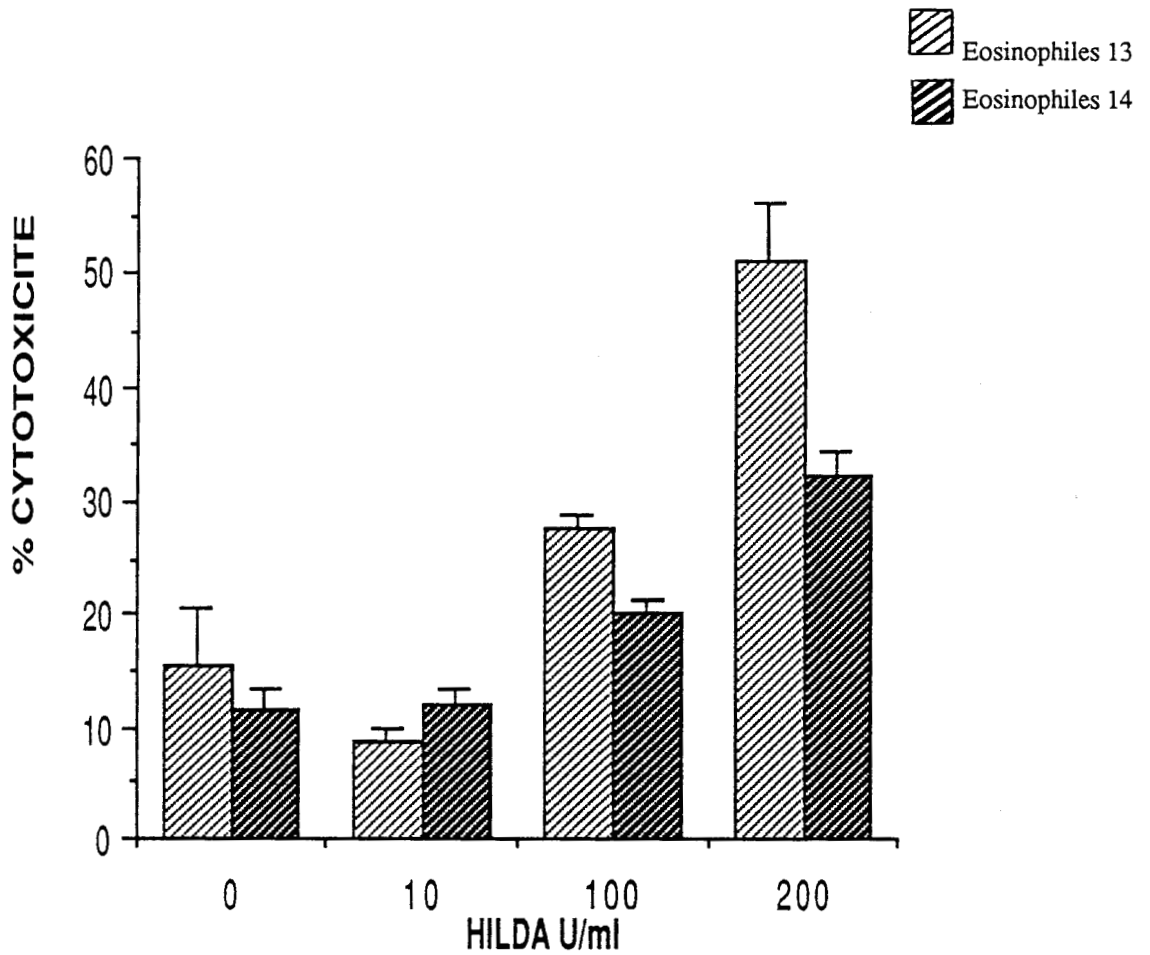


Figure 6 : Analyse de l'effet d'HILDA sur la fonction cytotoxique des éosinophiles humains dans un système d'ADCC dépendant d'IgE. Pour chaque point, les éosinophiles de deux sujets hyperéosinophiliques ont été testés.

E- ETUDE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

L'effet d'HILDA sur la synthèse protéique a été mesuré par marquage métabolique. Les expériences ont été réalisées avec des populations d'éosinophiles de pureté supérieure à 90%. Après précipitation à l'acide trichloroacétique, la radioactivité a été mesurée sur le culot cellulaire d'une part et sur le surnageant d'autre part (tableau VI). Des taux variables d'incorporation de méthionine ^{35}S ont été obtenus selon les éosinophiles testés. Une stimulation de l'incorporation totale de 70,5% (51,7 % + 141 %) pour les "éosinophiles 15" et de 23,9 % (25,5 % + 21.7 %) pour les "éosinophiles 16" est observée, traduisant un état d'activation variable. Pour les "éosinophiles 15", nous pouvons remarquer que l'activation par HILDA entraîne une stimulation très importante de la synthèse protéique avec libération des protéines marquées dans le milieu. Afin de vérifier que l'incorporation était bien due à la synthèse protéique, des expériences similaires ont été réalisées en présence de cycloheximide à 10 μg / ml. Une inhibition de 68,9% a été obtenue dans le culot cellulaire des "éosinophiles 15" en présence d'HILDA à 50 U/ml. Une mesure de la radioactivité effectuée sur les lysats cellulaires traités au NP40, avant et après précipitation à l'acide trichloroacétique, indique que l'augmentation d'incorporation n'est pas due à une captation non spécifique de la méthionine ^{35}S libre lors de la stimulation par HILDA. Une stimulation de l'incorporation (>20 %) a pu être détectée dans 5 cas sur un total de 8 expériences.

Afin de déterminer si la stimulation de la synthèse protéique après activation par HILDA entraînait soit une néosynthèse soit une augmentation de synthèse de protéines pré-existantes, il nous apparut intéressant d'étudier au préalable les profils protéiques des éosinophiles en fonction de leur activation cellulaire *in vivo*.

TABLEAU VI

MESURE DE L'INCORPORATION DE MET ³⁵S PAR LES EOSINOPHILES
APRES ACTIVATION PAR HILDA

	EOSINOPHILES 15		EOSINOPHILES 16	
	CULOT	SURNAGEANT	CULOT	SURNAGEANT
TEMOIN *	246 300	66 400	235 100	177 640
HILDA 50 U/ML *	373 800	160 710	295 120	216 200
STIMULATION	51,7 %	141 %	25,5 %	21,7 %

*Les valeurs sont exprimées en cpm/ 1x 10⁶ cellules.

**II-ETUDE DES PROFILS PROTEIQUES DE DIFFERENTES
SOUS-POPULATIONS D'EOSINOPHILES : CARACTERISATION
DE MARQUEURS D'ACTIVATION.**

L'ensemble des résultats ont fait l'objet de la publication ci-dessous :

Gruart V., Balloul J.M., Prin L., Tomassini M., Loiseau S., Capron A. &

Capron M. (1989) Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. *J. Immunol.*, **142** : 4416-4421.

De nombreux travaux soulignent l'hétérogénéité des éosinophiles. Celle-ci repose sur des études morphologiques et biologiques effectuées sur les sous-populations d'éosinophiles. En effet, la purification des éosinophiles sur gradient de densité a permis la caractérisation d'éosinophiles hypodenses, activés et plus cytotoxiques que les éosinophiles normodenses. Ces cellules diffèrent par de nombreux autres paramètres biologiques : métabolisme oxydatif, expression de récepteurs de surface, libération de médiateurs..... Alors que les propriétés biologiques et fonctionnelles de ces sous-populations sont bien documentées, peu d'études existent en ce qui concerne les bases moléculaires de cette hétérogénéité. Dans ce contexte, nous avons essayé d'établir les profils protéiques de ces différentes sous-populations afin de pouvoir les comparer.

A- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES EN SDS PAGE.

Des extraits cellulaires d'éosinophiles (30 µg) purifiés de cinq patients différents ont été passés sur gel SDS-PAGE. Des protéines de poids moléculaire allant de 14 à 200 kD ont été détectées après coloration des gels au nitrate d'argent. La figure 7 illustre les profils protéiques obtenus à partir d'éosinophiles purifiés et provenant de couche de métrizamide de différentes densités (couche III : 20 à 22%, couche IV : 22 à 23%, couche V : 23 à 24%). Le profil protéique est comparable pour des cellules de même densité à l'exception de variations individuelles mineures. Lorsque ces profils sont comparés entre éosinophiles provenant de différentes couches, des variations apparaissent. La comparaison entre couche III et couche IV révèle la présence d'une protéine de 51 kD dans les éosinophiles de couche IV, non détectable par cette technique dans les cellules de couche III. Le tableau VII indique que cette protéine est retrouvée dans tous les extraits d'éosinophiles des couches IV, V et VI de densité élevée (éosinophiles intermédiaires et normodenses), ceci indépendamment de l'origine pathologique des éosinophiles. Cette protéine est exprimée chez des sujets témoins. Un profil protéique identique est obtenu lorsque les extraits sont effectués avant ou après une nuit de culture.

Dans quelques cas, une expression plus élevée d'une protéine à 43 kD est remarquée dans les extraits de couche III. Toutes les variations décrites sont observées pour des extraits cellulaires de couche III et IV provenant d'un même patient (fig. 7, piste 5a et 5b).

Figure 7 : Analyse en SDS-PAGE d'extraits cellulaires d'éosinophiles purifiés à partir de couche III (pistes 1 à 3 et piste 5b) et de couches IV (pistes 4 et 5a) de 5 patients différents (piste 1 à 5). Les pistes 5a et 5b représentent les extraits d'éosinophiles d'un même patient. Les gels sont colorés au nitrate d'argent. Les flèches indiquent les protéines dont l'expression varie. Le pourcentage d'éosinophiles est de 80%, 89%, 97%, 98%, 91,5% et 92% pour les extraits des pistes 1, 2, 3, 4, 5a et 5b respectivement.

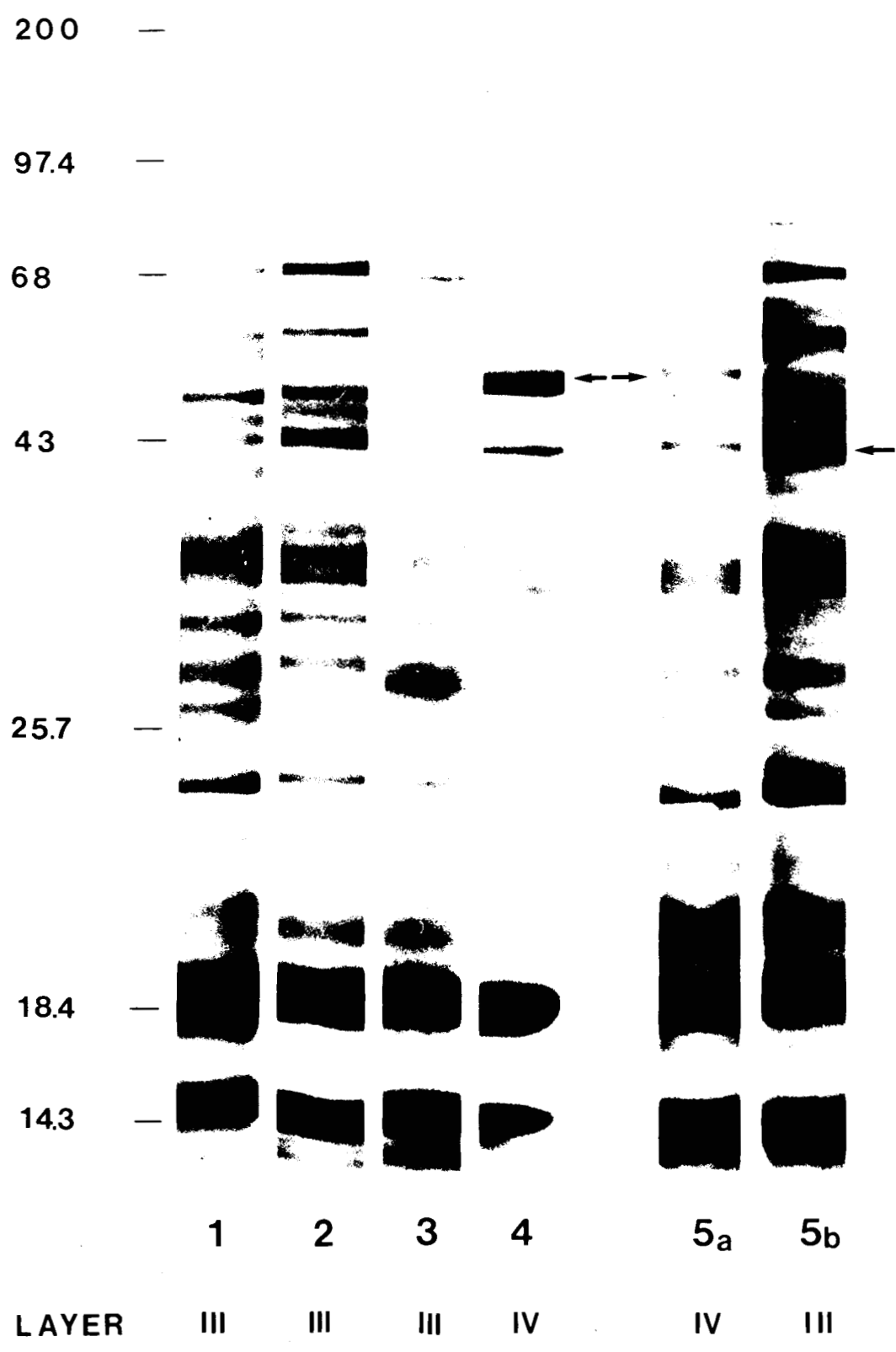


TABLEAU VIIETUDE DE LA PRESENCE DE LA PROTEINE DE 51 KD EN FONCTION
DE DIVERSES PATHOLOGIES

EOSINOPHILES * (% de métrizamide)	PATHOLOGIES (nombre de cas)	PROTEINE 51 kD
couche II = 18-20 %	lymphome T (1)	-
	HES (3)	-
couche III = 20-22 %	lymphome T (1)	-
	HES (9)	-
couche IV = 22-23 %	lymphome T (1)	+
	HES (11)	+
	syndrome de Churg et Strauss (2)	+
	filariose (1)	+
couche V = 23-24 %	lymphome T	+
	HES (3)	+
	témoin (1)	+
couche VI = 24-25 %	témoin (1)	+

* : La pureté des populations cellulaires est comprise entre 80 et 99 %

B- ANALYSE EN ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.

Afin d'affiner les profils protéiques observés, les extraits cellulaires ont été soumis à une électrophorèse bidimensionnelle. L'isoélectrofocalisation a tout d'abord été utilisée dans l'analyse des protéines obtenues à partir d'extraits d'éosinophiles de couche II à IV. La figure 8 illustre les résultats obtenus à partir de cellules d'un même patient en A et à partir de cellules de patients différents en B. La quantité de protéines déposée sur les gels est la même pour chaque électrophorèse (200 µg). De manière surprenante, la protéine de 51 kD n'a pas pu être localisée sur aucun des gels dont le pouvoir de séparation se situe dans des zones de pI allant de 4.0 à 8.5. Une différence notable est visible pour une protéine de 23 kD de pI 6,3-6,5 présente dans les couches II et III (densité faible ou hypodenses) et non dans les couches IV.

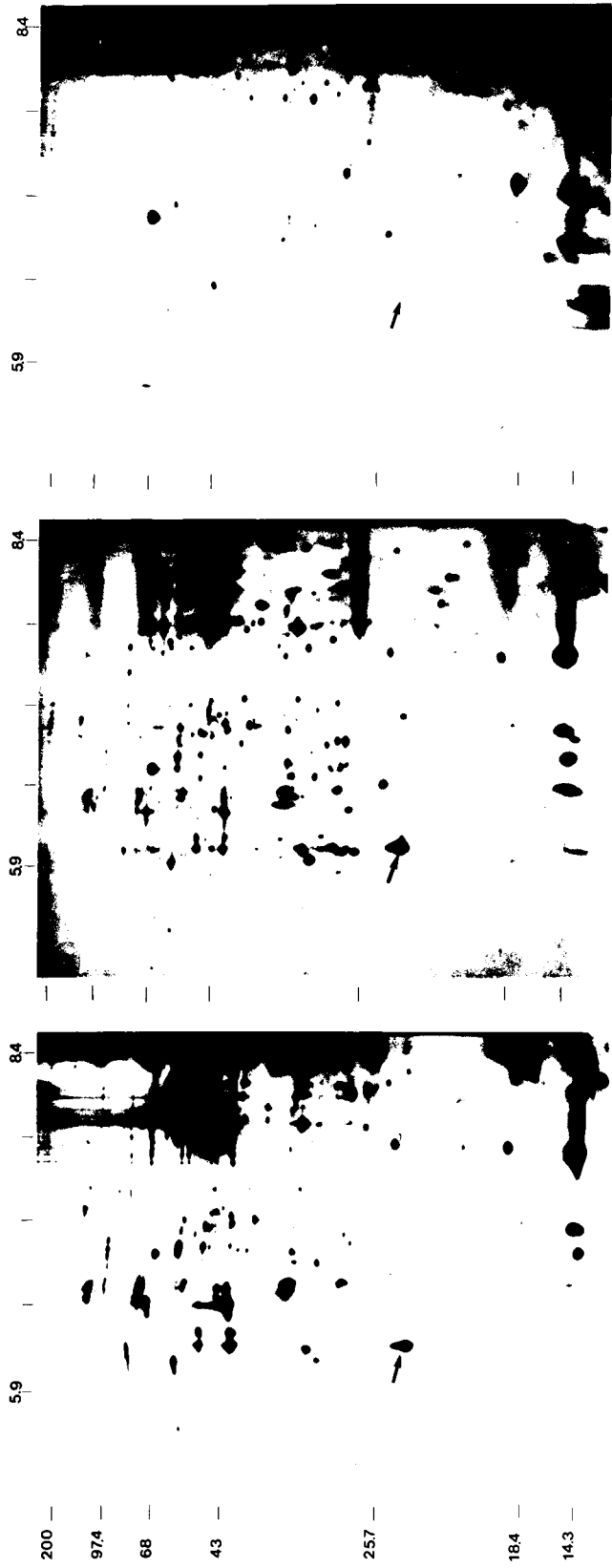
L'absence de détection de la protéine de 51 kD pouvait être due à un pI de la molécule très basique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une électrophorèse en gradient de pH non équilibré ou NEPHGE. En effet, dans le cas des protéines très basiques $pI \geq 9$, il n'est pas possible d'effectuer une IEF au sens propre, car leur pI se trouve au delà d'une zone dans laquelle il est difficile d'obtenir un gradient de pH stable. Ces protéines pourront cependant être séparées en stoppant l'électrophorèse de première dimension après un temps court, alors que celles-ci sont encore en mouvement vers la cathode. Une NEPHGE a donc été réalisée sur des extraits cellulaires de couche III et IV, et les résultats sont illustrés sur la figure 9. La protéine de 51 kD est alors visible dans les extraits de couche IV confirmant ainsi les résultats obtenus en électrophorèse monodimensionnelle mais également la nature basique de cette protéine ($pI \geq 9$). Cette dernière est faiblement détectable dans les éosinophiles de couche III.

Bien que les quantités de protéines déposées soient équivalentes, le taux de protéine détecté dans les couches II et III par rapport aux couches IV est plus important en IEF. L'inverse est obtenu pour la NEPHGE. La moyenne du taux de protéines est de $2,76 \pm 0,93 \mu\text{g}/10^5$ cellules de couche II/III (11 expériences) et de $2,76 \pm 0,66 \mu\text{g}/10^5$ cellules de couche IV/V (12 expériences). L'ensemble de ces données suggère que le taux de protéines basiques est plus important dans les éosinophiles de couche IV/V.

Figure 8 : Analyse en IEF d'extraits cellulaires provenant de couches II, III et IV du même patient en A et de couches III et IV de deux patients différents en B. Les gels sont colorés au nitrate d'argent. Les flèches indiquent les différences reproductibles. Le pourcentage en éosinophiles est de :

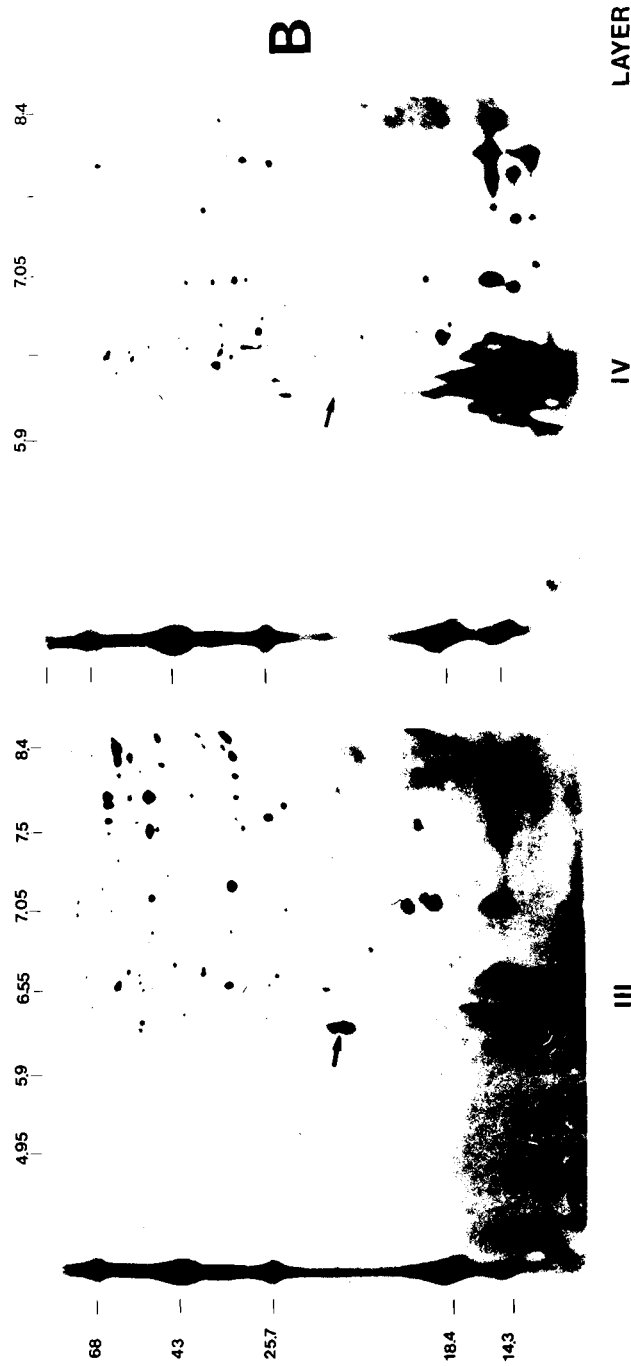
90%, couche II; 97%, couche III; 92,5%, couche IV en A

85%, couche III; 84% couche IV en B.



A

LAYER



B

LAYER

Figure 9 : Analyse d'extraits cellulaires d'éosinophiles en NEPHGE. Les cellules proviennent de deux sujets différents. La région du gel présentée correspond aux protéines comprises entre 68 kD et 13 kD. La pureté en éosinophiles est comparable pour les deux couches testées : 80% en couche III et 83% en couche IV.

B



A



68 — ●

43 — ●

257 — ●

18.4 —

14.3 —

BASIC

LAYER IV

ACIDIC

BASIC

LAYER III

ACIDIC

C- ANALYSE DES PRODUITS DE TRADUCTION DE L'EOSINOPHILE.

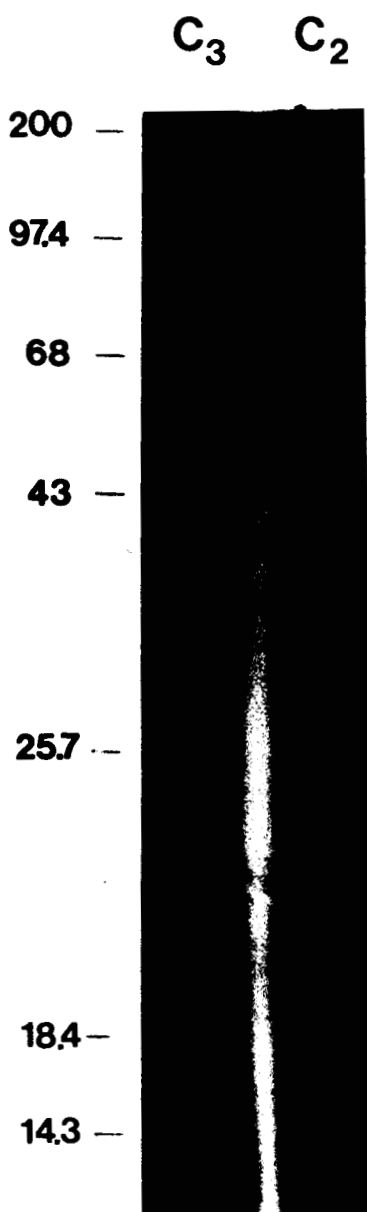
L'analyse des produits de traduction des ARN de l'éosinophile nous a permis d'étudier un autre versant de cette hétérogénéité. L'isolement et la traduction des ARN ont été effectués à partir de cellules provenant de deux patients différents A et B (figure 10). Les expériences montrent que l'éosinophile possède des ARNm pouvant coder pour des polypeptides de poids moléculaire 14 à 200 kD. Aucune variation n'est détectable dans les produits de traduction de poids moléculaire voisin de 51 kD. Une hétérogénéité peut être observée entre les produits de traduction des ARNm des éosinophiles de couche III et IV pour un polypeptide de 22-24 kD que n'expriment pas les éosinophiles de la couche IV. Inversement, la couche IV possède des ARNm pouvant coder pour un polypeptide de 16 kD, non détecté dans les cellules de la couche III. Ces différences ne sont pas observées entre les couches III et II. Le faible rendement en ARNm obtenu à partir des éosinophiles, a rendu l'investigation difficile sur d'autres patients.

Figure 10 : Analyse en SDS-PAGE des produits de traduction in vitro d'ARN d'éosinophiles de 2 sujets hyperéosinophiliques A et B. En A, il s'agit d'éosinophiles de couche III et IV; en B, l'étude est effectuée sur des éosinophiles de couche II et III.

A



B



D- CARACTERISATION DE LA PROTEINE DE 51 KD

1-Etude en Western blot

La nature basique de la protéine de 51 kD nous a incité à penser qu'elle pouvait faire partie des protéines cationiques connues de l'éosinophile. Une étude en Western blot fut entreprise avec différents anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines cationiques de l'éosinophile. Un mélange d'extraits d'éosinophiles de couche III, d'une part et de couche IV d'autre part a été fractionné en gel SDS-PAGE, puis transféré sur nitrocellulose.

Les anticorps polyclonaux anti-EPO, anti-MBP et anti-EDN ont été testés en Western blot (figure 11-A). Seul l'anti-EPO reconnaît une bande correspondant à une protéine de 51-53 kD présent uniquement dans les extraits de la couche IV. Aucune différence significative n'a été observée avec les autres anticorps. Une bande à 68 kD est détectée avec ces anticorps, de manière identique et non spécifique pour les couches III et IV.

2-Etude de l'activité enzymatique.

Les résultats en Western blot avec l'anti-EPO nous ont conduit à tester l'activité enzymatique de cette protéine. Pour cela nous avons mis au point une méthode permettant de visualiser l'activité peroxydasique sur nitrocellulose. Des extraits cellulaires d'éosinophiles de différentes couches ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose et l'activité enzymatique révélée grâce à un substrat spécifique de la peroxydase. Les résultats, résumés dans la figure 11-B, indiquent que l'activité de la peroxydase est beaucoup plus importante dans les extraits d'éosinophiles de couches IV et V. Ces résultats semblent donc être corrélés avec ceux obtenus en Western blot et suggèrent que la protéine de 51 kD pourrait être la peroxydase. Aucune activité peroxydasique n'a pu être visualisée dans les lignées cellulaires RPMI, U937, Jurkat utilisées comme témoin négatif, alors qu'une très faible activité est détectée dans des neutrophiles purifiés (résultats non présentés).

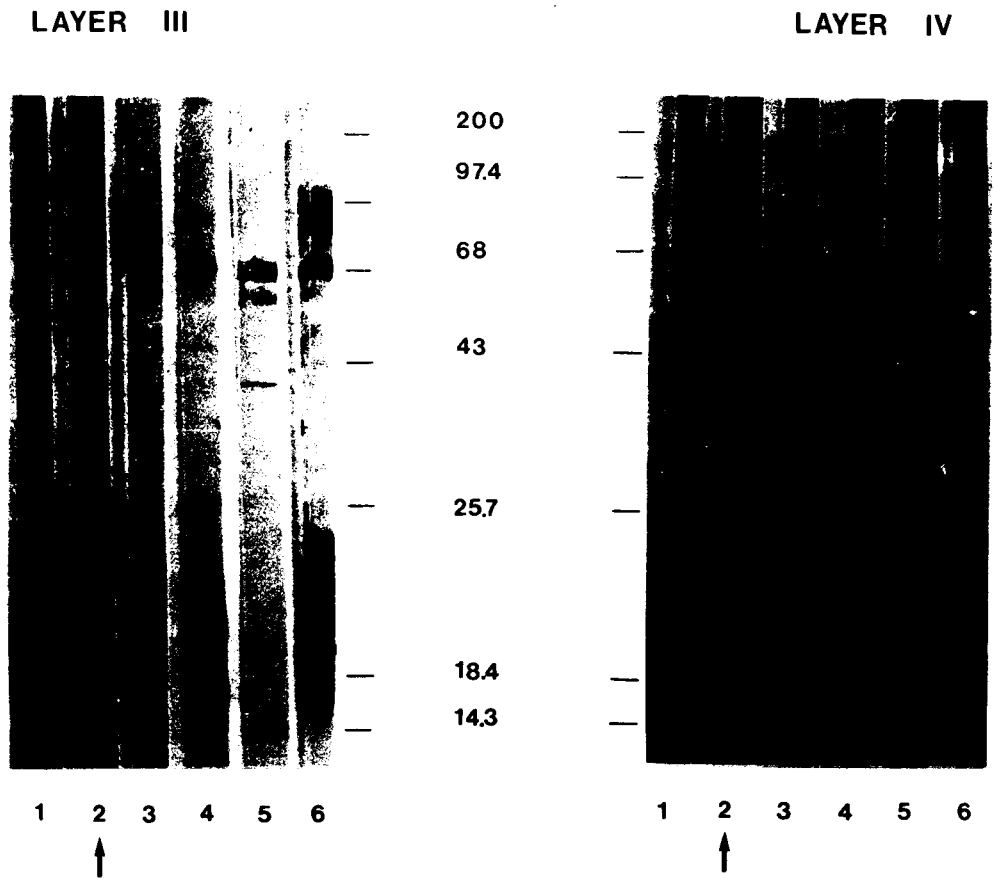
Figure 11-A : Analyse en Western blot d'extraits cellulaires provenant d'un pool de cellules de couches III et de cellules de couche IV. Les anticorps suivants ont été testés:

- piste 1 et 3: serum de lapin sain, dilution 1/100 et 1/50,
- piste 2: anti-EPO, dilution 1/50,
- piste 4: anti-ECP, dilution 1/50,
- piste 5: anti-MBP, dilution 1/50,
- piste 6: anti-EDN/EPX, dilution 1/100.

Figure 11-B : Détection de l'activité peroxydasique dans les extraits cellulaires. Trois expériences ont été réalisées avec deux concentrations de protéines (a= 4 µg et b= 8 µg de protéines totales). Ce taux de protéines correspond approximativement à 2×10^5 cellules (a) et 4×10^5 cellules (b) . Les formules cellulaires de chaque couche sont les suivantes:

- expérience 1 couche III: 97% éosinophiles, 2,5% neutrophiles et 0,5% lymphocytes,
couche IV: 92,5% éosinophiles, 6,5% neutrophiles et 1% lymphocytes,
- expérience 2 couche II: 94% éosinophiles, 5% neutrophiles, 1% lymphocytes,
couche V : 95% éosinophiles, 5% neutrophiles,
- expérience 3 couche II: 80% éosinophiles, 19% neutrophiles, 1% lymphocytes,
couche IV: 99% éosinophiles, 0,5% neutrophiles, 0,5% lymphocytes.

A



B

	EXPT 1	EXPT 2	EXPT 3	
LAYER II				a b
LAYER III				a b
LAYER IV				a b
LAYER V				a b

E- ETUDE DES PROTEINES NEOSYNTHEISEES.

La comparaison des profils protéiques a également été effectuée après marquage métabolique afin de déterminer si une différence de profil était observée dans les protéines néosynthétisées. Pour cela des marquages métaboliques ont été réalisés par incorporation de méthionine ^{35}S après 16h de culture. La figure 12 illustre les profils obtenus à partir de cellules d'un même patient. Les protéines ont été analysées en IEF et en NEPHGE sur deux sous-populations (couche III et couche IV). L'analyse des profils protéiques à partir de dépôts de quantité de radioactivité identique (200 000 cpm) permettent ainsi de comparer la néosynthèse des protéines dans chaque couche. L'importance du nombre de spots observés indique que l'éosinophile est capable de néosynthétiser des protéines. Les résultats montrent que les profils globaux sont similaires pour les couches III et IV.

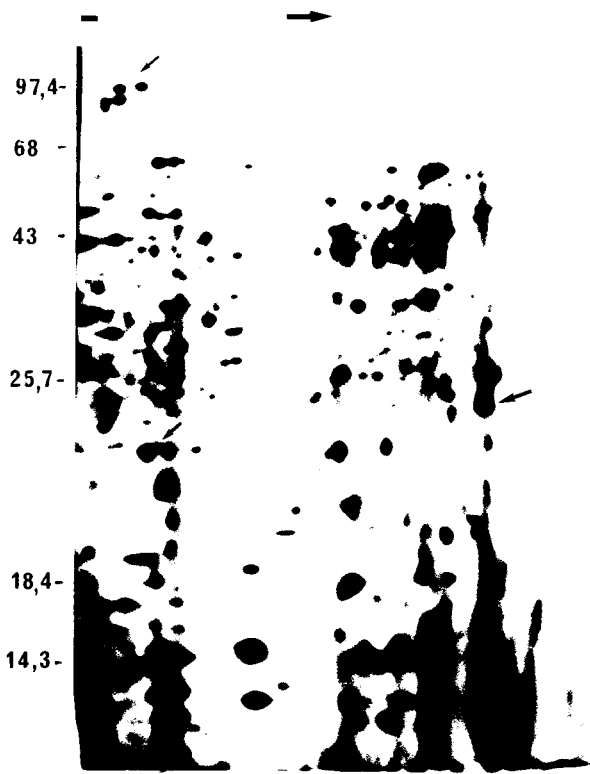
Cependant, si nous gardons à l'esprit les différences observées dans le profil des protéines froides, nous pouvons immédiatement situer en IEF, la présence d'une protéine de 24 kD néosynthétisée préférentiellement dans la couche III dans une zone de pI de 6,3 à 6,5. Nous n'avons, actuellement, aucun argument direct pour affirmer que cette protéine est identique à la protéine de 23 kD décrite précédemment.

Une variation dans l'intensité des spots peut être détectée pour d'autres protéines, notamment, pour un groupe de trois protéines de 94-97 kD et de pI 7,8 à 8,3.

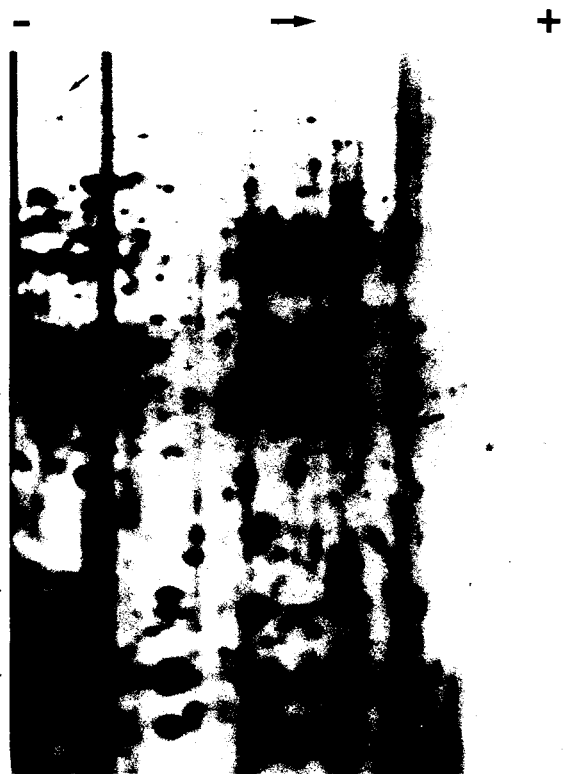
En NEPHGE, nous n'avons pas pu détecter de protéine à 51 kD, ni dans la couche III ni dans la couche IV. Ce fait laisse à supposer que la néosynthèse de cette protéine est faible.

Figure 12 : Analyse des protéines néosynthétisées en IEF et NEPHGE. Les éosinophiles des couches III et IV du même patient ont été utilisés pour les marquages métaboliques. Les flèches soulignent les variations reproductibles entre les profils.

IEF



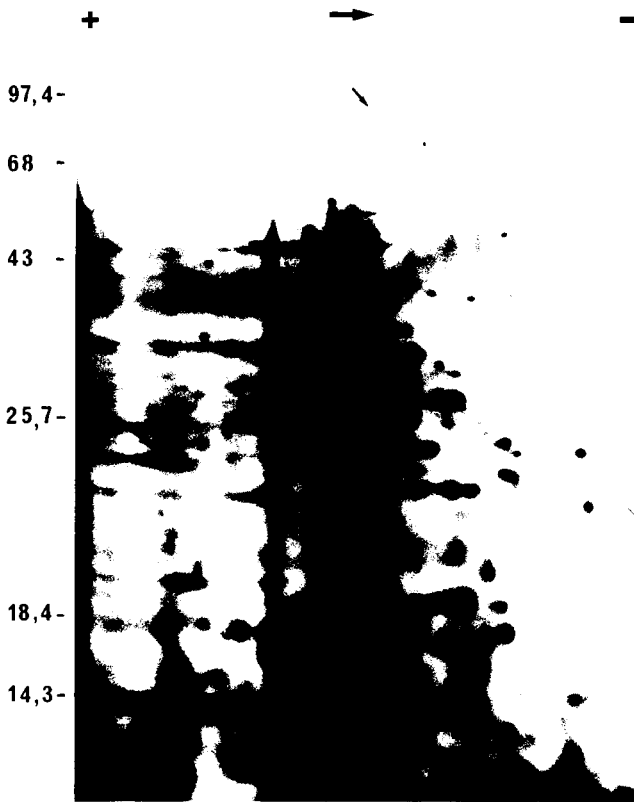
III



IV

LAYER

NEPHGE



III



IV

LAYER

F- ACTIVATION PAR HILDA

Après avoir établi les profils protéiques des cellules, nous avons voulu savoir s'ils étaient modifiés durant l'activation cellulaire et si les marqueurs décrits jouaient un rôle. Pour cela, nous avons utilisé HILDA dont les fonctions biologiques étaient clairement définies.

Des expériences préliminaires ont montré qu'HILDA pouvait stimuler l'incorporation de méthionine ^{35}S dans les éosinophiles (voir tableau VI). Afin de déterminer si cette augmentation de l'incorporation se traduisait par une élévation du taux de synthèse de protéines préexistantes ou par une néosynthèse de protéines, nous avons analysé sur gel SDS-PAGE les profils protéiques des marquages métaboliques après stimulation par HILDA. La figure 13 montre les résultats d'analyses en IEF, réalisés sur deux patients. Les dépôts ont été effectués en nombre constant de cpm . Bien que le profil protéique global reste similaire avant et après stimulation par HILDA, une faible augmentation dans la synthèse du polypeptide de 23 kD peut être toutefois observée dans les deux cas suggérant ainsi un rôle possible de ce polypeptide dans l'activation cellulaire par HILDA. Cependant, le nombre insuffisant d'échantillons analysés ne permet pas de conclure définitivement sur la participation éventuelle de ce polypeptide dans cette activation.

Figure 13 : Analyse des protéines néosynthétisées après activation par HILDA à 50 U/ml.

Les marquages métaboliques ont été réalisés sur les éosinophiles de couches IV de deux patients

A et B. Les électrophorèses bidimensionnelles ont été effectuées en IEF.

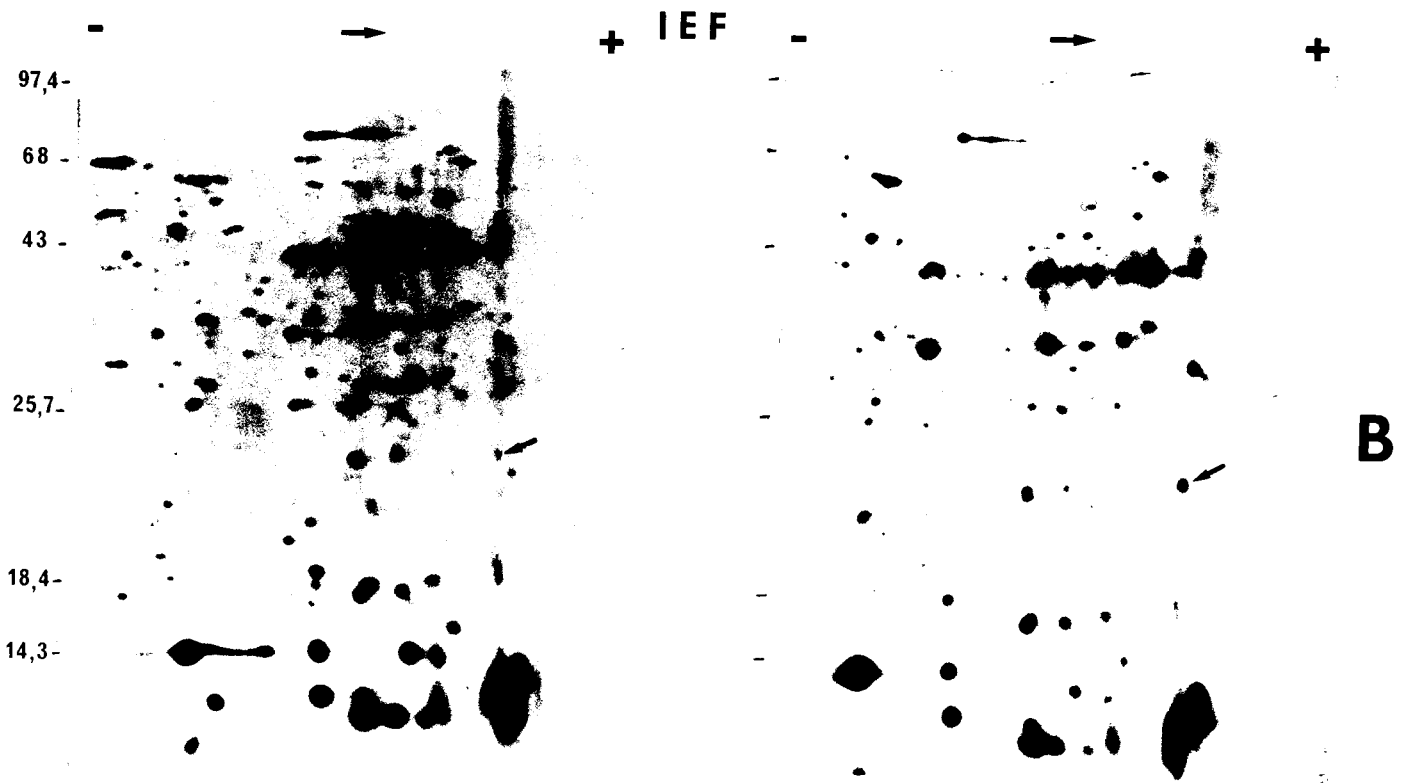
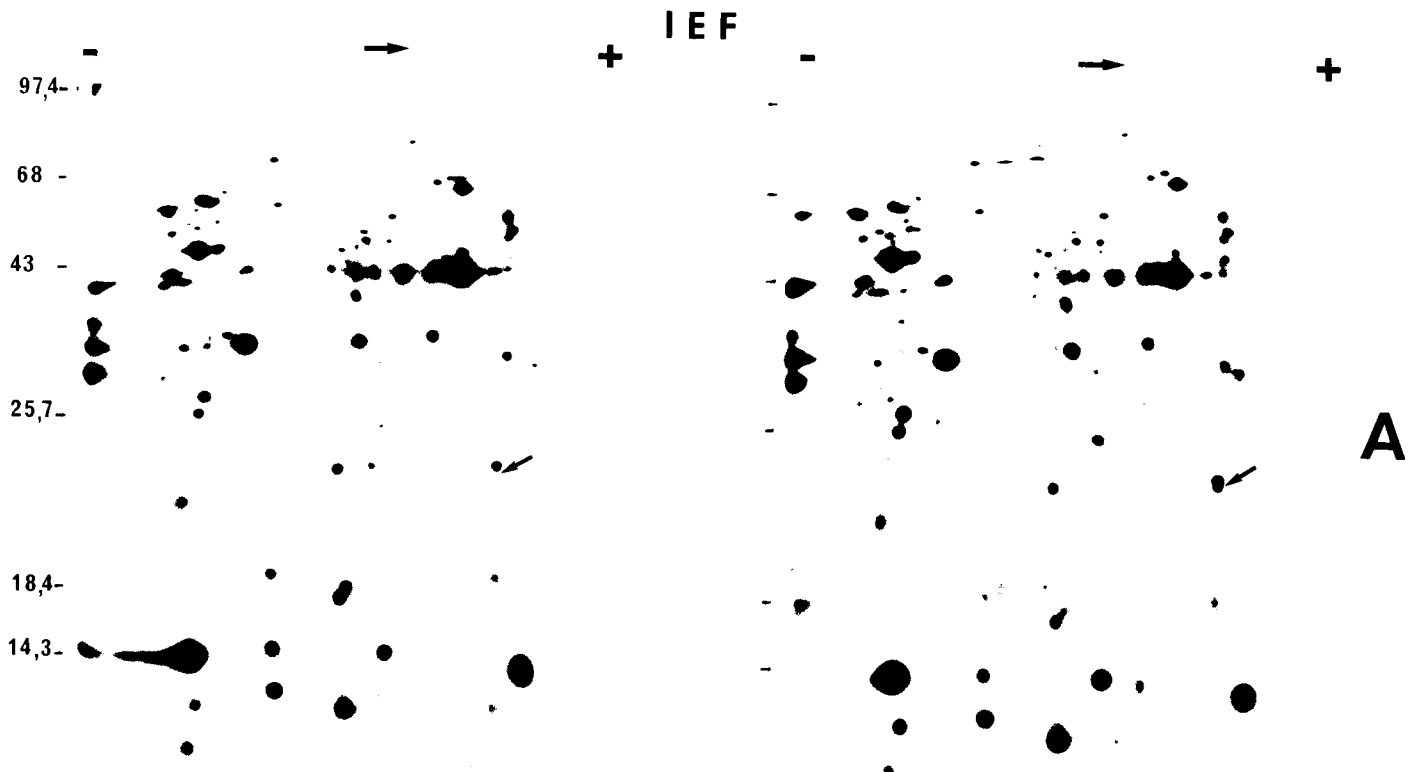


TABLEAU VIII

COMPARAISON DES PROFILS PROTEIQUES DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS D'EOSINOPHILES : Récapitulatif des protéines étudiées.

		COUCHE II / III	COUCHE IV / V / VI
Protéines 51 KD	SDS-PAGE	non détectable	++
	IEF	-	-
	NEPHGE	±	++
	Marquage métabolique	-	-
23-24 KD*	SDS-PAGE	non détectable	non détectable
	IEF	+	-
	Marquage métabolique	+	-
41-43 KD	SDS-PAGE	++	+
Produits de traduction			
22-24 KD*		++	-
16 KD		-	++

* Aucun argument ne peut laisser supposer une identité entre la protéine de 23-24 kD et le polypeptide de 22-24 kD obtenu par traduction des ARNm.

III- TENTATIVE DE CLONAGE DE LA PEROXYDASE

La caractérisation, lors de l'étude comparative des profils protéiques, d'une molécule ayant toutes les propriétés physicochimiques de l'EPO et pouvant être considérée comme un marqueur biochimique de l'hétérogénéité cellulaire, nous a conduit à envisager le clonage de cette molécule. De même, les travaux effectués dans de nombreux laboratoires montrent l'importance de cette molécule dans les fonctions effectrices de l'éosinophile. Les études réalisées sur les conditions de libération de ce médiateur indique que l'EPO est un marqueur de l'activation Ig E dépendante relative aux éosinophiles hypodenses à potentialités cytotoxiques très importantes. La perspective de l'obtention de la séquence de l'EPO en vue de la fabrication de sondes spécifiques permettant le dosage de l'EPO dans toutes les situations cliniques d'hyperéosinophilie était très attrayante. Il faut souligner que l'homologie entre la MPO et l'EPO rend difficile la réalisation de sondes anticorps ne détectant que l'EPO. La séquence pouvait donc nous aider dans la définition d'épitopes spécifiques de cette molécule. Le clonage de cette protéine fut donc entrepris.

La préparation par M. Tomassini dans notre laboratoire, d'un anticorps polyclonal dirigé contre un extrait de protéines cationiques de granules de l'éosinophile nous a apporté une sonde adéquate pour un éventuel criblage d'une banque d'ADNc. Après SDS-PAGE, nous avons pu détecté 5 protéines (50 kD, 30 kD, 19 kD, 17kD et 15 kD) dans les extraits de granules de l'éosinophile, mais l'anticorps testé en Western blot ne reconnaissait qu'une bande à 50 kD, taille de la grande sous-unité de l'EPO.

Les 5 protéines ont alors été microséquencées par l'équipe du Pr Tartar. Du fait de leur homologie avec la myéloperoxydase (MPO) sur les 15 acides aminés N terminaux, les deux bandes majeures (50 et 15 kD), pouvaient correspondre à l'EPO (petite et grande sous-unité). La microséquence effectuée sur les deux autres bandes, montraient que ces deux protéines correspondaient à l'ECP et l'EDN dont un début de séquence de la protéine avait été publié. Aucune homologie n'a été trouvée pour la microséquence de la dernière protéine, présente en très faible quantité. Nous disposions donc d'une sonde anticorps polyspécifique reconnaissant majoritairement la grande sous-unité de l'EPO.

Une banque d'ADNc fut construite à partir de l'ARN total d'éosinophiles humains provenant de deux sujets hyperéosinophiliques. Le vecteur d'expression λ gt11 a été utilisé pour la construction de cette banque permettant, ainsi, le criblage par l'anticorps polyclonal de lapin. Après criblage de 800 000 phages recombinants, trois clones positifs furent isolés (clones 11, 19, 22). Des expériences de Northern blot ont été réalisées avec les trois inserts isolés et purifiés à partir du DNA phagique recombinant. La séquence fut effectuée pour deux des trois clones. Les caractéristiques des clones sont détaillées dans le tableau IX. Les résultats indiquent que les ADNc des 3 clones isolés :

- ne sont pas spécifiques d'éosinophiles.
- ne possèdent aucune homologie avec la séquence de la MPO.
- contiennent la présence de séquences répétitives humaines ou séquences Alu .

Ces éléments nous permettaient de penser que les ADNc ne codaient pas pour l'EPO. Les ADNc (synthétisés à partir des ARN) isolés codent pour des protéines présentes dans l'éosinophile, mais également dans les lignées d'origine lymphocytaire, monocytaire et dans les neutrophiles.

La publication, en parallèle à notre travail, des séquences de l'EPO, ECP, EDN et MBP par différentes équipes nous a permis d'établir l'absence d'homologie entre la séquence de l'EPO et des protéines cationiques d'une part et celle de nos clones d'autre part.

TABLEAU IX

CARACTERISTIQUES DES CLONES 11, 19, 22

	CLONE 11	CLONE 19	CLONE 22
SITE ECO INTERNE	2= 3 FRAGMENTS	2= 3 FRAGMENTS	2= 3 FRAGMENTS
TAILLE	1 230 bp 11.1= 270 bp 11.2= 480 bp 11.3= 580 bp	2 430 bp 19.1= 290 bp 19.2= 440 bp 19.3= 1 700 bp	2 300 bp 22.1= 400 bp 22.2= 500 bp 22.3= 1400 bp
ARNm	3 300-3 400 bp	12 000 et 5 600 bp	2 800-2 900 bp
SPECIFICITE	EOSINOPHILES NEUTROPHILES U 937 JURKAT WIL2 EOL-3 YT	EOSINOPHILES NEUTROPHILES U 937 JURKAT WIL2 EOL-3 YT	EOSINOPHILES NEUTROPHILES U 937 JURKAT WIL2 EOL-3 YT
SEQUENCE "ALU"	+	+	ND
SEQUENCE	1 230 bp -cadre ouvert sur 60 AA -queue poly A -signal de polyadénylation -séquence ALU dans la partie non codante, avant la queue poly A	730 bp	-
HOMOLOGIE AVEC MPO	-	-	ND

**IV- ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm DE L'EOSINOPHILE :
CARACTERISATION DE MARQUEURS DE DIFFERENCIATION.**

Les données de ce travail sont partiellement présentées dans l'article :

Chihara J., Gruart V., Plumas J., Kusnierz JP., Torpier G., Prin L.,
Capron A. & Capron M. Induction of CD23, CD25, and CD4 expression on an
eosinophilic cell line (EoL-3) by interleukin-3, granulocyte-macrophage
colony stimulating factor and interleukin-5. (soumis pour publication).

Après les résultats obtenus lors de la tentative de clonage de l'EPO, un oligonucléotide a été réalisé à partir de la séquence publiée afin de vérifier que l'ARNm codant pour l'EPO était présent dans les éosinophiles des patients hyperéosinophiliques analysés. Il faut en effet souligner ici que le clonage de l'EPO a été réalisé à partir d'une banque d'ADNc de cellules immatures. Aucun résultat de Northern blot n'est montré dans la publication originale. L'étude de l'expression de cet ARNm ainsi que celle d'autres marqueurs a donc été entreprise.

A- ETUDE DES ARN D'EOSINOPHILES

L'étude de ces ARN (et à fortiori la réalisation de la banque d'ADNc) a été rendue difficile par le fait que les éosinophiles expriment très peu d'ARN. Toutes les études ont été faites sur de l'ARN total étant donné le faible taux d'ARN présent. Une étude sur 23 patients, a montré que le taux moyen est de $25,5 \pm 9,8$ μg d'ARN pour 10^8 cellules. Afin de vérifier que les conditions de purification et de culture n'avaient pas affecté le rendement, la comparaison du taux d'ARN a été effectuée dans différentes conditions. Les résultats obtenus sont les suivants:

	Avant purification		Après purification	
	tps 0		tps 0	tps 15h
μg d'ARN/ 10^8 cellules	23		28,6	13,5
% éosinophiles	89%		92%	92%

Les résultats montrent que la purification ne modifie pas significativement le rendement obtenu. Le taux d'ARN total est diminué de moitié après quinze heures de culture. L'intégrité de ces ARN a été vérifiée sur gel d'agarose et dans un système de traduction *in vitro*. La figure 14 illustre un exemple de synthèse de polypeptides à partir de la traduction *in vitro* d'ARN provenant d'un sujet hyperéosinophilique. Les protéines ont été séparées en IEF. Les résultats montrent que la traduction de ces ARN donne naissance à des polypeptides de 10 kD à 100 kD, confirmant ainsi leur intégrité. Sur gel d'agarose, l'observation des ARN ribosomiaux de 28 s et 18 s confirme l'absence de dégradation.

Figure 14 : Analyse en IEF des produits de traduction obtenus à partir d'ARN d'éosinophiles de couche IV d'un sujet hyperéosinophilique.

8.15

6.72

4.40

97A —

68 —

43 —

257 —

184 —

143 —



C4

B-ETUDE EN NORTHERN BLOT DES ARNm D'EOSINOPHILES DE SUJETS HYPEREOSINOPHILIQUES.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ARNm codant pour l'EPO. Une sonde de 40 oligonucléotides choisie à partir de la séquence publiée (1884-1924 pb), a été réalisée et marquée. Les ARN de 12 sujets ont été hybridés avec la sonde et seulement 3 patients possèdent l'ARNm spécifique de l'EPO. Les ARN des autres sujets testés ne présentent aucun signal d'hybridation. La figure 15 illustre le signal obtenu avec les cellules positives. La longueur de l'ARNm reconnu est de 3,2-3,4 kb. Nous pouvons noter que le signal d'hybridation obtenu avec les ARN des sujets 4 et 5 est très faible suggérant un niveau d'expression très bas chez ces 2 patients. L'intensité des ARN ribosomiaux (28s et 18s) observée en UV montre que la quantité d'ARN déposée est sensiblement la même pour toutes les pistes.

A la vue des résultats surprenants obtenus avec la sonde EPO, nous avons voulu savoir si le même phénomène se produisait pour les autres protéines cationiques. Un mélange de 3 oligonucléotides codant respectivement pour la MBP, l'ECP et l'EDN dont les tailles des ARNm sont identiques, a été utilisé comme sonde. L'ARN codant pour ces protéines est détecté sur 4 des 5 patients testés. La figure 15 montre le signal d'hybridation à 1 kb correspondant à la taille des messagers, décrite dans la littérature pour ces trois protéines. Nous pouvons observer que l'intensité des signaux d'hybridation est plus forte qu'avec l'EPO et ceci pour un temps d'exposition des gels moins long. Ces expériences ne permettent pas de dire si le signal d'hybridation reflète l'expression de l'une ou l'autre des trois protéines (MBP, ECP, EDN). Cependant, des résultats préliminaires montrent qu'aucun signal d'hybridation n'est obtenu avec la sonde MBP sur les éosinophiles matures suggérant ainsi que le signal observé avec le mélange des 3 oligonucléotides est dû à la présence de l'ARNm codant pour l'ECP et ou pour l'EDN.

Afin de déterminer si ce phénomène était propre aux ARNm codant pour les protéines cationiques, nous avons examiné l'expression de messagers codant pour d'autres molécules et pouvant être détectés dans les éosinophiles tels que les ARNm codant 1°) pour les antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA I) présents normalement dans toutes les cellules nucléées, 2°) pour le CD4 dont Weller et coll. ont récemment décrit l'existence de la protéine à la surface de l'éosinophile. Les résultats sont présentés dans la figure 15. Ils indiquent que tous les éosinophiles testés sont positifs, aussi bien avec la sonde CD4 qu'avec la sonde HLA I.

Figure 15 : Analyse en Northern blot des ARN provenant d'éosinophiles et de différents types cellulaires. 10 µg d'ARN ont été déposés sur gel. Après électrophorèse et transfert sur nitrocellulose, les ARN ont été hybridés avec des sondes oligonucléotidiques correspondant à l'EPO, l'ECP, l'EDN et la MBP d'une part et des ADNc codant pour le CD4 et l'HLA de classe I d'autre part. Les pistes 1 à 10 correspondent aux ARN des cellules suivantes:

1 : lignée YT.

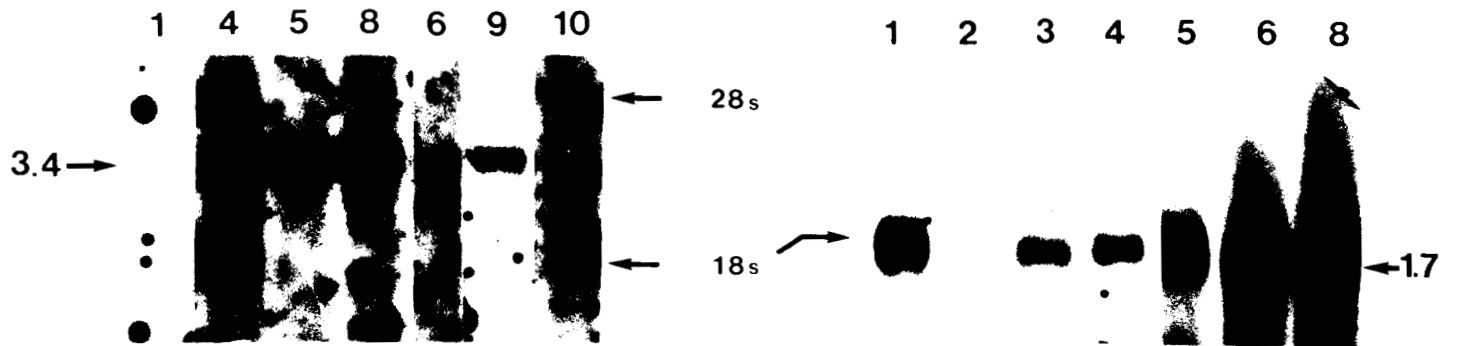
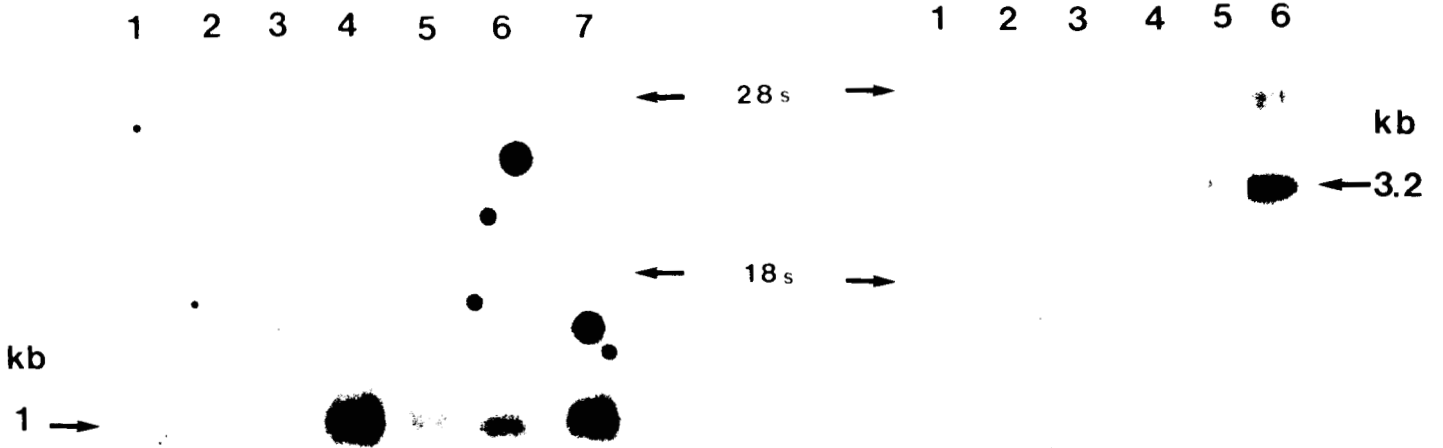
2 : lignée U937.

3 : neutrophiles

4 à 10 : éosinophiles provenant de 7 patients différents.

ECP-EDN-MBP

EPO



CD 4

HLA

C- ETUDE DES ARNm AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des ARN codant pour l'EPO sur des éosinophiles matures et les données de la littérature concernant le clonage de l'EPO dans des cellules immatures, nous permettaient de penser que l'expression de cet ARNm pouvait varier au cours de la différenciation cellulaire. En effet, le clonage de l'EPO à partir de précurseurs hématopoïétiques laissait penser que cet ARNm était présent dans les cellules immatures. L'hypothèse d'une synthèse d'EPO n'intervenant qu'au stade de différenciation cellulaire (promyélocyte....) conduisant à un stockage de la protéine dans les granules, et à une absence de néosynthèse de la protéine dans les cellules matures fut envisagée. Deux approches furent entreprises pour vérifier cette hypothèse :

- La première consistait en l'étude de l'expression de l'EPO mais également d'autres marqueurs cellulaires (protéines cationiques, CD4, CD25 et CD23) au cours de la différenciation de la lignée éosinophile EoL-3 induite par les facteurs responsables de l'éosinopoïèse (IL-3, GM-CSF et IL-5).

- La deuxième, fut l'étude de l'expression de ces marqueurs au cours de la différenciation, de précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon. Ce système offre l'avantage de travailler dans des conditions plus proches de l'éosinophilopoïèse normale.

1- la lignée EoL-3

La lignée nommée EoL-3 est une lignée établie à partir de cellules d'un patient ayant une "leucémie à éosinophiles". Les cellules de cette lignée sont des cellules morphologiquement très indifférenciées et permettent donc d'aborder l'étude de la différenciation cellulaire des éosinophiles. Dans ce modèle expérimental, nous avons cultivé la lignée EoL-3 en présence d'interleukines responsables de l'éosinophilopoïèse (IL-3, GM-CSF et IL-5). Ces facteurs de

croissance ont été ajoutés au milieu de culture de façon séquentielle en commençant par l'IL-3 puis le GM-CSF et enfin l'IL-5, selon le protocole décrit dans le paragraphe matériel et méthodes. L'expression des ARNm codant pour les protéines cationiques a été étudiée en Northern blot au cours de la différenciation. Aucun ARN spécifique de ces protéines n'a pu être détecté sur les cellules avant ou après culture avec les interleukines. Un contrôle négatif représenté par la sonde ADNc codant pour la MPO avait été inséré dans l'expérience. De façon intéressante, cette sonde donne un signal d'hybridation avec les cellules EoL-3, avant et après différenciation avec les interleukines (figure 18).

En parallèle à cette étude sur les protéines cationiques, nous avons suivi la différenciation cellulaire vers la lignée éosinophile, grâce à l'apparition de marqueurs cellulaires intéressants les éosinophiles tels que 1) le CD23 dont l'existence et la participation dans les fonctions effectrices de l'éosinophile a largement été démontré (95), 2) le CD4 décrit à la surface des éosinophiles (112), 3) le CD25 dont la présence pouvait être suspectée à la suite de la démonstration de l'existence du récepteur de l'IL-2 soluble chez les patients hyperéosinophiliques (176).

Une évolution dans l'apparition de ces marqueurs au cours de la culture en présence des interleukines a pu être observée. Cette étude, effectuée au cytofluoromètre montre une augmentation séquentielle de ces protéines de surface au cours de la différenciation (figure 16). IL-3 et GM-CSF font d'abord apparaître le CD23 de façon très importante mais également le CD25 et le CR3 (plus faiblement). Aucun effet n'est observé sur le CD4. Lorsque l'IL-5 est ajouté au milieu de culture, le pourcentage de cellules positives pour le CD23, CD25 et le CR3 augmente encore et des cellules positives pour le CD4 apparaissent. Il est à noter que chaque interleukine seule n'a aucun effet sur l'apparition de ces marqueurs. La figure 17-A illustre les résultats obtenus après culture avec l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5. L'intensité de fluorescence est visualisée pour chaque marqueur après 6 jours de culture en présence des 3 interleukines. Nous pouvons observer que celle-ci augmente encore entre le sixième et le douzième jour de culture avec ces 3 interleukines (figure 17-B).

Nous avons alors suivi l'apparition de ces marqueurs au niveau des ARNm codant pour ces protéines. La figure 18 montre que les résultats obtenus en Northern blot corrélaient parfaitement avec l'étude des protéines de surface. L'expression des différents messagers est détectable par hybridation, dans les cellules cultivées en présence des 3 interleukines alors qu'aucun signal n'est obtenu dans les cellules avant différenciation par les interleukines. Le contrôle d'hybridation par l'actine et la photographie des ARNm en UV indiquent que la même quantité d'ARN a été déposée sur les gels.

Les ARNm détectés sont de tailles identiques à celles décrites dans la littérature :

CD23 = 1,7 kb. CD25 = 3,5 et 1,7 kb. CD4 = 3,4 kb. actine = 1,8 kb.

Cette évolution dans l'apparition des marqueurs est accompagnée par des modifications physiologiques observables au microscope électronique. La différenciation se traduit par une polylobulisation du noyau et une apparition de granules denses.

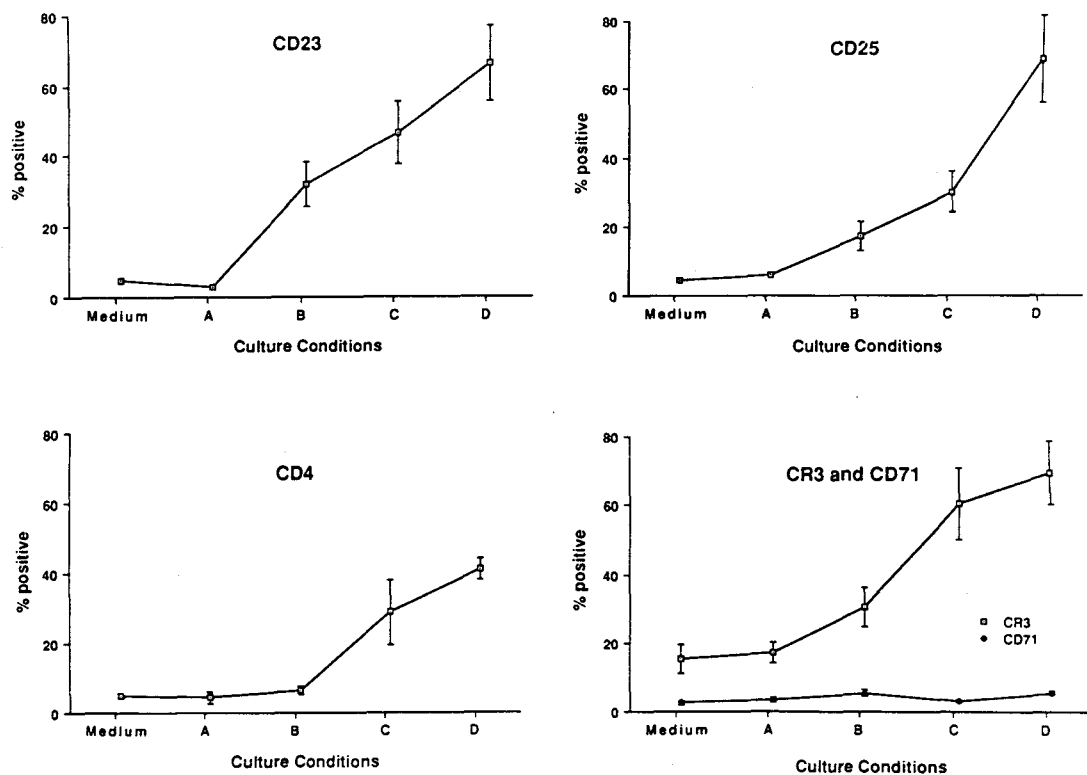


Figure 16 : Induction de CD23, CD25, CD4, CD11b (CR3) et CD71 sur les cellules EoL-3 après addition séquentielle d'IL-3, GM-CSF et IL-5. Les cellules sont cultivées en l'absence de cytokines (milieu), avec IL-3 pendant 6 jours (A), puis avec IL-3 et GM-CSF pendant les 6 jours suivants (B) enfin avec IL-3, GM-CSF et IL-5 pendant les 6 (C) ou 12 derniers jours (D). A chaque étape, les cellules sont incubées avec anti-CD23, anti-CD25, anti-CD4, anti-CD11b ou anti-CD71, et marquées ensuite avec un anti-Ig G de souris FITC. Les résultats représentent le % de cellules positives + SD (4 expériences).

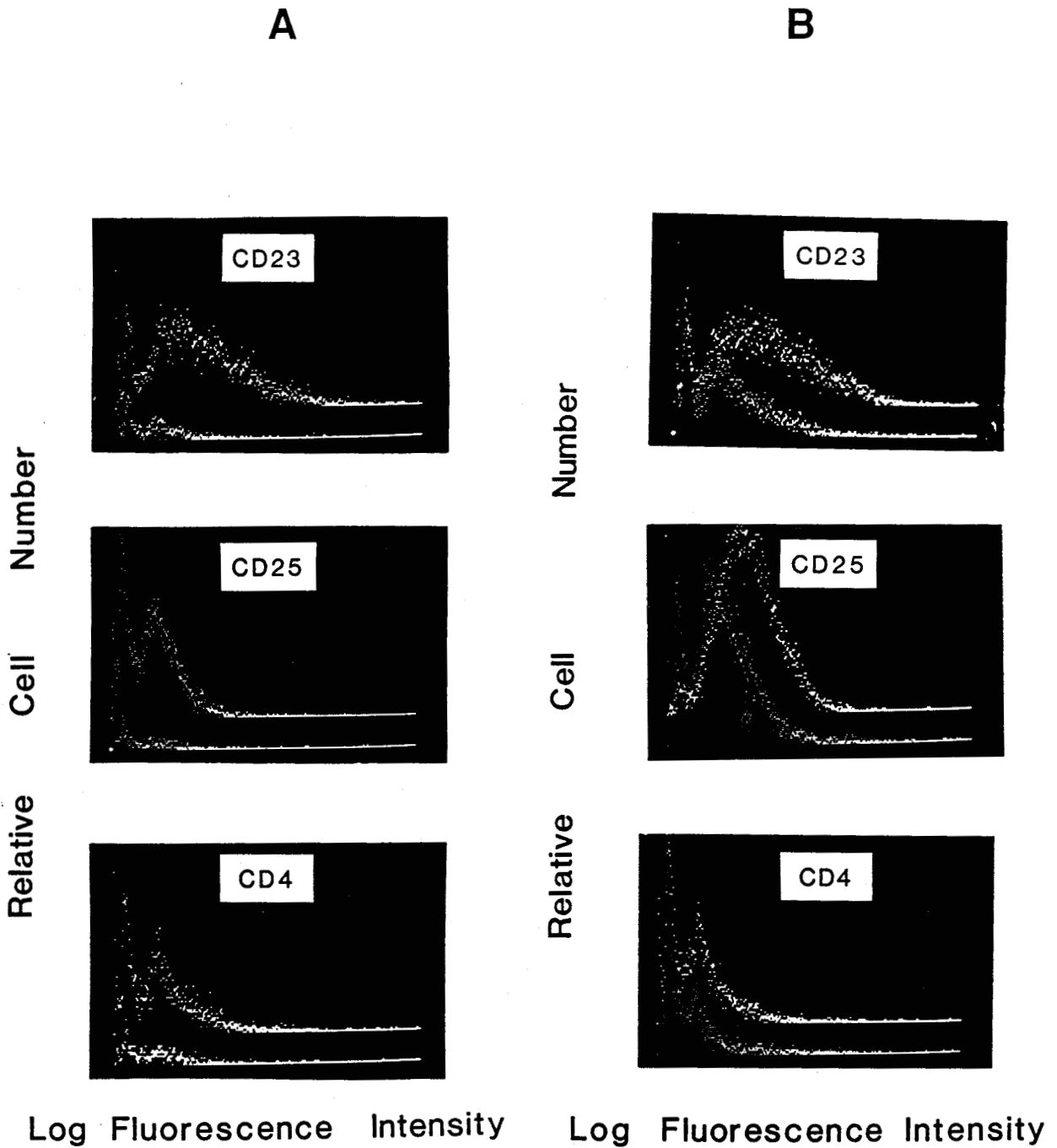


Figure 17 -A : Etude en cytofluorimétrie de l'expression de CD23, CD25 et CD4 sur la lignée cellulaire EoL-3 cultivée en l'absence de lymphokines (courbe du bas) ou en présence d'IL-3, GM-CSF et IL-5 (courbe du haut).

Figure 17 -B : Comparaison de l'expression de ces marqueurs après 6 jours de culture (courbe du bas) et 12 jours de culture (courbe du haut) en présence d'IL-3, GM-CSF et IL-5 .

Figure 18 : Analyse en Northern-blot des ARN de la lignée EoL-3 cultivée en l'absence de cytokines (-) ou avec IL-3, GM-CSF et IL-5 (+). 10 µg d'ARN ont été déposés sur gel et hybridés avec les sondes d'ADNc suivantes :

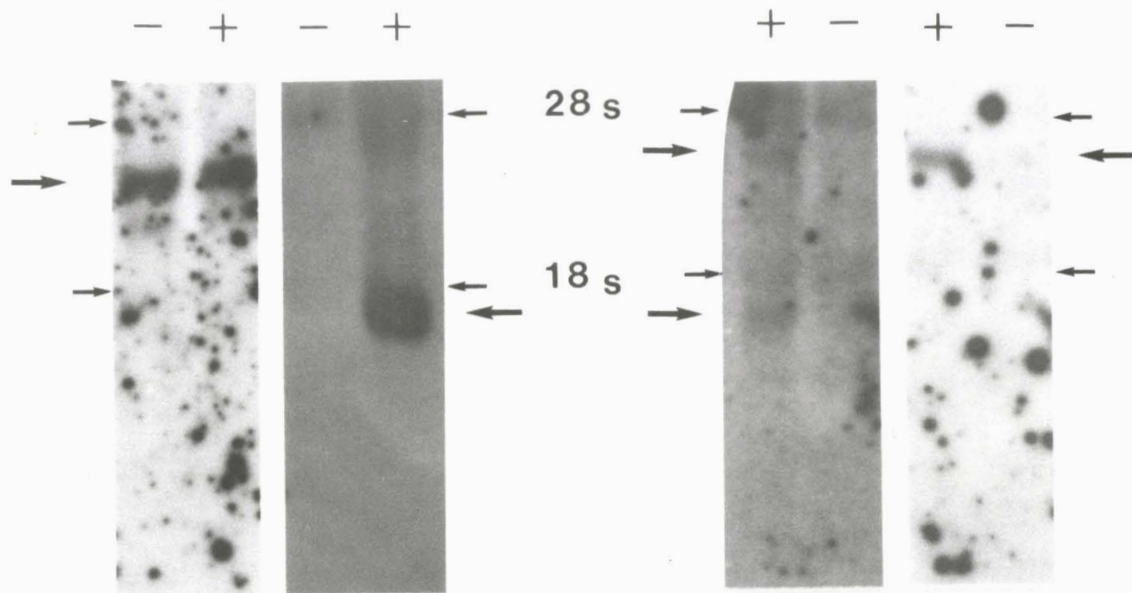
1: MPO

2: CD 23

3: CD 25

4: CD 4

β-actine



1

2

3

4



β -actine



2- les cellules de sang de cordon ombilical.

Afin de s'approcher des conditions physiologiques, nous avons mis au point la culture des précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical. Une différenciation cellulaire vers la lignée éosinophile est obtenue après culture en présence d'IL-3, GM-CSF et IL-5. Nous pouvons observer différentes étapes de la différenciation de l'éosinophile : blastes, promyélocytes, métamyélocytes et éosinophiles. Cette différenciation se traduit par une perte de la coloration bleue du cytoplasme, une diminution du rapport nucléo-cytoplasmique et une transformation de la forme du noyau rond et volumineux vers un noyau plus petit et segmenté. L'évolution vers la lignée éosinophile est suivie par coloration des lames de cyto centrifugation au RAL et à l'aide d'une coloration spécifique de l'EPO. Cette méthode est basée sur la résistance de l'activité peroxidasique de l'EPO en présence de cyanure. Le pourcentage de cellules positives pour l'EPO augmente en fonction du temps de culture. La cinétique d'apparition de l'EPO obtenue au cours d'une des cultures est présentée dans le tableau suivant :

Jours de culture	:	J 0	J 7	J 10	J 15	J 21	J 27

cellules EPO ++	:	0 %	32 %	52 %	67 %	75 %	81 %

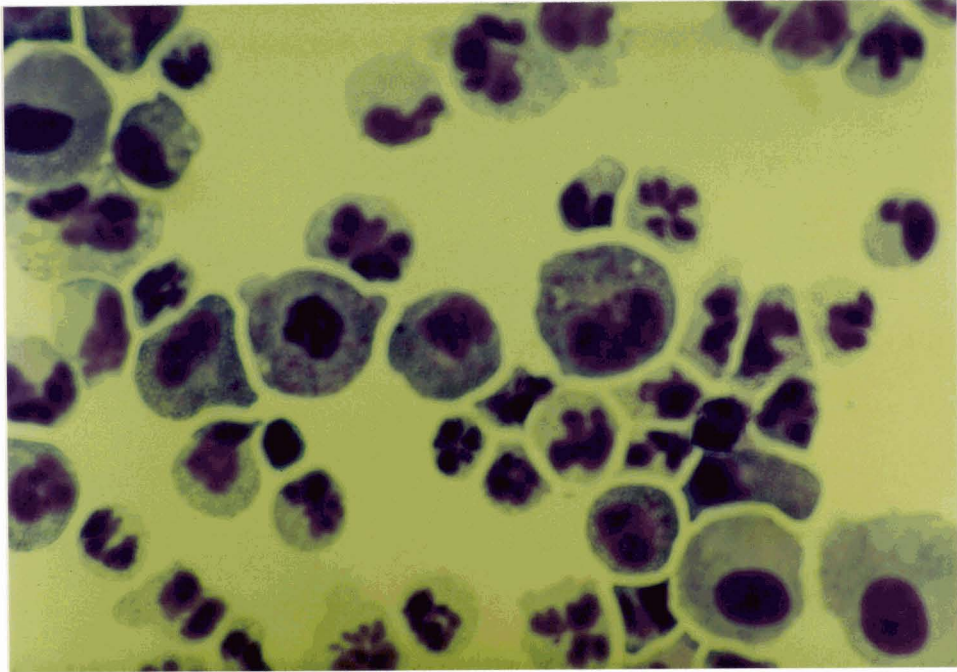
Cette cinétique varie légèrement selon les cultures testées.

La figure 19-A montre les cellules après 15 jours de culture. Les lames sont colorées au RAL. Nous pouvons observer la présence de cellules jeunes de la lignée éosinophile (myélocytes..), mais également la présence d'autres populations cellulaires (lymphocytes, neutrophiles....). Sur la figure 19-B, la coloration spécifique de l'EPO permet de mieux appréhender les cellules de la lignée éosinophile.

En parallèle aux études morphologiques, nous avons suivi l'apparition des ARNm codant

pour l'EPO au cours de la cinétique de culture. Un signal d'hybridation est obtenu, après 10 jours de culture en présence des interleukines. Ce signal est maximum du 15^{ème} au 21^{ème} jour et diminue ensuite entre le 21^{ème} et le 27^{ème} jour de culture. De la même façon, le taux d'ARN total diminue entre le 21^{ème} et le 27^{ème} jour (3.84 $\mu\text{g} / 10^6$ cellules à 21 jours et 1,2 $\mu\text{g} / 10^6$ cellules à 27 jours). Les photographies des gels en UV montre que les quantités d'ARN déposées sont sensiblement les mêmes pour chaque condition. Des résultats préliminaires identiques ont été obtenus avec la MBP.

A



B

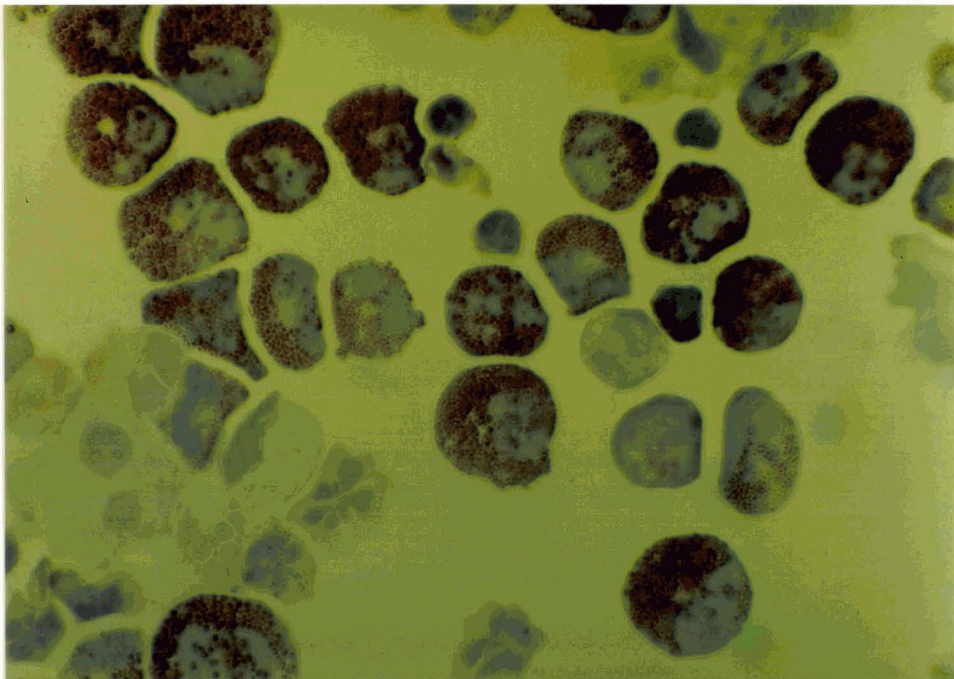


Figure 19 : Les photographies illustrent les différentes populations cellulaires obtenues après 15 jours de culture des précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical, en présence d'interleukines. Après coloration au RAL (photographie A), nous pouvons distinguer les cellules de la lignée éosinophile. La coloration de l'EPO rend plus aisée la distinction de ces cellules (photographie B). Les lames sont observées à l'aide de l'objectif à immersion (x100).

EPO



Figure 20 : Cinétique de différenciation des précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical, obtenue par culture des cellules avec l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5. L'apparition d'EPO (J0 à J27) est suivie en Northern blot par hybridation avec un oligonucléotide spécifique de l'EPO.

DISCUSSION

L'hétérogénéité des éosinophiles a été essentiellement mise en évidence au cours de divers syndromes hyperéosinophiliques. La possibilité de purifier des sous-populations d'éosinophiles différant par leur densité, a permis la réalisation d'études fonctionnelles sélectives. Ainsi, ont été isolés des éosinophiles de faible densité ou "hypodenses" (cellules activées à potentialité cytotoxique élevée) distincts des éosinophiles normodenses, sédimentant dans des gradients de plus haute densité (cellules non activées, peu cytotoxiques). Néanmoins, malgré de nombreuses études réalisées par différentes équipes, il est difficile aujourd'hui de savoir si les éosinophiles hypodenses diffèrent des éosinophiles de densité normale par leur état d'activation ou de différenciation. De manière à établir une analyse plus fine, nous avons tenté de définir les bases moléculaires de cette hétérogénéité, en étudiant les profils protéiques de chacune des (sous) populations, par électrophorèse mono et bidimensionnelle. Il faut souligner que l'ensemble des données relatives à l'hétérogénéité des éosinophiles reposent sur des critères morphologiques ou biologiques tels que les variations du métabolisme oxydatif, ou du potentiel cytotoxique, mais il existe, en fait, très peu de données en ce qui concerne la description de marqueurs spécifiques de ces sous-populations.

Lors de ce travail, nous avons tenté d'identifier et de caractériser des marqueurs d'activation de l'éosinophile ou de ses sous-populations. Plusieurs aspects ont été abordés. Le premier, basé sur des méthodes biologiques, a été la variabilité de réponse à certaines interleukines, notamment produites par les lymphocytes T puisque l'on connaît leur importance dans la réponse éosinophile. La seconde approche, plus biochimique, a été de caractériser l'existence de protéines spécifiques de chacune des sous-populations hypodenses et normodenses. Enfin, une approche utilisant les outils de la biologie moléculaire, a concerné l'étude des ARNm codant pour différentes protéines fonctionnelles comme la peroxydase et leur suivi au cours de la différenciation cellulaire.

I- EFFETS D'HILDA SUR LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE L'EOSINOPHILE.

De nombreux travaux ont déjà souligné les effets d'interleukines comme l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sur la différenciation et l'activation de la lignée éosinophile. Au cours de ce travail, nous avons testé l'activité d'une cytokine originale dénommée HILDA. C'est une molécule purifiée à partir de surnageants de clones T alloréactifs humains issus de rejet de greffe de rein. L'apparition d'éosinophiles précédant la survenue du rejet de greffe, ainsi que des résultats préliminaires sur l'effet chimiotactique de cette molécule *in vivo* (148), nous ont conduit à étudier les effets d'HILDA sur différents paramètres d'activation de l'éosinophile. Les travaux présentés ici ont été effectués avec la molécule native, purifiée jusqu'à l'homogénéité et ne présentant qu'une seule bande électrophorétique après coloration au nitrate d'argent. Des tests fonctionnels préalables permettaient de conclure qu'HILDA ne ressemblait à aucune autre interleukine connue.

Hilda a été étudiée sur les éosinophiles de différentes sous-populations afin de préciser si son activité s'exerçait indépendamment de leur état d'activation initial. Nous avons pu montrer l'effet stimulant d'HILDA sur les principales fonctions de l'éosinophile. HILDA active, en effet, la chimioluminescence (CL), le chimiotactisme, la cytotoxicité et la libération d'EPO de façon dose-dépendante sur toutes les populations d'éosinophiles testées. Cependant, les expériences de CL, chimiotactisme et libération d'EPO montrent un seuil de sensibilité et une cinétique de réponse différents parmi les éosinophiles.

Une élévation de la CL (inhibée par la super oxyde dismutase et la catalase) est observée avec HILDA et ceci, quelque soit le niveau de CL de base. Ce dernier paramètre permet d'évaluer avec précision le niveau d'activation cellulaire : les éosinophiles normodenses peu activés ont un niveau de CL de base faible alors que les éosinophiles hypodenses ont un niveau de CL de base élevé (119). L'intensité de réponse obtenue n'est pas corrélée à une sous-population particulière. Cependant, une différence dans les cinétiques d'activation peut être observée. Les éosinophiles normodenses ont une réponse en CL qui augmente au cours du temps contrairement

aux éosinophiles hypodenses. Ce phénomène peut être comparé à la stimulation par le PMA vis à vis duquel les éosinophiles hypodenses répondent moins bien que les éosinophiles normodenses (119). Cette hypo-réactivité, propre aux éosinophiles hypodenses, pourrait être due à une diminution intracellulaire soit du substrat, soit des enzymes intervenant dans le métabolisme oxydatif, par suite d'une activation préalable intervenue *in vivo*.

Nos études effectuées avec HILDA sur le chimiotactisme *in vitro* confirment les résultats obtenus par Moore et coll. sur le chimiotactisme des éosinophiles *in vivo* (148). Une divergence apparaît cependant au niveau de l'activité chimiotactique d'HILDA sur les neutrophiles *in vivo*, décrite par ces auteurs, que l'on ne retrouve pas *in vitro*. Cet effet pourrait être dû à un facteur chimiotactique pour les neutrophiles produit par une autre cellule (relais cellulaire) stimulée *in vivo* par HILDA. Les éosinophiles répondent différemment selon leur niveau de chimiotactisme de base. L'hypothèse d'une déactivation cellulaire *in vivo* peut être évoquée. Ce phénomène a déjà été démontré lors de la description *in vitro* d'un facteur sérique pour les éosinophiles et neutrophiles présent dans les sérums de sujets ayant une HES (139).

L'exocytose des médiateurs montre que les cellules libèrent de l'EPO en réponse à HILDA. Cette libération est inversement proportionnelle au niveau d'activation cellulaire. Lors des expériences de libération d'EPO mais également de chimiotactisme, une hétérogénéité au niveau de l'état d'activation cellulaire à l'intérieur d'une sous-population a été observée, suggérant que la purification sur gradient de densité ne conduit pas à des populations totalement homogènes. Cette hétérogénéité à l'intérieur d'une même sous-population est également observée lors des marquages métaboliques où nous pouvons remarquer une activation de la synthèse protéique plus élevée pour un des deux sujets. De plus, cette stimulation est liée à une libération accrue des protéines synthétisées dans le milieu extracellulaire. Celle-ci pourrait correspondre à une exocytose de médiateurs spécifiques de l'éosinophile.

En parallèle à notre travail, le clonage d'HILDA a permis d'obtenir la molécule recombinante (177). De façon surprenante, celle-ci ne possède aucun effet sur les diverses

fonctions de l'éosinophile, tout en conservant son activité sur la prolifération de la lignée DA₂ de souris, test de référence pour l'activité HILDA. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces faits :

- Les différences de structure entre la molécule native et recombinante au niveau des modifications post-traductionnelles (glycosylation....) peuvent contenir les informations nécessaires à l'activation des éosinophiles sans être le support de l'activité sur la lignée DA₂.

- La "contamination" de la préparation d'HILDA native par une autre molécule non détectable sur gel ou par activité biologique, pourrait expliquer l'activité obtenue sur les éosinophiles. Cette hypothèse avait été soigneusement vérifiée vis à vis des molécules connues comme étant actives sur la lignée éosinophile. L'IL-5 connue à l'époque sous le nom d'EDF était capable de faire proliférer la lignée DA₂, cependant, aucune activité de facteur de croissance des éosinophiles n'avait pu être décelée écartant ainsi l'hypothèse de la contamination d'HILDA par de l'IL-5. D'autre part, le BCGF_{II} (maintenant IL-5) et l'IL-3 ne correspondaient pas aux caractéristiques biochimiques d'HILDA. Enfin, la présence de GM-CSF et d'IL2 avait été écartée par l'absence de réponse proliférative de ces molécules vis à vis de la lignée DA₂.

L'hypothèse de la "contamination" par une autre molécule semble actuellement la plus probable puisque HILDA a maintenant été identifiée au LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et à un facteur inhibant la différenciation (DIA) des cellules embryonnaires (177) ne possédant aucune activité sur l'éosinophile.

Toutefois, la description et l'isolement du facteur responsable de l'activité biologique observée sur les éosinophiles restent intéressants. Il faut souligner ici qu'HILDA est une molécule humaine testée sur des cellules DA₂ de souris. L'hypothèse d'un facteur contaminant humain possédant une activité plus importante lorsqu'il est testé dans un système homologue (éosinophiles humains) ne peut être écartée. Dans tous les cas, la molécule contaminante doit être très faiblement présente au niveau de la préparation d'HILDA native et sera difficilement identifiable.

II- ANALYSE DES PROFILS PROTEIQUES.

Lors de l'analyse de l'activité de HILDA, nous avons soulevé le problème d'une hétérogénéité à l'intérieur même des différentes sous-populations. Nous nous sommes alors intéressés à leur analyse biochimique en établissant leurs profils protéiques.

La préparation des extraits cellulaires a été réalisée avec un détergent non-ionique, le NP40. Il était important dans nos expériences d'étudier l'ensemble des protéines de l'éosinophile afin de ne pas nous focaliser sur les protéines cationiques. L'utilisation de ce détergent n'empêche pas l'extraction des protéines cationiques puisqu'une étude récente a montré que le NP40 pouvait être utilisé pour les solubiliser (178).

L'analyse des profils protéiques en SDS-PAGE de différents extraits d'éosinophiles, permet de détecter la présence d'une protéine de 51 kD dans les éosinophiles de densité élevée (normodenses et intermédiaires, couches IV à VI). En revanche, seule l'électrophorèse bidimensionnelle (plus sensible) permet de visualiser cette protéine dans les extraits d'éosinophiles hypodenses. La participation des cellules contaminantes dans ces observations peut être éliminée puisque le degré de pureté en éosinophiles est sensiblement le même pour certaines couches III et IV, et peut aller jusqu'à 98 % d'éosinophiles. Cette observation n'est pas due aux conditions de culture de ces cellules puisque des résultats identiques sont obtenus lorsque des extraits cellulaires sont préparés immédiatement après purification. Cette variation dans le profil protéique n'est pas liée à la pathologie des sujets hyperéosinophiliques car cette protéine est retrouvée quelque soit l'origine des éosinophiles.

L'identification de la protéine de 51 kD a été rendue possible grâce à ses caractéristiques biochimiques. L'élément déterminant a été la nature très basique de cette protéine observée en électrophorèse bidimensionnelle. De plus, la reconnaissance d'une protéine à 51-53 kD par un anticorps anti-EPO dans les extraits de couche IV d'une part, corrélée à l'activité peroxydasique plus intense dans ces mêmes extraits d'autre part, ont permis de penser que cette molécule pouvait s'apparenter à l'EPO, protéine cationique de l'éosinophile. L'EPO est

localisée dans la matrice des granules qui entoure le core constitué de MBP (48). Elle a un poids moléculaire de 72 kD, un $pI > 11$ et contient deux sous-unités de 55 kD et 15 kD (49,50). Le poids moléculaire de la grande sous-unité correspond à celui de la protéine décrite dans ce travail. Aucune différence n'a été retrouvée aux environs de 15 kD mais l'importance du nombre de protéines cationiques de même poids moléculaire pourrait expliquer l'absence de variation au niveau de la petite sous-unité de l'EPO. Ce fait pourrait être également le résultat d'un mécanisme d'activation mettant uniquement en jeu la grande sous-unité de l'EPO qui contient le site catalytique de l'enzyme(52).

L'altération dans le profil protéique des éosinophiles de plus faible densité pourrait correspondre à une exocytose de l'EPO *in vivo*. Des études ont démontré que les éosinophiles hypodenses possédaient de plus petits granules, et un contenu en MBP plus faible(179,180). Nos résultats suggèrent un rôle préférentiel de l'EPO chez tous les patients, pouvant être relié à un processus d'activation *in vivo*. Des travaux ultérieurs démontrent la libération sélective d'EPO par des éosinophiles hypodenses après activation spécifique IgE-dépendante (133). L'apparente contradiction entre la quantité de peroxydase plus faible chez les hypodenses et leur plus grande capacité à libérer leur EPO lors de stimulation IgE spécifique peut être discutée en fonction des résultats obtenus avec les éosinophiles de rat (86). En effet, des éosinophiles péritonéaux de rat purifiés à des temps différents de l'infection par *Schistosoma mansoni* possèdent des taux intracellulaires d'EPO variables. Par contre, le maximum d'EPO libéré lors de la stimulation IgE spécifique est obtenu avec les éosinophiles dont le contenu en EPO est le plus faible.

Le rôle de l'EPO est également très important lors de la mesure de la chimioluminescence totale des éosinophiles. Cette méthode permet d'étudier le métabolisme oxydatif global dans lequel intervient l'EPO. La faiblesse de réponse observée en chimioluminescence avec les éosinophiles hypodenses par rapport aux éosinophiles normodenses, lors de la stimulation par le PMA, pourrait être en relation avec la diminution de la quantité d'EPO dans les éosinophiles hypodenses. De plus, la diminution de la cinétique de

réponse en chimioluminescence des éosinophiles hypodenses lors de la stimulation par HILDA, pourrait également être corrélée à des variations de quantités d'EPO dans ces cellules. Cette différence de taux intracellulaires d'EPO représenterait le résultat d'un processus d'activation cellulaire induisant une exocytose d'EPO *in vivo* et conduisant ainsi à l'obtention d'éosinophiles hypodenses. La diminution de la quantité de protéines cationiques avait déjà été soulevée par Venge et coll. dans les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques (181).

A côté de cette protéine de 51 kD ayant toutes les caractéristiques biochimiques de l'EPO, d'autres différences existent dans les profils protéiques. Tout d'abord, une protéine de 41 kD dont l'expression est plus élevée dans les éosinophiles hypodenses par rapport aux éosinophiles normodenses et une protéine de 23 kD, de pI 6,3 - 6,5 détectable uniquement dans les éosinophiles de faible densité, après électrophorèse bidimensionnelle (IEF). La protéine de 23 kD ne peut toutefois être visualisée qu'après coloration au nitrate d'argent, suggérant ainsi un très faible niveau d'expression. Ces protéines n'ont pas pu être identifiées à des protéines connues. Cependant, une étude récente effectuée par Ramesh et coll. a montré l'existence d'une néosynthèse de protéines de 24 et 43 kD après activation par du zymosan opsonisé (79). La similitude entre le poids moléculaire des protéines décrites par ces auteurs et celles décrites dans notre travail est à souligner puisque dans les 2 cas, ces protéines sont présentes dans des cellules activées. L'étude de la néosynthèse protéique suggère que la protéine de 23 kD est synthétisée après 16 h de culture contrairement à la protéine de 51 kD. Au niveau de l'étude effectuée sur la traduction des ARNm, un polypeptide de 24,3 kD est présent également dans les cellules activées. Aucun élément ne nous permet d'affirmer une identité entre ces deux molécules. Seule, la production d'un anticorps dirigé contre la protéine présente dans les extraits cellulaires et pouvant immunoprécipiter le polypeptide dans les produits de traduction permettrait de conclure. Ces protéines de 23 et 41 kD identifiées dans les éosinophiles apparaissent spécifiques de cellules activées.

Les expériences effectuées lors de la stimulation par HILDA montre que cette activation entraîne l'apparition de la protéine de 23 kD dans des éosinophiles de couches IV

(intermédiaires). La coloration des gels au nitrate d'argent permettrait de détecter une éventuelle diminution dans la quantité d'EPO, pouvant refléter les différences entre cellules activées et non activées. La protéine de 23 kD traduit d'un point de vue biochimique l'activation engendrée par HILDA (ou son contaminant).

La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines, pourrait fournir un outil intéressant afin d'analyser les mécanismes intervenant dans les fonctions exprimées par les éosinophiles. Ces anticorps pourraient permettre l'identification de sous- populations activées *in situ* en pathologie. Selon le même principe, il serait envisageable d'étudier les profils protéiques des éosinophiles liés à des pathologies bien précises (allergies, parasitoses, angéite de Churg et Strauss, hémopathies etc.). Dans ce contexte, quelques marqueurs biologiques précis ont déjà été définis. En effet, le syndrome Hyperéosinophilique (HES) regroupe un ensemble très hétérogène de pathologie aux risques évolutifs très différents. Certaines formes d'HES, de bon pronostic, sont souvent sensibles au traitement par les corticoïdes. D'autres formes évoluent vers des lésions viscérales graves (cardiopathies, neuropathies....) ou des leucémies aiguës ou des lymphomes T. Elles sont souvent résistantes à la corticothérapie. Nous disposons de peu de marqueurs "clinicobiologiques" discriminants. Dans les formes graves dites "myéloprolifératives", on note l'existence de taux élevés de vitamine B12 sérique, un effondrement du score des phosphatases alcalines leucocytaires (182) et plus récemment une élévation du taux du récepteur de l'IL-2 soluble (176). Nous avons également pu mettre en évidence une absence de récepteur pour les glucocorticoïdes dans les éosinophiles de sujets présentant une forme maligne corticorésistante d'HES (110).

III- TENTATIVE DE CLONAGE DE L'EPO.

De nombreux travaux montrent l'importance du rôle de l'EPO dans les fonctions effectrices de l'éosinophile. De même, la caractérisation, dans les profils protéiques, d'une protéine ayant toutes les caractéristiques biochimiques de l'EPO, nous a incité à effectuer le clonage de cette molécule. Une banque d'ADNc construite à partir d'ARN d'éosinophiles de patients hyperéosinophiliques a été réalisée. C'est l'hypothèse d'une hétérogénéité moléculaire de l'EPO qui nous a conduit à adopter cette stratégie. En effet aucune évidence directe ne laissait supposer l'existence d'une molécule unique dans l'activité peroxidasique de l'éosinophile.

Le criblage de la banque par l'anticorps polyclonal anti-protéines cationiques a abouti à l'obtention de 3 clones. Les études en Northern blot ont montré que ces clones n'étaient pas spécifiques d'éosinophiles. De plus, le séquençage effectué sur la totalité de l'insert d'ADNc du clone 11 et sur des fragments de l'insert d'ADNc du clone 19, indiquait l'absence d'homologie avec les peroxydases connues. Par la suite, la publication des séquences d'ADNc de l'EPO d'une part (53) et du gène complet d'autre part (54) a confirmé l'absence d'homologie complète de nos séquences avec l'EPO. La positivité des clones peut s'expliquer par la présence d'épitopes présents sur l'EPO et communs à d'autres protéines. Elle peut être aussi liée à la "contamination" dans les protéines d'immunisation, de molécules très immunogènes en quantité faible et non détectable. Si ces hypothèses peuvent expliquer la reconnaissance des clones par l'anticorps, elles ne suffisent pas à expliquer l'absence de clones pour l'EPO. En effet, l'EPO est présente dans les éosinophiles et reconnue par l'anticorps en Western blot dans les extraits cellulaires.

Les clones isolés restent cependant intéressants puisque la comparaison des séquences avec les banques de données, montre que ces clones codent pour des protéines non clonées à ce jour. La confection de cette banque aura, d'autre part, permis le clonage dans notre laboratoire d'un antigène de classe I (non-classique) du complexe majeur d'histocompatibilité dans

l'éosinophile (Truong M.J., Gruart.V et al, manuscrit en préparation).

La séquence des différents clones, obtenue à partir de cette banque a également mis en évidence l'existence de 3 séquences Alu parmi 5 clones isolés. Ces séquences Alu sont des séquences répétitives dont on ne connaît pas encore le rôle, mais que l'on ne retrouve généralement pas dans les ADNc (184). L'importance du nombre de séquences Alu détectées dans les ADNc des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques sera à reconsidérer en fonction de l'évolution des connaissances sur ce sujet.

IV- ETUDE DES ARNm

La publication de la séquence de l'EPO mais également des autres protéines cationiques, nous a permis de synthétiser des oligonucléotides afin d'étudier en Northern blot les variations d'expression des ARNm. De façon très surprenante, l'ARNm de l'EPO fut détecté chez seulement 3 des 12 sujets testés. Ce fait pouvait donc expliquer pourquoi aucun clone codant pour l'EPO n'avait été obtenu lors du criblage de la banque. L'absence de néosynthèse observée lors des marquages métaboliques pouvait être également interprétée par une absence d'ARNm.

A l'inverse, l'expression d'autres ARNm a pu être détectée sur tous les éosinophiles testés en présentant des signaux d'hybridation intenses. C'est le cas du CD4 dont l'expression des ARNm confirment les travaux de Weller et coll. décrivant le CD4 à la surface de l'éosinophile et le cas de l'expression des ARNm codant pour les antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité présents normalement à la surface de toutes les cellules nucléées. Ces résultats permettent de déduire que la très faible expression des ARNm de l'EPO n'est pas due aux techniques utilisées dans la purification cellulaire des éosinophiles, ni au faible rendement d'ARN obtenu à partir de cellules différenciées, mais semble spécifique de l'EPO. L'hypothèse d'une instabilité de l'ARNm décrit pour certains ARN est peu probable puisque 3 patients possèdent néanmoins un signal d'hybridation pour l'EPO.

Les ARNm codant pour les autres protéines cationiques ont été également recherchés dans

les éosinophiles. Les résultats montrent qu'un signal d'hybridation est obtenu avec un mélange de 3 oligonucléotide codant pour ECP, MBP et EDN sur 5 des 6 patients testés. Des résultats préliminaires montrant l'absence d'ARNm codant pour la MBP dans les éosinophiles matures indiquent que le signal d'hybridation obtenu avec le mélange des 3 oligonucléotides est du à la présence d'ARNm codant soit pour l'ECP soit pour l'EDN. Il semble donc que les ARNm codant pour les protéines cationiques soient régulés de façon différente.

Le clonage de l'EPO, effectué par Ten et coll. à partir de précurseurs hématopoïétiques permettait de penser que les cellules immatures possédaient les ARNm codant pour l'EPO (53). L'hypothèse d'une variation d'expression des messagers de l'EPO, au cours de la différenciation fut donc envisagée. Deux modèles d'étude ont été utilisés : la lignée d'éosinophile EoL-3 et les précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon ombilical. La différenciation a été obtenue par culture en présence d'IL-3, GM-CSF et IL-5 dans les deux cas.

Dans le premier système (EoL-3), l'expression des messagers codant pour l'EPO ainsi que pour les autres protéines cationiques n'a pas pu être détectée, même après culture en présence d'interleukines. Par contre, de façon intéressante, un signal d'hybridation a été obtenu avec la sonde MPO dans les cellules cultivées ou non avec les interleukines. Ce signal confirme la nature myéloïde de cette lignée. La culture en présence de ces interleukines est également associée à un changement morphologique observé au microscope électronique. Le noyau devient polylobé (caractéristique des granulocytes) et des granules denses apparaissent. D'autre part, la différenciation de cette lignée par les interleukines permet l'expression à la surface, du CD23, CD25 et du CD4 corrélée à l'expression des ARNm (106). La réactivité de cette lignée à l'IL-5, associée à l'expression de marqueurs exprimés sur l'éosinophile mature et non sur le neutrophile (CD23), suggère qu'il s'agit bien d'une différenciation orientée vers la lignée éosinophile.

L'absence d'ARNm codant pour l'EPO et le signal d'hybridation obtenu avec la sonde d'ADNc de MPO peuvent être discutés en fonction des résultats obtenus par différentes équipes

sur la lignée HL60. En effet, cette lignée possède la capacité de se différencier en éosinophile, neutrophile et monocyte selon les conditions de culture (7). Une lignée stable d'éosinophile (3+c-5) et de neutrophile (14 c) a pu être établie à partir de la lignée parentale HL60. Des auteurs ont démontré que le gène de la MPO était exprimé aussi bien dans la lignée parentale HL60 que dans la lignée neutrophile mais également éosinophile (54). Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec l'expression de MPO dans la lignée EoL-3 avant et après différenciation par les interleukines. La lignée HL60 stabilisée en éosinophile (3+c-5) exprime très faiblement les ARNm de l'EPO (54) et n'exprime les ARNm de l'ECP qu'après culture de cette lignée avec de l'IL-5 (62). Les messagers de l'EDN sont par contre détectés dans la lignée parentale et les deux sous-lignées. Les résultats des différentes équipes montrent que l'EPO et l'ECP sont les protéines cationiques les plus spécifiques de l'éosinophile et que ces ARNm sont très difficilement détectés même dans les lignées HL60 différenciées en éosinophiles. Dans le cas de la lignée EoL-3, une culture prolongée en présence d'interleukines pourrait peut-être permettre la détection de ces ARN. Cependant, si l'on admet un blocage de ces cellules à un certain stade de différenciation (puisqu'elles proviennent d'un patient atteint d'une "leucémie à éosinophiles"), il est permis de penser que les interleukines ne sont pas suffisantes pour faire apparaître ces marqueurs. Dans cet esprit, il serait important de tester l'effet de l'acide butyrique comme pour les HL60 mais également l'effet de l'acide rétinoïque connu comme agent différenciant. Ces molécules pourraient être testées seules ou en association avec les interleukines. Il serait intéressant de déterminer la part respective de chaque type de molécules (interleukines et agents différenciants) dans l'apparition de marqueurs spécifiques (recepteurs de surface et protéines cationiques) dont l'expression pourrait faire l'objet de régulations différentes.

L'apparition des marqueurs de surface (CD23, CD25 et CD4) après culture avec les interleukines peut être mise en parallèle avec l'activation de l'éosinophile mature, par ces mêmes interleukines. L'éosinophile hypodense correspond à un stade d'activation cellulaire. Il possède un métabolisme oxydatif et un pouvoir cytotoxique élevé (940119), un nombre de

récepteurs pour l'Ig E plus important que l'éosinophile normodense (95), exprime un pourcentage de molécule CD4 élevé (112). Il a été démontré que les interleukines étaient capables de transformer (différencier) des éosinophiles normodenses en éosinophiles hypodenses *in vitro* (154-156). Cette activation se traduit par l'obtention de cellules cytotoxiques, ayant des potentialités de cellules inflammatoires capables de libérer plus de leucotriènes (LTC₄). Il a également été démontré un effet des interleukines sur l'induction de segmentation du noyau. Cette hypersegmentation démontrée *in vivo* dans certaines situations pathologiques où sont observés des éosinophiles activés, soulignent l'importance de ces interleukines (28, 29).

En parallèle aux études réalisées sur des lignées cellulaires, nous nous sommes attachés à un système plus proche de la réalité biologique que constituent les cultures de cellules de sang de cordon. L'intérêt de ce modèle réside dans le nombre accru de précurseurs hématopoïétiques parmi ces cellules. En présence de facteurs de croissance de l'éosinophile (IL-3, GM-CSF et IL-5), nous avons pu obtenir des cellules immatures de la lignée éosinophile (blastes, myélocytes..) que nous n'observons pas avec la culture de la lignée EoL-3. Une synthèse intense d'ARNm codant pour l'EPO a pu être détectée après 10 jours de culture en présence des interleukines. L'étude cinétique réalisée montre que le taux d'ARNm diminue au cours de la culture. L'importance du signal d'hybridation obtenu avec ces cellules permet de confirmer la validité de notre oligonucléotide et montre ainsi que l'absence d'ARNm dans les cellules matures n'est pas due à la sonde utilisée. Ces résultats confirment notre hypothèse à savoir : la diminution de l'expression de l'ARNm de l'EPO au cours de la différenciation. La variation d'expression des ARNm de l'EPO entre les cellules matures et immatures peut s'expliquer par une down-régulation de l'expression de ce messager, corrélée à une accumulation de la protéine dans les granules. Cette hypothèse est compatible avec l'absence de néosynthèse, observée lors de l'analyse des profils protéiques. Elle suggère une demie-vie de la protéine élevée puisque celle-ci, après synthèse durant l'étape de différenciation, est stockée jusqu'au stade de dégranulation.

Cependant, la présence d'ARNm codant pour l'EPO chez trois des sujets est à souligner et pourrait indiquer la présence de cellules jeunes dans le sang circulant de ces patients. Il faut rappeler à ce propos que des auteurs ont démontré que la présence de l'ARNm codant pour la MPO dans des leucémies aiguës indifférenciées (lymphoïde ou myéloïde) ont permis le diagnostic de leucémie myéloïde aigüe. Avant toute conclusion hâtive sur la présence de cellules jeunes, il est nécessaire d'étudier la présence de ce marqueur chez un plus grand nombre de patients afin d'essayer d'établir une corrélation entre la présence d'EPO et l'état clinique des sujets.

Des résultats préliminaires montrent que ces cellules immatures sont capables de synthétiser la MBP. Après l'étude des autres protéines cationiques, il sera permis de déterminer si ce phénomène est observé pour l'ensemble de ces protéines.

Ces travaux concernant les ARNm montrent que l'EPO peut être considérée comme un marqueur de différenciation cellulaire. L'EPO serait synthétisée durant la maturation de l'éosinophile et stockée dans les granules jusqu'au stade de dégranulation. L'absence de néosynthèse pourrait signifier que l'éosinophile hypodense est le stade final et irréversible de la cascade de différenciation et d'activation cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de définir certains paramètres marquant l'hétérogénéité moléculaire de l'éosinophile. En effet, nous avons pu mettre en évidence deux protéines de poids moléculaire 23 kD et 51 kD présentes soit dans les éosinophiles normodenses soit dans les éosinophiles hypodenses.

- La protéine de 23 kD de pI 6,3-6,5 est retrouvée uniquement dans les cellules hypodenses activées. L'expression d'une protéine de 23 kD est également induite au niveau des cellules normodenses intermédiaires, lors de la stimulation par HILDA native. Il semble donc que cette protéine soit un marqueur d'activation cellulaire, distinct des protéines cationiques déjà décrites. Il serait intéressant de pouvoir purifier cette protéine afin de réaliser un anticorps spécifique. Cette sonde anticorps pourrait nous aider d'une part, à poursuivre les études fonctionnelles et biochimiques concernant cette protéine et d'autre part, à cribler une banque d'ADNc d'éosinophiles que nous possédons au laboratoire afin de la cloner.

- La protéine de 51 kD est une molécule présente essentiellement au niveau des éosinophiles normodenses. Nous avons pu montrer qu'elle possédait tous les caractères physico-chimiques et biologiques de l'EPO. Malgré l'abondance de cette protéine dans les éosinophiles normodenses, l'absence de l'ARNm codant pour l'EPO dans ces mêmes cellules pose un problème particulièrement intéressant concernant la régulation de synthèse de cette protéine au cours de la différenciation. La mise au point dans le laboratoire, d'un système de culture *in vitro* de précurseurs hématopoïétiques provenant de cellules de sang de cordon ombilical humain, a rendu possible l'étude de la régulation de l'EPO. Les résultats ont montré qu'au cours de la différenciation de ces précurseurs (cultivés en présence d'IL3, de GM-CSF et d'IL5) en éosinophiles, nous avons une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour l'EPO. Cette "down-régulation" du messager peut être corrélée à l'accumulation au préalable de la protéine dans les éosinophiles matures. Des résultats préliminaires indiquent que cette régulation semble différente pour les autres protéines cationiques notamment pour l'ECP.

Les perspectives de cette étude sont, dans un premier temps, d'affiner les paramètres de cinétique d'expression de l'ARNm codant pour l'EPO mais également codant pour la MBP, l'ECP

et l'EDN. De même, comme il a été fait sur la lignée EoL-3, l'expression des marqueurs immunologiques tels que le CD4 et le CD23 pourra être suivie. Il nous sera alors possible d'étudier les éléments impliqués dans la modulation de cette expression. Ces éléments sont de deux types :

1) Définir quelle est la part respective de l'effet de chaque interleukine dans l'expression des ARNm des protéines cationiques et des marqueurs immunologiques au cours de la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en éosinophiles.

2) Essayer de déterminer le ou les facteurs impliqués dans la "down-régulation" de l'ARNm de l'EPO lors de la maturation de l'éosinophile (il est possible que le responsable soit l'EPO elle-même par effet rétro-inhibiteur comme cela a déjà été montré pour un certain nombre de gènes).

Dans ces perspectives, la lignée EoL-3 semble intéressante à étudier. En effet, dans cette lignée bien que nous ayons pu mettre en évidence l'apparition de marqueurs immunologiques tels que le CD4, le CD23, après culture de ces cellules en présence des interleukines précédemment citées, nous n'avons pu détecter la présence de l'ARNm codant pour l'EPO. Il est possible que cette lignée soit bloquée à un stade de différenciation précoce et reste insensible aux effets d'une ou des interleukines présentes dans le milieu. L'utilisation d'agents différenciants tels que l'acide rétinoïque ou l'acide butyrique comme dans le cas des HL60 pourrait peut-être aider à redémarrer le programme de différenciation conduisant à la formation d'un éosinophile mature. Si c'est le cas, il est tout à fait envisageable d'étudier les événements liés au blocage de cette différenciation (blocage au niveau de l'expression des protéines cationiques) et notamment d'identifier le ou les gènes impliqués.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams, W.H. & Liu, Y.K. Periodic neutropenia and monocytopenia. *Ann. J. Haematol.*, 1982 : 73-82.
2. Juhlin, L. & Michaelsson, G. A new syndrome characterized by absence of eosinophils and basophils. *Lancet* , 1977, i : 1233-1235.
3. Tracey, R. & Smith, H. An inherited anomaly of human eosinophils and basophils. *Blood Cells*, 1978, 4 : 291-300.
4. Mlynek, M.L. & Leder, L.D. Lineage infidelity in chronic myeloid leukemia : demonstration and significance of hybridoid leukocytes. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, 1986, 51 : 107-114.
5. Denburg, J.A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. & Bienenstock, J. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies : evidence for a common basophil-eosinophil pregenitor. *Blood*, 1985, 66 : 312-318.
6. Walle, A.J. & Parwaresch, M.R. Estimation of effective eosinopoiesis and bone-marrow eosinophil reserve capacity in normal man. *Cell Tissue Kinet.*, 1979, 12 : 249-255.
7. Fischkoff, S.A. & Condon, M.E. Switch in differentiative response to maturation inducers of human promyelocytic leukemia cells by prior exposure to alkaline conditions. *Cancer Research*, 1985, 45 : 2065-2069.
8. Saito, H., Bourinbaiar, A., Ginsburg, M., Minato, K., Ceresi, E., Yamada, K., Machover, D., Breard, J. & Mathe, G. Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood.*, 1985, 66 : 1233-40.
9. McGarry, M.P., Speirs, R.S., Jenkin, S.V.K. & Trentin, J.J. Lymphoid cell dependence of eosinophil response to antigen. *J. Exp. Med.*, 1971, 134 : 801-814.
10. Basten, A. & Beeson, P.B. Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. *J. Exp. Med.*, 1970, 131 : 1288-1305.
11. Parker, J.W. & Metcalf, D. Production of colony stimulating factor in mixed leukocyte cultures. *Immunology*, 1974 a, 26 : 1039-1049.
12. Parker, J.W. & Metcalf, D. Production of colony-stimulating factor in mitogen-stimulated lymphocyte cultures. *J. Immunol.*, 1974 b, 112 (2) : 502-510.
13. Enokihara, H., Hamaguchi, H., Sakamaki, H., Hazama, S., Saito, K., Furusama, S., & Shishido, H. Specific production of eosinophil colony stimulating factor from sensitized T cells from a patient with allergic eosinophilia. *Br. J. Haematol.*, 1985, 59 : 85-91.
14. Warren, D.J. & Sanderson, C.J. Production of a T-cell hybrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. *Immunology*. 1985, 54 : 615-623.

15. Lopez, A.F., Begley, C.G., Williamson, D.J., Warren, D.J., Vadas, M.A. & Sanderson, C.J. Murine eosinophil differentiation factor : an eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J. Exp. Med.*, 1986, **163** : 1085-1099.
16. Sanderson, C.J., O'Garra, A., Warren, D.J. & Klaus, G.G. Eosinophil differentiation factor also has B cell-growth factor activity : proposed name Interleukin-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83** : 437-440.
17. Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C. & Wang, E.A. Biologic properties *in vitro* of a recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1986, **67** : 37-45.
18. Metcalf, D., Burgess, A.W., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Nice, E.C., De Lamarter, J., Thatcher, D.R. & Mermod, J.J. *In vitro* actions on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli* : comparison with purified native GM-CSF. *J. Cell. Physiol.*, 1986, **128** : 421-431.
19. Lopez, A.F., To, L.B., Yang, Y.C., Gamble, J.R., Shannon, M.F., Burns, G.F., Dyson, P.G., Juttner, C.A., Clark, S. & Vadas, M.A. Stimulation of proliferation, differentiation, and function of human cells by primate interleukin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 2761-2765.
20. Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt Lindquist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y. & Honjo, T. Cloning of complementary DNA encoding T cell replacing factor and identity with B cell-growth factor II. *Nature*, 1986, **324** : 70-73.
21. Azuma, C., Tanabe, T., Konishi, M., Kinashi, T., Noma, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., Hammarstrom, L., Smith, C.L. & Honjo, T. Cloning of cDNA for human T cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14** : 9149-9158.
22. Campbell, H.D., Tucker, W.Q., Hort, Y., Martinson, M.E., Mayo, G., Clutterbuck, E.J., Sanderson, C.J. & Young, I.G. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84** : 6629-6633.
23. Forni, G., Giovarelli, M., Santoni, A., Modesti, A. & Forni, M. Tumour inhibition by interleukin-2 at the tumour/host interface. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1986, **868** : 307-27.

24. **Enokihara H., Fursawa S., Nakakuboh, Kajitani H., Nagashima S., Saito K., Shishido H., Hitoshi Y., Takatsu K., Noma T., Shimizu, A. & Honjo T.** T cells from eosinophilic patients produce Interleukin-5 with interleukin 2 stimulation. *Blood.*, 1989, **73** : 1809-1813.
25. **Dexter M., Garland, J.M., Testa N.G. & Marcel Dekker,** Colony-stimulating factors. Molecular and cellular biology. *Inc. New York and Basel. Immunology series.*
26. **Warren, D.J. & Moore, M.A.S.** Synergism among interleukin-1, interleukin-3, and interleukin-5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. *J. Immunol.*, 1988, **140** : 94-99.
27. **Sparrewohn, S. & Wulff, H.R.** The nuclear segmentation of eosinophils under normal and pathological conditions. *Acta Haematol. (Basel)*, 1967, **37** : 120-125.
28. **Chihara, J., Kino, T., Yashuba, H., Furue, M., Fukuda, K., Izumi, T. & Oshima, S.** Increases of pulmonary hypodense eosinophils and eosinophils with hypersegmented nuclei in patients with PIE syndrome. *6th International Congress of Immunology, Toronto, Canada*, 1986.
29. **Chihara, J. & Nakajima, S.** Induction of hypodense eosinophils and nuclear hypersegmentation of eosinophils by various chemotactic factors and lymphokines *in vitro*. *Allergy Proc.*, 1989, **10** : 27-32.
30. **Miller, F., Deharven, E. & Palade, G.E.** The structure of the eosinophil leukocyte granules in rodent and in man. *J. Cell. Biol.*, 1966, **31** : 349-362.
31. **Parmley, R.T. & Spicer, S.S.** Cytochemical and structural identification of a small type granules in rodent and in man. *Lab. Invest.*, 1974, **30** : 557-567.
32. **Spry, C.J.F.** Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature (Sandoz), Oxford Medical Publications (1988).
33. **Gleich, G.J., Loegering, D.A. & Maldonado, J.E.** Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.*, 1973, **137** : 1459-1471.
34. **Gleich, G.J., Loegering, D.A., Kueppers, F., Bajaj, S.P. & Mann, K.G.** Physicochemical and biological properties of the major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.*, 1974, **140** : 313.
35. **Gleich, G.J., Loegering, D.A., Mann, K.G. & Maldonado, J.E.** Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J. Clin. Invest.*, 1976, **57** : 633-640.
36. **Gleich, G.J. & Loegering, D.A.** Immunobiology of eosinophils. *Ann. Rev. Immunol.*, **3** : 429-459.
37. **Lewis, D.M., Lewis, J.C., Loegering, D.A. & Gleich, G.J.** Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. *J. Cell. Biol.*, 1978, **77** : 702-713.

38. Egesten, A., Alumets, J., von Mecklenburg, C., Palmegren, M. & Olsson, I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1986, **34** : 1399-1403.
39. Barker, R.L., Gleich, G.J. & Pease, L.R. Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. *J. Exp. Med.*, 1988, **168** : 1493-1498.
40. McGrogan, M., Simonsen, C., Scott, R., Griffith, J., Ellis, N., Kennedy, J., Campanelli, D., Nathan, C. & Gabay, J. Isolation of a complementary DNA clone encoding a precursor to human eosinophil major basic protein. *J. Exp. Med.*, 1988, **168** : 2295-2308.
41. Wasmoen, T.L., Bell, M.P., Loegering, D.A., Gleich, G.J., Prendergast, F.G. & MacKean, D.J. Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule Major Basic Protein. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** : 12559-12563. .
42. Patty, L. Homology of cytotoxic protein of eosinophilic leukocytes with IgE receptor FcεRII : Implications for its structure and function. *Mol. Immunol.*, 1989, **26** : 1151-1154.
43. Butterworth, A.E., Wassom, D.L., Gleich, G.J., Loegering, D.A. & David, J.R. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.*, 1979, **122** : 221-223.
44. Wassom, D.L. & Gleich, G.J. Damage to *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil major basic protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1979, **28** : 860-863.
45. Kierszenbaum, F., Ackerman, S.J. & Gleich, G.J. Destruction of blood stream forms of *Trypanosoma cruzi* by eosinophil granules major basic protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **30** : 775-779.
46. Ayars, G.H., Altman, L.C, Gleich, G.J., Loegering, D.A. & Baker, C.B. Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1985, **76** : 595-604.
47. Gleich, G.J., Frigas, E., Loegering, D.A., Wassom, D.L. & Steinmuller, D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J. Immunol.*, 1979, **123** : 2925-2927.
48. Bainton, D.F. & Farquhar, M.G. Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. *J. Cell. Biol.*, 1970, **45** : 54-73.
49. Olsen, R.L. & Little, C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. *J. Biochem.*, 1983, **209** : 781-787.
50. Carlson, M.G., Peterson, C.G. & Venge, P. Human eosinophil peroxidase : purification and characterization. *J. Immunol.*, 1985, **134** : 1875-1879.

51. **Doustes-Blazy & Mendy, F.** Biologie des lipides chez l'homme. *Techniques et Documentation Lavoisier* (Ed. Médicales Internationales), 1988.
52. **Weller, P.F., Ackerman, S.J. & Smith, J.A.** Eosinophil granule cationic proteins : major basic protein is distinct from the smaller subunit of eosinophil peroxidase. *J. Leuk. Biol.*, 1988, **43** : 1-4.
53. **Ten, M.R., Pease, L.R., McKean, D.J., Bell, M.P. & Gleich, G.J.** Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.*, 1989, **169** : 1757-1769.
54. **Sakami, K., Tomonaga, M., Tsukui, K. & Nagata, S.** Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264** : 16828-16836.
55. **Jong, E.C., Henderson, W.R. & Klebanoff, S.J.** Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J. Immunol.*, 1980, **124** : 1378-1382.
56. **Jong, E.C., Mahmoud, A.A.F. & Klebanoff, S.J.** Peroxidase-mediated toxicity to Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1981, **126** : 468-471.
57. **Nogueira, N.M., Klebanoff, S.J. & Cohn, Z.A.** *Trypanosoma cruzi* : sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. *Immunol.*, 1982, **128** : 1705-1708.
58. **Jong, E.C. & Klebanoff, S.J.** Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity : role of the peroxidase system. *J. Immunol.*, 1980, **124** : 1949-1953.
59. **Olsson, I., Venge, P., Spitznagel, J.K. & Lehrer, R.I.** Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules. Comparison of the constituents of eosinophilic and neutrophilic leukocytes. *Lab. Invest.*, 1977, **36** : 493-500.
60. **Tai, P-C., Spry, C.J.F., Peterson, V.P. & Olsson, I.** Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature*, 1984, **309** : 182-184.
61. **Gleich, G.J., Loegering, D.A., Bell, M.P., Checkel, J.L., Ackerman, S.J. & McKean, D.J.** Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein : homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83** : 3146-3150.
62. **Rosenberg, H.F., Ackerman, S.J. & Tenen, D.G.** Human eosinophil cationic protein. Molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 163-176.
63. **Barker, R.L., Loegering, D.A., Ten, R.M., Hamann, K.J., Pease, L.R. & Gleich, G.J.** Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 952-955.
64. **Young, J.D., Peterson, C.G.B., Venge, P. & Cohn, Z.A.** Mechanism of membrane damage-mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*, 1986, **321** : 613-615.

65. McLaren, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venge, P. & Kay, A.B. Morphological studies on the killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite Immunol.*, 1981, **3** : 359-373.
66. Slifman, N.R., Venge, P., Peterson, C.G.B., McKean, D.J. & Gleich, G.J. Human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil protein X are likely the same protein. *J. Immunol.*, 1989, **143** : 2317-2321.
67. Durack, D.T., Ackerman, S.J., Loegering, D.A. & Gleich, G.J. Purification of eosinophil derived neurotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78** : 5165-5169.
68. Rosenberg, H.F., Tenen, D.G. & Ackerman, S.J. Molecular cloning of the human eosinophil derived neurotoxin : a member of the ribonuclease gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 4460-4464.
69. Durack, D.T., Sumi, S.M. & Klebanoff, S.J. Neurotoxicity of human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76** : 1443-1447.
70. Gullberg, U., Widegren, B., Arnason, U., Egesten, A. & Olsson, I. The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **139** : 1239-1242.
71. Archer, G.T. & Blackwood, A. Formation of Charcot-Leyden crystals in human eosinophils and basophils, and study of the composition of isolated crystals. *J. Exp. Med.*, 1965, **122** : 173-180.
72. Ackerman, S.J., Loegering, D.A. & Gleich, G.J. The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein : biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay. *J. Immunol.*, 1980, **125** : 2118-226.
73. Pincus, S.H. Hydrogen peroxide release from eosinophils : quantitative, comparative studies of human and guinea pig eosinophils. *J. Invest. Dermatol.*, 1983, **80** : 278-281.
74. Hubscher, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. II. Release of prostaglandins from human eosinophilic leukocytes. *J. Immunol.*, 1975, **114** : 1389-1393.
75. Samuelsson, B. Leukotrienes : mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983, **220** : 568-575.
76. Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E.J., Austen, K.F. & Lewis, R.A. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils : predominant production of leukotriene C₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80** : 7626-7630.
77. Jouvin-Marche, E., Grzych, J.M., Boulet, C., Capron, M. & Benveniste, J. Formation of PAF-acether by human eosinophils (Abstract). *Fed. Proc.*, 1984, **43** : 1924.

78. Lee, T., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L. & Wasserman, S.I. Increased biosynthesis of Platelet Activating Factor in activated human eosinophil. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** : 5526-5530.
79. Ramesh, K.S., Rocklin, R.A. & Pincus, S.H. Activated human eosinophils synthesize new proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **923** : 241-249.
80. Tai, P-C. & Spry, C.J. Studies on blood eosinophils. I. Patients with a transient eosinophilia. *Clin. exp. Immunol.*, 1976, **24** : 415-422.
81. Anwar, A.R.E. & Kay, A.B. Membrane receptors for Ig G and complement (C4-C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia. *J. Immunol.*, 1977a, **119** : 976-982.
82. Kulczycki, A. Human neutrophils and eosinophils have structurally distinct Fc g receptors. *J. Immunol.*, 1984, **133** : 849-854.
83. Hartnell, A., Moqbel, R., Walsh, G.M., Bradley, B. & Kay, A.B. Fc γ and CD11/ CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology*. 1990, **69** : 264-270.
84. Fleit, H.B., Wright, S.F., Durie, C.J., Valinsky, J.E. & Unkeless, J.C. Ontogeny of Fc receptors and complement receptor (CR3) during human myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.*, 1984, **73** : 516-525.
85. Yazdanbakhsh, M., Eckmann, C.M. & Roos, D. Characterization of the interaction of human eosinophils and neutrophils with opsonized particles. *J. Immunol.*, 1985, **135** : 1378-1384.
86. Khalife, J., Capron, M., Grzych, J.M., Bazin, H. & Capron, A. Extracellular release of rat eosinophil peroxidase EPO. I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J. Immunol.*, 1985, **134** : 1968-1974.
87. Hubscher, T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. E.D.I. : an eosinophil-derived inhibitor of histamine release. *J. Immunol.*, 1975, **114** : 1379-1388.
88. Capron, M., Capron, A., Dessaint, J.P., Torpier, G., Johansson, S.G.O. & Prin, L. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.*, 1981, **126** : 2087-2092.
89. Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. & Capron, A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.*, 1981, **126** : 1764-1768.
90. Capron, M., Spiegelberg, H.L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A.E., Pierce, R.J., Ouaiissi, M.A. & Capron, A. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.*, 1984, **132** : 462-468.

91. Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J.C. & Tonnel, A.B. From parasites to allergy : the second receptor for IgE (Fc ϵ R₂) *Immunol. Today*, 1986, 7 : 15-18.
92. Capron, M., Kusnierz, J.P., Prin, L., Spiegelberg, H.L., Ovlaque, G., Gosset, P., Tonnel, A.B. & Capron, A. Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils : detection by flow microfluorometry. *J. Immunol.*, 1985, 134 : 3013-3018.
93. Prin, L., Capron, M., Gosset, P., Wallaert, B., Kusnierz, J.P., Bletry, O., Tonnel, A.B. & Capron, A. Eosinophilic lung disease : immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. exp. Immunol.*, 1986, 63 : 249-257.
94. Jouault, T., Capron, M., Balloul, J.M., Ameisen, J.C. & Capron, A. Quantitative and qualitative analysis of the Fc receptor for Ig E (Fce RII) on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.*, 1988, 18 : 237-241.
95. Capron, M., Grangette, C., Torpier, G. & Capron, A. The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.*, 1989, 47 : 128-178.
96. Capron, M., Jouault, T., Prin, L., Joseph, M., Ameisen, J.C., Butterworth, A.E., Papin, J.P. & Capron, A. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc ϵ R₂) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J. Exp. Med.*, 1986, 164 : 72-89.
97. Grangette, C., Gruart, V., Ouaisi, M.A., Rizvi, F., Delespesse, G., Capron, A. & Capron, M. IgE receptor on human eosinophils (Fc ϵ RII) : Comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.*, 1989, 143 : 3580-3588.
98. Capron, M., Tomassini, M., Van der Vorst, E., Kusnierz, J.P., Papin, J.P. & Capron, A. Existence et fonctions d'un récepteur pour l'immunoglobuline A sur les éosinophiles humains. *C.R. Acad. Sc./Immunol.*, 1988, 307 : 397-402.
99. Fearon, D.T. Human C3b receptor. Springer Seminar. *Immunopathol.*, 1983, 6 : 159-172.
100. Fischer, E., Capron, M., Prin, L., Kusnierz, J.P. & Kazatchkine, M.D. Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell. Immunol.*, 1986, 97 : 297-306.
101. Sanchez-Madrid, F., Nagy, J.A., Robbins, E., Simon, P. & Springer, T.A. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct subunits and a common subunit : the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1) and the p150, 95 molecule. *J. Exp. Med.*, 1983, 158 : 1785-1803.

102. **Capron, M., Kazatchkine, M.D., Fischer, E., Joseph, M., Butterworth, A.E., Kusnierz, J.P., Prin, L., Papin, J.P. & Capron, A.** Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J. Immunol.*, 1987, **139** : 2059-2065.
103. **Glovsky, M.M., Hugli, T.E., Ishizaka, T., Lichtenstein, L.M. & Erickson, B.W.** Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes : studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *J. Clin. Invest.*, 1979, **64** : 804-811.
104. **Hamada, A. & Greene, B.M.** C1q enhancement of IgG-dependent eosinophil-mediated killing of schistosomula *in vitro*. *J. Immunol.*, 1987, **138** : 1240-1245.
105. **Lopez, A.F., Eglinton, J.M., Gillis, D., Park, S.L., Clark, S. & Vadas, M.A.** Reciprocal inhibition of binding between interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86** : 7022-7026.
106. **Chihara J., Plumas J., Tavernier J., Gruart V., Prin L., Capron A. & Capron M.** Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils : Variable expression and induction by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. (soumis)
107. **Peterson, A.P., Altman, L.C., Hill, J.S., Gosney, K. & Kadin, M.E.** Glucocorticoid receptors in normal human eosinophils : comparison with neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1981, **68** : 212-217.
108. **Tchernitchin, A.N., Barrera, J., Arroyo, P., Mena, M.A., Vilches, K. & Grunert, G.** Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes in vivo and in vitro. *Agents Actions.*, 1985, **17** : 60-66.
109. **Tchernitchin, A.N., Mena, M.A., Rodriguez, A., & Maturana, M.** Radioautographic localization of estrogen receptors in the rat uterus : a tool for the study of classical and nontraditional mechanisms of hormone action. In *Localization of putative steroid*. (eds. L.P. pertschuk and S.H. Lee), CRC Press, Florida, 1985, 5-37.
110. **Prin, L., Lefebvre, P., Gruart, V. Capron, M., Storme, L., Formstecher, P., Loiseau, S. & Capron A.** Heterogeneity of human eosinophil glucocorticoid receptor expression in hypereosinophilic patients : Absence of receptor correlates with resistance to corticotherapy. *Clin. exp. Immunol.*, 1989, **78** : 383-389.
111. **Tai, P.-C., Capron, M., Bakes, D.M., Barkans, J. & Spry, C.J.** Monoclonal antibodies to human eosinophil plasma membrane antigens enhance the secretion of eosinophil cationic protein. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, **63** : 728-37.

112. Lucey, D.R., Dorsky, D.I., Nicholson-Weller, A. & Weller, P.F. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp 120. *J. exp. Med.*, 1989, **169** : 327-332.
113. Lucey, D.R., Nicholson-Weller, A. & Weller, P.F. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, **86** : 1348-1351.
114. Vadas, M.A., David, J.R., Butterworth, A.E., Pisani, N.T. & Siongok, T.A. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1979, **122** : 12-28.
115. Bass, D.A., Grover, W.H., Lewis, J.C., Szejda, P., DeChatelet, L.R. & McCall, C.E. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J. Clin. Invest.*, 1980, **66** : 1265-1273.
116. De Simone, C., Doneli, G., Meli, D., Rosati, F. & Sorice, F. Human eosinophils and parasitic diseases. II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clin. exp. Immunol.*, 1982, **48** : 249-255.
117. Winqvist, I., Oloffson, T., Olsson, I., Persson, A.M. & Hallberg, T. Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology*, 1982, **47** : 531-539.
118. Prin, L., Capron, M., Tonnel, A.B., Bletry, O. & Capron, A. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils : variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, 1983, **72** : 336-346.
119. Prin, L., Charon, J., Capron, M., Gosset, P., Taelman, H., Tonnel, A.B. & Capron, A. Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. exp. Immunol.*, 1984, **57** : 735-742.
120. Kajita, T., Yui, Y., Mita, H., Taniguchi, N., Saito, H., Mishima, T. & Shida, T. Release of leukotriene C4 from human eosinophils and its relation to the cell density. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, 1985, **78** : 406-410.
121. Kauffman, H.F., Van der Belt, B., de Monchy, J.G., Boelens, H., Koeter, G.H. & de Vries, K. Leukotriene C4 production by normal density and low density eosinophils of atopic individuals and other patients with eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987, **79** : 611-619.
122. Lee, T., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L. & Wasserman, S.I. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** : 5526-5530.

123. Gruart, V., Balloul, J.M., Prin, L., Tomassini, M., Loiseau, S., Capron, A. & Capron, M. Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 4416-4421.
124. Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A., Sher, A., Rees, P.H. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 1975, **256** : 727.
125. Butterworth, A.E., Renold, H.G., Houba, V., David, J.R., Franks, D., David, P.H. & Sturrock, R.F. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 51Cr labeled Schistosomula of *S. mansoni* : mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.*, 1977, **118** : 2230-2236;
126. Vadas, M.A., Butterworth, A.E., Sherry, B., Desein, A., Hogan, M., Bout, D. & David, J.R. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *S. mansoni*. I. Stable and irreversible antibody dependent adherence. *J. Immunol.*, 1980, **124** : 1441-1448.
127. Anwar, A.R.E., Smithers, S.R. & Kay, A.B. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leucocytes in vitro : requirement for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.*, 1979, **122** : 628-637.
128. Pincus, S.H., Butterworth, A.E., David, J.R., Robbins, M. & Vadas, M.A. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* : lack of requirement for oxidative metabolism. *J. Immunol.*, 1981, **126** : 1794-1799.
129. Gleich, G.J. & Adolphson, C.R. The eosinophilic leukocyte : structure and function. *Adv. Immunol.*, 1986, **39** : 177-253.
130. Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. & Bazin, H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature (Lond.)*, 1975, **253** : 474-475.
131. Agosti, J.M., Altman, L.C., Ayars, G.H., Loegering, D.A., Gleich, G.J. & Klebanoff, S.J. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes *in vitro*. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 1987, **79** : 496-504.
132. Tai, P-C., Hayes, D.J., Clark, J.B. & Spry, C.J. Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells *in vitro*. *Biochem. J.*, 1982, **204** : 75-80.
133. Khalife, J., Capron, M., Cesbron, J.Y., Tai, P.-C., Taelman, H., Prin, L. & Capron, A. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.*, 1986, **137** : 1659-1664.

134. Capron, M., Tomassini, M., Torpier, G., Kusnierz, J.P., MacDonald, S. & Capron, A. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, 1989, **88** : 54-58.
135. Abu-Ghazaleh, R., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R.A. & Gleich, G.J. IgA induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.*, 1989, **142** : 2393-2400.
136. Torpier, G., Colombel, J.F., Mathieu-Chandelier, C., Capron, M., Dessaint, J.P., Cortot, A., Paris, J.C. & Capron, A. Eosinophilic gastroenteritis : ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin. Exp. immunol.*, 1988, **74** : 404-408.
137. Shaw, R.J., Walsh, G.M., Cromwell, O., Moqbel, R., Spry, C.J. & Kay, A.B. Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG dependant stimulation. *Nature*, 1985, **316** : 150-152.
138. Moqbel, R., MacDonald, A.J., Cromwell, O., & Kay, A.B. Release of leukotrienes C4 (LTC4) from human eosinophils following adherence to IgE and IgG coated Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Immunol*, 1990, **69** : 435-442.
139. Gosset, P., Prin, L., Capron, M., Auriault, C., Tonnel, A.B. & Capron, A. Presence of factors chemotactic for granulocytes in hypereosinophilic syndrome. sera : relation with alterations in eosinophil migration. *Clin. exp. Immunol.*, 1986, **65** : 654-663.
140. Kay, A.B., Stechschulte, D.J. & Austen, K.F. An eosinophil leukocyte chemotactic factor of anaphylaxis. *J. Exp. Med.*, 1971, **133** : 602-619.
141. Wasserman, S.I., Seibold, J.R., Medsger, T.A. & Rodnan, G.P. Serum eosinophilotactic activity in eosinophilic fasciitis. *Arthritis and Rheumatism.*, 1982, **25** : 1352-1356.
142. Wasserman, S.I., Goetzi, E.J., Ellman, L. & Austen K.F. Tumor associated eosinophilic factor. *N. England J. Med.*, 1974, **21** : 420-424.
143. Inque, T., Iwasaki, K. Chihara, T. & Torisu, M. Cervical carcinoma and eosinophil. I. Eosinophil chemotactic factor derived from invasive cervical carcinoma with eosinophil infiltration. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1981, **21** : 320-331.
144. Gosset, P., Tonnel, A.B., Joseph, M., Prin, L., Mallart, A., Charon, J. & Capron, A. J. Secretion of chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients. *Allergy. Clin. Immunol.*, 1984, **74** : 827-834.
145. Rothenberg, M.E., Owen, W.F. Jr, Silberstein, D.S., Soberman, R.J., Austen, K.F., & Stevens, R.L. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science*, 1987, **237** : 645-647.

146. Silberstein, D.S. & David, J.R. The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunol. Today.*, 1987, 8 : 380-385.
147. Thorne, K.J., Richardson, B.A., Veith, M.C., Tai, P-C., Spry, C.J. & Butterworth, A.E. Partial purification and biological properties of an eosinophil-activating factor. *Eur. J. Immunol.*, 1985, 15 : 1083-1091.
148. Moreau, J.F., Bonneville, M., Godard, A., Gascan, H., Gruart, V., Moore, M.A. & Souillou, J.P. Characterization of a factor produced by human T cell clones exhibiting eosinophil activating and burst promoting activities. *J. Immunol.*, 1987, 138 : 3844-3849.
149. Pincus, S.H., Whitcomb, E.A. & Dinarello, C.A. Interaction of IL-1 and TPA in modulation of eosinophil function. *J. Immunol.*, 1986, 137 : 3509-3514.
150. Silberstein, D.S., Owen, W.F., Gasson, J.C., Di Persio, J.F. Golde, D.W., Bina, J.C., Soberman, R.J., Austen, K.F. & David, J.R. Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Immunol.*, 1986, 137 : 3290-3294.
151. James, S.L., & Colley, D.G. Eosinophil mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. III-Lymphokine involvement in the induction of eosinophil functional abilities. *Cell; Immunol.*, 1978, 38 : 48-58.
152. Fujisawa, T., Abu-Ghazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C.J. & Gleich, G.J. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J. Immunol.*, 1990, 144 : 642-646.
153. Rothenberg, M.E., Pomerantz, J.L., Owen, W.F., Avraham, S., Soberman, R.J., Austen, K.F. & Stevens, R.L. Characterization of a human proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin-3, interleukin-5, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 13901-13908.
154. Owen, W.F. Jr, Rothenberg, M.E., Silberstein, D.S., Gasson, J.C., Stevens, R.L., Austen, K.F., and Soberman, R.J. Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1987, 166 : 129-141.
155. Rothenberg, M.E., Owen W.F. Jr., Silberstein, D.S., Woods, J., Soberman, R.J., Austen K.F. & Stevens, R.L. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin-3. *J. Clin. Invest.*, 1988, 81: 1986-1992.

156. Owen, W.F.Jr, Rothenberg, M.E., Peterson, J., Weller, P.F., Silberstein, D., Sheffer, R.F., Stevens, R.L., Soberman, R.J. & Austen, K.F. Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J. Exp. Med.*, 1989, **170** : 343-348.
157. Saito, H., Hayakawa, T., Yui, Y. & Shida, T. Effect of human interferon on different functions of human neutrophils and eosinophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* ,1987, **82** : 133-140.
158. Silberstein, D.S. & David J.R. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, **83**, 1055-1059.
159. Weller, P.F. & Goetzi, E.J., . The regulatory and effector roles of eosinophils. *Adv. Immunol.*, 1979, **27** : 339-371.
160. Gleich, G.J., Olson, G.M. & Loegering, D.A. The effect of ablation of eosinophil on immediate type hypersensitivity reactions. *Immunol.*, 1979, **38** : 343-35.
161. Seiler, G., Westerman, R.A. & Wilson J.A. The role of specific eosinophil granules in eosinophil induced experimental encephalitis. *Neurology* ., 1969, **19** : 478-488.
162. Gleich, G.J., Frigas, E., Filley, W.V. & Loegering, D.A. Eosinophils and bronchial inflammation. *Asthma* (Ed. Kay A.B., Austen K.F., Lichtenstein L.M., Acad. Press N.Y.) 1984 : 195-210.
163. Prin, L., Capron, M., Gosset, P., B. Wallaert, J.P. Kusnierz, O. Bletry, Tonnel, A.B. & Capron, A. Eosinophil lung disease : Immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, **63** : 249-257.
164. Spry, C.J.F., Tai, P-C. & Davies, J. The cardiotoxicity of eosinophils. *Postgrad. Med. J.*,1983, **59** : 147-151.
165. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, **21** : 77.
166. Zucker-Franklin, D., and Grusky, G. The identification of eosinophil colonies in soft agar cultures by differential staining for peroxidase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, **24** : 1270.
167. Descamps-Latscha, B., Nguyen, A.T., Golub, R.M. & Feuillet-Fieux, H.N. Chemiluminescence in microamounts of whole blood for investigation of the human phagocyte oxidative metabolism function. *Ann. Immunol.,(Inst. Pasteur)*, 1982, **133 c** : 349.
168. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1979, **72** : 248-250.

169. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.*, 1970, **27** : 680-685.
170. Garrels, J.I. Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.*, 1979, **254** : 7961.
171. Morrissey J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 1981, **117** : 307-310.
172. Towbin, H., Staechlin, F., & Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76** : 4350.
173. Lehrach, H., Diamond D., Wozney, J. & Boedtker, M. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.*, 1977, **16** : 4743-4751.
174. Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1975, **98** : 503-517.
175. Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 1983, **132** : 6-13.
176. Prin, L., Ameisen, J.C., Plumas, J., Gruart, V., Loiseau, S., Bletry, O., Fenaux, P., Capron, M. & Capron, A. High levels of soluble interleukin-2 receptor in the serum of 30 patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br. J. Haematol.*, 1990, **74** : 233-237.
177. Moreau J. F., Donaldson, D.D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S.C. & Wong, G.G. Leukemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature*, 1988, **336** : 690-692.
178. Abu-Ghazaleh, R., Dunnette, S.L., Krebs, T.B. & Gleich, G.J. Quantities of individual granule proteins in human eosinophils. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 1987, **79** : 162-163.
179. Okuda, M., Takenaka, T., Kawaboni, S. & Ogami, Y. Ultrastructural study of the specific granule of the human eosinophils. *J. Submicrosc. Cytol.*, 1981, **13** : 465-471.
180. Peters, M.S., Gleich, G.J., Dunette, S.L. & Fukuda, T. Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome : A morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood*. 1988, **71** : 780-785.
181. Venge, P. & Peterson, C.G.B. Eosinophil biochemistry and killing mechanisms. in *Eosinophils in asthma*. Eds Morley, J. & Colditz, I. Academic Press (London). 1987, pp : 163-172.
182. Prin, L., Bletry, O., Tonnel, A.B., Gruart, V., Bodemer, C., Capron, M., Guillevin, L., Godeau, P. & Capron, A. Lésions viscérales des hyperéosinophilies. *Presse Méd.*, 1987, **16** : 945-949.

184. Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. La cellule. Biologie moléculaire. Editions Vigot. 1988, pp : 435-437.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	P 2
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	P 6
ABREVIATIONS.....	P 8
RESUME.....	P 10
GENERALITES.....	P 13
I- LA GRANULOPOIESE EOSINOPHILE.....	P 14
A- LA LIGNEE EOSINOPHILE.....	P 14
B- FACTEURS INTERVENANT DANS L'EOSINOPHILOPOIESE.....	P 16
II- ETUDE STRUCTURALE DE L'EOSINOPHILE.....	P 19
A- LE NOYAU.....	P 19
B- LES CONSTITUANTS CYTOPLASMIQUES.....	P 19
1- les granules.....	P 19
a) <i>les protéines cationiques</i>	P 21
b) <i>les enzymes</i>	P 27
2- les métabolismes.....	P 27
a) <i>le métabolisme oxydatif</i>	P 27
b) <i>le métabolisme de l'acide arachidonique</i>	P 28
c) <i>le métabolisme protéique</i>	P 29
C- LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES ET CYTOSOLIQUES.	
ANTIGENES ET MOLECULES DE SURFACE.....	P 29
1- Les récepteurs pour les immunoglobulines.....	P 29
2- Les récepteurs pour le complément.....	P 31
3- Les récepteurs pour les interleukines.....	P 31
4- Les récepteurs pour les stéroïdes.....	P 32
5- Les antigènes et molécules de surface	P 32

III- HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DES EOSINOPHILES.....	P 33
A- LES METABOLISMES.....	P 35
B- LES FONCTIONS CYTOTOXIQUES.....	P 37
C- LIBERATION DE MEDIATEURS.....	P 38
D- LE CHIMIOTACTISME.....	P 39
E- FACTEURS INTERVENANT DANS L'ACTIVATION DE L'EOSINOPHILE.....	P 40
IV- ROLE DES EOSINOPHILES ACTIVES EN PATHOLOGIE HUMAINE.....	P 42
A- EOSINOPHILE, CELLULE REGULATRICE DES REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE.....	P 42
B- EOSINOPHILE, CELLULE EFFECTRICE.....	P 43
C- RELATION AVEC LA PATHOLOGIE.....	P 43
MATERIEL ET METHODES.....	P 45
I- LES CELLULES.....	P 46
A- PURIFICATION DES EOSINOPHILES.....	P 46
B- PURIFICATION DES NEUTROPHILES.....	P 47
C- CULTURE ET DIFFERENCIATION DE LA LIGNEE EoL-3.....	P 47
D- CULTURE ET DIFFERENCIATION DES CELLULES DE SANG DE CORDON OMBILICAL.....	P 48
II- TESTS BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELS.....	P 48
A- COLORATION SPECIFIQUE DE LA PEROXYDASE.....	P 48
B- ACTIVITE CYTOTOXIQUE.....	P 49
C- TEST DE CHIMIO-LUMINESCENCE.....	P 49
D- TEST DE CHIMIOTACTISME.....	P 49
E- DOSAGE DE L'EPO PAR CHIMIO-LUMINESCENCE.....	P 50
F- CYTOFLUORIMETRIE.....	P 50

III- ANALYSE DES PROTEINES.....	P 51
A- PREPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES.....	P 51
B- DOSAGE DES PROTEINES.....	P 51
C- DETECTION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DANS LES EXTRAITS CELLULAIRES.....	P 51
D- PRECIPITATION DES PROTEINES.....	P 52
E- MARQUAGE METABOLIQUE.....	P 52
F- ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE ET BIDIMENSIONNELLE..	P 52
G- COLORATION DES GELS.....	P 53
H- WESTERN BLOT.....	P 53
IV- ANALYSE DES ARNm.....	P 54
A- EXTRACTION DES ARN TOTAUX.....	P 54
B- TRADUCTION IN VITRO.....	P 54
C- NORTHERN BLOT.....	P 55
D- HYBRIDATION	P 55
E- MARQUAGE DES SONDAS.....	P 56
V- BANQUE D'ADNc, CRIBLAGE ET SEQUENCAGE.....	P 56
A- CONSTRUCTION DE LA BANQUE.....	P 56
B- CRIBLAGE DE LA BANQUE.....	P 57
C- SEQUENCAGE.....	P 57
VI- REACTIFS.....	P 57
BUT DU TRAVAIL.....	P 59

RESULTATS.....	P 61
I- ETUDE DE L'ACTIVATION CELLULAIRE DES EOSINOPHILES PAR HILDA :	
RELATION AVEC LEUR HETEROGENEITE.....	P 62
A- EFFET D'HILDA SUR LE METABOLISME OXYDATIF.....	P 63
B- ETUDE DU CHIMIOTACTISME.....	P 67
C- ETUDE DE LA LIBERATION DE L'EPO.....	P 70
D- ETUDE DE LA CYTOTOXICITE.....	P 70
E- ETUDE DE LA SYNTHESE PROTEIQUE.....	P 73
II- ETUDE DES PROFILS PROTEIQUES DE DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS	
D'EOSINOPHILES : CARACTERISATION DE MARQUEURS D'ACTIVATION.....	P 75
A- FRACTIONNEMENT DES PROTEINES EN SDS-PAGE.....	P 76
B- ANALYSE EN ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE.....	P 80
C- ANALYSE DES PRODUITS DE TRADUCTION DE L'EOSINOPHILE.....	P 85
D- CARACTERISATION DE LA PROTEINE DE 51 KD.....	P 88
1- Etude en Western blot.....	P 88
2- Etude de l'activité enzymatique.....	P 88
E- ETUDE DES PROTEINES NEOSYNTHESEES.....	P 91
F- ACTIVATION PAR HILDA.....	P 94
III- TENTATIVE DE CLONAGE DE LA PEROXYDASE.....	P 98
IV- ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm DE L'EOSINOPHILE:	
CARACTERISATION DE MARQUEURS DE DIFFERENCIATION.....	P 102
A- ETUDE DES ARN D'EOSINOPHILES	P 103
B- ETUDE EN NORTHERN BLOT DES ARNm D'EOSINOPHILES DE	
SUJETS HYPEREOSINOPHILIQUES.....	P 106

C- ETUDE DES ARNm AU COURS DE LA DIFFERENCIATION.....	P 110
1- La lignée EoL-3.....	P 110
2- Les cellules de sang de cordon ombilical.....	P 117
DISCUSSION.....	P 121
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	P 136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	P 139
TABLE DES MATIERES.....	P 156
FIGURES ET TABLEAUX.....	P 162

FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 :	Cibles des facteurs de croissance de l'éosinophile humain.....	P 20
Figure 2 :	Représentation schématique des composants spécifiques de l'éosinophile et des principaux récepteurs et antigènes de surface.....	P 34
Figure 3 :	Etude de la chimioluminescence des éosinophiles activés par HILDA.....	P 65
Figure 4 :	Etude du chimiotactisme en présence d'HILDA.....	P 68
Figure 5 :	Illustration de la technique de chimiotactisme.....	P 69
Figure 6 :	Etude de la cytotoxicité en présence d'HILDA.....	P 72
Figure 7 :	Analyse en SDS-PAGE des extraits cellulaires d'éosinophiles.....	P 77
Figure 8 :	Analyse en IEF des extraits d'éosinophiles.....	P 81
Figure 9 :	Analyse en NEPHGE des extraits d'éosinophiles.....	P 83
Figure 10 :	Analyse en SDS-PAGE des produits de traduction d'ARN d'éosinophiles....	P 86
Figure 11 :	Analyse en Western blot des extraits d'éosinophiles. Activité peroxydasique de ces extraits.....	P 89
Figure 12 :	Analyse en IEF et NEPHGE des protéines néosynthétisées.....	P 92
Figure 13 :	Analyse des protéines néosynthétisées après activation par HILDA.....	P 95
Figure 14 :	Analyse en IEF des produits de traduction de l'éosinophile.....	P 104
Figure 15 :	Analyse en Northern blot des ARN d'éosinophiles et des ARN de différents types cellulaires avec les sondes CD4, HLA, EPO et EDN-ECP-MBP.....	P 108
Figure 16 :	Induction des marqueurs CD23, CD4 et CD25 au cours de la différenciation de la lignée EoL-3. Analyse en cytofluorimétrie.....	P 113
Figure 17 :	Expression en cytofluorimétrie des marqueurs CD23, CD4 et CD25 avant et après différenciation par les interleukines.....	P 114

- Figure 18 : Analyse en Northern blot des ARN de la lignée EoL-3 avant et après différenciation. Hybridation avec les sondes CD4, CD23 et CD25.....P 115
- Figure 19 : Photographies des cultures à J15, de précurseurs hématopoïétiques présents dans les cellules de sang de cordon. Différenciation en présence d'IL-3, GM-CSF et IL-5.....P 119
- Figure 20 : Etude cinétique de l'apparition des ARNm codant pour l'EPO. Etude en Northern blot..... P 120

TABLEAUX

Tableau I	: Principaux facteurs de croissance des éosinophiles humains.....	P 18
Tableau II	: Principales caractéristiques des protéines cationiques de l'éosinophile..	P 26
Tableau III	: Hétérogénéité des éosinophiles.....	P 36
Tableau IV	: Inhibition de la chimioluminescence des éosinophiles induite par HILDA.....	P 66
Tableau V	: Mesure de la libération d'EPO.....	P 71
Tableau VI	: Mesure de l'incorporation de Met ³⁵ S par les éosinophiles après activation par HILDA.....	P 74
Tableau VII	: Etude de la présence de la protéine de 51 KD en fonction de diverses pathologies.....	P 79
Tableau VIII	: Comparaison des profils protéiques des différentes sous-populations d'éosinophiles : Récapitulatif des protéines étudiées.....	P 97
Tableau IX	: Caractéristiques des clones 11, 19, 22.....	P 101

