

50376
1992
131

N° d'ordre: 926

UNIVERSITE DES

DE LILLE

50376

1992

131

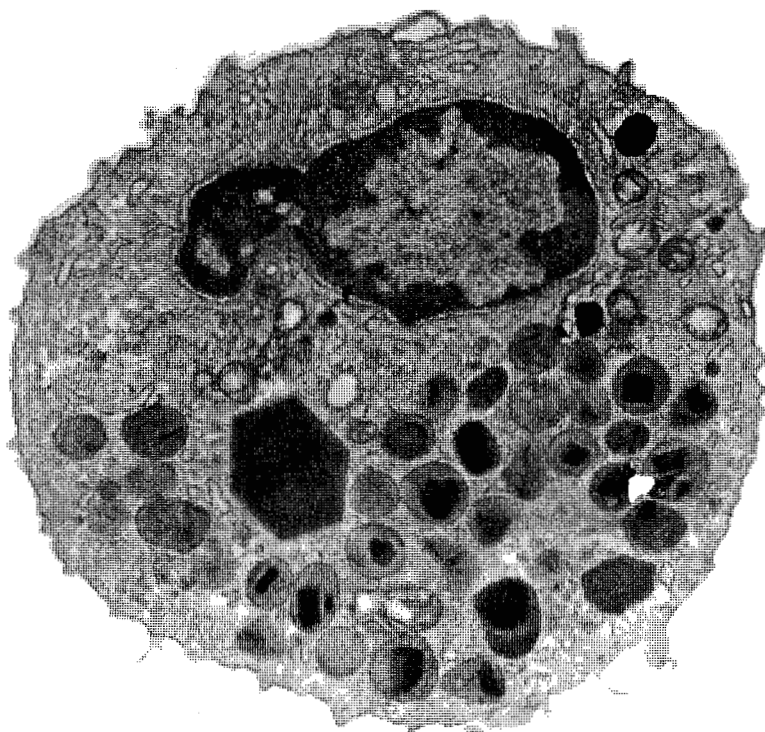
THESE DE DOCTORAT

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

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Joël PLUMAS



**Bases cellulaires et moléculaires
du développement de l'éosinophilie dans les
syndromes hyperéosinophiliques**

Présentée le 19 juin 1992 devant la commission d'examen:

Président : M. VERBERT

Rapporteurs : M^{me} CAPRON
M. DESSAINT

Examineurs : M. CAPRON
M. PORCHET
M. PRIN



03 77 33 4 1

Je dédie cette thèse

à Béatrice,

à mes parents et à mes beaux-parents,

à toute ma famille,

à tous mes amis.

SOMMAIRE GENERAL

Remerciements	p 5
Publications et communications	p 7
Abréviations	p 11
Introduction	p 13
Résultats	p 67
Discussion	p 111
Conclusion	p 143
Matériel et Méthodes	p 148
Bibliographie	p 165
Figures et Tableaux	p 216
Table des matières	p 220

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 Professeur A. Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex) dirigé par Monsieur le Professeur André Capron, au sein du groupe "Etude des mécanismes effecteurs" animé par Madame le Professeur Monique Capron et sous la responsabilité de Monsieur le Professeur Lionel Prin.

Ce travail a été financé par le Ministère de la Recherche et de la Technologie, l'Institut Pasteur de Lille et l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

Je remercie très chaleureusement:

Monsieur le Professeur A. Capron pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour l'aide qu'il m'a apportée dans les moments difficiles. Qu'il trouve dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Madame le Professeur Monique Capron pour m'avoir fait profiter de ses connaissances sur l'éosinophile et qui, par son dynamisme m'a aidé à la réalisation de ce travail. Je souhaite que cette thèse soit l'occasion de lui exprimer tous mes remerciements.

Monsieur le Professeur Dessaint d'avoir accepté tout de suite de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Porchet d'avoir accepté de juger les travaux présentés dans cette thèse. Qu'il soit assuré de toute mon estime.

Monsieur le Professeur Verbert, qui a bien voulu présider le jury de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Prin pour sa disponibilité constante et pour m'avoir instruit de son expérience médicale. Que ce travail soit l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie tous les médecins qui m'ont permis d'accomplir cette thèse. Tous mes remerciements également aux scientifiques américains et japonais pour m'avoir fourni les sondes immunologiques et moléculaires utilisées dans ce travail.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenu et m'ont aidé à réaliser ce travail. Qu'elles trouvent ici et dans ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

Merci.

**Publications
et
Communications**

Publications

Plumas, J., V. Gruart, L. Prin, D. Aldebert, M. J. Truong, A. Capron and M. Capron. 1991. Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 IL-2 receptor subunit. *Eur. J. Immunol.* 21:1265.

Chihara, J., J. Plumas, V. Gruart, J. Tavernier, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1990. Characterization of a receptor for Interleukin-5 (IL-5) on human eosinophils: Variable expression and induction by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *J. Exp. Med.* 172:1347

Prin, L., J. Plumas, V. Gruart, S. Loiseau, D. Aldebert, J. C. Ameisen, A. Vermersch, P. Fenaux, O. Bletry and M. Capron. 1991. Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor: a new marker of disease activity in the hypereosinophilic syndrome. *Blood.* 78:2626.

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

Chihara, J., V. Gruart, J. Plumas, J. P. Kusnierz, G. Torpier, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. (1992) Induction of CD23, CD25 and CD4 expression on an eosinophilic cell line (EoL3) by interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Eur. Cytok. Network.* 3:53.

Desreumaux, P., A. Janin, J.F. Colombel, L. Prin, J. Plumas, D. Emilie, G. Torpier, A. Capron and M. Capron. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* 175: 293.

Gruart, V., M. J. Truong, J. Plumas, M. Zandecki, J. P. Kusnierz, L. Prin, D. Vinatier, A. Capron and M. Capron. (1992) Decreased expression of Eosinophil Peroxydase and Major Basic Protein mRNA during eosinophil maturation. *Blood*. Sous presse.

Plumas, J. , M. Capron, A. Capron, L. Prin. The interleukin 2 receptor in the hypereosinophilic syndrome. *Leukemia and Lymphoma*. Sous presse.

Plumas, J. , F. Barre-Sinoussi, M. Bagot, H. Cong Tran, A. David, G. Torpier, A. Capron and L. Prin. Retroviral infection in the hypereosinophilic syndrome. En preparation.

Plumas, J., V. Gruart, A. Tournoy, D. Vinatier, A. Capron, M. Capron, L. Prin. Dual Effect of IL-2 on eosinophil differentiation. En preparation.

Plumas-Marty, B., R. Schöneck, A. Taibi, J. Plumas, C. Verwaerde, M. Loyens, V. Pommier, H. Gras-Masse, E. Diesis, A. Tartar, A. Capron and A. Ouaiissi. Trypanosoma cruzi glutathione-binding proteins: II. Molecular cloning and expression of the 30 and 25 kDa molecules. Soumis.

Communications Orales (O) et Posters (P)

Plumas, J., V. Gruart, L. Prin, D. Aldebert, A. Capron and M. Capron. (O) Expression of interleukin-2 receptor p55 alpha-chain on blood eosinophils from hypereosinophilic patients. *Présenté au meeting joint de la Société Française d'Immunologie et de la Nederlandse Vereniging voor Immunologie, PARIS; septembre 1990.*

Plumas, J., L. Prin, H. Cong Tran, M. Bagot, A. David, G. Torpier, A. Capron, F. Barré-Sinoussi. (P) Infection rétrovirale dans le syndrome hyperéosinophilique. *Présenté au symposium HTLV; Montpellier, mars 1992*

Plumas, J., V. Gruart, A. Tournoy, A. Capron, M. Capron, L. Prin. Effects of IL-2 on eosinophil differentiation from cord blood mononuclear cells. 48th International Congress of American Academy of Allergy and Immunology. *J. Allergy. Clin. Immunol.* (1992) 89:295 (Abstract)

Chihara, J., J. Plumas, V. Gruart, A. Capron, and M. Capron. (P) Characterization of a receptor for IL5 on human eosinophils. *Présenté au meeting joint de la Société Française d'Immunologie et de Nederlandse Vereniging voor Immunologie, PARIS; septembre 1990.*

Gruart, V., M. J. Truong, J. Plumas, A. Capron and M. Capron. 1991. Differential expression of messenger RNA encoding cationic proteins during eosinophil differentiation. 47th International Congress of American Academy of Allergy and Immunology. *J. Allergy. Clin. Immunol.* (1991) 87:345 (Abstract)

Gruart, V., M. J. Truong, J. Plumas, A. Capron and M. Capron. (O) Decreased expression of Eosinophil Peroxydase (EPO) and Major Basic Protein (MBP) mRNAs during eosinophil differentiation. *Présenté au meeting joint de la Société Française d'Immunologie et de la British Society for Immunology; Londre , octobre 1991*

Prin, L., S. Loiseau, J. Plumas, O. Bletry, P. Fenaux, M. Bagot, M. Capron, A. Capron. (P) Benefical effect of alpha-interferon therapy in malignant hypereosinophilic syndrome. *Présenté à Annual Meeting of the ISIR (International Society for Interferon Research); Nice; novembre 1991.*

ABBREVIATIONS

ADF	:	ATL-derived factor
ADN	:	Acide déoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ATF	:	Activating Transcription Factor
ATL	:	Adult T-cell Leukemia/Lymphoma
ATP	:	Adénosine triphosphate
BFU-E	:	Erythroid burst forming units
CD	:	Antigène de différenciation cellulaire
CFU	:	Colony Forming Unit
CFU-GEMM	:	Granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte-CFU
CFU-GM	:	Granulocyte/macrophage-CFU
CFU-MEG	:	Megakaryocyte-CFU
CREB	:	cAMP Response Element Binding protein
CSF	:	Colony stimulating factor
ECEF	:	Eosinophil Cytotoxicity Enhancing Factor
ECP	:	Eosinophil Cationic Protein
EDN	:	Eosinophil Derived Neurotoxin
ELAM-1	:	Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule-1
EPO	:	Eosinophil Peroxydase
Epo	:	Erythropoïétine
FeLV	:	Feline Leukemia Virus
FGF	:	Fibroblast growth factor
G-CSF	:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GH	:	Growth hormone
GM-CSF	:	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
GTP	:	Guanosine triphosphate
HAM	:	HTLV-I Associated Myelopathy
HES	:	Hypereosinophilic syndrome ou Syndrome Hyperéosinophilique
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus

HLA	:	Antigène de surface cellulaire du complexe majeur d'histocompatibilité humain
HTLV-I	:	Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus type I
ICAM-I	:	InterCellular Adhesion Molecule 1
IFN	:	Interferon
IL-	:	Interleukine
IL-2R	:	Récepteur pour l'Interleukine 2
IL-2Rs	:	Récepteur pour l'Interleukine 2 soluble
kb	:	Kilo bases
kD	:	Kilo Dalton
kd	:	Constante de dissociation
LAK	:	Lymphokine-Activated Killer
LCF	:	Lymphocyte Chemoattractant Factor
LFA	:	Leucocyte Fonction-associated Antigen
LTC4	:	Leucotriène C4
LTR	:	Long Terminal Repeat
M-CSF	:	Macrophage-colony stimulating factor
MBP	:	Major Basic Protein
MoLV	:	Murine Moloney Leukemia Virus
NK	:	Natural Killer
PAF	:	Platelet activating factor
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PDGF	:	Platelet-derived growth factor
PGE	:	Prostaglandine
PHA	:	Phytohémagglutinine
PKC	:	Protéine kinase C
PST	:	Paraparésie Spastique Tropicale
SCF	:	Stem cell factor
SIDA	:	Syndrome d'Immunodéficience Acquisée
TAC	:	T-cell Activation
TGF	:	Transforming growth factor
TNF	:	Tumor necrosis factor
VCAM-1	:	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4	:	Very Late Activation Antigen 4

INTRODUCTION

Les progrès réalisés ces dix dernières années à la fois dans les domaines de la biologie cellulaire, de l'immunologie et de la biologie moléculaire ont permis de disposer d'une large gamme d'outils moléculaires (protéines recombinantes, anticorps spécifiques, sondes nucléiques, ...) et d'introduire des méthodologies plus fines (amplification génique en chaîne ou PCR, hybridation in situ, ...). L'application de ces nouvelles techniques à l'étude de la physiopathologie de l'éosinophile a contribué à apporter des données tout à fait novatrices, bouleversant parfois certains concepts, sur la structure, la physiologie et le rôle de cette cellule.

L'éosinophile fut pour la première fois décrit précisément en 1879 par Ehrlich⁽¹⁾. Comme les neutrophiles ou les basophiles, c'est une cellule granuleuse ayant un noyau bi- ou poly-lobé. L'affinité tinctoriale particulière de ces granules pour des colorants acides comme l'éosine lui a conféré son nom. Cette cellule est normalement peu représentée dans la circulation sanguine (environ 1% à 4% des leucocytes) mais possède un fort tropisme tissulaire (peau et muqueuses gastrointestinales, bronchiques, ...). L'éosinophile fut longtemps considéré comme jouant un rôle passif dans la réponse immunitaire vis à vis d'éléments étrangers (allergènes, bactéries ou parasites). Mais les données recueillies ces dernières années, et parfois très récemment, à la fois dans les modèles pathologiques et dans les modèles expérimentaux font apparaître l'éosinophile comme étant un élément actif dans la réponse immunitaire. Cette cellule se révèle, en fait, extrêmement complexe tant au niveau de la compréhension de son activation que dans

l'appréhension de sa propre genèse.

L'éosinophile peut se comporter comme un élément bénéfique ou néfaste selon les pathologies. On lui attribue un rôle protecteur, notamment dans les infections parasitaires, mais il peut être aussi délétère, particulièrement dans les maladies allergiques. C'est cependant dans les syndromes hyperéosinophiliques où les taux d'éosinophiles circulants sont les plus élevés, que le rôle néfaste de cette cellule est le mieux observé. Ces syndromes représentent un groupe hétérogène de pathologies associées à une éosinophilie massive et persistante, à la fois sanguine et tissulaire. Il existe des formes bénignes et des formes plus sévères associées à des lésions viscérales multiples et graves, qui peuvent parfois annoncer le développement d'un lymphome. Ce modèle d'étude remarquable a permis de mettre en évidence plusieurs propriétés fonctionnelles de l'éosinophile mais les modalités causales du développement de ce syndrome demeurent, à l'heure actuelle, indéterminées.

Notre contribution à l'étude de la physiopathologie de l'éosinophile s'est orientée vers la recherche des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant au développement du syndrome hyperéosinophilique.

Le rôle critique des lymphocytes T dans l'éosinopoïèse et dans l'activation des éosinophiles clairement démontré ces dernières années nous a conduit à nous intéresser à l'interleukine 2 (IL-2) et à son récepteur. Dans ce travail nous avons étudié à la fois les cellules mononucléées et les éosinophiles sanguins de patients mais aussi les cellules hématopoïétiques issues de sang de cordon ombilical. D'autre part, le développement de lymphome T en association avec certaines formes du syndrome hyperéosinophilique a suscité l'idée qu'une infection

rétrovirale puisse être impliquée dans le développement de l'éosinophilie. Cette hypothèse nous a conduit à étudier le rétrovirus HTLV-I.

Nous avons ainsi abordé l'origine de l'hyperéosinophilie dans le cadre des syndromes hyperéosinophiliques sous deux aspects: le développement d'une éosinophilie réactionnelle, par le biais de l'activation d'autres cellules, et/ou d'une éosinophilie intrinsèque c'est à dire consécutive à une anomalie de la lignée éosinophile ou à un dérèglement du contrôle de l'éosinopoïèse.

Dans cette introduction nous présenterons les syndromes hyperéosinophiliques et le contrôle de l'éosinopoïèse ainsi que les caractéristiques cellulaires et moléculaires de l'éosinophile. Nous décrirons ensuite la structure et la régulation du récepteur pour l'interleukine 2; élément central dans la réponse immunitaire. Nous détaillerons enfin, la biologie moléculaire du rétrovirus HTLV-I ou Human T-cell Leukemia/lymphoma Virus type I, premier rétrovirus isolé chez l'homme.

**LE SYNDROME
HYPEREOSINOPHILIQUE
ET L'EOSINOPHILE**

1- Pathologie et traitement

Les capacités cytotoxiques de l'éosinophile, son rôle éventuel de cellule présentatrice d'antigène et sa capacité de libération de nombreuses molécules inflammatoires ou cytotoxiques lui confèrent un rôle particulièrement important dans la réponse immune vis à vis d'allergènes, d'antigènes bactériens ou parasitaires. Mais la non spécificité de ses molécules toxiques font apparaître également l'éosinophile comme étant une cellule agressive vis à vis de l'hôte, en particulier dans le contexte d'hyperéosinophilies.

Le syndrome hyperéosinophilique ou HES

On retrouve l'éosinophile associé à de nombreuses pathologies⁽²⁾, mais ce sont les hyperéosinophilies n'ayant pas de cause définie qui ont retenu notre attention.

C'est en 1968 que les termes de syndrome hyperéosinophilique sont introduits⁽³⁾, mais ce n'est qu'en 1975 qu'apparaît une définition claire et précise de ce syndrome⁽⁴⁾. La prévalence de cette pathologie est environ de 1/100 000. Il y a une forte prépondérance masculine (9 hommes atteints pour 1 femme). L'HES affecte le plus souvent des individus âgés de 20 à 50 ans mais aussi parfois de très jeunes enfants (5 mois à 5 ans)^(3,5).

L'HES se définit par une hyperéosinophilie sanguine supérieure à $1,5 \times 10^9$ éosinophiles par litre, évoluant depuis au moins six mois et sans qu'aucun agent causal n'ait été déterminé. Le nombre d'éosinophiles circulants chez un individu normal est $\leq 0,4 \times 10^9/L$. Ce syndrome est souvent accompagné de complications cliniques affectant principalement le coeur, le système nerveux central mais aussi

les poumons, la peau, le système vasculaire et le tube digestif⁽⁴⁾. Ces lésions viscérales résultent de la libération de médiateurs toxiques par les éosinophiles infiltrant de façon massive les tissus. Des biopsies médullaires mettent en évidence, dans le cas des patients atteints d'HES, une hyperplasie des précurseurs éosinophiles pouvant atteindre 20% à 80% des cellules nucléées.

Certaines formes d'HES présentent des caractères évoquant un processus malin tant par les données cliniques (myélofibrose, hépatosplénomégalie) que par l'existence de marqueurs leucémiques (taux élevés de vitamine B12 sérique, diminution des phosphatases alcalines leucocytaires, déficit en folate)⁽⁶⁾. On observe même dans certains cas, une association de l'éosinophilie à un lymphome T⁽⁷⁻¹⁰⁾, une leucémie lymphoblastique⁽¹¹⁻¹⁴⁾ ou encore un lymphome B⁽¹⁵⁾. L'éosinophilie peut même parfois précéder de plusieurs années un lymphome T⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Dans le cas particulier des lymphomes gastrointestinaux, une étude réalisée sur 250 patients montre que plus de 10% des cas sont associés à une éosinophilie tissulaire massive⁽¹⁹⁾.

Ces dernières observations suggèrent fortement que le développement des hyperéosinophilies est en étroite relation avec l'activation des lymphocytes. Les éléments moléculaires de cette association, en dehors des anomalies chromosomiques affectant notamment le chromosome 5^(20,21), sont à ce jour encore mal définies.

L'éosinophile: une population cellulaire hétérogène

L'étude des HES a contribué à la mise en évidence de sous-populations d'éosinophiles séparés par centrifugation sur gradient discontinu de

métrizamide^(22,23). Les éosinophiles sont regroupés en deux groupes selon leur densité. On distingue les éosinophiles de densité anormalement faible, appelés hypodenses, des éosinophiles de densité plus élevée considérés comme normodenses. Le mécanisme précis responsable de cette réduction de densité n'est pas clarifié mais il semble impliquer une diminution du volume cellulaire occupé par les granules ainsi qu'une diminution du nombre, de la taille et de l'intégrité de ces granules⁽²⁴⁾. Chez les sujets normaux, seuls les éosinophiles normodenses sont décelés dans le sang périphérique. Par contre, dans un contexte d'infection parasitaire, d'allergie ou d'HES, on observe un nombre parfois important d'éosinophiles hypodenses⁽²³⁾. Cette population cellulaire se retrouve aux étages sanguin et tissulaire, et des relations ont été établies entre la présence de ces cellules et le risque d'atteinte viscérale ⁽²⁵⁾. A côté de ces critères, différents travaux ont montré qu'il existait une hétérogénéité structurale, biochimique et fonctionnelle de ces sous-populations conduisant à associer le critère d'hypodensité à un état d'activation^(24,26-28).

Approche Thérapeutique

Plusieurs protocoles de traitement existent à l'heure actuelle utilisant les corticoïdes parfois en association avec l'hydroxyurée⁽²⁹⁾ ou d'autres agents anti-mitotiques ou cytostatiques (vincristine, thioguanine, cytarabine, adriblastine,...) dans les cas d'HES avec ou sans lymphome T détectable. En l'absence de critères précis d'évolution de la maladie, ces traitements restent délicats à utiliser et parfois inefficaces. Une stratégie thérapeutique établie sur des bases rationnelles doit encore être définie.

2- Contrôle de l'éosinopoïèse

Lors de l'embryogénèse, l'hématopoïèse est d'abord hépatique puis devient médullaire au cours du développement. Les précurseurs éosinopoïétiques représentent environ 3% des cellules nucléées dans la moelle osseuse chez un sujet sain. Comme pour les autres lignées hématopoïétiques, l'éosinophile est issu d'une cellule souche très indifférenciée qui subit une série de modifications morphologiques, phénotypiques et biochimiques au cours de sa différenciation et de sa prolifération. Quatre stades de précurseurs éosinophiles sont bien identifiés: les cellules blastiques se différencient en promyélocytes (stade au cours duquel apparaissent les granules spécifiques), puis en myélocytes, métamyélocytes et granulocytes éosinophiles. La proportion cellulaire de ces stades est de 1 à 2% de promyélocytes, 36% de myélocytes, 26% de métamyélocytes et 36% de granulocytes. L'émergence des éosinophiles dans la circulation sanguine est d'environ 2,5 jours (temps entre la dernière division et l'apparition des éosinophiles dans le sang). Une étude datant de 1979 indique que le "turn-over" moyen de l'éosinophile serait de $0,22 \times 10^9$ cellules/kg/jour et que la réserve d'éosinophiles dans la moelle attendrait $0,14 \times 10^9$ cellules/kg⁽³⁰⁾. Cette large réserve pourrait contribuer à l'augmentation rapide du nombre d'éosinophiles circulants dans certaines pathologies.

Les mécanismes impliqués dans les différentes étapes de la différenciation des cellules souches en éosinophiles sont complexes et loin d'être complètement identifiés. C'est en 1970 que la notion de thymodépendance de l'éosinopoïèse a été introduite⁽³¹⁾ et depuis, de nombreuses études ont analysé l'effet des facteurs d'origine lymphocytaire (principalement l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5) sur le

développement des éosinophiles à partir de cultures semi-solides ou liquides de cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse, du foie foetal, de la rate ou du sang de cordon ombilical. Dans d'autres études, des lignées cellulaires établies à partir de cellules leucémiques de patients atteints de leucémie lymphoïde ou myéloïde ont été utilisées comme modèle. Ces expériences réalisées à la fois chez l'homme et dans le modèle murin ont apporté des données précieuses quant à la nature des cellules cibles et des médiateurs impliqués.

2-1 Différenciation d'une cellule souche en précurseur mixte granulocyte/macrophage (CFU-GM) (Figure 1)

C'est à partir d'une même cellule souche (cellule totipotente) que dérivent toutes les lignées hématopoïétiques. Aucun marqueur membranaire, permettant de les identifier, n'est connu à ce jour. Ces cellules sont vraisemblablement en nombre très limité. De ce type cellulaire dérivent des cellules souches pluripotentes exprimant l'antigène membranaire CD34. Cette cellule a la potentialité de se différencier en progéniteur lymphoïde, à partir duquel dérivent les lymphocytes T, B et les cellules NK (Natural Killer) ou en progéniteur mixte (CFU-GEMM). Ces derniers expriment les antigènes membranaires CD34 et CD33 et peuvent poursuivre leur différenciation selon trois voies: la première conduit à la formation de mégakaryocytes puis de plaquettes (CFU-MEG), la seconde à la formation d'hématies ou d'érythrocytes (BFU-E) et enfin la dernière conduit à la formation de progéniteurs mixtes granulocyte/macrophage (CFU-GM).

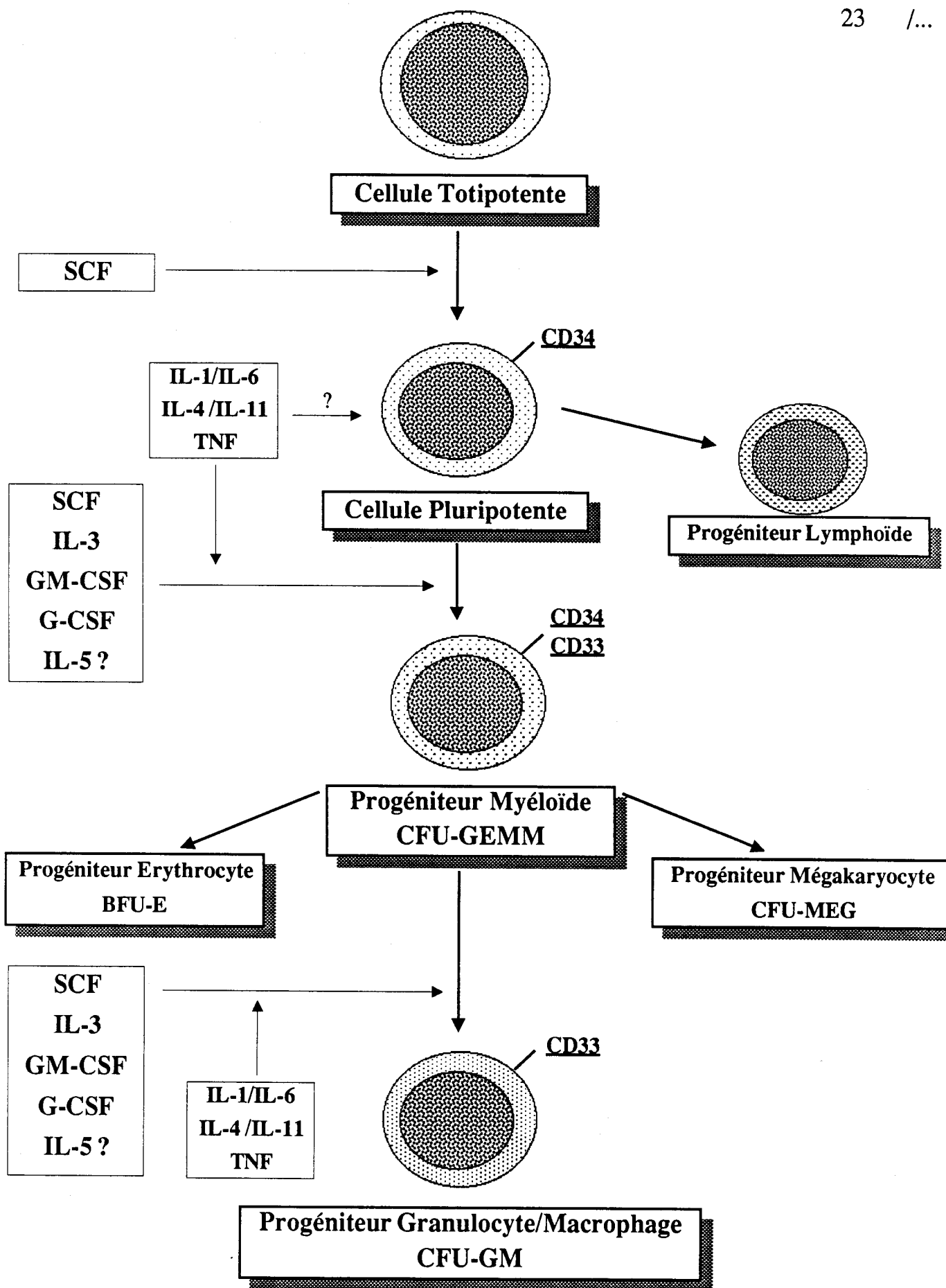


Figure 1 : D'une cellule souche au précurseur mixte granulocyte/macrophage

Le rôle de l'IL-3, du GM-CSF et du G-CSF sur ces différentes étapes a été assez bien étudié ces dernières années. Plusieurs travaux ont montré l'effet positif de ces cytokines sur l'induction et la prolifération des cellules exprimant la molécule CD34⁽³²⁻³⁴⁾ ainsi que sur la modification des phénotypes membranaires^(32,35), telle que la diminution de l'expression de l'antigène CD34 et l'apparition de l'expression de l'antigène CD33 au cours de la maturation. Ces cytokines pourraient agir de façon séquentielle: l'IL-3 puis le GM-CSF⁽³⁴⁾. D'autres cytokines interviennent également dans ces processus, notamment l'IL-1, l'IL-6, le TNF, l'IL-4 et l'IL-11. Elles semblent agir de façon indirecte par deux voies distinctes. La première est l'augmentation de la sécrétion d'autres facteurs soit par les cellules du stroma médullaire^(36,37), soit directement par les cellules hématopoïétiques⁽³⁸⁾. La seconde voie passe par un effet synergique ou inhibiteur de l'action d'autres facteurs. Ces cytokines agiraient en induisant le passage, des cellules au repos, de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire, permettant ainsi l'action plus rapide de facteurs pluripotents comme l'IL-3.

Les données de la littérature font apparaître que l'action de telle ou telle cytokine varie en fonction des combinaisons factorielles, des modèles et des conditions expérimentales. Plusieurs travaux indiquent cependant que l'IL-1 β ⁽³⁹⁾ et l'IL-6⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ agissent sur des cellules jeunes en potentialisant les effets de l'IL-3, alors que seules, elles n'ont pas ou peu d'activité sur la croissance ou la différenciation cellulaire. Ce phénomène est également observé pour l'IL-11 (produite par les cellules du stroma)⁽⁴³⁾ en association avec l'IL-3⁽⁴⁴⁾ ou avec l'IL-4⁽⁴⁵⁾. L'effet de l'IL-4 est différent suivant la nature de la cytokine ajoutée; il diminue en présence d'IL-3^(46,47) mais augmente en présence de G-CSF⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾, la

formation de CFU-GM. La modulation de la croissance et de la différenciation cellulaire induite par le TNF est un bon exemple des problèmes d'interprétation liés aux conditions expérimentales. Deux études réalisées dans le même groupe montrent que le TNF potentialise les effets de l'IL-3 sur des cellules CD34+ à court terme, mais par contre dans des cultures à long terme, le TNF se présente comme un inhibiteur^(49,50).

Des données récentes permettent de percevoir les mécanismes d'action de ces cytokines sur l'hématopoïèse. En effet, le TNF augmente l'expression des récepteurs pour l'IL-3 et pour le GM-CSF⁽⁵¹⁾ alors qu'il diminue celle du récepteur pour le G-CSF⁽⁵²⁾ sur des cellules de patient atteint de leucémie myéloïde aiguë. De la même façon, l'IL-1 augmente l'expression des récepteurs pour l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 sur une lignée cellulaire hématopoïétique⁽⁵³⁾. De plus, ces médiateurs semblent interagir entre eux; le TNF module en effet la réponse des cellules CD34+ à l'IL-1⁽³⁸⁾.

Il paraît raisonnable de penser que d'autres facteurs connus ou non pourraient également intervenir dans ces interactions complexes et conduire à une modulation soit positive, soit négative, de l'hématopoïèse. C'est ainsi qu'un nouveau facteur produit par les cellules du stroma médullaire^(54,55) a été caractérisé depuis peu, le SCF ou Stem Cell Factor. Ce facteur est multipotent, il agit à la fois sur les cellules des lignées lymphoïdes, myéloïdes et mastocytaires^(55,56). Il potentialise les effets de l'IL-3, du GM-CSF et de l'érythropoïétine (Epo) sur les cellules très immatures^(57,58). Ce facteur est le ligand du produit du proto-oncogène *c-kit*, un récepteur de surface possédant une

activité tyrosine kinase et appartenant à la même famille que celle des récepteurs pour le PDGF et le M-CSF. Ce récepteur est exprimé par 1 à 6% des cellules blastiques de la moelle ou du foie foetal^(59,60). Le SCF est particulièrement intéressant puisqu'il agit sur des cellules très indifférenciées⁽⁶¹⁾ et qu'il maintient, en absence d'autres facteurs, la survie de ces cellules. L'injection de SCF chez le babouin conduit à une augmentation de tous les éléments sanguins (hématies, lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles). La cellularité médullaire de ces primates ainsi que le nombre absolu de CFU-GM et de BFU-E sont fortement augmentés⁽⁶²⁾. Le SCF apparaît comme un outil précieux en clinique dans beaucoup de pathologies sanguines, notamment dans le cas d'aplasie médullaire ou de cytopénies observées chez les patients atteints du SIDA⁽⁶³⁾. De futurs travaux apporteront sans doute de nouvelles informations quant à la nature des mécanismes induits dans les processus de prolifération et de différenciation des cellules très jeunes.

2-2 Des progéniteurs mixtes granulocyte/macrophage (CFU-GM) aux éosinophiles (Figures 2)

Au stade CFU-GM, les cellules se différencient vers deux voies aboutissant soit aux monocytes/macrophages (Monoblastes) soit aux granulocytes (Myéloblastes). Ces derniers ont la capacité de se différencier en granulocytes basophiles, neutrophiles ou éosinophiles en passant par les stades promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes et granulocytes matures. L'IL-3, le GM-CSF ou l'IL-5 conduisent tous à la génération d'éosinophiles mais seule l'IL-5 est spécifique de la lignée éosinophile⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

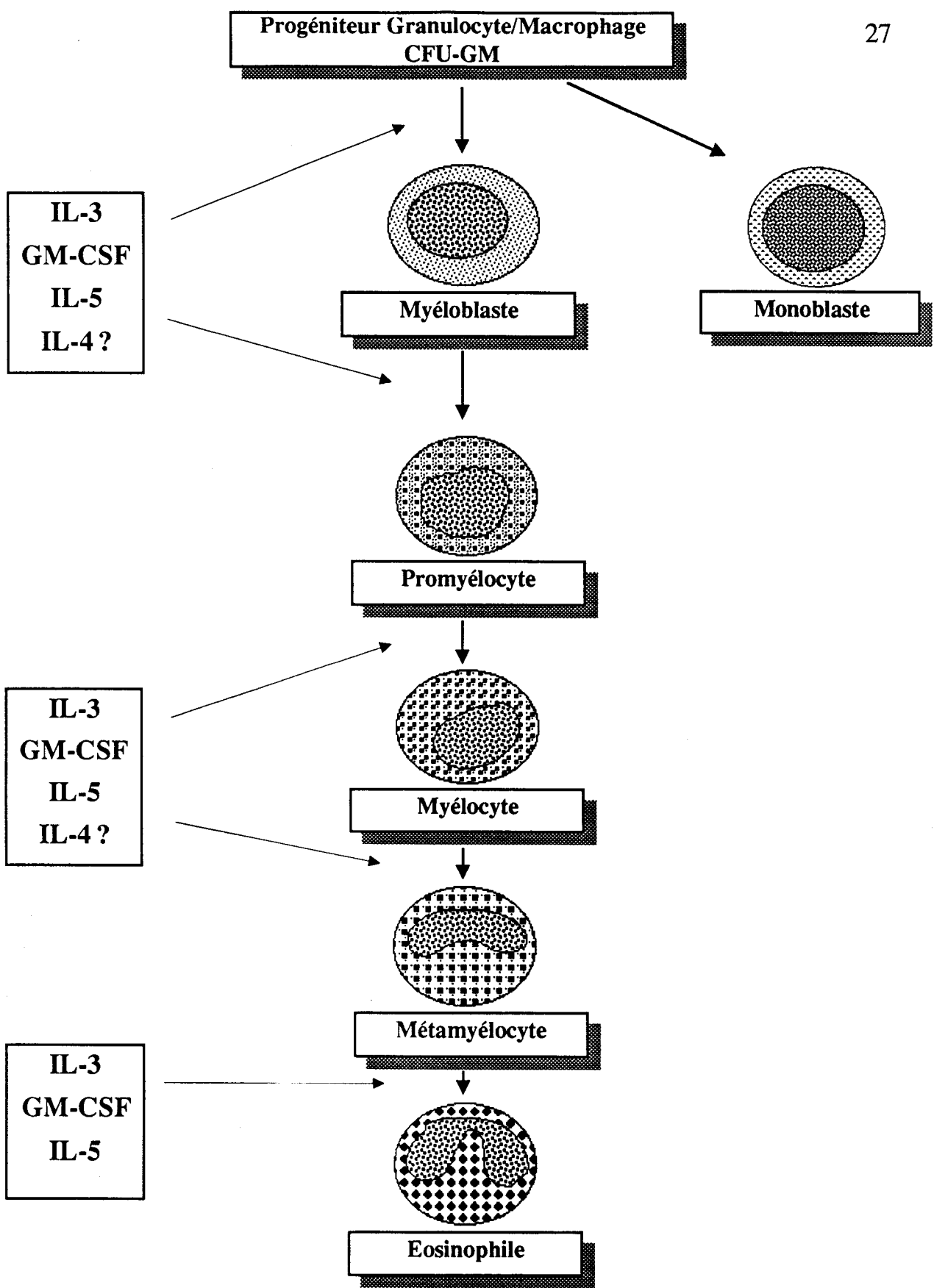


Figure 2 : D'un précurseur mixte granulocyte/macrophage à l'éosinophile

Ces cytokines peuvent agir seules ou en synergie. Les données de la littérature indiquent que l'IL-3 et le GM-CSF potentialisent les effets de l'IL-5^(67,68). Mais plusieurs travaux sont en contradiction sur la nature des cellules répondant à l'IL-5 et par conséquent sur la capacité de cette cytokine à conduire seule une différenciation des cellules souches en éosinophiles matures. Certains auteurs suggèrent que l'IL-5 agirait sur des cellules stimulées par l'IL-3 ou le GM-CSF^(64,68,69) alors que d'autres observent une différenciation des cellules souches en éosinophiles matures avec l'IL-5 seule^(65,66) et proposent même l'existence d'une sous-population répondant spécifiquement à l'IL-5⁽⁶⁵⁾. L'établissement de lignées de souris transgéniques exprimant l'IL-5 de façon constitutive et développant une hyperéosinophilie⁽⁷⁰⁾ argumente l'hypothèse que l'IL-5 est capable seule d'induire une éosinophilie et donc d'agir sur les cellules souches. L'injection d'anticorps anti-IL-5 à ces souris bloque le développement de l'éosinophilie⁽⁷¹⁾.

Le rôle d'autres cytokines sur ces stades de l'éosinopoïèse est peu documenté ou très controversé, excepté pour l'IL-4 qui semble, en association avec l'IL-3, avoir un effet inducteur positif non négligeable⁽⁷²⁾.

Le contrôle de l'éosinopoïèse est le résultat d'interactions complexes entre différents médiateurs. Il existe certainement un mécanisme de régulation négative permettant d'atteindre un équilibre stable afin de réguler la formation d'éosinophiles chez un sujet normal. Le dérèglement de ce mécanisme ou l'expression exagérée d'un ou plusieurs médiateurs positifs doit entraîner une génération accrue d'éosinophiles dans la moelle. Enfin, l'absence de précurseurs

éosinophiles dans la circulation sanguine même dans les cas de fortes éosinophilies (excepté dans quelques rares cas⁽¹⁴⁾) évoque l'existence de mécanismes particuliers régulant le passage des éosinophiles de la moelle osseuse vers le compartiment sanguin. Ces mécanismes pourraient impliquer des molécules de surface comme les molécules d'adhésion.

3- Les récepteurs et les médiateurs de l'éosinophile

Contrairement au neutrophile dont le pouvoir phagocytaire est important, l'éosinophile possède une faible capacité de phagocytose⁽⁷³⁾, aussi appelée microphagocytose, par ce qu'elle affecte le plus souvent des petites molécules comme les complexes immuns. Les fonctions principales de l'éosinophile résident dans la propriété de libérer différents types de médiateurs en réponse à une stimulation spécifique.

La synthèse des données sur les capacités de métabolisme et de libération de ces médiateurs ainsi que sur l'expression de composants ou de récepteurs membranaires spécifiques témoigne de la complexité des mécanismes générant une expression fonctionnelle de l'éosinophile.

3-1 Les récepteurs (Figure 3)

La caractérisation cellulaire et moléculaire des récepteurs spécifiques ou des composants membranaires de l'éosinophile a connu des progrès considérables ces dernières années et a contribué à une meilleure compréhension des mécanismes d'activation de cette cellule. Certains de ces récepteurs participent à la

mobilisation des éosinophiles notamment du compartiment médullaire au compartiment sanguin ou tissulaire. Cependant, toutes ces molécules ne sont pas identifiées en termes de caractérisation physicochimique (nombre et affinité des récepteurs, ...) ou de caractérisation biochimique ou moléculaire (nature du récepteur, clonage de l'ADN complémentaire,...). Leur présence est néanmoins suggérée par leur capacité à moduler telle ou telle fonction de l'éosinophile.

Une fois encore, la diversité de la nature de ces composants membranaires illustre bien le potentiel de cette cellule.

3-11- Les récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines

Ces récepteurs sont des molécules qui fixent la partie cristallisable des chaînes lourdes des immunoglobulines. Trois types de récepteurs sont connus et particulièrement étudiés pour leur rôle dans les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps.

- un récepteur de faible affinité pour l'immunoglobuline G (FcγRII ou CD32)^(74,75). Il a été démontré plus récemment, après stimulation par l'interféron gamma, l'expression d'un autre récepteur de faible affinité pour l'immunoglobuline G (FcγRIII ou CD16) à la surface de l'éosinophile⁽⁷⁶⁾,

- un récepteur pour l'immunoglobuline A^(77,78), particulièrement important pour les défenses de l'organisme au niveau des muqueuses,

- un récepteur de faible affinité pour l'immunoglobuline E⁽⁷⁹⁾, présentant des homologies avec celui du lymphocyte B (ou CD23). D'autres structures moléculaires présentes à la surface des éosinophiles, semblent également fixer l'IgE telle que la molécule MAC-2 de nature lectinique⁽⁸⁰⁾. Ce type de récepteur

est étudié dans les contextes des maladies allergiques et des infections parasitaires.

3-12- Les récepteurs pour le complément

L'éosinophile fixe certains composants du complexe du complément (C1q⁽⁸¹⁾, C3a et C5a⁽⁸²⁾, C3b (CR1) et C3bi (CR3)^(75,83,84)). Ces protéines interviennent en temps que stimulants des fonctions cytotoxiques (C1q), chimioattractants (C3a et C5a) mais aussi interviennent dans l'adhésion de l'éosinophile (CR3).

3-13- Les récepteurs pour les médiateurs lipidiques

Le PAF et le LTB₄ possèdent aussi des effets sur le chimiotactisme de l'éosinophile. De plus, ils stimulent leur dégranulation et la formation d'anions superoxydes⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

3-14- Les récepteurs pour les stéroïdes

Les stéroïdes sont utilisés dans le traitement de certaines hyperéosinophilies. Une étude a montré que la corticorésistance de certains patients était en relation avec une absence de récepteur détectable sur l'éosinophile⁽⁸⁸⁾. Les mécanismes impliqués dans la sensibilité des patients aux corticoïdes ne sont pas très bien définis à l'heure actuelle. Ils pourraient cependant faire intervenir une inhibition de la mobilité des éosinophiles et une action négative sur l'éosinopoïèse. Des travaux récents montrent que les corticoïdes diminuent la survie des éosinophiles, médiée par l'IL-3, le GM-CSF ou l'IL-5^(89,90).

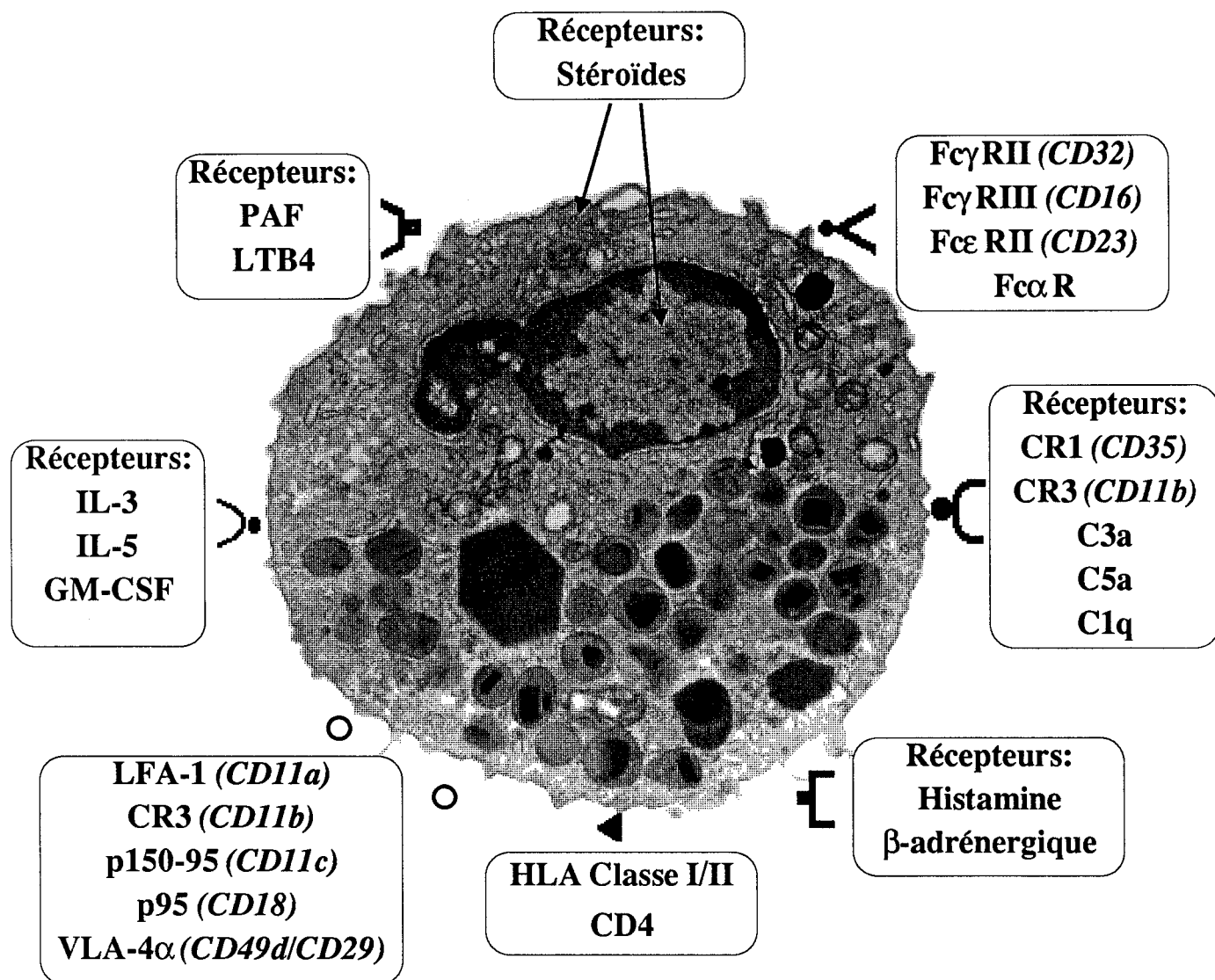


Figure 3 : Composants membranaires et récepteurs de l'éosinophile

3-15- Les récepteurs pour les interleukines

Jusqu'à présent, les récepteurs pour le TNF, l'IFN ou l'IL-1 ne sont pas caractérisés sur l'éosinophile. On suspecte cependant fortement leur existence du fait de leur action non négligeable sur l'expression de certaines fonctions de cette cellule (IFN^(91,92); TNF⁽⁹³⁾; IL-1⁽⁹⁴⁾).

Les récepteurs pour l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont caractérisés depuis peu. Ces récepteurs sont particulièrement importants d'une part dans l'activation et la survie des éosinophiles et d'autre part dans le contrôle de l'éosinopoïèse.

Plusieurs études ont montré que ces récepteurs se présentaient en nombre relativement peu élevé, de 300 à 900 sites par cellule pour l'IL-3 et le GM-CSF⁽⁹⁵⁾ et de 200 à 600 pour l'IL-5⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Le nombre de récepteurs pour l'IL-5 est par contre plus élevé (300 à 1700 sites) sur une lignée cellulaire différenciée en éosinophiles (HL60)⁽⁹⁹⁾. En terme de propriétés physicochimiques, les récepteurs peuvent fixer leur ligand avec une faible ou avec une haute affinité suivant la source cellulaire (cellules isolées de sujet sains ou de patients) et/ou suivant l'état d'activation des cellules.

Le clonage et le séquençage récents de ces récepteurs à la fois chez l'homme et dans le modèle murin à apporter des informations tout à fait novatrices sur la nature de ces protéines⁽¹⁰⁰⁾. A partir de plusieurs lignées cellulaires, trois équipes⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾ ont montré que les récepteurs pour l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF se présentaient sous forme d'un complexe de deux chaînes polypeptidiques. Il existe une chaîne alpha spécifique qui lie chaque ligand (IL-5⁽¹⁰¹⁾; IL-3⁽¹⁰²⁾; GM-CSF⁽¹⁰³⁾) avec une faible affinité et une chaîne bêta commune⁽¹⁰⁴⁾ qui n'a pas la capacité de fixer le ligand. La chaîne bêta s'associe à la chaîne alpha pour

former un récepteur de forte affinité, en diminuant considérablement la constante de dissociation du récepteur.

Ces quatre chaînes polypeptidiques appartiennent à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ qui comprend aussi, les récepteurs pour l'érythropoïétine (Epo), la prolactine, l'hormone de croissance (GH), les récepteurs pour l'IL-4, l'IL-6, l'IL-7, le G-CSF et la chaîne bêta du récepteur pour l'IL-2. Les membres de cette famille possèdent presque tous, deux motifs particuliers situés dans leur domaine extracellulaire: le premier comprend un ensemble de quatre résidus cystéine et le second, situé à proximité de la membrane cellulaire, correspond à un enchaînement particulier de cinq acides aminés: Tryp-Ser-X-Tryp-Ser ou WSXWS. Ces deux domaines très conservés, semblent avoir un rôle dans la conformation du récepteur. Dans le cas du récepteur pour l'IL-2, une étude a montré que l'intégrité des résidus tryptophanes dans le motif WSXWS était essentielle à la formation du site de fixation de l'IL-2 et du mécanisme de transduction du signal d'activation⁽¹⁰⁸⁾.

La coexpression de ces quatre chaînes sur l'éosinophile présente un intérêt particulier. Il apparaît que la transduction du signal soit transmise par la chaîne bêta; on comprend ainsi mieux le rôle commun joué par l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 sur l'activation et la genèse des éosinophiles. La succession des événements cellulaires découlant de la fixation du ligand sur son récepteur serait proche, voire similaire, dans les trois cas; ce qui commence à être vérifié dans certains modèles⁽¹⁰⁹⁾. De plus, les observations d'inhibition croisée observées entre l'IL-3 et le GM-CSF sur l'éosinophile⁽⁹⁵⁾ mais aussi dans d'autres modèles⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾

trouvent maintenant une explication. Le partage d'une même chaîne bêta peut entraîner en plus d'une simple compétition entre les ligands, une déplétion des chaînes bêta, par internalisation du récepteur, désensibilisant en quelque sorte la cellule pour les autres ligands.

L'analyse de l'expression des gènes de ces cytokines et des mécanismes induits par la fixation des ligands apporteront sans doute beaucoup à la compréhension des mécanismes d'activation des éosinophiles et de ceux impliqués dans la différenciation des cellules souches en cellules matures. Une étude réalisée sur une lignée hématopoïétique établie à partir d'un patient ayant une érythroleucémie montre que l'IL-1 augmente à la fois l'expression de la chaîne alpha de l'IL-3, du GM-CSF et de l'IL-5 de façon plus ou moins marquée et de la chaîne bêta commune⁽⁵³⁾. Sur l'éosinophile, le GM-CSF lui-même semble moduler l'expression de la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-5⁽⁹⁶⁾.

3-16- Les autres récepteurs

Une récente étude a montré que l'éosinophile possédait plus de 4000 récepteurs bêta-adrénergiques de forte affinité. Le rôle de ces récepteurs n'est pas encore clarifié. Les données actuelles montrent cependant qu'ils n'interviennent pas dans la dégranulation ou sur le métabolisme oxydatif de l'éosinophile⁽¹¹³⁾.

L'éosinophile est aussi capable de fixer l'histamine par des récepteurs de type H1 et H2⁽¹¹⁴⁾ et d'y répondre par l'augmentation de ses propriétés toxiques.

Un récepteur pour l'ECEF (Eosinophil Cytotoxicity Enhancing Factor), un groupe de trois polypeptides monocytaires qui augmente de façon considérable la cytotoxicité⁽¹¹⁵⁾, serait également présent à la surface de l'éosinophile.

3-2 Les composants membranaires (Figure 3)

3-21 Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion jouent un rôle important dans la mobilisation et l'expression des réponses fonctionnelles de l'éosinophile. Une récente étude montre que l'injection d'un anticorps anti-ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) à des primates avant inhalation du challenge antigénique diminue l'infiltration d'éosinophiles et l'hypersensibilité bronchique⁽¹¹⁶⁾. Ces molécules favorisent vraisemblablement la migration des éosinophiles dans les tissus et peut être même régulent le passage des éosinophiles matures de la moelle osseuse vers la circulation générale.

L'éosinophile exprime les antigènes membranaires CD11: LFA-1 (Leucocyte Fonction-associated Antigen) ou CD11a, le récepteur du fragment C3bi du complément ou CD11b et la protéine p150,95 ou CD11c. Ces trois chaînes s'associent avec une chaîne bêta commune: la protéine p95 ou CD18 également exprimée par l'éosinophile^(84,117). La protéine ICAM-1 est le ligand du complexe LFA-1/CD18. L'éosinophile exprime aussi le complexe protéique VLA-4 α (Very Late Activation Antigen 4 α ou CD49d/CD29) dont le ligand est la protéine VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)⁽¹¹⁸⁻¹²¹⁾. La molécule ELAM-1 (Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule-1) semble également jouer un rôle dans les mécanismes d'adhésion entre l'éosinophile et la cellule endothéliale^(117,118,121).

3-22 Les protéines CD4 et HLA-DR

Ces deux protéines se trouvent généralement associées aux lymphocytes. Elles ont cependant été décrites comme exprimées à la surface des éosinophiles matures de façon importante pour le CD4⁽¹²²⁾ ou après stimulation par le GM-CSF en ce qui concerne l'HLA-DR⁽¹²³⁾. Une récente étude a montré que le LCF (Lymphocyte Chemoattractant Factor) qui lie le CD4 et stimule la migration des lymphocytes T CD4+, a des effets analogues sur les éosinophiles CD4+⁽¹²⁴⁾. Enfin, la démonstration de l'infection in vitro de précurseurs médullaires éosinophiles par le HIV (Human Immunodeficiency Virus), renforce l'intérêt porté à la molécule CD4 sur l'éosinophile et fait apparaître cette cellule comme un réservoir potentiel de virus in vivo⁽¹²⁵⁾.

L'expression d'HLA-DR à la surface de l'éosinophile, sa capacité de phagocytose et l'expression et la libération de l'IL-1 (voir paragraphe 3-34) présentent cette cellule comme un bon candidat pour jouer le rôle d'une cellule présentatrice d'antigène. Cette propriété particulière de l'éosinophile pourrait se révéler très intéressante dans le contexte de l'initiation de la réponse immunitaire, au niveau tissulaire, vis à vis d'éléments étrangers.

3-3 Les médiateurs (Figure 4)

L'éosinophile produit quatre types essentiels de composés. Certains participent à la fonction de l'éosinophile vis à vis d'agents étrangers (allergènes, bactéries ou parasite) mais sont aussi responsables des lésions tissulaires observées dans les syndromes hyperéosinophiliques ou les maladies asthmatiques.

3-31- Les médiateurs lipidiques

Le leucotriène C4 (LTC₄)⁽¹²⁶⁾ issu du métabolisme de l'acide arachidonique et le PAF-acether (Platelet activating factor)⁽¹²⁷⁾ sont des stimulants vasoactifs, bronchoconstricteurs et de puissants facteurs chimiotactiques. Ils interviennent dans l'initiation et l'amplification des réactions inflammatoires dans les maladies asthmatiques.

3-32- Les Enzymes

Elles sont de plusieurs types: collagénases I et II, acétyl-cholinestérase, catalase, aryl-sulfatase, histaminase, phospholipases B et D, phosphatase alcaline, cathepsine, lipooxygénase, cyclooxygénase⁽¹²⁸⁾. Ces enzymes sont localisées pour la plupart dans les lysosomes. Le cristal de Charcot-Leyden de forme hexagonale est constitué d'une lysophospholipase polymérisée⁽¹²⁹⁾.

3-33- Les protéines cationiques

Ces protéines sont situées dans les mêmes granules et sont au nombre de quatre: la MBP (ou Major Basic Protein) compose le cristalloïde du granule alors que l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) et l'EPO (Eosinophil Peroxydase) sont localisées dans la matrice⁽¹³⁰⁻¹³²⁾. Ces protéines sont maintenant bien caractérisées⁽¹³³⁻¹³⁶⁾. Les ADN complémentaires⁽¹³⁷⁻¹⁴²⁾ codant pour ces protéines ainsi que les gènes correspondants sont identifiés depuis peu⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾. L'ECP et l'EDN appartiennent à la famille des ribonucléases^(134,139,141,145) et l'EPO à la famille des peroxydases⁽¹³⁶⁾.

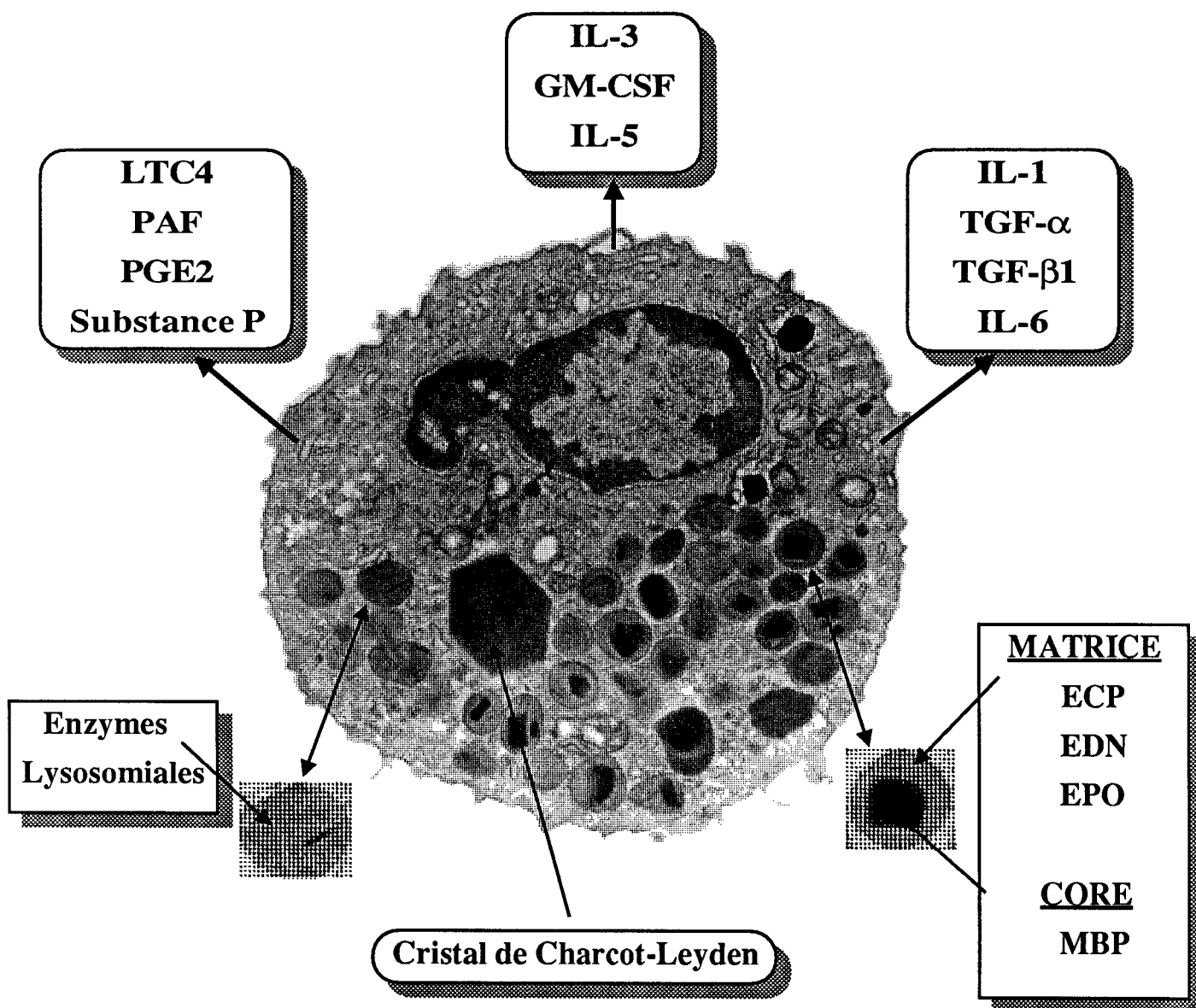


Figure 4 : Médiateurs de l'éosinophile

De par leurs propriétés basiques ou catalytiques ces protéines sont toxiques vis à vis de différentes cibles⁽¹²⁸⁾. Plusieurs auteurs ont décrit des activités helminthotoxiques⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁸⁾, bactéricides^(149,150) et anti-protozoaires⁽¹⁵¹⁾ mais aussi neurotoxiques⁽¹³⁵⁾ et anti-tumorales⁽¹⁵²⁾.

L'éosinophile possède également un métabolisme oxydatif. Il libère des anions superoxydes (O_2^-) et du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) utilisé comme substrat de l'EPO pour former des hypohalogènes (hypochlorure et hypobromure)^(153,154). Tous ces composés sont particulièrement toxiques.

3-34- Les cytokines

De par sa grande sensibilité, c'est la technique d'hybridation in situ qui a permis dans presque tous les cas d'identifier l'expression de cytokines par l'éosinophile. L'éosinophile synthétise et libère deux types de cytokines en regard de leur principales fonctions. Des cytokines possédant un large spectre d'action mais dont la relation avec l'éosinophile au niveau fonctionnel n'est pas toujours bien clarifié (IL-1⁽¹⁵⁵⁾, TGF- α ⁽¹⁵⁶⁾, TGF- β 1⁽¹⁵⁷⁾ et l'IL-6⁽¹⁵⁸⁾). Ces cytokines semblent conférer à l'éosinophile un rôle important dans la réaction inflammatoire. Le deuxième type de cytokines produites par l'éosinophile est plus directement impliqué dans la physiologie de cette cellule (IL-3⁽¹⁵⁹⁾, GM-CSF^(159,160) et IL-5⁽¹⁶¹⁾). En effet, ces dernières stimulent l'activité cytotoxique, augmentent la survie et représentent des facteurs de croissance des éosinophiles⁽¹⁶²⁻¹⁶⁷⁾. Elles agissent également sur la différenciation des cellules souches en éosinophiles. L'expression de ces cytokines est inductible et dépend de

l'état d'activation cellulaire. Leur mécanisme d'action serait paracrine ou autocrine dans le microenvironnement cellulaire.

Les stimuli responsables de l'expression des gènes de ces cytokines au niveau de l'éosinophile restent encore à identifier. La définition plus précise des régions promotrices des gènes codant notamment pour l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 ainsi que l'identification au niveau moléculaire des facteurs de transcription impliqués dans leur régulation apporteront sans doute des éléments essentiels pour la compréhension des mécanismes d'expression de ces médiateurs.

Jusqu'à présent, seules quelques régions sont reconnues comme pouvant intervenir dans cette régulation. Deux séquences nucléotidiques, appelées CK-1 ou CLE-1 et CK-2 ou CLE-2 associée à une région riche en nucléotides GC, ont été retrouvées dans les régions situées en 5' des gènes codant pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, le GM-CSF et le G-CSF en ce qui concerne le premier motif et seulement pour l'IL-3 et le GM-CSF en ce qui concerne le second. Deux protéines nucléaires appelées NF-GMa et NF-GMb se fixent respectivement aux motifs CK-1 et CK-2. Le facteur NF-GMa semble différent du NF-kappa B mais inductible par le TNF^(168,169). Le NF-kappa B est un facteur de transcription initialement décrit dans la régulation du gène des chaînes kappa des immunoglobulines mais apparaît impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux autres gènes⁽¹⁷⁰⁾. Le facteur NF-GMb semble lui plus proche du NF-kappa B au niveau biochimique mais les mécanismes d'induction sont différents⁽¹⁷¹⁾. Une troisième région régulatrice (appelée CLE-0) paraît également impliquée dans la régulation des gènes codant pour le GM-CSF, l'IL-5, l'IL-4 et le G-CSF^(172,173).

Plus particulièrement, dans le cas du GM-CSF, le facteur NF-kappa B se présente lui aussi comme un activateur transcriptionnel potentiel⁽¹⁷⁴⁾. Enfin d'autres séquences potentiellement régulatrices existent également dans le promoteur du gène de l'IL-3 et pourraient agir de façon positive ou négative⁽¹⁷⁵⁾.

On comprend aisément que les mécanismes d'activation au niveau transcriptionnel de ces gènes soient complexes et résultent d'une coopération ou d'un équilibre entre plusieurs facteurs régulateurs. Ces mécanismes semblent en partie communs à plusieurs gènes. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait les gènes codant pour l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5 et l'IL-4⁽¹⁷⁶⁾ sont organisés en "cluster" sur le chromosome 5. Les gènes codant pour le M-CSF, le récepteur pour le M-CSF et le PDGF ainsi que ceux codant pour le FGF et l'IL-9⁽¹⁷⁷⁾ sont également présents sur ce chromosome.

LE RECEPTEUR POUR L'INTERLEUKINE 2

L'IL-2 est une glycoprotéine de 15 kD qui joue un rôle pivot dans la croissance et la fonction des lymphocytes T. Elle affecte aussi l'activité des lymphocytes B, des monocytes, des cellules NK (Natural Killer) et des cellules LAK (Lymphokine-Activated Killer).

Les lymphocytes T possèdent d'importantes fonctions régulatrices d'aide et de suppression aussi bien que des fonctions effectrices par la production d'un large spectre de cytokines ou par la destruction cytotoxique cellulaire. Une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T requiert le passage des cellules d'un état au repos à un état activé, nécessitant deux niveaux de signaux des récepteurs membranaires au noyau. Le premier signal est initié par la présentation d'un antigène au lymphocyte T, enclenchant un programme d'activation conduisant à la synthèse de novo et à la sécrétion d'IL-2^(178,179). Les cellules T au repos n'expriment pas de récepteur pour l'IL-2 de forte affinité, mais celui-ci est rapidement exprimé après activation par un antigène ou un mitogène^(180,181). L'interaction de l'IL-2 avec son récepteur dirige la prolifération des cellules et le développement des fonctions régulatrices ou effectrices.

L'étude de l'expression du récepteur pour l'IL-2 et des lymphokines produites par les lymphocytes, a fourni des informations particulièrement intéressantes pour la compréhension des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de la réponse immune. De plus la compréhension du système IL-2 et récepteur pour l'IL-2 a ouvert la voie à des approches thérapeutiques nouvelles dans le cadre des lymphomes et des leucémies, des maladies autoimmunes et des rejets de greffe d'organe.

Dans le traitement par l'interleukine 2 de certains cancers (adénocarcinome, mélanome)⁽¹⁸²⁾ ou de certaines leucémies (Leucémie myéloïde aiguë)^(183,184); plusieurs études ont montré le développement d'une éosinophilie parfois très importante. Les éosinophiles circulants de ces patients apparaissent hypodenses^(185,186). Ces observations suggèrent que l'IL-2 a un effet direct ou indirect sur l'éosinopoïèse. Différents travaux relatent la présence d'IL-5 dans le sérum de ces patients^(187,188). Cette production paraît imputable aux lymphocytes; une étude précédente avait effectivement montré une production d'IL-5 par des lymphocytes stimulés par l'IL-2, de patients ayant une éosinophilie⁽¹⁸⁹⁾. Actuellement, aucun effet direct de l'IL-2 sur l'éosinopoïèse n'a été démontré. Ces observations indiquent clairement l'importance du système IL-2/IL-2R dans les syndromes hyperéosinophiliques.

Après avoir présenté la structure du récepteur pour l'IL-2, nous décrirons ses mécanismes d'expression et de régulation.

1- La structure (Tableau 1)

Il existe trois formes de récepteur membranaire pour l'IL-2 (IL-2R) qui diffèrent selon leur affinité pour le ligand⁽¹⁹⁰⁾: la première de forte affinité (constante de dissociation: $kd\ 10^{-11}M$), la seconde d'affinité intermédiaire ($kd\ 10^{-9}M$) et la dernière de faible affinité ($kd\ 10^{-8}M$).

De nombreuses études ont permis de caractériser ces différentes formes. Les premières expériences, utilisant l'IL-2 radiomarquée démontrèrent l'existence de sites saturables de forte affinité pour l'IL-2 sur les lymphocytes activés⁽¹⁸⁰⁾. Mais c'est grâce à la production d'anticorps monoclonaux anti-récepteur (le premier

Caractéristiques	IL-2R Alpha	IL-2R Bêta
Affinité	10 -8 M	10 -9 M
Masse Moléculaire (kD)	55	75
Modifications Post-Traductionnelles	Glycosylation Sulfatation	Glycosylation
Nombre Acides Aminés:		
Total	251	551
Peptide signal	21	26
Extracytoplasmique	219	214
Transmembranaire	19	25
Cytoplasmique	13	286
ARN (Kilobases)	3,5 et 1,5	4
Exons	8	10
Chromosome	10	22
Formes solubles	35 kD - 50 kD	50 kD - 55 kD
Expression	Inductible Lymphocytes T Lymphocytes B Cellules NK Monocytes Macrophages Oligodendrocytes Basophiles Cellules Hématopoïétiques	Constitutive Lymphocytes T Lymphocytes B Cellules NK Monocytes Macrophages Oligodendrocytes .?. .?.

Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques, moléculaires et cellulaires du Récepteur pour l'Interleukine 2

fut appelé anti-TAC (T-cell Activation))⁽¹⁹¹⁾ capable de bloquer la prolifération cellulaire induite par l'IL-2 que les recherches ont considérablement avancé dans l'analyse de la structure, de la fonction et de l'expression de l'IL-2R. La protéine reconnue par l'anticorps anti-TAC est une structure fortement glycosylée et sulfatée d'une masse moléculaire de 55 kD qui fixe l'IL-2 avec une faible affinité ($kd\ 10^{-8}M$) mais participe également à la formation du récepteur de forte affinité⁽¹⁹²⁾. Cette protéine est maintenant appelée CD25, p55 ou chaîne alpha du l'IL-2R (IL-2R α). Trois groupes ont cloné et séquencé l'ADN complémentaire correspondant⁽¹⁹³⁻¹⁹⁵⁾. La transcription du seul gène, composé de 8 exons et situé sur le chromosome 10⁽¹⁹⁶⁾, donne deux ARN messagers (3,5 et 1,5 kilobases) codant tous les deux pour une protéine de 250 acides aminés dont seulement 13 constituent le domaine intracellulaire. Ce très court domaine paraissait incapable de transmettre un signal d'activation cellulaire et l'on a très vite suggéré l'existence d'une autre protéine, capable de fixer l'IL-2. Cette hypothèse fut renforcée par la difficulté d'interprétation de certaines expériences, si l'on considérait que l'IL-2R était constitué que d'une seule chaîne. Enfin, certaines lignées cellulaires n'exprimant pas la p55 étaient cependant capables de répondre à l'IL-2.

Des expériences de "cross-linking" en utilisant l'IL-2 radiomarquée ont fortement contribué à la mise en évidence d'une deuxième protéine d'une masse moléculaire de 75 kD qui fut appelée, chaîne bêta (IL-2R β) ou p75. Cette protéine est capable de fixer l'IL-2 avec une affinité intermédiaire ($kd\ 10^{-9}M$). L'association de l'IL-2R α et de l'IL-2R β conduit à la formation du récepteur de forte affinité ($kd\ 10^{-11}M$)⁽¹⁹⁷⁻²⁰¹⁾. L'ADN complémentaire de la p75 est cloné et

séquencé⁽²⁰²⁾. Un seul gène^(203,204), composé de 10 exons et situé sur le chromosome 22, est transcrit en un ARN messager de 4 kilobases qui code pour une protéine de 525 acides aminés. C'est en comparant les structures des protéines des récepteurs pour l'érythropoïétine et pour l'IL-2 (p75) que fut pour la première fois défini le concept de la superfamille des récepteurs hématopoïétiques⁽¹⁰⁵⁾. Le domaine intracellulaire de la p75 est composé de 286 acides aminés riche en résidus sérine, proline et acide glutamique. Cette région ne contient pas de séquences consensus d'activité tyrosine kinase. Il est cependant clair que la cascade d'événements cellulaires induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur de forte affinité est médiée par la chaîne bêta⁽²⁰⁵⁾.

2- Les protéines associées

L'existence de protéines associées à l'IL-2R nécessaire à la fonctionnalité correcte du récepteur a été suggérée par des expériences de transfection de la chaîne bêta dans des cellules non lymphoïdes, en particulier dans des cellules d'une lignée fibroblastique^(202,206). Dans ces expériences la chaîne bêta est exprimée à la membrane mais elle n'a plus la capacité de fixer l'IL-2. De plus, l'IL-2R β purifiée lie l'IL-2 avec une efficacité plus faible que la forme membranaire⁽²⁰⁶⁾. Plusieurs travaux ont effectivement montré l'existence de protéines associées soit à la chaîne bêta, soit à la chaîne alpha mais ne fixant pas l'IL-2. Ces protéines semblent jouer un rôle dans trois domaines: (i) dans le changement de conformation de la chaîne bêta, altérant ainsi sa capacité de fixation de l'IL-2⁽²⁰⁷⁻²¹⁰⁾; (ii) dans les mécanismes d'endocytose du récepteur⁽²¹¹⁾; (iii) dans la transduction du signal d'activation^(212,213). De plus, une association

entre la chaîne alpha et une molécule HLA de classe I⁽²¹⁴⁾ d'une part, et la molécule ICAM-I^(215,216) d'autre part, a également été démontrée. La signification de telles associations n'est pas pour le moment expliquée.

Ces observations faites chez l'homme ou dans le modèle murin, font apparaître le récepteur pour l'IL-2 comme étant un complexe multi-chaînes, associées par des interactions très étroites, ayant chacune une fonction particulière dans la régulation de l'expression d'un récepteur fonctionnel.

3- Les mécanismes de transduction (Figure 5)

La transmission du signal d'activation de la membrane cellulaire au noyau n'est pas médiée par la protéine kinase C (PKC), par la mobilisation du calcium intracytoplasmique, ou par le phosphatidylinositol^(217,218). La stimulation par l'IL-2 ferait appel à un nouveau système de second messenger, le glycosyl-phosphatidylinositol. Sous l'action d'une phospholipase C spécifique, cette molécule est hydrolysée en diacylglycerol myristylé qui reste membranaire et en phosphoinositol glycanique libéré dans le cytosol. La fonction de ces deux composés dans le système IL-2/IL-2R n'est pas encore établie mais l'on sait que l'IL-2 induit la formation de ces molécules, sans doute par l'activation de la phospholipase, mécanisme qui est par contre, inhibé par l'IL-4⁽²¹⁹⁾.

La chaîne bêta ne possède pas de séquence consensus du site de fixation de l'ATP⁽²⁰²⁾, mais une région de 46 acides aminés, riche en résidus sérine dans le domaine cytoplasmique essentielle pour la transduction du signal. L'interaction de l'IL-2 avec la chaîne bêta induit la phosphorylation des résidus tyrosines de plusieurs protéines cellulaires^(220,221) y compris la chaîne bêta elle-même^(222,223).

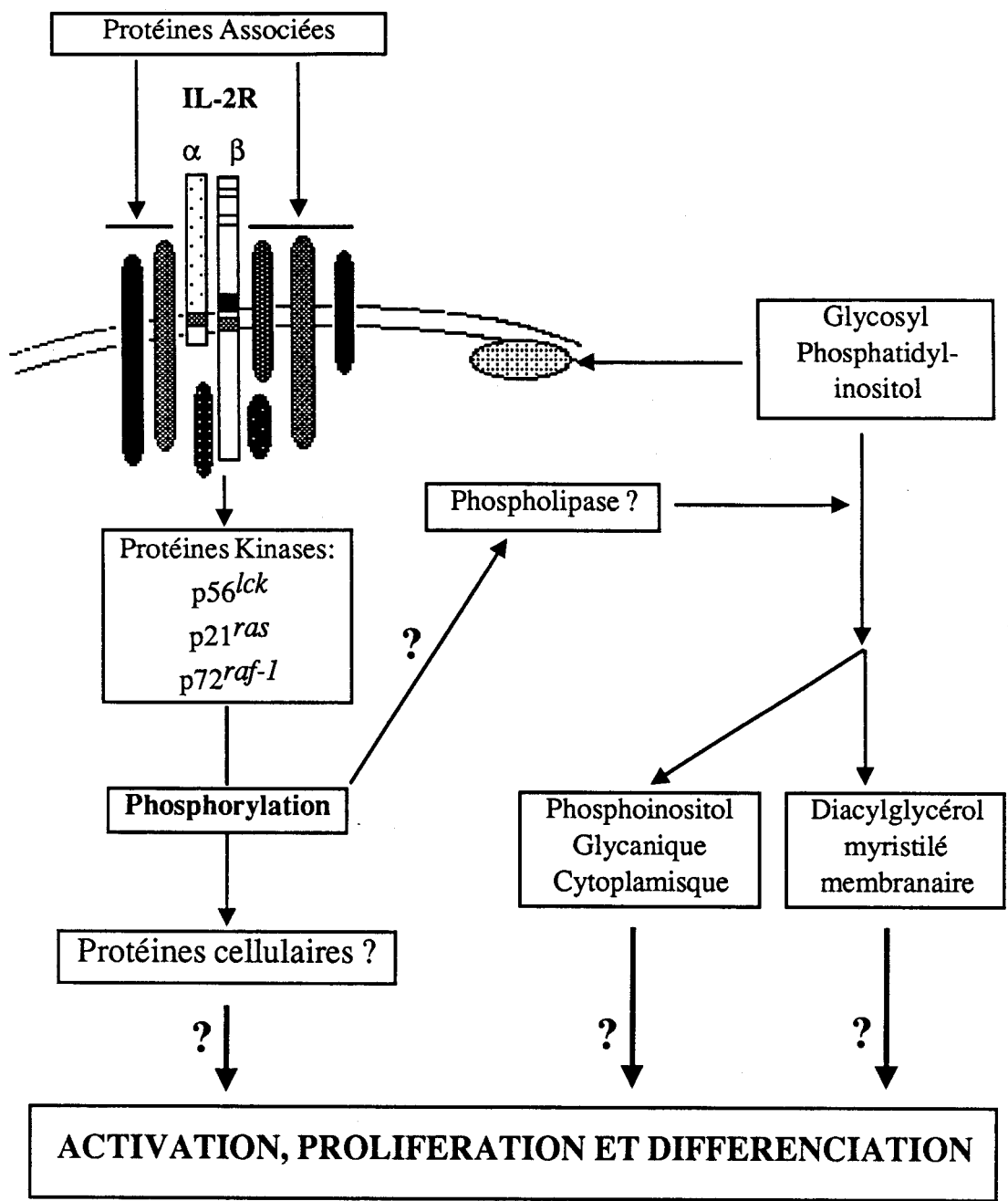


Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de transduction induits par l'IL-2

Une série de protéines de 56 à 63 kD a été proposée comme tyrosine kinases potentielles, associées au domaine cytoplasmique de la chaîne bêta⁽²¹³⁾. Récemment, il a été montré que la chaîne bêta est associée à la protéine p56^{lck}⁽²²⁴⁾. Cette protéine, déjà impliquée dans les mécanismes de signalisation cellulaire associés aux molécules CD4 et CD8, est un membre d'une famille de protéines membranaires à activité tyrosine kinase. D'autres protéines semblent également intervenir dans ces mécanismes de transduction, telle qu'une protéine de 21 kD fixant le GTP, produit du gène *ras* qui serait également liée aux récepteurs pour l'IL-3 et le GM-CSF⁽²²⁵⁾ et une serine/thréonine kinase de 72-74 kD, produit du proto-oncogène *c-Raf-1*⁽²²⁶⁾.

4- La régulation de l'expression de l'IL-2R (Figure 6)

La régulation de l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL-2 est conditionnée en grande partie par l'induction membranaire de la chaîne alpha, la seconde chaîne étant le plus souvent synthétisée de façon constitutive. Cependant, si la stimulation antigénique ou mitogénique augmente considérablement l'expression de la p55, la chaîne bêta est également induite⁽²²⁷⁾. L'activation de la protéine kinase C semble être la voie d'induction de la chaîne alpha, alors que l'augmentation du calcium intracytoplasmique semble être l'élément stimulant l'expression de la p75⁽²²⁸⁾.

En dehors des mitogènes, plusieurs cytokines sont responsables de l'induction de la chaîne alpha, en particulier l'IL-1⁽²²⁹⁻²³¹⁾, le TNF α ^(229,232,233) mais également l'IL-2^(234,235). Les mécanismes impliqués dans cette induction sont nombreux et font appel à l'activation de systèmes de facteur de transcription dont

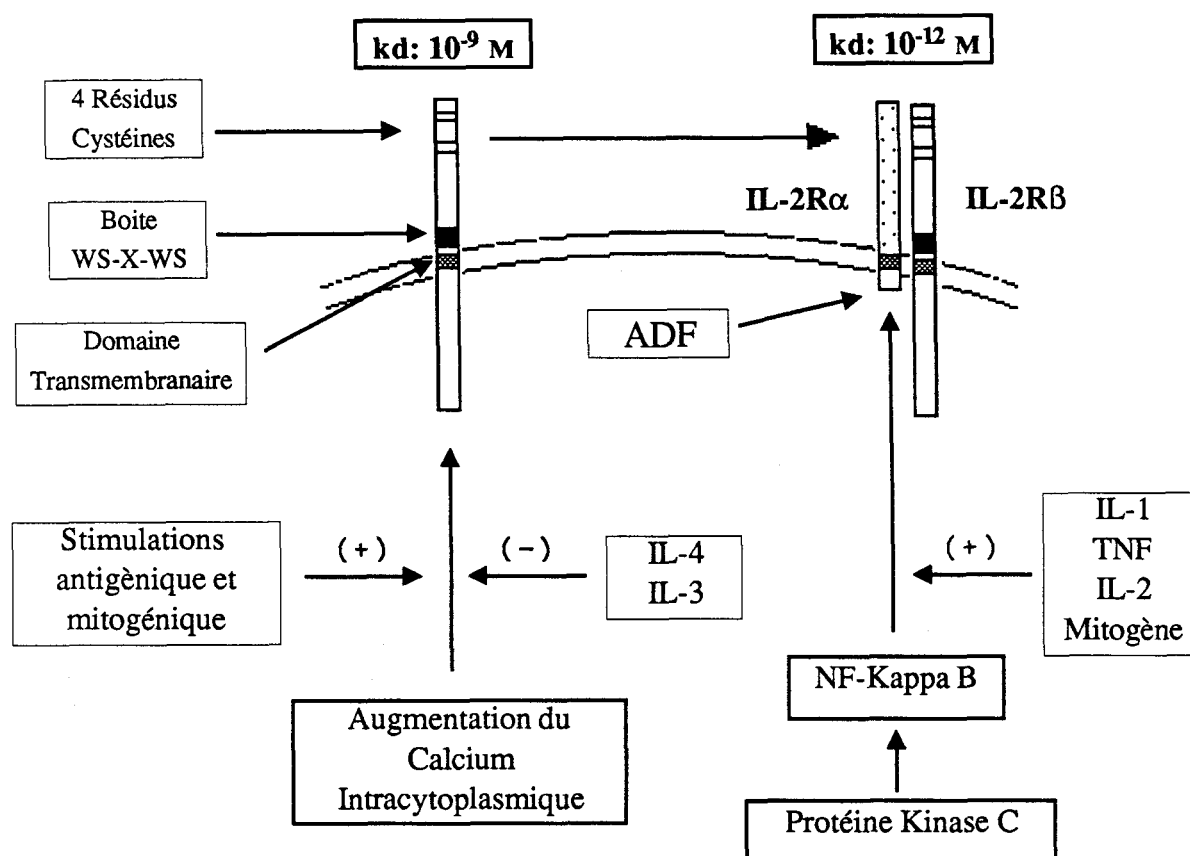


Figure 6 : Représentation schématique des mécanismes d'expression des chaînes alpha et bêta de l'IL-2R

le NF-kappa B^(232,236). A l'opposé, une étude réalisée sur des lymphocytes T montre que l'IL-4 diminue l'expression de la p75 et la prolifération induite par l'IL-2^(237,238). Ce même type d'inhibition a été observé récemment avec l'IL-3⁽²³⁹⁾.

L'infection cellulaire par le rétrovirus HTLV-I (Human T-Cell Leukemia Virus) entraîne également une forte expression de la chaîne alpha comparable à la stimulation par un mitogène comme la PHA⁽²⁴⁰⁾. L'expression de la protéine virale tax est nécessaire à cette induction, mais son action est indirecte. En effet, c'est l'augmentation de l'expression d'une protéine cellulaire appelée ADF (Adult T-cell leukemia Derived Factor) qui est responsable de l'induction de l'expression de la chaîne alpha⁽²⁴¹⁾. Le surnageant de cellules transfectées avec l'ADN complémentaire de l'ADF augmente l'expression membranaire de la p55 sur une lignée cellulaire. Cette protéine cellulaire est homologue à une enzyme appelée thioredoxine⁽²⁴²⁾ qui catalyse la réduction de protéines et de ribonucléotides.

5- La distribution cellulaire

Les lymphocytes T au repos expriment environ 4000 sites d'IL-2R β . La chaîne alpha n'est présente que sur seulement 5% des lymphocytes au repos à raison de 200 sites par cellule. La stimulation par la PHA entraîne l'expression d'à peu près $30 \cdot 10^3$ à $60 \cdot 10^3$ sites d'IL-2R α mais seulement 3500 à 5000 sites de forte affinité. Dans le cas des cellules infectées par HTLV-I, le nombre d'IL-2R α peut atteindre $270 \cdot 10^3$ à 10^6 mais seulement 1% donne un site de forte affinité.

Les lymphocytes B expriment les chaînes fonctionnelles de l'IL-2R^(243,244), à raison de 2000 sites de forte affinité et 10 fois plus de sites de faible affinité sur des cellules activées. L'IL-2 stimule la croissance des lymphocytes B et augmente

la synthèse d'immunoglobulines. L'IL-2R est retrouvée dans d'autres types cellulaires lymphoïdes comme les cellules NK et les cellules LAK⁽²⁴⁵⁾.

Les macrophages⁽²⁴⁶⁾ et les monocytes^(247,248) expriment également un récepteur fonctionnel pour l'IL-2. La p75 est exprimée de façon constitutive par 90% des monocytes alors que la p55 est inductible. L'interféron gamma^(249,250) et l'IL-2⁽²⁴⁸⁾ augmente l'expression de cette chaîne et la cytotoxicité des monocytes.

L'IL-2 agit sur la croissance et/ou sur la maturation de cellules non lymphoïdes comme des cellules de lignées d'oligodendrocytes^(251,252) ou les cellules de Langerhans⁽²⁵³⁾. Par contre on ne connaît pas encore le rôle de l'expression de la chaîne alpha sur des cellules comme les basophiles^(254,255), ou des précurseurs hématopoïétiques stimulées par la PHA⁽²⁵⁶⁾.

6- Les formes solubles de l'IL-2R

La chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2 a été retrouvée sous forme d'une protéine glycosylée soluble de 35 à 50 kD, dans des surnageants de cellules T stimulées et de lignées cellulaires^(257,258). Ces formes semblent produites par clivage protéolytique des protéines membranaires plus que par la synthèse et la libération de molécules tronquées⁽²⁵⁹⁾. Il n'y a en effet, aucune évidence de l'existence d'un épissage alternatif particulier de l'ARN messager de la chaîne alpha codant pour une forme soluble.

La chaîne alpha est retrouvée sous forme soluble (sIL-2R α) dans le sérum de patients atteints de nombreuses pathologies à des taux plus ou moins élevés. Dans les cas d'infection par HTLV-I^(260,261) ou dans les leucémies à

tricleucocytes⁽²⁶²⁾, ces taux sont remarquablement élevés. Des taux notables de sIL-2R α sont également détectés dans l'infection par le virus HIV, dans les hémopathies malignes (lymphomes), dans les cas de tumeurs solides, de métastases, de maladies autoimmunes ou encore dans les rejets de greffe d'organes⁽²⁶³⁾. Cette augmentation du taux de sIL-2R α constitue une approche fiable et sensible de l'activation cellulaire.

De la même manière, une forme soluble de la chaîne bêta (sIL-2R β) de 50-55 kD a été détectée dans des surnageants cellulaires^(206,264). A l'heure actuelle, aucune étude n'a relaté la présence de cette protéine soluble *in vivo*.

La génération de ces deux formes solubles entre vraisemblablement dans un mécanisme de désensibilisation des cellules activées mais aussi dans un processus plus large d'immunorégulation, puisqu'elles conservent, toutes les deux, la capacité de fixer l'IL-2. Ce type de système est également suggéré pour d'autres récepteurs de cytokines⁽²⁶⁵⁾.

LE RETROVIRUS HTLV-I

Les progrès réalisés dans la culture cellulaire et surtout la découverte de l'IL-2⁽¹⁷⁸⁾ ont rendu possible la culture de lymphocytes à long terme, préparant la voie de la découverte en 1980, du premier rétrovirus humain, le HTLV-I ou Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus de type I, à partir de cellules de patients atteint d'un lymphome cutané^(266,267). HTLV-I fut très vite identifié comme l'agent causal de l'ATL ou Adult T-cell Leukemia/Lymphoma, un cancer progressif très rapide des lymphocytes T CD4+, décrit pour la première fois dans le sud-est du Japon. En 1982, un second rétrovirus, HTLV-II, fut isolé à partir des cellules d'un patient atteint d'une leucémie à tricoleucocytes d'origine T⁽²⁶⁸⁾. Ce virus possède une structure génomique et des propriétés biologiques similaires à celles d'HTLV-I, mais n'a pas été pour le moment associé à un type de pathologie donnée.

1- Epidémiologie, transmission et pathologie

HTLV-I est reconnu comme l'agent étiologique de l'ATL⁽²⁶⁹⁾. C'est un lymphome souvent agressif et fatal affectant les cellules T matures, CD4+. Il se développe dans des régions géographiques où l'infection par HTLV-I est endémique; incluant le Sud-Est du Japon, le Sud-Sahara Africain, la région des Caraïbes et le Sud-Est des Etats Unis. L'incidence de l'ATL dans ces régions est d'environ 1 à 15%. De nombreux cas sont également décrits en Amérique Centrale et en Amérique Latine. En Europe, l'incidence de cette infection est beaucoup plus faible (0,01% à 0,035%).

Cliniquement l'ATL est caractérisée par une leucémie, une lymphoadénopathie, des infiltrats de cellules tumorales au niveau de la peau, une

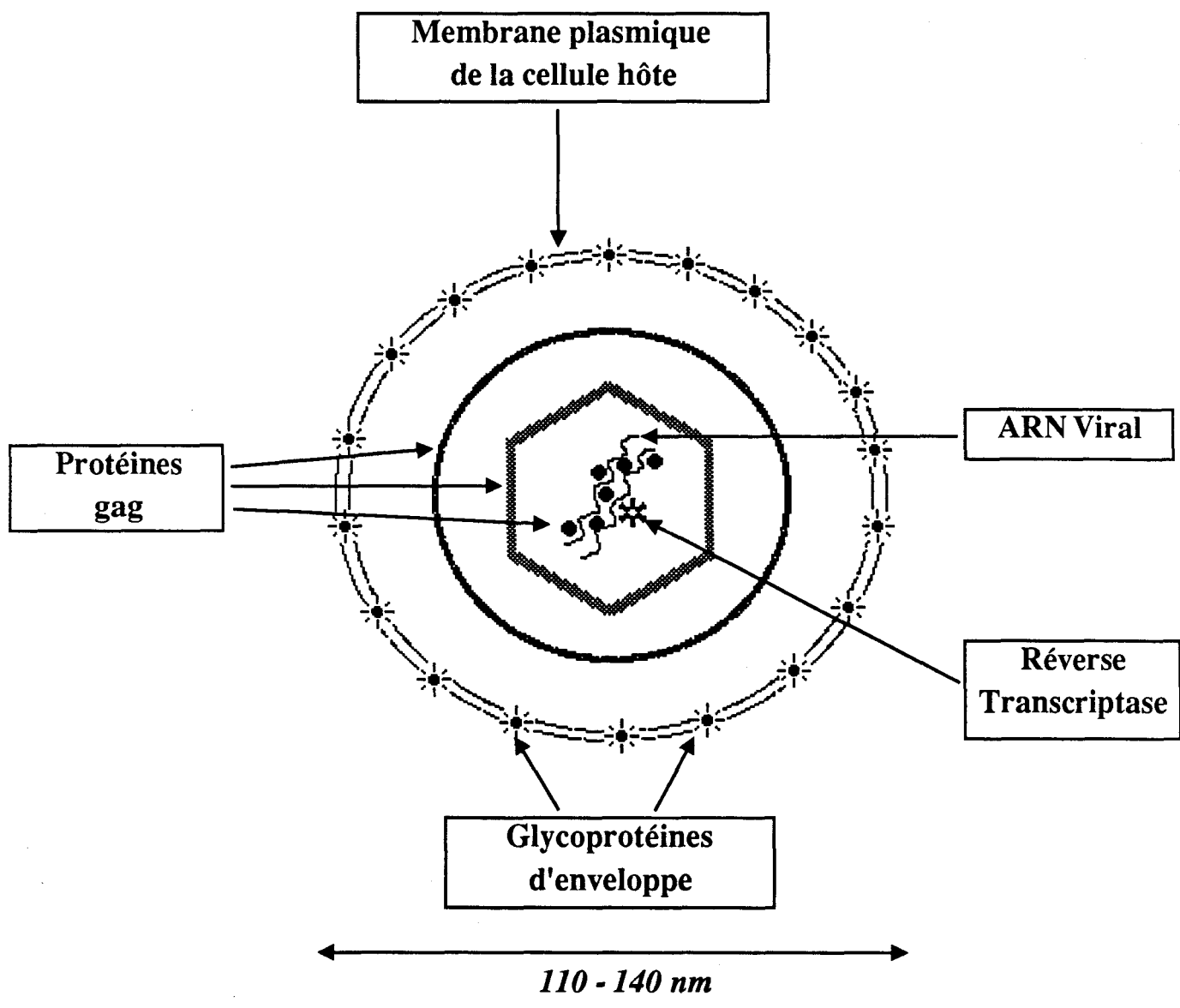


Figure 7 : Representation schématique du virus HTLV-I

hépatosplénomégalie, une hypercalcémie et des lésions lytiques osseuses⁽²⁷⁰⁻²⁷³⁾. La transmission virale a lieu par contacts sexuels et par contamination sanguine. La transmission de la mère à l'enfant a également été observée mais une transmission via le lait maternel, est suspectée⁽²⁷⁴⁾. La période de latence entre l'infection par HTLV-I et l'apparition des symptômes cliniques est typiquement longue, souvent entre 10 et 30 ans. Le risque pour un individu infecté de contracter la maladie est faible (< 5%), cependant, le pronostique des patients développant une forme aiguë d'ATL est très mauvais, la survie est inférieure à six mois.

De plus, HTLV-I a été associé à un syndrome chronique neurodégénératif dénommé HAM (HTLV-I Associated Myelopathy) ou PST (Paraparésie Spastique Tropicale)^(275,276). Cette pathologie est caractérisée par une démyélinisation progressive des tractus neuronaux moteurs de la moelle épinière, conduisant à une paraparésie et une diminution de la force musculaire. Les bases moléculaires de cette association sont encore inconnues.

L'implication d'HTLV-I dans d'autres pathologies, notamment dans la sclérose en plaque reste controversée⁽²⁷⁷⁾.

2- Organisation génomique

HTLV-I est un virus exogène de type C de la sous-famille des Oncovirinae, d'un diamètre de 110 à 140 nm. Deux copies d'ARN d'une longueur de 9032 nucléotides, sont enfermées dans la nucléocapside (Figure 7). Comme tous les rétrovirus compétents, HTLV-I possèdent les trois gènes gag, pol et env entourés par deux séquences LTR (Long Terminal Repeat) identiques aux extrémités 5' et 3' du génome. Cependant, il existe une région supplémentaire située entre le gène

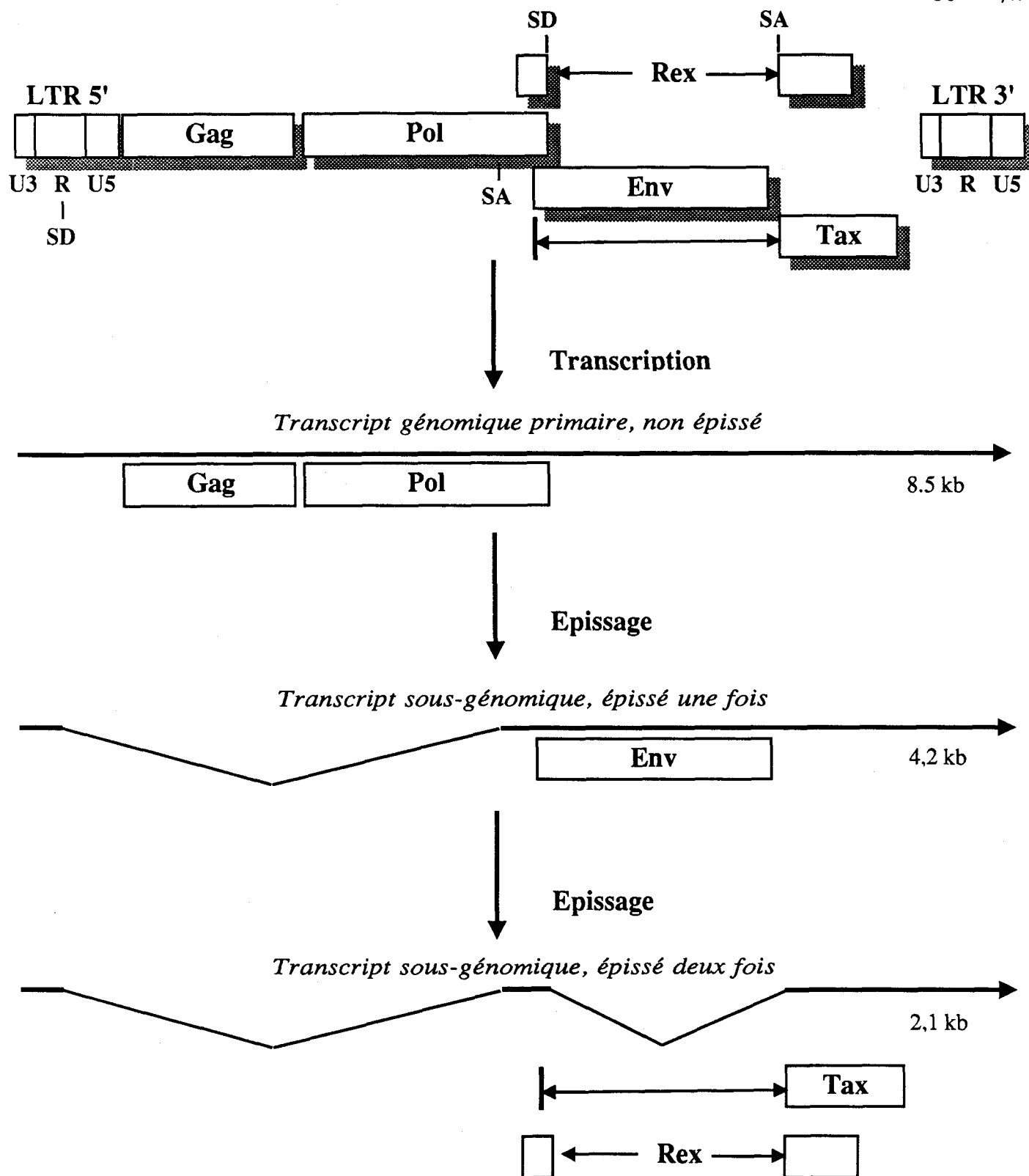


Figure 8 : Organisation génomique du virus HTLV-I
Transcription et Epissage alternatif

env et le LTR 3' dénommée initialement pX. Cette région code pour deux protéines régulatrices appelées tax et rex⁽²⁷⁸⁾.

Les gènes d'HTLV-I subissent un épissage particulier du fait de l'utilisation de cadres ouverts de lecture chevauchant. Le transcript primaire de 8,5 kilobases codant pour les protéines gag et pol est épissé pour donner un deuxième transcript de 4,2 kilobases, codant pour les protéines d'enveloppe. Ce dernier est à nouveau épissé en un ARN messager de 2,1 kilobases qui est traduit en une protéine tax ou rex (Figure 8).

Le produit du gène gag est un précurseur de 53 kD qui subit des modifications post-traductionnelles pour donner les protéines structurales p19, p24 et p15. L'ADN polymérase dépendante d'ARN ou reverse transcriptase, dépendante du magnésium est codée par le gène pol sous forme d'une protéine de 95 kD. Le gène env code pour une protéine de 45 kD, transformée en gp61 après glycosylation puis en protéines d'enveloppe sous la forme d'une gp46 externe et d'une p15-20 responsable de l'ancrage membranaire. La glycosylation est une étape importante pour la fonctionnalité de la protéine. Les gènes tax et rex codent respectivement pour une p40 et p27. Ces protéines sont essentielles à la réplication virale⁽²⁷⁹⁾ et sont analogues aux protéines tat et rev du rétrovirus HIV, responsable du syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA (Figure 9).

3- La transformation cellulaire induite par HTLV-I

HTLV-I induit la transformation leucémique des cellules T par un nouveau mécanisme. Le génome d'HTLV-I ne code pas pour un oncogène⁽²⁷⁸⁾ et ne transforme pas les cellules par un mécanisme d'activation cis, c'est à dire

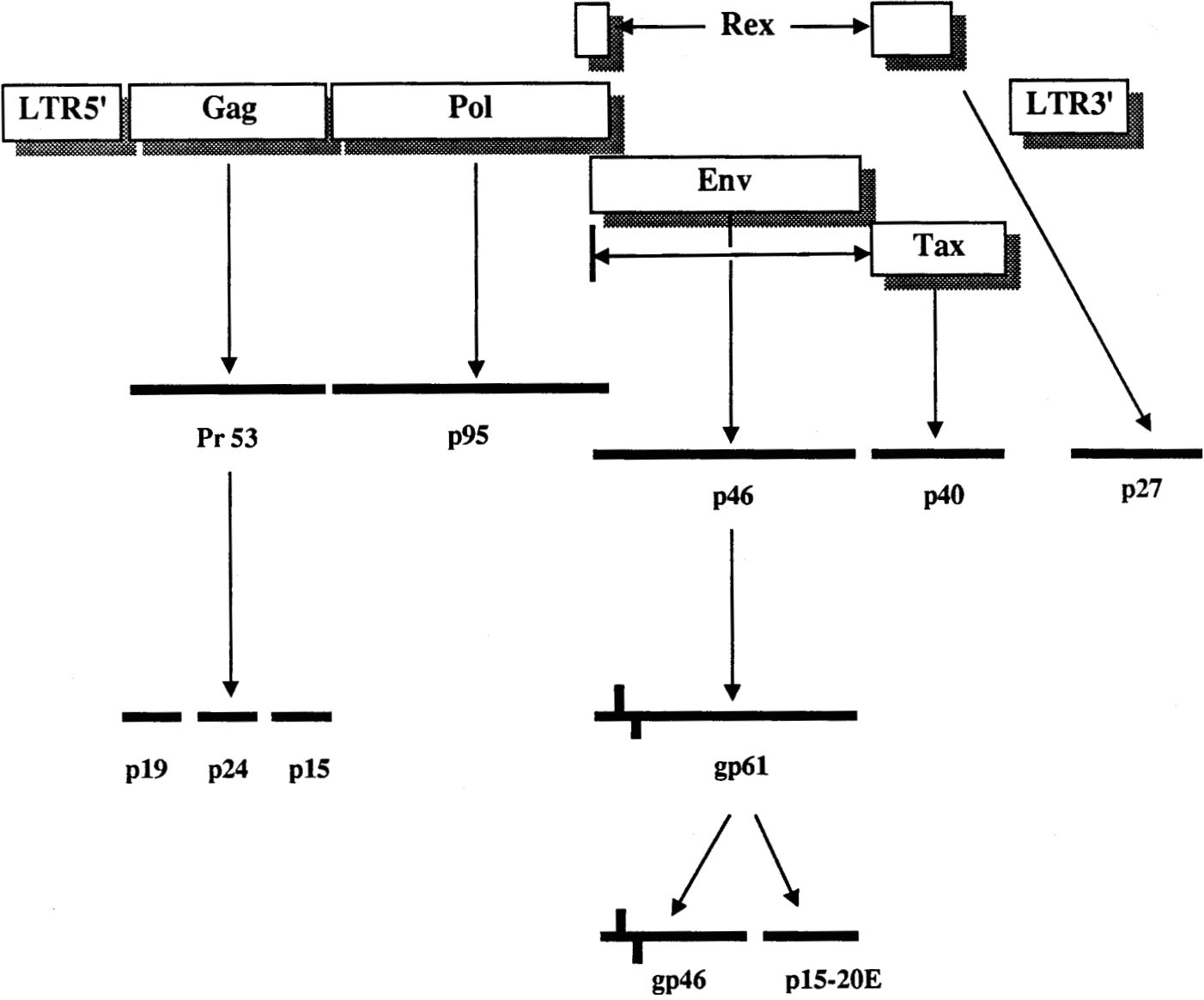


Figure 9 : Organisation génomique du virus HTLV-I
Expression des protéines virales

l'activation de gènes cellulaires adjacents comme un proto-oncogène par exemple. L'intégration du provirus dans le génome humain se produit effectivement de façon aléatoire⁽²⁸⁰⁾. Une des propriétés constante des lignées cellulaires établies à partir des cellules de patient atteint d'ATL ou des cellules tumorales infectées in vitro est l'expression constitutive d'un grand nombre de chaînes alpha du récepteur pour l'IL-2^(240,281). Cette expression contribue à la prolifération polyclonale qui caractérise l'étape précoce de l'infection par HTLV-I. Cependant, les premières cellules tumorales des patients atteints d'ATL sont typiquement monoclonale, ce qui suggère l'existence d'événements cellulaires supplémentaires pour compléter le processus de tumorigénèse. La nature exacte de ces mécanismes n'est pas encore bien connue.

La protéine tax: médiateur potentiel de la transformation des lymphocytes T

La phosphoprotéine tax est le trans-activateur potentiel de la réplication virale⁽²⁸²⁾ et de certains gènes cellulaires⁽²⁸³⁾. Tax réprime l'expression de la bêta-polymérase, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN⁽²⁸⁴⁾. Ce qui pourrait expliquer les cassures chromosomiques et d'autres anomalies caryotypiques observées dans les cellules infectées. Par contre, tax active l'expression, au niveau transcriptionnel des gènes de l'IL-2⁽²⁸⁵⁾, de l'IL-2R α ⁽²⁸⁶⁾, du proto-oncogène *c-fos*⁽²⁸⁷⁾, du GM-CSF⁽²⁸⁸⁾ ainsi que celui de la vimentine⁽²⁸⁹⁾, protéine importante du cytosquelette reliant le noyau à la membrane plasmique.

Plusieurs travaux ont rapporté l'expression d'autres cytokines dans l'infection par HTLV-I, mais cette expression ne semble pas toujours être

constante. C'est le cas notamment de l'IL-1(α/β); du TNF(α/β); de l'IL-4; de l'IL-5; de l'IL-6; de l'IL-9; de l'IFN γ et du TGF β 1)^(177,290-294). L'expression de l'ADF (Adult T-cell leukemia Derived Factor) ou thioredoxine^(241,295) est par contre induite dans tous les cas, mais les mécanismes moléculaires de cette induction ne sont pas encore caractérisés.

L'importance de certaines de ces protéines trans-activées dans l'activation et la croissance des cellules T normales suggère que ces systèmes jouent un rôle crucial dans l'initiation de la transformation. Plusieurs expériences suggèrent fortement que la protéine tax soit capable seule, d'initier le processus de transformation. La transfection du gène codant pour cette protéine dans des lymphocytes normaux induit une croissance à long terme de ces cellules⁽²⁹⁶⁾. De plus, les souris transgéniques tax développent des neurofibromes et les gènes codant pour l'IL-2R α et le GM-CSF sont trans-activés dans les cellules tumorales⁽²⁹⁷⁾. Cependant, ni tax, ni les autres produits viraux ne semblent nécessaires au maintien du phénotype transformé. Le programme de transformation induit par tax entraînerait l'altération de fonctions cellulaires essentielles de façon irréversible. Récemment, une nouvelle glycoprotéine cellulaire de 34 kD (gp34) a été identifiée spécifiquement sur la membrane plasmique des cellules infectées par HTLV-I⁽²⁹⁸⁾. On ne connaît pas encore la fonction de cette gp34 mais elle pourrait être impliquée dans le processus de transformation. Elle n'est en effet, détectable que sur des cellules de tissus foetaux.

Les mécanismes d'action de tax sont encore peu connus. Tax ne semble pas se lier directement aux séquences régulatrices des promoteurs des gènes

cellulaires, mais activerait plutôt les facteurs nucléaires de régulation comme le NF-kappa B ou des facteurs de transcription de la famille ATF (Activating transcription factor) et CREB (cAMP Response Element Binding protein)⁽²⁹⁹⁾.

La protéine rex: Régulatrice de l'expression des protéines virales.

Le produit du gène rex est une phosphoprotéine nucléaire de 27 kD. Elle dirige l'expression des gènes structuraux et de la polymérase d'HTLV-I, en régulant le transport des ARN messagers codant pour gag/pol et env du noyau au cytoplasme où ils sont traduits. Cette régulation s'effectue par une association directe de la protéine à l'ARN messager. La protéine rex imprime en effet une structure secondaire particulière au complexe ARN-protéine qui permet son transport du noyau au cytoplasme. Mais cette structure, rend impossible la transcription des gènes tax et rex, ce qui implique que rex régule négativement, en même temps que sa propre synthèse, celle de tax⁽³⁰⁰⁾.

Une autre fonction de rex serait la stabilisation de l'ARN messager codant pour la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine 2⁽³⁰¹⁾.

4- Immunodéficience associée à HTLV-I

L'augmentation de la fréquence des infections opportunistes chez les sujets atteints d'ATL a suggéré l'existence d'une immunosuppression consécutive à l'infection par HTLV-I^(271,272).

Les propriétés biologiques d'HTLV-I sont très similaires à celles de certains rétrovirus animaux ayant un tropisme T, en particulier le FeLV (Feline Leukemia Virus). L'infection par le FeLV entraîne une profonde immunosuppression chez

le chat. Les protéines transmembranaires du FeLV, du MoLV (Murine Moloney Leukemia Virus), du HTLV-I et du HTLV-II contiennent toutes une séquence peptidique conservée qui est immunosuppressive in vitro. Un peptide synthétique de 17 acides aminés homologue à cette séquence inhibe la prolifération d'une lignée de cellules T dépendante d'IL-2, mais aussi la prolifération des lymphocytes humains et murins stimulés par un antigène⁽³⁰²⁾. D'autres travaux ont montré qu'une séquence similaire était présente dans le HIV, mais également dans l'IL-2. Cette séquence pourrait correspondre au site d'interaction de l'IL-2 à son récepteur⁽³⁰³⁾.

Un autre mécanisme responsable en partie de cette immunosuppression serait liée à la présence de taux remarquablement élevés d'IL-2R soluble, ceux-ci entrant en compétition avec les récepteurs membranaires pour la fixation d'IL-2.

RESULTATS

I- ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE DANS L'HES

1-1 Distribution des éosinophiles en fonction des hyperéosinophilies

Grâce à un large recrutement de patients présentant une hyperéosinophilie d'étiologies diverses, nous avons pu étudier la répartition du nombre d'éosinophiles hypodenses en fonction de la pathologie (Figure 10). Les HES ont été divisés en trois groupes. Les groupe A, B et C représentent respectivement les HES sans complications particulières (HES A), les HES avec lésions viscérales (HES B) et les HES malins (HES C). Les hyperéosinophilies se déclarant après l'apparition d'un lymphome T ont été individualisées. On note que le nombre absolu d'éosinophiles recueillis dans les fractions de faible densité (éosinophiles hypodenses) est significativement plus élevé dans le cas des HES avec lésions viscérales, des HES malins et des hyperéosinophilies associées à un lymphome T par rapport à celui rencontré chez les patients ayant un HES sans complications ($P < 0,02$) ou chez les patients allergiques ou parasités ($P < 0,01$).

1-2 Taux de récepteur soluble pour l'IL-2 en fonction de la pathologie

Nous avons recherché l'existence d'une relation entre ces taux d'éosinophiles hypodenses et une activation des lymphocytes T. L'activation lymphocytaire T se traduisant par une expression et une libération de la chaîne alpha (p55) du récepteur pour l'interleukine 2 ⁽²⁶³⁾, nous avons dosé par un test ELISA, cette protéine dans le sérum des patients présentant différentes formes d'HES. Les résultats illustrés dans la Figure 11 montrent que les taux d'IL-2 récepteur soluble (IL-2Rs) les plus élevés sont rencontrés dans les hyperéosinophilies associées à un

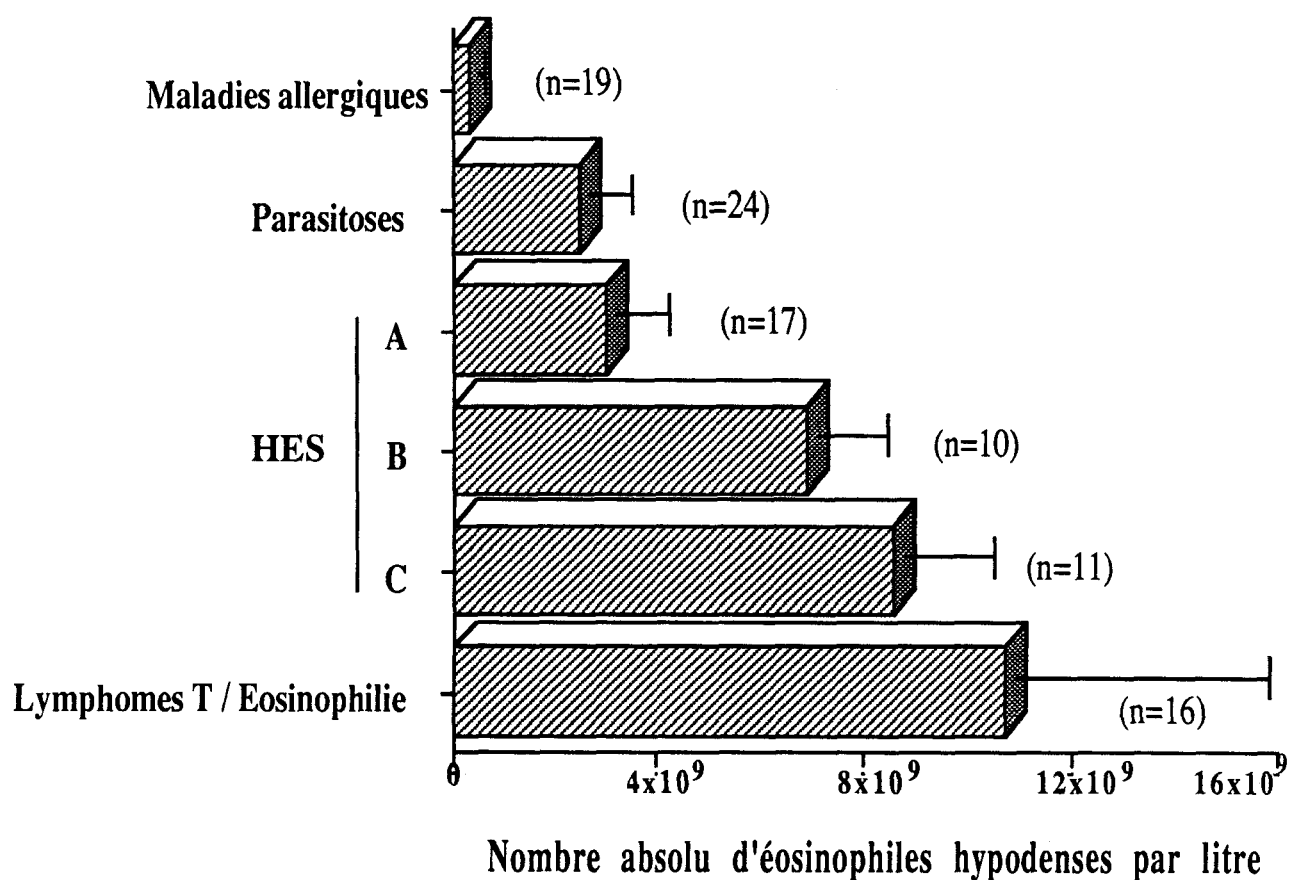


Figure 10: Nombre absolu d'éosinophiles sanguins hypodenses dans les différentes formes d'HES et dans les autres pathologies avec éosinophilie. HES-A: sans complications, HES-B: avec lésions viscérales, HES-C: HES malins.

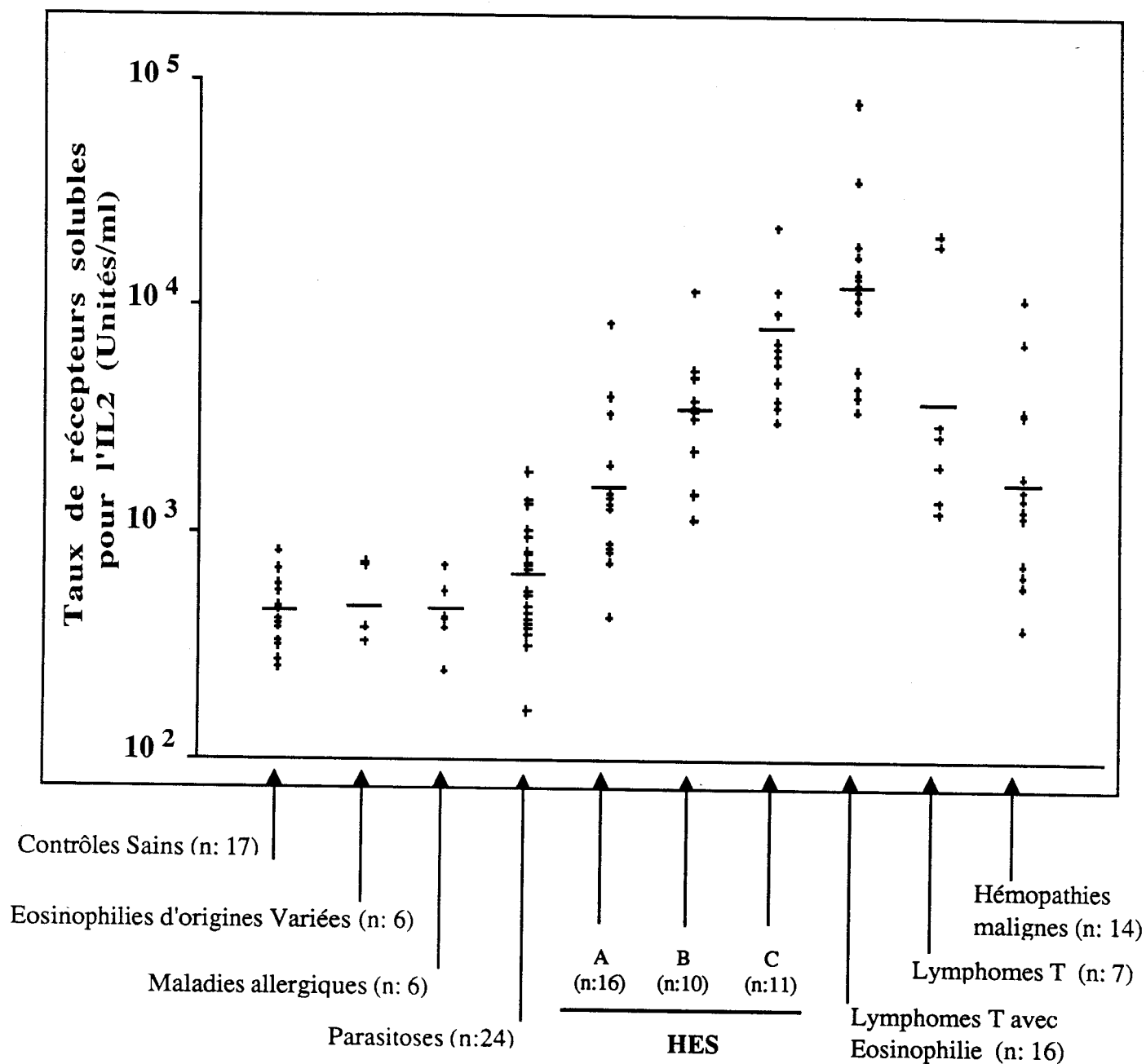


Figure 11: Taux de récepteur soluble pour l'interleukine 2 dans le sérum des patients ayant différentes formes d'HES et dans le sérum des patients ayant une pathologie avec éosinophilie ou une hémopathie maligne. Les barres horizontales représentent la moyenne géométrique. HES-A: sans complications, HES-B: avec lésions viscérales, HES-C: HES malins.

lymphome T (moyenne géométrique: 12111 U/ml). Ces taux sont significativement plus élevés ($p < 0,1$) que ceux observés dans les HES ou chez les patients ayant une hémopathie maligne (1652 ± 791 U/ml) ou un lymphome T (3785 U/ml) sans éosinophilie. Chez les patients ayant différentes formes d'HES, le taux d'IL-2Rs (2645 U/ml, $n=38$) est plus élevé que celui observé chez les contrôles ou chez les patients ayant une éosinophilie d'origine variée. Les taux d'IL-2Rs chez les patients parasités (663,4 U/ml) ou les sujets allergiques (374,8 U/ml) ne sont pas significativement différents de ceux observés chez les sujets sains (436,4 U/ml). Si l'on observe plus particulièrement les trois groupes d'HES, les taux d'IL-2Rs évoluent en fonction de la gravité de la maladie. Ces taux sont significativement plus élevés dans les HES C (8021 ± 1639 U/ml) que dans les HES B (3345 ± 938 U/ml; $p < 0,015$). De la même façon ces derniers taux sont également différents de façon significative de ceux observés dans les HES A (1493 ± 461 U/ml; $p < 0,05$).

1-3 Relation entre les taux d'éosinophiles et les taux IL-2Rs

En comparant les valeurs du nombre absolu d'éosinophiles circulants (Figure 10) et d'IL-2Rs sériques dans les cas des HES et des lymphomes avec hyperéosinophilie (Figure 11), on constate que ces deux paramètres évoluent dans le même sens. Une corrélation significative a pu être observée dans le cas des lymphomes associés à une éosinophilie (Figure 12). En effet, dans 8 cas, les taux d'IL-2Rs sont corrélés soit au nombre total d'éosinophiles (Figure 12A), soit au nombre d'éosinophiles hypodenses (Figure 12B).

Chez six patients résistants à la chimiothérapie conventionnelle une thérapie à base d'interféron alpha a été utilisée. L'effet thérapeutique de cette cytokine a

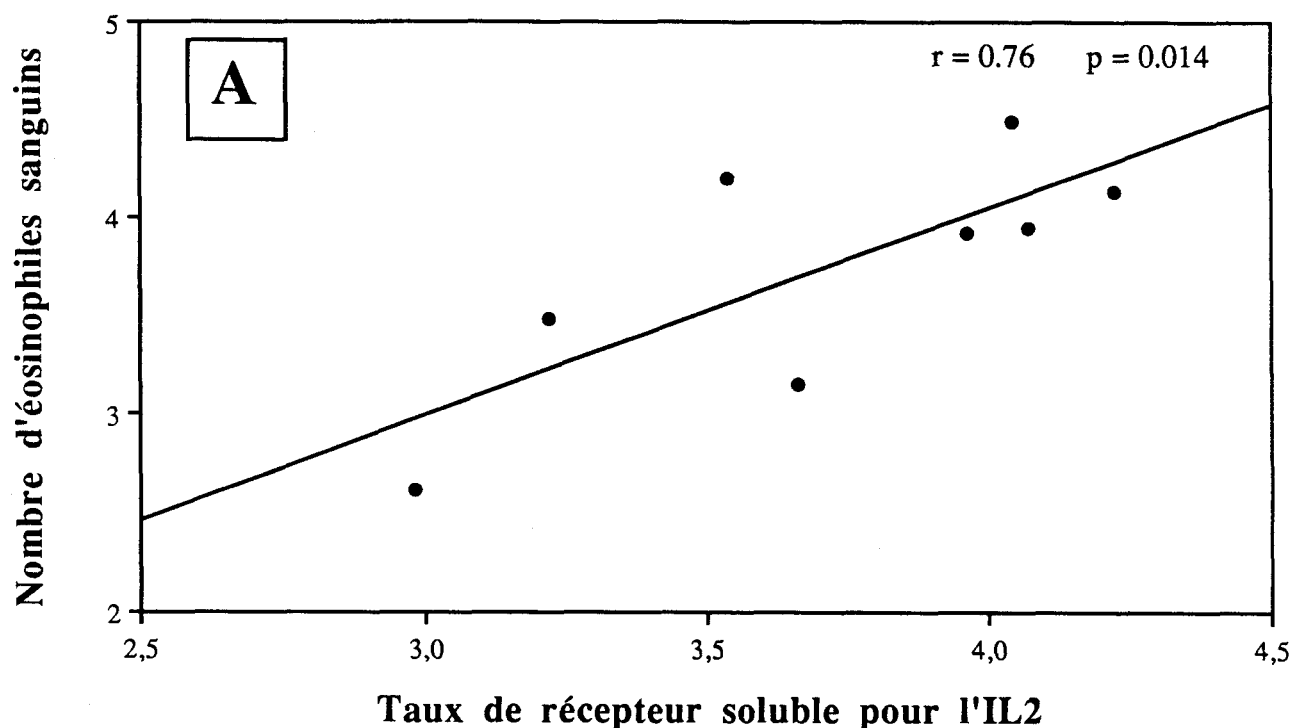


Figure 12A: Corrélation entre le taux de récepteur soluble pour l'IL-2 et le nombre total d'éosinophiles sanguins chez 8 patients présentant un lymphome T avec éosinophilie. (Données logarithmiques).

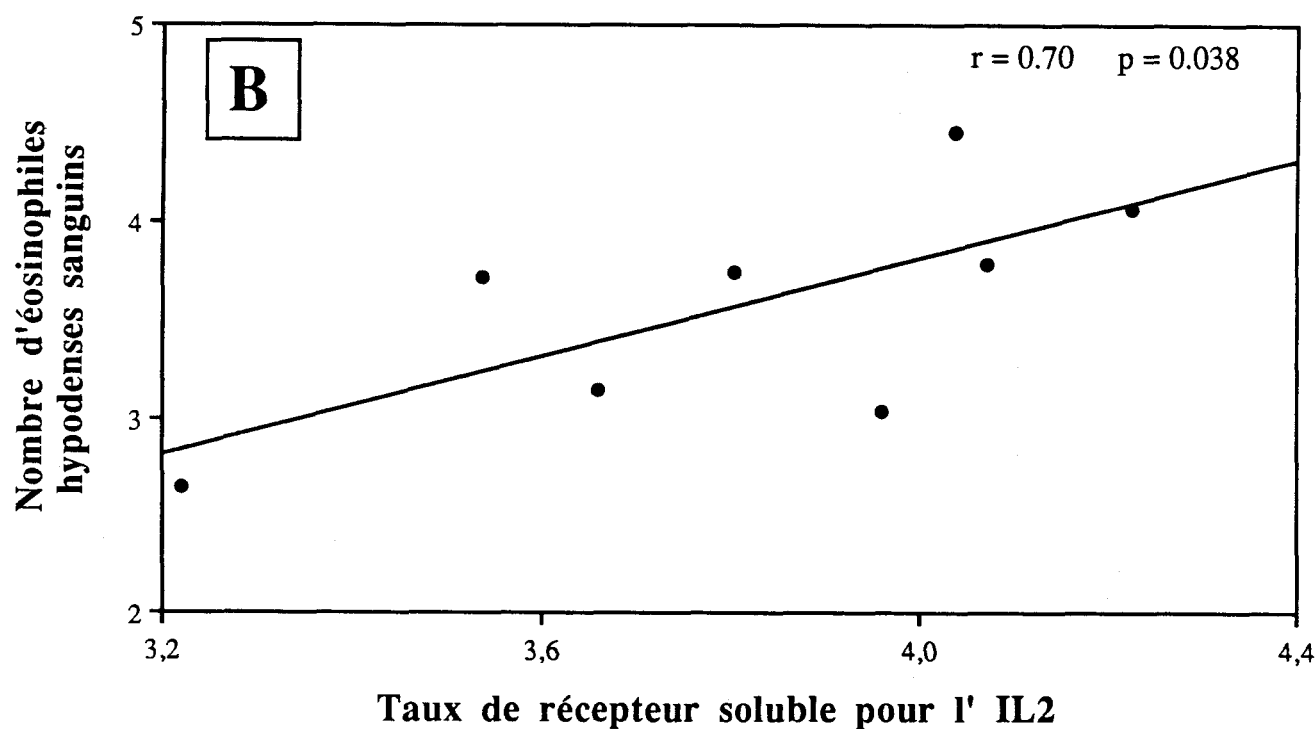
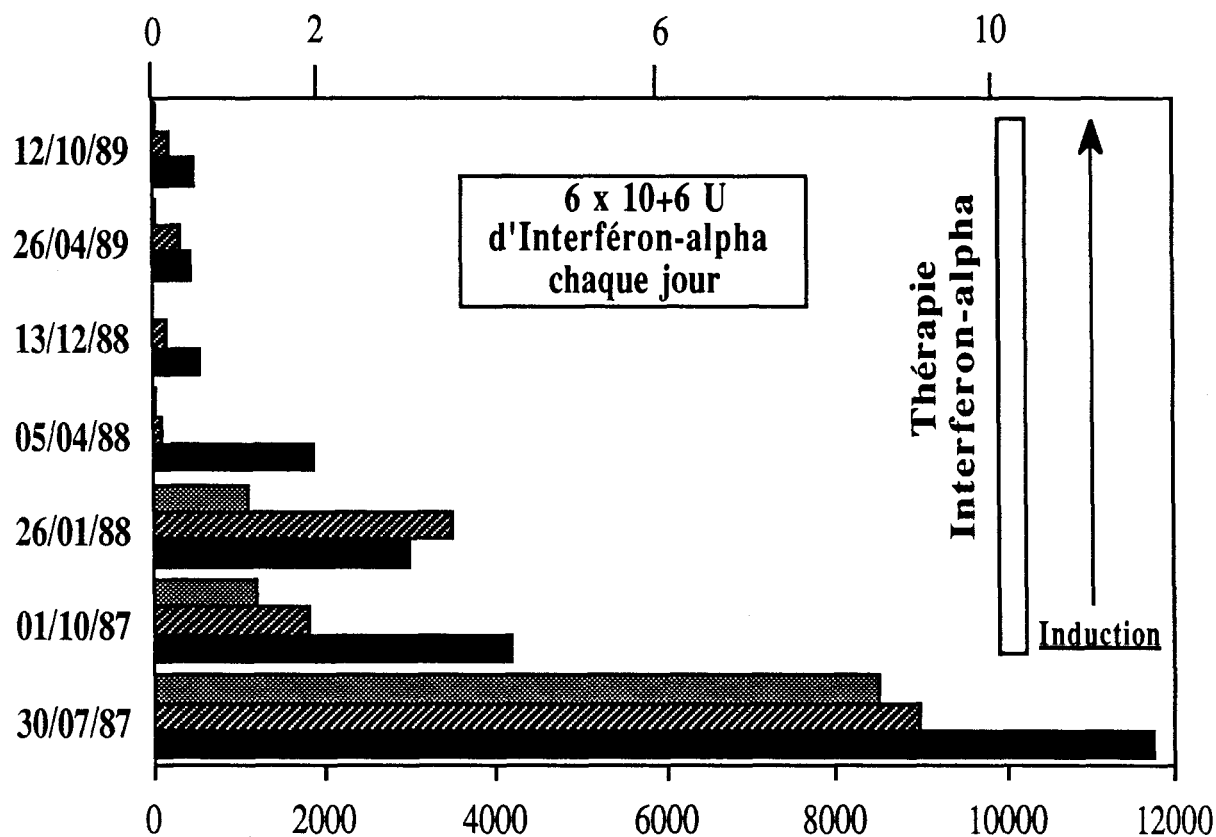


Figure 12B: Corrélation entre le taux de récepteur soluble pour l'IL-2 et le nombre d'éosinophiles hypodenses sanguins chez 8 patients présentant un lymphome T avec éosinophilie. (Données logarithmiques).

Nombre d'Eosinophiles/L ($\times 10^9$)



IL2R soluble (Unités/mL)

Figure 13: Modification des paramètres sanguins chez un patient, ayant un lymphome T avec éosinophilie, traité par l'interféron-alpha.

■ Taux d'IL-2R soluble ▨ Nombre Total d'Eosinophiles ▤ Nombre d'Eosinophiles Hypodenses

été bien illustré dans le cas des leucémies a tricoleucocytes⁽²⁶²⁾. Ce traitement de ces patients par l'IFN α a conduit à une réponse clinique favorable dans tous les cas en quelques mois, voire en quelques semaines, accompagnée d'une chute à la fois du taux d'IL-2Rs et du nombre total d'éosinophiles et d'éosinophiles hypodenses. Une expérience représentative de la modification de ces paramètres sanguins est illustrée par la Figure 13.

1-4 Activation lymphocytaire

Nous avons ensuite examiné l'effet de la stimulation par l'interleukine 2 des cellules mononucléées de 4 patients ayant un lymphome T avec éosinophilie, ou un HES malin (HES C) dans deux buts précis. Le premier consistait à définir les modalités de l'expression de l'IL-2R, par la mise en évidence de la synthèse d'IL-1, de TNF, d'IL-2 et d'ADF. Dans un second temps nous avons voulu déterminé l'expression des cytokines impliquées dans les mécanismes de régulation de l'éosinopoïèse, à savoir l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5, mais aussi l'IL-1, l'IL-6 et le TNF qui sont connues pour leur activité synergique sur la croissance et la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Les principaux caractères clinicobiologiques des patients sont représentées dans le tableau 2. Un patient a pu être testé à deux reprises. Le nombre d'éosinophiles circulants varie de $2,4 \times 10^9/L$ à $33 \times 10^9/L$ et le taux d'IL-2Rs sérique de 3950 U/ml à 15120 U/ml. Après purification, la majorité des cellules recueillies est de type lymphocytaire (Tableau 3). En utilisant un anticorps dirigé soit contre la chaîne alpha (p55), soit contre la chaîne bêta (p75) du récepteur

<i>Patient</i>	<i>Pathologie</i>	<i>Formule</i>				<i>Eosinophiles</i> 10 ⁹ /L	<i>sIL-2R</i> U/ml
		<u>L</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>Eo</u>		
Témoin	Sain	28	8	63	1	<0,3	328
PEL	HES-Lymphome T	18	1	13	78	33,2	3 950
LEP	HES-Lymphome T	19	5	46	30	2,4	9 270
SCH	HES-C	11	1	30	58	8,3	3 480
BOS I	HES-Lymphome T	42	2	19	37	31,1	10 920
BOS II		34	2	20	44	15,7	15 120

Tableau 2: Pathologie et formule cellulaire du sang périphérique des patients. Dosage de l'IL-2Rα soluble sérique.

L: Lymphocyte; M: Monocyte; N: Neutrophile; Eo: Eosinophile

<i>Patient</i>	<i>Formule</i>				<i>Phénotypage</i>		<i>Culture</i>	<i>Dosage</i>
	L	M	N	Eo	p75	p55	IL-2 100U/ml	sIL2R U/100M
Témoin	76	13	1	0	12	5,5	- +	960 2 560
PEL	70	30	0	0	6	3	- +	560 1 160
LEP	72	27	1	1	4,5	45	- +	1 400 6 360
SCH	94	2	4	0	0	0	- +	0 160
BOS I	75	19	3	3	4	10	- +	700 3 350
BOS II	83	13	3	1	9	8	- 100 500 1 000	480 9 840 11 440 10 640

Tableau 3: Formule cellulaire et expression de l'IL-2R sur les cellules purifiées de patients. Dosage de l'IL-2Rα soluble dans le surnageant des cellules cultivées en présence ou en absence d'IL-2.

pour l'IL-2, nous avons pu réaliser des expériences de phénotypage des cellules lymphocytaires. Les résultats montrent que l'expression membranaire des deux chaînes est variable, mais le plus souvent faible et qu'elle ne semble pas liée ni aux taux d'IL-2Rs sérique ni aux taux d'éosinophiles circulants.

Les cellules ont été mises en culture pendant 20 heures en présence ou en absence d'IL-2 à 100 U/ml. Nous avons ensuite tenté de déterminer l'expression d'un certain nombre de cytokines, à deux niveaux: au niveau protéique, en dosant les protéines dans le surnageant, et au niveau de l'ARN messenger par hybridation moléculaire. La stimulation sur un temps court, nous permettait d'observer deux phénomènes. Le premier concernait la libération de médiateurs déjà préformés ou en cours de synthèse et le second l'expression des gènes correspondants. Le dosage de l'IL-2R α dans les surnageants et l'expression de cette protéine aux niveau de l'ARNm ont également été étudiés.

Expression de cytokines au niveau protéique

Les résultats concernant le dosage de l'IL-2Rs, dans le surnageant de culture, sont représentés dans le Tableau 3. La stimulation par l'interleukine 2 augmente le taux soluble d'IL-2R α mais il ne semble pas y avoir de relation entre le nombre de cellules exprimant l'IL-2R et les taux de formes solubles. Dans trois cas sur quatre la stimulation par l'IL-2 entraîne une libération plus importante d'IL-2Rs (de 1,7 à 7,6 fois) qu'en absence de stimulation. La concentration d'IL-2 de 100 U/ml semble suffisante à la génération d'une réponse maximale, on n'observe en effet qu'une très faible augmentation du taux d'IL-2Rs dans le cas BOS-2 pour les concentrations de 500 U/ml et 1000 U/ml. Concernant les quatre cytokines: IL-1, IL-6, TNF, IL-3 et GM-CSF (l'IL-1 étant d'origine presque

exclusivement monocyttaire), la stimulation par l'IL-2 n'a pas ou peu d'effet sur leur libération. Les quantités libérées dans le cas des patients sont peu différentes du Témoin excepté pour le cas BOS-1 (Résultats non présentés).

Expression de cytokines au niveau moléculaire

L'ARN total correspondant aux cellules en culture en présence ou en absence d'IL-2, ainsi que les cellules de ces patients fraîchement purifiées, a été isolé et séparé sur gel d'agarose. Plusieurs sondes d'ADN complémentaires (IL-2R α , IL-2R β , IL-5, IL-3, GM-CSF), d'ARN (TNF α) ou oligonucléotidiques (TNF β , ADF) ont été successivement utilisées afin de détecter l'ARN messenger correspondant (Figure 14). L'hybridation avec la sonde actine dont l'expression n'est pas modulable permet d'apprécier de façon qualitative et quantitative l'ARN déposé dans le gel d'agarose.

Les cellules fraîchement isolées du donneur sain, n'expriment pas de messenger codant pour l'IL-2R α , l'IL-5, le GM-CSF, le TNF α et β et l'ADF. Chez les patients LEP et BOS, seuls les ARNm du TNF et de l'ADF sont retrouvés dans les cellules non cultivées.

Le profil d'expression du TNF α et de l'ADF est modifié quand les cellules sont cultivées pendant 20 heures, mais en absence de stimulation. En effet, chez trois patients l'expression de l'ARNm du TNF α est amplifiée. Le messenger correspondant à l'ADF est détectable dans tous les cas y compris chez le Témoin. L'ARN codant pour la chaîne β de l'IL-2R, dont l'expression est constitutive, est retrouvée dans les cellules fraîches ou cultivées de tous les sujets.

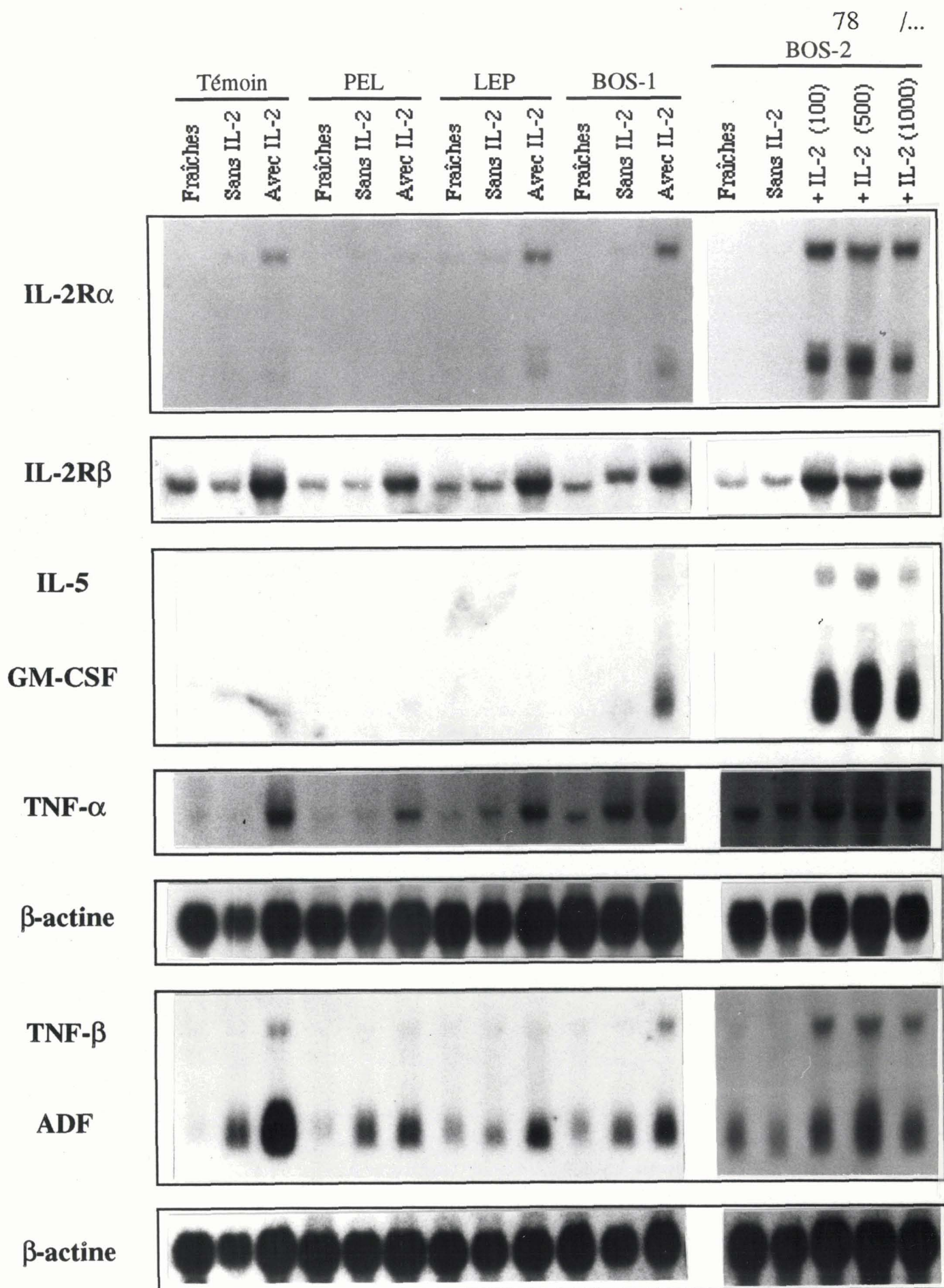


Figure 14: Expression de l'ARN messager de l'IL-2R α , de l'IL-2R β , de l'IL-5, du GM-CSF, du TNF α et β et de l'ADF. Pour chaque patient, l'ARN des cellules fraîchement purifiées et des cellules cultivées pendant 20 heures, en présence ou en absence d'IL-2 a été extrait. Les signaux obtenus avec les sondes nucléotidiques correspondent aux tailles décrites dans la littérature.

La stimulation pendant 20 heures par l'IL-2 entraîne une stimulation de l'expression des deux chaînes de l'IL-2R. Cependant, si l'induction de l'IL-2R β par l'IL-2 semble identique dans tous les cas, l'induction de l'IL-2R α paraît plus importante chez les patients que chez le Témoin, dans au moins trois cas sur quatre. Chez tous les sujets, l'IL-2 augmente l'expression du TNF α et de l'ADF de façon plus ou moins importante. Dans le cas de l'ADF, l'induction est plus importante chez le donneur sain que chez les patients. Chez le patient BOS et le Témoin, l'IL-2 induit l'expression du TNF β . Enfin, les ARN messagers du GM-CSF et de l'IL-5, n'apparaissent que chez le patient BOS après stimulation par l'IL-2. L'hybridation avec une sonde IL-3, n'a donné aucun signal positif quels que soient les patients ou les conditions (Résultats non présentés).

II- INFECTION RETROVIRALE ET HYPEREOSINOPHILIE

L'apparition de lymphome T avant ou après le développement d'une hyperéosinophilie nous a conduit à envisager l'existence d'une infection rétrovirale à potentialité transformante dans la pathogénie de l'HES. La présence de taux sériques d'IL-2R soluble très élevés a orienté notre recherche vers le rétrovirus HTLV-I.

2-1 Présence de séquences rétrovirales dans l'ADN des cellules de patients

Deux types d'approche ont été utilisées pour tester cette hypothèse. La première consistait à détecter des séquences rétrovirales homologues à HTLV-I par amplification génique ou PCR (Polymérase Chain Reaction) dans le génome des cellules mononucléées des patients. Une étude réalisée dans notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Professeur J.P. Lévy a montré qu'il existait des séquences nucléotidiques spécifiques d'HTLV-I dans le génome de cellules mononucléées de trois patients présentant un HES associé à un lymphome T⁽³⁰⁴⁾. D'autre part, nous avons réalisé une étude sur une vingtaine de patients présentant des hyperéosinophilies de diverses origines. Nous n'avons détecté des séquences spécifiques des régions gag et tax d'HTLV-I, que dans le cas d'un seul patient hyperéosinophilique présentant un lymphome T (Résultats non présentés).

2-2 Cultures cellulaires

Ces résultats nous ont permis d'envisager un second type d'approche, permettant d'augmenter la sensibilité de la détection virale et de pouvoir disposer

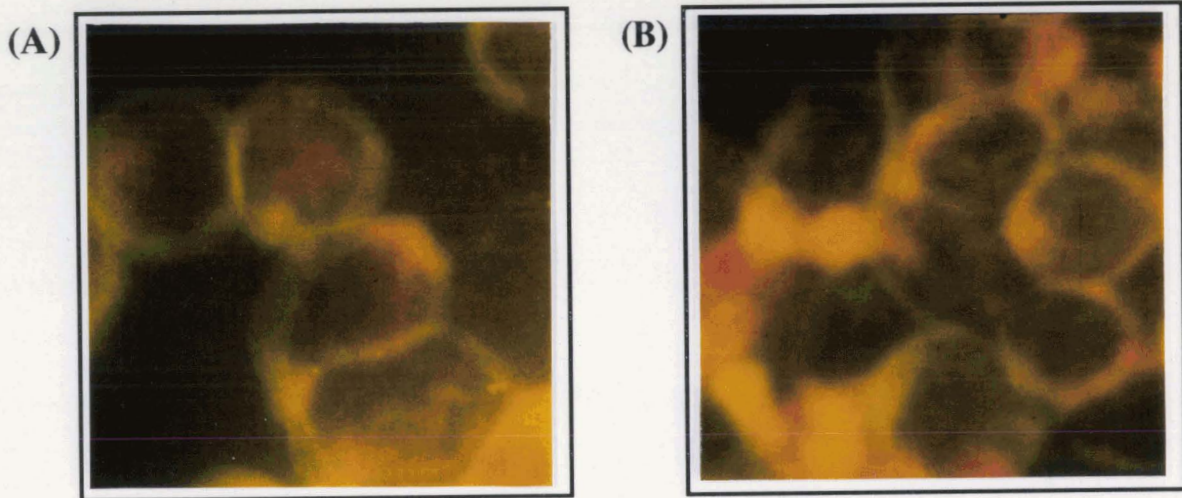


Figure 15: Immunofluorescence, réalisée avec un sérum polyclonal anti HTLV-I, sur les cellules de la lignée C10MJZ (A) et sur les cellules du patient Do cocultivées avec les cellules de sang de cordon ombilical pendant trois semaines (B).

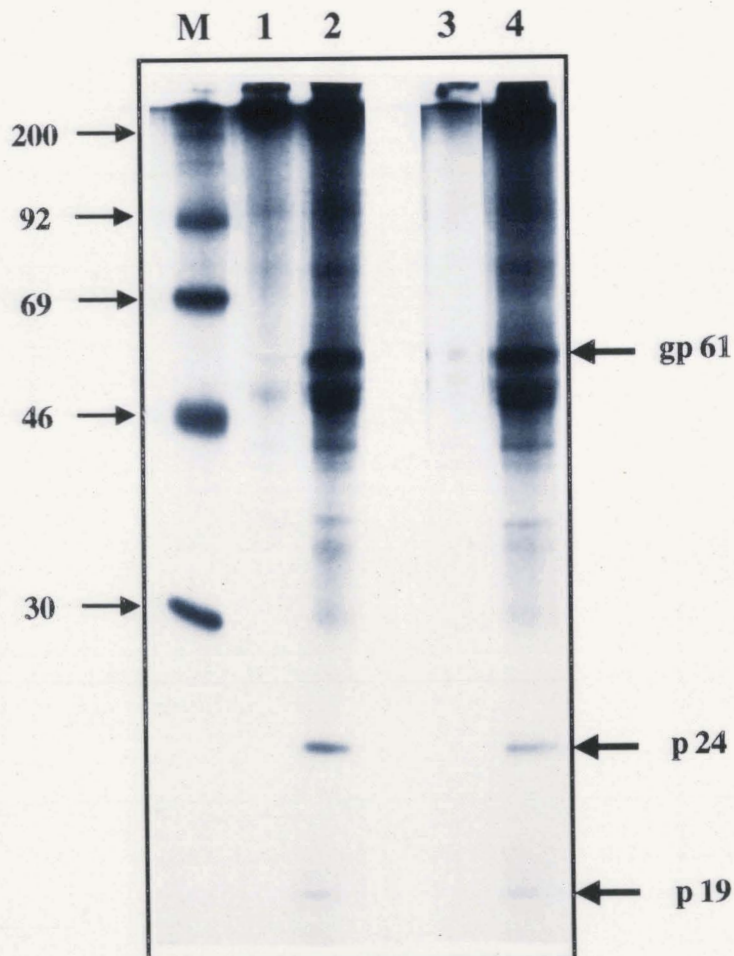


Figure 16: Immunoprécipitation des extraits cellulaires marqués au soufre ^{35}S de la lignée C10MJZ (1 et 2) et de la lignée Do (3 et 4). Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un sérum polyclonal anti-HTLV-I (2 et 4) et avec un sérum contrôle (1 et 3). La piste M correspond aux marqueurs de poids moléculaire exprimés en kiloDalton (kD).

d'un matériel biologique plus abondant. Cette approche reposait sur la mise en culture des cellules mononucléées de patients dans le but d'obtenir une transformation cellulaire. Pour ce faire, les cellules sont stimulées pendant trois jours par un mitogène, puis elles sont soit, cultivées directement en présence d'IL-2, soit cocultivées avec des cellules mononucléées de sang de cordon ombilical, également en présence d'IL-2. Les cellules de sang de cordon semblent plus sensibles à l'infection par HTLV-I⁽³⁰⁵⁾.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. F. BARRE-SINOUSI et a porté sur sept patients présentant une hyperéosinophilie associée à un lymphome T.

La détection d'anticorps anti-HTLV-I par une technique ELISA dans le sérum de ces patients s'est révélée négative. Après trois semaines de culture, une immunofluorescence réalisée avec un sérum polyclonal a mis en évidence une positivité pour les cellules d'un patient (Patient Do) (Figure 15). Nous avons utilisé comme témoin positif une lignée cellulaire appelée C10MJZ qui est infectée par HTLV-I. L'ADN génomique correspondant aux cellules cultivées soit en culture directe, soit en coculture de tous les patients, a été isolé puis a subi une amplification génique. Les résultats de cette expérience présentés dans la Figure 17A, montrent que deux patients sont positifs pour la région tax d'HTLV-I. Alors qu'un signal positif est retrouvé à la fois pour les cellules en culture directe et en coculture chez le patient Do, seules les cellules cocultivées avec les cellules de sang de cordon donnent un signal positif chez le patient Ca. Il faut cependant noter que pour tous les patients, aucun signal n'a été détecté pour la région gag et pour deux régions pol d'HTLV-I.

(A)

Culture DirecteCo-culture

Ca Di Do Lo Ma Sa Va

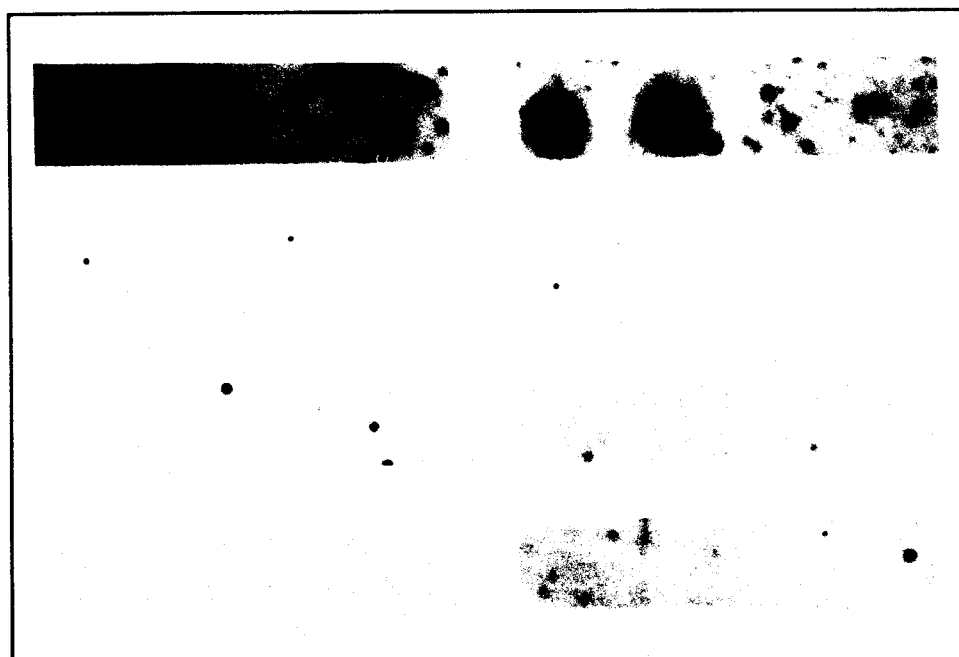
Ca Di Do Lo Ma Sa Va

Tax

Gag

Pol A

Pol B



(B)

Lignée
Do

Neg Eau

Lignée
C10MJZ

Tax

Gag

Pol A

Pol B

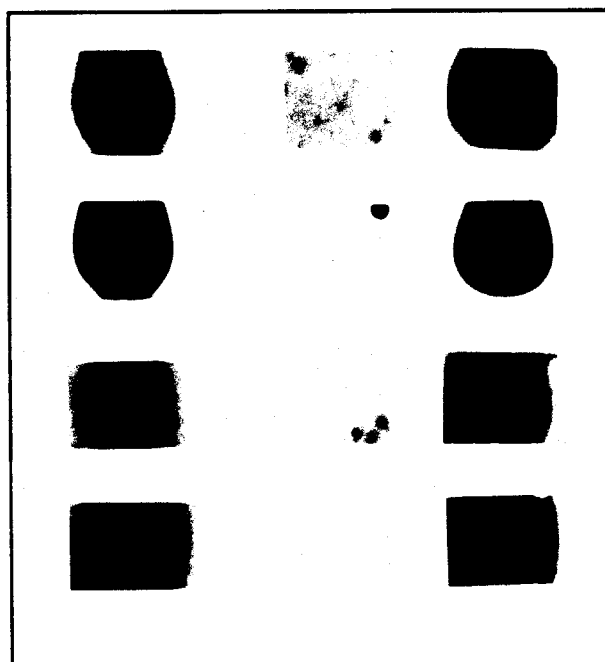


Figure 17: Amplification génique de l'ADN des cellules en culture ou en coculture, de sept patients (A) et de la lignée Do et C10MJZ (B). Les fragments d'amplification ont la taille attendue (tax: 138 pb; gag: 203 pb; pol A: 119 pb; pol B: 391 pb). Les témoins correspondent à une amplification réalisée avec l'ADN de cellules de sang de cordon non cultivées (Neg) et à une amplification où l'ADN a été remplacé par de l'eau (Eau).

2-3 Etablissement d'un clone cellulaire transformé par HTLV-I

Après un mois de culture, un clone cellulaire a été établi à partir des cellules en coculture du patient Do, alors que dans tous les autres cas les cellules sont mortes. Par phénotypage membranaire nous avons pu observer que les cellules de la lignée Do étaient CD4+ CD8- CD25+.

Des expériences de radioimmunoprécipitation en utilisant un anticorps polyclonal ont été réalisées afin de savoir si les cellules de la lignée exprimaient des antigènes viraux. Les résultats présentés dans la Figure 16 montrent le profil protéique obtenu avec le clone Do est identique à celui de la lignée C10MJZ et que ces cellules expriment effectivement les antigènes viraux p19 et p24 ainsi que gp61 d'HTLV-I.

En utilisant la technique d'amplification génique, nous avons détecté quatre séquences spécifiques d'HTLV-I dans les gènes gag, pol et tax (Figure 17B). Ces produits d'amplification sont retrouvés à la même taille que ceux obtenus avec l'ADN de la lignée C10MJZ.

Afin de connaître l'identité de l'entité virale infectant les cellules de la lignée Do avec le virus HTLV-I, nous avons analysé l'ADN par digestion enzymatique suivie d'une analyse par la technique de Southern blot (Figure 18). L'ADN du clone a été digéré par les enzymes Pst I d'une part et par les enzymes Sma I et Bam HI d'autre part. L'ADN digéré a ensuite été hybridé avec les sondes nucléotidiques correspondant aux gènes gag et pol en ce qui concerne les digestions Pst I (Pistes 1 et 3) et la sonde Tax en ce qui concerne la double digestion Sma I/Bam HI (Piste 2). Les signaux obtenus correspondent aux tailles attendues d'après la carte de restriction du génome HTLV-I. En effet pour une digestion avec Pst I et une hybridation soit avec la sonde gag, soit avec la sonde

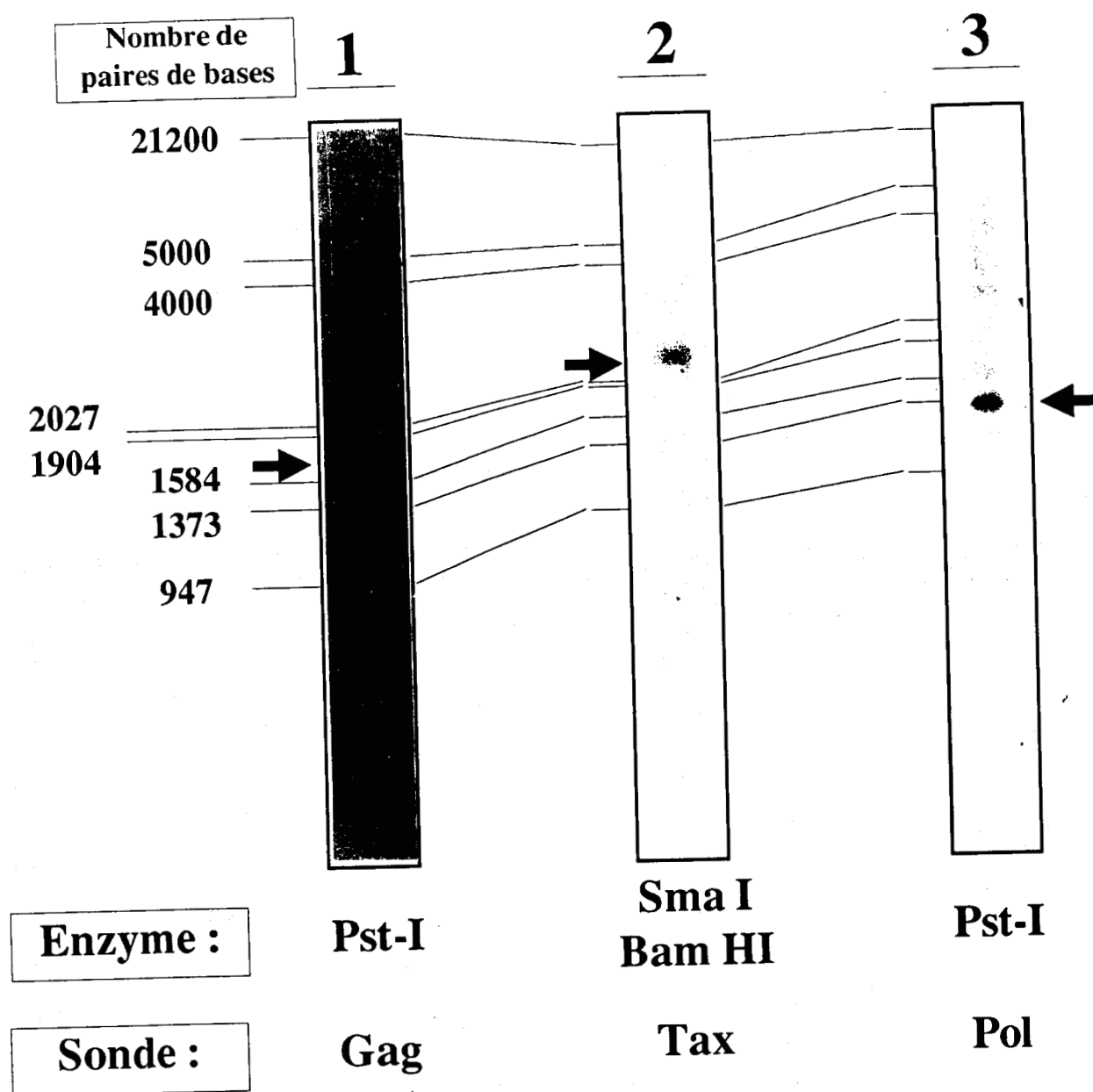


Figure 18: Digestion enzymatique et hybridation de l'ADN de la lignée Do avec les sondes gag, tax et pol d'HTLV-I. Les tailles des bandes observées sont de 1600 pb (Piste 1), 2200 pb (Piste 2) et 1300 pb (Piste 3). Les tailles théoriques pour les mêmes digestions et les mêmes hybridations de l'ADN d'HTLV-I sont respectivement de 1644 pb, 2208 pb et de 1281pb.

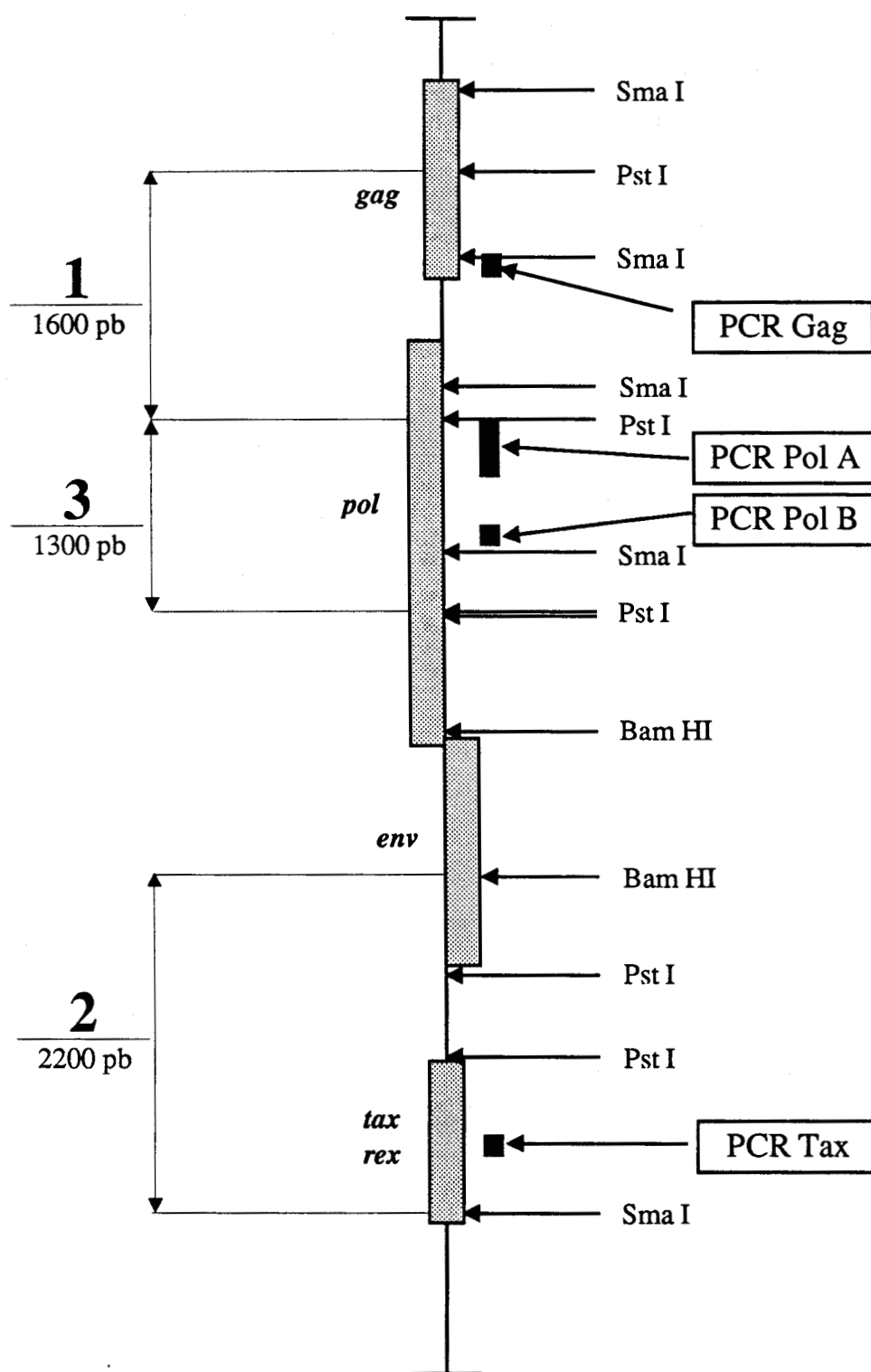


Figure 19: Représentation schématique de la carte de restriction de l'ADN du virus HTLV-I. La position et la taille des fragments de restriction, obtenus dans l'expérience d'hybridation des fragments de digestion de l'ADN de la lignée Do ainsi que la localisation des régions amplifiées par PCR sont indiquées.

pol, les fragments attendus ont respectivement une taille de 1644 paires de bases (pb) et de 1280 pb. Dans nos expériences ces fragments ont respectivement la taille de 1600 pb (Piste 1) et 1300 pb (Piste 3). Enfin, la digestion de l'ADN d'HTLV-I par Sma I et Bam HI donne en théorie un fragment de 2200 pb avec la sonde tax; dans notre expérience nous avons un fragment exactement à la taille attendue (Piste 2). La Figure 19 représente la synthèse des résultats de PCR et d'analyse des fragments de restriction. Sur ce schéma, les différentes régions analysées du génome d'HTLV-I sont notées.

Enfin, une analyse en microscopie électronique de coupes fines des cellules de la lignée Do a été réalisée. Sur la photographie présentée dans la Figure 20, on distingue clairement des formes arrondies extracellulaires ayant un core central, dense aux électrons. Cette image est typique des particules virales mûres de type C.

2-4 Pathologie du patient Do

Les données cliniques concernant le patient Do âgé de 37 ans et vivant en Côte d'Ivoire indiquent qu'il souffre d'un syndrome hyperéosinophilique associé à des lésions cutanées (nodules prurigineux) depuis 1984 sans aucune autre symptomatologie associée. Sa sérologie HTLV-I a toujours été négative. Six ans après la découverte de l'hyperéosinophilie, des biopsies cutanées ont fait apparaître l'existence d'un lymphome pléiomorphe à petites cellules. Le traitement par l'interféron alpha entraîne une amélioration clinique en quelques semaines dont la diminution du taux sérique d'IL-2R et du nombre total d'éosinophiles et d'éosinophiles hypodenses (Figure 21).

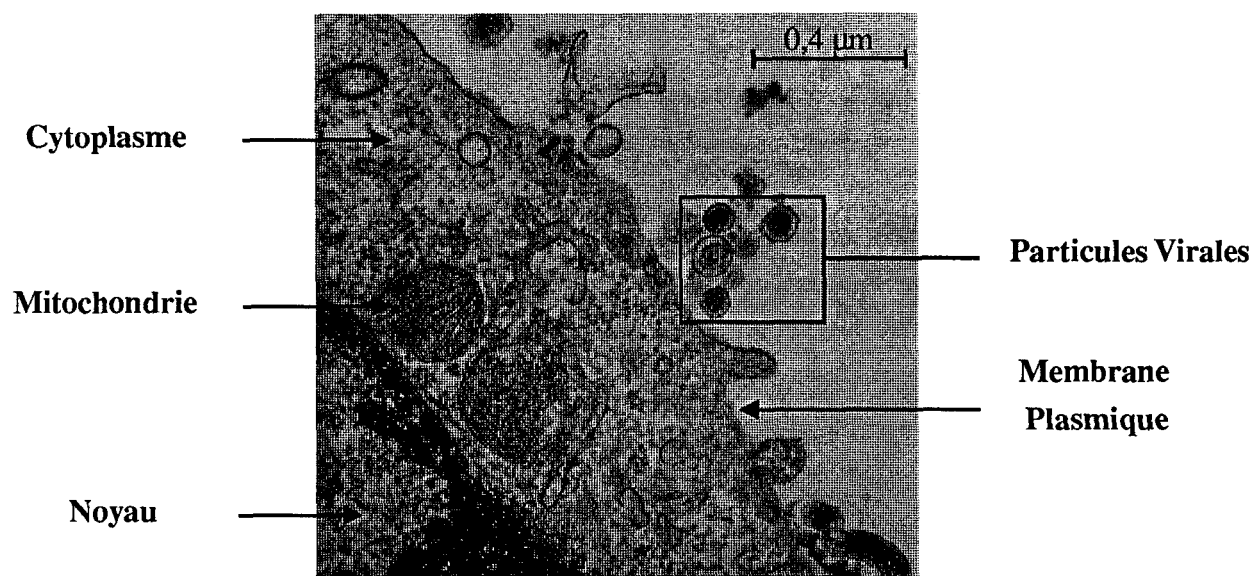
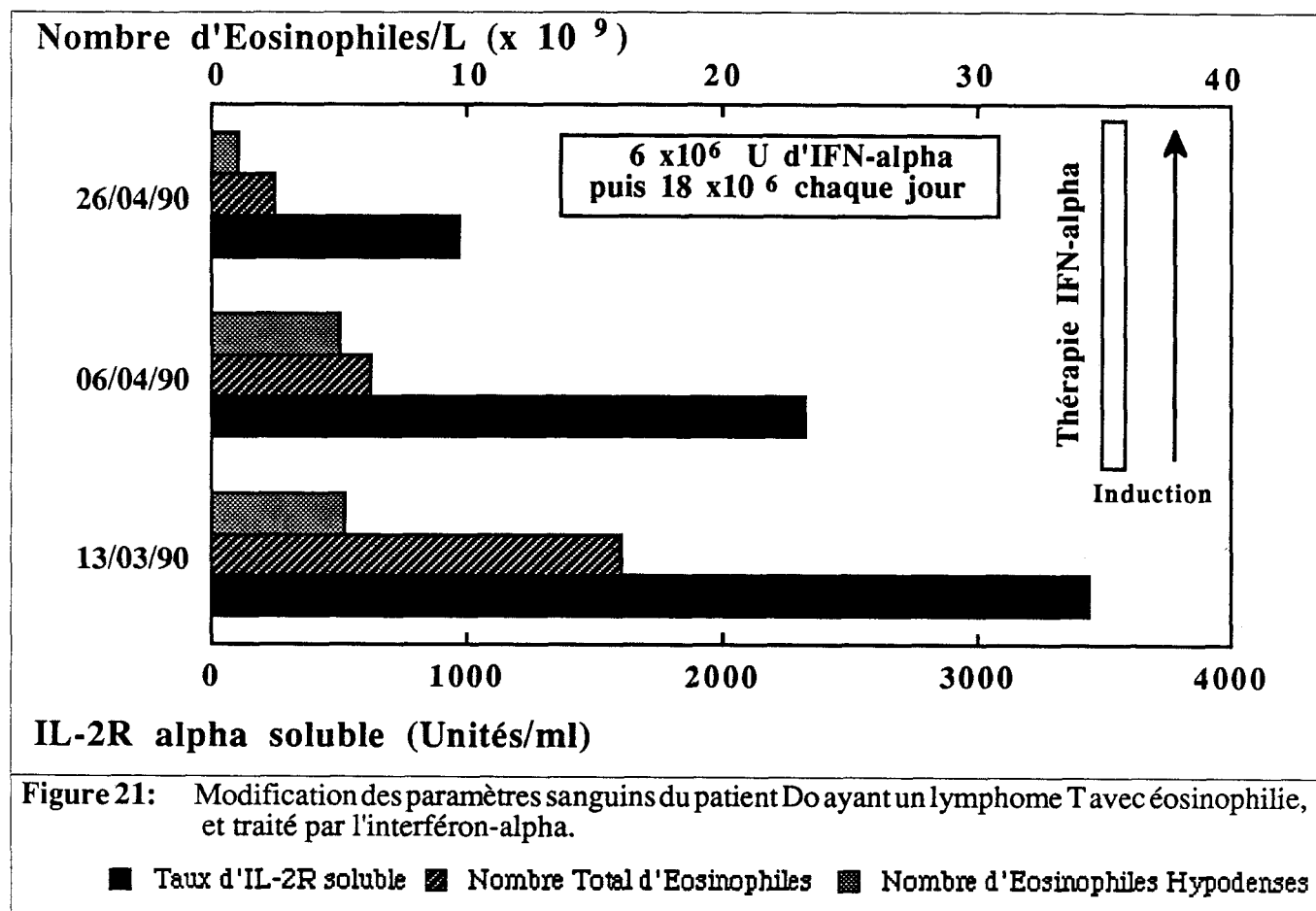


Figure 20: Microscopie électronique réalisée sur des coupes fines des cellules de la lignée Do. L'encadré indique les particules virales de type C. Ce sont des formes arrondies qui ont un core central, dense aux électrons.



III- EXPRESSION DE L'IL-2R PAR L'EOSINOPHILE

La discordance entre les taux élevés d'IL-2R soluble dans le sérum et l'expression membranaire de la p55 sur les lymphocytes des patients hyperéosinophiliques suggère l'existence d'autres types cellulaires au niveau sanguin ou tissulaire comme source d'IL-2Rs. Cette observation nous a conduit à envisager l'expression d'IL-2R par l'éosinophile lui-même.

3-1 Expression membranaire de la chaîne alpha de l'IL-2R sur l'éosinophile

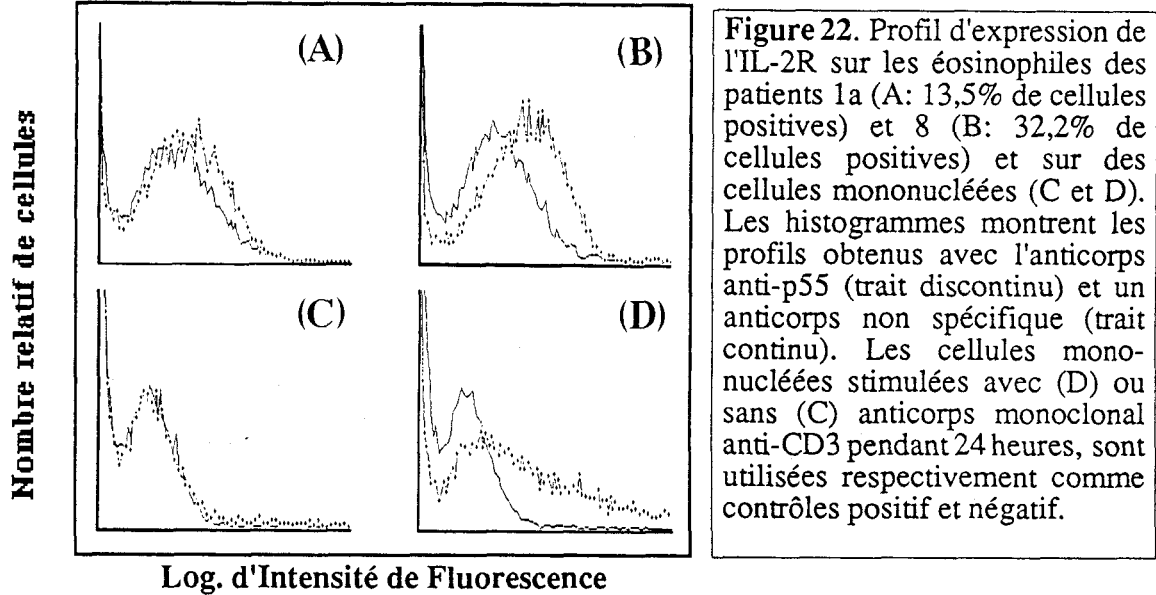
L'expression de l'IL-2R α ou CD25 à la surface de l'éosinophile a été d'abord observée en cytométrie de flux sur des éosinophiles fraîchement purifiés. Les résultats présentés dans le tableau 4, montre que le pourcentage de cellules exprimant le CD25 est variable (3,6% à 70%) suivant les patients et la pathologie. Pour plusieurs patients, deux expériences ont été réalisées quand le pourcentage de cellules contaminantes était faible et quand le nombre de cellules était suffisant. Dans 10 cas sur 19, plus de 10% des éosinophiles expriment le CD25. La Figure 22 correspond à une expérience représentative où les histogrammes 1A et 1B représentent respectivement les résultats obtenus avec les patients 1a et 8.

L'expression des chaînes alpha et bêta sur l'éosinophile a été ensuite examinée par fixation covalente du ligand radiomarqué à son récepteur ou "cross-linking" en utilisant un agent chimique. Les résultats d'une expérience représentative sont montrés dans la Figure 23. Une bande est observée dans l'échantillon contenant l'IL-2 radiomarquée à l'iode 125 (Piste 1). Cette bande est située à un poids moléculaire compris entre 64 kD et 75 kD avec un pic d'intensité vers 70 kD représentant vraisemblablement le complexe p55/IL-2; la

Tableau 4: Eosinophilie sanguine et expression de la chaîne alpha de l'IL-2R sur l'éosinophile

Patient	Pathologie	N° d'éosino- philes/mm3	Purification cellulaire		* Analyse cytofluorométrique
			Pourcentage d'éosinophiles	Couche	% de cellules positives
1a	HES	5850	70	III	13,5
1b		ND	82	II	8,7
			85	III	6,6
1c		11407	90	III	18
2	HES	1500	67	III	4,7
3	HES	ND	91	IV	11,8
			97,5	V	7,9
4a	HES	3450	90	III	19,4
4b		3360	93	IV	70
5	HES	2970	98	IV	8,8
			100	V	3,6
6	HES	8000	97	III	5,9
7	HES	2550	96	IV	4,5
8	Parasitose	2210	93,5	IV	32,2
9	Parasitose	4100	97	III	19,4
			89	IV	11,6
10	Parasitose	6820	89,5	II	9,8
			90	III	10,1
11	Allergie	15600	72	III	16,7

* L'analyse cytofluorométrique a été réalisée sur les éosinophiles fraîchement purifiés. Les résultats sont exprimés par rapport à une immunoglobuline non spécifique.



masse moléculaire de l'IL-2 étant de 15 kD. De façon à déterminer la spécificité de cette observation, les cellules ont été préincubées soit avec un excès d'IL-2 non marquée (Piste 2), soit avec un anticorps bloquant le site de fixation de l'IL-2 à la chaîne alpha (Piste 3). Dans les deux cas, aucune bande n'est détectable, ce qui confirme la présence de la p55. Enfin, aucun signal, correspondant à la chaîne bêta (p75), n'est observé; la taille du complexe IL-2/p75 devrait se situer entre 85 kD et 95 kD.

3-2 Expression de l'IL-2R au niveau transcriptionnel

Afin de savoir si l'éosinophile synthétisait l'IL-2R, nous avons réalisé une expérience de Northern blot en utilisant les sondes d'ADN complémentaires codant pour la p55 et la p75. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de type NK comme témoins positifs et négatifs: la lignée YT Ser transfectée avec l'ADN complémentaire codant pour le CD23 et la lignée YT Néo, non transfectée⁽²⁵³⁾. Cette dernière n'exprime que la chaîne bêta de l'IL-2R, alors que dans la lignée YT Ser, les ARN messagers codant pour les deux chaînes sont retrouvés. Les résultats d'une première hybridation réalisée avec la sonde p55 sont représentés dans la Figure 24. L'ARN messenger correspondant codant pour l'IL-2R α est retrouvé dans le cas de la lignée YT Ser (Piste 2) mais pas dans celui de la lignée YT Néo (Piste 1). L'utilisation de deux sites de polyadénylation différents conduit à l'existence de deux formes d'ARN messenger codant toutes les deux pour la p55. Nous avons utilisé une troisième lignée appelée EoL3, qui est dérivée des cellules d'un patient ayant une leucémie à éosinophile. Cette lignée exprime la chaîne alpha de l'IL-2R en surface mais pas la chaîne bêta. Cette expression est retrouvée

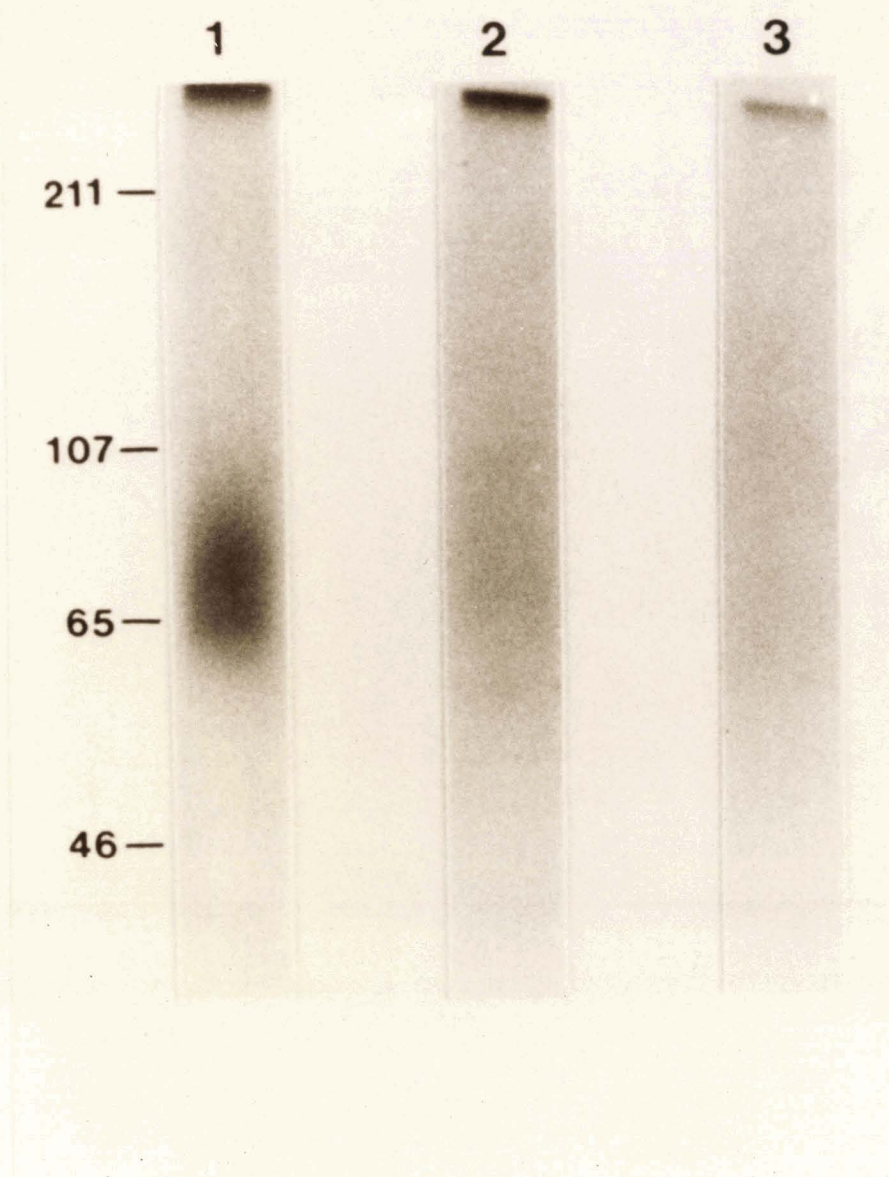


Figure 23: Caractérisation du récepteur pour l'IL-2 sur l'éosinophile. Les éosinophiles (10×10^6 ; 97% de pureté) sont incubés avec de l'IL-2 marquée à l'iode ^{125}I en absence d'inhibiteur (piste 1), en présence d'un excès d'IL-2 non marquée (piste 2) ou en présence d'un anticorps monoclonal bloquant le site de fixation de l'IL-2 sur la chaîne alpha du récepteur (piste 3). La bande observée dans la piste 1 correspond au complexe p55/IL-2.

au niveau transcriptionnel (Piste 3). De la même façon, les populations cellulaires enrichies en éosinophiles expriment toutes, les deux messagers de la p55 (Pistes 4 à 7).

Afin de savoir, si l'éosinophile exprimait la p75 au niveau transcriptionnel, nous avons réalisé une seconde expérience. Dans celle-ci le même blot a été hybridé d'abord avec la sonde IL-2R β , puis déhybridé pour subir une nouvelle hybridation avec la sonde IL-2R α . Les résultats illustrés dans la Figure 25 indiquent que l'ARN messager correspondant à la p75 n'est pas détectable à la fois dans les éosinophiles et dans la lignée EoL3, alors que l'on retrouve bien les deux formes d'ARNm de la p55. Dans le cas des lignées YT Ser et YT Néo, elles expriment toutes les deux la p75 au niveau transcriptionnel comme le laissait supposer l'expression membranaire, seule la lignée YT Ser possède le messager de la p55.

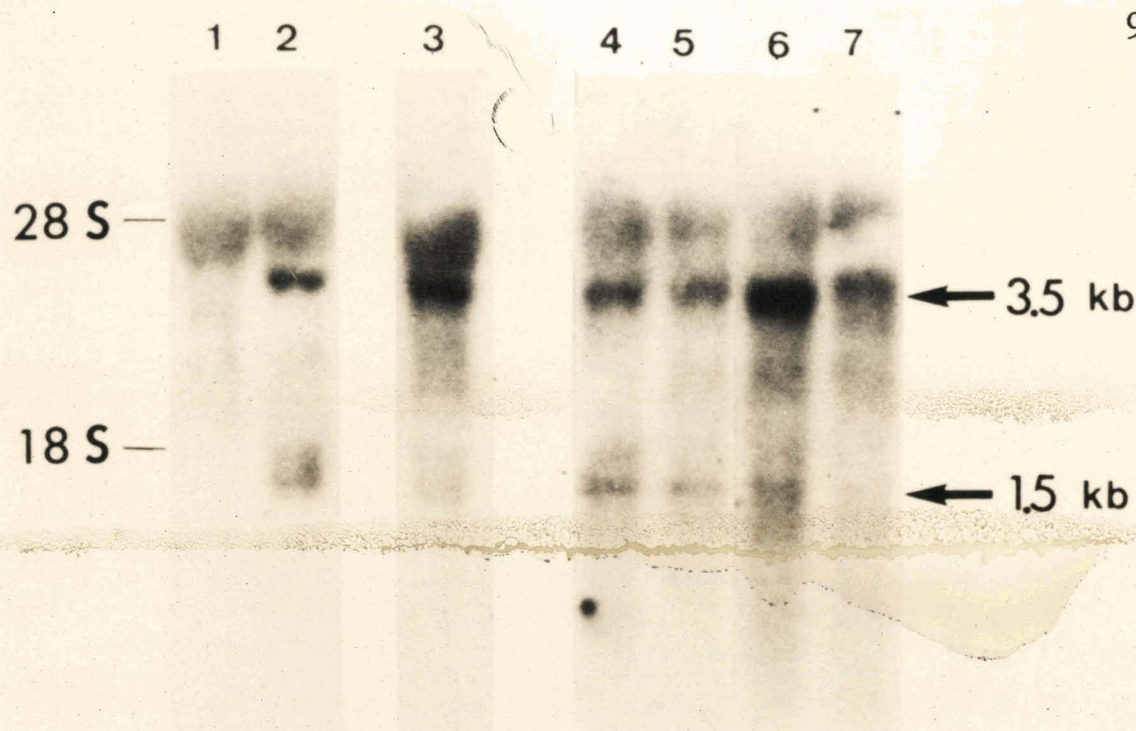


Figure 24: Expression de l'ARN messager de la chaîne alpha du récepteur pour l'IL2. Les pistes 1 et 2 représentent respectivement les contrôles négatif et positif. Les ARN d'une lignée éosinophile (EoL3; piste 3) et d'éosinophiles de quatre patients (pistes 4 à 7) ont été analysés par hybridation avec la sonde nucléotidique de la chaîne alpha de l'IL-2R. Le pourcentage de cellules contaminantes dans les préparations d'éosinophiles est respectivement de 1%, 1%, 0% et 2%.

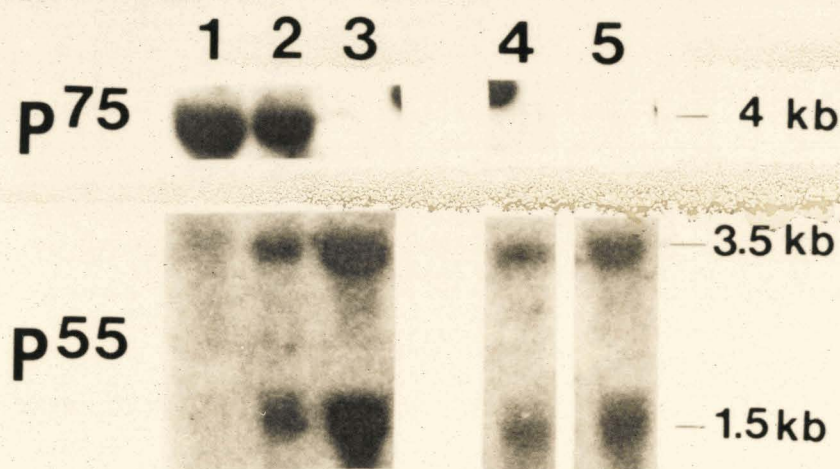


Figure 25: Expression de l'ARN messager des chaînes alpha et bêta de l'IL-2R. Les pistes 1 et 2 représentent respectivement les contrôles négatif et positif. Les ARN d'une lignée éosinophile (EoL3; piste 3) ainsi que d'éosinophiles de deux patients (pistes 4 et 5) ont été analysés par hybridation avec les sondes nucléotidiques des chaînes alpha et bêta de l'IL-2R. Le pourcentage de cellules contaminantes dans les préparations d'éosinophiles est respectivement de 5% et 0%.

IV-EFFETS DE L'IL-2 SUR L'EOSINOPOIESE

La présence de la chaîne alpha du récepteur pour l'interleukine 2 à la surface de l'éosinophile ainsi que le développement d'une éosinophilie chez les patients ayant un cancer et traités par l'IL-2 nous ont conduit à évoquer l'hypothèse que l'IL-2 pouvait agir sur l'éosinopoïèse. La disponibilité d'un modèle de différenciation de cellules de sang de cordon ombilical en éosinophiles, nous a permis de réaliser plusieurs séries d'expériences.

4-1 Effet de l'IL-2 sur la différenciation

Afin d'évaluer l'activité de l'IL-2 sur la différenciation des cellules de sang de cordon nous avons réalisés deux types d'expériences.

Dans un premier temps, l'IL-2 a été ajoutée dans la culture, en plus des trois autres cytokines (IL-3/IL-5/GM-CSF) pendant les 24 jours de culture (Figure 26A, n=3). La différenciation des cellules souches en éosinophiles est inhibée par l'IL-2 tout au long de la culture. Le nombre de cellules positives pour la coloration spécifique de l'EPO atteint 68% à J18 dans la condition Témoin, alors qu'il est à peine à 30% en présence d'IL-2, soit une inhibition de plus de 50%.

Dans la seconde série d'expériences, l'incubation des cellules avec l'IL-2 a été réalisée sur une courte durée. En effet, l'IL-2 a été rajoutée dans le milieu de culture, en plus des trois autres cytokines (IL-3/IL-5/GM-CSF) seulement pendant les six premiers jours, la culture est ensuite poursuivie jusqu'à J24 en absence d'IL-2 (Figure 26B, n=3). Après une première phase d'inhibition, la différenciation augmente fortement de J6 à J12 pour ce maintenir à une valeur supérieure à celle de la condition Témoin jusqu'à la fin de la culture. La deuxième semaine de culture représente une période importante dans la

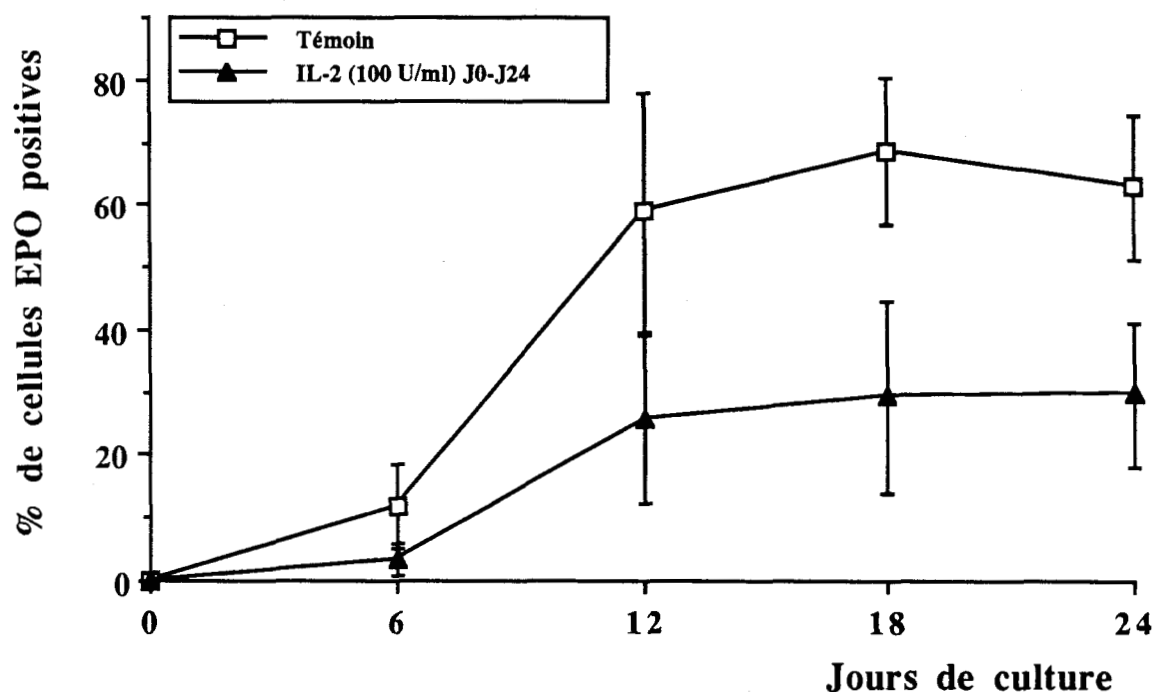


Figure 26 A: Différenciation des cellules de sang de cordon, en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5, et en absence (Témoin) ou en présence d'IL-2 à 100 U/ml pendant toute la durée de la culture. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type (SD) de trois expériences.

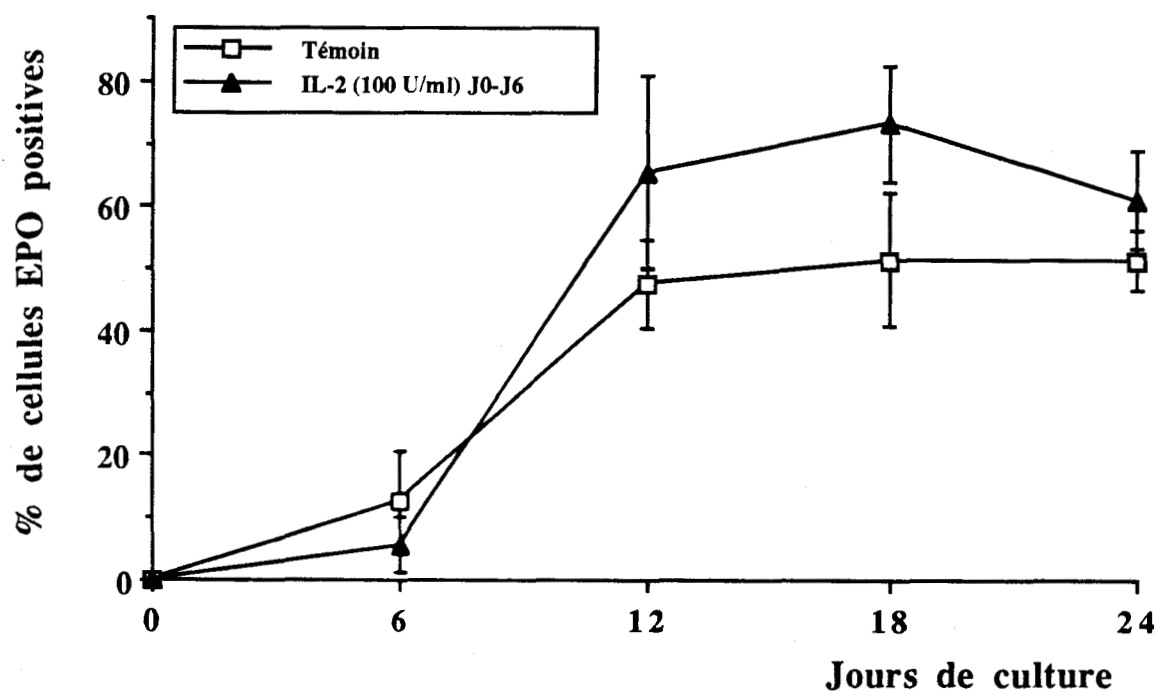


Figure 26 B: Différenciation des cellules de sang de cordon, en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5, et en absence (Témoin) ou en présence d'IL-2 à 100 U/ml pendant seulement les six premiers jours. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type (SD) de trois expériences.

modification des événements cellulaires conduisant à l'augmentation de la différenciation cellulaire induite par l'IL-2. Le nombre de précurseurs éosinophiles dans la condition Témoin passe de 12,7% à 47,5% de J6 à J12, alors que dans la condition IL-2 ce nombre passe de 4,5% à 65,3% dans le même temps. Ces chiffres traduisent une augmentation très nette de la différenciation.

Il faut cependant noter une différence entre les courbes de différenciation Témoin des deux expériences. Cette différence pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité cellulaire des sangs de cordon.

4-2 Effet dose de l'IL-2

Ces premières observations nous ont conduit à réaliser une deuxième série d'expériences visant à déterminer s'il y avait un effet dose de l'IL-2 sur l'inhibition et la stimulation de la différenciation des cellules souches en éosinophiles.

A- Effet dose sur l'inhibition de la différenciation:

Les résultats d'une expérience représentative sont illustrés par la Figure 27. Les cellules de sang de cordon (Condition A) ont été cultivées toujours en présence des trois cytokines éosinophilogènes et en présence de concentrations croissantes d'IL-2 pendant toute la durée de la culture. Dans la condition Témoin ou en présence de 10 U/ml d'IL-2, le nombre de cellules EPO positives augmente rapidement à partir de J6 pour atteindre une valeur proche de 50% à J24. A l'opposé, si le nombre de précurseurs éosinophiles est voisin de celui de la condition Témoin à J12, dans le cas où les cellules sont cultivées en présence de 50 U/ml d'IL-2, il n'augmente que très légèrement par la suite pour atteindre la

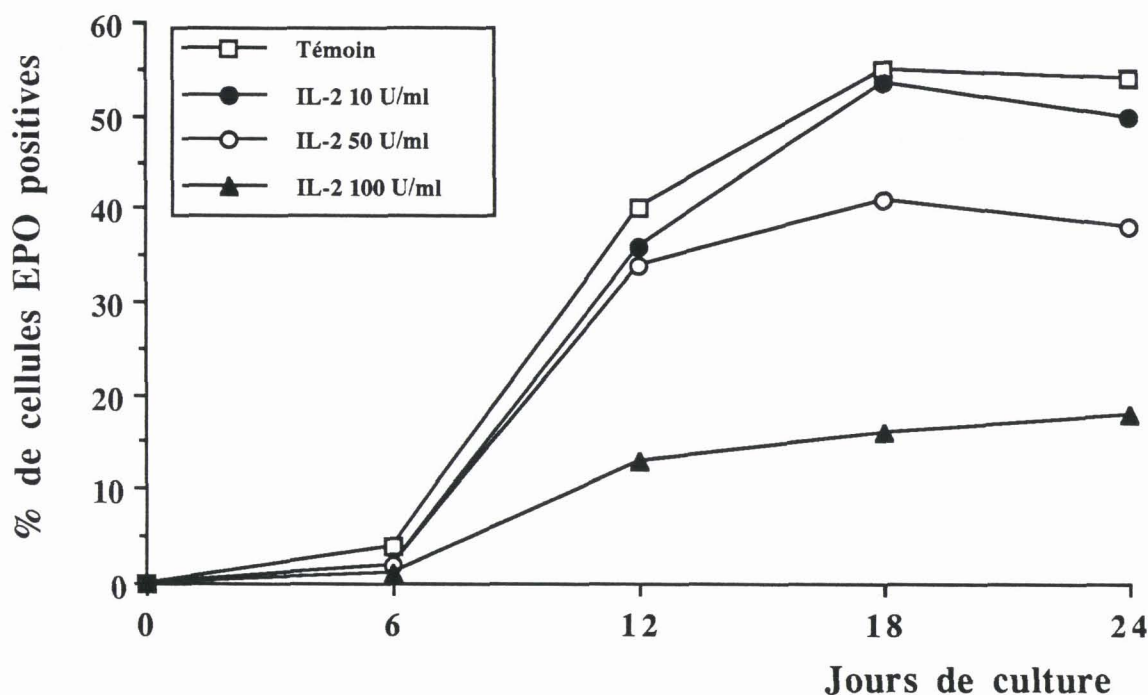


Figure 27: Différenciation des cellules du sang de cordon (Condition A), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'IL-2 pendant toute la durée de la culture.

Conditions	Jours	L	M	B	Pr	My	Mé	Seg
Témoin	J0	51	46	3	0	0	0	0
Témoin	J6	27	44	25	3	1	0	0
IL-2 10 U/ml	J6	33	36	29	2	0	0	0
IL-2 50 U/ml	J6	39	29	30	1	1	0	0
IL-2 100 U/ml	J6	45	22	32	1	0	0	0
Témoin	J12	12	19	29	6	15	12	7
IL-2 10 U/ml	J12	17	16	31	7	15	11	3
IL-2 50 U/ml	J12	18	15	33	8	19	7	0
IL-2 100 U/ml	J12	27	2	58	5	4	4	0
Témoin	J18	5	23	17	9	15	21	10
IL-2 10 U/ml	J18	5	18	22	5	17	20	13
IL-2 50 U/ml	J18	14	18	27	4	7	27	3
IL-2 100 U/ml	J18	20	1	63	2	6	8	0
Témoin	J24	2	35	9	2	12	22	18
IL-2 10 U/ml	J24	3	43	4	1	8	21	20
IL-2 50 U/ml	J24	9	29	24	2	5	21	10
IL-2 100 U/ml	J24	12	0	70	1	4	7	6

Tableau 5: Formule cellulaire du sang de cordon (Condition A), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'IL-2 pendant toute la durée de la culture.

L: Cellules d'origine Lymphocytaire, M: cellules d'origine Monocytaire, B: cellules Blastiques, Pr: Promyélocytes éosinophiles, My: Myélocytes éosinophiles, Mé: Métamyélocytes éosinophiles, Seg: éosinophiles Segmentés.

valeur de 38% à J24. Pour la condition IL-2 100 U/ml, cette inhibition est plus importante et peut s'observer dès J12, à J24 le nombre de cellules EPO positives est de 18%.

La formule cellulaire de ces quatre conditions pour chaque temps est représentée sur le tableau 5. Les différents stades des précurseurs éosinophiles sont identifiés ainsi que les cellules blastiques, les cellules lymphocytaires et les cellules dérivées des précurseurs monocyte/macrophage. Les cellules blastiques apparaissent dès le début de la culture. En effet de 3% à J0, les blastes représentent 25% de la population à J6 en absence d'IL-2. La stimulation par l'IL-2 à 100 U/ml entraîne une formation plus importante de blastes dès J6, mais alors que ce nombre diminue au cours de la culture pour la condition Témoin, il ne cesse d'augmenter en présence d'IL-2 pour représenter 70% de la population à J24. Le nombre de blastes en présence de 10 U/ml ou de 50 U/ml d'IL-2 est plus variable mais il cependant généralement plus élevé que celui de la condition Témoin.

B- Effet dose sur la stimulation de la différenciation:

Parallèlement, nous avons voulu savoir quels étaient les effets de différentes concentrations l'IL-2, ajoutée seulement pendant les six premiers jours, sur la différenciation cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé l'expérience précédente en divisant par deux les cultures en présence d'IL-2 afin de poursuivre la culture en absence d'IL-2 (Condition B), la condition Témoin n'a pas été modifiée (Figure 28). La différenciation cellulaire est affectée pour une incubation courte d'IL-2 et dépend de la concentration de cytokine. Le nombre de cellules positives en coloration spécifique de l'EPO est à peu près identique en

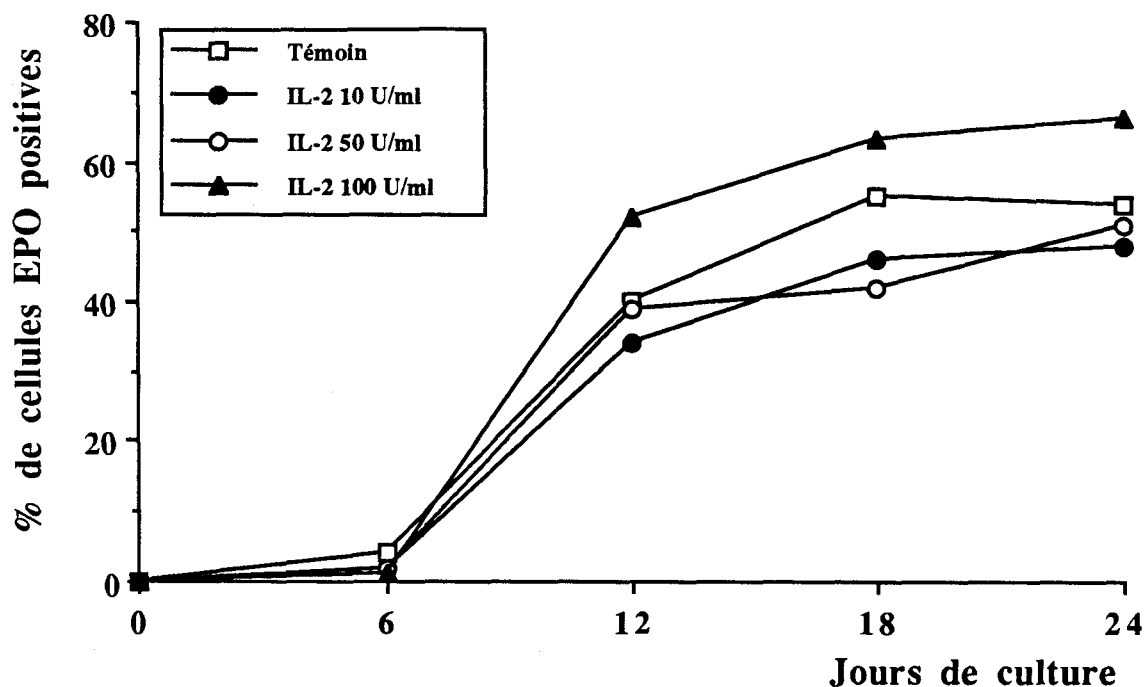


Figure 28: Différenciation des cellules du sang de cordon (Condition B), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'IL-2, **seulement pendant les six premiers jours**.

Conditions	Jours	L	M	B	Pr	My	Mé	Seg
Témoin	J0	51	46	3	0	0	0	0
Témoin	J6	27	44	25	3	1	0	0
IL-2 10 U/ml	J6	33	36	29	2	0	0	0
IL-2 50 U/ml	J6	39	29	30	1	1	0	0
IL-2 100 U/ml	J6	45	22	32	1	0	0	0
Témoin	J12	12	19	29	6	15	12	7
IL-2 10 U/ml	J12	9	12	45	8	18	7	1
IL-2 50 U/ml	J12	10	9	42	10	18	9	2
IL-2 100 U/ml	J12	30	0	18	14	17	18	3
Témoin	J18	5	23	17	9	15	21	10
IL-2 10 U/ml	J18	0	28	26	6	14	20	6
IL-2 50 U/ml	J18	5	30	23	4	17	12	9
IL-2 100 U/ml	J18	2	6	29	4	18	28	13
Témoin	J24	2	35	9	2	12	22	18
IL-2 10 U/ml	J24	1	39	12	3	13	17	15
IL-2 50 U/ml	J24	2	30	17	3	7	22	19
IL-2 100 U/ml	J24	0	16	18	4	16	25	21

Tableau 6: Formule cellulaire du sang de cordon (Condition B), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'IL-2 **seulement pendant les six premiers jours**.

L: Cellules d'origine Lymphocytaire, M: cellules d'origine Monocytaire, B: cellules Blastiques, Pr: Promyélocytes éosinophiles, My: Myélocytes éosinophiles, Mé: Métamyélocytes éosinophiles, Seg: éosinophiles Segmentés.

présence de 10 U/ml ou de 50 U/ml d'IL-2, par rapport à la condition Témoin, ils est cependant plus faible à J18. A l'inverse, en présence d'IL-2 à 100 U/ml pendant les six premiers jours, le nombre de précurseurs éosinophiles dépasse celui de la condition Témoin à J12 et reste supérieur à J18 et J24. L'étude cytologique présentée dans le tableau 6 montre que le nombre de cellules blastiques est en général plus élevé dans le cas des cellules cultivées pendant 6 jours avec IL-2 que dans la condition Témoin mais le facteur d'augmentation ne dépasse pas 2, quelque soit la concentration de cytokine.

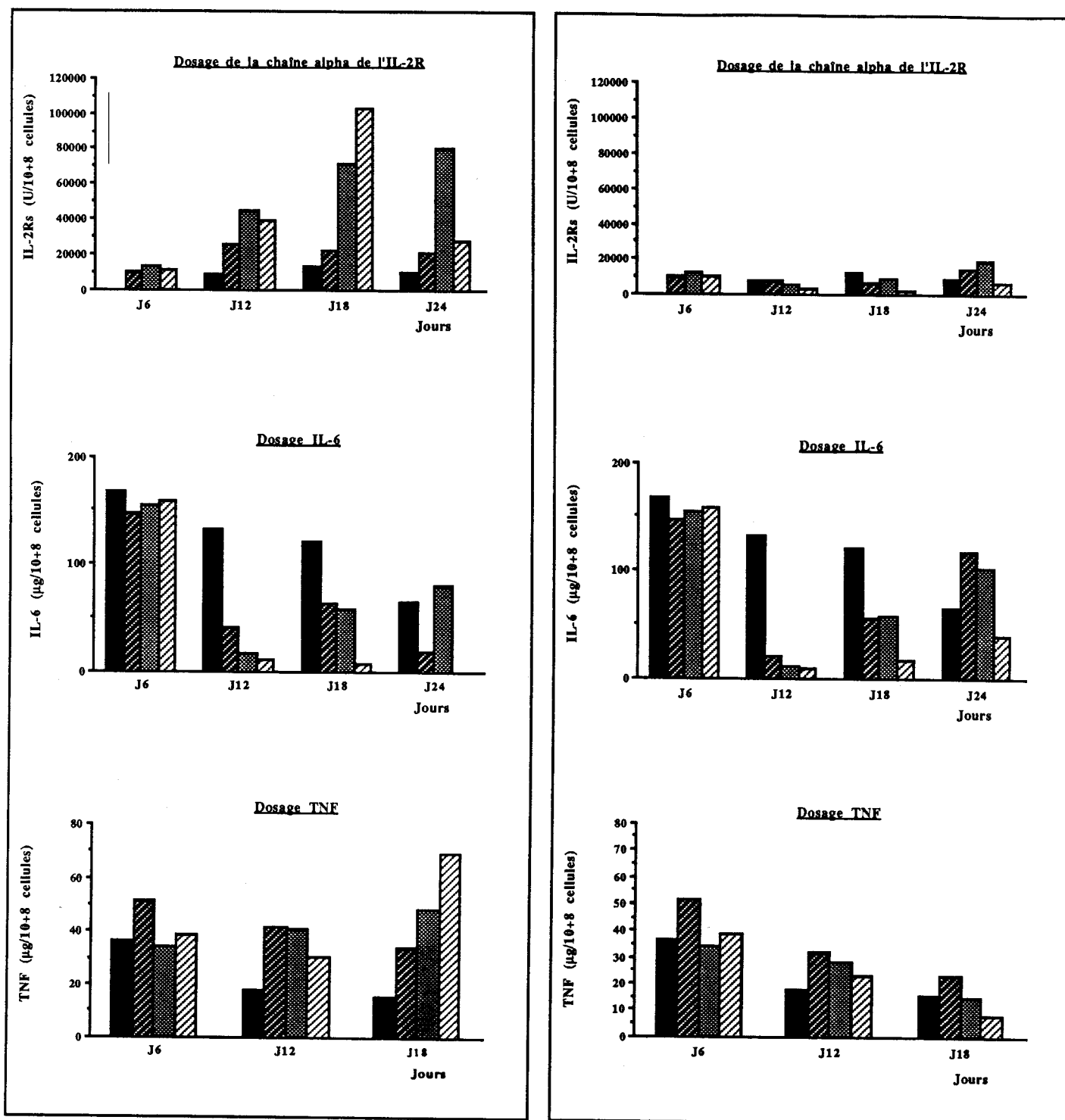
4-3 Dosages de médiateurs dans les surnageants de culture

Dans ces deux dernières expériences nous avons doser l'IL-2R α soluble ainsi que trois cytokines intervenant dans les étapes précoces de l'hématopoïèse, à savoir l'IL-6, le TNF α et l'IL-1. Les résultats de ces dosages sont présentés dans la figure 29. L'interleukine 1 n'a été détectée dans aucun des surnageants (Résultats non présentés).

Les taux d'IL-2R α soluble dans les surnageants augmentent en fonction du temps et de façon dose dépendante quand les cellules sont stimulées par l'IL-2 pendant toute la culture. Par contre ces taux restent stables quand l'IL-2 est ajoutée seulement pendant la première semaine.

A l'opposé, la stimulation continue des cellules par l'IL-2 provoque une forte diminution de la libération d'IL-6 dans les surnageants. La stimulation courte entraîne le même phénomène mais il semble s'inverser à J24.

L'effet de l'IL-2, ajoutée de J0 à J24, est inducteur sur la libération de TNF α par les cellules de sang de cordon. Cet effet est atténué quand l'IL-2 n'est ajouté que pendant les six premiers jours.

**Condition A:****Condition B:**

■ Témoin ▨ IL-2 10 U/ml ▩ IL-2 50 U/ml ▤ IL-2 100 U/ml

Figure 29: Dosage de la chaîne alpha de l'IL-2R, de l'IL-6 et du TNF dans les surnageants des cellules du sang de cordon A et B cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de concentrations croissantes d'IL-2.

Condition A: l'IL-2 est ajoutée pendant toute la durée de la culture.

Condition B: l'IL-2 est ajoutée seulement pendant les six premiers jours.

4-4 Action séquentielle de l'interleukine 2

Les modifications importantes de la différenciation cellulaire provoquées par l'IL-2 en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 nous ont conduit à réaliser une quatrième série d'expériences (Condition C). Nous avons voulu évaluer l'effet de l'addition d'IL-2 à différents moments de la culture. Cette expérience a consisté à ajouter l'IL-2 (100 U/ml) dans le milieu de culture par période de six à sept jours, c'est à dire de J0 à J6, de J6 à J13 et de J13 à J20.

Analyse cellulaire

La différenciation (Figure 30) est peu affectée quand l'IL-2 est ajoutée entre J6 et J13 ou entre J13 et J20. La différenciation est par contre augmentée quand les cellules sont cultivées pendant les 6 premiers jours en présence d'IL-2, comme dans l'expérience précédente (Condition B). En effet, le taux de cellules positives pour l'EPO passe de 10% à J6 à 85% à J13 en présence d'IL-2 alors que ce taux passe de 20% à J6 à 54% à J13 dans la condition Témoin. Cette différence est encore nettement observée à J20. L'étude cytologique correspondant aux différentes conditions présentée dans le tableau 7 montre que le pourcentage de blastes à J6 est fortement augmenté en présence d'IL-2 (75%) par rapport à la condition Témoin (20%).

Analyse phénotypique

Afin de comprendre les événements cellulaires et moléculaires apparaissant au cours de la culture nous avons réalisé des expériences de cytométrie de flux et des analyses de l'ARN messager de ces différentes conditions.

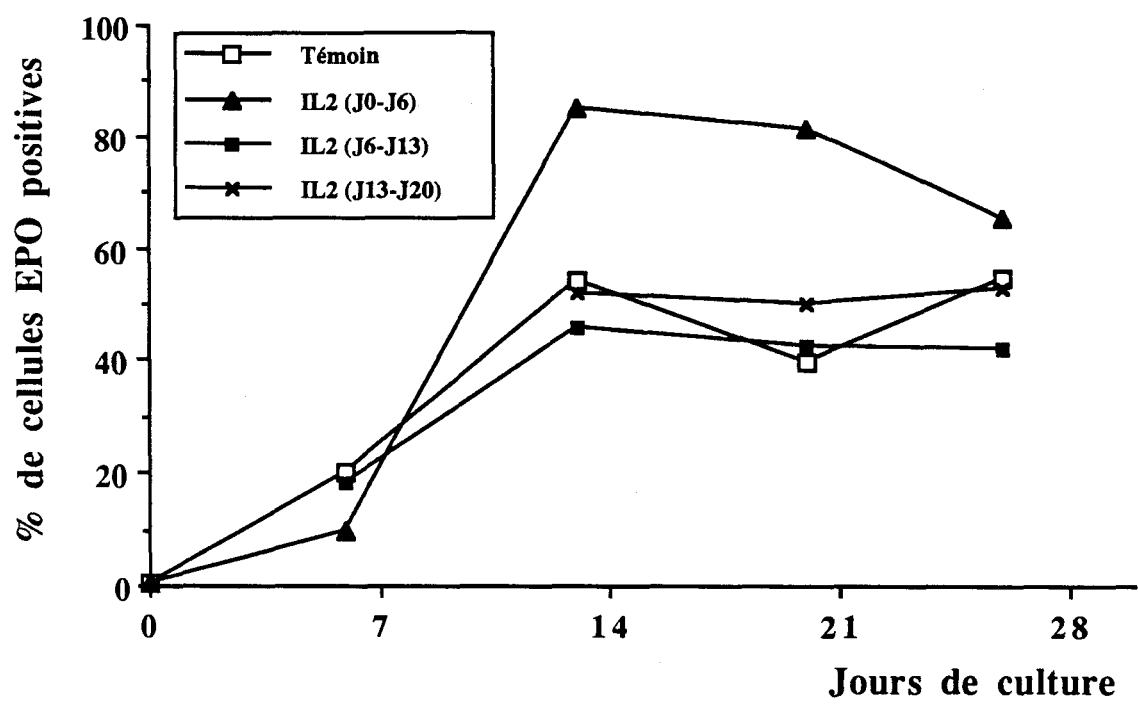


Figure 30: Différenciation des cellules du sang de cordon (Condition C), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de 100 U/ml d'IL-2 à différents temps; de J0 à J6: IL-2 (J0-J6); de J6 à J13: IL-2 (J0-J13) et de J13 à J20: IL-2 (J13-J20).

Conditions	Jours	L	M	B	Pr	My	Mé	Seg
Témoin	J0	55	36	3	0	0	0	1
Témoin	J6	16	47	20	13	3	0	0
IL-2 (J0-J6)	J6	8	6	75	8	3	0	0
Témoin	J13	2	42	10	6	8	22	10
IL-2 (J0-J6)	J13	2	5	15	10	22	28	18
IL-2 (J6-J13)	J13	3	54	5	2	6	10	20
Témoin	J20	0	50	13	3	6	8	20
IL-2 (J0-J6)	J20	0	6	13	4	6	31	40
IL-2 (J6-J13)	J20	2	55	7	0	2	9	25
IL-2 (J13-J20)	J20	0	52	7	2	5	7	27
Témoin	J26	0	55	4	2	6	10	23
IL-2 (J0-J6)	J26	0	36	5	1	4	18	36
IL-2 (J6-J13)	J26	0	60	2	0	1	7	30
IL-2 (J13-J20)	J26	0	51	3	3	9	9	25

Tableau 7: Formule cellulaire du sang de cordon (Condition C), en fonction du temps. Les cellules sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoin) ou en présence de 100 U/ml d'IL-2 à différents temps; de J0 à J6: IL-2 (J0-J6), de J6 à J13: IL-2 (J0-J13) et de J13 à J20: IL-2 (J13-J20).

L: Cellules d'origine Lymphocytaire, M: cellules d'origine Monocytaire, B: cellules Blastiques, Pr: Promyélocytes éosinophiles, My: Myélocytes éosinophiles, Mé: Métamyélocytes éosinophiles, Seg: éosinophiles Segmentés

L'analyse en cytométrie a été réalisée, sur la population cellulaire entière, en utilisant plusieurs types d'anticorps: deux anticorps reconnaissant les deux chaînes de l'IL-2R, et deux anticorps dirigés contre les antigènes membranaires des cellules hématopoïétiques jeunes, à savoir les molécules CD34 et le CD33 (Tableau 8).

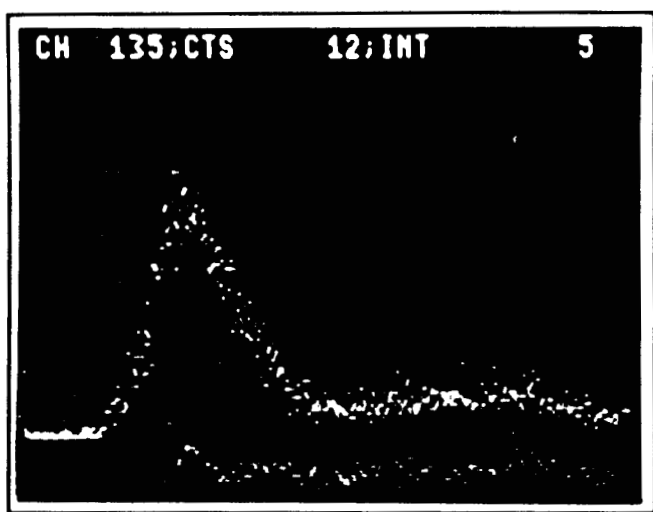
Tout au long de la culture l'antigène membranaire CD34 est très faiblement exprimé quelque soit la condition. Le phénotypage CD33 n'a pu être réalisé qu'à J20 et à J26. Cette molécule est exprimée sur les progéniteurs myéloïdes et sur les précurseurs granulocyte/macrophage. Son expression est d'autant plus faible que les cellules se différencient. A ces deux temps la molécule CD33 est exprimée sur près de 50% des cellules. Cependant à J26, les cellules cultivées de J0 à J6 avec l'IL-2 ont une expression plus faible de l'antigène CD33.

En ce qui concerne les deux chaînes de l'IL-2R, la p75 n'est détectable qu'à J0 et après stimulation par l'IL-2 à J6, alors que la p55 est présente sur les cellules à tous les temps et dans toutes les conditions. Les résultats, présentés dans la figure 31, illustrent l'expression de la p55 sur les cellules des conditions Témoin et IL-2 (J0-J6). On note que le nombre de cellules exprimant la p55 et l'intensité de fluorescence, c'est à dire le nombre de molécules d'IL-2R α par cellule, sont plus faibles dans la condition IL-2.

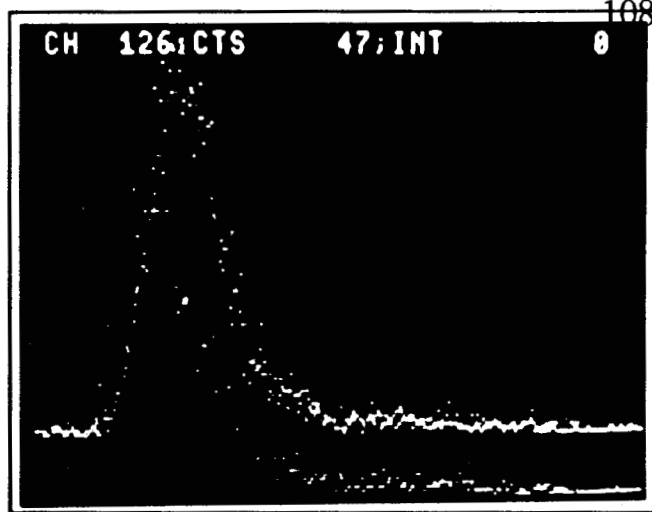
L'analyse phénotypique avec les anticorps anti- CD3, CD19 et CD14, reconnaissant respectivement les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes, indique que les deux premiers types cellulaires sont très faiblement représentés dans la culture. Les cellules CD14+ apparaissent, par contre, en fin de culture (Résultats non présentés).

Conditions	Jours	CD34	CD33	P55	P75
Témoin	J0	3	ND	11,5	7
Témoin IL-2 (J0-J6)	J6	1	ND	32	0
	J6	5,5	ND	6	13
Témoin IL-2 (J0-J6) IL-2 (J6-J13)	J13	1	ND	47	0
	J13	1	ND	27	0
	J13	2	ND	37	0
Témoin IL-2 (J0-J6) IL-2 (J6-J13) IL-2 (J13-J20)	J20	0	52	46	0
	J20	0	45	22	0
	J20	3	47	52	0
	J20	0	55	45	0
Témoin IL-2 (J0-J6) IL-2 (J6-J13) IL-2 (J13-J20)	J26	0	50	53	0
	J26	5,5	37	52	0
	J26	1	55	ND	0
	J26	2,5	55	52	3

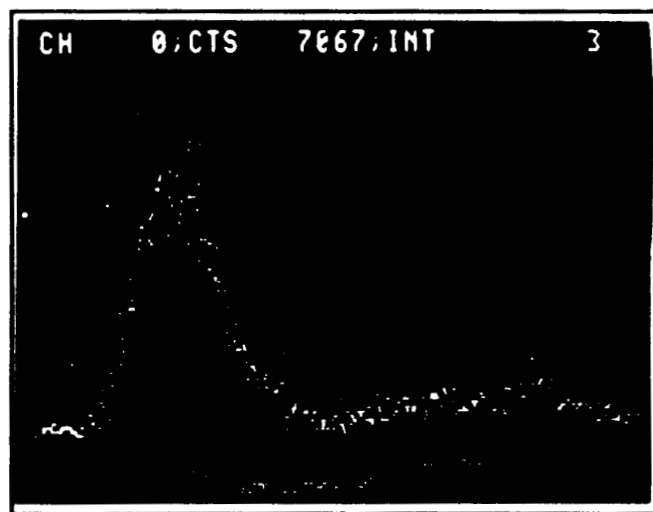
Tableau 8: Phénotypage des cellules du sang de cordon C cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et en absence (Témoin) ou en présence de 100 U/ml d'IL-2 à différents temps, de J0 à J6: IL-2 (J0-J6), de J6 à J13: IL-2 (J0-J13) et de J13 à J20: IL-2 (J13-J20). Les résultats sont exprimés après déduction de la valeur obtenue avec l'anticorps non relevant, de même isotype.



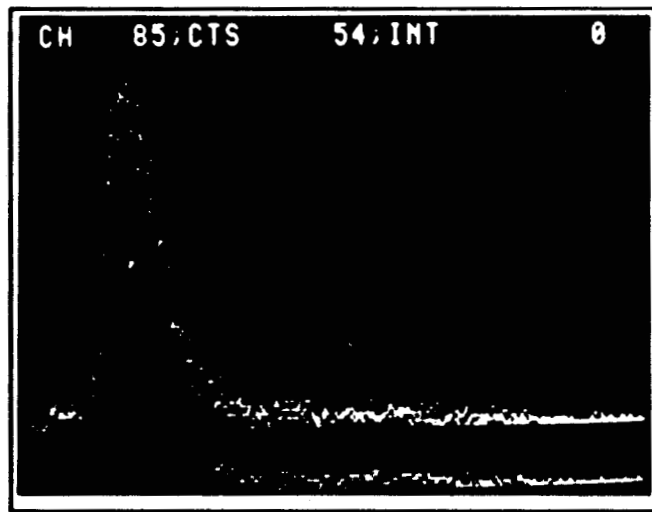
A



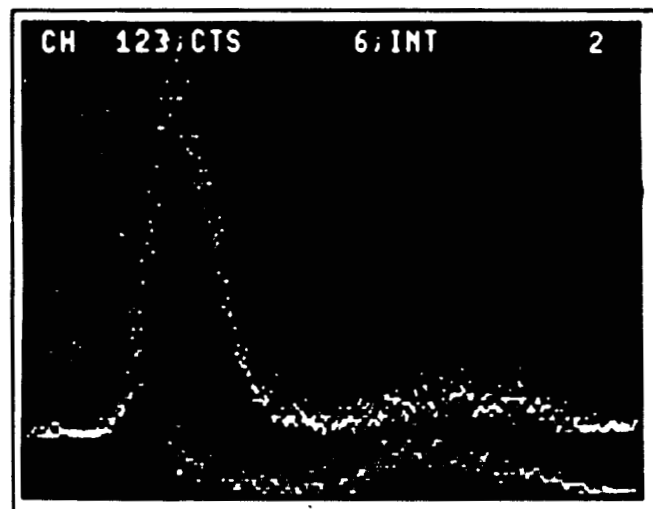
B



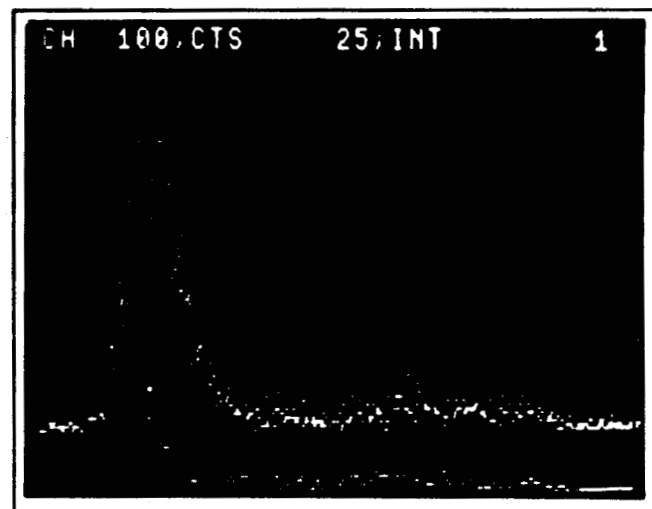
C



D



E



F

Figure 31: Profil d'expression de la chaîne alpha de l'IL-2R sur les cellules du sang de cordon (Condition C), cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et en absence (Témoin: A, C et E) ou **en présence de 100 U/ml d'IL-2 pendant les six premiers jours (IL-2 J0-J6: B, D, F)**. Les histogrammes représentent les résultats obtenus à J13 (A et B), à J20 (C et D) et à J26 (E et F). Les courbes du haut représentent les résultats obtenus avec l'anticorps dirigé contre la p55 de l'IL-2R et les courbes du bas, les résultats obtenus avec l'anticorps contrôle.

Analyse transcriptionnelle

L'ARN total des cellules de chaque condition a été isolé pour subir une hybridation avec différentes sondes nucléotidiques (Figure 32). Nous avons utilisé les sondes correspondant aux deux chaînes de l'IL-2R ainsi que celles correspondant au TNF α et à la peroxydase de l'éosinophile. L'hybridation avec la sonde actine permet d'apprécier de façon quantitative et qualitative l'ARN déposé dans le gel d'agarose. En ce qui concerne l'IL-2R, l'ARN messenger codant pour la p75 est très faiblement détectable à J6 pour les cellules cultivées en présence d'IL-2 alors que celui de la chaîne alpha est présent tout au long de la culture (excepté à J0) quelque soit la condition. Enfin, le TNF α est également détecté au niveau transcriptionnel dans tous les cas mais semble plus exprimé au début de la culture, notamment en présence d'IL-2. Dans cette expérience, nous avons aussi utilisé les sondes d'ADN complémentaires codant pour l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5. Dans aucun des cas nous n'avons obtenu de signal positif (Résultats non présentés).

En absence d'IL-2, l'ARN messenger codant pour la peroxydase de l'éosinophile apparaît à J6, atteint son maximum à J20 et disparaît complètement à J26. En présence d'IL-2 pendant les six premiers jours, la quantité maximale de messenger est détectée à J13 puis décline progressivement jusqu'à J26. L'IL-2 ajoutée, entre J6 et J13 ou, entre J13 et J20, ne modifie la quantité d'ARNm de l'EPO qu'à J26 par rapport à la condition Témoin, cette observation est plus nette pour la condition J13-J20.

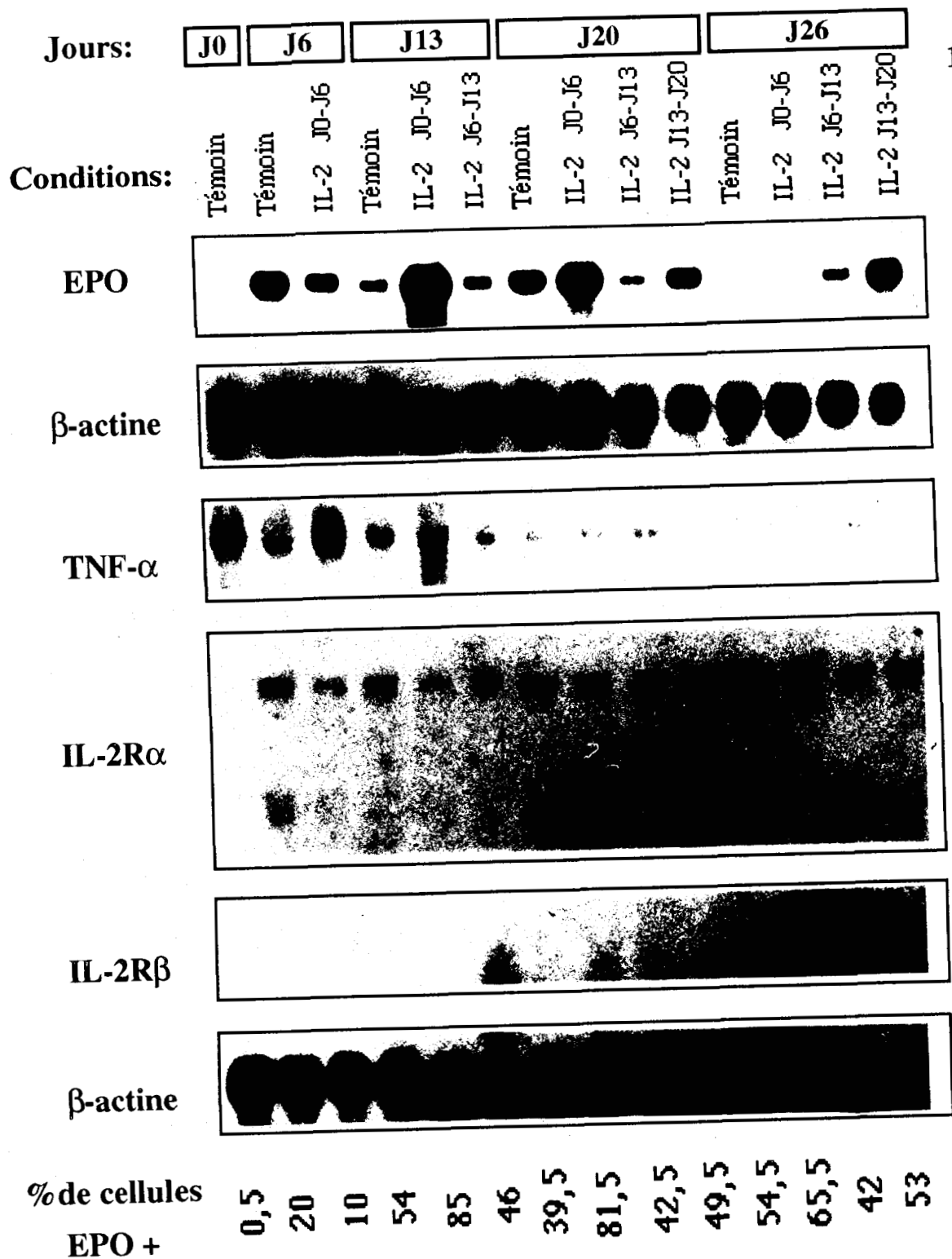


Figure 32: Expression de l'ARN messager de l'EPO, du TNF α , de l'IL-2R α et de l'IL-2R β . Les cellules du sang du cordon (Condition B), sont cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 et, en absence (Témoïn) ou en présence de 100 U/ml d'IL-2 à différents temps; de J0 à J6: IL-2 (J0-J6), de J6 à J13: IL-2 (J0-J13) et de J13 à J20: IL-2 (J13-J20). Les signaux obtenus avec les sondes nucléotidiques EPO, TNF α , IL-2R α , IL-2R β et actine correspondent aux tailles décrites dans la littérature

DISCUSSION

Parmi les diverses pathologies où l'éosinopoïèse est dérégulée de façon significative, les syndromes hyperéosinophiliques présentent des aspects cliniques et biologiques particulièrement intéressants pour la compréhension de la physiopathologie et l'étude de la genèse de l'éosinophile. En effet, la diversité des formes cliniques au sein même de ce syndrome est grande. Elle est fonction de l'état évolutif de la maladie, du taux d'éosinophiles circulants, des lésions associées mais aussi du développement d'autres types de pathologies (lymphomes ou leucémies) avant, pendant ou après l'hyperéosinophilie. La nature des mécanismes mis en jeu, ainsi que la cinétique des événements cellulaires responsables de l'éosinophilie demeurent inconnus.

Les diverses approches thérapeutiques utilisées à l'heure actuelle reposent plus sur des données empiriques que sur des bases cellulaires et moléculaires bien établies. Il n'existe effectivement pas actuellement de marqueur d'évolution de cette pathologie, d'où la difficulté d'orienter un choix thérapeutique approprié.

Si les recherches effectuées depuis plusieurs années se sont principalement axées sur la connaissance des propriétés toxiques et des mécanismes d'activation de l'éosinophile, peu d'équipes se sont attachées à déterminer la ou les causes de l'éosinophilie dans le cas des syndromes hyperéosinophiliques.

Lors de ce travail nous avons tenté de préciser certains mécanismes cellulaires et moléculaires permettant de suivre l'évolution de la pathologie du syndrome hyperéosinophilique, d'identifier une entité particulière de ce syndrome et enfin d'apporter notre contribution à la compréhension de la différenciation des cellules hématopoïétiques en éosinophiles. Plusieurs approches ont été abordées. La première a consisté à définir le rôle des lymphocytes T dans l'HES

par la mise en évidence de marqueurs d'activation et par la détection des cytokines produites. Par une seconde approche, nous avons tenté de démontrer qu'une origine rétrovirale pouvait être impliquée dans les cas d'HES associés à un lymphome T. Enfin, la troisième approche, utilisant un modèle de différenciation cellulaire *in vitro*, a permis de définir le rôle de l'interleukine 2 dans l'éosinopoïèse, après avoir caractérisé son récepteur à la surface de l'éosinophile mûre.

I- Activation lymphocytaire dans l'HES

Le rôle crucial des lymphocytes T dans le développement de l'éosinophilie fut clairement établi en 1970⁽³¹⁾. Le développement d'une éosinophilie chez le rat, induite par un parasite nématode (*Trichinella spiralis*) est considérablement réduite par thymectomie néonatale ou par injection d'un sérum de lapin, anti-lymphocytes de rat. De plus, des animaux irradiés, exposés au challenge parasitaire ne développaient une éosinophilie qu'après reconstitution avec des lymphocytes issus d'animaux sains ou parasités. Enfin, les lymphocytes de rats sensibilisés étaient capables d'induire une éosinophilie chez des rats normaux par diffusion de médiateurs solubles. A l'heure actuelle, le nombre de cytokines produites par les lymphocytes T après stimulation mitogénique est élevé, et la liste actuelle n'est certainement pas close. La caractérisation de l'IL-3⁽³⁰⁶⁾, du GM-CSF⁽¹⁶⁹⁾ et notamment de l'IL-5⁽³⁰⁷⁾, spécifique de la lignée éosinophile, a fait avancer d'un grand pas la recherche sur la compréhension des mécanismes régulant l'éosinopoïèse. Ainsi, s'il est admis que ces trois cytokines sont capables d'induire une différenciation des cellules hématopoïétiques en éosinophiles⁽⁶⁴⁾, les événements cellulaires et moléculaires qui sous-tendent cette différenciation sont multifactoriels et complexes. Du fait de sa spécificité, l'IL-5 semble jouer un rôle primordial dans le développement d'une éosinophilie. Elle a en effet, été détectée, soit sous forme soluble dans le sérum, soit au niveau de l'ARN messager, dans de nombreuses pathologies telles que les infections parasitaires^(308,309), les maladies allergiques⁽³¹⁰⁾, les éosinophilies induites au cours de l'immunothérapie par l'IL-2^(187,311) et mêmes dans les syndromes hyperéosinophiliques^(312,313). L'IL-5 apparaît en fait nécessaire à la genèse d'une éosinophilie mais n'est

vraisemblablement pas suffisante. Il est raisonnable de penser que l'IL-5 fait parti d'un réseau complexe de stimulation et/ou d'inhibition multifactorielle, comprenant notamment l'IL-3 et le GM-CSF. D'autres médiateurs non encore identifiés pourraient également agir en synergie avec l'IL-5.

Le rôle crucial des lymphocytes T dans l'induction de l'éosinophilie sanguine, nous a conduit à évaluer l'activation cellulaire T chez les patients ayant un HES au début ou durant l'évolution de la maladie. Des travaux antérieurs avaient montré que la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2 était retrouvée sous forme soluble (sIL-2R α) dans le surnageant de lymphocytes stimulés ou de certaines lignées cellulaires⁽²⁵⁷⁾. La détection d'IL-2R α soluble, dans le sérum de patients au cours d'un grand nombre de maladies humaines indique clairement que le taux sérique d'IL-2R α est un bon marqueur, quantitatif et sensible de l'activation des cellules mononucléées⁽²⁶³⁾.

Nos avons dosé cette protéine dans le sérum des patients ayant différentes formes d'HES mais aussi dans le sérum des patients ayant une éosinophilie d'origine variée (parasitose, maladie allergique ou autre). Les résultats obtenus montrent que les taux d'IL-2R α soluble sont variables et dépendent de la situation pathologique. Les taux sont peu élevés dans le cas des parasitoses ou des maladies allergiques et ne sont pas significativement différents des taux observés chez les témoins, à l'opposé des valeurs d'IL-2R α soluble chez les patients présentant un HES. Cependant, ces taux varient suivant l'évolution de la maladie; ils sont plus faibles dans le cas des HES sans complications cliniques et plus élevés pour les HES malins. Les patients ayant une éosinophilie associée à un lymphome T bien

caractérisé présentent les taux les plus élevés.

Nous avons en parallèle déterminé le nombre absolu d'éosinophiles hypodenses circulants dans chaque catégorie. Les éosinophiles hypodenses se distinguent des éosinophiles normodenses par une densité plus faible mais aussi par des propriétés biochimiques et fonctionnelles qui les font apparaître comme étant les cellules activées^(24,26-28). Cette activation se concrétise par une sensibilité accrue aux activateurs potentiels de l'éosinophile qui conduit le plus souvent, à une libération non appropriée ou exagérée de nombreux médiateurs toxiques altérant ainsi l'environnement tissulaire.

Le nombre d'éosinophiles hypodenses est plus élevé dans tous les cas d'HES que dans les maladies allergiques ou parasitaires. Il y a cependant une variation importante au sein des groupes d'HES. Le nombre absolu d'éosinophiles hypodenses traduit en quelque sorte, la sévérité de l'éosinophilie et un risque sérieux de complications viscérales plus ou moins graves⁽²⁵⁾.

Il est intéressant de noter que l'évolution de ce paramètre cellulaire, au travers des différentes situations pathologiques, suit l'évolution du taux d'IL-2R α soluble. Il semble y avoir une étroite relation entre l'activation des éosinophiles et la présence de récepteurs solubles pour l'IL-2. Dans le cas des éosinophilies associées à un lymphome T, où le nombre d'éosinophiles hypodenses sanguins est le plus élevé, une corrélation statistiquement interprétable a pu être mise en évidence. Cette corrélation est également retrouvée si toute la population d'éosinophiles circulants est prise en compte.

Ces résultats sont particulièrement intéressants pour le suivi de l'évolution de la pathologie. En effet, chez six patients présentant un HES malin associé ou

non à un lymphome T, et résistants à la chimiothérapie conventionnelle, une thérapie à base d'interféron alpha a été employée. Ce traitement a conduit à une réponse clinique favorable dans tous les cas, accompagnée d'une chute à la fois des taux d'IL-2R α soluble et d'une diminution significative de l'éosinophilie sanguine. L'effet clinique de l'interféron alpha a été montré dans d'autres travaux sur des cas isolés de syndromes hyperéosinophiliques^(314,315). Bien que les mécanismes d'action de l'IFN α ne soient pas encore identifiés, il pourrait agir directement au niveau médullaire, en inhibant la formation des stades cellulaires CFU-GEMM et CFU-GM⁽³¹⁶⁾. Dans les leucémies à tricoleucocytes, l'interféron alpha conduit également à une amélioration clinique et à une diminution du taux d'IL-2R α soluble⁽²⁶²⁾. Enfin, les taux d'IL-2R alpha semblent également être en relation avec la situation pathologique dans d'autres pathologies comme les leucémies myéloïdes chroniques⁽³¹⁷⁾ ou les leucémies T aiguës de l'adulte (ATL) induites par le virus HTLV-I^(260,261).

Le dosage du récepteur soluble pour l'IL-2 dans les syndromes hyperéosinophiliques semble être une méthode reproductible, sensible et ayant de plus, une valeur pronostique. A cet égard, les valeurs d'IL-2R α peuvent être très informatives dans le cas des HES associés à des marqueurs myéloprolifératifs qui peuvent précéder, parfois de plusieurs années, l'apparition d'un lymphome ou d'une leucémie⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. L'absence de marqueurs cellulaires ou sanguins caractéristiques, en dehors de l'éosinophilie, ne permet pas toujours de faire le diagnostic du lymphome, celui n'étant découvert qu'à l'autopsie⁽¹⁶⁾. Le dosage d'IL-2R α soluble pourrait donc permettre d'orienter le diagnostic.

La reproductibilité des dosages du à l'extrême fiabilité des réactifs

commercialisés, mais aussi à l'utilisation de contrôles internes, permettent une bonne comparaison de nos mesures de taux de récepteurs solubles pour l'interleukine 2 avec celles réalisées ces dernières années dans d'autres pathologies. Les taux d'IL-2R α soluble les plus élevés (11000 à 99000 U/ml) sont rencontrés dans le sérum des patients souffrant d'une leucémie T aiguë de l'adulte (ATL)⁽²⁶⁰⁾. Des taux comparables sont rencontrés dans les leucémies à tricoleucocytes (1700 à 81000 U/ml)⁽²⁶²⁾ et dans les leucémies myéloïdes chroniques (2580 à 172000 U/ml)⁽³¹⁷⁾. Les dosages obtenus dans nos expériences chez les patients ayant un lymphome T isolé sont de même ordre que ceux décrits dans la littérature (3569 U/ml en moyenne)⁽³¹⁸⁾. La comparaison de ces données avec celles obtenues chez les patients ayant une éosinophilie permettent donc de mettre en évidence le caractère particulièrement élevé des valeurs obtenues dans le cas des HES malins et des éosinophilies associées à un lymphome T.

Ces valeurs très élevées d'IL-2R α suggèrent l'existence d'une "dérégulation" importante de l'expression de la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2. Les mécanismes qui conduisent à la libération de la forme soluble de cette chaîne semblent faire appel à un clivage protéolytique de la forme membranaire plutôt qu'à une sécrétion directe de forme soluble. L'analyse du gène de l'IL-2R α n'a en effet pas permis la mise en évidence d'une régulation particulière de la transcription aboutissant à la synthèse d'une protéine sans domaine transmembranaire⁽¹⁹⁶⁾, comme il a été démontré pour les récepteurs de l'IL-4^(319,320), de l'IL-7⁽³²¹⁾ et de l'IL-5⁽¹⁰¹⁾. Les mécanismes qui régissent le clivage de l'IL-2R α ne sont pas pour le moment identifiés. Seule une étude réalisée dans le modèle murin, montre que l'IL-5 est capable d'induire la

libération d'IL-2R α soluble à partir des formes membranaires, sur des lymphocytes B activés⁽³²²⁾. La présence d'IL-5, récemment mise en évidence dans les sérums de patients atteints d'HES^(312,313) pourrait être reliée aux taux d'IL-2R α soluble. Il serait intéressant de comparer ces deux paramètres chez les mêmes patients.

La source de récepteurs solubles pour l'IL-2 reste néanmoins à définir dans les syndromes hyperéosinophiliques. L'analyse en cytométrie de flux des lymphocytes de patients montre que l'expression membranaire de l'IL-2R est le plus souvent faible. De plus, l'analyse au niveau transcriptionnel révèle aussi une faible expression de l'ARN messenger de l'IL-2R α . Néanmoins, la stimulation des cellules mononucléées des patients, par l'IL-2, entraîne une augmentation à la fois du taux d'ARNm de l'IL-2R α et de la libération de la protéine soluble dans le surnageant de culture. Ces expériences montrent que les cellules de patients ont la capacité de produire de l'IL-2R α . Mais il ne semble pas qu'elles participent de façon importante à la génération d'IL-2R α soluble, puisqu'en dehors d'une stimulation, elles n'expriment pas ou peu ce récepteur. Ces données ne correspondent pas non plus aux dosages de récepteurs solubles dans les sérums.

On se sait pas encore si la présence d'IL-2R α soluble dans les sérums de patients joue un rôle particulier où si ce n'est que le témoin d'une activation cellulaire. De plus, aucune évidence n'existe à l'heure actuelle de la présence de formes solubles de la chaîne bêta dans les sérums de patients. Elle a cependant été détectée dans des surnageants de certaines lignées cellulaires^(206,264) mais aucun travail n'a rapporté son existence *in vivo*. Chaque forme soluble du récepteur

garde sa capacité de fixer l'IL-2 et il a même été démontré que l'IL-2R α soluble présente dans le sérum de patients atteint d'un lymphome T cutané était capable d'inhiber la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK (Natural Killer) induites par l'IL-2⁽³²³⁾. Le rôle de l'IL-2R α chez les patients ayant un HES reste néanmoins à définir.

Même si les cellules mononucléées circulantes ne semblent pas constituer la source principale d'IL-2R α soluble dans le sérum, elles peuvent néanmoins intervenir en modulant cette production, à partir, par exemple, de cellules localisées au niveau tissulaire. Plusieurs médiateurs sont en effet connus pour leur action inductrice sur l'expression de la chaîne de l'IL-2R. Différents travaux ont clairement montré que l'IL-1⁽²²⁹⁾, le TNF⁽²³²⁾, l'ADF⁽²⁴¹⁾ et même l'IL-2⁽²³⁴⁾ augmentent l'expression de l'IL-2R α . Dans cet esprit, nous avons mesuré la synthèse de ces médiateurs par les cellules mononucléées de patients. La première approche consistant à doser ces protéines dans les surnageants de culture des cellules de patients, s'est révélée peu informative. Dans la seconde, l'expression de l'IL-2R, du TNF α et β et de l'ADF a été étudiée au niveau de l'ARN messenger des cellules fraîchement isolées et des cellules cultivées en présence ou en absence d'IL-2. Il est intéressant de noter que les cellules de patients expriment l'ARN messenger du TNF α et de l'ADF, en dehors de toute stimulation. L'ADF, dont l'expression est induite par l'infection par HTLV-I, augmente l'expression de l'IL-2R à la membrane d'une lignée cellulaire⁽²⁴²⁾.

La stimulation par l'IL-2 entraîne une augmentation de l'expression du TNF α , de l'ADF et du TNF β chez les patients mais aussi chez le Témoin. Il est

décrit dans la littérature que l'IL-2 induit l'expression du TNF α et du TNF β dans les lymphocytes T normaux^(233,324). En ce qui concerne l'ADF, aucune donnée n'est pour le moment disponible concernant la régulation de son expression par l'IL-2. En comparant les situations observées chez le témoin et les patients, on note qu'il n'y a pas de différence significative entre les niveaux d'induction de ces cytokines, excepté pour l'ADF. Le signal obtenu pour ce médiateur, dans le cas du Témoin, est en effet plus intense que chez les patients. Ceci pourrait traduire une différence de sensibilité des cellules à l'IL-2, pouvant s'expliquer notamment par le fait que les mécanismes régulant l'expression de l'ADF ont été sollicités antérieurement. Pour pallier ces problèmes d'interprétation, il faudrait augmenter le nombre de témoins et de patients, mais peut être également le temps de stimulation afin de permettre aux cellules d'exprimer une réponse maximale.

Parallèlement, nous avons mesuré l'expression des cytokines impliquées directement dans l'activation des éosinophiles et dans le contrôle de l'éosinopoïèse. Seuls, les ARN messagers de l'IL-5 et du GM-CSF ont pu être détectés après stimulation par l'IL-2. Dans aucun cas, l'ARN de l'IL-3 n'a été détecté. Ces résultats confirment les observations réalisées par d'autres équipes⁽¹⁸⁹⁾. Même si les lymphocytes de patients ne produisent pas spontanément ces cytokines, ils sont malgré tout dans un état d'activation qui leur permet de répondre rapidement à une stimulation par l'IL-2. Cette observation suggère l'existence d'une expression de cette cytokine *in vivo*. Il faut remarquer néanmoins qu'un résultat positif n'a été obtenu que dans un seul cas. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par le fait que la stimulation pendant 20 heures est insuffisante pour une expression optimale de ces gènes ou par le fait que les ARN

messagers de ces cytokines sont présents en faible quantité et rapidement dégradés. La demie-vie de l'ARN messager du GM-CSF n'excède pas une heure⁽³²⁵⁾. La faible quantité d'ARN messager d'IL-5 soulève aussi le problème de la sensibilité de la technique de détection. L'application de techniques plus fines telle que l'hybridation *in situ* apportera de nouvelles informations quant à la nature et le nombre de cellules productrices.

L'ensemble de ces résultats apporte des informations nouvelles sur l'intérêt et les modalités de l'expression de l'IL-2R dans les syndromes hyperéosinophiliques. Il apparaît que le dosage de l'IL-2R α soluble dans le sérum des patients est un marqueur fiable et sensible de l'évolution de la pathologie. Les taux de récepteurs solubles sont particulièrement élevés dans les formes extrêmes d'HES. L'IL-2R α soluble traduit assez fidèlement l'état d'activation des éosinophiles et par conséquent le risque d'atteinte viscérale. Le dosage de cette protéine apparaît aussi comme un marqueur utile pour le suivi du traitement par l'interféron alpha de certaines formes d'HES. Ce traitement se révèle particulièrement efficace, puisqu'en quelques mois ou quelques semaines, l'état clinique des patients est nettement amélioré et que l'éosinophilie sanguine retourne en parallèle à une valeur presque normale.

Par ailleurs, l'origine cellulaire de ce récepteur soluble reste néanmoins à définir. En effet, il n'y pas de relation entre le nombre de lymphocytes circulants exprimant le récepteur pour l'IL-2R et les taux de protéines sériques. On observe la même situation chez les patients présentant un lymphome T où les taux d'IL-2R α solubles ne sont pas non plus corrélés à la présence d'IL-2R à la surface

des cellules circulantes⁽³¹⁸⁾. Par contre dans les cas particuliers des leucémies T aiguës de l'adulte (ATL)⁽²⁶⁰⁾ ou des leucémies à tricoleucocytes⁽²⁶²⁾, les dosages d'IL-2R α sont en étroite relation avec les phénotypes membranaires. Les cellules mononucléées de patients atteints d'HES ont malgré tout la capacité de synthétiser, d'exprimer et de libérer de l'IL-2R α . Elles paraissent également participer de façon indirecte à ce phénomène en libérant certains médiateurs qui induisent l'expression de la chaîne alpha de l'IL-2R. Le TNF α et l'ADF semblent être de bons candidats, mais d'autres investigations seront nécessaires pour confirmer ces premiers résultats. De plus ces cellules semblent capables de produire des cytokines impliquées dans le contrôle de l'éosinophilie. La production de messenger codant pour l'IL-5 et le GM-CSF en réponse à une stimulation par l'IL-2 a pu être observée.

II- Expression de l'IL-2R par l'éosinophile

Ces premiers résultats laissaient supposer que l'IL-2R α soluble pouvait être produit au niveau tissulaire ou par d'autres types cellulaires. Nous avons émis l'hypothèse que l'éosinophile était capable, lui aussi, d'exprimer et de synthétiser la chaîne alpha de l'IL-2R. Sa représentation importante dans la circulation et dans les tissus, le présentait comme un candidat potentiel. De plus, les observations d'autres équipes concernant le développement d'une éosinophilie chez les patients traités par l'IL-2 dans le cas de certains cancers⁽¹⁸²⁾ ou des leucémies myéloïdes aiguës^(183,184), allaient dans le sens de l'existence d'un récepteur pour l'IL-2 à la surface des éosinophiles.

Nos résultats indiquent que les éosinophiles de patients fraîchement purifiés

expriment spontanément, la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2. Cette expression est toutefois variable et dépend des patients ainsi que de la densité des éosinophiles. Pour l'instant, il n'est pas possible de lier l'expression de l'IL-2R α à une pathologie donnée puisque la p55 est exprimée aussi bien par les éosinophiles de patients ayant une parasitose ou une maladie allergique que par ceux de patients ayant un HES. Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de patients dans chaque catégorie pour définir éventuellement une relation particulière avec la pathologie. La variabilité de l'expression de ce récepteur est toutefois similaire à celle d'autres molécules de surface comme le CD23⁽⁷⁹⁾, le récepteur pour l'IL-5^(96,97) et la molécule CD4⁽¹²²⁾ également décrits sur l'éosinophile. La synthèse protéique des éosinophiles diffère selon leur densité, suggérant l'existence de stades distincts d'activation⁽²⁸⁾. Cette variation pourrait expliquer l'hétérogénéité de l'expression de la p55.

Nous avons ensuite caractérisé à la surface de l'éosinophile, une chaîne de 55 kD correspondant à l'IL-2R α , mais par contre aucun signal correspondant à la chaîne bêta n'a été détecté. Afin d'éliminer la possibilité d'une adsorption éventuelle de la p55 sur la membrane, nous avons examiné l'expression de l'IL-2R au niveau transcriptionnel. Comme dans la lignée EoL3, les éosinophiles expriment les deux messagers de l'IL-2R α . A l'opposé, aucun signal correspondant au messager de la chaîne bêta n'est détecté.

Dans nos expériences, nous n'avons pas inclut d'éosinophiles de sujets sains principalement pour des raisons quantitatives. Cependant, une étude récente a montré que les éosinophiles de donneurs sains n'exprimaient pas l'IL-2R α en absence de stimulation, mais ils gardent la capacité de transcription du gène et de

synthèse de la protéine après stimulation avec l'IL-3 ou le GM-CSF, cultivés sur un tapis de fibroblastes⁽³²⁶⁾. Il faut noter que les éosinophiles normaux exposés à ces cytokines et cultivés dans les mêmes conditions, sont convertis en éosinophiles hypodenses^(162,163). De la même façon, nous avons démontré une induction de la p55 sur un clone de la lignée EoL3, sélectionné comme négatif pour l'expression de l'IL-2R α , par une stimulation séquentielle avec l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF⁽³²⁷⁾. Ces études tendent à considérer l'expression de l'IL-2R par l'éosinophile comme étant un marqueur d'activation.

Le rôle de l'IL-2 sur l'éosinophile mûre n'avait jusqu'alors pas été déterminé. Aucun effet direct de l'IL-2 n'avait été observé sur la survie⁽¹⁶²⁾, sur la modification de la densité cellulaire⁽¹⁸⁶⁾ ou sur les fonctions cytotoxiques de l'éosinophile⁽¹⁸⁵⁾. Cependant, une étude a récemment décrit un effet chimioattractant de l'IL-2 sur l'éosinophile. La chaîne bêta n'est pas détectable, bien que sa présence soit fortement suggérée par des expériences d'inhibition de l'activité de l'IL-2 en utilisant un anticorps bloquant le site de fixation de l'IL-2 de cette chaîne⁽³²⁸⁾.

L'induction de la p55 par le GM-CSF et l'IL-3 est également confirmée. La synthèse de ces deux cytokines par l'éosinophile^(159,160), pourrait faire partie d'une boucle de régulation autocrine de l'expression de la p55. En outre, il a été montré que les surnageants d'une lignée monocyttaire augmentent de façon significative l'expression de l'IL-2R α , bien que le facteur impliqué dans cette induction ne soit pas déterminé.

L'IL-5 ainsi que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-6 ne semblent pas avoir d'effet sur la production de la p55. Pour notre part, nous avons détecté la

présence de messagers codant pour l'ADF, dans les éosinophiles de patients (résultats non présentés). L'ADF est une protéine cellulaire homologue à la thioredoxine qui est impliquée dans l'induction de la chaîne alpha de l'IL-2R⁽²⁴¹⁾. L'expression de l'ADF par l'éosinophile pourrait être reliée à celle de l'IL-2R α . L'analyse des mécanismes impliqués dans cette induction apportera peut être des informations nouvelles sur la régulation de l'expression de l'IL-2R par l'éosinophile.

Pour pallier la faible représentation de la chaîne bêta à la surface de l'éosinophile, il est possible d'envisager une éventuelle association de l'IL-2R α à d'autres protéines membranaires comme il a déjà été décrit dans certains modèles. Une association de la p55 a en effet été démontrée entre d'une part, une molécule HLA de classe I⁽²¹⁴⁾ et d'autre part, la molécule ICAM-1^(215,216) sur les lymphocytes T. Le rôle d'une telle association reste encore énigmatique.

L'expression d'IL-2R par l'éosinophile pourrait contribuer à l'augmentation de la forme soluble du récepteur dans les syndromes hyperéosinophiliques. Même si l'expression est variable et parfois faible, il est raisonnable de penser que la quantité d'éosinophiles dans la circulation sanguine et dans les tissus est suffisamment importante pour participer à l'augmentation du pool d'IL-2R α soluble dans les sérums. Le fait que les taux solubles de la chaîne alpha soient en relation avec le nombre d'éosinophiles hypodenses renforce cette hypothèse. Il reste néanmoins à vérifier *in vitro*, l'expression par les éosinophiles de l'IL-2R α et la libération de la forme dans les surnageants de culture. L'IL-5, comme c'est le cas pour les lymphocytes B murins⁽³²²⁾, pourrait participer à la libération

d'IL-2R α soluble à partir de la forme membranaire sur l'éosinophile. Cette régulation serait autocrine puisque une étude récente a montré que l'éosinophile était capable de produire l'ARN messenger codant pour l'IL-5⁽¹⁶¹⁾.

Enfin, de par son puissant rôle chimioattractant, l'IL-2 pourrait participer au recrutement d'éosinophiles de la moelle osseuse dans la circulation sanguine.

III- Effet de l'IL-2 sur l'éosinopoïèse

Le rôle de l'IL-2 dans l'éosinopoïèse n'est pas établi jusqu'à présent. En fait, peu d'études se sont intéressées au rôle de l'IL-2 dans l'hématopoïèse, de façon plus générale. Cependant, la génération d'une éosinophilie chez certains patients traités par l'IL-2 qui ne présentaient pas de critères de sujets hyperéosinophiliques avant le traitement, laissait supposer que l'IL-2 puisse avoir un effet direct sur les événements cellulaires conduisant à la génération d'éosinophiles. De plus, une étude *in vivo* réalisée sur le chat⁽³²⁹⁾ montre que l'injection d'IL-2 pendant cinq jours conduit à une remarquable augmentation du nombre d'éosinophiles circulants et une très nette hyperplasie sélective des précurseurs éosinophiles au niveau médullaire, sept jours après la première injection. L'éosinophilie sanguine et les taux de précurseurs retournent à leur valeur normale à la quatrième semaine. Les éosinophiles sanguins de ces chats ont une survie accrue et sont hypodenses.

Il existe certes, un effet indirect de l'IL-2, démontré par la mise en évidence de l'expression de certaines cytokines dont l'IL-5 à la fois chez l'homme et dans le modèle murin^(187,188,311,330). Cette expression est vraisemblablement responsable de l'activation des éosinophiles observée chez les patients traités par IL-2^(185,186).

Cependant l'expression de l'IL-2R α par l'éosinophile mûre laissait supposer que les précurseurs éosinophiles étaient capables d'exprimer cette protéine. De même, il était raisonnable d'envisager que la chaîne β était, elle aussi, synthétisée par ces précurseurs. Nous avons voulu vérifier ces hypothèses en analysant les effets de l'IL-2 sur la différenciation des cellules de sang de cordon ombilical en éosinophiles, en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5.

Les résultats obtenus dans six expériences mettent en évidence un double effet de l'IL-2 sur la différenciation. La réponse des cellules de sang de cordon vis à vis de l'IL-2, en termes de différenciation cellulaire, dépend du temps d'incubation en présence de cette cytokine. Lorsque l'IL-2 est présente pendant toute la durée de la culture, la différenciation est fortement réduite mais l'inhibition n'est pas totale. Celle-ci dépend de la concentration de cytokine, elle est plus importante en présence de 100 U/ml d'IL-2. A l'opposé, l'addition d'IL-2 seulement pendant les premiers jours entraîne une augmentation de la différenciation des cellules souches en éosinophiles. Ce phénomène est clairement observé pour une concentration d'IL-2 égale à 100 U/ml. Deux études réalisées avec le TNF α donnent des résultats similaires. L'effet du TNF α peut présenter, suivant le temps d'incubation, à la fois un effet stimulateur ou inhibiteur sur la croissance et la différenciation des cellules CD34+, en présence d'IL-3^(49,50).

L'addition d'IL-2 pendant la deuxième ou la troisième période de la culture ne modifie pas la cinétique de la différenciation. L'IL-2 semble donc agir sur les premières étapes de l'hématopoïèse, ce qui suggère une action de l'IL-2 sur les cellules indifférenciées. L'analyse cytologique montre une modification importante du nombre de cellules blastiques au cours de la culture. La stimulation

par l'IL-2 entraîne une augmentation du nombre de blastes dès la première période. Cette augmentation persiste si l'IL-2 est maintenue tout au long de la culture alors qu'elle disparaît en absence d'IL-2.

L'analyse de l'expression de l'IL-2R montre clairement la présence de la chaîne alpha à la surface des cellules en différenciation, dans la condition Témoin, de la première à la dernière semaine de culture. Le nombre de cellules positives et l'intensité de fluorescence, c'est à dire la densité de molécule p55 par cellules, diminuent quand l'IL-2 est ajoutée dans la culture pendant la première semaine. Cette diminution pourrait s'expliquer par un rapide "turnover" de la p55⁽³³¹⁾. Les résultats de phénotypage membranaire montrent également une absence de l'expression de la chaîne bêta de l'IL-2R, exceptée pour la première période de culture. Cette chaîne doit être cependant présente en faible quantité et en deçà des limites de détection. L'IL-3 pourrait être en partie responsable de la diminution d'expression de l'IL-2R β , comme il a été montré par ailleurs⁽²³⁹⁾. Sa présence est également suggérée par le fait qu'elle est responsable de la transduction du signal d'activation cellulaire⁽²⁰⁵⁾. La concentration d'IL-2 utilisée dans nos expériences (100 U/ml soit 660 pM) est en effet plus en faveur de l'expression d'un récepteur de forte affinité (10 pM) que de faible affinité (10 nM).

L'étude au niveau de l'ARN messager de l'expression de l'IL-2R confirme ces résultats. En effet l'ARN messager de l'IL-2R α est détecté tout au long de la culture même quand le pourcentage de cellules positives en coloration spécifique est élevé, ce qui semble indiquer que les précurseurs éosinophiles expriment l'IL-2R. L'ARN messager de l'IL-2R β n'est par contre détecté faiblement qu'après la première semaine de culture en présence d'IL-2.

Parallèlement à cette étude, nous avons mesuré les taux d'IL-2R α soluble dans les surnageants de culture. Dans la culture Témoin, les taux de p55 sont détectables à partir de la seconde semaine et restent stables tout au long de la culture. La stimulation par l'IL-2 entraîne une augmentation de ces taux dès la première semaine de culture, ils restent cependant faibles si la culture est poursuivie sans IL-2, mais par contre augmentent nettement si l'IL-2 est maintenue. Cette observation est très intéressante car elle apporte un élément nouveau dans la compréhension de l'origine cellulaire de l'IL-2R α soluble dans le sérum des patients ayant une hyperéosinophilie. Il est effectivement possible d'envisager une libération de la forme soluble de l'IL-2R α par les cellules blastiques de la moelle osseuse des patients, cette protéine libérée dans la circulation générale augmenterait le pool de p55 soluble sérique.

La détection d'IL-2R, à la surface des cellules blastiques, a été étudiée dans d'autres modèles. Chez la souris, les cellules d'une lignée constituée de progéniteurs granulocytes et macrophages expriment seulement l'IL-2R α mais aucun effet biologique de l'IL-2, même à forte dose, n'est décelable⁽³³²⁾. Contrairement à ce qui est observé en ce qui concerne la chaîne bêta, l'IL-3 augmente l'expression de l'IL-2R α sur cette lignée. Chez l'homme, les cellules blastiques de patients ayant une leucémie myéloïde chronique^(256,317), ou une leucémie myéloïde aiguë⁽³³³⁾ sont capables d'exprimer la chaîne alpha de l'IL-2R et cette expression est parfois en étroite relation avec l'IL-2R α soluble⁽³¹⁷⁾. L'IL-2 induit même, dans certains cas la prolifération des cellules blastiques⁽³³⁴⁾. De plus, dans le cas d'un patient ayant une leucémie à éosinophiles, les cellules blastiques comprenant des formes immatures d'éosinophiles ainsi qu'une lignée

eosinophile établie (EoL1) expriment de fort taux d'IL-2R α . Enfin, le traitement par l'IL-2 entraîne une très forte augmentation de cellules précurseurs hématopoïétiques (CFU-GEMM, BFU-E et CFU-GM) dans la circulation sanguine⁽³³⁵⁾. La quasi absence d'effet de l'IL-2 sur les cellules leucémiques exprimant l'IL-2R peut s'expliquer par le fait que leur développement est bloqué à un stade de différenciation donné, mais l'augmentation de précurseurs hématopoïétiques circulants après l'injection d'IL-2 renforce l'idée de l'implication de cette cytokine dans la régulation des premières étapes de l'hématopoïèse.

Pour comprendre les événements cellulaires induits par IL-2, nous avons ensuite analysé l'expression d'un certain nombre de médiateurs, connus pour leur activité sur l'hématopoïèse, au niveau protéique et au niveau transcriptionnel. Nous avons recherché la présence d'ARN messenger codant pour l'IL-5, le GM-CSF et l'IL-3. Il apparaît en effet qu'un certain nombre de cellules expriment ces cytokines en réponse à l'IL-2. La production d'IL-5 par les lymphocytes T de patients stimulés par l'IL-2 *in vitro*⁽¹⁸⁹⁾ mais aussi *in vivo*^(188,336), ainsi que l'expression de GM-CSF⁽³³⁶⁾, notamment par les cellules NK⁽³³⁷⁾ après stimulation par l'IL-2, ont été observées par différentes équipes. De plus l'éosinophile lui-même est capable d'exprimer ces médiateurs⁽¹⁵⁹⁻¹⁶¹⁾. Les populations cellulaires de sang de cordon utilisée dans nos expériences étant hétérogènes, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de l'expression de ces cytokines en réponse à l'IL-2. Les expériences montrent que les ARN messagers de l'IL-5, du GM-CSF et de l'IL-3 ne sont pas détectables quelque soit la condition. L'effet stimulateur

de l'IL-2 sur la différenciation ne semble pas être modulé par la production de ces trois cytokines.

D'autres travaux ont également mis en évidence l'implication d'autres cytokines dans la régulation des étapes précoces de l'hématopoïèse. Ainsi, l'IL-1 β et l'IL-6 sont reconnues pour leurs activités potentielles de la réponse des cellules jeunes à l'IL-3⁽³⁹⁻⁴²⁾. Le TNF α possède un double effet sur l'hématopoïèse, il augmente ou diminue les effets de l'IL-3 sur la culture de cellules jeunes^(49,50), selon les conditions expérimentales. Nos expériences montrent qu'il n'y a pas de production d'IL-1 β au cours de la culture. Par contre des taux assez importants d'IL-6 et de TNF α sont détectés dans les surnageants. Le TNF α est également détecté au niveau transcriptionnel. Dans la condition Témoin, les taux les plus élevés sont observés à la première semaine de culture, ils décroissent ensuite progressivement. La stimulation par l'IL-2 pendant les six premiers jours n'entraîne pas de variation importante de ces taux, mais si l'IL-2 est maintenue dans la culture, les taux d'IL-6 décroissent rapidement alors que les taux de TNF ne cessent d'augmenter. Le TNF α , à long terme, bloque la différenciation des cellules jeunes, induite par l'IL-3, vers la lignée granulocytaire⁽⁵⁰⁾. Cette augmentation du TNF combiné à la diminution de l'expression d'IL-6, pourrait être responsable de l'inhibition de la différenciation observée.

L'intervention d'autres mécanismes semble être requise pour expliquer l'augmentation de la différenciation induite par la stimulation par l'IL-2 d'une semaine. Le TNF α pourrait être impliqué également dans ces mécanismes. Il a en effet été mis en évidence que le TNF augmente l'expression des récepteurs pour l'IL-3 et pour le GM-CSF sur des cellules leucémiques⁽⁵¹⁾. L'IL-2 pourrait avoir

un rôle similaire. Il est effectivement possible que cette cytokine augmente l'expression des récepteurs pour l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5, comme elle induit l'expression de son propre récepteur⁽²³⁴⁾. Le clonage récent de ces récepteurs indiquent qu'ils sont constitués de deux chaînes polypeptidiques dont une seule, spécifique, fixe le ligand avec une faible affinité, la deuxième chaîne étant commune aux trois récepteurs⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾. On ne connaît pas encore la cinétique d'expression de ces protéines, mais l'IL-2 pourrait stimuler l'expression de l'une ou l'autre de ces quatre protéines à la surface des cellules blastiques. La disponibilité de sondes immunologiques ou nucléotidiques de ces récepteurs et notamment du récepteur pour l'IL-5, permettra de répondre à cette interrogation.

Nous avons dans le même temps analysé l'expression de la peroxydase de l'éosinophile (EPO) qui est spécifique de cette cellule. Une récente étude a montré que l'ARN messenger de l'EPO, qui apparaît au stade promyélocyte était abondant dans les cellules jeunes et que son taux diminuait au cours de la différenciation pour devenir à peine détectable à la fin de la culture⁽³³⁸⁾. Nous obtenons le même profil d'expression dans nos expériences. La stimulation par l'IL-2 à différentes périodes de la culture apporte des informations nouvelles sur l'effet de cette cytokine au cours de la différenciation. La stimulation par l'IL-2, pendant la première semaine, entraîne une très forte augmentation du taux de l'ARNm de l'EPO à la deuxième et la troisième semaine. Cette induction est en relation avec le nombre de cellules EPO positives. Cependant, alors que la stimulation par l'IL-2 pendant la troisième période de culture ne modifie pas le niveau de la différenciation, l'expression de l'ARN messenger codant pour l'EPO est induite

très clairement dans les cellules en la fin de la culture. Cette observation est importante car elle tend à montrer que l'IL-2 agit également sur les précurseurs éosinophiliques et qu'elle pourrait de ce fait participer à l'augmentation de l'activation cellulaire des éosinophiles, observés chez les patients traités par l'IL-2. D'autres paramètres biologiques pourraient être modifiés par l'IL-2, comme l'altération de la densité cellulaire. Cette sensibilité des précurseurs éosinophiliques à l'IL-2 renforce l'hypothèse de l'expression de l'IL-2R à la surface des précurseurs éosinophiles.

L'ensemble de ce travail apporte des éléments nouveaux quant à la compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire. La croissance cellulaire n'a pas été abordée dans ce travail du fait de la grande variabilité dans la réponse vis à vis de l'IL-2, due vraisemblablement à l'hétérogénéité des populations cellulaires des sang de cordon. L'IL-2 semble agir sur deux populations cellulaires de façon différente.

La première est représentée par les cellules blastiques et la seconde par les précurseurs éosinophiliques. La description d'une part, de l'expression de l'IL-2R à la surface des blastes dans nos expériences et dans la littérature et d'autre part, de l'augmentation dans la circulation générale de cellules jeunes après traitement par l'IL-2, est en faveur de l'effet direct de l'IL-2 sur la prolifération et l'activation de ces cellules. Cette activation pourrait se concrétiser par l'augmentation de l'expression à la fois de récepteurs spécifiques et de médiateurs hématopoïétiques conduisant à une induction ou à une inhibition de la différenciation vers la lignée éosinophile, en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5, suivant le temps de stimulation par l'IL-2.

Par ailleurs, la condition où les cellules de sang de cordon sont stimulées par l'IL-2 pendant une semaine, se rapproche des conditions *in vivo* des traitements de certains cancers par l'IL-2. En effet dans ce type de pathologie, les patients reçoivent de fortes doses d'IL-2 pendant des périodes de 4 à 5 jours⁽³³⁹⁾, l'éosinophilie apparaissant généralement tout de suite après. Cette situation est retrouvée plus clairement dans le modèle animal⁽³²⁹⁾. En effet, l'injection d'IL-2 pendant 5 jours à des chats, entraîne spécifiquement une éosinophilie qui apparaît dès la première semaine du traitement, et dont le pic est situé à la troisième semaine. L'éosinophilie décline ensuite progressivement pour atteindre une valeur presque normale à la quatrième semaine. De manière intéressante, au troisième jour du traitement, l'éosinophilie est inférieure à l'éosinophilie mesurée une semaine avant le début des injections. Par contre, les auteurs n'ont pas observé de changement notable du nombre absolu de neutrophiles et de lymphocytes, tout au long de l'étude. Il apparaît donc que l'IL-2 est capable d'induire spécifiquement des mécanismes conduisant à stimuler l'éosinophilie. Dans ce contexte, on peut envisager le schéma de régulation suivant: (i) L'IL-2 induirait la prolifération des cellules jeunes indifférenciées en augmentant leur sensibilité à l'IL-5. (ii) dans le même temps, l'IL-2 stimulerait les cellules lymphocytaires périphériques ou tissulaires à produire de l'IL-5. L'IL-5 ainsi produite, induirait la différenciation cellulaire des cellules sensibilisées en éosinophiles. (iii) pour maintenir une inhibition de la différenciation tant que l'IL-2 est présente, l'implication d'autres facteurs, comme le TNF α semble est requise.

La deuxième cible cellulaire dans notre modèle, serait représentée par les précurseurs éosinophiles. La démonstration de l'expression d'un récepteur pour

l'IL-2 sur l'éosinophile mûre laissait effectivement supposer un rôle de l'IL-2 sur les stades indifférenciés de l'éosinopoïèse. La stimulation par l'IL-2 de l'expression de l'ARN messager de la peroxydase dans les cellules différenciées en fin de culture est un élément de réponse. D'autres propriétés de l'éosinophile sont peut être affectées, comme la densité cellulaire ou les fonctions cytotoxiques. Il faut cependant rappeler que les éosinophiles obtenus par différenciation de cellules de sang de cordon, sont différents des éosinophiles circulants par leur densité mais aussi par un certain nombre de propriétés biologiques^(340,341). Cette différence est attribuée à l'absence de cellules du stroma médullaire dans les modèle *in vitro*. La moelle osseuse contient en effet de nombreux composants cellulaires en dehors des cellules hématopoïétiques: des fibroblastes, des cellules adipeuses, des cellules endothéliales, des macrophages, ...

Enfin, on ne peut cependant pas exclure une intervention des cellules contaminantes dans nos expériences. Même si l'expression de marqueurs spécifiques des lignées cellulaires est faible, on distingue morphologiquement des cellules d'origine lymphocytaires et monocytaires. Il existe vraisemblablement au moins au début de la culture, et malgré l'étape de purification une contamination cellulaire T. Pour pallier ce problème nous envisageons d'utiliser comme modèle dans les expériences futures, les cellules exprimant l'antigène CD34, c'est à dire les cellules pluripotentes, purifiées à partir des cellules de sang de cordon.

IV- Infection rétrovirale dans le syndrome hyperéosinophilique

Plusieurs arguments biologiques nous ont permis de formuler l'hypothèse

qu'une infection rétrovirale pouvait être incriminée dans la pathogénie de certaines formes d'HES:

- le développement de lymphomes T à différents stades de l'éosinophilie^(7,16,342) évoque l'existence de mécanismes de transformation cellulaire affectant un clone lymphocytaire T. L'existence de clones cellulaires T, sécrétant des facteurs de différenciation de la lignée éosinophilie, a déjà été mise en évidence dans un cas de syndrome hyperéosinophilique⁽³⁴³⁾.

- les taux remarquablement élevés d'IL-2R α soluble chez les patients ayant un HES malin ou une éosinophilie associée à un lymphome T rappellent ceux observés dans les ATL (leucémies T aiguës de l'adulte), pathologies induites par HTLV-I. La protéine tax virale est responsable de la dérégulation de la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2R dans les cellules infectées^(240,285).

- chez les patients ayant un HES malin ou un HES associé à un lymphome T, résistant aux traitements conventionnels, le traitement à base d'interféron alpha entraîne une réduction de l'éosinophilie mais aussi une diminution des taux d'IL-2R α soluble. La sensibilité à l'interféron alpha, connu pour ses propriétés anti-prolifératives mais aussi anti-virales, est un argument supplémentaire. Dans le cas des cellules infectées par HTLV-I, l'IFN α inhibe la production et la transmission virale, l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe est affectée⁽³⁴⁴⁾.

Nous avons donc recherché l'existence d'une infection rétrovirale à potentialité transformante dans les formes les plus sévères d'HES. Nous avons choisi d'orienter nos recherches vers le retrovirus HTLV-I.

En utilisant des amorces spécifiques, les premières expériences

d'amplification génique ont permis de révéler l'existence de séquences rétrovirales gag et tax d'HTLV-I dans le génome de cellules mononucléées de quatre patients présentant un HES associé à un lymphome T. Ces résultats encourageants ne permettaient cependant pas d'autres investigations afin de définir de façon plus précise la nature exacte de l'entité virale détectée.

Pour cette raison, nous avons utilisé une autre approche qui avait l'avantage de fournir le matériel biologique indispensable à l'analyse des propriétés de l'agent viral. Des cultures cellulaires à long terme ont alors été entreprises dans des conditions optimales afin d'obtenir une transformation cellulaire et l'établissement d'une lignée immortalisée. Les cellules mononucléées de sept patients ont été mises en culture. Par amplification génique nous avons pu mettre en évidence l'existence des séquences spécifiques de la région tax dans le génome de cellules en culture pour deux patients, par contre aucun signal n'a été observé avec les amorces spécifiques des régions gag et pol d'HTLV-I. Une lignée cellulaire n'a pu être établie que dans un seul cas. Ces résultats montrent que même dans des conditions optimales de culture la fréquence de séquences rétrovirales dans le génome cellulaire est faible. L'hypothèse de virus défectif pour certaines parties du génome permettrait d'expliquer ce phénomène, seuls les gènes codant pour les protéines de régulation ne seraient pas modifiés. Le virus défectif aurait alors perdu la capacité de réplication, mais garderait son potentiel d'activation de certaines fonctions cellulaires. Cette hypothèse n'a pu être testée.

La lignée cellulaire a été établie à partir des cellules du patient Do cocultivées avec les cellules de sang de cordon ombilical. Ce patient présentait depuis 1984, un syndrome hyperéosinophilique associé à des lésions cutanées mais ce n'est qu'en 1990 que le diagnostic d'un lymphome a pu être établi. Sa sérologie

HTLV-I, contrôlée par un test ELISA et par la technique de Western Blot, est négative. Au moment du prélèvement sanguin, son éosinophilie et son taux d'IL-2R α soluble atteignaient respectivement 16.10^9 éosinophiles/L et 3440 U/ml. Sous traitement par l'interféron alpha, ces deux paramètres ont chuté parallèlement.

Les cellules de la lignée expriment les antigènes CD4 et CD25 (IL-2R α). L'analyse en microscopie montre que les cellules produisent des particules virales de type C, c'est à dire avec la nucléocapside centrale comme dans le cas d'HTLV-I. Nous avons défini l'agent viral impliqué dans l'infection de la lignée Do comme étant un retrovirus du type HTLV-I. En effet, les protéines p19 et p24 d'HTLV-I sont détectées dans les cellules infectées. De plus quatre séquences spécifiques d'HTLV-I dans les gènes gag, pol et tax ont été mises en évidence dans le génome cellulaire. Enfin la carte de restriction virale établie donne un profil identique à celle d'HTLV-I.

On ne peut cependant pas exclure la possibilité qu'il s'agisse d'un variant viral d'HTLV-I. En effet, le patient Do ne présente pas les caractéristiques cliniques d'une leucémie T de l'adulte (ATL) ou d'une paraparésie spastique tropicale (PST), pathologies classiquement associées à l'infection par HTLV-I. Pour répondre à ce problème, le séquençage du provirus est en cours. Plusieurs études ont tenté de relier les deux pathologies (ATL et PST) à une éventuelle variation génétique d'HTLV-I. Pour le moment seules quelques variations ont été mise en évidence mais sont plus en relation avec l'origine géographique qu'avec la pathologie^(41,345). Cependant un virus apparenté au HTLV-I, délété dans toute la région pol et une partie de gag et de env, a été identifié dans un cas particulier de

lymphome T cutané (Mycosis fungoïde)⁽³⁴⁶⁾. La détection de séquences virales délétées dans l'ADN de cellules des lésions cutanées de cinq autres patients séronégatifs suggèrent qu'un tel virus pourrait être impliqué dans l'étiologie de certaines formes de mycosis fungoïde.

Les relations entre l'infection par HTLV-I et le développement d'une éosinophilie restent cependant à définir. Parmi cinq études, publiées ces dernières années^(271-273,347,348) présentant les données cliniques de 44 patients ayant une ATL, trois cas sont décrits comme ayant une éosinophilie atteignant respectivement 12%, 35% et 45%^(273,348). Une autre étude décrit la présence d'une éosinophilie persistante (40%) chez un patient coinfected par les rétrovirus HIV-1 et HTLV-II⁽³⁴⁹⁾. Enfin, une étude réalisée sur 14 chats infectés par une souche particulière du FeLV (Feline Leukemia Virus) apporte également des arguments en faveur d'une relation entre l'infection rétrovirale et le développement d'une éosinophilie⁽³⁵⁰⁾. En effet, dans ce travail, deux chats développent une hyperéosinophilie (47% et 56% d'éosinophiles) avec la présence de formes jeunes d'éosinophiles dans le sang. Les biopsies médullaires révèlent une très nette hyperplasie des précurseurs éosinophiles. Une virémie et la présence d'antigène viral à la surface des cellules mononucléées ont pu être détectées mais aucun processus tumoral n'a été observé.

Les mécanismes moléculaires d'une telle association ne sont pas actuellement connus. Les cellules infectées par HTLV-I sont capable de produire un large spectre de cytokines dont l'IL-5⁽²⁹⁰⁾ et le GM-CSF. Seul le GM-CSF est produit de façon constitutive par transactivation du promoteur du gène par la protéine virale

tax⁽²⁸⁸⁾. Aucune étude n'a rapporté jusqu'à présent la synthèse d'IL-3 par les cellules infectées. L'activation du GM-CSF dans l'infection par HTLV-I n'est pas à elle seule suffisante pour entraîner une hyperéosinophilie.

En dehors de la mise en évidence de l'existence d'un variant viral d'HTLV-I, trois hypothèses peuvent être raisonnablement formuler afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction de l'éosinopoïèse par ce rétrovirus:

- L'implication de nouveaux facteurs cellulaires, induits par le virus, agissant sur l'éosinopoïèse est suspectée. En effet, une récente étude a mis en évidence un facteur synthétisé par une lignée cellulaire infectée par HTLV-I qui est capable d'induire la différenciation de la lignée éosinophilie EoL1 et une différenciation des cellules souches en éosinophiles⁽³⁵¹⁾. Ce facteur semble différent des cytokines connues à ce jour, notamment différent de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF. On ne sait pas encore si ce facteur est suffisant, à lui seul, pour supporter la différenciation ou s'il agit en synergie avec d'autres facteurs. Par ailleurs, dans un cas de leucémie lymphoïde chronique T avec anémie, un facteur, non encore identifié, libéré par les cellules infectées est responsable de l'atteinte de la lignée érythroïde⁽³⁵²⁾. L'infection par HTLV-I ouvre la voie à la mise en évidence de nouveaux facteurs de régulation de la différenciation cellulaire.

- La description de l'existence d'une clonalité dans l'HES suggère l'existence de clones cellulaires T sensibilisés pour la production de facteurs éosinopoïétiques⁽³⁵³⁾. Il est raisonnable d'envisager que l'infection par HTLV-I de

tels clones soit responsable de l'initiation d'une éosinophilie.

- Enfin, cette association pourrait reposer sur des bases génomiques. Il est connu d'une part, que l'intégration du virus dans le génome cellulaire n'obéit pas à un mécanisme précis⁽²⁸⁰⁾ et d'autre part, que la protéine tax régule négativement l'expression de la β -polymérase, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN⁽²⁸⁴⁾. Ces deux phénomènes pourraient soit séparément, soit ensemble altérer l'organisation génomique du chromosome 5, sur lequel les gènes codant pour l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5 et l'IL-4 sont organisés en "cluster". L'altération d'un ou plusieurs de ces gènes, par cassure chromosomique ou par intégration virale, conduisant à une expression exagérée de telle ou telle protéine, serait responsable de l'éosinophilie.

Ces hypothèses doivent cependant être prises avec quelques précautions puisque les résultats que l'on peut obtenir avec une lignée cellulaire établie à partir de cellules de sang de cordon ne sont pas automatiquement transposables aux résultats que l'on peut attendre avec une lignée établie à partir des propres cellules du patient. L'intégration virale s'effectuant de façon aléatoire, les mécanismes induits par le virus ne sont de ce fait pas forcément identiques. L'optimisation des cultures cellulaires permettra d'obtenir une transformation des cellules de patients et ainsi des lignées cellulaires "directes". Nous pourrions mieux alors étudier les relations HTLV-HES.

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons tenté d'apporter notre contribution à la caractérisation des bases cellulaires et moléculaires du développement de l'éosinophile dans le cadre des syndromes hyperéosinophiliques idiopathiques. Dans ce contexte, les relations entre les lymphocytes T et les éosinophiles ont été étudiées par le biais de l'interleukine 2 et de son récepteur.

Dans un premier temps, nous avons montré que le dosage de la chaîne alpha de l'IL-2R soluble dans le sérum des patients présentant un HES était une méthode sensible et reproductible permettant d'apprécier l'état d'évolution de la maladie. Les taux d'IL-2R soluble semblent corrélés aux taux d'éosinophiles hypodenses circulants, témoins du risque d'atteintes viscérales.

Parallèlement, nous rapportons une alternative thérapeutique à base d'interféron alpha dans les formes sévères d'HES ne répondant pas aux traitements conventionnels. Les bases cellulaires et moléculaires de l'action de l'interféron restent cependant à définir. De manière intéressante, l'évolution de ce traitement peut être suivi par le dosage d'IL-2R soluble sérique dont les taux chutent en fonction de l'amélioration de la situation clinique. De plus, cette diminution des taux d'IL-2R soluble est contemporaine à la diminution de l'éosinophilie sanguine.

En plus de son caractère pronostique, le dosage de l'IL-2R dans le sérum des patients atteint d'HES apparaît ainsi comme un bon marqueur biologique, très utile dans le suivi thérapeutique.

Dans une seconde approche nous avons étudié le rôle de l'IL-2 sur la genèse des éosinophiles après avoir montré que les éosinophiles matures exprimaient la chaîne alpha de l'IL-2R. Il semble, dans ce cadre, que l'IL-2 soit un médiateur essentiel et spécifique de la régulation des étapes précoces de l'éosinopoïèse. Cette cytokine peut en effet, se comporter à la fois en inhibiteur ou en activateur de la régulation de l'éosinopoïèse. Même si aucun travail n'a relaté à l'heure actuelle la présence d'IL-2 dans les sérums de patients atteints d'HES, il est possible d'envisager une dérégulation de l'expression du gène de ce médiateur soit au niveau périphérique, soit au niveau tissulaire. La sensibilité des lymphocytes de patients hyperéosinophiliques à produire de l'IL-5 après stimulation par l'IL-2 fait en effet, suspecter une production d'IL-2 *in vivo* chez les patients atteints d'HES. L'IL-2 agirait ainsi à plusieurs niveaux:

- au niveau des cellules jeunes indifférenciées en augmentant leur sensibilité à l'IL-5, en induisant, par exemple, l'expression de son récepteur.
- au niveau des cellules lymphocytaires et peut être même au niveau des éosinophiles en induisant la production d'IL-5.
- au niveau des précurseurs éosinophiles, en les activant, notamment par l'induction de l'expression du gène de la peroxydase.
- au niveau, enfin, des éosinophiles matures. L'IL-2 pourrait intervenir, par son action chimioattractive, au recrutement des éosinophiles de la moelle dans la circulation sanguine.

L'ensemble de ces actions résulterait en une production accrue d'éosinophiles hypodenses dans la circulation sanguine. La stimulation de l'expression d'autres facteurs comme par exemple l'IL-6, le TNF α et l'ADF jouerait un rôle de modulateur dans ce schéma, en potentialisant ou en inhibant

l'action de l'IL-2.

L'expression de la chaîne alpha du récepteur pour l'IL-2 à la surface des cellules mononucléées, des éosinophiles, des cellules hématopoïétiques et peut-être des précurseurs éosinophiles serait le témoin d'une telle activation et conduirait à l'augmentation significative des taux d'IL-2R soluble dans les sérums des patients hyperéosinophiliques.

Enfin, **dans un troisième temps**, nous avons identifié un agent viral potentiellement responsable de l'éosinophilie dans les formes d'HES associées à un syndrome néoplasique. Il s'agit du rétrovirus HTLV-I, dont les propriétés transformantes sont bien connues. Les relations entre une telle infection et le développement d'une éosinophilie sont encore à définir. Dans ce contexte, il est envisagé de tester les surnageants de la lignée Do dans le modèle de différenciation des cellules de sang de cordon ombilical en éosinophiles afin de mettre en évidence l'expression d'un ou plusieurs facteurs connus ou non encore identifiés. Mais il est possible également d'imaginer dans ce modèle qu'une synthèse à la fois d'IL-2 et d'IL-5 soit responsable de l'initiation de l'éosinophilie. Cette dernière hypothèse reste à vérifier.

Même si d'autres investigations seront nécessaires pour confirmer les résultats obtenus, l'ensemble de ce travail avait pour but d'apporter une meilleure compréhension des interactions lymphocytes/éosinophiles dans les syndromes hyperéosinophiliques idiopathiques. Il est clair que la présence d'IL-5 est nécessaire au développement d'une éosinophilie. Mais l'IL-2 semble être aussi un élément important dans la régulation complexe de l'éosinopoïèse et de l'activation

des éosinophiles, son rôle dans la pathologie de l'HES n'est plus à négliger. De plus, la mise en évidence d'un rétrovirus dans l'HES, permet de définir un nouveau groupe de syndrome hyperéosinophilique et peut être même d'identifier un variant particulier d'HTLV-I. Enfin, de par son effet inhibiteur sur la production d'éosinophiles sanguins, l'interféron alpha constitue un bon traitement alternatif de l'HES. Une étude prospective sera nécessaire pour définir les critères d'évaluation et d'application d'une telle approche thérapeutique.

MATERIEL
et
METHODES

1- Purification et culture cellulaires

1-1 Les éosinophiles

La technique utilisée pour la purification des éosinophiles sanguins est dérivée de celle précédemment décrite par Vadas⁽²²⁾. Un volume de sang veineux (60 ml) prélevé en présence de 0,2 ml de calciparine est dilué avec quatre volumes de dextran T500 à 4,5% dans de l'eau physiologique. La solution ainsi obtenue est laissée à température ambiante pendant 30 à 60 mn afin de permettre aux hématies de sédimenter. Le plasma contenant la majorité des leucocytes est récupéré puis centrifugé. Ces cellules subissent par la suite un choc hypotonique de façon à lyser les hématies contaminantes, par addition d'un volume de NaCl à 0,2% pendant 20 secondes, l'osmolarité est ensuite rétablie en ajoutant un même volume de NaCl à 1,6%. Après centrifugation les cellules sont lavées et ajustées à une concentration de $50 \cdot 10^6$ /ml, en gel de Tyrode. Le gel de Tyrode est une solution tamponnée saline contenant notamment du dextrose, de la gélatine et de la DNase (Déoxyribonucléase). La suspension cellulaire est ensuite déposée sur un gradients de densité discontinu de métrizamide à raison de 2 ml par gradients (Figure 33). Les tubes sont alors centrifugés à 1200g pendant 45 mn à 15°C. Les suspensions cellulaires situées aux niveaux des différentes couches sont récupérées puis lavées en milieu tamponné HBSS. La morphologie et la nature des cellules sont appréciées à l'aide d'une coloration Giemsa après cytocentrifugation des cellules sur lames. La viabilité cellulaire déterminée par l'exclusion du bleu Trypan est supérieure à 85%. La distribution cellulaire varie en fonction des patients.

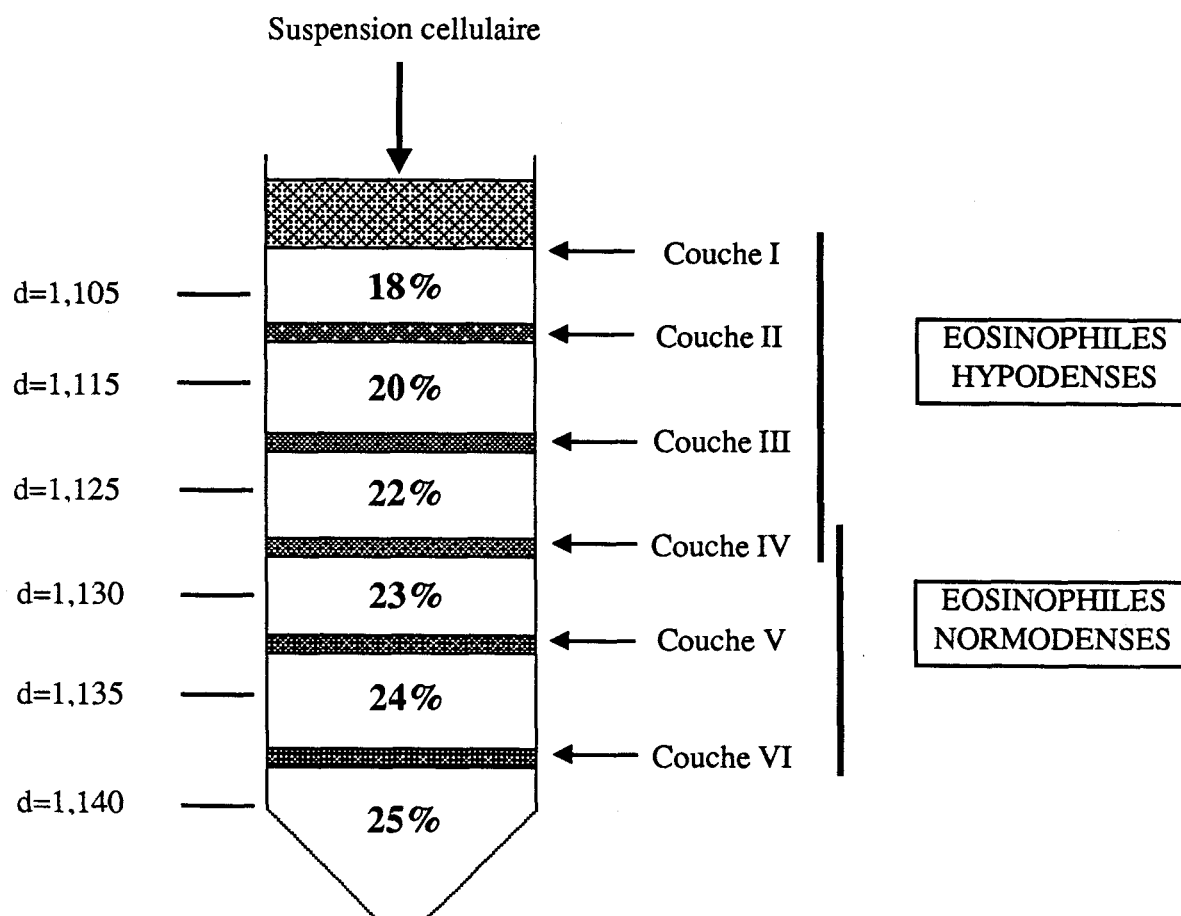


Figure 33: Gradients discontinus de métrizamide de 25% à 18% en gel de Tyrode. La valeur des densités des solutions de métrizamide est indiquée sur la gauche du schéma, le numéro de la couche cellulaire correspondante est indiquée à gauche. Les éosinophiles hypodenses sont recueillis au niveau des couches I, II et III, les éosinophiles normodenses au niveau des couches V et VI. Les éosinophiles situés au niveau de la couche IV sont de densité intermédiaire.

Les éosinophiles peuvent se répartir dans toutes les couches, les monocytes et les lymphocytes se retrouvent le plus souvent dans les couches I et II, alors que les neutrophiles sont plus généralement situés au niveau des couches II, III et IV (Figure 34).

1-2 Les cellules mononucléées

Le sang veineux prélevé sur 0,2 ml de calciparine est dilué avec un volume égal de tampon HBSS puis centrifugé à 400 g pendant 30 mn à 15 °C sur un coussin de Ficoll-Paque de densité 1,077. Les cellules mononucléées recueillies à l'interface plasma-Ficoll sont lavées 3 fois en HBSS puis comptées. La morphologie et la nature des cellules sont appréciées à l'aide d'une coloration Giemsa après cytocentrifugation des cellules sur lames.

1-21 Culture en présence d'IL-2

Les cellules purifiées sont cultivées en présence ou en absence de 100 U/ml d'IL-2 à raison de $2 \cdot 10^6$ /ml de milieu de culture (RPMI 1640; glutamine 2 mM; β -mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-5}$ M; pyruvate de sodium 1 mM; antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine) et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVFd) par chauffage à 56°C pendant 30 mn). Après 20 heures de culture à 37°C en présence de 5% de CO₂, les cellules sont centrifugées. Le surnageant est recueilli, puis aliquoté et congelé à -20°C, le culot cellulaire est utilisé pour la préparation d'ARN.

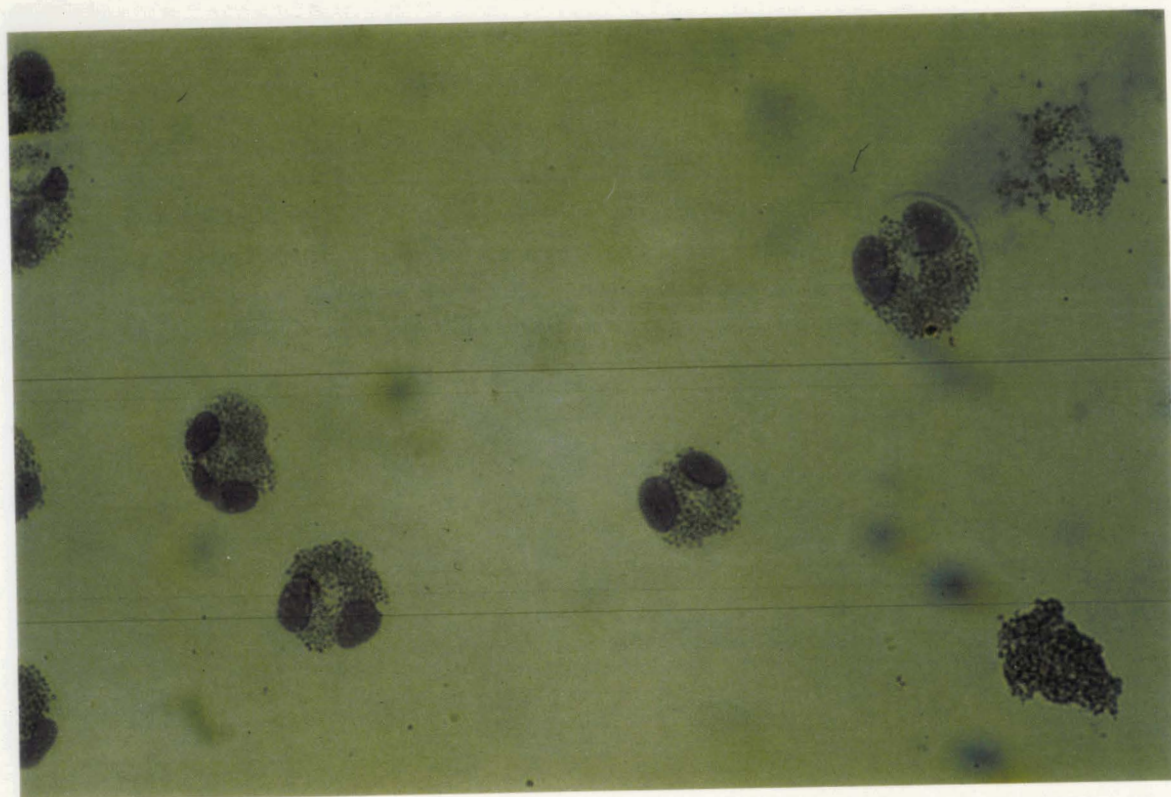


Figure 34A: Eosinophiles, issus de la couche IV, après purification sur gradient de métrizamide. Les cellules sont colorées au RAL (coloration Giemsa) et observées à l'objectif x100 en immersion. La photographie représente quatres éosinophiles distincts, ayant un noyau bi-lobé et beaucoup de granulations.

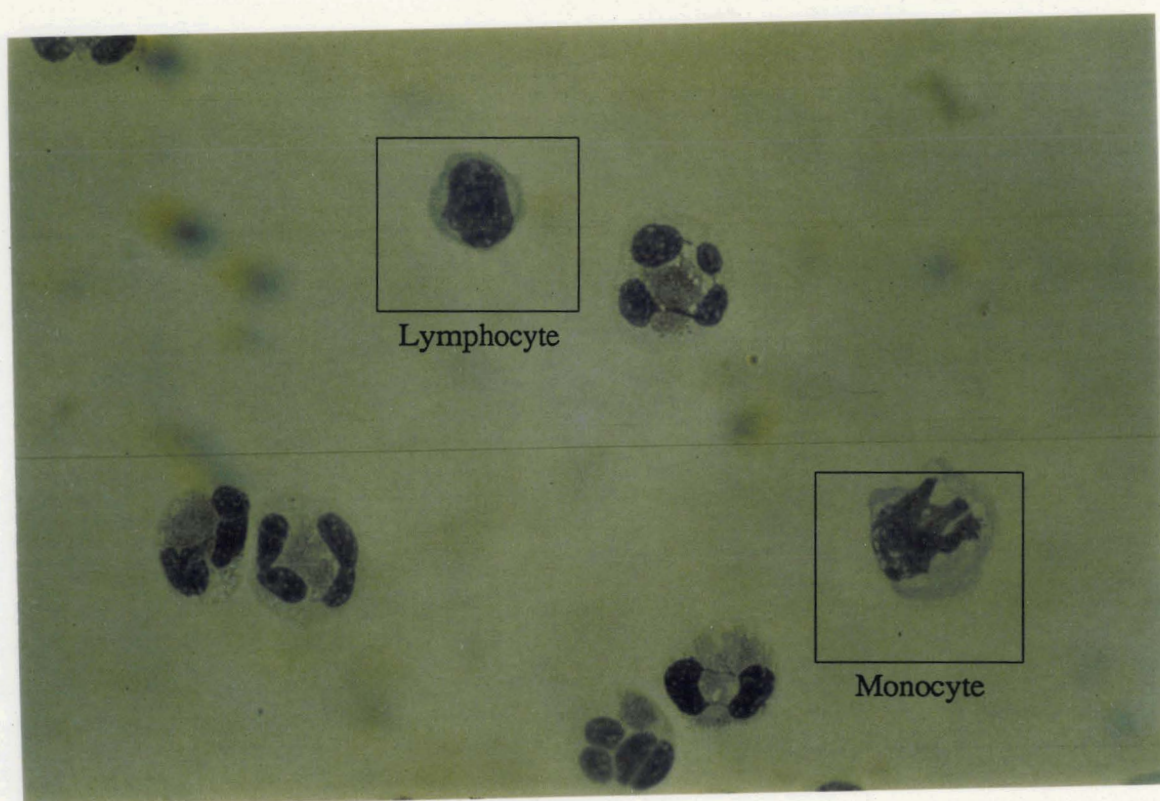


Figure 34B: Cellules, issues de la couche I, après purification sur gradient de métrizamide. Les cellules sont colorées au RAL (coloration Giemsa) et observées à l'objectif x100 en immersion. La photographie représente une cellule lymphocytaire, une cellule monocyttaire et cinq éosinophiles polylobés et légèrement dégranulés.

1-22 Culture virologique

Les cellules sont activées pendant 3 jours en présence de phytohémagglutinine (PHA) à une dilution finale de 1/2000 dans un milieu de culture contenant 10% de lymphocult T-LF, 1 UI/ml de sérum anti interféron alpha humain et 10% de SVFd. Le lymphocult T-LF est un milieu conditionné à partir de surnageant de lymphocytes stimulés par la PHA, il contient en particulier de l'IL-2. Au troisième jour les cultures des cellules de patients sont divisées en deux. Une partie des cellules est cultivée avec le milieu de culture précédemment décrit sans mitogène à raison de 1.10^6 cellules/ml. L'autre partie est irradiée par une dose de 5000 rads pendant 10 mn puis cocultivée avec les cellules de sang de cordon dans le même milieu à raison de 1.10^6 cellules/ml pour un rapport cellules de patients/cellules de sang de cordon de 1/4. Deux fois par semaine le milieu de culture est remplacé et la concentration cellulaire maintenue à 1.10^6 cellules/ml. Au bout de trois semaines, les cellules ont été testées en immunofluorescence et en PCR. Après un mois, les cellules du patient Do ont été clonées par dilution limite afin d'obtenir une lignée cellulaire.

1-3 Les cellules de sang de cordon ombilical

Les cellules mononucléées de sang de cordon obtenues après centrifugation sur coussin de Ficoll-Paque sont déplétées en cellules adhérentes par incubation d'une nuit à 37°C. Les cellules non adhérentes ainsi obtenues subissent ensuite une étape supplémentaire de purification afin d'éliminer les lymphocytes T. Cette étape fait intervenir la technique des rosettes E décrite par Kaplan⁽³⁵⁴⁾. Des hématies de mouton sont lavées quatre fois en eau physiologique. Un volume de

culot globulaire est ensuite incubé avec 4 volumes d'AET (Aminoéthyl isothio-uronium bromide) à 4%, pH 9 pendant 15 mn à 37°C. Après six lavages en eau physiologique, les hématies sont resuspendues à 2% avec du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVFd. Le contact entre les hématies et les cellules du sang de cordon est réalisé pendant 10 mn à 37°C à raison d'un volume d'hématies à 2% pour un volume de cellules mononucléées ajustées à une concentration de 4.10^6 cellules/ml. La suspension cellulaire est ensuite soumise à une centrifugation douce (50 g, 7 mn) puis est maintenue une heure à 4°C afin de stabiliser la formation des rosettes. Une nouvelle purification sur Ficoll-Paque est alors réalisée et l'anneau cellulaire à l'interface entre le ficoll et le milieu est récupéré. Les hématies contaminantes sont lysées par choc osmotique et les cellules lavées plusieurs fois.

Les cellules ainsi purifiées sont mises en culture à raison de 1.10^6 cellules/ml dans un milieu complet (RPMI 1640, 2 mM glutamine, β -mercaptoéthanol 5.10^{-5} M; antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine) et 10% SVFd) contenant 2.10^{-10} M d'IL-3 recombinante humaine, 2.10^{-10} M de GM-CSF recombinant humain et de 1 U/ml d'IL-5 recombinante humaine. Dans certaines expériences l'IL-2 est ajoutée à la concentration finale de 10 U/ml, de 50 U/ml ou de 100 U/ml. La différenciation est suivie en utilisant une coloration spécifique basée sur la résistance de l'activité enzymatique de la peroxydase de l'éosinophile en présence de cyanure⁽³⁵⁵⁾. Environ 1.10^5 cellules sont cytocentrifugées sur lames, puis fixées pendant 30 secondes par un mélange d'acétone et de formaldéhyde dans une solution de phosphate de sodium et de potassium. Les lames sont ensuite incubées pendant 10 mn dans un tampon phosphate contenant

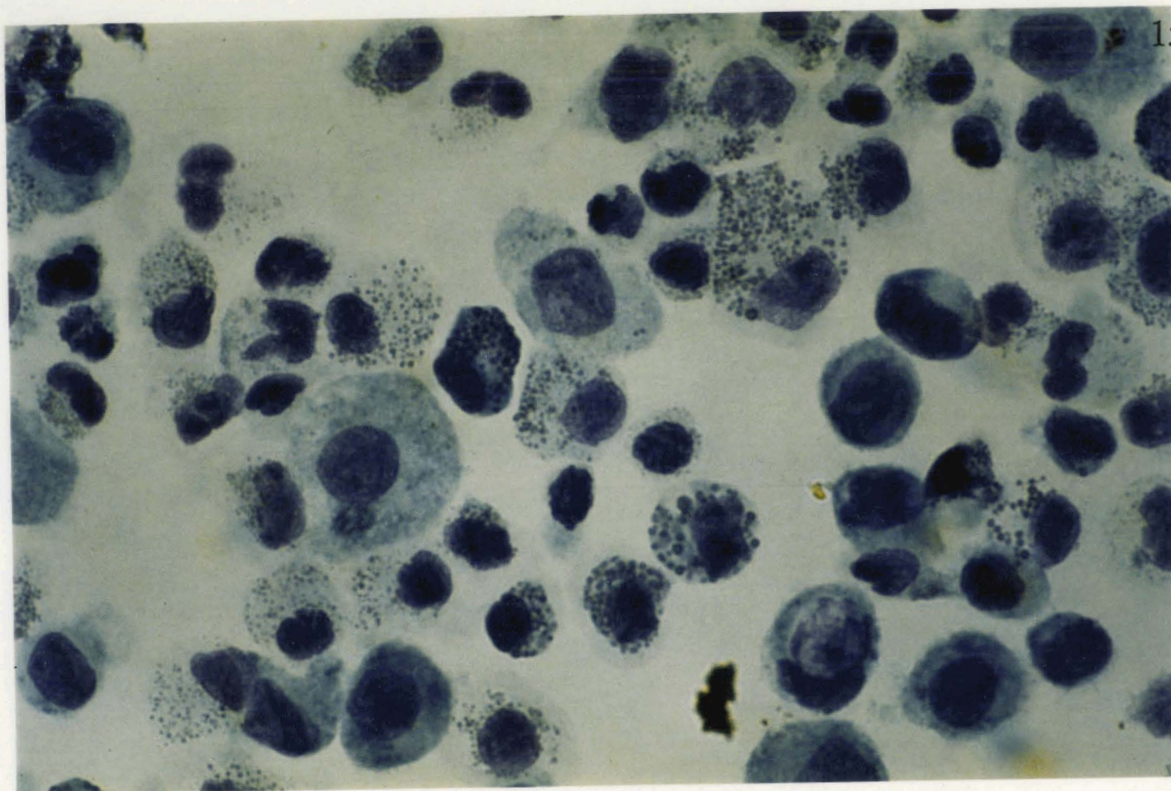


Figure 35A: Cellules de sang de cordon cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 pendant 18 jours. Les cellules sont colorées au RAL (coloration Giemsa). La photographie représente des précurseurs éosinophiles à différents stades de maturation, ainsi que quelques cellules blastiques et quelques cellules contaminantes. Les lames ont été observées à l'objectif x100 en immersion.

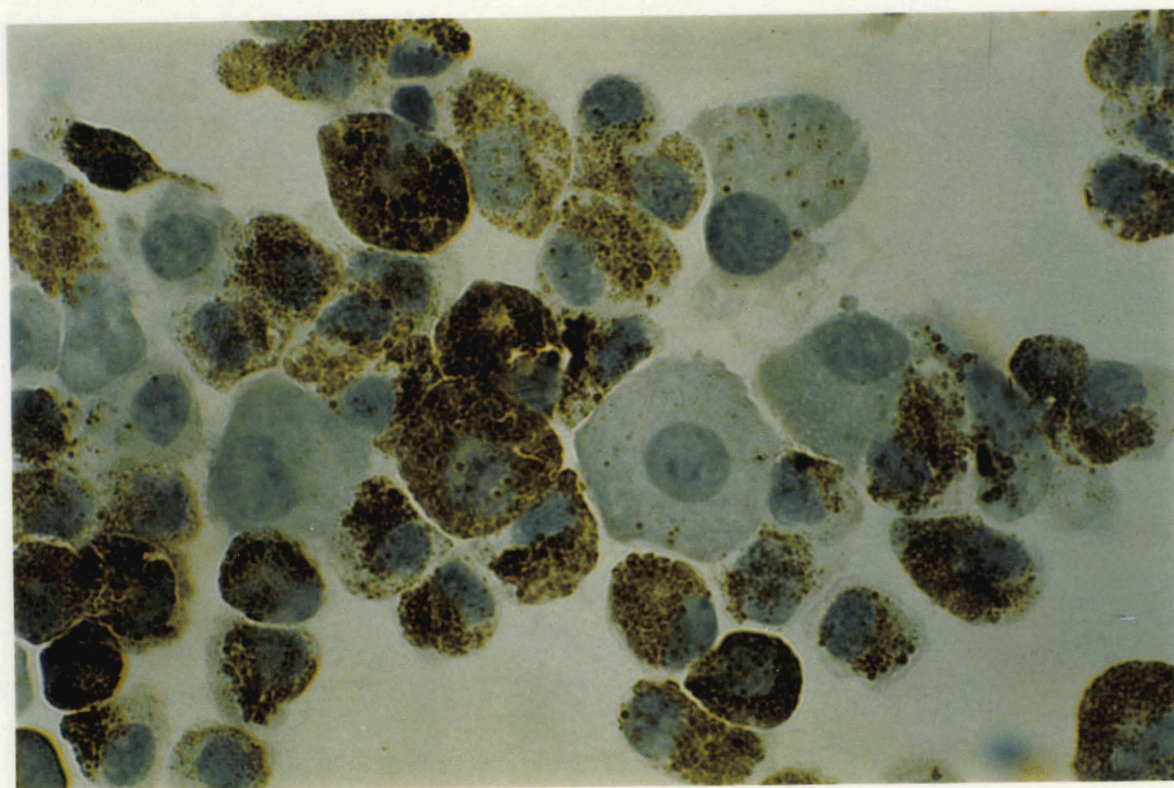


Figure 35B: Cellules de sang de cordon cultivées en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 pendant 18 jours (idem figure 35A). Les cellules ont subies la coloration spécifique de la peroxydase de la peroxydase de l'éosinophile. Les précurseurs éosinophiles sont ainsi plus distiguables des autres cellules. Les lames ont été observées à l'objectif x100 en immersion.

du DAB (3'3' diaminobenzidine tétracloryde) et du NaCN en présence d' H_2O_2 . Le peroxyde d'oxygène est utilisé comme substrat de la peroxydase libérant de l'oxygène libre qui s'associe au DAB pour donner une coloration brune/orangée. Le noyau cellulaire est ensuite coloré pendant une minute par une solution d'hématoxyline de Harris. Entre chaque étape les lames sont rincées à l'eau puis séchées à l'air (Fig 35).

2- Analyse de l'ADN et de l'ARN

2-1 Northern Blot

L'ARN total des cellules est préparé en utilisant la méthode décrite par Chirgwin⁽³⁵⁶⁾. Les cellules sont lysées par une solution de guanidium (Guanidium thiocyanate 4,7 M; sarkosyl 1%; acétate de sodium 10 mM, pH 5; EDTA 5 mM, pH 8; β -mercaptoéthanol 5%). 3,5 ml d'homogénat sont déposés sur un coussin de 1,2 ml d'une solution de chlorure de césium de densité 1,81 contenant 10 mM d'acétate de sodium à pH 5 et 5 mM d'EDTA à pH 8. Les tubes sont ensuite ultracentrifugés à 35000 tours/mn pendant 20 heures à 15°C. Le culot est resuspendu dans un volume d'eau puis précipité avec deux volumes d'éthanol à 100% et 0,1 volume d'acétate de sodium 5 M, pH 5 pendant une nuit à -20°C. L'ARN est ensuite centrifugé, puis lavé avec de l'éthanol à 70%. Enfin, le culot est séché puis dissout dans de l'eau et ramené à une concentration de 2 μ g d'ARN par μ l.

L'ARN (5 μ l soit 10 μ g) est ensuite déposé sur un gel d'agarose à 1,2 % en tampon MOPS et en présence de formaldéhyde⁽³⁵⁷⁾. Le tampon MOPS est constitué d'une solution contenant 20 mM d'acide 3-[N-morpholino]

-propanesulfonique, 5 mM d'acétate de sodium et de 1 mM d'EDTA. La formaldéhyde permet de dénaturer l'ARN afin d'éviter la formation de structure secondaire. Après une électrophorèse de 2 à 3 heures à 80 Volts, le gel d'agarose est rincé deux fois par 200 ml de 10X SSPE (1X SSPE: 180 mM NaCl; 10 mM phosphate de sodium pH 7,7; 0,1 mM EDTA). L'ARN est ensuite transféré sur une membrane de nylon par flux passif de 10X SSPE pendant 1 nuit, puis fixé à la membrane de façon covalente par exposition de 3 mn aux ultra-violets. La membrane de nylon est ensuite conservée à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2-2 Southern Blot

L'ADN cellulaire est préparé de la façon suivante: les cellules sont lysées par un tampon contenant 0,5% de Nonidet P40 (NP40) pendant 10 mn à 4°C puis centrifugées. Le culot est resuspendu dans une solution contenant 10 mM de Tris pH 7,5; 10 mM de NaCl; 25 mM d'EDTA; 100 µg/ml de Protéinase K et 1% de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) puis incubé à 37°C pendant 2 heures. Après extraction phénol/chloroforme, la solution d'ADN subit l'action d'une RNase (ribonucléase) pendant 30 mn à 37°C. Après une seconde extraction phénol/chloroforme, l'ADN est précipité par l'éthanol puis lavé et dosé. A ce stade, l'ADN est conservé à 4°C. Il peut ensuite être utilisé pour une amplification génique ou une digestion enzymatique puis subir un Southern Blot.

Dans la technique du Southern blot, l'ADN est séparé sur gel d'agarose en tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) sous l'action d'un champ électrique. Après électrophorèse, le gel est plongé dans une solution contenant 1,5 mM NaCl et 1,5 M NaOH pendant 30 mn afin de dénaturer l'ADN. La neutralisation s'effectue pendant 30 mn en présence de 1,5 M NaCl et 1 M Tris pH 7,5. L'ADN est ensuite

transféré sur une membrane de nylon, comme dans le cas de l'ARN par flux passif d'une solution de 10X SSPE pendant une nuit. L'ADN est ensuite fixé de façon covalente à la membrane par exposition pendant 3 mn aux ultra-violets. La membrane de nylon est alors conservée à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2-3 Amplification génique ou PCR

L'amplification s'effectue sur 1 µg d'ADN dans un volume final de 100 µl. Le mélange réactionnel est composé de 200 µM de chaque déoxynucléotide; 1 µM de chaque amorce (ou primer); 2,5 U de Taq polymérase dans un tampon constitué de 10 mM de Tris-HCl pH 8; de 50 mM de KCl; de 1,5 mM MgCl₂ et de 0,01% de gélatine. Ce mélange est ensuite couvert par de l'huile minérale afin d'éviter l'évaporation. Les tubes subissent ensuite un chauffage à 95°C afin de dénaturer l'ADN puis une succession de 40 cycles de température. Un cycle se décompose de la façon suivante: 2 mn à 55°C, permettant aux amorces de se fixer sur les séquences d'ADN complémentaires, puis 1 mn à 72°C, température optimale de la polymérase et enfin 2 mn à 95°C afin de dénaturer les nouveaux brins d'ADN synthétisés. Le dernier cycle se termine par un passage de 7 mn à 72°C afin de permettre à la polymérase de terminer la synthèse de tous les fragments d'ADN amplifiés. La solution est ensuite analysée par Southern Blot permettant de connaître la taille des fragments amplifiés puis par hybridation, permettant de déterminer la spécificité de ces fragments. Le tableau 9 représente les caractéristiques des amorces et des sondes utilisées pour l'amplification et la détection des régions gag, pol et tax d'HTLV-I.

Nom	Séquence	Nature	Position	Fragment amplifié
Gag	ATCCTCCAAGGCCTGGAGGA TGACAAGCCCGCAACATAT CTGCCAGAAGGCACGCCCAAAGACC	amorce 5' amorce 3' sonde	1596-1616 1781-1800 1666-1691	203 pb
Pol A	AACCCAGTATTCCCAGTTAA AGAATGTCATCCATGTACTG ACCCTTGGGGTAGTACTTT	amorce 5' amorce 3' sonde	2680-2699 3052-3071 2947-2965	391 pb
Pol B	TACAAAGGCATACTGATCCC CAGGGTTTGGACTAGTCTA TGACAGGGCCTGCCGCAGCTGCACT	amorce 5' amorce 3' sonde	3365-3384 3465-3483 3426-3460	119 pb
Tax	CTGGCCACCTGTCCAGAGCA GGGTAAGGACCTTGAGGGTC CACCTGGGACCCCCATCGATGGACGCG	amorce 5' amorce 3' sonde	7432-7452 7552-7572 7458-7484	138 pb

Tableau 9: Séquences et positions* des oligonucléotides spécifiques des régions Gag, Pol et Tax du génome d'HTLV-I, utilisés dans les expériences d'amplification génique.

* D'après la séquence publiée par Seiki et collaborateur: **Seiki, M., Hattori, S. and Yoshida, M. (1982).** Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. Proc Natl Acad Sci USA: **79**; 6899-6902.

2-4 Marquage des sondes nucléotidiques et hybridation

2-41 Sondes oligonucléotidiques

L'enzyme utilisée pour le marquage de ce type de sonde est la polynucléotide kinase du phage T4. Elle permet la fixation d'une molécule de phosphate marquée au phosphore 32 du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ à l'extrémité 5' de la sonde oligonucléotidique. La réaction s'effectue dans un tampon composé de 62,5 mM de Tris-HCl pH 7,5; de 10 mM de MgCl_2 et de 5 mM de Dithiothreitol (DTT), en présence de 15 pmoles de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ et de 15 pmoles de la sonde oligonucléotidique et de 1 unité d'enzyme, le volume final étant de 20 μl . La réaction a lieu pendant 30 mn à 37°C.

Hybridation avec une sonde de longueur égale ou supérieure à 40 nucléotides:

Le tampon d'hybridation est composé de: 10% de sulfate de Dextran; 40% de formamide, 0,1% SDS, 4X SSPE, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1X de solution de Denhardt et 20 mg/ml d'ADN de sperme de hareng. La solution de Denhardt est constituée de 0,02% d'albumine bovine, de 0,02% de Ficoll 400 et de 0,02% de polyvinylpyrrolidon. Le filtre de nylon est préhybridé pendant 2 heures à 42°C, puis hybridé en présence de la sonde marquée pendant 1 nuit à 42°C. Trois à quatre lavages de 30 mn sont ensuite réalisés, le premier à température ambiante en présence de 1X SSPE et 0,1% SDS, le second dans le même milieu mais à 42°C, enfin le troisième et/ou le quatrième en présence de 0,1X SSPE et 0,1% SDS à 60-65°C. Le filtre est ensuite légèrement séché puis exposé entre deux écrans intensificateurs à -70°C.

Hybridation avec une sonde de longueur inférieure à 40 nucléotides:

Le tampon d'hybridation est composé de: 0,2% SDS, 6X SSPE et 10X de solution de Denhardt. La préhybridation a lieu pendant 5 mn à 65°C puis l'hybridation est réalisée à 20°C pendant une heure. Les lavages en présence de 6X SSPE sont réalisés pendant 2 à 3 mn en augmentant progressivement la température jusqu'à 50-55°C. Les filtres sont traités ensuite de la même façon que précédemment.

2-42 Sondes d'ADN complémentaire

Ces sondes sont marquées à l'aide de réactifs commercialisés par PHARMACIA (T7QuickPrime). Le protocole utilisé est celui recommandé par le fabricant en utilisant comme source de phosphate marqué le [α - ^{32}P]-dCTP. La préhybridation et l'hybridation des filtres sont réalisées à 65°C dans un tampon d'hybridation commercialisé par AMERSHAM (Rapid hybridization buffer) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Après hybridation, les filtres subissent le traitement décrit dans le paragraphe 2-41.

2-43 Sondes ARN

Le marquage des sondes ARN est également réalisé par utilisation de réactifs commercialisés par STRATAGENE (RNA transcription kit). La préhybridation a lieu à 60-65°C pendant 2 heures et l'hybridation pendant une nuit également à 60-65°C. Le tampon est constitué de 50% formamide, 5X SSPE, 5X de solution de Denhardt, 0,1% SDS et 200 mg/ml d'ADN de sperme de hareng. Trois à quatre lavages de 30 mn sont ensuite réalisés, le premier à température ambiante en présence de 1X SSPE et 0,1% SDS, le second dans le

même milieu mais à 60-65°C, enfin le troisième et/ou le quatrième en présence de 0,1X SSPE et 0,1% SDS à 60-65°C. Le filtre est ensuite légèrement séché puis exposé entre deux écrans intensificateurs à -70°C.

3- Analyse protéique

3-1 Dosage des cytokines

Les dosage de l'IL-1, de l'IL-6, du TNF, de l'IL-3 et du GM-CSF ont été réalisés à l'aide de trousse ELISA gracieusement fournies par la société MEDGENIX. La trousse utilisée pour le dosage de la chaîne alpha soluble du récepteur pour l'IL-2 est commercialisée par la société AMERSHAM. Les résultats sont exprimés en unité pour 100 millions de cellules.

3-2 Fixation covalente du ligand à son récepteur ou "Cross-linking"

Les cellules ($10 \cdot 10^6$) sont lavées trois fois en HBSS puis incubées avec 5 nM d'IL-2 marquée à l'iode 125 (New England Nuclear; activité spécifique: 37,8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) pendant 2 heures à 4°C dans 1 ml de milieu RPMI 1640 contenant 10% SVFd et un inhibiteur de protéase (Aprotinine). Dans les expériences d'inhibition, les cellules sont préincubées à 4°C pendant 2 heures avec un excès d'IL-2 non marquée (1 mM) ou avec un anticorps anti-IL-2R α bloquant le site de fixation de l'IL-2 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Après l'incubation, l'agent permettant la fixation covalente (Disuccinimidyl subérate ou DSS) est additionné à la concentration finale de 2 mM. La réaction est stoppée après 15 mn avec 100 μl de glycine 100 mM puis les cellules sont centrifugées. Le culot cellulaire est lysé par une solution contenant 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl_2 ; 140 mM NaCl et 1% NP40 pendant 30

mn à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est analysé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 10% en présence de SDS et en conditions réductrices. Le gel est ensuite séché puis exposé entre deux écrans intensificateurs à -70°C.

3-3 Immunofluorescence et immunoprécipitation

Ces deux techniques ont été utilisées dans le cadre des cultures virologiques. Elles ont été réalisées avec un sérum polyclonal humain provenant d'un patient séropositif pour HTLV-I.

Dans la technique d'immunofluorescence, les cellules centrifugées sur lames sont fixées avec du méthanol froid pendant 10 mn, rincées par une solution saline et séchées à l'air. Le sérum polyclonal humain est ensuite déposé sur les cellules pendant 30 mn puis les lames sont lavées et séchées. Une solution de bleu Evans diluée au 1/10000 contenant l'anticorps anti immunoglobulines humaines marqué à la fluorescéine est appliqué sur les lames pendant 30 mn. Les lames lavées et séchées sont observées au microscope optique sous un rayonnement ultra-violet.

Dans la technique d'immunoprécipitation, les cellules sont d'abord marquées *in vitro* en présence de cystéine marquée soufre 35 pendant 3 à 4 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot cellulaire resuspendu dans un tampon contenant 5 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,1% SDS; 0,1 mM EDTA et 1% Triton X100; 1% Déoxycholate de sodium. Le surnageant de lyse est incubé pendant 1 heure à 37°C en présence du sérum polyclonal. Après cette première étape, 10 mg de protéine A, couplée à la sépharose, sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant la nuit à 4°C en présence du même tampon. La protéine A ayant fixé le complexe antigène/anticorps est ensuite lavée une dizaine de fois avec le même tampon. Le complexe antigène/anticorps est ensuite dissocié de la

protéine A par chauffage puis déposé sur un gel d'acrylamide à 13% en présence de SDS et en conditions réductrices. Le gel est ensuite séché puis exposé entre deux écrans intensificateurs à -70°C .

3-3 Cytofluorométrie

Après lavages, les cellules (2.10^5) sont resuspendues dans 100 μl d'HBSS et marquées en utilisant une technique indirecte. Elles sont d'abord incubées avec 2 $\mu\text{g/ml}$ d'anticorps de souris spécifique non marqué pendant 30 à 60 mn à 4°C . Après deux lavages en HBSS, les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti immunoglobulines de souris marqué à la fluorescéine pendant 30 mn à 4°C puis lavées deux fois avec de l'HBSS. La quantification de la fluorescence est analysée par cytofluorométrie. Le pourcentage de cellules positives est déterminé par soustraction de la fixation d'un anticorps irrelevant mais de même isotype.

4- Analyse statistique

Les données concernant le dosage de l'IL-2R α soluble dans les sérums de patients sont exprimées en moyenne géométrique $\pm$ l'écart-type à la moyenne. Le test de Student a été utilisé pour comparer les taux solubles d'IL-2R α dans les différents groupes. Les corrélations entre le taux d'IL-2R α et les autres paramètres biologiques (en données logarithmiques) ont été déterminés en utilisant le test non paramétrique de Spearman (une valeur de la variable P inférieure à 0,05 est considérée comme significative).

BIBLIOGRAPHIE

1. Ehrlich P (1879). *Ueber die specifischen granulationen des Blutes*. Arch Anat Physiol Lpz 3 Physiol Abt; 571-579.
2. Spry CJF (1988). *Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature*. Oxford Medical Publications
3. Hardy WR and Anderson RE (1968). *The hypereosinophilic syndromes*. Ann Intern Med; **68**: 1220-1228.
4. Chusid MJ, Dale DC, West BC and Wolf SM (1975). *The hypereosinophilic syndrome*. Medecine; **54**: 1-26.
5. Spry CJF (1982). *The hypereosinophilic syndrome: Clinical features, laboratory findings and treatment*. Allergy; **37**: 539-551.
6. Flaum MA, Schooley RT, Fauci AS and Gralnick HR (1981). *A clinicopathologic correlation of the idiopathic hypereosinophilic syndrome. I. Hematologic manifestations*. Blood; **58**: 1012-1020.
7. Chan LS, Hanson CA and Cooper KD (1991). *Concurrent Eosinophilic Fasciitis and Cutaneous T-Cell Lymphoma - Eosinophilic Fasciitis As a Paraneoplastic Syndrome of T-Cell Malignant Neoplasms*. Arch Dermat; **127**: 862-865.
8. Merlio JP, Demascarel A, Astiergin T, Michenet P, Beylot C and Beylot J (1991). *Eosinophilia Associated with a Composite Lymphoma*. Histopathology; **18**: 363-365.
9. O'Shea J, Jaffe ES, Lane HC, Mc Dermott RP and Fauci AS (1987). *Peripheral T cell lymphoma presenting an hypereosinophilia with vascularitis*. Am J Med; **82**: 539-541.
10. Sato A, Kobayashi K, Okabe H and Fukuda S (1983). *A case of the hypereosinophilic syndrome complicated by malignant lymphoma*. J

Dermatol; 10: 75-80.

11. Fishel RS, Farnen JP, Hanson CA, Silver SM and Emerson SG (1990). *Acute Lymphoblastic Leukemia with Eosinophilia*. Medicine; 69: 232-243.
12. Troxell M and Mills AR (1984). *The hypereosinophilic syndrome in acute lymphocytic leukemia*. Cancer; 54: 1058-1061.
13. Kollegger H, Preis P, Maida E, Zielinski CC, Linkesch W, Bettelheim P and Aiginger P (1986). *CSF cytology of a patient with conversion of an acute lymphatic leukemia to an acute eosinophilic leukemia*. Eur Neurol; 25: 320-326.
14. Yoo TJ, Orman SV, Patil SR, Dorminey C, Needleman S, Rajtora D, Graves N, Ackerman L and Taylor WW (1984). *Evolution to eosinophilic leukemia with a t(5:11) translocation in a patient with idiopathic hypereosinophilic syndrome*. Cancer Genet Cytogenet; 11: 389-4.
15. Watanabe K, Shinbo T, Kojima M, Naito M, Tanahashi N and Nara M (1989). *B-cell lymphoma associated with eosinophilia*. Cancer; 64: 1682-1685.
16. Kim CJ, Park SH and Chi JG (1991). *Idiopathic hypereosinophilic syndrome terminating as disseminated T-cell lymphoma*. Cancer; 67: 1064-1069.
17. Keidan AJ, Catovsky D, Tavares DCJ and Spry CJ (1985). *Hypereosinophilic syndrome preceding T cell lymphoblastic lymphoma*. Clin Lab Haematol; 7: 83-88.
18. Moraillon I, Bagot M, Bourmerias I, Prin L, Wechsler J and Revuz J (1991). *Syndrom Hyperéosinophilique avec pachydermie précédant un lymphome. Traitement par l'interféron alpha*. Ann Dermatol Venereol; 118: 885-886.
19. Shepherd NA, Blackshaw AJ, Hall PA, Bostad L, Coates PJ, Lowe DG,

- Levison DA, Morson BC and Stansfeld AG (1987). *Malignant lymphoma with eosinophilia of the gastrointestinal tract*. Histopathology; **11**: 115-30.
20. Meeker TC, Hardy D, William C, Hogan T and Abrams J (1990). *Activation of the interleukin-3 gene by chromosome translocation in acute lymphoblastic leukemia with eosinophilia*. Blood; **76**: 285-289.
21. Grimaldi JC and Meeker TC (1989). *The t(5;14) chromosomal translocation in a case of acute lymphoblastic leukemia joins the interleukin-3 gene to the immunoglobulin heavy chain gene*. Blood; **73**: 2081-2085.
22. Vadas MA, David JR, Butterworth AE, Pisani NT and T.A. S (1979). *A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of Schistosoma mansoni*. J Immunol; **122**: 1228-1235.
23. Prin L, Capron M, Tonnel AB, Bletry O and Capron A (1983). *Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia*. Int Arch Allergy Appl Immunol; **72**: 336-346.
24. Caulfield JP, Hein A, Rothenberg ME, Owen WF, Soberman RJ, Stevens RL and Austen KF (1990). *A Morphometric Study of Normodense and Hypodense Human Eosinophils That Are Derived In vivo and In vitro*. Am J Pathol; **137**: 27-41.
25. Prin L, Bletry O, Tonnel AB, Gruart V, Bodemer C, Capron M, Guillevin L, Godeau P and Capron A (1987). *Lésions viscérales des hyperéosinophilies*. La presse médicale; **16**: 945-949.
26. Winquist I, Olofsson T, Olsson I, Magperson A and Halberg T (1982). *Altered density, metabolism and surface receptor of eosinophils in*

- eosinophilia. Immunology*; **47**: 531-539.
27. Prin L, Charon J, Capron M, Gosset P, Taelman H, Tonnel AB and Capron A (1984). *Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. Clin Exp Immunol*; **57**: 735-742.
 28. Gruart V, Balloul JM, Prin L, Tomassini M, Loiseau S, Capron A and Capron M (1989). *Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. J Immunol*; **142**: 4416-4421.
 29. Parillo F, Fauci AS and Wolff SM (1978). *Therapy of the hypereosinophilic syndrome. Ann Intern Med*; **89**: 167-178.
 30. Walle AS and Parwaresch MR (1979). *Estimation of effective eosinopoiesis and bone marrow eosinophil reserve capacity in normal man. Cell Tissue Kinet*; **12**: 249-255.
 31. Basten A and Beeson PB (1970). *Mechanism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. J Exp Med*; **131**: 1288-1305.
 32. Saeland S, Caux C, Favre C, Aubry JP, Mannoni P, Pebusque MJ, Gentilhomme O, Otsuka T, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J and De Vries JE (1988). *Effects of recombinant human interleukin-3 on CD34-enriched normal hematopoietic progenitors and on myeloblastic leukemia cells. Blood*; **72**: 1580-1588.
 33. Takaue Y, Kawano Y, Reading CL, Watanabe T, Abe T, Ninomiya T, Shimizu E, Ogura T, Kuroda Y, Yokobayashi A, Nakahata T, Asano S and Ventura G (1990). *Effects of Recombinant Human G-CSF, GM-CSF, Il-3, and Il-1-Alpha on the Growth of Purified Human Peripheral Blood Progenitors. Blood*; **76**: 330-335.
 34. Saeland S, Caux C, Favre C, Duvert V, Pebusque MJ, Mannoni P and De

- Vries JE (1989). *Combined and sequential effects of human IL-3 and GM-CSF on the proliferation of CD34-positive hematopoietic cells from cord blood.* Blood; **73**: 1195-1201.
35. Ema H, Suda T, Nagayoshi K, Miura Y, Civin CI and Nakauchi H (1990). *Target Cells for Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3, and Interleukin-5 in Differentiation Pathways of Neutrophils and Eosinophils.* Blood; **76**: 1956-1961.
36. Fibbe WE, Van Damme J, Billau A, Goselink HM, Voogt PJ, Van Eeden G, Ralph P, Altonic BW and Falkenberg JHF (1988). *Interleukin-1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor.* Blood; **71**: 430-435.
37. Gimble JM, Hudson J, Henthorn J, Hua XX and Burstein SA (1991). *Regulation of Interleukin-6 Expression in Murine Bone Marrow Stromal Cells.* Exp Hematol; **19**: 1055-1060.
38. Bot FJ, Schipper P, Broeders L, Delwel R, Kaushansky K and Löwenberg B (1990). *Interleukin-1-alpha also induces Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in immature normal bone marrow cells.* Blood; **76**: 307-311.
39. Kobayashi M, Imamura M, Gotohda Y, Maeda S, Iwasaki H, Sakurada K, Kasai M, Hapel AJ and Miyazaki T (1991). *Synergistic Effects of Interleukin-1beta and Interleukin-3 on the Expansion of Human Hematopoietic Progenitor Cells in Liquid Cultures.* Blood; **78**: 1947-1953.
40. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y and Ogawa M (1987). *Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of*

- multipotential hemopoietic progenitors. Proc Natl Acad Sci USA; 84: 9035-9039.*
41. Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC and Ogawa M (1988). *Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. Blood; 71: 1759-1763.*
 42. Koike K, Nakahata T, Takagi M, Kobayashi T, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Okano A, Akiyama Y and Akabane T (1988). *Synergism of BSF-2/Interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture. J Exp Med; 168: 879-890.*
 43. Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, Ohara RM, Leary AC, Sibley B, Clark SC, Williams DA and Yang YC (1990). *Molecular Cloning of a cDNA Encoding Interleukin-11, a Stromal Cell-Derived Lymphopoietic and Hematopoietic Cytokine. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 7512-7516.*
 44. Musashi M, Yang YC, Paul SR, Clark SC, Sudo T and Ogawa M (1991). *Direct and Synergistic Effects of Interleukin-11 on Murine Hemopoiesis in Culture. Proc Natl Acad Sci USA; 88: 765-769.*
 45. Musashi M, Clark SC, Sudo T, Urdal DL and Ogawa M (1991). *Synergistic Interactions Between Interleukin-11 and Interleukin-4 in Support of Proliferation of Primitive Hematopoietic Progenitors of Mice. Blood; 78: 1448-1451.*
 46. Sonoda Y, Okuda T, Yokota S, Maekawa T, Shizumi Y, Nishigaki H, Misawa S, Fujii H and Abe T (1990). *Actions of human interleukin-4/B-cell stimulatory factor-1 on proliferation and differentiation of enriched*

- hematopoietic progenitor cells in culture. Blood; 75: 1615-1621.*
47. Vellenga E, De Wolf JTM, Beentjes JAM, Esselink MT, Smit JW and Halie MR (1990). *Divergent effects of interleukin-4 (IL-4) on the granulocyte colony-stimulating factor and IL-3-supported myeloid colony formation from normal and leukemic bone marrow cells. Blood; 75: 633-637.*
 48. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Tushinski R, Mochizuki D, Rubin BY, Gillis S and Williams DE (1988). *Synergistic effects of purified recombinant human and murine B cell growth factor-1/IL-4 on colony formation in vitro by hematopoietic progenitor cells. J Immunol; 141: 3852-3862.*
 49. Caux C, Saeland S, Favre C, Duvert V, Mannoni P and Banchereau J (1990). *Tumor Necrosis Factor-Alpha Strongly Potentiates Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Proliferation of Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells. Blood; 75: 2292-2298.*
 50. Caux C, Favre C, Saeland S, Duvert V, Durand I, Mannoni P and Banchereau J (1991). *Potentiation of Early Hematopoiesis by Tumor Necrosis Factor-alpha Is Followed by Inhibition of Granulopoietic Differentiation and Proliferation. Blood; 78: 635-644.*
 51. Elbaz O, Budel LM, Hoogerbrugge H, Touw IP, Delwel R, Mahmoud LA and Lowenberg B (1991). *Tumor Necrosis Factor Regulates the Expression of Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Receptors on Human Acute Myeloid Leukemia Cells. Blood; 77: 989-995.*
 52. Elbaz O, Budel LM, Hoogerbrugge H, Touw IP, Delwel R, Mahmoud LA and Lowenberg B (1991). *Tumor Necrosis Factor Downregulates*

- Granulocyte-Colony-Stimulating Factor Receptor Expression on Human Acute Myeloid Leukemia Cells and Granulocytes. J Clin Invest; 87: 838-841.*
53. Kitamura T, Takaku F and Miyajima A (1991). *IL-1 up-regulate the expression of cytokine receptors on a factor-dependant human hemopoietic cell line, TF-1. Int Immunol; 3: 571-577.*
 54. Zsebo KM, Wypych J, Mc Niece IK, Lu HS, Smith KA, Kakare SB, Schadev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams R, Stayal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA and Langley KE (1990). *Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic Stem Cell Factor from Buffalo rat liver-conditioned medium. Cell; 63: 195-201.*
 55. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, Mc Niece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, Birkett NC, Smith KA, Johnson MJ, Parker VP, Flores JC, Patel AC, Fisher EF, Erjavec HO, Herrera CJ, Wypych J, Schadev RK, Pope JA, Leslie I, Wen D, Lin CH, Cupples RL and Zsebo KM (1990). *Primary structure and functional expression of rat and human Stem Cell Factor DNAs. Cell; 63: 203-211.*
 56. Ulich TR, Del Castillo J, Yi ES, Yin S, Mc Niece I, Yung YP and Zsebo KM (1991). *Hematologic effects of Stem Cell Factor in vivo and in vitro in rodents. Blood; 78: 645-650.*
 57. McNiece IK, Langley KE and Zsebo KM (1991). *Recombinant Human Stem Cell Factor Synergizes with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and EPO to Stimulate Human Progenitor Cells of the Myeloid and Erythroid Lineages. Exp Hematol; 19: 226-231.*
 58. Bernstein ID, Andrews RG and Zsebo KM (1991). *Recombinant Human*

- Stem Cell Factor Enhances the Formation of Colonies by CD34+ and CD34+lin- Cells, and the Generation of Colony-Forming Cell Progeny from CD34+lin- Cells Cultured with Interleukin-3, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, or Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. Blood; 77: 2316-2321.*
59. Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RL and Juttner CA (1991). *Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. Blood; 78: 30-37.*
60. Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC and Zsebo KM (1991). *Isolation of c-kit Receptor-Expressing Cells from Bone Marrow, Peripheral Blood, and Fetal Liver - Functional Properties and Composite Antigenic Profile. Blood; 78: 1403-1412.*
61. Migliaccio G, Migliaccio AR, Valinsky J, Langley K, Zsebo K, Visser JWM and Adamson JW (1991). *Stem Cell Factor Induces Proliferation and Differentiation of Highly Enriched Murine Hematopoietic Cells. Proc Natl Acad Sci USA; 88: 7420-7424.*
62. Andrews RG, Knitter GH, Bartelmez SH, Langley KE, Farrar D, Hendren RW, Appelbaum FR, Bernstein ID and Zsebo KM (1991). *Recombinant Human Stem Cell Factor, a c-kit Ligand, Stimulates Hematopoiesis in Primates. Blood; 78: 1975-1980.*
63. Miles SA, Lee K, Hutlin L, Zsebo KM and Mitsuyasu RT (1991). *Potential Use of Human Stem Cell Factor as Adjunctive Therapy for Human Immunodeficiency Virus-Related Cytopenias. Blood; 78: 3200-3208.*
64. Sonoda Y, Arai N and Ogawa M (1989). *Humoral regulation of eosinophilopoiesis in vitro: analysis of targets of interleukin-3,*

- granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and interleukin-5. Leukemia; 3: 14-18.*
65. Clutterbuck EJ, Hirst EM and Sanderson CJ (1989). *Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. Blood; 73: 1504-1512.*
66. Saito H, Hatake K, Dvorak AM, Leiferman KM, Donnenberg AD, Arai N, Ishizaka K and Ishizaka T (1998). *Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. Proc Natl Acad Sci USA; 85: 2288-2292.*
67. Warren DJ and Moore MAS (1988). *Synergism among interleukin 1, interleukin 3, and interleukin 5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. J Immunol; 140: 94-99.*
68. Clutterbuck EJ and Sanderson CJ (1990). *Regulation of Human Eosinophil Precursor Production by Cytokines - A Comparison of Recombinant Human Interleukin-1 (rhil-1), rhil-3, rhil-5, rhil-6, and rh Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. Blood; 75: 1774-1779.*
69. Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tominaga A and Takatsu K (1988). *Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. J Exp Med; 167: 43-56.*
70. Dent LA, Strath M, Mellor AL and Sanderson CJ (1990). *Eosinophilia in Transgenic Mice Expressing Interleukin-5. J Exp Med; 172: 1425-1431.*
71. Hitoshi Y, Yamaguchi N, Korenaga M, Mita S, Tominaga A and Takatsu K

- (1991). *In vivo Administration of Antibody to Murine IL-5 Receptor Inhibits Eosinophilia of IL-5 Transgenic Mice*. Int Immunol; **3**: 135-139.
72. Favre C, Saeland S, Caux C, Duvert V and Devries JE (1990). *Interleukin-4 Has Basophilic and Eosinophilic Cell Growth-Promoting Activity on Cord Blood Cells*. Blood; **75**: 67-73.
73. Beeken WL, Northwood I, Beliveau C, Baigent G and Gump D (1987). *Eosinophils of human colonic mucosa: C3b and Fc gamma receptor expression and phagocytic capabilities*. Clin Immunol Immunopathol; **43**: 289-300.
74. Graziano RF, Looney RJ, Shen L and Fanger MW (1989). *Fc-gamma Receptor-mediated killing by eosinophils*. J Immunol; **142**: 230-235.
75. Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, Bradley B and Kay AB (1990). *Fc-gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils*. Immunology; **69**: 264-270.
76. Hartnell A, Kay AB and Wardlaw AJ (1992). *IFN- γ induces expression of Fc γ RIII (CD16) on human eosinophils*. J Immunol; **148**: 1471-1478.
77. Capron M, Tomassini M, Van Der Vorst E, Kusnierz JP, Papin JP and Capron A (1988). *Existence et fonctions d'un récepteur pour l'immunoglobuline A sur les éosinophiles humains*. C R Acad Sci Paris, Série III; **307**: 397-402.
78. Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA and Gleich GJ (1989). *IgA-induced eosinophil degranulation*. J Immunol; **142**: 2393-2400.
79. Capron M, Grangette C, Torpier G and Capron A (1989). *The second receptor for IgE in eosinophil effector function*. Chem Immunol; **147**: 128.
80. Truong MJ, Gruart V, Capron A and Capron M (1992). *Human eosinophils*

- express IgE-binding molecules of the MAC-2 family. Faseb J; 6: 1154.*
81. Hamada A and Greene BM (1987). *C1q enhancement of IgG-dependent eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. J Immunol; 138: 1240-1245.*
82. Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF and Gerard C (1989). *Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. J Biol Chem; 264: 1760-1766.*
83. Changelian PS and Fearon DT (1986). *Tissue-specific phosphorylation of complement receptors CR1 and CR2. J Exp Med; 163: 101-105.*
84. Fischer E, Capron M, Prin L, Kusnierz JP and Kazatchkine M (1986). *Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. Cell Immunol; 97: 297-306.*
85. Kroegel C, Yukawa T, Westwick J and Barnes PJ (1989). *Evidence for two platelet activating factor receptors on eosinophils: discussion between PAF-induced intracellular calcium mobilization degranulation and superoxide anion generation in eosinophils. Biochem Biophys Res Commun; 162: 511-521.*
86. Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O and Kay AB (1986). *Platelet-activating factor: a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. J Clin Invest; 78: 1701-1706.*
87. Kroegel C, Yukawa T, Dent G, Venge P, Chung KF and Barnes PJ (1989). *Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. J Immunol; 142: 3518-3526.*
88. Prin L, Lefebvre P, Gruart V, Capron M, Storme L, Formstecher P, Loiseau S and 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.*
89. Lamas AM, Leon OG and Schleimer RP (1991). *Glucocorticoids Inhibit Eosinophil Responses to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. J Immunol; 147: 254-259.*
90. Wallen N, Kita H, Weiler D and Gleich GJ (1991). *Glucocorticoids Inhibit Cytokine-Mediated Eosinophil Survival. J Immunol; 147: 3490-3495.*
91. Valerius T, Repp R, Kalden JR and Platzer E (1990). *Effects of IFN on Human Eosinophils in Comparison with Other Cytokines - A Novel Class of Eosinophil Activators with Delayed Onset of Action. J Immunol; 145: 2950-2958.*
92. Saito H, Hayakawa T, Yui Y and Shida T (1987). *Effect of human interferon on different functions of human neutrophils and eosinophils. Int Arch Allergy Appl Immunol; 82: 133-140.*
93. Silberstein DS and David JR (1986). *Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. Proc Natl Acad Sci USA; 3: 1055-1059.*
94. Pincus SH, Whitcomb EA and Dinarello CA (1986). *Interaction of IL 1 and TPA in modulation of eosinophil function. J Immunol; 137: 3509-3514.*
95. Lopez AF, Eglinton JM, Gillis D, Park LS and Vadas MA (1989). *Reciprocal inhibition of binding between interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. Proc Natl Acad Sci USA; 86: 7022-7026.*
96. Chihara J, Plumas J, Gruart V, Tavernier J, Prin L, Capron A and Capron

- M (1990). *Characterization of a Receptor for Interleukin-5 on Human Eosinophils - Variable Expression and Induction by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*. J Exp Med; **172**: 1347-1351.
97. Migita M, Yamaguchi N, Mita S, Higuchi S, Hitoshi Y, Yoshida Y, Tomonaga M, Matsuda I, Tominaga A and Takatsu K (1991). *Characterization of the Human IL-5 Receptors on Eosinophils*. Cell Immunol; **133**: 484-497.
98. Ingley E and Young IG (1991). *Characterization of a Receptor for Interleukin-5 on Human Eosinophils and the Myeloid Leukemia Line HL-60*. Blood; **78**: 339-344.
99. Plaetinck G, Vanderheyden J, Tavernier J, Fache I, Tuypens T, Fischkoff S, Fiers W and Devos R (1990). *Characterization of Interleukin-5 Receptors on Eosinophilic Sublines from Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) Cells*. J Exp Med; **172**: 683-691.
100. Nicola NA and Metcalf D (1991). *Subunit Promiscuity Among Hemopoietic Growth Factor Receptors*. Cell; **67**: 1-4.
101. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Vanderheyden J, Fiers W and Plaetinck G (1991). *A Human High Affinity Interleukin-5 Receptor (IL5R) Is Composed of an IL5-Specific alpha-Chain and a beta-Chain Shared with the Receptor for GM-CSF*. Cell; **66**: 1175-1184.
102. Kitamura T, Sato N, Arai K and Miyajima A (1991). *Expression Cloning of the Human IL-3 Receptor cDNA Reveals a Shared beta-Subunit for the Human IL-3 and GM-CSF Receptors*. Cell; **66**: 1165-1174.
103. Gearing DP, King JA, Gough NM and Nicola NA (1989). *Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage*

- colony-stimulating factor. Embo J; 8: 3667-3676.*
104. Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai KI, Yokota T and Miyajima A (1990). *Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 9655-9659.*
105. D'Andrea AD, Fasman GD and Lodish HF (1989). *Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta-chain: A new receptor family. Cell; 58: 1023-1024.*
106. Bazan JF (1989). *A novel family of growth factor receptors: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. Biochem Biophys Res Commun; 164: 788-793.*
107. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG and March CJ (1990). *A New Cytokine Receptor Superfamily. Trends Biochem Sci; 15: 265-270.*
108. Miyazaki T, Maruyama M, Yamada G, Hatakeyama M and Taniguchi T (1991). *The Integrity of the Conserved WS Motif Common to IL-2 and Other Cytokine Receptors Is Essential for Ligand Binding and Signal Transduction. EMBO J; 10: 3191-3197.*
109. Kanakura Y, Druker B, Cannistra SA, Furukawa Y, Torimoto Y and Griffin JD (1990). *Signal Transduction of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Receptors Involves Tyrosine Phosphorylation of a Common Set of Cytoplasmic Proteins. Blood; 76: 706-715.*

-
110. Taketazu F, Chiba S, Shibuya K, Kuwaki T, Tsumura H, Miyazono K, Miyagawa K and Takaku F (1991). *IL-3 Specifically Inhibits GM-CSF Binding to the Higher Affinity Receptor. J Cell Physiol*; **146**: 251-257.
111. Gesner T, Mufson RA, Turner KJ and Clark SC (1989). *Identification Through Chemical Cross-Linking of Distinct Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Receptors on Myeloid Leukemic Cells, kg-1. Blood*; **74**: 2652-2656.
112. Brizzi MF, Avanzi GC, Veglia F, Clark SC and Pegoraro L (1990). *Expression and Modulation of Il-3 and GM-CSF Receptors in Human Growth Factor Dependent Leukaemic Cells. Br J Haematol*; **76**: 203-209.
113. Yukawa T, Ukena D, Kroegel C, Chanez P, Dent G, Chung KF and Barnes PJ (1990). *Beta-2-Adrenergic Receptors on Eosinophils - Binding and Functional Studies. Am Rev Respir Dis*; **141**: 1446-1452.
114. Beer DJ, Matloff SM and Roclin RE (1984). *The influence of histamine on immune and inflammatory responses. Adv Immunol*; **35**: 218-219.
115. Silberstein DS, Ali MH, Baker SL and David JR (1989). *Human eosinophil cytotoxicity-enhancing factor: Purification, physical characteristics, and partial amino acid sequence of an active polypeptide. J Immunol*; **143**: 979-983.
116. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG and Rothlein R (1990). *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. Science*; **247**: 456-459.
117. Kyanaung U, Haskard DO, Poston RN, Thornhill MH and Lee TH (1991). *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Mediate the Adhesion of Eosinophils to Endothelial Cells In*

- vitro and Are Expressed by Endothelium in Allergic Cutaneous Inflammation In vivo.* J Immunol; **146**: 521-528.
118. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derseanthony CP, Klunk D and Schleimer RP (1991). *Adhesion of Human Basophils, Eosinophils, and Neutrophils to Interleukin 1-Activated Human Vascular Endothelial Cells - Contributions of Endothelial Cell Adhesion Molecules.* J Exp Med; **173**: 1553-1556.
119. Walsh GM, Mermoud JJ, Hartnell A, Kay AB and Wardlaw AJ (1991). *Human Eosinophil, But Not Neutrophil, Adherence to IL-1-Stimulated Human Umbilical Vascular Endothelial Cells Is $\alpha 4\beta 1$ (Very Late Antigen-4) Dependent.* J Immunol; **146**: 3419-3423.
120. Dobrina A, Menegazzi R, Carlos TM, Nardon E, Cramer R, Zacchi T, Harlan JM and Patriarca P (1991). *Mechanisms of Eosinophil Adherence to Cultured Vascular Endothelial Cells - Eosinophils Bind to the Cytokine-Induced Endothelial Ligand Vascular Cell Adhesion Molecule-1 via the Very Late Activation Antigen-4 Integrin Receptor.* J Clin Invest; **88**: 20-26.
121. Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chiroso G and Lobb RR (1991). *Human Eosinophil Adherence to Vascular Endothelium Mediated by Binding to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1.* Proc Natl Acad Sci USA; **88**: 7430-7433.
122. Lucey DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller A and Weller PF (1989). *Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus I gp120.* J Exp Med; **169**: 327-332.
123. Lucey DR, Nicholson-Weller A and Weller PF (1989). *Mature human*

- eosinophils have the capacity to express HLA-DR. Proc Natl Acad Sci USA; 86: 1348-1351.*
124. Rand TH, Cruikshank WW, Center DM and Weller PF (1991). *CD4-Mediated Stimulation of Human Eosinophils - Lymphocyte Chemoattractant Factor and Other CD4-Binding Ligands Elicit Eosinophil Migration. J Exp Med; 173: 1521-1528.*
125. Freedman AR, Gibson FM, Fleming SC, Spry CJ and Griffin GE (1991). *Human immunodeficiency virus infection of eosinophils in human bone marrow cultures. J Exp Med; 174: 1661-1664.*
126. Weller PF, C.W. L, Foster DW, Corey EJ, Austen KF and Lewis RA (1983). *Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. Proc Natl Acad Sci USA; 80: 7626-7630.*
127. Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Roddy LL and Wasserman SI (1984). *Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. J Biol Chem; 259: 5526-5530.*
128. Gleich GJ and Adolphson CR (1986). *The eosinophilic leukocyte: structure and function. Adv Immunol; 39: 177-253.*
129. Weller PF, Bach D and Austen KF (1984). *Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). J Biol Chem; 259: 15100-15105.*
130. Peters MS, Rodriguez M and Gleich GJ (1986). *Localization of human eosinophil granule Major Basic Protein, Eosinophil Cationic Protein, and Eosinophil-Derived Neurotoxin by immunoelectron microscopy. Lab Invest; 54: 656-662.*

131. Egesten A, Alumets J, Von Mecklenburg C, Palmegren M and Olsson I (1986). *Localization of Eosinophil Cationic Protein, Major Basic Protein, and Eosinophil Peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopy technique.* J Histochem Cytochem; **34**: 1399-1403.
132. Olsson I, Egesten A, Gullberg U, Lantz M, Stromberg K and Winqvist I (1986). *The biosynthesis of neutrophil and eosinophil granule proteins.* Folia Histochem Cytobiol; **24**: 89-97.
133. Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA, Gleich GJ, Prendergast FG and McKean DJ (1988). *Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule Major Basic Protein.* J Biol Chem; **263**: 12559-12563.
134. Olsson I, Persson AM and Winqvist I (1986). *Biochemical properties of the Eosinophil Cationic Protein and demonstration of its biosynthesis in vitro in marrow cells from patients with an eosinophilia.* Blood; **67**: 498-503.
135. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ and McKean DJ (1986). *Biochemical and functional similarities between Eosinophil-Derived Neurotoxin and Eosinophil Cationic Protein: homology with ribonuclease.* Proc Natl Acad Sci USA; **83**: 3146-3150.
136. Olsen RL and Little C (1983). *Purification and some properties of Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase from human blood.* Biochem J; **209**: 781-787.
137. Barker RL, Gleich GJ and Pease LR (1988). *Acidic precursor revealed in human eosinophil granule Major Basic Protein cDNA.* J Exp Med; **168**: 1493-1498.
138. Rosenberg HF, Ackerman SJ and Tenen DG (1989). *Human Eosinophil Cationic Protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with*

- ribonuclease activity. J Exp Med; 170: 163-176.*
139. Barker RL, Loegering DA, Ten RM, Hamann KJ, Pease LR and Gleich GJ (1989). *Eosinophil Cationic Protein cDNA: comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. J Immunol; 143: 952-955.*
140. Rosenberg HF, Tenen DG and Ackerman SJ (1989). *Molecular cloning of the human Eosinophil-Derived Neurotoxin: a member of the ribonuclease gene family. Proc Natl Acad Sci USA; 86: 4460-4464.*
141. Hamann KJ, Barker RL, Loegering DA, Pease LR and Gleich GJ (1989). *Sequence of human Eosinophil-Derived Neurotoxin cDNA: identity of deduced amino acid sequence with human nonsecretory ribonucleases. Gene; 83: 161-167.*
142. Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP and Gleich GJ (1989). *Molecular cloning of the human eosinophil peroxydase. J Exp Med; 169: 1757-1769.*
143. Barker RL, Loegering DA, Arakawa KC, Pease LR and Gleich GJ (1990). *Cloning and Sequence Analysis of the Human Gene Encoding Eosinophil Major Basic Protein. Gene; 86: 285-289.*
144. Sakamaki K, Tomonaga M, Tsukui K and Nagata S (1989). *Molecular cloning and characterization of chromosomal gene for human Eosinophil Peroxidase. J Biol Chem; 264: 16828-16836.*
145. Hamann KJ, Ten RM, Loegering DA, Jenkins RB, Heise MT, Schad CR, Pease LR, Gleich GJ and Barker RL (1990). *Structure and Chromosome Localization of the Human Eosinophil-Derived Neurotoxin and Eosinophil Cationic Protein Genes - Evidence for Intronless Coding Sequences in the Ribonuclease Gene Superfamily. Genomics; 7: 535-546.*
146. Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA and David JR

- (1979). *Damage to schistosomula of Schistosoma mansoni induced directly by eosinophil Major Basic Protein*. J Immunol; **122**: 221-229.
147. Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA and Butterworth AE (1985). *Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg; **34**: 735-745.
148. Jong EC, Mahmoud AAF and Klebanoff SJ (1981). *Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of Schistosoma mansoni*. J Immunol; **126**: 468-471.
149. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ and Gleich GJ (1989). *Anti-bacterial properties of eosinophil Major Basic Protein and Eosinophil Cationic Protein*. J Immunol; **142**: 4428-4434.
150. Jong EC, Henderson WR and Klebanoff SJ (1980). *Bactericidal activity of eosinophil peroxidase*. J Immunol; **124**: 1378-1382.
151. Nogueira NM, Klebanoff SJ and Cohn ZA (1982). *T. cruzi: sensitization to macrophage killing by Eosinophil Peroxidase*. J Immunol; **128**: 1705-1708.
152. Jong EC and Klebanoff SJ (1980). *Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system*. J Immunol; **124**: 1949-1953.
153. Weiss SJ, Test ST, Eckmann CM, Roos D and Regiani S (1986). *Brominating oxidants generated by human eosinophils*. Science; **243**: 200-203.
154. Mayeno AN, Curran AJ, Roberts RL and Foote CS (1989). *Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents*. J Biol Chem; **264**: 5660-5668.

155. Del Pozo V, De Andreas B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P and Lahoz C (1990). *Murine eosinophils and IL-1: alpha-IL-1 mRNA detection by in situ Hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils.* J Immunol; **144**: 3117-3122.
156. Wong DTW, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, Chiang T, Chou MY, Matossian K, McBride J and Todd R (1990). *Human Eosinophils Express Transforming Growth Factor- α .* J Exp Med; **172**: 673-681.
157. Wong DTW, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, Gordon JR, Rand TH, Galli SJ and Weller PF (1991). *Eosinophils from Patients with Blood Eosinophilia Express Transforming Growth Factor- β 1.* Blood; **78**: 2702-2707.
158. Moqbel R, Hamid Q, Ying S, Barkans J, Abrams JS and Kay AB (1992). *Human eosinophils as cytokine producing inflammatory cells (Abstract 2700).* Faseb J; **6**: 1402.
159. Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS and Gleich GJ (1991). *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Release from Human Peripheral Blood Eosinophils and Neutrophils.* J Exp Med; **174**: 745-748.
160. Moqbel R, Hamid Q, Ying S, Barkans J, Hartnell A, Tsicopoulos A, Wardlaw AJ and Kay AB (1991). *Expression of Messenger RNA and Immunoreactivity for the Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor in Activated Human Eosinophils.* J Exp Med; **174**: 749-752.
161. Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A and Capron M (1991). *Interleukin 5 messenger RNA*

- expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with Coeliac disease. J Exp Med; 175: 293-296.*
162. Rothenberg ME, Owen WFJ, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL (1988). *Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin-3. J Clin Invest; 81: 1986-1992.*
163. Owen WFJ, Rothenberg ME, Silberstein DS, Gasson JC, Stevens RL, Austen KF and Soberman RJ (1987). *Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. J Exp Med; 166: 129-141.*
164. Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K and Suda T (1988). *Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. J Exp Med; 167: 1737-1742.*
165. Silberstein DS, Owen WF, Gasson JC, Di Persio JF, Golde DW, Bina JC, Soberman R, Austen KF and David JR (1986). *Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Immunol; 137: 3290-3294.*
166. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG and Vadas MA (1988). *Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. J Exp Med; 219-224.*
167. Tai PC, Sun L and Spry CJF (1991). *Effects of IL-5, Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and IL-3 on the Survival of Human Blood Eosinophils In vitro. Clin Exp Immunol; 85:*

312-316.

168. Shannon MF, Pell LM, Leonardo MJ, Kuczek ES, Occhiodoro FS, Dunn SM and Vadas MA (1990). *A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes.* Mol Cell Biol; **10**: 2950-2959.
169. Gasson JC (1991). *Molecular Physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.* Blood; **77**: 1131-1145.
170. Lenardo MJ and Baltimore D (1989). *NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control.* Cell; **58**: 227-229.
171. Tsuboi A, Sugimoto K, Yodoi J, Miyatake S, Arai K and Arai N (1991). *A Nuclear Factor NF-GM2 That Interacts with a Regulatory Region of the GM-CSF Gene Essential for Its Induction in Response to T-Cell Activation - Purification from Human T-Cell Leukemia Line Jurkat Cells and Similarity to NF- κ B.* Int Immunol; **3**: 807-817.
172. Miyatake S, Shlomai J, Arai K and Arai N (1991). *Characterization of the Mouse Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Gene Promoter - Nuclear Factors That Interact with an Element Shared by Three Lymphokine Genes - Those for GM-CSF, Interleukin-4 (IL-4), and IL-5.* Mol Cell Biol; **11**: 5894-5901.
173. Arai N, Tsuboi A, Iwai Y, Miyatake S, Yokota K, Malefyt RD, Muramatsu M, Matsuda I, Nishida J, Baldwin D, Koyanonakagawa N, Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Sato N, Hara T, Shlomai J, Yokota T, Miyajima A and Arai (1990). *Regulation of Il-3, Il-4 and GM-CSF Genes and Signal Transduction by Their Receptors.* Lymphokine Res; **9**: 551-553.
174. Schreck R and Baeuerle PA (1990). *Nf-Kappa-B As Inducible*

- Transcriptional Activator of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene. Mol Cell Biol; 10: 1281-1286.*
175. Shoemaker SG, Hromas R and Kaushansky K (1990). *Transcriptional regulation of interleukin 3 gene expression in T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 9650-9654.*
176. Van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC and Young IG (1989). *Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF genes, on human chromosome 5. Blood; 73: 1142-1148.*
177. Kelleher K, Bean K, Clark SC, Leung WY, Yangfeng TL, Chen JW, Lin PF, Luo W and Yang YC (1991). *Human Interleukin-9 - Genomic Sequence, Chromosomal Location, and Sequences Essential for Its Expression in Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV)-I Transformed Human T-Cells. Blood; 77: 1436-1441.*
178. Morgan DA, Ruscetti FW and Gallo R (1976). *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science; 193: 1007-1008.*
179. Smith KA (1980). *T-cell growth factor. Immunol Rev; 51: 337-357.*
180. Robb RJ, Munck A and Smith KA (1981). *T-cell growth factor receptors: quantitation, specificity and biological relevance. J Exp Med; 154: 1455.*
181. Leonard WJ, Krönke M, Pfeffer NJ, Depper JM and Greene WC (1985). *Interleukin-2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA; 82: 6281-6285.*
182. Lotze MT, Matory YT, Rayner AA, Ettinghausen SE, Vetto JT, Seipp CA and Rosenberg CA (1986). *Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in*

- patients with cancer. Cancer; 58: 2764-2772.*
183. McDonald D, Jiang YZ, Gordon AA, Mahendra P, Oskam R, Palmer PA, Franks CR and Barrett AJ (1990). *Recombinant Interleukin-2 for Acute Myeloid Leukaemia in First Complete Remission - A Pilot Study. Leuk Res; 14: 967-973.*
184. Foa R, Meloni G, Tosti S, Novarino A, Fenu S, Gavosto F and Mandelli F (1991). *Treatment of Acute Myeloid Leukaemia Patients with Recombinant Interleukin-2 - A Pilot Study. Br J Haematol; 77: 491-496.*
185. Silberstein DS, Schoof DD, Rodrick ML, Tai P-C, Spry CJF, David JR and Eberlein TJ (1989). *Activation of eosinophils in cancer patients treated with IL-2 and IL-2-generated lymphokine-activated killer cells. J Immunol; 142: 2162-2167.*
186. Sedgwick JB, Frick WE, Sondel PM, Hank JA, Borden E and Busse WW (1990). *The Appearance of Hypodense Eosinophils During Interleukin-2 Treatment. J Allergy Clin Immunol; 85: 557-566.*
187. McDonald D, Gordon AA, Kajitani H, Enokihara H and Barrett AJ (1990). *Interleukin-2 Treatment-Associated Eosinophilia Is Mediated by Interleukin-5 Production. Br J Haematol; 76: 168-173.*
188. Pisani CV, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, Dennin R and Abrams JS (1991). *Administration of Interleukin-2 (IL-2) Results in Increased Plasma Concentrations of IL-5 and Eosinophilia in Patients with Cancer. Blood; 78: 1538-1544.*
189. Enokihara H, Furusawa S, Nakakubo N, Kajitani H, Nagashima S, Saito K, Shishido H, Hitoshi Y, Takatsu K, Noma T, Shimizu A and Honjo T (1989). *T cells from eosinophilic patients produce interleukin-5 with interleukin-2*

- stimulation. Blood; 73: 1809-1813.*
190. Smith KA (1989). *The Interleukin-2 Receptor. Annu Rev Cell Biol; 5: 397-425.*
191. Uchiyama T, Broder S and Waldmann TA (1981). *A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. J Immunol; 126: 1393.*
192. Robb RJ, Greene WC and Rusk CM (1984). *Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2. Implications for the level of Tac-antigen. J Exp Med; 160: 1126-1146.*
193. Leonard WJ, Depper JM, Grabtree GR, Rudikoff S, Pumphrey J, Robb RJ, Krönke M, Svetlik PB, Pepper NJ, Waldmann TA and Greene WC (1984). *Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. Nature; 311: 626-631.*
194. Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, Sabe H, Teshigawara K, Maeda M, Uchiyama T, Yodoi J and Honjo T (1984). *Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. Nature; 311: 631-635.*
195. Cosman D, Cerretti DP, Larsen A, Park L, March L, Dower S, Gillis S and Urdal D (1984). *Cloning, sequencing and expression of human interleukin-2 receptor. Nature; 312: 768-771.*
196. Leonard WJ, Depper JM, Kanehisa M, Krönke M, Pepper NJ, Svetlik PB, Sullivan M and Greene WC (1985). *Structure of the human interleukin-2 receptor gene. Science; 230: 633-639.*
197. Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R and Leonard WJ (1986). *Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high*

- affinity conditions. Science; 234: 859-863.*
198. Tsudo M, Kozak RW, Coldman CK and Waldmann TA (1986). *Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin-2: a potential participant in a multichain interleukin-2 receptor complex. Proc Natl Acad Sci USA; 83: 9694-9698.*
199. Teshigawara K, Wang HM, Kato K and Smith KA (1987). *Interleukin-2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. J Exp Med; 165: 223-238.*
200. Robb RJ, Rusk CM, Yodoi J and Greene WC (1987). *Interleukin-2 binding molecule distinct from the Tac protein: analysis of its role in formation of high-affinity receptors. Proc Natl Acad Sci USA; 84: 2002-2006.*
201. Dukovich M, Wano Y, Bich Thuy LT, Katz P, Cullen BR, Kehrl JH and Greene WC (1987). *A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. Nature; 327: 518-522.*
202. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M and Taniguchi T (1989). *Interleukin-2 receptor beta-chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. Science; 244: 551-556.*
203. Shibuya H, Yoneyama M, Nakamura Y, Harada H, Hatakeyama M, Minamoto S, Kono T, Doi T, White R and Taniguchi T (1990). *The Human Interleukin-2 Receptor Beta-Chain Gene - Genomic Organization, Promoter Analysis and Chromosomal Assignment. Nucleic Acids Res; 18: 3697-3703.*
204. Gnarr JR, Otani H, Wang MG, McBride OW, Sharon M and Leonard WJ (1990). *Human Interleukin-2 Receptor Beta-Chain Gene - Chromosomal*

- Localization and Identification of 5' Regulatory Sequences. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 3440-3444.*
205. Tsudo M, Karasuyama H, Kitamura F, Nagasaka Y, Tanaka T and Miyasaka M (1989). *Reconstitution of a Functional IL-2 Receptor by the Beta-Chain cDNA - A Newly Acquired Receptor Transduces Negative Signal. J Immunol; 143: 4039-4043.*
206. Tsudo M, Karasuyama H, Kitamura F, Tanaka T, Kubo S, Yamamura Y, Tamatani T, Hatakeyama M, Taniguchi T and Miyasaka M (1990). *The IL-2 Receptor Beta-Chain (P70) - Ligand Binding Ability of the cDNA-Encoding Membrane and Secreted Forms. J Immunol; 145: 599-606.*
207. Sharon M, Gnarra JR and Leonard WJ (1990). *A 100-Kilodalton Protein Is Associated with the Murine Interleukin-2 Receptor - Biochemical Evidence That P100 Is Distinct from the Alpha-Chain and Beta-Chain. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 4869-4873.*
208. Colamonici OR, Neckers LM and Rosolen A (1990). *Putative Gamma-Subunit of the IL-2 Receptor Is Detected in Low, Intermediate, and High Affinity IL-2 Receptor-Bearing Cells. J Immunol; 145: 155-160.*
209. Takeshita T, Asao H and Sugarama K (1990). *An associated molecule, p64, with high-affinity interleukin-2 receptor. Int Immunol; 2: 477-480.*
210. Saito Y, Tada H, Sabe H and Honjo T (1991). *Biochemical Evidence for a Third Chain of the Interleukin-2 Receptor. J Biol Chem; 266: 22186-22191.*
211. Sugie K, Nakamura Y, Tagaya Y, Koyasu S, Yahara I, Tkakura K, Kumagai S, Imura H and Yodoi J (1990). *70-75 kd molecules expressed on LGL and T cells recognized by a mitogenic monoclonal antibody YTA-1;*

- co-modulation and functional association with the interleukin-2 receptor p75. Int Immunol; 2: 391-397.*
212. Saragovi H and Malek TR (1990). *Evidence for Additional Subunits Associated to the Mouse Interleukin-2 Receptor P55/P75 Complex. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 11-15.*
213. Fung MR, Searce RM, Hoffman JA, Peffer NJ, Hammes SR, Hosking JB, Schmandt R, Kuziel WA, Haynes BF, Mills GB and Greene WC (1991). *A Tyrosine Kinase Physically Associates with the beta-Subunit of the Human IL-2 Receptor. J Immunol; 147: 1253-1260.*
214. Sharon M, Gnarr JR, Baniyash M and Leonard WJ (1988). *Possible association between IL-2 receptors and class I HLA molecules on T cells. J Immunol; 141: 3512-3515.*
215. Edidin M, Aszalos A, Damjanovich S and Waldman TA (1988). *Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells. J Immunol; 141: 1206-1210.*
216. Burton J, Goldman CK, Rao P, Moos M and Waldmann TA (1990). *Association of Intercellular Adhesion Molecule-1 with the Multichain High-Affinity Interleukin-2 Receptor. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 7329-7333.*
217. Mills GB, Girard P, Grinstein S and Gelfand EW (1988). *Interleukin-2 induces proliferation of T lymphocyte mutants lacking protein kinase C. Cell; 55: 95-100.*
218. Valge VE, Wong JGP, Datlof BM, Sinskey AJ and Rao A (1988). *Protein kinase C is required for responses to T cell receptor ligands but not to*

- interleukin-2 in T cells. Cell; 55: 101-112.*
219. Eardley DD and Koshland ME (1991). *Glycosylphosphatidylinositol - A Candidate System for Interleukin-2 Signal Transduction. Science; 251: 78-81.*
220. Zu Y, Kohno M, Kubota I, Nishida E, Hanaoka M and Namba Y (1990). *Characterization of Interleukin-2 Stimulated 65-Kilodalton Phosphoprotein in Human T-Cells. Biochemistry; 29: 1055-1062.*
221. Saltzman EM, White K and Casnellie JE (1990). *Stimulation of the Antigen and Interleukin-2 Receptors on Lymphocytes-T Activates Distinct Tyrosine Protein Kinases. J Biol Chem; 265: 10138-10142.*
222. Sharon M, Gnarr JR and Leonard WJ (1989). *The beta-chain of the IL-2 receptor (p70) is tyrosine-phosphorylated on YT and HUT-102B2 cells. J Immunol; 143: 2530-2533.*
223. Mills GB, May C, McGill M, Fung M, Baker M, Sutherland R and Greene WC (1990). *Interleukin 2-Induced Tyrosine Phosphorylation - Interleukin-2 Receptor-Beta Is Tyrosine Phosphorylated. J Biol Chem; 265: 3561-3567.*
224. Hatakeyama M, Kono T, Kobayashi N, Kawahara A, Levin SD, Perlmutter RM and Taniguchi T (1991). *Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56lck: identification of a novel intermolecular association. Science; 252: 1523-1528.*
225. Satoh T, Nakafuku M, Miyajima A and Kaziro Y (1991). *Involvement of ras p21 Protein in Signal-Transduction Pathways from Interleukin-2, Interleukin-3, and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, But Not from Interleukin-4. Proc Natl Acad Sci USA; 88: 3314-3318.*
226. Turner B, Rapp U, App H, Greene M, Dobashi K and Reed J (1991).

- Interleukin-2 Induces Tyrosine Phosphorylation and Activation of p72-74 Raf-1 Kinase in a T-Cell Line. Proc Natl Acad Sci USA; 88: 1227-1231.*
227. Audrain M, Boeffard F, Soullillou JP and Jacques Y (1991). *Synergistic Action of Monoclonal Antibodies Directed at p55 and p75 Chains of the Human IL-2-Receptor. J Immunol; 146: 884-892.*
228. Tanaka T, Kishimoto S and Saiki O (1989). *Different induction of p55 and p70/75 interleukin-2 receptor subunits in human cells. Biochem Biophys Res Commun; 167: 686-692.*
229. Plaetinck G, Combe MC, Cortesy P, Sperisen P, Kanamori H, Honjo T and Nabholz M (1990). *Control of IL-2 Receptor-Alpha Expression by IL-1, Tumor Necrosis Factor, and IL-2 - Complex Regulation via Elements in the 5' Flanking Region. J Immunol; 145: 3340-3347.*
230. Shirakawa F, Tanaka Y, Eto S, Suzuki H, Yodoi J and Yamashita U (1986). *Effect of interleukin 1 on the expression of interleukin 2 receptor (Tac antigen) on human natural killer cells and natural killer-like cell line (YT cells). J Immunol; 137: 551-556.*
231. Kaye J, Gillis S, Mizel SB, Shevach EM, Malex TR, Dinarello CA, Lachman LB and Janeway CAJ (1984). *Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: Interleukin-1 is required for the expression of receptors for interleukin-2. J Immunol; 1339-1345: 1339.*
232. Lowenthal JW, Ballard DW, Bogerd H, Böhnlein E and Greene WC (1989). *Tumor necrosis factor-alpha activation of the IL-2 receptor-alpha gene involves the induction of kB-specific DNA binding proteins. J Immunol; 142: 3121-3128.*

-
233. Lee JC, Truneh A, Smith MF and Tsang KY (1987). *Induction of interleukin 2 receptor (Tac) by tumor necrosis factor in YT cells.* J Immunol; **139**: 1935-1938.
234. Jankovic DL, Gibert M, Baran D, Ohara J, Paul WE and Theze J (1989). *Activation by IL-2, but not IL-4, up-regulate the expression of the p55 subunit of the IL-2 receptor on IL-2- and IL-4-dependent T cell lines.* J Immunol; **142**: 3313-3120.
235. Smith KA and Cantrell DA (1985). *Interleukin-2 regulates its own receptors.* Proc Natl Acad Sci USA; **82**: 864-868.
236. Freimuth WW, Depper JM and Nabel GJ (1989). *Regulation of the IL-2 receptor alpha-gene. Interaction of a kB binding protein with cell-specific transcription factors.* J Immunol; **143**: 3064-3068.
237. Martinez OM, Gibbons RS, Garovoy MR and Aronson FR (1990). *IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells.* J Immunol; **144**: 2211-2215.
238. Lindqvist C, Nihlmark EL, Nordstrom T and Andersson LC (1991). *Interleukin-4 Downregulates the p70-Chain of the IL-2 Receptor on Peripheral Blood Mononuclear Cells.* Cell Immunol; **136**: 62-68.
239. Onishi R, Ishikawa T, Kodaka T, Okuma M and Uchiyama T (1991). *Interleukin-3-Induced Downregulation of the Expression of Interleukin-2 Receptor-beta Chain in Human T-Cells.* Blood; **78**: 2908-2917.
240. Krönke M, Leonard WJ, Depper J and Greene WC (1985). *Deregulation of interleukin-2 receptor gene expression in HTLV-I-induced adult T-cell leukemia.* Science; **228**: 1215-1217.
241. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N,

- Arai K-I, Yokota T, Wagasugi H and Yodoi J (1989). *ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction.* Embo J; **8**: 757-764.
242. Tonissen KF and Wells JRE (1991). *Isolation and Characterization of Human Thioredoxin-Encoding Genes.* Gene; **102**: 221-228.
243. Tsudo M, Uchiyama T and Uchino H (1984). *Expression of Tac antigen on activated normal B cells.* J Exp Med; **160**: 612-617.
244. Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M and MacDonald HR (1985). *Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes.* Nature; **315**: 669-672.
245. Ben Aribia MH, Moire N, Metivier D, Vaquero C, Lantz O, Olive D, Charpentier B and Senik A (1989). *IL-2 receptors on circulating natural killer cells and T lymphocytes.* J Immunol; **142**: 490-499.
246. Cox GW, Mathieson BJ, Giardina SL and Varesio L (1990). *Characterization of Il-2 Receptor Expression and Function on Murine Macrophages.* J Immunol; **145**: 1719-1726.
247. Espinoza-Delgado I, Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Sugamura K, Varesio L and Longo DL (1990). *Expression and role of the p75 interleukin 2 receptor on human monocytes.* J Exp Med; **171**: 1821-1826.
248. Malovsky M, Loveland B, North M, Asherson GL, Gao L, Ward P and Fiers W (1987). *Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes.* Nature; **325**: 262-265.
249. Hermann F, Cannistra SA, Levine H and Griffin JD (1985). *Expression of interleukin-2 receptors and binding of interleukin-2 by gamma interferon*

- induced human leukemia and normal monocytic cells. J Exp Med; 162: 1111-1116.*
250. Hancock WW, Muller WA and Cotran RS (1987). *Interleukin-2 receptors are expressed by alveolar macrophages during pulmonary sarcoidosis and are inducible by lymphokine treatment of normal human lung macrophages, blood monocytes and monocyte cell lines. J Immunol; 138: 185-191.*
251. Benveniste EN and Merrill JE (1986). *Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. Nature; 321: 610-613.*
252. Okamoto Y, Minamoto S, Shimizu K, Mogami H and Taniguchi T (1990). *Interleukin-2 Receptor Beta-Chain Expressed in an Oligodendroglioma Line Binds Interleukin-2 and Delivers Growth Signal. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 6584-6588.*
253. Steiner G, Tschachler E, Tani M, Malek TR, Shevach EM, Holter W, Knapp W, Wolff K and Stingl G (1986). *Interleukin-2 receptors on cultured murine epidermal Langerhans cells. J Immunol; 137: 155-159.*
254. Stockinger H, Valent P, Majdic O, Bettelheim P and Knapp W (1990). *Human Blood Basophils Synthesize Interleukin-2 Binding Sites. Blood; 75: 1820-1826.*
255. Maggiano N, Colotta F, Castellino F, Ricci R, Valitutti S, Larocca LM and Musiani P (1990). *Interleukin-2 Receptor Expression in Human Mast Cells and Basophils. Int Arch Allergy Appl Immunol; 91: 8-14.*
256. Visani G, Delwel R, Touw I, Bot F and Löwenberg B (1987). *Membrane receptors for interleukin-2 on hematopoietic precursors in chronic myeloid leukemia. Blood; 69: 1182-1187.*
257. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R

- and Nelson DL (1985). *Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro.* J Immunol; **135**: 3172-3177.
258. Josimovic-Alasevic O, Herrman T and Diamantstein T (1988). *Demonstration of two distinct forms of released low-affinity type interleukin-2 receptors.* Eur J Immunol; **11**: 1855-1857.
259. Miedel ML, Hulmes JD, Weber DW, Bailon P and Pan YC (1988). *Structural analysis of recombinant soluble interleukin-2 receptor.* Biochem Biophys Res Commun; **154**: 372-379.
260. Yasuda N, Lai PK, Ip SH, Kung PC, Hinuma Y, Matsuoka M, Hattori T, Takatsuki K and Purtilo DT (1988). *Soluble IL-2 receptors in sera of Japanese patients with adult T cell leukemia mark activity of disease.* Blood; **71**: 1021-1026.
261. Marcon L, Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Longo DL, Uchiyama T, Edwards BK and Nelson DL (1988). *Elevated serum levels of soluble Tac peptide adult T-cell leukemia: correlation with clinical status during chemotherapy.* Ann Intern Med; **109**: 247-249.
262. Richards JM, Mick R, Latta JM, Daly K, Ratain MJ, Vardiman JW and Golomb HM (1990). *Serum Soluble Interleukin-2 Receptor Is Associated with Clinical and Pathologic Disease Status in Hairy Cell Leukemia.* Blood; **76**: 1941-1945.
263. Rubin LA and Nelson DL (1990). *The Soluble Interleukin-2 Receptor - Biology, Function, and Clinical Application.* Ann Intern Med; **113**: 619-627.
264. Honda M, Kitamura K, Takeshita T, Sugamura K and Tokunaga T (1990). *Identification of a Soluble IL-2 Receptor beta-Chain from Human*

- Lymphoid Cell Line Cells. J Immunol*; **145**: 4131-4135.
265. Fernandez-Botran R (1991). *Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. FASEB J*; **5**: 2567-2574.
266. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC (1980). *Detection and isolation of type C retrovirus particules from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA*; **77**: 7415-7419.
267. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanarama VS and Gallo RC (1981). *Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. Nature*; **294**: 268-271.
268. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D and Gallo RC (1982). *A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant hairy cell leukemia. Science*; **218**: 471-475.
269. Yoshida M, Mioshi I and Hinuma Y (1982). *Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its application in the disease. Proc Natl Acad Sci USA*; **79**: 2031-2035.
270. Kim JH and Durack DT (1988). *Manifestations of human T-lymphotropic virus type I infection. Am J Med*; **84**: 919-927.
271. Catavsky D, Rose M, White JM, Bourikas G, Brownell AI, Blattner WA, Greaves MF, Galton DAG, Mc Cluskey DR, Lampert I, Ireland R, Bridges JM and Gallo RC (1982). *Adult-T-cell lymphoma-leukemia in blacks from the West Indies. Lancet*; **I**: 639-643.
272. Bunn PA, Schechter GP, Jaffe E, Blayney D, Young RC, Matthews MJ, Blattner W, Broder S, Robert-Guroff M and Gallo RC (1983). *Clinical*

- course of retrovirus-associated Adult-T-cell lymphoma. New Eng J Med; 309: 257-264.*
273. Shimoyama M, Minato K, Tobinai K, Nagai M, Setoya T, Takenaka T, Ishihara K, Watanabe S, Hoshino H, Miwa M, Kinoshita M, Okabe S, Fukushima N and Inada S (1983). *Atypical adult T-cell leukemia/lymphoma. Diverse clinical manifestations of T-cell leukemia/lymphoma. Jpn J Clin Oncol; 13, suppl. 2: 165-168.*
274. Nakano S, Ando Y and Saito K (1986). *Primary infection of Japanese infants with adult T-cell leukemia-associated retrovirus (ATLV): evidence for viral transmission from mothers to children. J Infect; 12: 205-212.*
275. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A and De The G (1986). *Antibodies to the human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet; 2: 407-410.*
276. Osame M, Usuku K, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M and Tara H (1986). *HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet; 1: 1031-1032.*
277. Sarma PS and Gruber J (1990). *Human T-cell lymphotropic viruses in human diseases. J Natl Cancer Inst; 82: 1100-1106.*
278. Seiki M, Hattori S and Yoshida M (1982). *Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. Proc Natl Acad Sci USA; 79: 6899-6902.*
279. Chen ISY, Slamon DJ, Rosenblatt JD, Shah NP, Quan SG and Wachsman W (1985). *The x gene is essential for HTLV replication. Science; 229: 54-58.*
280. Seiki M, Eddy R, Shows TB and Yoshida M (1984). *Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukemia cells. Nature;*

309: 640-642.

281. Waldmann TA, Greene WC, Sarin PS, Saxinger C, Blaney DW, Blattner WA, Goldman CK, Bongiovanni K, Sharrow S, Depper J, Leonard W, Uchiyama T and Gallo RC (1984). *Functional and phenotypic comparison of human T cell leukemia/lymphoma virus negative Sezary leukemia, and their distinction using anti-Tac.* J Clin Invest; **73**: 1711-1718.
282. Sodroski J, Rosen C, Goh WC and Haseltine W (1985). *A transcriptional activator protein encoded by the x-lor region of the human T-cell leukemia virus.* Science; **228**: 1430-1434.
283. Yoshida M and Seiki M (1987). *Recent advances in the molecular biology of HTLV-I: trans-activation of viral and cellular genes.* Ann Rev Immunol; **5**: 541-559.
284. Jeang KT, Widen SG, Semmes OJ and Wilson SH (1990). *HTLV-I Trans-Activator Protein, Tax, Is a Trans-Repressor of the Human Beta-Polymerase Gene.* Science; **247**: 1082-1084.
285. Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S and Yoshida M (1986). *Induction of interleukin-2 gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type I.* Embo J; **5**: 2883-2888.
286. Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F and Leonard WJ (1987). *Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of the nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I.* Cell; **49**: 47-56.
287. Fujii M, Sassone-Corsi P and Verma IM (1988). *c-fos promoter trans-activation by the tax1 protein of the human T-cell leukemia virus type I.* Proc Natl Acad Sci USA; **85**: 8526-8530.

-
288. Nimer SD, Gasson JC, Hu K, Smalberg I, Williams JL, Chen ISY and Rosenblatt JD (1989). *Activation of the GM-CSF promoter by HTLV-I and -II tax proteins.* Oncogene; **4**: 671-676.
289. Lilienbaum A, Dodon MD, Alexandre L, Gazzolo L and Paulin D (1990). *Effect of human T-cell leukemia virus type I tax protein on activation of the human vimentine gene.* J Virol; **64**: 256-263.
290. Noma T, Nakukubo H, Sugita M, Kumagai S, Maeda M, Shimizu A and Honjo T (1989). *Expression of different combinations of interleukins by human T-cell leukemic cell lines that are clonally related.* J Exp Med; **169**: 1853-1858.
291. Ishibashi K, Ishitsuka K, Chuman Y, Otsuka M, Kuwazuru Y, Iwahashi M, Utsunomiya A, Hanada S, Sakurami T and Arima T (1991). *Tumor Necrosis Factor-beta in the Serum of Adult T-Cell Leukemia with Hypercalcemia.* Blood; **77**: 2451-2455.
292. Tschachler E, Robert-Guroff M, Gallo RC and Reitz MSJ (1989). *Human T-Lymphotropic Virus I-Infected T-cells constitutively express Lymphotoxin in vitro.* Blood; **73**: 194-201.
293. Lal RB and Rudolph DL (1991). *Constitutive Production of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-alpha from Spontaneously Proliferating T-Cells in Patients with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-I/II.* Blood; **78**: 571-574.
294. Tendler CL, Greenberg SJ, Burton JD, Danielpour D, Kim SJ, Blattner WA, Manns A and Waldmann TA (1991). *Cytokine Induction in HTLV-I Associated Myelopathy and Adult T-Cell Leukemia - Alternate Molecular Mechanisms Underlying Retroviral Pathogenesis.* J Cell Biochem; **46**:

- 302-311.
295. Yodoi J and Tursz T (1991). *ADF, a Growth-Promoting Factor Derived from Adult T-Cell Leukemia and Homologous to Thioredoxin - Involvement in Lymphocyte Immortalization by HTLV-I and EBV.* Adv Cancer Res; **57**: 381-411.
296. Grassmann R, McGuire K, Dokhelar MC, Blechner C, Mullerfleckenstein I, Sodroski J, Haseltine WA and Fleckenstein B (1990). *The X-Region of HTLV-I Cloned in a Herpesvirus Vector Transforms Primary Human Lymphocytes-T to Permanent Growth.* Human Retroviruses; **119**: 61-70.
297. Green JE, Begley CG, Wagner DK, Waldmann TA and Jay G (1989). *Trans Activation of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ant the interleukin-2 receptor in transgenic mice carrying the Human T-Lymphocyte Virus Type I tax gene.* Mol Cell Biol; **9**: 4731-4737.
298. Miura S, Ohtani K, Numata N, Niki M, Ohbo K, Ina Y, Gojobori T, Tanaka Y, Tozawa H, Nakamura M and Sugamura K (1991). *Molecular Cloning and Characterization of a Novel Glycoprotein, gp34, That Is Specifically Induced by the Human T-Cell Leukemia Virus Type-I Transactivator p40tax.* Mol Cell Biol; **11**: 1313-1325.
299. Smith MR and Greene WC (1990). *Identification of HTLV-I Tax Trans-Activator Mutants Exhibiting Novel Transcriptional Phenotypes.* Genes Dev; **4**: 1875-1885.
300. Hidaka M, Inoue J, Yoshida M and Seiki M (1988). *Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-I initiates expression of viral structural proteins, but suppresses expression of regulatory proteins.* Embo J; **7**: 519-523.
301. Kanamori H, Suzuki N, Siomi H, Nosaka T, Sato A, Sabe H, Hatanaka M

- and Honjo T (1990). *HTLV-1 p27rex Stabilizes Human Interleukin-2 Receptor Alpha-Chain Messenger RNA*. Embo J; **9**: 4161-4166.
302. Ciancolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S and Snyderman R (1985). *Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins*. Science; **230**: 453-456.
303. Reiher WE, Blalock JE and Brunk TK (1986). *Sequence homology between acquired immunodeficiency syndrome virus envelope protein and interleukin-2*. Proc Natl Acad Sci USA; **83**: 9188-9192.
304. Prin L, Leguern M, Ameisen JC, Saragosti S, Bletry O, Fenaux P, Levy JP and Capron A (1988). *HTLV-I and malignant hypereosinophilic syndrome*. Lancet; **2**: 569.
305. Mioshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K and Hinuma Y (1981). *Type C virus particules in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukeamic T cells*. Nature; **294**: 770-771.
306. Oster W and Schulz G (1991). *Interleukin-3 - Biological and Clinical Effects*. Int J Cell Cloning; **9**: 5-23.
307. Sanderson CJ, Campbell HD and Young JG (1988). *Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (Interleukin-5) and its effects on human and mouse B cells*. Immunol Rev; **12**: 29-50.
308. Limaye AP, Abrams JS, Silver JE, Ottesen EA and Nutman TB (1990). *Regulation of Parasite-Induced Eosinophilia - Selectively Increased Interleukin-5 Production in Helminth-Infected Patients*. J Exp Med; **172**: 399-402.
309. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P and Cheever AW (1990).

- Interleukin-5 Is Required for the Blood and Tissue Eosinophilia But Not Granuloma Formation Induced by Infection with Schistosoma-mansoni. Proc Natl Acad Sci USA; 87: 61-65.*
310. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK, Quint DJ and Kay AB (1991). *Expression of Messenger RNA for Interleukin-5 in Mucosal Bronchial Biopsies from Asthma. J Clin Invest; 87: 1541-1546.*
311. Yamaguchi Y, Suda T, Shiozaki H, Miura Y, Hitoshi Y, Tominaga A, Takatsu K and Kasahara T (1990). *Role of IL-5 in IL-2-Induced Eosinophilia - In vivo and In vitro Expression of IL-5 Messenger RNA by IL-2. J Immunol; 145: 873-877.*
312. Enokihara H, Kajitani H, Nagashima S, Tsunogake S, Takano N, Saito K, Furusawa S, Shishido H, Hitoshi Y and Takatsu K (1990). *Interleukin-5 Activity in Sera from Patients with Eosinophilia. Br J Haematol; 75: 458-462.*
313. Owen WF, Rothenberg ME, Petersen J, Weller PF, Silberstein D, Sheffer AL, Stevens RL, Soberman RJ and Austen KF (1989). *Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. J Exp Med; 170: 343-348.*
314. Murphy PT, Fennelly DF, Sturart M and O'Donnell JR (1990). *Alpha interferon In a case of hypereosinophilic syndrome. Br J Haematol; 75: 619-620.*
315. Zielinski RM and Lawrence WD (1990). *Interferon alpha for the hypereosinophilic syndrome. Ann Intern Med; 113: 716-718.*
316. Broxmeyer HE, Lu L, Platzer E, Feit C, Juliano L and Berish RY (1983).

- Comparative analysis of the influences of human gamma, alpha, and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells. J Immunol; 131: 1300-1305.*
317. Motoi T, Uchiyama T, Hori T, Itoh K, Uchino H and Ueda R (1989). *Elevated serum-soluble interleukin-2 receptor (Tac antigen) levels in Chronic Myelogenous Leukemia Patients with blastic crisis. Blood; 74: 1052-1057.*
318. Chilosi M, Semenzato G, Vinante F, Menestrina F, Piazzola E, Focchiatti V, Sabbioni R, Zanotti R and Pizzolo G (1989). *Increased levels of soluble interleukin-2 receptor in Non-Hodgkin's lymphomas. Am J Clin Pathol; 1989: 186-191.*
319. Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, Vander Bos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, Wignall JM, Smith C, Gallis B, Sims JE, Urdal D, Widmer MB, Cosman D and Park LS (1989). *The murine interleukin-4 receptor: Molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. Cell; 59: 335-348.*
320. Galizzi JP, Zuber CE, Harada N, Gorman DM, Djossou O, Kastelein R, Banchereau J, Howard M and Miyajima A (1990). *Molecular Cloning of a cDNA Encoding the Human Interleukin-4 Receptor. Int Immunol; 2: 669-675.*
321. Goodwin RG, Friend D, Zielger S, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE and Park LS (1990). *Cloning of the human and murine interleukin-7 receptor: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. Cell; 60: 941-951.*

-
322. Loughnan MS, Sanderson CJ and Nossal GJV (1988). *Soluble interleukin 2 receptors are released from the cell surface of normal B lymphocytes stimulated with interleukin 5*. Proc Natl Acad Sci USA; **85**: 3115-3119.
323. Dummer R, Posseckert G, Nestle F, Witzgall R, Burger M, Becker JC, Schafer E, Wiede J, Sebald W and Burg G (1992). *Soluble Interleukin-2 Receptors Inhibit Interleukin 2-Dependent Proliferation and Cytotoxicity - Explanation for Diminished Natural Killer Cell Activity in Cutaneous T-Cell Lymphomas In vivo*. J Invest Dermatol; **98**: 50-54.
324. Owenschaub LB, Demars M, Murphy EC and Grimm EA (1991). *IL-2 Dose Regulates TNF-alpha Messenger RNA Transcription and Protein Secretion in Human Peripheral Blood Lymphocytes*. Cell Immunol; **132**: 193-200.
325. Shaw G and Kamen R (1986). *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation*. Cell; **46**: 659-667.
326. Riedel D, Lindemann A, Brach M, Mertelsmann R and Herrmann F (1990). *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-3 Induce Surface Expression of Interleukin-2 Receptor p55-Chain and CD4 by Human Eosinophils*. Immunology; **70**: 258-261.
327. Chihara J, Gruart V, Plumas J, Tavernier J, Kusnierz JP, Prin L, Capron A and Capron M (1992). *Induction of CD23, CD25 and CD4 expression on an eosinophilic cell line (EoL-3) by interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-5 (IL-5)*. Eur Cytokine Netw; **3**: 53-61.
328. Rand TH, Silberstein DS, Kornfeld H and Weller PF (1991). *Human*

- Eosinophils Express Functional Interleukin-2 Receptors. J Clin Invest*; **88**: 825-832.
329. Tompkins MB, Novotney C, Grindem CB, Page R, English R, Nelson P and Tompkins WAF (1990). *Human recombinant interleukin-2 induces maturation and activation signals for Feline eosinophils in vivo. J Leukoc Biol*; **48**: 531-540.
330. Schaafsma MR, Falkenburg JHF, Landegent JE, Duinkerken N, Osanto S, Ralph P, Kaushansky K, Wagemaker G, Vandamme J, Willemze R and Fibbe WE (1991). *In vivo Production of Interleukin-5, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interleukin-6 During Intravenous Administration of High-Dose Interleukin-2 in Cancer Patients. Blood*; **78**: 1981-1987.
331. Sayar D, Ketzinel M, Gerez L, Silberberg C, Reshef A and Kaempfer R (1990). *Expression of the human IL-2 receptor on lymphocytes involves rapid turnover of its p55 α -subunit (Tac). J Immunol*; **145**: 2946-2949.
332. Birchenall-Sparks MC, Farra WL, Rennick D, Kilian PL and Ruscetti FW (1986). *Regulation of the expression of the interleukin-2 receptor on hematopoietic cells by interleukin-3. Science*; **233**: 456-458.
333. Armitage RJ, Lai AP, Roberts PJ and Cawley JC (1986). *Certain myeloid cells possess receptors for interleukin-2. Br J Haematol*; **64**: 799-807.
334. Carron JA and Cawley JC (1989). *IL-2 and myelopoiesis: IL-2 induces blasts cell proliferation in some cases of acute myeloid leukaemia. Br J Haematol*; **73**: 168-172.
335. Schaafsma MR, Fibbe WE, Vanderharst D, Duinkerken N, Brand A, Osanto

- S, Franks CR, Willemze R and Falkenburg JHF (1990). *Increased Numbers of Circulating Hematopoietic Progenitor Cells After Treatment with High-Dose Interleukin-2 in Cancer Patients*. Br J Haematol; **76**: 180-185.
336. Takaki S, Mita S, Kitamura T, Yonehara S, Yamaguchi N, Tominaga A, Miyajima A and Takatsu K (1991). *Identification of the Second Subunit of the Murine Interleukin-5 Receptor - Interleukin-3 Receptor-Like Protein, AIC2B Is a Component of the High Affinity Interleukin-5 Receptor*. EMBO J; **10**: 2833-2838.
337. Levitt LJ, Nagler A, Lee F, Abrams J, Shatsky M and Thompson D (1991). *Production of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor by Human Natural Killer Cells - Modulation by the p75 Subunit of the Interleukin-2 Receptor and by the CD2 Receptor*. J Clin Invest; **88**: 67-75.
338. Gruart V, Truong MJ, Plumas J, Zandecki M, Kusnierz JP, Prin L, Vinatier D, Capron A and Capron M (1992). *Decreased expression of Eosinophil Peroxidase and Major Basic Protein mRNAs during eosinophil maturation*. Blood; **In press**:
339. Triebel F and Hercend T (1991). *L'interleukine 2 en cancérologie*. Rev Prat; **8**: 722-727.
340. Walsh GM, Hartnell A, Moqbel R, Cromwell O, Nagy L, Bradley B, Furitsu T, Ishizaka T and Kay AB (1990). *Receptor Expression and Functional Status of Cultured Human Eosinophils Derived from Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells*. Blood; **76**: 105-111.
341. Bach MK, Brashler JR, Sanders ME, Furitsu T and Ishizaka T (1990). *How Similar Are In vitro Differentiated, Cord Blood Derived Eosinophils to Peripheral Blood Eosinophils - A Comparison of Their Peroxidase and*

- Eosinophil-Derived Neurotoxin Contents and of Their Responses to Various Activators. Int Arch Allergy Appl Immunol; 93: 323-329.*
342. Stefanini M, Claustro JC, Motos RA and Bendigo LL (1991). *Blood and Bone Marrow Eosinophilia in Malignant Tumors - Role and Nature of Blood and Tissue Eosinophil Colony-Stimulating Factor(s) in Two Patients. Cancer; 68: 543-548.*
343. Raghavachar A, Fleischer S, Frickhofen N, Heimpel H and Fleischer B (1987). *T lymphocyte control of eosinophilic granulopoiesis. Clonal analysis in an idiopathic hypereosinophilic syndrome. J Immunol; 139: 3753-3758.*
344. Oka T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Furihata M and Miyoshi I (1990). *Suppressive Effects of Interferons on the Production and Release of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). Arch Virol; 115: 63-73.*
345. Komurian F, Pelloquin F and De Thé G (1991). *In vivo genomic variability of Human T-cell Leukemia Virus Type I depends more upon geography than pathologies. J Virol; 65: 3770-3778.*
346. Hall WW, Liu CRR, Schneewind O, Takahashi H, Kaplan MH, Roupe G and Vahlne A (1991). *Deleted HTLV-I Provirus in Blood and Cutaneous Lesions of Patients with Mycosis Fungoides. Science; 253: 317-320.*
347. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K and Uchino H (1977). *Adult-T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood; 50: 481-492.*
348. Vukelja SJ, Weiss RB, Perry DJ and Longo DL (1988). *Eosinophilia associated with Adult T-cell Leukemia/lymphoma. Cancer; 62: 1527-1530.*
349. Kaplan MH, Hall WW, Susin M, Pahwa S, Salahuddin SZ, Heilman C, Fetteen J, Coronesi M, Farber BF and Smith S (1991). *Syndrome of Severe Skin*

- Disease, Eosinophilia, and Dermatopathic Lymphadenopathy in Patients with HTLV-II Complicating Human Immunodeficiency Virus Infection. Am J Med; 91: 300-309.*
350. Lewis MG, Kociba GJ, Rojko JL, Stiff MI, Haberman AB, Velicer LF and Olsen RG (1985). *Retroviral-associated eosinophilic leukemia in the cat. Am J Vet Res; 46: 1066-70.*
351. Morita M, Saito H, Honjo T, Saito Y, Tsuruta S, Kim KM, Tanaka M, Mori KJ, Mayumi M and Mikawa H (1991). *Differentiation of a Human Eosinophilic Leukemia Cell Line (EoL-1) by a Human T-Cell Leukemia Cell Line (HIL-3)-Derived Factor. Blood; 77: 1766-1775.*
352. Levitt LJ, Reyes GR, Moonka DK, Bensh K, Miller RA and Engleman EG (1988). *Human T cell leukemia virus-I-associated T-suppressor cell inhibition of erythropoiesis in a patient with pure red cell aplasia and chronic T γ -lymphoproliferative disease. J Clin Invest; 81: 538-548.*
353. Rothenberg ME, Owen WFJ, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL (1987). *Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. Science; 237: 645-647.*
354. Kaplan ME, Woodson M and Clark C (1980). *Detection of human T lymphocytes by rosette formation with AET-treated sheep red cells. In: Bloom, BR, David, JR In vitro methods in cell mediated ant tumor immunity; 83-88.*
355. Zucker-Franklin D and Grusky G (1976). *The identification of eosinophil colonies in soft agar cultures by differential staining for peroxidase. J Histochem Cytochem; 24: 1270-1275.*
356. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Rutter WJ (1979). *Isolation*

of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry; 18: 5294-5299.

357. Lehrach H, Diamond D, Wozney JM and Boedtker H (1977). *RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry; 16: 4743-4751.*

FIGURES
et
TABLEAUX

Figure 1: D'une cellule souche au précurseur mixte granulocyte/macrophage	p 23
Figure 2: D'un précurseur mixte granulocyte/macrophage à l'éosinophile	p 27
Figure 3: Composants membranaires et récepteurs de l'éosinophile	p 32
Figure 4: Médiateurs de l'éosinophile	p 39
Figure 5: Représentation schématique des mécanismes de transduction induits par l'IL-2	p 50
Figure 6: Représentation schématique des mécanismes d'expression des chaînes alpha et bêta de l'IL-2R	p 52
Figure 7: Représentation schématique de virus HTLV-I	p 58
Figure 8: Organisation génomique du virus HTLV-I: Transcription et Epissage alternatif	p 60
Figure 9: Organisation génomique du virus HTLV-I: Expression des protéines virales	p 62
Figure 10: Distribution des éosinophiles hypodenses en fonction des Hyperéosinophilies	p 69
Figure 11: Taux de récepteur soluble pour l'interleukine 2 en fonction de la pathologie	p 70
Figure 12: Corrélation entre les taux d'IL-2R soluble et l'éosinophilie	p 72
Figure 13: Effet de l'interféron alpha sur l'éosinophilie et les taux d'IL-2R	p 73
Figure 14: Analyse en Northern blot des ARN messagers des cellules mononucléées des patients avec les sondes IL-2R α/β , IL-5, GM-CSF, TNF α/β et ADF	p 78
Figure 15: Analyse en immunofluorescence de la présence d'antigènes HTLV-I sur les cellules de patients	p 81

-
- Figure 16: Analyse en radioimmunoprécipitation de la présence d'antigènes HTLV-I sur les cellules de la lignée Do p 81
- Figure 17: Détection par PCR de séquences rétrovirales dans le génome des cellules de patients p 83
- Figure 18: Analyse en Southern blot de la l'ADN de la lignée Do avec les sondes gag, pol et env d'HTLV-I p 85
- Figure 19: Représentation schématique de la carte de restriction de l'ADN du virus HTLV-I p 86
- Figure 20: Analyse en microscopie électronique du virus infectant les cellules du patient Do p 88
- Figure 21: Effet de la thérapie par l'interféron alpha du patient Do p 89
- Figure 22: Analyse en cytométrie de l'expression de l'IL-2R par l'éosinophile p 91
- Figure 23: Caractérisation de l'IL-2R à la surface de l'éosinophile p 93
- Figure 24: Analyse de l'expression de la chaîne alpha de l'IL-2R au niveau de l'ARN messenger des éosinophiles p 95
- Figure 25: Analyse de l'expression des chaînes alpha et bêta de l'IL-2R au niveau de l'ARN messenger des éosinophiles p 95
- Figure 26: Effet de l'IL-2 sur la différenciation des éosinophiles p 97
- Figure 27: Effet dose de l'IL-2 sur l'inhibition de la différenciation: Condition A. p 99
- Figure 28: Effet dose de l'IL-2 sur l'augmentation de la différenciation: Condition B. p101
- Figure 29: Dosages des médiateurs dans les surnageants de culture: Conditions A et B. p103

Figure 30: Action séquentielle de l'IL-2 au cours de la différenciation:

Condition C. p105

Figure 31: Analyse en cytofluorométrie de l'expression de l'IL-2R par les

cellules du sang de cordon (C) p108

Figure 32: Analyse de l'expression de l'IL-2R, du TNF et de l'EPO par les

cellules du sang de cordon (C), au niveau transcriptionnel p110

Figure 33: Illustration de la technique de purification des éosinophiles

p150

Figure 34: Photographies d'éosinophiles purifiés

p152

Figure 35: Photographies de cellules de sang de cordon en cours de

différenciation vers la lignée éosinophile p155

Tableau 1: Caractéristiques biochimiques, moléculaires et cellulaires du
récepteur pour l'interleukine 2

p 46

Tableau 2: Pathologie et formule cellulaire sanguine de quatre patients

p 75

Tableau 3: Analyse de l'effet de la stimulation par l'IL-2 sur les cellules

mononucléées de patients après purification p 75

Tableau 4: Analyse en cytométrie de l'expression de l'IL-2R par l'éosinophile

p 91

Tableau 5: Formule cellulaire du sang de cordon: Condition A.

p 99

Tableau 6: Formule cellulaire du sang de cordon: Condition B.

p101

Tableau 7: Formule cellulaire du sang de cordon: Condition C.

p105

Tableau 8: Analyse en cytofluorométrie de l'expression de l'IL-2R, du CD34

et du CD33 par les cellules du sang de cordon: Condition C p108

Tableau 9: Amorces et sondes spécifiques d'HTLV-I

p159

TABLE des MATIERES

SOMMAIRE GENERAL	p 3
REMERCIEMENTS	p 5
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	p 7
ABREVIATIONS	p 11
INTRODUCTION	p 13
<u>Première Partie: Le syndrome hyperéosinophilique et</u>	
L'éosinophile	p 17
1- Pathologie et traitement	p 18
2- Contrôle de l'éosinopoïèse	p 21
2-1 Différenciation d'une cellule souche en précurseur mixte granulocyte/macrophage (CFU-GM)	p 22
2-2 Des progéniteurs mixtes granulocyte/macrophage (CFU-GM) aux éosinophiles	p 26
3- Les récepteurs et les médiateurs de l'éosinophile	p 29
3-1 Les récepteurs	p 29
3-11 Les récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines	p 30
3-12 Les récepteurs pour le complément	p 31
3-13 Les récepteurs pour les médiateurs lipidiques	p 31
3-14 Les récepteurs pour les stéroïdes	p 31
3-15 Les récepteurs pour les interleukines	p 33
3-16 Les autres récepteurs	p 35

3-2 Les composants membranaires	p 36
3-21 Les molécules d'adhésion	p 36
3-22 Les protéines CD4 et HLA-DR	p 37
3-3 Les médiateurs	p 37
3-31 Les médiateurs lipidiques	p 38
3-32 Les enzymes	p 38
3-33 Les protéines cationiques	p 38
3-34 Les cytokines	p 40
 <u>Deuxième Partie: Le Récepteur pour l'Interleukine 2</u>	 p 43
1- La structure	p 44
2- Les protéines associées	p 48
3- Les mécanismes de transduction	p 49
4- La régulation de l'expression de l'IL-2R	p 51
5- La distribution cellulaire	p 53
6- Les formes solubles de l'IL-2R	p 54
 <u>Troisième Partie: Le Rétrovirus HTLV-I</u>	 p 56
1- Epidémiologie, transmission et pathologie	p 57
2- Organisation génomique	p 59
3- La transformation cellulaire induite par HTLV-I	p 61
4- Immunodéficience associée à HTLV-I	p 65

RESULTATS	p 67
1- Activation lymphocytaire dans l'HES	p 68
1-1 Distribution des éosinophiles en fonction des hyperéosinophilies	p 68
1-2 Taux de récepteur soluble pour l'IL-2 en fonction de la pathologie	p 68
1-3 Relation entre les taux d'éosinophiles et les taux d'IL-2Rs	p 71
1-4 Activation lymphocytaire	p 72
2- Infection rétrovirale et hyperéosinophilie	p 80
2-1 Présence de séquences rétrovirales dans l'ADN des cellules de patients	p 80
2-2 Cultures cellulaires	p 80
2-3 Etablissement d'un clone cellulaire transformé par HTLV-I	p 84
2-4 Pathologie du patient Do	p 87
3- Expression du récepteur pour l'IL-2 par l'éosinophile	p 90
3-1 Expression membranaire de la chaîne alpha de l'IL-2R sur l'éosinophile	p 90
3-2 Expression de l'IL-2R au niveau transcriptionnel	p 92
4- Effets de l'IL-2 sur l'éosinopoïèse	p 96
4-1 Effet de l'IL-2 sur la différenciation	p 96
4-2 Effet dose de l'IL-2	p 98
A- Effet sur l'inhibition de la différenciation	p 98
B- Effet sur la stimulation de la différenciation	p 100

4-3 Dosages de médiateurs dans les surnageants de culture	p 102
4-4 Action séquentielle de l'interleukine 2	p 104
DISCUSSION	p 111
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p 143
MATERIEL ET METHODES:	p 148
1- Purification et culture cellulaires:	p 149
1-1 Les éosinophiles	p 149
1-2 Les cellules mononucléées	p 151
1-21 Culture en présence d'IL-2	p 151
1-22 Culture virologique	p 153
1-3 Les cellules de sang de cordon ombilical	p 153
2- Analyse de l'ADN et de l'ARN	p 156
2-1 Northern Blot	p 156
2-2 Southern Blot	p 157
2-3 Amplification génique ou PCR	p 158
2-4 Marquage des sondes nucléotidiques et Hybridation	p 160
2-41 Sondes oligonucléotidiques	p 160
2-42 Sondes d'ADN complémentaire	p 161
2-43 Sondes ARN	p 161



3- Analyse protéique	p 162
3-1 Dosage des cytokines	p 162
3-2 Cross-linking ou fixation covalente du ligand à son récepteur	p 162
3-3 Immunofluorescence et immunoprécipitation	p 163
3-3 Cytofluorométrie	p 164
4- Analyse statistique	p 164
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 164
FIGURES ET TABLEAUX	p 216
TABLE DES MATIERES	p 220

