94. 20104180

Université des Sciences et Techniques de Lille I

 $N^{\circ}\ d' or dre$ 

### THESE DE DOCTORAT pour le titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé Option : Immunologie

## Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des récepteurs pour le Fc d'Immunoglobuline E exprimés par les éosinophiles et les plaquettes

## Soussi Gounni Abdelilah

Présentée le 21 Septembre 1995

Membres du Jury: Président : Mme le Pr. G. Spick Rapporteurs : Mr. le Pr. J.-P. Dessaint Mr. le Pr. L. Prin Examinateurs : Mr. le Pr. A. Capron

Mme le Pr. M. Capron



Laboratoire d'accueil:

Unité INSERM U167, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 Rue du Pr. Calmette, Lille. 59019 Cedex. Directeur : Pr. André Capron.

# Sommaire général

Remerciements 4
Publications et communications5
Abréviations7
<i>R é s u m é</i> 8
Introduction générale9
Généralités14
Résultats66
Discussion et perspectives166
<i>Références bibliographiques</i> 172
Tables des matières 194

Je dédie cette thèse, à la mémoire de ma mère..... à mon père à ma femme à mes frères et soeurs à ma grande famille et à tous mes amis 3

Je remercie très chaleureusemnt :

-Monsieur le Pr. André Capron pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de ma très grande considération.

-Mon directeur de thèse, Madame le Pr. Monique Capron, qui par ses qualités d'encadrement et son dynamisme m'a permis de réaliser ce travail au sein du groupe de recherches sur les "Mécanismes Effecteurs" qu'elle anime.

Madame le Pr. Geneviève Spick, qui a bien voulu présider le jury de cette thèse. Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Messieurs les Prs. Jean Paul Dessaint et Lionel Prin, pour avoir lu, commenté et critiqué ce manuscrit. Qu'ils soient assurés de toute mon estime.

#### Je tiens également à remercier

l'ensemble du Personnel du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, et en particulier celui du groupe "Mécanismes Effecteurs" pour leur aide technique et les conseils prodigués pour la réussite de ces travaux.

La Fondation Mérieux pour le soutien financier tout au long de cette thèse.

### **Publications**

Soussi Gounni A, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet J.P & Capron M : High affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites . *Nature* **367**, 183-186, 1994.

**Soussi Gounni A**, Lamkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet J.P, Capron A & Capron M : The high affinity IgE receptor on eosinophils : From allergy to parasites or from parasites to allergy ? *J. All . Clin. Immunol.* **94**, 1214-1216, 1994.(Suppl)

Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Gruart V, Pearce A, Capron A, &Capron M : Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA dependent activation. *Eur. J. Immunol.* 25, 117-125, 1995.

Capron M, Soussi Gounni A, Morita M, Truong MJ, Prin L, Kinet J.P & Capron A Eosinophils : From low to high affinity IgE receptors. *Allergy*. 1995.

Lamkhioued B, Aldebert D, Soussi Gounni A, Delaporte E, Goldman M, Capron A & Capron M : Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* Sous press

Capron M, Desreumaux P, Soussi Gounni A, Lamkhioued B & Capron A : L'éosinophile, bénéfique ou néfaste : une cellule à part entière dans la réponse immunitaire. *C. R. Soc. Biol.*, 188, 39-46, 1994.

Yoichi T, Delaporte E, Dubucquoi S, **Soussi Gounni A**, Porchet E, Capron A & Capron M : Interleukin -5 messenger RNA and immunoreactive protein expression by activated eosinophils in lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest . Dermatol.* **103**, 589-592. 1994.

Capron M, Lamkhioued B, Aldebert D, Soussi Gounni A, Dubost A, Delaporte E & Capron A: Eosinophil functional aspects. *Progress in allergy and Clinical Immunology*. Stockholm, **3**, 26-29, 1994.

**Soussi Gounni A,** Capron M, Kusnierz J.P, Vorng H, Kinet J.P, Sarfati M, Capron A & Joseph M: High affinity receptor for IgE stimulates cytotoxic functions of human blood platelet . Regulation by CD23. Soumis

Lamkhioued B, **Soussi Gounni A**, Goldman M, Prin L, Capron A, & Capron M : Distinct Eosinophil populations express type1 or Type2 cytokines.*Science*. Soumis

### Communications orales et présentations aux congres

1- Congres de jeunes chercheurs, CRBGC, Toulouse, September 1991. Ciblage du gène codant pour la protéine Kex2 chez Trichoderma reseii.

2- International Congres of Immunology and Clinical Immunology. Stockholm. Juin 1994.

3- Congres des Chercheurs Maghrebins, Hammamet, Novembre, Tunisie 1994. Récepteur de forte affinité FccRI chez l'éosinophile l'humain. Premier prix de la communication orale.

4- American Academy of Allergy and Immunology (AAAI), New York, USA, February, 1994.

Expression of high affinity IgE receptor (FcERI) in human platelets.

## Abréviations

ADDC	: antibody-Dependent Cell- Cytotoxicity		
ARAM	: Antigen Recognition Activation Motif		
ASGPR	: AsialoGlycoProtein Receptor		
BCGF	: B- Cell Growth Factor		
BCR	: B Cell Receptor		
CD23s	: CD23 soluble		
CLC	: Charcot-Leyden Crystal		
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité		
EBV	: Epstein-Barr Virus		
ECP	: Eosinophil Cationic Protein		
EDN	: Eosinophil Derived Neurotoxin		
ELAM	: Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule		
EPO	: Eosinophil Peroxydase		
FAK	: Focal Adhesion Kinase		
FGF	: Fibroblast Growth Factor		
Fn	: Fibronectine		
HES	: Syndrome Hyperéosinophile		
HIV	: Human Immunodeficiency Virus		
HLA	: Human Leukocyte Antigen		
HTLV	: Human T Lymphocyte Virus		
ICAM	: Intercellular Adhesion Molecule		
KDa	: Kilodalton		
Kb	: Kilobase		
LPS	: Lipopolysaccharide		
LTB4	: Leucotriène B4		
MAPK MBP MCP3 MIP	<ul> <li>Mitogen Activated Protein Kinase</li> <li>Major Basic Protein</li> <li>Monocyte Chemottractant Protein 3</li> <li>Macrophage Inflammatory Peptide</li> </ul>		
PAF	: Platelet activating Factor		
Pb	: paire de base		
PF4	: Platelet Factor 4		
PG	: Prostaglandine		
PM	: Poids moléculaire		
RANTES	: Regulated upon Activation in Normal T Cells Expressed and Secreted		
TCR	: T Cell Receptor		
TNF	: Tumor Necrosis Factor		
TRE	: TPA Responding Element		
TX	: Thromboxane		

7

### Résumé

De nombreuses études ont montré que les interactions entre l'IgE et les cellules proinflammatoires, en particulier les éosinophiles et les plaquettes, intervenaient dans les manifestations allergiques ainsi que dans les mécanismes de défense anti-parasitaire. La caractérisation des structures capables de fixer l'IgE a permis de mettre en évidence dans un premier temps le récepteur de faible affinité FceRII, puis la molécule galectine 3 ou Mac 2/eBP à la surface des éosinophiles et des plaquettes. Les travaux réalisés dans notre laboratoire suggéraient l'existence d'une ou plusieurs autres structures capables de fixer l'IgE à la surface de ces deux protagonistes. L'expression du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI) a été longtemps supposée restreinte aux mastocytes et aux basophiles. Cependant, au cours de cette étude, nous avons pu démontrer l'expression et l'implication du récepteur FcERI dans les mécanismes effecteurs des éosinophiles et des plaquettes. Dans la seconde partie de ce travail nous avons cloné et séquencé les ADNc codant pour le récepteur FcERII exprimé par les éosinophiles. Ces isoformes a et b du FceRII/CD23 montrent une totale identité de séquence avec ceux exprimés par les lymphocytes B. Ce résultat est conforté par la détection de la protéine et de l'ARNm in situ. Par la suite, nous avons montré, une diminution de l'expression protéique du FceRI par les éosinophiles, sous l'effet de l'IL-4, l'IL-5, l'IFNy et du CD23s. Chez les plaquettes, le CD23s ainsi que les anticorps anti-CD23 inhibent de manière significative et dose-dépendante la mobilisation du récepteur FcERI. Ces arguments suggèrent un effet régulateur négatif du FceRII sur l'expression du FceRI.

# Introduction générale

L'hypersensibilité de type I selon la classification de Gell et Coombs ou hypersensibilité immédiate est liée à la production d'anticorps IgE contre les antigènes de notre environnement dénuées de toxicité propre, comme le pollen, les poussières de maison ou les poils d'animaux.

Pendant longtemps, l'analyse du déclenchement de la réaction d'hypersensibilité immédiate s'est limitée à l'étude des mastocytes et des basophiles. Ces cellules sensibilisées, par les anticorps IgE spécifiques de l'allergène et fixées par leur récepteur de forte affinité ou récepteur de type I (FcɛRI), libèrent après mobilisation par l'allergène, des médiateurs pharmacologiques qui déclenchent une réaction inflammatoire (Figure 1).

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'hypersensibilité immédiate s'est considérablement améliorée, grâce à la mise en évidence de la contribution d'autres partenaires cellulaires au niveau du site inflammatoire. Ces partenaires participent non seulement aux manifestations cliniques de la phase précoce, caractéristique des désordres allergiques, mais également lors des phases retardées à l'origine des réactions inflammatoires qui leur sont associées. En effet, de nombreuses cellules telles que les éosinophiles, les macrophages, les plaquettes et les neutrophiles sont recrutées par voie sanguine ou à partir de tissus voisins. De même le tissu cible concourt activement au développement de la réaction aigue notamment par les cellules épithéliales et endothéliales.

Outre leur rôle dans la réponse allergique, l'intervention des mêmes cellules inflammatoires dans les processus de défense contre les parasites a été bien étudié, en particulier celui des éosinophiles et des plaquettes. En effet, lors des helminthiases, on assiste à une production d'anticorps IgE accompagnée d'une augmentation du nombre des éosinophiles, aussi bien dans le sang que dans les tissus des hôtes parasités (Figure 2). *In vitro*, les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes sont capables de tuer les larves de schistosome par un mécanisme de type ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) dépendant d'anticorps IgE. Dans ce système, les IgE assurent, outre l'attachement de la cellule effectrice à la cible parasitaire, son activation, via les récepteurs de faible affinité ou (FceRII). Ce phénomène induit la libération de médiateurs cytotoxiques pour la larve parasitaire, tels que les radicaux libres, le PAF dans le cas des plaquettes et, dans le cas des éosinophiles, les protéines basiques des granules (MBP...). Les études épidémiologiques réalisées chez l'homme ont confirmé l'implication des anticorps IgE dans la défense antiparasitaire.

La description d'un récepteur spécifique d'IgE de type II (FcɛRII) sur la membrane des cellules inflammatoires tellesque les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes a fortement



Figure 1 : Mécanismes effecteurs de l'hypersensibilité de type 1.

Les allergènes pénètrent par les surfaces muqueuses, sont captés par les cellules présentant l'antigène qui les dégradent et les présentent aux cellules TH (Helper). La coopérationn TH-B, par contact membranaire et libération de médiateurs solubles, induit la prolifération et la différenciation des cellules B, conduisant à la production d'anticorps IgE spécifiques de l'allergène. L'IgE sensibilise les mastocytes en se fixant aux FceRI et induit la libération de médiateurs préformés comme l'histamine et les protéases. Les médiateurs lipidiques néofromés teleque les leucotriènes et les prostaglandines sont à l'origine des signes cliniques de l'allergie. Une rétro-inhibition des cellules du système immunitaire par ces médiateurs contribue à diminuer la réaction allergique. (D'après Rott., 1994).

contribué à développer les recherches autour des structures réceptrices d'IgE à la surface de ces cellules. Dans ce contexte, nous avons entrepris la caractérisation des récepteur Fce sur ces deux protagonistes cellulaires:

- d'une part, la caractérisation moléculaire et fonctionnelle du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI). L'expression de ce récepteur n'est plus restreinte aux mastocytes et les basophiles mais s'effectue également sur les cellules de Langerhans. L'ensemble de cette partie de travail sera exposé dans le chapitre II (Résultats I et II).

- d'autre part, l'identification moléculaire de l'ADNc codant pour le récepteur FceRII exprimé par les éosinophiles (Chapitre II ; Résultat III).

- Enfin l'étude de la cinétique d'expression de ces deux récepteurs au cours de la maturation et la différenciation des éosinophiles ainsi que les facteurs influant sur leur régulation (Chapitre II ; Résultat IV).

Ainsi, la caractérisation de ces récepteurs à l'echelle moléculaire permettra de mieux comprendre les mécanismes d'activation cellulaire. De même l'étude de la régulation de l'expression des ces récepteurs et leur interaction éventuelle nous renseignera d'une facon précise et apportera des nouveaux éléments éclaircissants sur le concept d'hétérogénéité d'expression au niveau de ces populations cellulaires.



13

Figure 2 : Implications des cellules inflammatoires dans le processus de défense contre les helminthes.

Au cours d'une helminthiase, des antigènes parasitaires solubles diffusent à travers la muqueuse intestinale et atteingnent les ganglions lymphatiques régionaux où se développe une réponse IgE. Stimulés par les antigènes parasitaires les mastocytes se dégranulent et libèrent des médiateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire et attirent les cellules inflammatoires dont les éosinophiles. Les IgE produites dans les ganglions se fixent sur le parasite qui devient susceptible à la cytotoxicité (ADCC) exercée par les éosinophiles qui expriment le récepteur de faible affinité FccRI.

Généralités

# Chapitre I: Généralités

# Les polynucléaires éosinophiles

Découverts par Ehrlich en 1879 grâce à leur affinité pour un colorant acide, l'éosine, les éosinophiles sont des cellules de forme ronde ou ovoîde ayant un diamètre de 12 à 17  $\mu$ m. Ils se classent parmi les polynucléaires de par la forme de leur noyau et parmi les granulocytes à cause de la présence dans leur cytoplasme de granules spécifiques. Ce sont des cellules à localisation tissulaire prédominante au niveau des muqueuses. Le pourcentage des éosinophiles circulants ne dépasse guère 1% de la quantité synthétisée dans la moelle osseuse. La différenciation et la maturation de la lignée éosinophile sont sous le contrôle de facteurs hématopoïètiques en particulier l'IL-5.

## Eosinopoïèse

Les lignées hématopoïètiques proviennent d'une même cellule souche ou cellule totipotente. De ce type cellulaire dérivent les cellules souches pluripotentes exprimant l'antigène de surface CD34. Ces cellules ont la capacité de se différencier en progéniteur lymphoïde qui donne naissance aux cellules B et T ainsi que les cellules NK (Natural Killer) ou en progéniteur mixte myéloïde (CFU-GEMM). La différenciation des progéniteurs mixtes aboutit à la formation des mégacaryocytes puis des plaquettes (CFU-MEG), des érythrocytes ou hématies (BFU-E) et enfin à la formation des progéniteurs mixtes granulocyte/macrophage (CFU-GM) (Figure 3A).

L'éosinophile dérive des progéniteurs mixtes qui subissent une série de modifications morphologiques, phénotypiques et biochimiques. Quatre stades de précurseurs d'éosinophile sont bien caractérisés: les promyélocytes, stade au cours duquel apparaissent les granules spécifiques, les myélocytes, les métamyélocytes et les granulocytes éosinophiles (Figure 3B). Ce développement dans la moelle osseuse dure environ 5 jours. Par la suite, l'éosinophile effectue un bref passage dans le sang (6-8 heures) avant de migrer vers les tissus où il peut séjourner 12 jours environ.

Les mécanismes impliqués dans les différentes étapes de la différenciation des cellules souches en éosinophiles sont complexes et loin d'être complètement identifiés. Les premiers travaux soulignant l'importance des relations entre lymphocyte T et éosinophile datent des observations de Basten et Beeson avec la démonstration de la thymodépendance de la réponse éosinophile (Basten et Beeson, 1970). Par la suite, de nombreuses études ont analysé l'effet des cytokines d'origine lymphocytaire et principalement l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 sur



16

l'éosinopoïèse. Ces cytokines ont des activités pléiotropiques et peuvent agir seules ou en synergie. Ainsi les évidences expérimentales indiquent que l'IL-5 facilite la prolifération et la différenciation terminale des éosinophiles après l'action du GM-CSF et l'IL-3 (Warren et Moore., 1988; Clutterbuck *et al.*, 1989).

17

## Eosinophile: Relation structure - fonction

L'éosinophile représente une des cellules majeures impliquées dans la protection contre les infections parasitaires en particulier la schistosomiase. Il participe aussi à la réaction inflammatoire possédant ainsi un rôle à la fois néfaste et bénéfique pour l'hôte. De plus, cette cellule collabore lors de différentes situations pathologiques avec d'autres populations cellulaires. La libération par les éosinophiles de médiateurs cytotoxiques et proinflammatoires mais également de diverses cytokines souligne le rôle pleiotropique de ces cellules lors de la réponse immunitaire.

### A-Les médiateurs de l'éosinophile (Figure 4)

Les composants qui confèrent à l'éosinophile certaines de ses particularités fonctionnelles sont les protéines cationiques des granules, les médiateurs phospholipidiques néoformés et les métabolites de l'oxygène, les enzymes et les cytokines.

### 1- Les protéines cationiques

Localisées au niveau des granules, les protéines cationiques jouent un rôle important dans la fonction cytotoxique de l'éosinophile. Quatre protéines majeures sont synthétisées et libérées par l'éosinophile lors de son activation :

La Major Basic Protein (MBP) a une localisation prédominante au niveau du cristalloïde ou "core" des granules, avec un PM de 13,8kDa et un pI >à 10 (Gleich *et al.*, 1973). La MBP a un potentiel cytotoxique important vis-à-vis des parasites (Wassom et Gleich, 1979) mais aussi des cellules de l'hôte. Elle contribue au développement des processus inflammatoires en stimulant la libération de l'histamine par les mastocytes (O'Donnel *et al.*, 1983) mais aussi par sa capacité d'activation du complément (Sur *et al.*, 1993).

L'Eosinophil Cationic Protein (ECP) est localisée au niveau de la matrice des granules. Il s'agit d'un polypeptide dont le PM varie (18-21kDa) suivant l'état d'activation de la cellule. Ses effets sont essentiellement bactéricides, antiparasitaires et toxiques vis à vis des cellules de l'hôte. Des études structurales ont montré une homologie entre l'ECP et l'EDN d'une part et entre ces deux molécules et les ribonucléases d'autre part, définissant l'appartenance de l'ECP à la famile des ribonucléases (Gleich *et al.*, 1986).

L'Eosinophil derived Neurotoxin (EDN) également membre de la famille des ribonucléases présente une forte homologie avec l'ECP au niveau de la séquence primaire en acides aminés



19

(68%). Elle est aussi présente dans la matrice intragranulaire, et possède un poids moléculaire de 18kDa. C'est une neurotoxine puissante dont les effets sont observés lors du phénomène de Gordon (Durack *et al.*, 1981).

L'Eosinophil Peroxidase (EPO) est formée d'une chaîne lourde de 50-58 kDa et d'une chaîne légère de 14-15 kDa. Elle présente une homologie de 68 % avec la myéloperoxydase des neutrophiles et des monocytes (Carlson *et al.*, 1985). Comme toute peroxydase, sa cytotoxicité est due à la production de métabolites toxiques. Elle possède des activités antitumorales, anti helminthiques et antibactériennes (Jong *et al.*, 1980a ; 1980b ; 1981 ; Nogueira *et al.*, 1982). De plus, l'EPO est capable de se lier aux granules mastocytaires. Cette liaison induit la libération de l'histamine (Henderson *et al.*, 1980). L'EPO intervient aussi dans l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales, activité non liée à sa fonction enzymatique de peroxidase.

2- Les médiateurs phospholipidiques, peptidiques et les métabolites de l'oxygène

En plus des protéines granulaires préformées, l'éosinophile synthétise et libère des médiateurs en réponse à différents stimuli. Parmi ces médiateurs on trouve :

- Le PAF, est synthétisé par l'acétylation de lysophospholipides sous l'effet de l'acétyl -CoA acétyltransférase. Cette synthèse est augmentée après un traitement des éosinophiles avec un activateur tel que l'ionophore calcique A23187 ou des particules de sépharose recouvertes d'IgG (Lee *et al.*, 1984).

- Les eicosanoïdes dérivent du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique ou d'autres acides gras polyinsaturés. Deux voies multienzymatiques de synthèse des eicosanoïdes ont été décrites chez l'éosinophile humain : la voie de lipoxygénase aboutissant au leucotriène C4 et ses dérivés LTD4, E4 et le 15 HETE (acide hydroxyeicosatetranoïque); et la voie de cyclooxygénase qui génére les prostaglandines (PG) de classes E2 et D2 et de thromboxanes (TX) de classe B2 (Weller., 1993 ; Figure 5).

Ces composés sont des puissants facteurs vasoactifs, spasmogènes et inducteurs des sécrétions muqueuses.

- Les médiateurs neuropeptidiques comme la substance P sont aussi synthétisés par l'éosinophile. La substance P a des effets sur la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et la contractibilité des muscles lisses. Elle induit la dégranulation des mastocytes ainsi que la libération des mastocytes. Les éosinophiles synthétisent également le VIP ou "vasoactive intestinal peptide" (Aliakbari *et al.*, 1987).



Figure 5: Métabolisme de l'acide arachidonique

- Les anions superoxyde et hydroperoxyde dérivent du métabolisme de l'oxygène. Leur synthèse s'accompagne d'un accroissement de l'oxydation du glucose (Pincus *et al.*, 1983). Ce sont de puissants agents cytotoxiques .

### 3- Les enzymes

De nombreux enzymes sont produits par l'éosinophile: il s'agit de l'arylsulfatase B associée aux granules primaires, la  $\beta$  glucuronidase, les phosphatases D et B, l'histaminase, l'élastase et la collagénase. Celle ci est impliquée dans la dégradation du tissu conjonctif du parenchyme pulmonaire. Certains de ces enzymes semblent jouer un rôle essentiel dans la réaction d'hypersensibilité immédiate. C'est le cas de l'histaminase qui dégrade l'histamine libérée par les mastocytes.

Enfin la protéine de Charcot Leyden Crystal ou CLC est caractéristique des infiltrats tissulaires à éosinophiles (Archer *et al.*, 1963). C'est une protéine membranaire possédant une activité de lysophospholipase (Weller *et al.*, 1980). Elle représente 7 à 10 % des protéines totales de l'éosinophile. Sa polymérisation est à l'origine de cristaux hexagonaux observés au microscope dans les infiltrats à éosinophiles. Elle posséde une homologie structurale avec les  $\epsilon$ BP ou " $\epsilon$  binding protein" (25 à 30% d'identité). Ainsi, elle appartient à la superfamille des lectines fixant le  $\beta$  galactoside (Ackerman *et al.*, 1993). On lui attribue aussi des activités antiparasitaires directes par lyse des cuticules du parasite, et indirectes par protection de l'éosinophile contre les produits toxiques émis par les parasites.

### 4- Les cytokines

L'éosinophile représente aussi une source de cytokines. La synthèse et la sécrétion des cytokines par l'éosinophile dépendent de son état d'activation.

-Le TGF-α (Wong *et al.*, 1990 ; Ghiabi *et al.*, 1992 ; Brach *et al.*, 1994) exerce des effets mitogéniques sur les fibroblastes. Il stimule la prolifération des cellules épithéliales et participe à l'angiogénèse.

-Le TGF- $\beta$ 1 (Wong *et al.*, 1991) est l'une des trois formes moléculaires du TGF- $\beta$ , régulateur multifonctionnel de la croissance cellulaire. Il favorise la formation de la matrice extracellulaire et contribue à la formation des fibroses tissulaires observées lors des maladies parasitaires, inflammatoires et idiopathiques. Celles ci se caractérisent par une infiltration d'éosinophiles. Le TGF $\beta$ 1 inhibe aussi la différenciation dépendante de l'IL-3 des éosinophiles humains (Ohno *et al.*, 1992).

-L'IL-1 $\alpha$  (Delpozo *et al.*, 1990) posséde des activités proinflammatoires. Cette cytokine pourrait aussi servir de cofacteur de stimulation des lymphocytes au cours de la présentation d'antigène par les éosinophiles.

-L'IL-6 (Hamid *et al.*, 1992) est élaborée et sécrétée in vitro par les éosinophiles. Elle possède de nombreuses activités biologiques, essentiellement sur la différenciation terminale des cellules B, la croissance des plastocytomes et des hybridomes, la synthèse des protéines de la phase aïgue, la stimulation des progéniteurs hématopoïétiques et l'activation des cellules T et des thymocytes.

-L'IL-8 (Braun *et al.*, 1993) est une cytokine possèdant un effet chimiotactique. Ainsi, elle est impliquée dans la margination et le recrutement des cellules au niveau du site inflammatoire.

-L'IL-5 (Desreumaux *et al.*, 1992 ; 1993) intervient dans les étapes tardives de la maturation et la différenciation des précurseurs de l'éosinophile. Elle agit comme facteur chimiotactique des éosinophiles, prolonge leur survie et stimule leurs fonctions cytotoxiques dépendantes d'anticorps. Récemment, l'étude de la localisation cytoplasmique et des mécanismes de sécrétion de l'IL-5 ont été réalisés dans notre laboratoire. L'IL-5 est localisée dans la matrice des granules de l'éosinophile. De plus, la stimulation des éosinophiles par des immunocomplexes à IgA, IgE ou dans une moindre mesure à IgG permet la sécrétion d'IL-5 à des concentrations physiologiques (Dubucquoi *et al.*, 1994)

L'éosinophile est aussi capable de synthétiser d'autres facteurs de différenciation et de maturation tels l'IL-3, le GM-CSF (Kita *et al.*, 1991).

# B- Les récepteurs membranaires, antigènes et molécules de surface

1- Les récepteurs Fc d'immunoglobulines

L'éosinophile exprime à sa surface différents récepteurs pour le Fc des Ig.

-Le récepteur pour l'IgG, le premier identifié, est impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité anticorps dépendante. Deux types de récepteurs pour l'IgG sont exprimés par l'éosinophile, essentiellement le récepteur de faible affinité Fc $\gamma$ RII ou CD32 (Hartnell *et al.*, 1990) et le Fc $\gamma$  RIII ou CD16 dont l'expression est inductible par l'IFN $\gamma$  (Valerius *et al.*, 1990; Hartnell *et al.*, 1992).

-Le récepteur pour l'IgA appartient à la famille des immunoglobulines semble lui aussi être impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité des éosinophiles (Capron *et al.*, 1988).

-Le récepteur de faible affinité pour l'IgE (FcɛRII/ CD23) est exprimé par l'éosinophile. La présence du récepteur FcɛR à la surface des éosinophiles a été tout d'abord démontrée par la technique des rosettes et la fixation d'IgE radiomarquée (Capron *et al.*, 1981). L'expression de ce récepteur s'accroît en présence de concentrations élevées d'IgE sériques ou des facteurs chimiotactiques (Capron *et al.*, 1981).



7

Généralités

Un anticorps monoclonal (BB10), dirigé contre la membrane des éosinophiles activés et inhibant le fixation d'IgE a été obtenu (Capron *et al.*, 1986). Une analyse plus fine a montré que l'IgE monomérique se fixe sur ce récepteur avec une constante d'association de l'ordre de 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>. La technique d'immunoadsorption réalisée avec de l'IgE ou l'anticorps BB10 a permis de détecter des composants de PM 45-50 kDa et un composant de 23 kDa. Des produits de clivage 15-18 kDa sont également détectés dans ces conditions (Jouault *et al.*, 1988).

L'étude comparative des épitopes du FceRII des éosinophiles par le BB10 et un anticorps dirigé contre le CD23 (Ac 135) a permis de révéler certaines analogies structurales entre ces deux antigènes membranaires (Grangette *et al.*, 1989). En outre, les anticorps anti fibronectine, dirigés contre l'adhésiotope RGD, de même que le BB10 inhibent la cytotoxicité IgE dépendante de l'éosinophile et reconnaissent le même composé de PM 45-50 kDa. Ceci suggère que le tétrapeptide RGD est contenu dans la séquence du récepteur de l'IgE de l'éosinophile (Grangette *et al.*, 1989). Toutefois, l'absence d'analyse moléculaire n'a pas permis la comparaison entre le CD23 des lymphocytes et le FceRII des éosinophiles.

a-Rôle dans les mécanismes de cytotoxicité

L'éosinophile posséde un rôle majeur dans les processus de défense vis-à-vis de certains organismes multicellulaires notamment les parasites (Butterworth, 1984). En effet, c'est dans le modèle de la schistosomiase que le rôle de l'éosinophile a été particulièrement bien étudié. La découverte originale de Butterworth démontrant que l'éosinophile est capable de détruire des schistosomules in vitro en présence des anticorps spécifiques de classe IgG, a ouvert de nouveaux champs d'investigations sur le rôle physiopathologique et la fonction de cette cellule dans la défense antiparasitaire (Butterworth *et al.*, 1975).

Le mécanisme intervenant dans cette fonction est un mécanisme de type ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) où les anticorps se lient aux récepteurs pour le Fc des immunoglobulines, présents sur les éosinophiles et reconnaissent les antigènes cibles à la surface du schistosomule grâce à leur fragment Fab. Au moins 3 types de récepteurs à la surface de l'éosinophile Fc $\gamma$ , Fc $\epsilon$  et Fc $\alpha$  ont été incriminés dans ces mécanismes de cytotoxicité (Capron *et al.*, 1993) sans oublier une structure appartenant à la famille des lectines de type S, Mac2/ $\epsilon$ BP maintenant dénommée galectine3 (Truong *et al.*, 1993)

b- Libération des médiateurs via les récepteurs Fc

Le pontage des récepteurs Fc membranaires induit la libération de médiateurs par les éosinophiles suivant un processus de dégranulation qui peut revêtir de multiples aspects, avec ou sans extrusion de granules à l'extérieur de la cellule (Dvorak *et al.*, 1994 ; Scepeck *et al.*, 1993).

Il a été démontré qu'après stimulation par des anticorps IgG2a ou des IgE, les éosinophiles

de rat libèrent de l'EPO (Khalife *et al.*, 1985). Une libération sélective de l'EPO a aussi été obtenue par incubation des éosinophiles humains portant des IgE de surface avec de l'anti IgE ou de l'allergène spécifique (Khalife *et al.*, 1986 ; Tomassini *et al.*, 1991). De la même manière, la MBP est relarguée par l'éosinophile par un mécanisme IgE dépendant. En revanche, l'ECP est libérée uniquement en réponse à une stimulation IgG mais pas après stimulation IgE (Khalife *et al.*, 1986 ; Capron *et al.*, 1989b).

Par ailleurs, la stimulation IgA des éosinophiles induit la libération de l'EPO et l'ECP (Tomassini *et al.*, 1991) ainsi que de l'EDN (Abu Ghazaleh *et al.*, 1989). Ces résultats expérimentaux indiquent une hétérogénéité dans les signaux d'activation délivrés par ces différents récepteurs Fc.

### 2- Les récepteurs de cytokines

Les récepteurs de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF sont composés de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne  $\alpha$  spécifique qui lie chaque ligand avec une faible affinité (Gearing *et al.*, 1989 ; Tavernier *et al.*, 1991 ; Kitamura *et al.*, 1991) et une chaîne  $\beta$  commune qui est dépourvue de cette capacité. L'association de ces deux chaînes au niveau membranaire augmente l'afffinité du récepteur pour son ligand. Seuls parmi les cellules de la lignée myéloïde les éosinophiles possèdent les trois types de chaînes  $\alpha$ .

La liaison de ces trois cytokines à leur récepteur se produit avec une affinité qui dépend de l'état d'activation de l'éosinophile. L'incubation d'éosinophiles avec le GM-CSF augmente la liaison spécifique de l'IL-5 : on dénombre une moyenne de 450 sites de liaison à l'IL-5 par éosinophile, contre seulement 20 à 200 sites de liaison de haute affinité pour le GM-CSF (Capron *et al.*, 1993).

Le GM-CSF, l'IL-5 et l'IL-3 exercent des activités biologiques redondantes sur la production et la modulation fonctionnelle des éosinophiles. Cette redondance peut s'expliquer en partie par la présence de la sous unité  $\beta$ , commune aux récepteurs à haute affinité de ces trois cytokines. Dans le cas des éosinophiles humains, une compétition de la liaison entre le GM-CSF ou l'IL-3 a été clairement démontrée (Lopez *et al.*, 1989).

A côté des formes membranaires, des formes solubles ont été mises en évidence dans les surnageants des cellules exprimant les récepteurs de l'IL-5 et le GM-CSF. Elles peuvent constituer des antagonistes de ces cytokines (Raines *et al.*, 1991 ; Kikuchi *et al.*, 1994).

Du fait de leur action sur les fonctions des éosinophiles, la présence des récepteurs pour le TNF  $\alpha$  (Tumor Necrosis Facteur) (Silberstein *et al.*, 1986), l'IL-1 (Pincus *et al.*, 1986) et l'IFN $\gamma$  (Valerius *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1987) est suspectée. Les éosinophiles portent également à leur surface la chaîne  $\alpha$  ou sous unité p55 du récepteur d'IL-2 (Plumas *et al.*, 1991) et plus récemment démontré dans notre laboratoire le récepteur pour l'INF $\alpha$  (Aldebert D., soumis ).

### 3- Les molécules d'adhérence et chimiotaxie

L'adhérence est l'une des étapes capitales dans la détermination de l'infiltrat cellulaire lors de la réaction inflammatoire. Elle dépend de l'état d'activation des leucocytes circulants et des cellules endothéliales avoisinantes ainsi que de facteurs chimiotactiques. Dans le cas de l'éosinophile, plusieurs facteurs chimiotactiques ont été identifiés: ceux dérivés des mastocytes, tels que l'ECF-A (Eosinophil Chemotactic Factor of anaphylaxis), le LTB4 et l'histamine; d'autres issus de différents types cellulaires, incluant le PAF (Wardlaw *et al.*, 1986). Les facteurs de la famille des chemokines : l'IL-8, le MCP3 (Monocyte Chemottractant Protein 3), le MIP1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) (Rot *et al.*, 1992) ou encore ses propres facteurs de différenciation et de maturation, l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF (Warringa *et al.*, 1991; Desreumaux *et al.*, 1992).

Le phénomène d'adhérence des éosinophiles à l'endothélium fait intervenir plusieurs familles de molécules. Il s'agit principalement des intégrines, des sélectines et des molécules de la famille des immunoglobulines. Les molécules endothéliales importantes dans le recrutement des éosinophiles sont ICAM-1 (Intercellular Cell adhesion Molecule 1, CD54) qui est exprimé constitutivement (Czech *et al.*, 1993), ELAM-1 (Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule -1 ou E selectin), dont l'expression est inductible (Kyanaung *et al.*, 1991) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) (Weller., 1991).

Les éosinophiles expriment à leur surface des molécules d'adhérence de la famille des  $\beta 1$  et  $\beta 2$  intégrines (Walsh *et al.*, 1990 ; 1991) par exemple: CD11a/18 (LFA-1 ou Leucocyte Function associated Antigen), le CD11b/18 CR3 ou MAC-1(Neely *et al.*, 1993) et le CD11c/18 ou protéine 150,95 (Kyanaung *et al.*, 1991). L'eosinophile exprime aussi des molécules de la famille de S sélectines: CD62L/LAM1(Neely *et al.*, 1993), ainsi que CD15, CDw65, CD44 et CD31 ou PECAM (Platelet Endothelial cell adhesion molecule).

### 4- Les autres récepteurs et antigènes membranaires

L'éosinophile possède des récepteurs cytosoliques pour les stéroïdes (Peterson *et al.*, 1981). Les éosinophiles de certains patients hyperéosinophiliques montrent un défaut d'expression du récepteur pour les glucocorticoïdes (Prin *et al.*, 1989), ce qui explique probablement leur résistance à la corticothérapie.

Les récepteurs de certains composants du complément ont également été mis en évidence sur l'éosinophile (Fischer *et al.*, 1986 ; Hamada *et al.*, 1987 ; Gerard *et al.*, 1989 ; Hartnell *et al.*, 1990). Par ailleurs, l'observation de l'expression inductible de la glycoprotéine CD4 par les éosinophiles (Lucey *et al.*, 1989a) est à l'origine de la démonstration que ces cellules puissent être infectables par le virus d'immunodéficience acquise (Conway *et al.*, 1992). Les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA-DR) (Lucey *et al.*, 1989a ; 1989b) sont aussi présents à la surface de l'éosinophile, et représentent une des bases moléculaires du rôle des éosinophiles dans la présentation d'antigène aux cellules T (Weller *et al.*, 1993) et même des superantigènes (Mawhorther *et al.*, 1994).

### L'ensemble de ces facteurs participe à la dualité fonctionnelle de l'éosinophile: antiparasitaire et antitumorale ou fonction bénéfique; proinflammatoire ou fonction néfaste.

### C-Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des éosinophiles

Les éosinophiles ont été classés en deux sous-populations selon leur densité sur gradient de métrizamide: éosinophiles normodenses et hypodenses (Prin *et al.*, 1983 ; 1984, Figure 7). Le nombre des éosinophiles hypodenses est très élevé chez les patients atteints de syndrome hyperéosinophilique idiopathique (HES), de parasitoses, d'allergies ainsi que de certaines néoplasies. Les éosinophiles hypodenses diffèrent par rapport à ceux des patients normaux par des critères biochimiques, morphologiques et fonctionnels.

In vitro, les éosinophiles normodenses peuvent devenir hypodenses sous l'action de différents facteurs (le PAF, certaines cytokines comme l'IL-5, le sérum de patients hyperéosinophiliques). In vivo, les facteurs intervenant ne sont pas encore bien définis mais l'on suspecte que les éosinophiles tissulaires soient plutôt hypodenses.

De nombreux travaux ont montré que le nombre et l'apparition des éosinophiles hypodenses périphériques sont corrélés positivement avec la sévérité des symptômes. C'est le cas des patients atteints de rhinite allergique à symptomatologie sévère (Frick *et al.*, 1988). Ainsi, ceci suppose que l'hyperéosinophilie sanguine serait la conséquence du passage des éosinophiles immatures de la moelle osseuse vers la circulation. Cependant, les études morphologiques de ces éosinophiles hypodenses n'ont pas confirmé cette hypothèse (Schult *et al.*, 1988 ; Kauffman *et al.*, 1987). D'autres équipes ont observé une augmentation du nombre des éosinophiles hypodenses en l'absence d'une hyperéosinophilie périphérique (Sedwick *et al.*, 1990). Ceci suggère qu'au niveau du site d'inflammation, les éosinophiles deviennent hypodenses sous l'effet des facteurs tissulaires (Barnes *et al.*, 1988 ; Abu-Ghazaleh *et al.*, 1989). Ces résultats posent toujours la question de savoir si l'hyperéosinophilie résulte d'une surproduction des éosinophiles par la moelle osseuse et / ou d'une incapacité des tissus périphériques à réguler l'éosinopoïèse (Figure8).

Les premières études ont montré que les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques exercent une cytotoxicité très élevée vis à vis des parasites (Prin *et al.*, 1983 ; Capron *et al.*, 1984), une capacité de phagocytose plus importante et un métabolisme oxydatif accru comparé aux éosinophiles normaux (Bass *et al.*, 1980 ; Pincus *et al.*, 1981). En effet, les éosinophiles hypodenses montrent une activation du transport d'hexoses transmembranaire, une production



Figure 7: Principe de séparation des éosinophiles hypodenses et normodenses sur gradients discontinus de métrizamide. 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. La valeur des densités des solutions de métrizamide est indiquée sur la gauche du schéma.

29

accrue de leucotriène C4 après stimulation (Shaw et al., 1985; Kauffman et al., 1987; Kajita et al., 1985; Moqbel et al., 1990). Ils possèdent aussi une adhérence accrue aux cellules endothéliales (Kimani et al., 1988) et libèrent de l'EPO après stimulation avec de l'anti IgE ou l'antigène spécifique (Khalife et al., 1986).

Ces propriétés particulières des éosinophiles hypodenses s'expliquent par l'expression à leur surface d'un nombre plus élevé de récepteurs Fc membranaires de récepteurs du complément (Capron *et al.*, 1993) et de molécules d'adhérence (Kimani *et al.*, 1988).

Enfin, il est clair que les éosinophiles hypodenses ont un métabolisme différent de celui des éosinophiles normodenses (Prin *et al.*, 1983). Ceci leur confère des particularités fonctionnelles manifestées par un grand potentiel d'aggression envers les tissus de l'hôte et les parasites.

La définition de l'hétérogénéité des éosinophiles est déterminante pour mieux comprendre la biologie de ce type cellulaire et construire des stratégies thérapeutiques efficaces visant à traiter les pathologies qui y sont associées.



Figure 8: Mécanismes possibles aboutissant aux éosinophiles hypodenses

# Les plaquettes

### A- Ontogénèse et structure

### 1- Ontogénèse

Les étapes de la mégacaryocytopoïèse sont sous le contrôle de plusieurs facteurs hématopoïétiques (Bruno *et al.*, 1989 ; Figure 3A). A la fin de leur maturation, les mégacaryocytes matures se fragmentent en une multitude de plaquettes.

A l'état de repos, la plaquette se présente sous forme d'ellipsoide de révolution très aplatie (Figure 9). Elle mesure de 2 à 4  $\mu$ m dans son grand axe et de 0,5 à 1  $\mu$ m dans le petit. Le volume moyen est de l'ordre de 5 à 7  $\mu$ m. Formée dans la moelle osseuse par fragmentation des mégacaryocytes, elle passe dans la circulation où elle séjourne 7 à 10 jours. Elle est éliminée soit par phagocytose ou lors de son intervention dans les mécanismes de l'hémostase.

### 2- Structure

L'étude en microscopie électronique a permis d'identifier les structures suivantes (Figure 10):

-La membrane plasmique constituée, en plus des phospholipides et glycoprotéines retrouvés dans toutes les membranes plasmiques des mammifères, de protéines et glycoprotéines spécifiques des plaquettes intervenant dans les diverses fonctions plaquettaires (Facteurs V, VIII, XI, XII; fibrinogène; glycoprotéine V;...)

-Les membranes intraplaquettaires formées par le système canaliculaire ouvert (SCO) et le système tubulaire dense (STD). Ces deux systèmes assurent la communication avec le milieu extracellulaire (White *et al.*, 1980), l'activité peroxydasique ainsi que le stockage du calcium (Breton-Gorius *et al.*, 1972).

-Les organites sont constitués principalement par les différents granules incluant, outre les granules à catalase et les lysosomes, les granules denses, et les granules  $\alpha$ .

-Le cytoplasme dont les constituants majeurs sont représentés par les protéines du cytosquelette.

### **B-Les plaquettes sanguines et les récepteurs d'IgE**

### 1- Les plaquettes et les parasitoses

Dans diverses parasitoses, la démonstration de l'existence d'une cytotoxicité plaquettaire IgE dépendante (Joseph *et al.*, 1983) laissait soupçonner l'existence d'un récepteur spécifique pour l'IgE à la surface de la plaquette. Chez les sujets sains, 10 à 20% des plaquettes expriment



Figure 9: Morphologie d'une plaquette humaine. (Microscopie élèctronique à balayage: X 24000). (D'après White., 1987)



Figure 10: Ultrastructure d'une plaquette humaine. Coupe équatoriale.

Légende: MT: microtubules ; Gly : glucogène ; G : Granules ; DB : corps dense ; OCS: système canaliculaire ouvert ; DTS: système tubulaire dense ; MC: complèxe membranaire (Microscopie élèctronique X 25000). (D'après White., 1987)

Généralités

ce récepteur. Ce pourcentage peut atteindre 50% chez les sujets allergiques et ceux atteints de parasitoses. Il possède des analogies avec le récepteur de faible affinité pour l'IgE exprimé par d'autres cellules inflammatoires : les monocytes et les macrophages (Capron *et al.*, 1975), les éosinophiles (Capron *et al.*, 1981), les lymphocytes T et B (Spiegelberg *et al.*, 1985). En effet, l'analyse par Scatchard a permis de déterminer deux constantes d'affinités dont l'une correspond au récepteur FceRII (Ka 3,3 10<sup>7</sup> M-1) avec environ 600-1000 sites de fixation par plaquette (Joseph *et al.*, 1986). La chromatographie d'affinité réalisée avec l'anticorps anti FceRII de l'éosinophile (BB10) a permis d'identifier deux composants majeurs de 43-45 kDa et de 31 kDa. De plus, cet anticorps BB10, et l'anticorps anti CD23 des lymphocytes B (135-1) sont capables d'inhiber la fixation de l'IgE sur les plaquettes et leur activation subséquente (Capron *et al.*, 1986a).

### 2- Les plaquettes ; syndrome allergique et asthme

Chez les patients souffrant d'asthme allergique ou chez les sujets sensibles au venin d'hyménoptère, le pourcentage des plaquettes exprimant le récepteur FceRII est élevé par rapport à celui des donneurs sains. Les plaquettes de ces sujets portent des anticorps IgE cytophiles et peuvent être activées in vitro par des allergènes spécifiques ou des anticorps anti-IgE. Cette activation aboutit à la libération des radicaux libres, d'histamine, mais pas de sérotonine. Aucune activation n'est observée quand elles sont incubées avec des allergènes non spécifiques ou des anticorps anti-IgG (Tsicopoulos *et al.*, 1988).

De façon identique, l'incubation des plaquettes de donneurs sains avec le sérum de patients allergiques, puis l'addition d'anticorps anti-IgE ou de l'allergène spécifique déclenchent les fonctions effectrices cytotoxiques des plaquettes induisant la mort des larves de *S. mansoni*. Ces effets sont inhibés après immunoadsorption des IgE du sérum ou après préincubation des plaquettes avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le récepteur de faible affinité pour l'IgE (CD23/FceRII).

### C-L'activation plaquettaire

Les événements physiologiques majeurs qui sont initiés par l'activation in vitro des plaquettes sont illustrés par les figures 11 et 12. Ils incluent les changements de forme des plaquettes, l'extension des pseudopodes, la génération et la sécrétion des agonistes et la fixation de la molécule GPIIbIIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) sur son ligand soluble. Ces événements interviennent au cours de l'agrégation plaquettaire

### 1- Les molécules d'adhérence et l'agrégation plaquettaire

Les plaquettes expriment diverses molécules d'adhérence à leur surface (Tableau 1). Ces



34

Figure 11: Changement de la forme d'une plaquette suite à l'incubation avec le calcium ionophore.

Le calcium transforme la forme discocytes (1) en echinocytes (2)puis spherechinocytes (3). Microscope élèctronique à balayage X8000. (D'après White., 1987)



Figure 12 : Les événements d'activation plaquettaire.

Le traitement des plaquettes par des agonistes (la thrombine par exemple) activent de multiples signaux intracellulaires induisant une réponse plaquettaire physiologique. Dans un premier temps on assiste: au changement de la forme des plaquettes de la forme ovoide vers une forme sphérique compacte; l'induction du métabolisme de l'acide arachidonique aboutissant à la synthèse du thromboxane (TX); la sécrétion des constituants des granules (granules  $\alpha$  et les granules denses). Le traitement à la thrombine induit un changement conformationnel de la protéine GPIIb IIIa permettant à celle ci de se fixer sur les formes dimèriques du fibrinogène. Enfin, l'agitation permet le contact entre les molécules du fibrinogène de plaquettes adjacentes aboutissant à l'agrégation. Légende : Tr: le récepteur du Thromboxane ou Thromboxane receptor. (D'après Clarck *et al.*, 1994).

Famille	Récepteurs	Ligands	Nombre/ cellule
Intégrines	αΠbβ3 αV β3 α2β1 α5β1 α6β1	Fibrinogène, vWf, Fn , Vn Fibrinogène, vWf, Fn , Vn, OP Collagène Fn Laminine	80 000 250 <1000 <1000 <1000
Motif riche en leucine	GPIb-IX	vWf	25 000
Imunoglobuline	PECAM-1	PECAM-1, GAGs	5000
Selectines	P selectines	Carbohydrates sialylés et fucosylés	10000

Tableau 1: Les molécules d'adhésion sur les plaquettes Vn, Vitronectine ; Fn , Fibronectine ; OP, Ostéopontine ; GAGs , glycosaminoglycanes; PECAM-1, Platelet endothelial cell adhesion molecule ;

Généralités

Les plaquettes

Ũ

molécules interviennent dans les interactions entre les plaquettes elles-mêmes et entre ces dernières et les structures sous-endothéliales. Ces phénomènes aboutissent soit à la réponse hémostatique physiologique, ou à la réponse pathologique, la thrombose.

Malgré l'existence de ces différents récepteurs et de ligands à la surface des plaquettes, la mobilité des plaquettes n'est pas affectée. En effet, à l'état de repos, ces récepteurs ont une faible affinité pour leur ligand. La fixation des ligands solubles ne survient que lors des processus d'activation conduisant à l'agrégation des plaquettes.

L'agrégation plaquettaire est influencée par divers agonistes incluant la thrombine, l'ADP (l'adenosyldiphosphate) ainsi que des inhibiteurs comme la prostacycline ou l'oxyde nitrique. Cet effet est exercé via la modulation de l'affinité de fixation des ligands sur leurs récepteurs membranaires, en particulier, la fixation du fibrinogène et du facteur von Willebrand sur la molécule GPIIb IIIa (Figure 12).

### 2- Signaux de transduction

La stimulation des plaquettes induit une phosphorylation importante de certaines protéines cellulaires (Clark *et al.*, 1994). Cette phosphorylation s'effectue en différentes étapes et elle est dépendante du mode d'activation. Elle fait intervenir plusieurs protéines kinases et ou des phosphatases (Figure13). La thrombine, le collagène, de même que d'autres agonistes induisent le même profil de phosphorylation au niveau cellulaire. Ceci suggère que des récepteurs de structures différentes convergent vers la même voie de signalisation. Cette phosphorylation est partiellement inhibée dans le cas des plaquettes dépourvues de la GPIIb/IIIa, provenant de patients atteints de syndrome de Glanzmann, ou si on incube les plaquettes en présence d'inhibiteurs qui bloquent la fixation du fibrinogène sur la GPIIb/IIIa. Ceci indique que la phosphorylation des tyrosines est régulée en particulier par l'intégrine GPIIb/IIIa (Ferrel *et al.*, 1989).

Trois événements majeurs contrôlant la phosphorylation des tyrosines ont été décrits sur les plaquettes (Figure 13) :

-Des événements précoces détectables durant les premières secondes après l'addition de l'agoniste. Ils sont insensibles aux traitements qui bloquent la fixation du fibrinogène sur la GP IIb/IIIa. De plus, ces événements ne sont pas altérés sur les plaquettes de sujets atteints de syndrome de Glanzmann traités par la thrombine. Ils font intervenir deux protéines kinases : *Src* et *Syk* qui sont activées. Outre ces deux protéines kinases, d'autres protéines cellulaires sont phosphorylées, en particulier (MAPK) ou Mitogen Activated Protein Kinase (Chichowski *et al.*, 1992). C'est une sérine/thréonine kinase qui intervient dans la transmission de signaux transductionnels de différentes classes de récepteurs. Le traitement des plaquettes par la thrombine fait intervenir la PLC $\gamma$ 2 (Clarck *et al.*, 1994).

Deux autres événements sont dépendants de la fixation du fibrinogène sur la GPIIb/IIIa.
Plaquette non act	tivée — hoβ3	Phase d'activation-	Crosslinking du GPIIb-IIIa	Agrégation
Conditions experimentales		Thrombine+antiαIIbβ3 Trombine* Thrombine + RGDS Src activée	Anti LIBS + Fn Contortrosattin Crosslinking du αIIbβ3 Thrombine sans agitation	Thrombine + agitation
Tyrosine kinase impliquée		Syk activée	Syk activée	Fak activée Fak, Syk et Src associées au cytosquelette
Substrats cellulaires phosphorylés	P120 Src	Syk GAP+p59, p68 p85, cortactine p110 MAPK p84	Syk p140 p50-60	FAK p95-97

Figure 13: Résumé des principaux événements de phosphorylation de tyrosine au cours des différents étapes d'activation plaquettaire. Chaque événement est défini par rapport aux conditions expérimentales utilisées.

Légende: TR: le récepteur de la thrombine; \*: Addition de la thrombine dans le cas de patients atteints du syndrome de Glanzman (déficience d'expression de la GPIIb-IIIa ou  $\alpha$ IIb $\beta$  3). (D'après Clark *et al.*, 1994).

Généralités

-Le premier est indépendant de l'agrégation des plaquettes mais est dépendant du cross linking et l'oligomérisation de la GPIIb/IIIa. Au cours de cette étape, la protéine kinase Syk est activée ainsi que deux autres protéines cellulaires.

-le second requiert l'agrégation des plaquettes par le fibrinogène et il s'accompagne de la phosphorylation de plusieurs protéines kinases en particulier de la PTK (FAK) ou Focal Adhesion Kinase (Zachary et Rozengurt., 1992).

En raison de l'absence de noyau, les plaquettes offrent un excellent modèle d'étude des signaux de transduction, en particulier, l'étude des protéines kinases et leurs substrats cellulaires. La compréhension et la définition exacte de ces phénomènes, permettront de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent dans les cas pathologiques et donc de bien définir les stratégies therapeutiques appropriées.

# **D-** Les plaquettes et l'inflammation

Les plaquettes participent aussi à la réponse inflammatoire (Oxholm et Winter, 1986). La Protéine Réactive C (CRP) confère aux plaquettes humaines comme à celles du rat des propriétés cytotoxiques antiparasitaires (Bout *et al.*, 1986). Il a été démontré que la substance P induit une activation plaquettaire. Celle ci aboutit à la génération des médiateurs cytotoxiques et inhibe aussi l'activation plaquettaire IgE dépendante (Damonneville *et al.*, 1988).

L'interaction des plaquettes avec le subendothelium, les cellules métastasiques ou les microorganismes aboutit à la libération et ou l'expression à leur surface d'une varieté de molécules ; telles que le PDGF, le 12(HETE), le PF4, et le TGF $\beta$ . Ces facteurs interviennent par leur activité chimiotactique dans le recrutement des cellules inflammatoires principalement les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes (Turner *et al.*, 1975 ; Duel *et al.*, 1982 ; Wahl *et al.*, 1987).

Dans le cas du processus métastasique, des récepteurs plaquettaires ou présents sur les cellules endothéliales, sont impliqués dans la propagation des cellules cancéreuses vers différents endroits de l'organisme (Belloni et Tressler., 1990). En particulier, deux molécules exprimées par les plaquettes : le CD36 et la P selectine. De plus, la fixation des plaquettes aux cellules malignes dépend de la GPIIb-IIIa (Boukerche et McGregor., 1989).

Ainsi, les plaquettes interviennent dans les processus inflammatoires en libérant des substances chimiotactiques et par l'expression des récepteurs de surface impliqués lors d'interactions avec les leucocytes en modulant leur activité.

# L'immunoglobuline E et ses récepteurs

L'IgE a été identifiée par Ishizaka comme une nouvelle classe d'immunoglobuline. Elle est synthétisée par les plasmocytes qui sont abondants au niveau des sites de la réaction inflammatoire: la peau, l'intestin et les poumons. Elle constitue une fraction minime du total des Ig présentes dans le serum humain, 50-300ng/ml comparé à 10 mg/ml pour l'IgG. Les effets de l'IgE sont fortement amplifiés quand elle est fixée sur ses récepteurs membranaires. Deux types de récepteurs Fcc ont été caractérisés. Le récepteur de forte affinité pour l'IgE ou FccRI qui est exprimé sur chez les mastocytes et les basophiles et appartient à la superfamille des immunoglobulines. Sa mobilisation induit la libération des principaux médiateurs intervenant dans la réaction allergique. Le récepteur de faible affinité ou FccRII/CD23 a été identifié à la surface des lymphocytes B et des cellules inflammatoires, en particulier les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes. Il présente des homologies avec certaines lectines animales. Il joue un rôle dans les mécanismes de cytotoxicité vis-à-vis des parasites ainsi que dans la libération de médiateurs participant à la réaction inflammatoire (Capron *et al.*, 1986b).

# A- Structure de l'IgE

Comme les autres classes d'immunoglobulines, l'IgE est formée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. La région constante de la chaîne lourde  $\varepsilon$  est formée de 4 domaines (C $\varepsilon$ 1-C $\varepsilon$ 4) (Figure14). Le domaine de fixation au récepteur de forte affinité (F $\varepsilon$ ERI) est situé au niveau de la partie C $\varepsilon_3$  (Beavil *et al.*, 1992 ; Sutton et Gould, 1993 ; Figure 15 ; A). L'analyse par mutagénèse dirigée a montré que 12 acides aminés de cette région sont nécessaires à l'interaction avec le F $\varepsilon$ ERI (Nissim *et al.*, 1991 ; Basu *et al.*, 1993). Le domaine de fixation de l'IgE au récepteur de faible affinité (F $\varepsilon$  $\varepsilon$ RII) est également localisé au niveau de la région C $\varepsilon$ 3 (Nissim *et al.*, 1991 ; Vercelli *et al.*, 1989a ; Figure 15 ; B).

L'IgE est une molécule fortement glycosylée, toutefois aucune liaison de type glycanique n'intervient dans sa fixation sur les récepteurs Fc $\epsilon$  (Vercelli *et al.*, 1989a). La structure tridimensionnelle de l'IgE montre que cette molécule forme une courbure qui se maintient après sa fixation sur les récepteurs Fc $\epsilon$  (Figure 15).

# B- Synthèse de l'IgE

Les premières études ont montré que la production d'IgE est dépendante des cellules T.

Par la suite, deux sous populations de lymphocytes T murins ont été caractérisées, ayant un profil de production de cytokines distinct. Les lymphocytes T dits Th1 produisent l'IL-2, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , ceux dits Th2 synthétisent en particulier l'IL-5 et l'IL-4. Le développement de la réponse IgE est dépendant de la différenciation préférentielle des cellules T en Th2.

## 1- Rôle de l'IL-4

Les premiers travaux ont montré qu'*in vitro* l'IL-4 est capable de stimuler la production d'IgE par les cellules B murines en présence de LPS (Coffman *et al.*, 1986a; Snapper *et al.*, 1988). En outre, les études *in vivo* ont montré que la réponse IgE spécifique d'antigène ainsi que la réponse IgE polyclonale dépendaient de l'IL-4. En effet, des anticorps anti IL-4 ou anti récepteur d'IL-4 sont capables d'inhiber cette réponse (Finkelman *et al.*, 1988; 1989).

La production d'IgE par les cellules B humaines est aussi stimulée par l'IL-4 en présence d'EBV (Thyphronitis *et al.*, 1989), d'anticorps anti-CD40 (Jabara *et al.*, 1990), de cortisol (Wu *et al.*, 1991) ou encore des cellules T activées (Vercelli *et al.*, 1989b).

Le mode d'action de l'IL-4 a été analysé in vitro au niveau cellulaire et moléculaire. Il en découle que l'IL-4 induit la commutation isotypique des cellules B IgM+ en cellules productrices d'IgE.

## 2- Rôle de l'IFNγ

Les interférons peuvent supprimer *in vivo* la synthèse d'IgE chez la souris et dans certains cas chez l'homme. En effet, la réponse polyclonale IgE est inhibée par l'administration des doses élevées d'IFN<sub>Y</sub> mais restaurée avec les anticorps neutralisant anti IFN<sub>Y</sub>. Ceci indique que l'IFN<sub>Y</sub> endogène régule négativement la réponse IgE (Finkelman *et al.*, 1988).

Chez différents groupes de patients, la synthèse d'IgE spontanée par les cellules B est inhibée par le traitement par l'IFN $\gamma$ .

In vitro, l'IFN $\gamma$  ainsi que l'IFN $\alpha$  bloquent la réponse IgE induite par l'IL-4 des cellules B murines et humaines stimulées par le LPS et l'EBV respectivement (Coffman *et al.*, 1986b; Pene *et al.*, 1988 a ; Thyphronitis *et al.*, 1989). Cependant l'IFN $\gamma$  n'a aucun effet sur la réponse IgE quand les cellules B humaines sont stimulées avec les anticorps anti-CD40 en présence d'IL-4. L'IFN $\gamma$  inhibe l'expression du messager du gène  $\varepsilon$  par les cellules B murines (Berton *et al.*, 1989). En revanche, cet effet n'est pas observé dans le système humain.

En fonction des systèmes d'étude, d'autres facteurs modulent la réponse IgE. En effet, l'IL-2, l'IL-5 et l'IL-6 ainsi que le récepteur de faible affinité pour l'IgE (CD23) contribuent à l'induction de la réponse IgE. En revanche, l'IL-12, les prostaglandines inhibent cette réponse (Snapper et Finkelman., 1993)

#### Généralités

# Le récepteur de forte affinité pour l'IgE:FceRI

# A- Distribution cellulaire

Le récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcERI) a été initialement décrit comme étant un marqueur constitutif des mastocytes et des basophiles. Sa mobilisation à la surface de ces cellules induit la dégranulation et la libération des médiateurs cellulaires tel que l'histamine, la chondroïtine sulfate et l'héparine (Galli., 1993). Les mastocytes et les basophiles activés synthétisent et sécrétent des métabolites de l'acide arachidonique comme les leucotriènes (Barnes., 1989) et sont une source importante de cytokines (Plaut *et al.*, 1989 ; Wodnar-Fillipowicz *et al.*, 1989 ; Burd *et al.*, 1989). Cette activation requiert deux étapes: la fixation de l'IgE sur le FcERI au niveau de la membrane cellulaire et l'interaction du complexe récepteur-IgE avec l'antigène spécifique qui initie la dégranulation cellulaire.

Récemment son expression a été mise en évidence chez les cellules de Langerhans (Bieber *et al.*, 1992), et les monocytes (Maurer *et al.*, 1994). Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigène au niveau de la peau. Le récepteur FceRI pourrait intervenir dans cette fonction non seulemnt sur les cellules de Langerhans (Bieber *et al.*, 1992) mais aussi sur les monocytes (Maurer *et al.*, 1995).

## **B-** Structure du FceRI

Le Fc $\epsilon$ RI, ou récepteur de forte affinité pour l'IgE, est composé de trois sous unités :une chaîne  $\alpha$ , une chaîne  $\beta$  et deux chaînes  $\gamma$  (Metzger *et al.*, 1983, 1986). Cette structure multimérique est présente aussi bien chez la souris, le rat et l'homme.

#### 1- Organisation génomique

Le gène codant pour la sous unité  $\alpha$  est un gène de 6,6Kb pour le rat (Tepler et *et al.*, 1989); 6,5Kb pour la souris (Ye *et al.*, 1992) et 5,8Kb pour l'homme (Pang *et al.*, 1993). Dans les trois espèces, ce gène est structuré en 4 introns et 5 exons (Figure 16). La région en 5' en amont du site d'initiation de la transcription est hautement conservée entre les 3 espèces suggérant un rôle potentiel dans la régulation de l'expression.

Le gène  $\beta$  est morcelé en 7 exons étalé sur 10Kb. Il comporte un seul site d'initiation de la transcription précédé par une seule boite TATA. Le premier exon code pour la région 5' non transcrite et une partie de la région cytoplasmique NH2 terminale. Le premier domaine transmembranaire (TM1) est codé par les exons 2 et 3, les segments TM2, TM3 et TM4 sont codés par les exons 3 et 4, l'exon 5 et l'exon 6 respectivement. L'exon 7 code pour la partie C



Figure 16 : Représentation schématique du gène et de l'ADNc codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI )

43

Généralités

terminale et la partie 3' non transcrite (Figure 17).

Le gène  $\gamma$  est composé de 5 exons et mesure 4,2 kb. Le premier code pour la séquence leader (Kuster *et al.*, 1990; Figure 18). L'exon 2 code pour un residu de la séquence leader, le domaine extracellulaire, transmembranaire et pour trois résidus du domaine intracytoplasmique. Le reste du domaine intracytoplasmique et la partie 3' non transcrite sont codés par les 3 derniers exons. La chaîne  $\gamma$  du FcɛRI et celle  $\zeta$  du TCR appartiennent à la même famille de molécules (Weissman *et al.*, 1988).

# 2- Localisation chromosomique

Chez la souris et l'homme, les gènes des sous unités  $\alpha$  et  $\gamma$  sont portés par le chromosome 1, au niveau des bandes 1q et 1q23 respectivement (Hupi *et al.*, 1988 ; Hupi *et al.*, 1989 LeConiat *et al.*, 1990). Ils sont liés génétiquement à ceux du récepteur Fc $\gamma$  (Ly17 ou Fc $\gamma$ RII) dans une région qui contient les gènes de chaînes  $\alpha$  de ces récepteurs (Ravetch *et al.*, 1986 ; Lewis *et al.*, 1986 ; Hogarth et *al.*, 1987). Il est surprenant de constater que malgré l'absence d'homologie de séquences, ces deux protéines possèdent des structures géniques localisées sur le même chromosome. Ceci suggère que la pression de sélection les a amenés à se retrouver sur le même locus afin d'harmoniser la régulation de l'expression des sous unités du récepteur.

Chez la souris, le gène de la chaîne  $\beta$  est localisé sur le chromosome 19 dans une région qui contient aussi le gène Ly44 (CD20) (Tedder *et al.*, 1988). La présence des ces deux gènes sur ce chromosome a permis de mettre en évidence une homologie structurale entre ces deux protéines. Chez l'homme, il est localisé sur le chromosome 11 dans une région proximale d'un gène associé à l'atopie (Sandford *et al.*, 1993).

Chez les trois espèces, l'analyse de la conservation des séquences d'acides aminés des chaînes composant le FccRI montre une identité de 38%, 68% et 86% respectivement pour les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  (Tableau 2). Le niveau de conservation de la chaîne  $\alpha$  diffère suivant les domaines : 16% d'identité pour la partie cytoplasmique, par rapport à 62% de conservation des résidus transmembranaires dont 9 forment un motif trés conservé.

## 3- Expression du récepteur FceRI au cours de la différenciation

Au cours de la différenciation des basophiles humains, l'expression du récepteur FcERI précède l'apparition des granules (Thompson *et al.*, 1990). Une synthèse de novo d'ARNm des trois sous-unités a été observée dans le cas des basophiles immatures. En revanche, cette capacité de néosynthèse n'a pas été décrite chez les cellules activées.

Pour différents récepteurs multimériques, l'abondance de l'ARNm de différentes sousunités corrèle avec la quantité de protéine synthétisée. Dans le cas du FcERI, les ARNm des







Région non transcrite	Transmembranaire
Peptide leader	Intracellulaire
Extracelluaire	

\$

Figure 18: Structure génique de la chaîne y du FcERI

ဂါ	
0	
<u>G</u>	
ai l	
<u>ଟ</u> ା	
N N	

	Espèce	ARNm (kb)	Chr	Nbre de copie	% d'identité (acides aminés)
<b>Chaîne</b> α	Homme Souris Rat	1,1 1,3 1,1	11q23 1q 1q	   	38%
<b>Chaîne</b> β	Homme Souris Rat	3,9 2,7 ; 1,7 2,7; 1,7	11q13 19	   	68%
Chaîne γ	Homme Souris Rat	0,85 0,85 0,85	1 1 1	1 1 1	86%

Tableau 2: Localisation chromosomique des gènes codants pour les 3 sous unités du FceRI Legende: Ch: chromosome; Nbre: Nombre.

trois sous unités ne sont pas synthétisés de facon équimolaire. La formation et l'assemblage du récepteur et par conséquent l'expression de surface est conditionnée par l'expression de la sousunité  $\beta$  (Klausner., 1989). Par ailleurs, la fixation d'IgE induit une stimulation de l'expression du récepteur en surface, résultant donc en une diminution de la dégradation (Quarto *et al.*, 1985; Furuichi *et al.*, 1985). Ainsi, la synthèse et la dégradation du récepteur apparait comme un phénomène coordonné (Quarto *et al.*, 1985).

Dans un système d'expression transitoire (Cellules Cos ) la transfection de la chaîne  $\alpha$  seule n'aboutit pas à l'expression en surface du FceRI (Kinet *et al.*, 1987 ; Shimizu *et al.*, 1988). En effet chez les rongeurs, la cotransfection simultanée des trois chaînes est nécessaire pour qu'il y ait expression en surface (Blank *et al.*, 1989). En revanche, la cotransfection des chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$ est suffisante pour l'expression membranaire du FceRI humain. Le même phénomène s'effectue si la cotransfection de la chaîne  $\alpha$  humaine est associée à celle de la chaîne  $\gamma$  de diffèrentes espèces ou d'autres protéines de la même famille que la chaîne  $\gamma$ (Ra *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1989 ; Kuster *et al.*, 1990). Ainsi, le mécanisme contrôlant l'expression membranaire du FceRI diffère entre les rongeurs et l'homme. Aucune explication n'est donnée à cette différence de formation et de rassemblage mais une première hypothèse va dans le sens de l'existence de *in vivo* complexe membranaire  $\alpha(\gamma)_n$  (Kuster *et al.*, 1992).

# 4- Structure peptidique et topologie des sous unités du FcERI

Les séquences peptidiques des trois chaînes ont été déduites de leurs ADNc respectifs (Ra *et al.*, 1989 ; Blank *et al.*, 1989). L'analyse du profil d'hydrophobicité de ces 3 séquences révèlent les caractéristiques suivantes (Tableau 3) :

-La chaîne  $\alpha$  est composée d'une séquence leader, d'un domaine transmembranaire, d'un segment hydrophile extracellulaire contenant les sites de glycosylation, et de deux domaines immunoglobulines où se situe le site de fixation pour l'IgE (Helm *et al.*, 1988).

-La chaîne  $\beta$  est constituée de 4 domaines transmembranaires et des régions N et C terminales intracytoplasmiques. En effet, des anticorps dirigés contre les résidus de la région N terminale et C terminale de la chaîne  $\beta$  ne détectent pas son expression en surface (Kinet *et al.*, 1988). Il est intéressant de noter que la chaîne  $\beta$ , tout en étant une protéine membranaire, ne présente pas de séquence leader.

-La chaîne  $\gamma$  est structurée en un domaine intra cytoplasmique hydrophile contenant les résidus thréonine et tyrosine (Holowka et Baird., 1984). Ces résidus deviennent phosphorylés *in vivo* (Quarto *et al.*, 1986). Ces données structurales ainsi que l'analyse statistique prédisent un modèle de récepteur à sept domaines transmembranaires pour le Fc $\epsilon$ RI (Figure 19).

Les différents domaines transmembranaires du Fc $\epsilon$ RI interagissent entre eux. En effet, des complexes  $\beta_{\gamma 2}$  sont détectés par immunoprécipitation du récepteur (Kinet *et al.*, 1988b). De plus,

#### Le récepteur de forte affinité pour l'IgE FceRI

ſ								
Sous unité	S. G		Гоtal	SL	EC	ТМ	IC	PM (kDa)
	Н	6	260	28	180	21	31	45
Chaîne a	S	6	250	23	181	21	25	45
	R	7	245	23	181	21	20	45
Chaîne 7	H. S. R	0	86	18	5	21	42	9

		Nbre d'acides aminés							
Sous unité	SG	Total	EC1	EC2	TM	ICNter	IC Loop	ICCter	РМ
Chaîne β	S 2	235	17	29	21	51	11	43	32
	R 2	243	17	29	21	59	11	43	32

Tableau 3: Principales caractéristiques biochimiques des sous unités  $\alpha$ .  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur de torte atfinité pour l'IgE FceRI

Légende : SG: sites de glycosylation; H: homme S: souris ; R: Rat SL: Séquence leader ; EC: extracellulaire ; TM: transmembranaire; IC: intracellulaire Nter : NH2 terminal; Cter: C terminal.



Figure 19: Modèle du récepteur de forte affinité pour l'IgE FceRI

+8

l'association de la chaîne  $\gamma$  avec  $\alpha$  a été mise évidence au niveau de la surface membranaire (Kuster *et al.*, 1990). La chronologie d'assemblage de ces trois chaînes montre qu'il y a formation d'un complexe  $\alpha/\beta$  avant l'interaction avec la chaîne  $\gamma$ . Basé sur ces évidences, un modèle d'interaction entre les différents domaines transmembranaires a été proposé (Kinet *et al.*, 1988; Figure 20).

Les études de la structure primaire ont permis d'avoir des informations nouvelles sur la disposition spatiale du FceRI au niveau de la membrane cytoplasmique. Les sous-unités du FceRI sont associées par des liaisons non covalentes de nature hydrophobe (Rivnay *et al.*, 1982, Kinet *et al.*, 1985a). L'analyse par mutagénèse dirigée a permis de confirmer ce type d'interactions (Blank-Varin et Metzger, 1990). Par ailleurs, les délétions de la partie cytoplasmique d'une ou plusieurs chaînes n'altèrent pas l'expression membranaire du récepteur. En revanche, la mutation d'un acide aminé situé au niveau des domaines transmembranaires l'abolit complètement. Le haut degré de conservation des séquences de ce domaine, comparé à celui d'autres régions du récepteur, va dans le sens d'une importance capitale pour l'assemblage du récepteur.

# **C-** Fonctions

# 1- Aspects généraux

L'IgE se fixe sur le Fc $\epsilon$ RI avec une affinité de 10<sup>10</sup>M<sup>-1</sup> (Conrad *et al.*, 1983) au niveau de la partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$ . Cette région extracellulaire est composé de deux domaines "immunoglobuline like"  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 (Kinet *et al.*, 1987 ; Figure 21). Elles sont homologues aux régions de la chaîne correspondante du Fc $\gamma$ R, Fc $\alpha$ R et poly Ig (Ravetch et Kinet, 1991). La grande homologie entre le domaine  $\alpha$ 1 du Fc $\epsilon$ RI, du Fc $\gamma$ RIII/CD16, et du Fc $\gamma$ RII/CD32 de même que la colocalisation chromosomique de leur gènes suggère que des évènements de duplication génique sont à l'origine des récepteurs Fc $\gamma$  et Fc $\epsilon$  (Qiu *et al.*, 1990 ; Ravetch et Kinet, 1991).

Les études détaillées grâce aux peptides chimériques de même que l'analyse épitopique par les anticorps monoclonaux montrent que le site de fixation de l'IgE est situé au niveau de la structure  $\alpha$ 2. La structure  $\alpha$ 1 est requise pour renforcer cette liaison (Mallamaci *et al.*, 1993).

Malgré la faible homologie de séquence entre la chaîne  $\beta$  du Fc $\epsilon$ RI et le CD20, ils présentent des similitudes structurales et une même colocalisation génique ce qui laisse prédire une fonction commune. La chaîne  $\beta$  du Fc $\epsilon$ RI et le CD20 ont des motifs trés conservés au niveau des domaines transmembranaires (Huppi *et al.*, 1989) et le CD20 semble intervenir dans la régulation de flux du calcium transmembranaire (Tedder *et al.*, 1988). Ceci a permis d'orienter les recherches vers un rôle éventuel de la chaîne  $\beta$  du Fc $\epsilon$ RI dans la transduction du signal.

La chaîne  $\gamma$  du Fc $\epsilon$ RI et la chaîne  $\zeta$  du TCR (Weissman *et al.*, 1988) appartiennent à la même famille de molécules. Leur ressemblance n'est pas limitée à l'aspect structural. En effet,



Figure 20 : Modèle d'interaction entre les domaines transmembranaires des sous unités du FœRI



Figure 21: Structure des domaines "immunoglobuline like "  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  du FceRI

50

les deux protéines forment un homodimère grâce aux ponts disulfure et sont essentielles à l'expression membranaire de leurs récepteurs respectifs (Weissman *et al.*, 1988; Ra *et al.*, 1989; Blank *et al.*, 1989). L'expression de la chaîne  $\gamma$  a été détectée au niveau de certains types cellulaires qui n'expriment pas le récepteur FceRI (Ra *et al.*, 1989). Elle est associé avec le Fc $\gamma$ RIIa ou son équivalent humain le Fc $\gamma$ RIII des cellules tueuses (NK) et des macrophages (Hibbs *et al.*, 1989) et le Fc $\gamma$ RI, récepteur à forte affinité pour l'IgG (Ernst *et al.*, 1993; Scholl et Geha., 1993). Comme la chaîne  $\zeta$ , la chaîne  $\gamma$  s'associe *in vivo* avec la chaîne  $\eta$  du TCR en formant des dimères (Jin *et al.*, 1990).

# 2- Activation liée au récepteur FcERI

# a- Agrégation du récepteur FceRI

L'agrégation du récepteur FcɛRI joue un rôle critique dans l'initiation de l'activation cellulaire. Chez les mastocytes, elle induit un changement rapide de la morphologie cellulaire (Oliver *et al.*, 1988) manifesté par une redistribution du cytosquelette (Pfeiffer *et al.*, 1985; Robertson *et al.*, 1986; Apgar *et al.*, 1991). Ce phénomène apparaît être secondaire par rapport aux signaux biochimiques tranduits à travers la membrane (Apgar *et al.*, 1991). Le récepteur FcɛRI non engagé a une mobilité latérale au niveau du plan de la membrane. Elle se réduit serieusement aprés l'agrégation du récepteur (Menon *et al.*, 1985; Mao *et al.*, 1991). En effet, les études de diffusion rotationnelle montrent un ralentissement de sa mobilité aprés l'agrégation. Enfin, le récepteur agrégé est internalisé par la voie des vésicules recouvertes ou "coated pits"(Isersky *et al.*, 1983; Pfeiffer *et al.*, 1985). Ces phénomènes induisent des changements de morphologie, de potentiel membranaire et une augmentation du pH intracellulaire.

En dépit des progrès réalisés pour la compréhension de ces processus, la définition exacte du signal minimum (nombre des récepteurs mobilisés) induisant l'activation cellulaire reste encore mal définie.

#### b- Activation des kinases

Le premier événement détecté après l'agrégation du FceRI est l'activation des protéines kinases. En effet, les inhibiteurs des tyrosines kinases inhibent l'activation des mastocytes via le FceRI (Deanin *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991). Au niveau des cellules au repos, les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du FceRI sont phosphorylées sur les résidus sérines et une seule thréonine respectivement. Après l'agrégation du récepteur, le niveau de base de phosphorylation de ces résidus augmente très rapidement (5s après fixation de l'antigène et se stabilise à 30 secondes) (Paolini *et al.*, 1991). La phosphorylation du FceRI peut être induite aussi dans un système acellulaire de préparation membranaire. Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation est l'un des événements précoces de la cascade biochimique.

51

Le FcɛRI ne possède pas d'activité kinase intrinsèque mais en fonction des types cellulaires, différents tyrosine kinases lui sont associées. Dans la lignée des basophiles de rat (RBL)2H3, plusieurs protéines kinases apparaissent associées au récepteur; il s'agit de p56 *Lyn*, pp60*Src*, (Eiseman et Bollen ., 1992) et une protéine de 72 kDa apparentée à la protéine *Syk* (Taniguchi *et al.*, 1991), la protéine kinase *Nck* (Li *et al.*, 1992), le produit du protooncogène *Vav* (Margolis *et al.*, 1992), *PLC*<sub>7</sub>*I* (phospholipase  $\gamma$ 1) (Park *et al.*, 1991), *Raf* et *Gap*. Cependant chez la lignée PT18, une autre protéine (p62*cYes*) est associée au FcɛRI (Eiseman et Bollen , 1992).

Un des rôles de la phosphorylation des tyrosines est de promouvoir les interactions entre les protéines contenant des résidus tyrosines phosphorylés et d'autres à domaine SH2 (Src homology domain 2). Ce domaine est décrit en se basant sur la forte homologie entre les protéines de la famille *Src* tyrosine kinases au niveau de la partie NH2 terminal. Différentes protéines, dont certaines ont un rôle dans la transmission de signal , possèdent ce domaine. La phosphorylation représente un mécanisme intermédiaire de transmission du signal de la cascade biochimique. Par ailleurs, dans certains cas elle correspond à un mécanisme physique de couplage (Paolini *et al.*, 1992) qui fait intervenir l'adhésion cellulaire aux composés de la matrice extracellulaire (Hamawy *et al.*, 1993).

#### c- Rôle des phosphatases

Le rôle des phosphatases dans le signal transductionnel du FceRI tient à deux observations: d'une part l'engagement continu du récepteur (agrégation) est nécessaire pour maintenir la phosphorylation des protéines cellulaires; d'autre part la déphosphorylation rapide des résidus phosphorylés des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur après addition d'un haptène monovalent (Paolini *et al.*, 1991). La fonction des phosphatases est de remettre le système à l'état de repos.

La régulation de la phosphorylation sur les résidus tyrosine lors de l'activation des cellules met également en jeu des phosphotyrosine phosphatases. La tyrosine phosphatase CD45, joue un rôle essentiel dans le signal de transduction du BCR et du TCR (Koretzky *et al.*, 1990; Justement *et al.*, 1991). Elle est aussi impliquée dans celui du FceRI. L'un des substrats de CD45 est la protéine kinase p56 *Lck*. Il a été ainsi démontré que seuls les transfectants des cellules T, FceRI+/CD45+, sont capables de restaurer l'activation via le FceRI en déphosphorylant la protéine kinase *Lck* (Adamczewski *et al.*, 1995)

#### d- Modèle

Comme d'autres récepteurs, le Fc $\epsilon$ RI contient un motif cytoplasmique D/EX<sub>2</sub>YX<sub>2</sub>LX<sub>6/7</sub>YX<sub>2</sub> désigné sous le nom d'ARAM (Antigen Recognition Activation Motif) (Reth., 1989 ; Weiss., 1993). Les études faites grâce aux protéines chimériques indiquent que ce motif est capable à lui seul de transduire l'ensemble des signaux comme ceux du récepteur multimérique (Irving et weiss, 1991 ; Romeo et Seed., 1991). Le motif ARAM exerce son action en interagissant avec le



Figure 22: Localisation du motif ARAM au niveau du récepteur FceRI

domaine SH2 des autres molécules impliquées dans le signal de transduction.

Le FceRI possède plusieurs domaines ARAM localisés dans la partie C terminale de la chaîne  $\beta$  et un motif dans chacune des chaînes  $\gamma$  (Figure 22). La présence du même motif dans la chaîne  $\beta$  et  $\gamma$  suggère un rôle différent. En effet, ces deux sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  semblent interagir par leur motif ARAM avec des kinases différentes (*Lyn* et *Syk* respectivement) (Jouvin *et al.*, 1994).

Un modèle tenant compte de l'ensemble de ces processus biochimiques initiaux a été proposé par l'équipe de Kinet :

L'agrégation du récepteur active la protéine kinase Lyn qui est associée à la chaîne  $\beta$  du Fc&RI. Cette activation résulte probablement de l'interaction de 2 molécules Lyn par le domaine SH2. La tyrosine phosphatase CD45 est impliquée dans cette étape en déphosphorylant le résidu tyrosine (régulateur négatif ) situé sur la protéine Lyn. Ce phénomène a été observé dans le cas du TCR ou on assiste à une déphosphorylation de la protéine kinase Lck (Sieh *et al.*, 1993). Une fois activée, la protéine kinase Lyn phosphoryle la chaîne  $\gamma$ . Ceci renforce la liaison entre la chaîne  $\gamma$  et la protéine kinase Syk. Par la suite, la protéine Syk devient phosphorylée et active. Elle phosphoryle à son tour les phospholipases  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$  qui sont transloquées au niveau de la membrane provoquant ainsi la synthèse de l'inositol triphosphate et du diacylglycérol (Beaven et Cunha-Melo., 1988). Dans ce modèle, l'étape limitante de la réaction est la phosphorylation des résidus tyrosines, régulateurs négatifs, de la protéine Lyn par une protéine kinase qui reste à identifier.

# 3- Synthèse de cytokines

L'un des développement importants dans le domaine de connaissance de la biologie des mastocytes est la découverte que ces cellules sont capables de synthétiser des cytokines. En effet, en réponse à l'activation via le FceRI, ces cellules synthètisent et libérent de l'IL-3, l'IL-4, l'IL 5, l'IL-6, l'IFN $\gamma$  et le GM-CSF ainsi que d'autres facteurs (Plaut *et al.*, 1989 ; Wodnar-Filipowiz *et al.*, 1989 ; Kulumburg *et al.*, 1992). Cette observation est importante car l'IL-3 est clairement impliquée dans la maturation et la différenciation des mastocytes chez la souris et les basophiles chez l'homme (Ihle *et al.*, 1983 ; Razin *et al.*, 1984 ; Valent *et al.*, 1989). Ainsi, la stimulation via le FceRI maintiendrait leur maturation et différenciation en jouant donc un rôle autocrine. De plus, l'IL-4 stimule la production de l'IgE par les cellules B. Par conséquent, l'activation des mastocytes via le FceRI augmenterait la synthèse d'IgE. Ceci aboutira à l'élévation du nombre de récepteurs Fc membranaires (Furuichi *et al.*, 1985 ; Quarto *et al.*, 1985). Cette séquence d'événements est contrebalancée par un système de régulation généré par l'effet d'autres cytokines comme l'IFN  $\gamma$ . Ce facteur, synthétisé et sécrété par les mastocytes et les basophiles activés via le FceRI, est connu pour son rôle de régulateur négatif sur la synthèse de l'IgE.

# Généralités

# Le récepteur de faible affinité pour l'IgE: CD23/ FceRII

Le récepteur de faible affinité pour l'IgE (FcɛRII) a initialement été découvert sur les cellules B lymphoblastoïdes humaines (Gonzalez-Molina et Spiegelberg., 1976). Depuis, il a été mis en évidence sur les cellules B transformées par le virus d'Epstein Bar (EBV) d'où son nom d'EBVCS2 (Kintner et Sugden., 1981), et les cellules B activées (Blast2) (Thorely-Lawson *et al.*, 1985). Differentes approches experimentales ont permis de le détecter à la surface d'autres populations cellulaires, en particulier les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes (Capron *et al.*, 1986b).

# A- Caractéristiques biochimiques du FcERII/CD23

Le CD23 humain est une glycoprotéine membranaire de 45KDa. Les groupements sucrés sont ajoutés par N glycosylation et O glycosylation (Conrad *et al.*, 1984). Le CD23 recombinant non glycosylé est capable de fixer l'IgE mais les hydrates de carbone, liés par N glycosylation, peuvent influencer la stabilité de la molécule membranaire (Delespesse *et al.*, 1989). L'immunoprécipitation des extraits cellulaires des cellules exprimant le CD23 révélent la présence d'autres molécules de 95kDa, 60 kDa, 45 kDa et 37 kDa (Pecoud et Conrad., 1981 ; Letellier *et al.*, 1988 ; Nakajima *et al.*, 1987). La forme de haut poids moléculaire est le résultat de l'agrégation de la forme monomérique. Des études plus détaillées ont montré que la forme de 45 kDa se clive par autoprotéolyse en différents fragments appelés : CD23 soluble (CD23s) de poids moléculaire 37kDa, 25 kDa et 15 kDa (Letellier *et al.*, 1989 ; 1990 Figure 23). Les fragments de 37 KDa et 25 kDa conservent la capacité de fixer l'IgE mais avec une faible affinité par rapport à la molécule native.

Le CD23 murin possède des caractéristiques similaires à celles retrouvées chez l'homme (Conrad et Pettrson, 1984 ; Staros et *al.*, 1988 ; Keegan et Conrad., 1987). Contrairement à leurs correspondants humains, les CD23s murins sont dépourvus de la capacité de fixer l'IgE.

#### B- Le gène du CD23

1- Organisation structurale et génomique

L'analyse des ADNc du FceRII/ CD23 humain (Ikuta *et al.*, 1987) et murin (Bettler *et al.*, 1989) ainsi que leurs structures génomiques (Suter *et al.*, 1987) révèlent une identité de séquences de 57% entre les deux protéines.

La protéine CD23 est composée d'un exodomaine, d'un domaine transmembranaire et d'un ectodomaine:



Figure 23 : Représentation schématique de la protéine CD23/FceRII

L'exodomaine est formé : - d'une région C terminale composée de 37 acides aminés qui contient un motif RGD inversé qui pourrait jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire (Grangette *et al.*, 1989). En revanche chez la souris, le motif RGD inversé est absent de la séquence C terminale (Conrad *et al.*, 1990).

- d'une région homologue aux lectines animales de type C, comme le récepteur d'asialoglycoprotéine (ASPGR) (Drickamer., 1988). Elle est codée par les exons 9, 10 et par une partie de l'exon 11. Par ailleurs, il y a une correspondance entre l'agencement des exons 9, 10 et 11 de la molécule CD23 et les exons 6, 7 et 8 du gène codant pour l'ASGPR du rat (Suter *et al.*, 1987). Ainsi, le CD23 a été classé dans la superfamille des lectines de type C (Springer, 1990).

- d'une séquence répétée de 21 acides aminés de nature hydrophobe. Elle correspond parfaitement aux exons 5, 6 et 7 du CD23 humain. Cet arrangement génique suggère une duplication d'exon au cours de l'évolution. Cette séquence forme une  $\alpha$  hélice qui confère la structure trimérique à la molécule CD23 (Drieks *et al.*, 1993).

Le domaine transmembranaire hydrophobe est composée d'une séquence de 20 acides aminés (entre le résidu 24 et 44). Elle correspond à une séquence signal, outre son rôle d'ancrage de la protéine au niveau membranaire.

L'ectodomaine N terminal intracytoplasmique est constitué de 23 acides aminés. Cette orientation inverse classe la molécule CD23 parmi les protéines membranaires de type II. Le  $Fc\epsilon RII/CD23$  est le seul récepteur d'anticorps décrit jusqu'ici qui n'appartient pas à la superfamille des immunoglobulines.

Le CD23/FceRII humain est codé par un gène unique (Suter *et al.*, 1987), étalé sur 13kb du chromosome 19 (Wendel *et al.*, 1990). Il est morcelé en 11 exons dont l'agencement correspond parfaitement aux différents domaines de la protéine. Le site d'initiation de la transcription est situé au niveau de l'exon 2. Deux formes de FceRII/ CD23 ont été décrites : FceRIIa et FceRIIb qui diffèrent par 6 acides aminés au niveau de la partie NH2 terminale (Yokota *et al.*, 1988). Elles dérivent du même gène par utilisation de sites d'initiation différents et une maturation alternative. Le FceRIIa est exprimé de façon constitutive par les cellules B. Le FceRIIb est exprimé par les autres populations cellulaires et par les cellules B après induction. Toutefois ces données ont été principalement acquises grâce à des lignées cellulaires.

Le gène murin possède la même structure que son équivalent humain. En effet, les exons codant pour le domaine lectinique sont séparés des autres par un large intron (4,1Kb). Au sein de cet intron, il y a des motifs répétés caractéristiques des éléments génétiques mobiles (Slighton *et al.*, 1980; Nishioka *et al.*, 1980). Récemment, en plus de la forme a, deux nouveaux ADNc ont été clonés. Il s'agit de l'équivalent de l'isoforme b et d'un autre isoforme appelé c dont le rôle n'est pas encore élucidé (Hideiko *et al.*, 1994).

L'analyse du promoteur du CD23 humain montre: deux boites TATA en amont du site



Figure24: Cartographie des promoteurs et des gènes du FcERII humain

de la coiffe (capping) et une région riche en GC qui juxtapose le premier exon. Cette région semble jouer un rôle important dans l'expression en fixant les facteurs de transcription de la famille des protéines à doigts de zinc (Zinc Finger Protein) (Jones et Tjijan, 1985 ; Rausher *et al.*, 1990). Ensuite, deux séquences de 188bp répétées et inversées, absentes du promoteur murin, sont localisées de part et d'autre du premier intron du CD23 humain. Elles forment une structure tertiaire impliquée dans la régulation de l'expression du CD23 humain au cours du développement des cellules B (Suter *et al.*, 1987). Enfin, l'ensemble est flanqué de part et d'autre par deux séquences ALU1 répétées comme c'est le cas du promoteur des gènes HLA-DR (Sullivan *et al.*, 1987).

La région promotrice du gène murin contient, en plus de l'équivalent des séquences ALU1(le motif B1), des motifs homologues aux boites "Y", "X" et TRE (TPA Responding Elements). Ces séquences sont aussi présentes en amont du promoteur du gène DPA codant pour le CMH de classe II (Benoist et Mathis, 1990). Cette observation peut expliquer la coexpression du gène codant pour le CMH classe II et celui du CD23. L'analyse par gène reporter montre que la séquence de 190 bp en amont du site d'intiation est suffisante pour l'expression du CD23 par les cellules B humaines (Sutter *et al.*, 1989).

# 2- Régulation de l'expression du FceRII

Dans différentes situations pathologiques, particulièrement associées à une élévation des IgE, comme les allergies ou le syndrome d'Hyper IgE (Nagai *et al.*, 1985), une élévation de l'expression du CD23 est observée au niveau de la surface membranaire des cellules T et B. Le même phénomène se produit dans le cas des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques ou de rat infectés par *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1981). Une augmentation du taux sérique du CD23s est détecté chez les patients hyperéosinophiliques (Aldebert *et al.*, 1994).

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans la régulation de l'expression du CD23, à savoir, l'IgE, les cytokines, la molécule elle même et ses fragments solubles.

# a- Rôle de l'IgE

Une étroite association entre l'élévation du taux d'IgE et l'augmentation de la densité cellulaire du CD23 a été démontrée au niveau des cellules B des rongeurs (Chen *et al.*, 1981 ; Yodoi *et al.*, 1979), des macrophages de souris (Daeron *et al.*, 1986) et de la lignée de monocytes U937 (Mayumi *et al.*, 1988). Par ailleurs, chez les monocytes ainsi que chez certaines lignées de cellules T, la fixation de l'IgE stabilise la molécule membranaire (Hosoda *et al.*, 1989 ; Kawabe *et al.*, 1988). Cependant, aucune augmentation de l'ARNm ni de la synthèse de la protéine n'a été mise en évidence (Delespesse *et al.*, 1989). Un des mécanismes expliquant cette observation tient à une protection contre la protéolyse du CD23 grâce à la fixation de l'IgE .

#### b- Rôle des cytokines

Les cytokines jouent un rôle important dans la régulation du CD23. Leurs effets dépendent du type cellulaire et de la situation pathologique.

La principale cytokine intervenant dans l'augmentation de l'expression du CD23 est l'IL-4. L'IL-4 augmente aussi bien la synthèse d'IgE ainsi que celle du CD23 (Keegan et *al.*, 1989 ; Defrance *et al.*, 1987; Galizzi *et al.*, 1989). En effet, après 24-48h de culture, les cellules B de patients normaux perdent la capacité d'exprimer le messager et la protéine membranaire. En revanche, il y a accumulation des fragments solubles dans les surnageants de culture. L'introduction de l'IL-4 dans le milieu de culture induit l'expression des deux formes a et b mais avec une prépondérance pour la forme b (Yokata *et al.*, 1988). L'IL-4 agit au niveau transcriptionnel, après internalisation via son récepteur membranaire. Ce mécanisme est indépendant de la voie de la protéine kinase C (PKC) (Lee *et al.*, 1993a). Le même effet stimulateur est observé pour l'IL-2 en présence d'anticorps antiIgM (Hivroz *et al.*, 1989). Récemment, des études ont décrit un rôle stimulant de l'IL-13 sur l'expression du CD23 indépendamment de l'effet de l'IL-4 (Punnonen *et al.*, 1993 ; Mc Kenzie *et al.*, 1993). Comme pour les cellules B, l'IL-4 et l'IL-13 stimulent l'expression du CD23 des monocytes humains normaux ainsi que de la lignée monocytaire U937 (Mc Kenzie *et al.*, 1993).

L'IFN $\gamma$ ,  $\alpha$ , les glucocorticoïdes aussi bien que le TGF $\beta$  inhibent cet effet stimulant (Denory *et al.*, 1990 ; Pène *et al.*, 1988a ; Wu *et al.*, 1991). L'IFN $\gamma$  intervient au niveau post-trancriptionnel en diminuant la stabilité du messager CD23 (Lee *et al.*, 1993b). Par ailleurs, d'autres facteurs peuvent accentuer l'effet stimulant de l'IL-4. C'est le cas de l'IL-5 (Pène *et al.*, 1988), des leucotriènes B4 (Yamaoka *et al.*, 1989), du LPS et du SAC ou encore des signaux résultant de l'interaction entre les cellules T et B (Fanslow *et al.*, 1992).

L'IL-4 et l'IFN  $\gamma$ , qui ont des effets antagonistes sur l'expression du CD23 par les lymphocytes B, augmentent son expression sur les plaquettes (Pancré *et al.*, 1988), les cellules de Langerhans (Bieber *et al.*, 1989a) et des cellules épithéliales du thymus (Delespesse *et al.*, 1991). Chez les éosinophiles et les monocytes humains, le LTB4 et le PAF ont un rôle stimulant (Moqbel *et al.*, 1990 ; Paul-Eugene *et al.*, 1990). Cependant le TGF $\beta$  inhibe l'expression du CD23 par la lignée éosinophilique (EoL3) et les monocytes (U937) (Naray Fejes Toth *et al.*, 1985 ; Watanabe *et al.*, 1990).

#### **C-Expression cellulaire**

#### 1- Les lymphocytes B

L'expression du CD23 a été d'abord détectée par la technique de rosettes. Depuis, chez l'homme ainsi que la souris a été montré que 90% des lymphocytes B  $\mu^+\delta^+$  expriment le FceRII(Kikuani et *al*, 1986; Waldschmidt et *al*, 1989). En outre chez la souris, les lymphocytes

Cellules cibles	Activité	Forme	Réferences	
Centrocytes	La survie et la différenciation	25 kDa. r *	Liu et al., 1991	
Thymocytes	La différenciation	25 kDa. r *	Mossalayi <i>et al</i> , 1990	
T CD4+	Costimulation	25 kDa. r *	Bertho et al., 1991	
Précurseurs Myéloïdes	Croissance et différenciation	25 kDa. r *	Mossalyi <i>et al.</i> , 1990	
U937	MIF	25 kDa. n	Flores -Romeo et al., 1989	
Monocytes	Pyrogènique	25 kDa. n	Ghaderi et al., 1991	
Mastocytes	HRF	25 kDa. n	Ghaderi et al., 1991	
PBMC	Production d'IgE	?	Delespesse et al., 1991	
Cellules B	Autostimulation	45 kDa. r	Jansen <i>et al</i> , 1991	
Différentes cellules	Adhésion	45 kDa. r	Kikutani <i>et al.</i> , 1989	
	1		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Tableau 4: Fonctions attribuées à la molécule CD23

Légende : MIF: Migration Inhibition Factor; HRF: Histamine Releasing Factor r : la proteine recombinate; n, la protéine naturelle; PBMC: Peripheral Blood mononuclear cells

\* Indique l'exigence de l'IL1 comme cofacteur

63

Comme dans le cas des éosinophiles, le FceRII détecté à la surface des plaquettes humaines et murines intervient dans la cytotoxicité IgE dépendante vis-à-vis des parasites (Joseph *et al.*, 1983 ; 1986 a et b).

# 5- Les cellules de Langerhans

Plusieurs laboratoires ont décrit la présence d'un site de fixation d'IgE à la surface des cellules de Langerhans de patients atteints de la dermatite atopique (Bruynzeel-Koomen*et al.*, 1988; Barker *et al.*, 1988 ; Bieber *et al.*, 1989a). Ce récepteur est associé au niveau membranaire au CD1(Bruynzeel-Koomen *et al.*, 1988). In vitro, les cellules de Langerhans expriment l'ARNm, la protéine et libèrent les fragments solubles du CD23 (Bieber *et al.*, 1989 b).

# 6- Autres types cellulaires

La présence du CD23 a été démontrée au niveau des cellules naturelles tueuses (NK) (Galli *et al.*, 1982 ; Kimata *et al.*, 1986), des cellules folliculaires dendritiques (Masuda *et al.*, 1989 ; Johnson *et al.*, 1986), des kératinocytes (Delespesse *et al.*, 1991), des cellules stromales de la moelle osseuse ainsi que les cellules de Red Steenberg de patients atteints de la maladie de Hodgkin (Rowlands *et al.*, 1990).

# **D-** Fonctions du CD23

La molécule CD23 possède plusieurs fonctions. Cependant, il y a une distinction à faire entre les fonctions de la forme membranaire et celle des formes solubles (Tableau4).

# 1- Fonction du CD23 membranaire

La fonction IgE dépendante du CD23 varie suivant le type cellulaire considéré. La découverte récente du CD21 comme un second ligand du CD23 vient compléter et résoudre beaucoup de questions jusqu'alors obscures.

a-Rôle dans la défense immunitaire

Le CD23 semble intervenir dans le mécanisme de cytotoxicité IgE dépendante des cellules inflammatoires (Capron *et al.*, 1983 ; Joseph *et al.*, 1986 ; Capron *et al.*, 1987). Ceci est en association avec le CD11b dans le cas des éosinophiles et des monocytes (Capron *et al.*, 1987). Par ailleurs, il peut intervenir dans les phénomènes de phagocytose des complexes immuns d'IgE. Récemment, des études ont montré l'implication de la forme b dans la phagocytose alors que la forme a est responsable de l'endocytose (Yokota *et al.*, 1992).

B qui sont Ly1<sup>+</sup> (l'équivalent murin du CD5<sup>+</sup>) ou Ly1<sup>-</sup> n'expriment pas le FcεRII même après induction par l'IL-4 (Kehry et Hudak.,1989 ; Lebrin *et al.*, 1988 ; Waldschmidt *et al.*, 1989). Cette lignée est caractérisée par une forte expression d'IgM et une faible expression d'IgD par rapport aux cellules B matures (CD23<sup>+</sup>) qui expriment ces deux isotypes. Ainsi le CD23 peut donc être un marqueur de sélection des cellules B murines. En revanche, chez l'homme les cellules B CD5<sup>+</sup> et CD5<sup>-</sup> ainsi que celles des patients leucémiques sont CD23<sup>+</sup> (Sarfati *et al.*, 1988 ; Fournier et al., 1991).

## 2- Les lymphocytes T

Malgré l'amélioration des techniques de détection, l'expression du CD23 à la surface des lymphocytes T normaux reste encore sujet à controverse. Initialement une faible expression a été détectée à la surface des lymphocytes T humains et murins (Young *et al.*, 1984 ; Chen *et al.*, 1981). D'autres travaux ont montré l'existence du CD23 à la surface des cellules T de patients atteints de la maladie de Kimura (Nagai *et al.*, 1985 ) ou infectés par le virus du Sida (Carini *et al.*, 1988a et 1988b), au niveau de clones T infectés par le HTLVI (Nutman *et al.*, 1987 ; Sarfati *et al.*, 1987) ou encore au niveau des cellules germinales T de patients allergiques (Armitage *et al.*, 1989 ; Prinz *et al.*, 1987 ; Prinz *et al.*, 1990). Par ailleurs, un ADNc du CD23 a été cloné à partir d'une lignéeT humaine HTLV1- (Nonaka *et al.*, 1989). Cet ADNc est identique à celui du CD23 de type b. Ainsi, il apparait que dans certaines conditions, les lymphocytes T synthétisent et expriment le CD23 au moins faiblement.

## 3- Les monocytes et les macrophages

Si le FcɛRII/CD23 n'est pas exprimé ou très peu sur les monocytes et les macrophages de patients normaux, il est clairement détecté sur les monocytes circulants de patients atteints de syndrome HyperIgE (Melewicz et Spiegelberg., 1980) et sur les macrophages alvéolaires de patients atteints d'asthme ou d'alvéolite extrinsèque (Melewicz *et al.*, 1982 ; Pforte *et al.*, 1990). Chez les rongeurs, le FcɛRII a été mis en évidence à la surface des monocytes et des macrophages (Boltz-Nitulescu*et al.*, 1981 ; Capron *et al.*, 1986b).

#### 4- Les éosinophiles et les plaquettes

Par différentes techniques, l'existence d'un récepteur de faible affinité pour l'IgE a été démontrée sur les éosinophiles et les plaquettes (Joseph *et al.*, 1986 ; Capron *et al.*, 1986b). Par ailleurs, une lignée d'éosinophile (EoL3) exprime le messager et la protéine CD23 (Yokota *et al.*, 1988). En revanche, l'identification et la caractérisation de ce récepteur à la surface d'éosinophiles comme étant le CD23 a été pendant longtemps sujet à controverse. Notre travail a permis de répondre à cette question fondamentale.

Récemment, l'équipe de Bonnefoy a démontré que le CD23 interagit avec une autre molécule membranaire : le CD21 (Aubry et al., 1992 ; Pochon et al., 1992).

La molécule CD21 a été identifiée sur les cellules B comme étant le récepteur d'EBV et du complément CR2. Elle est aussi exprimée par les cellules folliculaires dendritiques et les cellules T. L'interaction entre le CD23 et la molécule CD21 survient au niveau de la partie glycanique et elle est dépendante des ions Ca2<sup>+</sup> (Aubry *et al.*, 1993). Les anticorps anti CD21, tout comme les anticorps anti CD23, sont capables d'inhiber l'association entre les cellules T et B (Aubry *et al.*, 1993). Ceci suggère que la formation des conjugués entre les cellules T et B est en partie due à l'interaction du CD23 avec le CD21. Cette interaction peut avoir d'autres effets indépendamment de la régulation d'IgE. En effet, elle joue un rôle sur la survie des centres germinatifs des cellules B et sur la différenciation des cellules B en plasmocytes (Bonnefoy *et al.*, 1993), sur l'adhésion homotypique des cellules B (Bjork *et al.*, 1993) et sur la production d'histamine par les basophiles après stimulation (Bacon *et al.*, 1993).

# 2- Fonction des fragments solubles

# a-Rôle dans la mort cellulaire programmée

En présence d'IL-1 $\alpha$ , le fragment de 25 KDa exerce un effet négatif sur l'apoptose des cellules B centroblastiques et induit leur différenciation en plasmocytes (Liu *et al.*, 1991). Ces fragments solubles proviennent de la protéolyse du CD23 membranaire des cellules folliculaires dendritiques situées dans la zone claire du tymus.

# b- Rôle dans l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire

Les cellules CD23-, une fois transfectées par le CD23, forment des agrégats suggérant donc l'implication de la séquence RGD dans l'étape de l'adhésion cellulaire. En outre, les anticorps anti CD23 et anti CD21 inhibent effectivement l'agrégation cellulaire (Bjork *et al.*, 1993). Il a été également décrit que les fragments solubles du CD23 exercent une activité type MIF (migration inhibitory factor) sur la lignée monoblastique U937, activité qui se neutralise en présence des anticorps anti CD23 (Flores-Romo *et al.*, 1989).

c- Rôle dans la différenciation thymique et hématopoïétique

En association avec l'IL-1, le CD23s produit localement par les cellules stromales de la moelle osseuse, induit la différenciation des cellules précurseurs myéloïdes en cellules plus matures appartenant essentiellement aux lignées granulo-monocytaires (Mossalayi *et al.*, 1990 a). De la même manière, ces deux facteurs participent à la maturation des prothymocytes en thymocytes différenciés (Mossalayi et *al.*, 1990b).

# Chapitre II : Résultats

66

# Résultat I : Le récepteur de forte affinité pour l'IgE (Fc&RI) exprimé par l'éosinophile humain est impliqué dans la fonction antiparasitaire

# <u>RESULTAT I : LE RÉCEPTEUR DE FORTE AFFINITÉ POUR L'IGE (FCERI),</u> <u>EXPRIMÉ PAR L'ÉOSINOPHILE HUMAIN EST IMPLIQUÉ DANS LA</u> <u>FONCTION ANTIPARASITAIRE DE L'ÉOSINOPHILE</u>

De nombreuses études ont montré que les interactions entre les éosinophiles et l'IgE intervenaient non seulement dans les mécanismes de défense parasitaire mais aussi dans les manifestations allergiques. Jusqu'a présent, les bases moléculaires régissant ces phénomènes étaient mal définis. L'expression du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI) a été longtemps supposée restreinte aux mastocytes et aux basophiles. Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que l'éosinophile humain exprime les trois chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  composant le récepteur FceRI. L'immunomarquage ainsi que l'analyse par cytofluorimétrie, réalisés avec un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne  $\alpha$  (mAb15-1) du récepteur, révèle la présence de la chaîne  $\alpha$  à la surface d'une sous population d'éosinophiles. En outre, une inhibition dose-dépendante de la fixation d'IgE radiomarquée est observée quand les éosinophiles sont incubés en présence de l'anticorps mAb15-1.

Pour élucider le rôle du FceRI dans les fonctions effectrices de l'éosinophile humain, nous avons déterminé l'effet de l'engagement de ce récepteur dans le processus de libération des médiateurs spécifiques contenus dans les granules. En effet, la fixation de l'anticorps mAb15-1 sur le récepteur suivie de l'addition d'un second anticorps visant à mobiliser les récepteurs dans la membrane, induit la libération de la peroxydase (EPO) et non de la protéine cationique de l'éosinophile (ECP). Ce résultat intrigant et interessant au niveau fonctionnel est en accord avec ce qui a été démontré auparavant dans notre laboratoire: induction spécifique de l'EPO versus ECP lors de la fixation de l'IgE sur son récepteur. Nous avons pu démontrer une inhibition dose dépendante de l'ADCC vis à vis des schistosomules, quand on incube les éosinophiles en présence de l'anticorps mAb15-1. Ces résultats suggèrent que le récepteur de forte affinité pour l'IgE, en plus de son rôle dans les maladies allergiques, a un rôle primordial dans les mécanismes effecteurs de l'éosinophile potentiellement impliqués dans la défense antiparasitaire.

# L'ensemble de ces résultats est présenté dans cet article publié dans le journal *Nature*.

# High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites

Abdelillah Soussi Gounni Bouchaïb Lamkhioued, Kenichi Ochiai, Yoïchi Tanaka, Emmanuel Delaporte, André Capron, Jean-Pierre Kinet & Monique Capron

Reprinted from Nature, Vol. 367, January 13, 1994 Issue

69

# High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites

Abdelillah Soussi Gounni\*, Bouchaïb Lamkhloued\*, Kenichi Ochial<sup>†</sup>, Yoïchi Tanaka\*, Emmanuel Delaporte<sup>‡</sup>, André Capron\*, Jean-Pierre Kinet<sup>†</sup> & Monique Capron\*§

\* Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire.
Unite Mixte INSERM U167-CNRS624, Institut Pasteur,
1 rue du Professeur A. Calmette, BP 245, 59019 Lille, France
\* Molecular Allergy and Immunology Section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Maryland 20852, USA
‡ Service de Dermatologie A, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 59000 Lille, France
§ To whom correspondence should be addressed

PARASITIC infections are often associated with eosinophilia and high levels of immunoglobulin E (IgE). This observation has led to speculation that eosinophils and IgE may act together in the immune response against parasites. In support of this hypothesis, IgE and eosinophils participate in cytotoxic reactions directed against Schistosoma mansoni larvae in vitro<sup>1,2</sup>. Furthermore, epidemiological studies have shown an inverse correlation between levels of specific IgE and rates of infection with Schistosoma<sup>3-5</sup>. The low-affinity IgE receptor (FceRII/CD23) was first incriminated in eosinophil activation<sup>6,7</sup>. The fact that the high-affinity IgE receptor  $(Fc \in RI)^{8,9}$  is not only expressed on mast cells and basophils but also on Langerhans cells<sup>10,11</sup> led us to investigate the presence of FcERI on eosinophils. Here we show that FcERI is expressed on eosinophils from hypereosinophilic patients, is involved in eosinophil degranulation, and participates in eosinophilmediated cytotoxicity against S. mansoni. Our results indicate that FceRI may play a major part in immune defence against parasites.

Highly purified eosinophils from hypereosinophilic patients were incubated with <sup>125</sup>I-labelled monomeric human IgE together with increasing concentrations of the anti-Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ chain monoclonal antibody 15-1 (ref. 10) or with a control antibody, and the cell-bound radioactivity counted. The monoclonal antibody 15-1, but not the isotypic control antibody, induces a

dose-dependent inhibition of monomeric IgE binding (Fig. 1). At the higher dose of 15-1 (50 µg ml<sup>-1</sup>, inhibition is comparable to the inhibition seen with 1 mg ml<sup>-1</sup> of unlabelled human IgE. Under the same conditions, 1 mg ml<sup>-1</sup> of human IgG did not inhibit IgE binding, whereas 15-1 was not able to inhibit the binding of <sup>125</sup>I-labelled human IgG (data not shown). We then used flow cytometry to confirm the surface expression of FcERI  $\alpha$ -chain on the eosinophils. The Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> human basophil cell line KU812 served as a positive control. As expected, 90% of the KU812 cells stain positively with 15-1 (Fig. 2a) but not with control antibody. Under the same conditions, positive staining is detected on 13-73% of cells in purified eosinophil preparations (Fig. 2b, c). This percentage varies according to individual donors and is equivalent to binding of IgE (Fig. 2c). Immunostaining experiments with 15-1 were also performed on cytocentrifuged KU812 cells or purified blood eosinophil preparations. Positive staining is again found on KU812 cells (Fig. 2d), as well as on some eosinophils (Fig. 2f). In contrast, no staining is detectable with the control antibody (Fig. 2e-g). Moreover, combined immunostaining of tissue eosinophils with 15-1 and an antibody against eosinophil cationic protein (ECP) shows that the 15-1-positive cells are eosinophils (Fig. 2h, i). Taken together, these data demonstrate that eosinophils from these patients can bind monomeric IgE through the Fc $\varepsilon$ RI  $\alpha$ chain and that expression of Fc ERI varies between individuals.

We next investigated whether transcripts for the Fc $\varepsilon$ RI  $\alpha$ chain<sup>12,13</sup>, which contains the binding site for IgE<sup>14,15</sup>, could be detected by northern blotting in the control cell line KU812 or in the highly enriched eosinophil preparations. As expected, a 1.2-kilobase (kb) transcript is readily detected in KU812 cells (Fig. 3a). Eosinophils from all patients express transcripts of similar size, but with variable abundance according to the individual donor (Fig. 3a, lanes 2-5). No transcript is detected in preparations of lymphocytes or neutrophils (Fig. 3b, lanes 2-5), which may contaminate the eosinophil preparations. Furthermore, a similarly sized mRNA is also detected in butyratetreated HL60 cells, which differentiate towards eosinophils<sup>16,17</sup> (Fig. 3b, lanes 6 and 7), but not in untreated cells (Fig. 3a, lane 6; Fig. 3b, lane 8). This is remarkable not only because  $Fc \in RI$  $\alpha$ -chain transcripts are expressed in an eosinophil cell line, but also because this expression can be regulated.

Fc $\varepsilon$ RI is a tetrameric structure composed of an IgE-binding  $\alpha$ -chain, a  $\beta$ -chain and two disulphide-linked  $\gamma$ -chains<sup>8.9</sup>. We tested for the presence of  $\beta$ - and  $\gamma$ -transcripts in our eosinophil preparations. As in basophils, the amount of  $\beta$ -chain mRNA is much less than for  $\alpha$ -chain<sup>18</sup>, so the polymerase chain reaction

FIG. 1 Inhibition of <sup>125</sup>I-igE binding to human eosinophils by anti-Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ -chain monoclonal antibody (mAb) 15-1.

METHODS. Human eosinophils were purified from the venous blood of patients with eosinophilia, associated mainly with idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES), skin diseases or lymphomas, by centrifugation on discontinuous 18-25% (w/v) metrizamide gradients (Nyegaard, Norway) as described<sup>22</sup>. The degree of purity of eosinophil populations, estimated after staining with Giemsa, was between 85 and 99%. Human IgE myeloma protein PS (gift from H. L. Spiegelberg) was radioiodinated by the chloramine-T technique<sup>7</sup> to a specific activity of  $1\times 10^6$  c.p.m. per µg. Purified human eosinophils  $(3.3\times 10^6$  cells per ml) were incubated with  $^{125}$ l-labelled IgE myeloma protein (1 µg ml $^{-1})$ in a total volume of 60  $\mu$ l for 90 min at 4  $^\circ$ C in the presence of various concentrations of anti-Fc  $\epsilon$ RI  $\alpha$ -chain mAb 15-1, or isotypic control mAb, or human IgE myeloma protein PS, or normal human IgG (Sigma). Cells were then centrifuged through sucrose gradients and cell-associated radiolabelled IgE was measured in a  $\gamma$ -scintillation counter. All results obtained with anti-Fc $\varepsilon$ RI  $\alpha$ -chain mAb 15-1 or control antibodies are presented as mean percentages of inhibition ±s.e.m. by comparison to those obtained with unlabelled IgE (n=4 experiments). In two experiments, the average numbers of receptors per eosinophil were estimated to be 84,000 and 73,000 respectively.



## LETTERS TO NATURE

(PCR) was used to detect  $\beta$ -chain mRNA. The amplified products obtained from eosinophils. KU812 cells and, remarkably, from butyrate-treated HL60, revealed the size bands predicted for Fe $\varepsilon$ RI  $\beta$ - and  $\gamma$ -chains (Fig. 3c, d). The specificity of the fragments was confirmed by restriction enzyme analysis (data not shown) and Southern blotting, with internal oligonucleotides specific for each subunit (Fig. 3e, f). Thus, eosinophils and differentiated HL-60 cells express  $\alpha$ -.  $\beta$ - and  $\gamma$ -transcripts.

Effector functions of eosinophils appear to be primarily mediated by the release of granule proteins<sup>19</sup>. Moreover, IgE-dependent activation of eosinophils from patients with parasitic infections or with allergic diseases can lead to the selective release of eosinophil peroxidase (EPO) but not  $ECP^{20,21}$ . We therefore investigated whether crosslinking of FceRI could induce EPO



NATURE · VOL 367 · 13 JANUARY 19

FIG. 3 Presence of Fc $\varepsilon$ RI  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain transcripts in eosinophils. a and b, Northern blot hybridization of total RNA with a human Fc $\varepsilon$ RI  $\alpha$ -chain probe. a, Lanes: 1 and 7, human basophilic cell line KU812: 2–5, highly purified eosinophils from 4 different eosinophilic patients; 6, undifferentiated HL60 cells. b, Lanes: 1. KU812 cells; 2, purified lymphocytes from hypereosinophilic patient; 3 and 4: purified eosinophils, as in lanes 3 and 4 in a; 5, highly purified neutrophils from eosinophilic patient: 6 and 7, butyrate-induced HL60 cell line, at 7 and 3 days respectively; 8, undifferentiated HL60 cells. c and e, Reverse transcriptase (RT)-PCR and Southern blot analysis of Fc $\varepsilon$ RI  $\beta$ -subunit. Lanes: 1, negative control (no cDNA); 2 and 6. purified eosinophils; 3, KU812; 4, undifferentiated HL60 cells; 5, differentiated HL60 cells. d and f, RT-PCR and Southern blot analysis of Fc  $\varepsilon$ RI  $\gamma$ -subunit. Lanes: 1 and 4, purified eosinophils; 2. differentiated HL60 cells; 3, undifferentiated HL60 cells; 5, KU812 cells; 6, negative control (no cDNA). g, RT-PCR with  $\beta$ -actin primers.

METHODS. Neutrophil preparations: patient neutrophils were obtained from the venous blood of patients with hypereosino-philia by centrifugation through discontinous metrizamide gradients<sup>23</sup>. Cell culture: a sub-line of the HL60 cell line (clone 15: gift from J. Tavernier (Roche Research, Gent, Belgium) was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 25 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin. For induction, cells were incubated at  $2 \times 10^5$  per ml with 0.5 mM sodium butyrate for 7 days<sup>17</sup>. For northern blot analysis, 10 µg total RNA was used per lane<sup>9</sup>. The *Bam*HI-XhoI fragment of the human FccRI α-chain cDNA was used as the probe. RT-PCR: total RNAs from eosinophils, KU812 and HL60 cell line were reverse-transcribed and examined by PCR analysis using specific primers for β- and γ-chains of FccRI (ref. 11). PCR conditions were 1 min at 94 C, 2 min at 60 C and 3 min at 72 °C for 30

cycles. PCR products were electrophoresed on agarose and visualized by ethidium staining. Southern blot analysis: Amplified products were blotted onto Hybond N membranes using standard methods. Oligonucleotide probes were labelled with T4 polynucleotide kinase and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Hybridization was carried out in the same conditions as before.



i. 4 a and b, Release of EPO and ECP after stimulation of eosinophils with anti-RI mAb. c and d, Inhibition of eosinophil-mediated IgE-dependent cytotoxicity inst schistosome targets. For cell activation, highly purified eosinophils (>90%) is incubated with anti-Fc RI  $\alpha$ -chain mAb 15–1, irrelevant mAb of the same ype, or secretory IgA (positive control) at a final concentration of 10  $\mu$ g mI<sup>-1</sup>

TURE · VOL 367 · 13 JANUARY 1994



Oligonucleotides specific for sequences on either side of a splice juction within  $\beta$  and  $\gamma$  genes were used in the PCR reaction to preclude amplification of possible contaminating genomic DNA. The FccRI  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain primers have been described<sup>11</sup>.



at 4 °C. Then cells were challenged with anti-lg antibody Fab'2 fragments and incubated for 2 h at 37 C in 5% CO2. As negative controls, cells were incubated with each reagent alone. EPO and ECP release was evaluated in the same supernatants by a chemiluminescence assay<sup>20</sup> and a double-antibody radioimmunoassay method (Pharmacia Diagnostics) respectively. Results are expressed as the index of EPO and ECP release as described<sup>21</sup>. For cytotoxicity assay, eosinophils were preincubated with various concentrations of anti-Fc ERI mAb 15-1 or isotype control for 30 min at room temperature before addition to S. mansoni targets<sup>9</sup>, in the presence of one IgE containing reference immune serum (at 1:32 final dilution; total volume, 200  $\mu$ l). Results were compared with those obtained with targets incubated without mAb (medium) in the presence of effector cells and immune serum. The cytotoxicity values obtained with eosinophils from 4 different eosinophilic donors were expressed as mean % cytotoxicity ±s.e.m. d. Individual results of sera (final dilution 1:32) from 8 different S. mansoni-infected patients (patients 1-8), containing varying amounts of specific anti-S. mansoni IgE antibodies, were evaluated by a radioallergosorbent test against a soluble S. mansoni worm extract. IgE values are expressed as the index of bound radioactivity versus normal serum (RAST values). Anti-Fc ERI (15-1) or control isotype mAb were used as in c (mean cytotoxicity values of 3 experiments ±s.e.m.). Sera from 5 allergic individuals containing between 420 and 4.313 IU mI  $^1$  total IgE were used as specificity controls. Normal human sera were used as negative controls.

185

# .ETTERS TO NATURE

elease from eosinophils (Fig. 4a). Increased levels of EPO index of release >15) are detected after stimulation of purified osinophils by crosslinking antibody 15-1 but not an unrelated sotype control antibody, or other control antibodies. In conrast, no significant amounts of ECP were detected in the same upernatants in which EPO was measured (Fig. 4b). However, levated levels of both EPO and ECP are obtained in supernatints of the same eosinophil preparations after crosslinking of ecretory IgA (Fig. 4a, b). These data indicate that  $Fc \in RI$  is nvolved in the differential release of EPO versus ECP, as was shown previously after IgE-dependent activation<sup>20,21</sup>

Finally, we analysed whether  $Fc \in RI$  is involved in the cytotoxicity of eosinophils against parasites. Purified eosinophils, schistosomula targets, and IgE antibody-containing immune sera were incubated in the presence of antibody 15-1 or an isotype control antibody. A dose-dependent inhibition of cytotoxicity is

- 1. Capron. A. et al. immun. Today 7, 15-18 (1986)
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Ouma, J. H. & Butterworth, A. E. Science 238, 1065-1072 (1987)
- 3. Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunne, D., Simpson, A. J. & Wilkins, H. A. Nature 349, 243-245 (1991) 4. Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgeois, A., Prata, A. & Dessein, A. J. Eur. J. Immun. 21, 2679-
- 2686 (1991).
- 5. Dunne, D. W. et al. Eur. J. Immun. 22, 1483-1486 (1992).
- Capron, M., Grangette, C., Torpier, G. & Capron, A. Chem. Immun. 47, 128–178 (1989).
   Capron, M. et al. Eur. J. Immun. 21, 2423–2429 (1991).
- Kinet, J.-P. in Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates 701-708 (Raven, New 8. York, 1992).
- Ravetch, J. V. & Kinet, J. P. Rev. Immun. 9, 457–479 (1991).
   Wang, B. et al. J. exp. Med. 175, 1353–1358 (1992).
- Bieber, T. *et al. J. exp. Med.* **175**, 1285–1291 (1992).
   Kochan, J., Pettine, L. F., Hakimi, J., Kischi, K. & Kinet, J. P. Nucleic Acids Res. **16**, 3584– 3594 (1988).

observed with 15-1 but not with control antibody in the presence of one immune serum used as positive control (Fig. 4c). Also, when more sera from S. mansoni-infected patients were used. not only were cytotoxicity levels significantly correlated with specific anti-S. mansoni IgE levels (Spearman's correlation test, P < 0.05), but they were also significantly inhibited by 15-1 at the optimum concentration (Fig. 4d). None of the five control isotype sera from allergic patients was able to induce target cell lysis. Anti-CD23 monoclonal antibody of the same isotype (antibody  $(135)^7$  used at 50 µg ml<sup>-1</sup> did not significantly inhibit cytotoxicity (data not shown). These results indicate that FcERI can mediate eosinophil-dependent cytotoxicity against schistosomula and provide the evidence that, in addition to its role in mediating allergic responses<sup>8.7</sup>,  $Fc \in RI$  may participate in a physiological protective immune response against metazoan parasites.  $\square$ 

- 13. Shimizu, A. et al. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 85. 1907-1911 (1988)
- Blank, U., Ra, C. & Kinet, J. P. J. biol. Chem. 266, 2639–2646 (1991).
   Hakimi, J. et al. J. biol. Chem. 265, 22079–22081 (1990).

- Fischkoff, S. A. et al. J. exp. Med. **160**, 179–196 (1984).
   Plaetinck, G. et al. J. exp. Med. **172**, 683–691 (1990).
   Kuster, H., Zhang, L., Brini, A. T., MacGlashan, D. W. J. & Kinet, J. P. J. biol. Chem. **267**, 1000 (2000). 12782-12787 (1992).
- 19. Gleich, G. J. & Adolphson, C. R. Adv. Immun. **39**, 177–253 (1986). 20. Khalife, J. et al. J. Immun, **137**, 1659–1664 (1986).
- Tomassini, M. et al. J. Allerg. clin. Immun. 88, 365–375 (1991).
   Capron, M. et al. J. exp. Med. 184, 72–89 (1986).
- 23. Truong, M. J. et al. J. exp. Med. 177, 243-248 (1993)

ACKNOWLEDGEMENTS, We thank J. P. Dessaint, M. Joseph and M. H. Jouvin for advice; A. Scharenberg for critically reading the manuscript: J. P. Papin, S. Loiseau, J. L. Neyrink and J. P. Kusnierz for help with experimental procedures; K. Nilsson for the KU812 cell line; and J. Pestel and P. Desreumaux for human sera. A. S. G. is supported by Fondation Marcel Mérieux, Lyon. France.

Received 29 July: accepted 16 November 1993

## Résultats complémentaires

D'autres expériences ont été réalisées, confirmant les résultats que nous avons publiés. Comme il a été démontré, l'expression de la chaîne  $\beta$  est le facteur limitant de l'expression membranaire du récepteur FccRI (Kinet *et al.*, 1989). Ainsi, grâce à la technique de Northern blot, nous avons pu mettre en évidence l'expression de cette chaîne par l'ensemble des éosinophiles testés, provenant de patients HES, de même que la lignée HL60 différenciée en éosinophile, confirmant les résultats publiés obtenus uniquement par RT-PCR.

Il est à noter qu'un patient présente en outre du messager à la taille attendue, un autre messager de faible taille qui pourrait être la conséquence d'un épissage alternatif (Figure : 25).



Figure 25: Détection de l'ARNm codant pour la chaîne  $\beta$  du Fc $\epsilon$ RI chez l'éosinophile humain
## Discussion et conclusion

De nombreux travaux ont montré le rôle primordial du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI) dans les mécanismes inflammatoires et allergiques en particulier. Au cours de ce travail, nous avons démontré pour la première fois l'expression de ce récepteur à la surface des éosinophiles. Ce récepteur s'avère impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité IgE dépendante vis-à-vis des parasites.

Chez les éosinophiles, l'étude par Northern blot de l'expression de l'ARNm codant pour la chaîne α, le site de fixation de l'IgE, montre une hétérogénéité d'expression de cette chaîne en fonction des patients. Cette hétérogénéité se manifeste par l'absence du signal ou par un signal très faible pour certaines préparations d'éosinophiles. Cette hétérogénéité d'expression au niveau de l'ARNm suggère l'existence d'un contrôle de l'étape de la transcription du messager codant pour la chaîne  $\alpha$  FceRI par des facteurs qui restent à identifier. Par ailleurs, l'étude de l'expression membranaire par cytofluorimétrie en flux et immunomarquage révèle que le pourcentage des cellules exprimant la chaîne  $\alpha$  en surface varie de 10 à 50 % suivant les patients, ce qui suggère l'existence de deux sous-populations d'éosinophiles différant au niveau de l'expression du FcERI. Ceci n'exclut pas un mécanisme de contrôle de l'étape traductionnelle de la chaîne  $\alpha$  du FcERI. Dans ce contexte, il sera très intéressant d'essayer de correler cette hétérogénéité d'expression à des situations pathologiques. Des résultats préliminaires indiquent que pour certains patients atteints de pemphigoïde bulleuse, l'expression du récepteur FceRI par les éosinophiles n'a été détecté que quand le taux d'IgE est supérieur à la normale (Delaporte et al., en préparation). Des études sur un échantillon de patients plus important nous permettra de répondre à cette question fondamentale.

Par ailleurs, la détection par immunomarquage de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du FcɛRI montre une localisation granulaire de cette protéine. Ceci peut reflèter le stockage granulaire de cette protéine et /ou l'internalisation du complexe ternaire antigène-IgE-récepteur agrégé. Ce phénomène a été observé dans le cas de la lignée RBL (Pfeiffer *et al.*, 1985). Cette observation, associée à l'expression chez l'éosinophile de la molécule HLA-DR colocalisée au niveau membranaire avec le récepteur de faible affinité CD23, suggère que l'éosinophile peut participer à la présentation d'antigène, suite à la coopération du récepteur FcɛRI, FcɛRII et de la molécule HLA-DR. Ceci peut avoir lieu au niveau des lésions de certains pathologies cutanées où l'éosinophile constitue le type cellulaire prédominant de l'infiltrat inflammatoire, comme la pemphigoîde bulleuse. Dans cette pathologie, par double-immunomarquage on a pu détecter l'expression des récepteurs FcɛRI et FcɛRII (Figure 27; Résultat IV). Afin de vérifier cette hypothèse, il reste à identifier par triple immunomarquage l'expression du récepteur FcɛRI, FcɛRII et la molécule HLA-DR à la surface des éosinophiles.

Le rôle des récepteurs d'IgE des éosinophiles dans les mécanismes de cytotoxicité vis-à

-vis des parasites a été étudié par de nombreuses approches (Capron *et al.*, 1984.; 1986b). Ainsi dans ce contexte, le rôle éventuel du récepteur FcɛRI, caractérisé à la surface des éosinophiles, a été étudié *in vitro* par un test de cytotoxicité IgE dépendant vis-à-vis des schistosomules de *S. mansoni*. Nous avons démontré que l'addition d'un anticorps dirigé contre la chaîne  $\alpha$  du FcɛRI mAb (15-1) inhibe d'une manière dose dépendante la cytotoxicité des éosinophiles vis-a-vis des schistosomules. Ce résultat suggère que ce récepteur fait partie des molécules membranaires impliqué dans la défense antiparasitaire.

De plus, la mobilisation de ce récepteur induit une libération sélective des protéines cationiques de l'éosinophile EPO versus ECP. Les fonctions de l'EPO sont liées à son activité enzymatique et peuvent s'exercer notamment vis-à-vis des cellules pulmonaires, en synergie avec d'autres facteurs comme les halogènes, l'eau oxygénée ou les granules de mastocytes. Ainsi, les éosinophiles se trouvent une fois de plus incriminés mais cette fois ci via le récepteur FcERI dans les mécanismes inflammatoires particulièrement dans le cas des allergies.

En conclusion on peut suggérer que le récepteur de forte affinité pour l'IgE puisse faire partie des molécules impliquées dans la défense contre les parasites, et qu'au cours de l'évolution ce récepteur s'est converti vers une fonction néfaste pour l'organisme en particulier lors des allergies.

# Résultat II: Expression par les plaquettes du récepteur de forte affinité pour l'IgE -Implication dans la cytotoxicité antiparasitaire et modulation par le récepteur de faible affinité FcERII /CD23

77

Soussi Gounni A., Capron M., Kusnierz J.P., Vorng H., Kinet J.P., Sarfati M., Capron A., and Joseph M.

Soumis pour publication

# RESULTAT II : EXPRESSION PAR LES PLAQUETTES DU RECEPTEUR DE FORTE AFFINITÉ POUR L'IGE.-IMPLICATION DANS LA FONCTION ANTPARASITAIRE ET MODULATION PAR LE RECEPTEUR DE FAIBLE AFFINITE POUR L'IGE FCERII/CD23

C'est à la suite des travaux démontrant l'existence d'une cytotoxicité plaquettaire IgE dépendante dans diverses parasitoses, que l'existence d'un récepteur spécifique d'IgE sur ces cellules a été suggérée (Joseph *et al.*, 1983). L'analyse par Scatchard de ce récepteur a révélé une courbe bimodale avec deux constantes d'affinité. La première correspond à un récepteur de faible affinité pour l'IgE dont les caractéristiques biochimiques sont similaires à celui du FceRII/CD23 des lymphocytes (Joseph *et al.*, 1986). La deuxième pouvait correspondre à un site de forte affinité pour l'IgE qui restait à identifier.

L'expression du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI) a été longtemps supposée restreinte aux mastocytes et aux basophiles. Récemment son expression vient d'être mise en évidence chez les cellules de Langerhans (Wang *et al.*, 1992), les éosinophiles (Soussi Gounni *et al.*, 1994), et les monocytes (Maurer *et al.*, 1994). Le FcɛRI est un complexe multimérique formé de trois chaînes protéiques  $\alpha\beta\gamma2$  (Kinet *et al.*, 1989). La mobilisation de ce récepteur au niveau de la membrane des basophiles induit le relargage de médiateurs intervenant dans les étapes précoces de l'hypersensibilité de type 1, incluant les prostaglandines, les leucotriènes (Parker *et al.*, 1993) ainsi que les cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  et les chemokines) qui ont un rôle dans la régulation de la réaction immunitaire (Kulumburg *et al.*, 1992; Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1989).

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si les plaquettes exprimaient le récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI).

Une approche fonctionnelle nous a permis tout d'abord de tester l'effet de la mobilisation du récepteur Fc $\alpha$ RI sur les plaquettes humaines. La mobilisation de ce récepteur par l'anticorps antichaîne  $\alpha$  du Fc $\alpha$ RI (mAb15-1), induit une cytotoxicité plaquettaire vis-à -vis des schistosomules. L'analyse par cytofluorimétrie en flux, ainsi que l'inhibition de la fixation de l'IgE radiomarquée sur les plaquettes par l'anticorps 15-1, nous a permis de mettre en évidence l'expression de la chaîne  $\alpha$  du Fc $\alpha$ RI, chez les plaquettes humaines.

Ces résultats suggèrent que les plaquettes expriment en surface le récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI) et que la mobilisation de celui-ci induit une stimulation de la fonction cytotoxique des plaquettes.

La caractérisation moléculaire de ce récepteur a été entreprise par Northern Blot et RT-PCR. En effet, grâce à ces deux techniques, nous avons mis en évidence l'expression par les plaquettes et

par la lignée mégacaryocytaire (DAMI) de l'ARNm des trois sous unités composant le récepteur Fc $\epsilon$ RI. De plus, par la technique de RT-PCR *in situ*, nous avons détecté l'expression de la chaîne  $\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI par les plaquettes et la lignée DAMI. Nous avons, grâce aux mêmes techniques démontré l'expression par les plaquettes de l'ARNm du Fc $\epsilon$ RII/CD23 confirmant ainsi les résultats biologiques antérieurs (Joseph *et al.*, 1983). Enfin, l'étude de la relation entre les deux récepteurs Fc $\epsilon$  nous a permis de révèler un rôle inhibiteur du Fc $\epsilon$ RII/CD23 sur la fonction cytotoxique du Fc $\epsilon$ RI.

Ces résultats apportent de nouveaux arguments en faveur de l'implication des plaquettes humaines dans la défense antiparasitaire via les structures réceptrices d'IgE et suggèrent une interaction entre les deux types de récepteurs , FceRI et FceRII. The high-affinity receptor for IgE stimulates cytotoxic functions of human blood platelets. Regulation by CD23.

Abdelillah Soussi Gounni<sup>\*</sup>, Monique Capron<sup>\*</sup>, Jean-Pierre Kusnierz<sup>\*</sup>, Han Vorng<sup>#</sup>, Jean-Pierre Kinet<sup>°</sup>, Marika Sarfati<sup>◊</sup>, André Capron<sup>\*</sup> & Michel Joseph<sup>#</sup>§

\* Unité INSERM 167 and <sup>#</sup> Unité INSERM 416, Institut Pasteur, B.P. 245, F-59019 Lille (France)

<sup>°</sup> Molecular Allergy and Immunology Section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Rockville, MD 20892

<sup>()</sup> Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada.

§ To whom correspondence should be addressed

#### Abstract

Besides their haemostatic and thrombotic functions, blood platelets can participate in IgE-mediated protective immunity against helminth and protozoan parasites and in the immediate and late phase reactions of allergic disorders. The low-affinity receptor for IgE (FccRII/CD23) was first incriminated in these mechanisms. Here we show that isolated human platelets can not only express FceRII/CD23 but also the high-affinity IgE receptor (FceRI). Cross-linking of FceRI with the anti- $\alpha$  chain monoclonal antibody (mAb) 15-1 induced platelet cytotoxicity against Schistosoma mansoni larvae, whereas the same mAb inhibited the binding of radiolabeled IgE to purified blood platelets. The mRNA encoding the  $\alpha$ chain of FceRI was detected by northern blot and single cell RT-PCR in situ, in the other hand  $\beta$  and  $\gamma$  chains were detected by RTPCR on platelet megakaryocytic cell. Interactions between FcERI and FcERII were and suggested since anti-CD23 mAb significantly inhibited the cytotoxicity induced by anti-FceRI  $\alpha$  chain antibody. We conclude that human platelets possess a functional high affinity receptor for IgE, which stimulates their effector functions, whereas CD23 has regulating properties on FcERIdependent effector functions.

Investigations carried out on immunological functions of platelets have shown that these blood elements were reactive to IgE and could express either antiparasitic properties (1-4) or release proinflammatory mediators in allergic disorders (5-7). These IgE-mediated functions were first associated to the presence of a low affinity receptor for IgE (FceRII/CD23), as demonstrated by flow cytometry with anti-CD23 monoclonal antibodies (8-9). The binding of IgE antibody to platelets and their cross-linking by anti-IgE antibody or by specific antigens (either parasite antigens or allergens) resulted in a stimulation process following which platelets generated cytotoxic mediators for parasite larvae. Polyclonal and monoclonal anti-CD23 antibodies were able to inhibit very significantly the IgE-dependent stimulation and the binding of radiolabeled IgE to platelets, at a level very similar to that achieved by a fiftyfold excess of unlabeled IgE. We therefore concluded that IgE could bind to platelets and induce cytotoxic functions through the low affinity receptor for IgE (FceRII/CD23).

The recent demonstration that, in addition to FcERII/CD23, Langerhans cells, eosinophils and monocytes could also express the high affinity IgE receptor (FcERI) (10-12) led us to investigate its expression on platelets. The availability of a mAb, specific for the  $\alpha$ -chain of FcERI (15-1) (13), allowed us to show that platelets could express a functional FcERI. As shown on Fig 1a, isolated human blood platelets expressed dose-dependent cytotoxic properties towards schistosome larvae when incubated with mAb 15-1, reaching a plateau with 10 µg antibody/ml. This indicated that the cross-linking of FcERI, at variance with the effect of anti-CD23 antibody (Fig 1b), could induce effector properties of platelets. Suboptimal concentrations of anti- $\alpha$ -chain antibody (below 10 µg/ml) were able to inhibit, up to 70% with 1 and 5 µg/ml, the IgE-mediated triggering of platelets induced by anti-schistosome IgE present in the serum of patients with schistosomiasis (Fig 2).

The surface expression of Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain and of Fc $\epsilon$ RII on human platelets was next investigated by flow cytometry. Anti-Fc $\epsilon$ RI or anti-Fc $\epsilon$ RII mAb were able to bind to purified platelets from normal blood donors with a respective mean of 22% positive platelets for anti-Fc $\epsilon$ RII mAb and 34% for anti-Fc $\epsilon$ RII/CD23 mAb (Fig 3). A large heterogeneity of the expression of both IgE receptors according to individual subjects was shown by this technique, similarly to the heterogenous expression of myeloma IgE binding. The binding of IgE significantly correlated with anti-Fc $\epsilon$ RI binding (r=0.74; p<0.01 for 12 donors), at a lesser extent with anti-Fc $\epsilon$ RII (r=0.59), whereas the best correlation was observed when the binding of the 2 mAb was considered (r=0.91). Binding of mAb to GPIIb/IIIa, a specific marker of platelets, confirmed the purity of the platelet preparation.

Résultats

We have previously shown that human platelets express  $Fc\epsilon RII/CD23$  (8). To confirm the presence of  $Fc\epsilon RII/CD23$  mRNA in human platelets, RT-PCR analysis from highly purified platelets and megacaryocyte cell line (DAMI) was performed. As shown in Fig4A, aspecific band corresponding to the predicted size and confirmed by southern blot, was obtained from 4 differents platelets mRNA preparations (lane 5-8), DAMI cell line (lane4), eosinophil (lane3) and EoL3 used as positive control (lane2).

83

Northern hybridization was then performed to detect the presence of mRNA coding for the Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain in the same mRNA platelets preparations. As shown in Fig 4B, a similarly sized signal at 1.2 kb was detected in the DAMI cells (lane 3), as well as in platelets (lane 4-7) eosinophils (lane2) and in the basophilic cell line KU812, used as a positive control (lane 1). The question remained whether platelets could also express  $\beta$ ,  $\gamma$  chains. Due to the limited amount of RNA from purified platelets, a more sensitive northern analysis with poly-A<sup>+</sup> RNA could not be carried out. We therefore used the RT-PCR to detect  $\beta$  and  $\gamma$  messengers. The amplified material obtained from platelets, DAMI, KU812 or eosinophils revealed the predicted size band for  $\beta$  and  $\gamma$  chains of Fc $\epsilon$ RI in all tested cells (Figure 4C). The specificity of the fragments was confirmed by retriction enzymes (data not shown)and Southern blotting with internal oligonucleotides specific for each subunits (4D).

To ascertain that platelets and their precursors can express the Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain, single cell *in* situ RT-PCR was performed on cytocentrifuged preparations of platelets or DAMI megakaryocytic cells. As shown in Fig 5, which illustrates a positive staining of amplified products with digoxigenin-labelled nucleotides and anti-digoxigenin fluorescein-labelled Ab or alkaline phosphatase conjugates, the majority of platelets (Fig 5a) and of DAMI cells (Fig 5c) expressed Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain mRNA. The absence of signal when reverse transcriptase was omitted (Fig 5b) showed that synthesized cDNA rather than genomic DNA was detected by this *in situ* RT-PCR. No signal was detected in the absence of Taq polymerase (Fig 5d)

Having established the expression and synthesis of FceRI by human platelets, we next examined whether the  $\alpha$  chain of FceRI could participate in IgE binding. As shown in Fig 6, an almost complete inhibition of radiolabelled IgE binding was observed when platelets were incubated in the presence of optimal concentrations of the mAb to FceRI  $\alpha$  chain (15-1) or to FceRII/CD23, by comparison to isotypic control. No synergy could be evidenced in the inhibition process, possibly - but not exclusively - due to an excess of each antibody. It remains however that the binding of one antibody to its specific IgE receptor could influence the binding of IgE on the other receptor. In the context of such an interaction, the respective role of FceRI and FceRII in platelets was investigated with anti-FceRI and anti-FceRII antibodies used simultaneously in the cytotoxicity assay. When an optimal amount of anti-FceRII mAb (i.e. 10 µg/ml) was used to induce cytotoxicity, increasing concentrations of anti-FceRII/CD23 mAb

# RESULTAT II : EXPRESSION PAR LES PLAQUETTES DU RECEPTEUR DE FORTE AFFINITÉ POUR L'IGE.-IMPLICATION DANS LA FONCTION ANTPARASITAIRE ET MODULATION PAR LE RECEPTEUR DE FAIBLE AFFINITE POUR L'IGE FCERII/CD23

C'est à la suite des travaux démontrant l'existence d'une cytotoxicité plaquettaire IgE dépendante dans diverses parasitoses, que l'existence d'un récepteur spécifique d'IgE sur ces cellules a été suggérée (Joseph *et al.*, 1983). L'analyse par Scatchard de ce récepteur a révélé une courbe bimodale avec deux constantes d'affinité. La première correspond à un récepteur de faible affinité pour l'IgE dont les caractéristiques biochimiques sont similaires à celui du FceRII/CD23 des lymphocytes (Joseph *et al.*, 1986). La deuxième pouvait correspondre à un site de forte affinité pour l'IgE qui restait à identifier.

L'expression du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI) a été longtemps supposée restreinte aux mastocytes et aux basophiles. Récemment son expression vient d'être mise en évidence chez les cellules de Langerhans (Wang *et al.*, 1992), les éosinophiles (Soussi Gounni *et al.*, 1994), et les monocytes (Maurer *et al.*, 1994). Le FcɛRI est un complexe multimérique formé de trois chaînes protéiques  $\alpha\beta\gamma 2$  (Kinet *et al.*, 1989). La mobilisation de ce récepteur au niveau de la membrane des basophiles induit le relargage de médiateurs intervenant dans les étapes précoces de l'hypersensibilité de type 1, incluant les prostaglandines, les leucotriènes (Parker *et al.*, 1993) ainsi que les cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  et les chemokines) qui ont un rôle dans la régulation de la réaction immunitaire (Kulumburg *et al.*, 1992; Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1989).

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si les plaquettes exprimaient le récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI).

Une approche fonctionnelle nous a permis tout d'abord de tester l'effet de la mobilisation du récepteur FceRI sur les plaquettes humaines. La mobilisation de ce récepteur par l'anticorps antichaîne  $\alpha$  du FceRI (mAb15-1), induit une cytotoxicité plaquettaire vis-à -vis des schistosomules. L'analyse par cytofluorimétrie en flux, ainsi que l'inhibition de la fixation de l'IgE radiomarquée sur les plaquettes par l'anticorps 15-1, nous a permis de mettre en évidence l'expression de la chaîne  $\alpha$  du FceRI, chez les plaquettes humaines.

Ces résultats suggèrent que les plaquettes expriment en surface le récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcɛRI) et que la mobilisation de celui-ci induit une stimulation de la fonction cytotoxique des plaquettes.

La caractérisation moléculaire de ce récepteur a été entreprise par Northern Blot et RT-PCR. En effet, grâce à ces deux techniques, nous avons mis en évidence l'expression par les plaquettes et

inhibited in a dose-dependent manner the cytotoxic process (Fig 7a). When IgE antibodies were used for the stimulation of platelets, anti-Fc $\epsilon$ RII/CD23 mAb also inhibited cytotoxicity, according to its concentration (Fig 7b), suggesting a negative regulatory role for Fc $\epsilon$ RII/CD23 on Fc $\epsilon$ RI. This inhibitory activity of anti-Fc $\epsilon$ RII on anti-Fc $\epsilon$ RI- and IgE-mediated stimulation of platelets was mimicked by the addition of increasing concentrations of soluble CD23 (sCD23) (Fig7c and 7d). This inhibitory effect of sCD23 was apparently limited to IgE-dependent activation receptor, since stimulation of platelet cytotoxicity with an IgE-independent agonist, such as thrombin (14), was insensitive to sCD23.

## Discussion

Whereas platelets have been clearly involved in IgE-dependent release of cytotoxic mediators *in vitro* as well as in immune protection to schistosome infection *in vivo* (1-4), the precise underlying molecular mechanisms have not been elucidated yet. A role for Fc $\epsilon$ RII/CD23 was first proposed, based mainly on the ability of anti-Fc $\epsilon$ RII/CD23 antibodies to inhibit IgE binding to platelets and the expression by these cells of IgE-dependent cytotoxic properties. However some discrepancies between CD23 expression and IgE-binding - evidenced, among others, by a bimodal curve in Scatchard analysis of IgE binding (8) - together with the recent demonstration that Fc $\epsilon$ RI expressed by eosinophils also participated in anti-parasite cytotoxicity (11), led us to investigate Fc $\epsilon$ RI expression by platelets.

The presence of  $Fc \in RI \alpha$  chain on human platelets was demonstrated here by flow cytometric analysis with anti-FceRI  $\alpha$  chain mAb (15-1). Even if a high heterogeneity appeared among donors for both structures linked to IgE binding, a good correlation could be observed between the level of IgE binding and that of anti-FceRI  $\alpha$  chain antibody : donors with a high IgE binding were those with a high anti-FceRI  $\alpha$  chain labelling, whereas low IgE binding corresponded to a low labelling with 15-1 mAb similarly to the situation described for eosinophils (Soussi Gounni et al, 1994). Northern blot analysis and PCR amplification of platelet RNA - either from overall content or in situ - have allowed the demonstration that these anucleated blood elements have the capacity to synthesize all three chains of FceRI, similarly to eosinophils, but in contrast with monocytes which do not express the  $\beta$  chain of FceRI (Maurer et al, 1994). A confirmation of this cell lineage ability to express the high affinity receptor for IgE was brought by the identification of its highly expressed presence on the human megacaryocytic cell line DAMI. Its expression on normal bone marrow megacaryocytes is presently under investigation. Therefore, platelet FceRI apparently represents one membrane structure carrying the IgE-dependent functions inducing platelet cytotoxicity, since its cross-linking by anti-receptor mAb reproduces the stimulation process mediated by anti-parasite specific IgE antibodies. Similarly the inhibition, by anti-FceRI mAb, of parasite specific or allergen specific induction of their killing ability, as well as the inhibition of radiolabelled-IgE binding, give this receptor a crucial role in the generation of platelet effector functions.

The participation of FceRII/CD23 in the IgE-mediated stimulation of blood platelets, which was initially considered as primary if not exclusive, appears now under a new light. We confirm here the previously reported effect of anti-FceRII/CD23 antibodies on the IgE-binding and triggering of platelets, i.e. the nearly complete inhibition of the interaction of radiolabelled IgE on these cells and of the IgE-dependent stimulation of their cytotoxic properties (8). But the yet

unexplained unability of these anti-FceRII/CD23 antibodies to induce by themselves the generation of cytotoxic mediators, the normal consequence of a cross-linking of adjacent receptors, finds here the beginning of an explanation. In this perspective FceRII/CD23 seems to express regulating properties. In the presence of IgE, which has been shown to stabilize FccRII/CD23, the regulation favours a full expression of FccRI. The addition of anti-FceRII/CD23 antibody could induce a destabilization of CD23, by accelerating its autocatalytic shedding and its solubilization, with an inhibitory role for sCD23. Alternatively, CD23-linked transactivation signals - a prerequisite for a full expression of FceRI - would be abolished as soon as CD23 has been catalyzed or if CD23 is cross-linked by specific antibody. Recently, it has been described in mast cells that the capacity of FceRI to trigger mediator release is inhibited by its cross-linking with FcyRII, the low affinity IgG receptor (15). Such a control of CD23 on the FceRI expression in platelets opens interesting perspectives not only on this cell type but on other cell lineage where both receptors have been reported, including mast cells. The hypothesis of down-regulation of IgE binding and IgE-dependent histamine release by mast cells in the presence of high concentrations of soluble CD23 has already been suggested, but no direct interactions between the 2 IgE binding structures were investigated in this study (16). A better understanding of these finding might have interesting consequences for the treatment of allergic diseases. The problem is now to define if these receptors are expressed by the same or by different cells and if they are equally expressed or not along the cell differentiation and maturation stage.

## **LEGENDS TO FIGURES**

Figure 1 Effects of anti-FceR antibodies on human platelet stimulation. Purified platelets were incubated with serum from normal donors (Nor. ser.; background stimulation), IgE-rich serum from Schistosoma mansoni-infected patients (Imm. ser.; positive stimulation), or with increasing concentrations of either anti-FceRI (Fig 1a) or anti-FceRII (Fig 1b) monoclonal antibody in normal serum in the presence of schistosome larvae. The cytotoxicity was evaluated after overnight incubation at 37°C and expressed as the percentage of dead schistosomula. Platelets were purified from the venous blood (6 vol) of adult healthy volunteers collected on ACD-C (1 vol) by the centrifugation of 5 ml aliquots at 120 g for 15 min at room temperature. The platelet-rich plasma (PRP) was collected in a single volume and centrifuged at 1,500 g for 15 min after addition of 1 vol ACD-C for 9 vol PRP. Avoiding the recovery of the lowest part of the pellet if contaminated with red cells, the platelets were resuspended in PBS supplemented with citric acid (36 mM), glucose (5 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), bovine serum albumin (0.35 %) and prostaglandin E1 (100 mM) and washed three times in this medium. The last pellet was resuspended in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) to a cell concentration of  $3.10^9$  platelets/ml. For cytotoxicity assay, to 50 µl platelet suspension were added 50 to 80 schistosomula in 50 µl EMEM, 20 µl either normal human serum, or serum from patients with bilharziasis, and the indicated concentration of anti-FceRI (mouse mAb 15-1 from Jean-Pierre Kinet, Rockville) or anti-FceRII (mouse mAb 135 from Guy Delespesse, Montréal), the final volume being adjusted to 200 µl of EMEM.

<u>Figure 2</u>. Inhibitory effect of anti-FceRI mAb on IgE-mediated cytotoxicity of human blood platelets. Purified platelets, prepared as described in Fig. 1, were incubated with serum from normal donors or IgE-rich serum from *Schistosoma mansoni*-infected patients (Imm. ser.; positive stimulation). Increasing concentrations of anti-FceRI monoclonal antibody (mAb 15-1) were added to IgE-stimulated platelets, and the cytotoxicity evaluated as in Fig. 1.

Figure 3. FACS analysis of human blood platelets for IgE and for Fc $\epsilon$ R expression. Human platelets were prepared as described in Fig 1, with the exception of EDTA (5% in water) as anticoagulant (1 vol for 9 vol blood) and washings with PBS containing 0.01M EDTA. 2.10<sup>7</sup> platelets in 100 µl PBS were incubated at 37°C, for 30 min each, first with either 10 µg human myeloma IgE (kindly donated by Hans Spiegelberg, La Jolla, CA) - when a saturation of IgE receptors was investigated - or with medium - when the labelling of *in vivo*-bound IgE was looked for -.followed, after washing, with mouse IgG anti-human IgE, and finally with FITC-conjugated.goat IgG anti-mouse IgG (1/40). For IgE-receptors, platelets were incubated with anti-Fc $\epsilon$ R monoclonal antibodies, (20 µg/ml final concentration), and, after

washing, with FITC-conjugated goat IgG anti-mouse IgG (1/40). The background labelling obtained with 20  $\mu$ g anti-*Toxoplasma* mouse IgG1 mAb was subtracted from the fluorescence obtained with antibodies against human IgE or against IgE receptors. The platelet specific integrin IIb/IIIa was occasionally labelled with mAb AP2 (from D. Pidard, Paris) as a probe of platelet integrity, giving always more than 80 % positive platelets.

## Figure 4. Characterisation of FceRI and FceRII in human platelets.

A) RT-PCR analysis of FcεRII/CD23. Lane1: without cDNA; Lane2 : positive control Eosinophilic cell line EoL3 ; lane 3: purified eosinophils from hypereosinophilic patient ; Lane
4: human megacaryocyte cell line DAMI; Lanes 5 to 8 : purified platelets from 4 different donors. CD23 specific primers (C1 and C2) were used in the PCR step (35 cycles).

The Southern blot was performed with internal specific primer C3. Each lane correspond was as described in RT-PCR.

B) Northern Blot analysis of  $\alpha$  chain transcripts of high affinity receptor FceRI. Each line represents 10 µg of total RNA. Probe is the BamHI-XhoI fragment corresponding to human a chain cDNA of FceRI.

lane 1: KU812 human basophilic cell line; lane 2: purified eosinophils from hypereosinophilic patient; lane 3: human megacaryocyte cell line DAMI; lanes 4-7: purified platelets from 4 different donors.

C) RT-PCR analysis of FceRI  $\beta$ ,  $\gamma$  subunits of FceRI and  $\beta$  actin used as control. Lane1: negatif control: no cDNA was added before amplification step; lane 2: purified eosinophil from hypereosinophilic patient ; lane 3: KU812 human basophilic cell line; lane 3: human megakaryocytic cell line DAMI; lanes 5-8: purified platelets from 4 different donors. 25 cycles was performed for  $\beta$  actin and FceRI  $\gamma$  chain and 35 in the case of FceRI  $\beta$  chain.

D) Southern blot analysis corresponding to the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits, each lane was as described above (C).

**Methods.** Cell culture : As described previously , megacaryocyte cell line DAMI, EoL3 were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 25  $\mu$ g/ ml gentamycin. Northern Blot: total RNA from highly purified platelets was isolated with the guanidine isothiocyanide cesium chloride methods (11). Ten micrograms were fractionated in 1% agarose /formaldehyde gel and transferred to nylon membrane (Hybon N, Amersham, Les Ulis, France) in 10% SSC. After ultraviolet crosslinking, the filters were prehybridized for 2 hours at 42 °C in solution (40% formamide, 10% dextran sulfate, 4% SSC, 20 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, Denhardt's solution 1x, 20 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 0.1% SDS). Hybridation with <sup>32</sup>P labelled probe was performed in the same conditions overnight. After hybridization, the filters were washed 10 min at room temperature in 2x SCC, 0.05% SDS and twice in the 2x SCC, 0.05% SDS at 42 °C and 1xSCC, 0.05 SDS at 55 °C for 30 min each time. RT-PCR. Reverse Transcription (RT) was performed by using 2  $\mu$ g of total RNA in cDNA synthesis

reaction utilizing MMLV1 reverse transcriptase as recommended by the supplier (All Gibco; Bethesda Research Laboratories; Gathersburg; MD). PCR was performed by adding 1  $\mu$ l of the RT product into 50  $\mu$ l of total volume reaction containing 1x buffer; (Cetus corp; Norwalk; CT); 200 mmol of each dNTPs (Boehringer Mannheim biochemicals); 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 20 pmol of each oligonucleotide primers and 0.2 unit of ampli Taq polymerase (Cetus corp; Norwalk; CT). PCR conditions were 1 min at 94 °C, 2 min at 60 °C, 3 min at 72 °C and 25 cycles for  $\gamma$  subunit and  $\beta$  actin or 35 cycles for  $\beta$  subunit and CD23/FceRII. The PCR products were electrophoresed on Nusieve/Seakem (3:1) agarose gel (FMC Bio Product, Rockland) and visualized by ethidium staining. Southern blot analysis. Amplified products were blotted on Hybond N membranes according to standard conditions. Oligonucleotide probes were labeled with T4 polynucleotide kinase and  $\gamma$  <sup>32</sup>P ATP. Hybridization was carried out in the same conditions as described above . Oligonucleotide primers and probes were synthesized on a DNA synthesizer (Cyclone plus, Miligen/ Biosearch, Burlington, MA) on the basis of the published sequences: The FceRII primers were : 5' primer (C1): 5'CTGTGGGCACTGGGACACCACA 3'.

3' primer (C2): 5'TGTGTGCAACACGTGCCCTGAA 3'.

Internal CD23 primer (C3): 5'TGGACTGGGATTTCTGCGCCAT 3'

The FceRI β chain primers were : 5' primer 5'GGACACAGAAAAGTAATAGGAGAG3'; 3'primer: 5'GATCAGGATGGTAATTCCCGTT3'; Internal primer was: 5'TTTTCATCATTTAAAGCAGGTTATCCATTC3';

The FceRIy chain were:5'primer:5'CCAGCAGTGGTCTTGCTCTTAC3';

3' primer: 5'GCATGCAGGCATATGTGATGCC 3'.

Figure 5. Detection of  $Fc \in RI \propto chain$  messenger in human platelets and megacaryocytic cell line (DAMI) by *in situ* RT-PCR. a, Human purified platelets from donor show fluorescent specific signal when antidigoxigenin antibody conjugated fluorescein was used in the revelation step; b, negatif control : during amplification step the Taq polymerase was omitted.

c, DAMI cell line positively stained when antidigogenin antibody conjugated phosphatase alkaline incubation was used to detect the amplified  $\alpha$  chain cDNA product, revelation step was done by using new fushin kit (red color). DAMI cells were counterstained with hematoxylin. d, negatif control : all step are as described for the positif slide except omission of the reverse transcriptase during the cDNA synthesis.

Methods.Single cell In situ RT-PCR. Cytospin preparations were permeabilized with Methanol/Acetone (V/V) for 20' at -20 °C. Cells were fixed again in 4% paraformaldehyde then washed extensively in DEPC-TBS and then in water. Air-dried cells were acetylated in 0.1 M triethanolamine buffer 5 min at 4°C and 0.1M triethanolamine containing 0.25% acetic anhydride

for 10 min at room temperature. Cells were hybridized with 2.5 ng/ $\mu$ l of antisens oligonucleotides (  $\alpha$ 1) to human FccRI  $\alpha$ chain gene in 50% formamide, 10% dextran sulfate, 300 mM NaCL, 20 mM Tris, pH 7.6 mM EDTA, 1x Denhardt, and 10 mM dithiothritol (DTT) buffer for 16 hours in an humidified chamber at 37°C. Cells were then washed in a 50% formamide, 2x standard saline citrate (SSC), 1mM EDTA, and 10 mM DTT buffer and air dried. First Strand cDNA synthesis: Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (3U/ $\mu$ l) in a 75 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8, 12 mM MgCl2, 2 $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 10 mM DTT buffer containing 1mM each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP and 1U/ $\mu$ l RNAse inhibitor was applied to cells for 3 hours in a humidified chamber. Slides were washed extensively in 2xSSc , water and equilibrated with 1X PCR buffer.

cDNA Amplification. Taq polymerase (5u/µl; Promega) was added to a buffer containing 1mM of dATP, dCTP, dGTP, dTTP and 11 dig dUTP. 75 mM KCl 10 mM Tris, pH 8, 10 mM MgCl2 and 10 pmol/µl each of the 5' ( $\alpha$ 2) and 3'( $\alpha$ 3) oligonuceotides complementary to human Fc  $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain gene. The reaction mixture was added to the slides and the coverslips were sealed at the edge with nail-polish to prevent desiccation. PCR conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 30 cycles. Coverslips were removed, the supernatant aspirated and submitted to tube PCR with primers  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3. The Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  chain primers were:

αl: 5' TACAGTAATGTTGAGGGGGCTCAG3'.

α2: 5'CCTTGTACACATCCCAGTTCCTCCAACCAT3'.

α 3: 5'CTGTTCTTCGCTCCAGATGGCGT 3'.

**Detection of Amplification Products.** After washing step in TBS, the slides were recovered with 5% BSA inTBS for 20min at RT, rinsed in TBS. Then the slides were incubated with 1.100 sheep FAb antibody fragments specific for digoxigenin conjugated to alkaline phosphatase or to fluorescein for 60 min at RT. Revelation step was done as described for immunostaining purpose when antidigoxigenin conjugated to alkaline phosphatase was used; or by direct observation in microscope UV light.

Figure 6. Binding of radiolabelled IgE in the presence or absence of anti-IgE receptors. The final pellet of platelets, isolated as indicated in Fig. 1, was resuspended in PBS. Eight x  $10^7$  washed platelets in 200 µl PBS were incubated, without stirring, in plastic tubes for 90 min at room temperature with 1µg <sup>125</sup>I-labelled IgE (spec. act. 150 mCi/mM) either alone or after a 30 min-preincubation with a saturating concentration of 50 µg unlabelled IgE, or with 10 µg/ml anti-*Toxoplasma* mouse IgG, or with 10 µg/ml anti-IgE receptor mouse antibodies. At the end of the labelling procedure, the platelets were separated from unbound IgE by centrifugation at 8,500 g for 2 min through 1 ml 25% sucrose in a Microfuge (Beckman, palo Alto, CA), and the radioactivity of the pellet was measured with a CG 4000 gamma counter. Labelling with

saturating concentrations of IgE was taken as background and subtracted from all other results.

Figure 7. Inhibition of IgE-mediated and FceRI-dependent stimulation of platelets by anti-FceRII antibody. Purified platelets, prepared as described in Fig. 1, were incubated with serum from normal donors (N. ser.; background activity) or with IgE-rich serum from *Schistosoma mansoni*-infected patients (Imm. ser.; positive stimulation), or with anti-FceRI antibody at a concentration (10  $\mu$ g/ml) mediating an optimal stimulation of platelets (*Fig 7a*). Increasing concentrations of anti-FceRII monoclonal antibody (mAb 135) added a few minutes before mAb 15-1 induced a dose-dependent inhibition of the cytotoxicity. In *Fig 7b*, platelets were submitted to an IgE-mediated stimulation: anti-FceRII monoclonal antibody (mAb 135), added a few minutes before IgE, also induced a dose-dependent inhibition of the cytotoxic process.

### REFERENCES

1. Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. & Viens P. A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. Nature, 1983, 303: 810-812

2. Viens, P., Dubois, R. and Kongshavn, P. A. L. Platelet activity in immune lysis of *Trypanosoma musculi*. Int J Parasitol, 1983, 13: 527-530

3. Haque, A., Cuna, W., Bonnel, B., Capron, A. and Joseph, M. Platelet-mediated killing of larvae from different filarial species in the presence of *Dipetalonema viteae* stimulated IgE antibodies. Parasite Immunol, 1985, 7: 517-526

4. Ridel, P.R., Auriault, C., Darcy, F., Pierce, R.J., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J.L., Kusnierz, J.P. and Capron, A.. Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. J Immunol, 1988, 141: 978-983

5. Capron, A., Joseph, M., Ameisen, J.C., Capron, M., Pancré, V. and Auriault, C. Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions. Int Archs Allergy appl Immunol, 1987, 82: 307-312

6. Coyle, A. J., Brown, L., Page, C.P. and Metzger, W.J. The role of platelets in late phase asthma, bronchial hyperresponsiveness and eosinophil recruitment in allergic rabbits. Am Rev Respir Dis, 1988, 137-135

7. Joseph, M. The involvement of platelets in the allergic response. pp. 120-131, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991.

8. Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J.C., Capron, M., Vorng, H., Pancré, V., Kusnierz, J.P. and Auriault, C. The receptor for IgE on blood platelets. Eur J Immunol, 1986, 16: 306-312

9. Capron, M. and Joseph, M. The low affinity receptor for IgE on eosinophils and platelets. in "Monographs in Allergy", 29, pp. 63-75, 1991.

10. Bieber, T., H. de la Salle, A. Wollenberg, J. Hakimi, R. Chizzonite, J. Ring, D. Hanau and C. de la Salle. 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FceRI). *J exp Med*, 175:1285.

11. Soussi Gounni, A., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J.P.

Kinet and M. Capron. 1994. High affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature*, 367:183.

12. Maurer, D., E. Fiebiger, B. Reininger, B. Wolff-Winiski, M.H. Jouvin, O. Kilgus, J.P. Kinet and G. Stingl. 1994. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FceRI) on monocytes of atopic individuals. *J exp Med*, 179:745.

13. Wang, B., A. Rieger, O. Kilgus, K. Ochiai, D. Maurer, D. Födinger, J.P. Kinet and G. Stingl. 1992. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FceRI. J exp Med, 175:1353.

14. Tran, A., D. Vanhée, A. Capron, H. Vorng, P. Braquet and M. Joseph. 1992. Separate induction of human blood platelet aggregation or cytotoxicity by different concentrations of PAF-acether and thrombin. *Agents Actions*, 36:39.

15. Daëron, M., O. Malbec, S. Latour, M. Arock and W.H. Fridman. 1995. Regulation of highaffinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptor. *J Clin Invest* 95:577.

16. H. Kikutani, A. Yokata, N. Uchibayashi, K. Yukawa, T. Tanaka, K. Sugiyama, E.L. Barsumian, M. Suemura and T. Kischimoto. 1989. Structure and function of FceReceptorII (FceRII/CD23) : a point of contact between the effector phase of allergy and B cell differentiation. *In Ciba Foundation Symposium*, 147, 23-35.

# Figure 1





94

95

# Figure 2



% cytotoxicity

# Figure3



Treatment



Figure 4: Expression of IgE receptors FcERI and FcERII in human platelets





9

Figure

66

Résultats

# Figure 7 (a;b)





100

# Figure 7 (c;d)





101

## Discussion et conclusion

Au cours de ces dernières années, la plaquette sanguine, perçue comme une cellule à rôle essentiel dans les phénomènes d'hémostase et de thrombose, s'est vue également incriminée dans d'autres domaines comme les manifestations allergiques et la défense vis-à-vis des parasites.

Ces fonctions effectrices des plaquettes sont en partie dues à la présence des structures capables de fixer l'IgE à leur surface. Jusqu'à présent, les travaux développés dans notre laboratoire avaient mis de mettre en évidence la présence du récepteur de faible affinité FceRII/CD23 à la surface de plaquettes (Joseph *et al.*, 1986). Cependant, l'existence d'autres structures capables de fixer l'IgE était suspectée. Ainsi, nous avons pu démontrer, au cours de ce travail, l'expression par les plaquettes humaines du récepteur de forte affinité pour l'IgE (FceRI) et son implication dans la défense antiparasitaire. La fonction de cette structure apparait être inhibée par la mobilisation du récepteur de faible affinité CD23 ou par addition du CD23s.

Il reste à définir les mécanismes d'interaction entre ces deux récepteurs. Plusieurs hypothèses de travail peuvent être avancées. Tout d'abord, l'implication des mêmes protéines kinases et substrats cellulaires dans la cascade biochimique qui suit l'activation des deux récepteurs. Pour cela, l'identification et la comparaison de signaux de transduction au cours de l'activation de chaque récepteur reste d'une nécessité absolue afin de vérifier cette hypothèse. Cette situation a été déjà rapportée dans la littérature. En effet, des antigènes membranaires plaquettaires différents mobilisent les mêmes substrats cellulaires (Zachary et Rozengurt, 1992; Clark *et al.*, 1994). Il est également à rappeler dans ce contexte que l'addition de CD23s, à des concentrations très importantes, est capable d'inhiber la libération IgE- dépendante d'histamine par les mastocytes, sans que d'explication n'ait été fournie (Kikutani *et al.*, 1989)

Ensuite, il faut déterminer s'il s'agit d'un effet d'encombrement stérique des deux molécules au niveau de la membrane plaquettaire. Ainsi, le cross linking du récepteur de faible affinité CD23 inhiberait la mobilisation du Fc $\epsilon$ RI. Cet effet inhibiteur sur la fonction du Fc $\epsilon$ RI a été obtenu par le cross-linking du Fc $\gamma$ RII au niveau des mastocytes (Daëron *et al.*, 1995). Ces deux hypothèses pourraient expliquer l'inhibition de la cytotoxicité IgE dépendante du Fc $\epsilon$ RI par les anticorps anti CD23.

L'étude moléculaire de cette interaction permettra de déterminer si le CD23 ou ses fragments solubles (25 KDa) ont un effet direct en inhibant l'expression du messager ou des protéines composant le Fc $\epsilon$ RI. Ceci peut être réalisé sur la lignée mégacaryocytaire DAMI. En effet, l'expression du messager du CD23 ainsi que les trois sous-unités du Fc $\epsilon$ RI a été mis en évidence dans cette lignée. L'étude cinétique de l'évolution du messager et de la protéine de la chaîne  $\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI en présence du CD23 soluble sera réalisée afin de vérifier cette hypothèse.

Une autre voie intéressante est de savoir si le CD23 exerce son effet via les cytokines. Ainsi la

mobilisation du CD23 induirait le relargage de cytokines qui agirai sur sa propre expression et/ ou sur l'expression du FcERI.

L'effet du CD23 soluble sur les plaquettes suggère également l'existence d'un site de fixation pour cette molécule. De nouveaux récepteurs pour le CD23s ont été recemment identifiés (Aubry *et al.*, 1992). Il conviendrait de rechercher leur existence sur les plaquettes.

La grande hétérogénéité de l'expression du FceRI par les plaquettes purifiées à partir du sang périphériques de donneur normaux est à souligner. Elle suggère qu'au contraire des mastocytes et des basophiles, cette expression n'est pas constitutive et est probablement soumise à des facteurs de régulation qui restent à identifier. De manière intéressante une situation semblable est rencontrée dans le cas des éosinophiles (Résultat I ; Soussi Gounni *et al.*, 1994).

# Résulat III: Caractérisation moléculaire du récepteur FceRII/CD23 exprimé par les éosinophiles humains.

Soussi Gounni A., Lamkhioued B., Morita M., Aldebert D., Capron A., and Capron M.

Soumis pour publication

# RESULTAT III: CARACTERISATION MOLECULAIRE DU RECEPTEUR FCERII/CD23 EXPRIME PAR LES EOSINOPHILES HUMAINS.

L'identification d'un récepteur spécifique pour l'IgE sur les éosinophiles a fait suite à l'étude des mécanismes effecteurs de l'immunité antiparasitaire (Capron *et al.*, 1981 ; 1984), et particulièrement à la démonstration de fonctions cytotoxiques de l'éosinophile humain et de rat, vis-à- vis de *S. mansoni*. En effet, ces recherches ont montré que les éosinophiles peuvent fixer l'IgE in vitro et que, de manière générale la mobilisation des IgE de surface par des anticorps anti-IgE ou par leur antigène spécifique induit cette activation qui conduit à la mort des larves parasitaires.

Un des buts des recherches menées dans notre laboratoire est la caractérisation des structures capables de fixer l'IgE, structures qui confèrent à l'éosinophile sa fonctionnalité dans la réponse immunitaire vis-à-vis des parasites, rôle bénéfique, ou vis-à-vis des cellules de l'hôte, rôle néfaste. Jusqu'à présent, les travaux développés ont permis la démonstration sur la membrane d'éosinophile de trois types de molécules capables de fixer l'IgE, d'abord le récepteur de faible affinité (Fc $\epsilon$ RII) (Capron *et al.*, 1986b), puis la molécule MAC2/ $\epsilon$ BP maintenant dénommée galectine3 (Truong *et al.*, 1993) et plus récemment le récepteur de forte affinité (Fc $\epsilon$ RII) (Soussi Gounni *et al.*, 1994).

Différentes approches expérimentales ont suggéré que le récepteur Fc $\epsilon$ RII de l'éosinophile présentait certaines caractéristiques communes avec le récepteur de faible affinité (CD23) des lymphocytes B (Jouault *et al.*, 1987; Grangette *et al.*, 1989). Toutefois, aucune identité moléculaire entre les deux molécules n'a été décrite jusqu'ici.

Comme il a été rapporté, le Fc $\epsilon$ RII/CD23 des lymphocytes existe sous deux formes. L'isoforme "a" est exprimée de façon constitutive à la surface des lymphocytes B, fraîchement isolés du sang périphérique, et l'isoforme "b" qui est induite par l'IL-4. Ces deux isoformes diffèrent par la partie N terminale (6 à 7 résidus). Par ailleurs, il a été démontré que la lignée EoL3 différenciée en éosinophile exprime seulement l'isoforme b du CD23 (Yokota *et al.*, 1988). De plus, l'expression par les éosinophiles de patients HES du messager du CD23 a été mise en évidence par Northern blot (Capron *et al.*, 1991).

Au cours de notre travail, nous avons confirmé par la technique d'hybridation *in situ* et d'immunomarquage, l'expression de l'ARN messager et de la protéine CD23 par les éosinophiles humains de patients HE ou atteints de pathologies dermiques, en particulier la dermatite atopique et la pemphigoïde bulleuse. Par la suite, nous avons pu mettre en évidence, par RT-PCR, l'expression par l'éosinophile des deux formes du CD23. Le clonage et le séquençage de ces deux molécules nous a permis de démontrer l'identité moléculaire entre les deux formes exprimées chez l'éosinophile et le CD23 a et b des lymphocytes. Afin de confirmer

ce résultat, nous avons mis au point une technique de RT-PCR *in situ* qui nous a permis d'identifier l'expression *in situ* par les éosinophiles humains de l'ARN messager de ces deux formes.

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve moléculaire de l'expression des 2 isoformes du FccRII/CD23 par les éosinophiles humains et leur identité totale de séquence avec les isoformes exprimées par les lymphocytes B. Molecular Characterisation of Low affinity IgE Receptor CD23/FcERII isoforms in Human Eosinophils

Soussi Gounni.A, Lamkhioued.B, Morita. M, Aldebert. D., Truong M.J., Capron.A & Capron M

From INSERM U167, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP: 245, 59019, Lille Cedex.

Soussi Gounni A. was awarded by a fellowship from the Fondation Mérieux, Lyon, France. Morita M. was supported by a postdoctoral fellowship from INSERM.

#### Summary

CD23/FceRII, the low affinity receptor for IgE, is a pluripotent molecule with diverse biological effects, including the ability to influence activation and multiplication, antigen presentation and IgE synthesis. Initial investigations suggested that expression of CD23 was restricted to B lymphocytes and macrophages but a much wider tissue distribution is now appreciated. Despite experimental evidence suggesting that human eosinophils could express low affinity IgE receptor FceRII/CD23 with biological functions, no molecular cloning data have previously been reported until now. In situ hybridization and immunohistochemistry revealed the expression of CD23 mRNA and protein by purified eosinophils. RT-PCR analysis showed that eosinophils from hypereosinophilic patients as well as the eosinophilic leukemia cell line EoL3 expressed both a and b CD23 subtypes. Moreover single cell in situ RT PCR confirmed that specific signals corresponding to the a and b subtypes are well detected in human eosinophils. Sequence analysis of the CD23/ FcERII CDNA isolated from HES patients revealed a total homology with the already reported CD23 sequence. Taken together, our results provide further evidence that the low affinity IgE receptor (FceRII) synthesized by human eosinophils is identical to the CD23 molecule expressed on B cells.

## Introduction

The low affinity receptor for the Fc portion of IgE (CD23), is a 45 Kda single chain glycoprotein (Letellier *et al.*, 1988), and belongs to a novel superfamily of type II integral membrane proteins displaying a lectin binding motif (Bevalacqua *et al.*, 1989). CD23 is mainly expressed on B lymphocytes and has been shown to be involved in several B cell functions such as growth promoting effect (Gordon *et al.*, 1987), cell adhesion (Wang *et al.*, 1987), IgE-mediated antigen presentation (Kehry *et al.*, 1989) and isotype specific process such as regulation of IgE synthesis (Sarfati *et al.*, 1988; Pene *et al.*, 1988). However, it can be found on a variety of hematopoietic cells, including eosinophils, platelets, and macrophages (Capron *et al.*, 1986).

In human eosinophils, Fc $\epsilon$ RII has been reported to be an effector molecule of IgE-mediated immune responses including immediate type allergy and cytotoxicity against parasites (Capron *et al.*, 1986).

Two species of human FceRII/CD23, FceRIIa and FceRII b have been previously described. They are the apparent result of alternative RNA splicing and translational initiation at different sites, and they differed only at a short amino acid strech in the N terminal cytoplasmic end (Yokota., 1988). The cellular distribution of the two forms is different : FceRII a is expressed in resting B cells, whereas FceRII b is found on a variety of inflammatory cells, as well as on IL-4 induced B cells (Delespesse, 1991). Moreover, peripheral blood lymphocytes from atopic donors expressed FceRIIb without stimulation with IL-4 (Fournier *et al.*, 1991).

We have previously reported that CD23 mRNA was expressed in human eosinophils with a large variability according to the patients (Capron *et al.*, 1991).Various biochemical procedure suggested some common characteristics between eosinophil FceRII and B cell CD23 (Grangette *et al.*, 1989). However no molecular data supported the hypothesis of identity between FceRII on human eosinophil and on B lymphocytes CD23. The present study report a molecular characterisation of low affinity IgE receptor expressed by human eosinophils.
## Results

**Detection of CD23/FceRII mRNA in human eosinophils by** *in situ* hybridization. The CD23 mRNA has been detected by Northern blot in human eosinophils purified from HES patients (Capron *et al.*, 1991). In order to exclude the hypothesis of contaminating cells and to precisely localize the cellular source of CD23/FceRII mRNA, we performed *in situ* hybridization on purified eosinophils from hypereosinophilic patients (Figure 1). An intense cytoplasmic signal was present in many cells with the eosinophil morphology with <sup>35</sup>S labeled antisense human CD23 riboprobe (Figure 1a), but not with the control sense probe (Figure 1b). This result provides a direct evidence for the expression of CD23/FceRII mRNA in human eosinophils.

**Immunodetection of FceRII/CD23 on human eosinophils**. To determine whether CD23 mRNA detected in eosinophils was translated into CD23 protein, immunostaining with anti CD23 (mAb 135-1) was performed on cytospin preparations of human eosinophils (Figure2). Depending upon the patients, positive staining was observed in some eosinophil subpopulation (Fig2; a, c, e, and g). However, no signal was detected when human CD23 mAb was replaced by an isotypic control mAb (anti P30 of *Toxoplasma gondii*) (Figure 2, b, d, h and f). These results confirmed the expression of FceRII by human eosinophils.

#### PCR amplification of RNA sequence spanning the CD23 exons.

To further study the CD23 transcripts in more details, we used the polymerase chain reaction (PCR) in order to amplify CD23 RNA. In figure (3-I), a schematic representation of the CD23 cDNA and the positions of the priming sites for the PCRs are depicted. We designed 6 primers (Table 1) to test the hypothesis that CD23 a and b isoforms could be expressed by human eosinophils. Thus, we amplified CD23 transcripts from RNA extracted from highly purified eosinophils from HES, PB patients and EoL3 cell line used as control. For one set of

experiments, the cDNA was amplified using primer pair C1-C2 and C2-C5 revealed the predicted size bands 366bp and 590bp, coding for the cterminal common part of CD23 and a isoform respectively (Figure3-IIa, lanes 1,2 and 4,5) as those observed in the EoL3 used as positive control (IIa, lanes2 and 5). The specificity of amplified products was confirmed by Southern blot (Figure 3, IIb). In a similar fashion, EoL3 cell line show a strong band when specific b isoform primers were used (C2-C4). However, a specific signal corresponding to the b isoform messenger was detected from human eosinophils only after Southern blot procedure (Figure3, IIc).

## Sequence analysis of FccRII/ CD23.

For the carboxy terminal part, by using C1- C7 primer pair the size expected was amplified as visualized by ethidium bromure staining (data not shown). After the cloning step, five independent clones were examined and found to be indistinguishable in terms of the insert size and the restriction enzyme digestion pattern. Sequencing one of them revealed that our assumption of the c terminal part was correct (Fig3C). Furthermore, for the amino terminal by the same procedure using C2-C5 and C2-C6 primers, the sequences obtained are exactly the same as already described for the B cell CD23 a and b isoform (Yokota *et al.*, 1988, Fig3A and B).

## Detection of a and b CD23 isoforms by single cell in situ RT-PCR.

To ascertain that human eosinophils were the cellular source of the two Fc $\epsilon$ RII isoforms, single cell *in situ* RT PCR was performed on cytocentrifuged eosinophil preparations. After the reverse transcription step, we used specific pairs primers(C2-C5), to amplify the a isoform CD23 c DNA. As shown in Fig4, a specific signal was detected in the majority of the eosinophils purified from hypereosinophilic patients (Figure 4A, a).Similar result was observed in human eosinophils purified from healthy donor (Figure 4A, b).We then determined whether the specific Fc $\epsilon$ RIIb isoform mRNA could be detected in human eosinophils derived from the same eosinophil preparation, specific primers pairs (C2-C6) were used for the amplification step. A specific signal was detected in the majority of the eosinophilc patients as well as from healthy donnors (Figure 4B, a and d).

Because false positivity is a common problem complicating many PCR procedures, control experiments were performed to ensure the specificity of CD23 detection. The absence of signal when reverse transcriptase was omitted as well as in the PCR products amplified from the supernatants of slides control showed that the RT-PCR *in situ* was truly detecting the synthesized cDNA rather than genomic DNA (Fig4A and 4B, bottom lines 3 and 4). Indeed, no signal was detected after cDNA synthesis alone indicating the necessity for messenger amplification (Figure 4A, b; 4B,d), an observation confirmed when Taq polymerase was omitted from the PCR reaction. On the other hand, to confirm the specificity of the *in situ* amplified products, supernatants aspirated from slides were subjected to another round of PCR with specific nested primers (C2-C1). As shown in Fig4A and 4B (bottom lines 1 and 2) specific fragments were detected by southern blot.

## Discussion

This report presents several lines of evidence confirming that human eosinophils can express FceRII/CD23 molecule similar to CD23 expressed by B cells. FceRII/CD23 mRNA was first detected by in situ hybridization, in purified eosinophils from patients with HES. The identification of the eosinophil associated transcript as CD23 was confirmed by RT-PCR by restriction enzyme analysis, by Southern blot hybridization and sequencing analysis. It was already suggested that the EoL3 cell line expressed exclusively the CD23 b isoform (Yokota et al., 1988). In our experiments, by using RT-PCR, we also detect the CD23 a isoform in EoL3 cell line as well as in blood eosinophils. These results are the first demonstration of the presence of CD23 a isoform in EoL3 and of the expression of the two CD23 isoform by human eosinophils purified from patients. It has been shown that IgE dependent phagocytosis occured only in FceRII/CD23 b expressing transfectants. On the other hand FceRII/CD23a expressing transfectants show IgE dependent endocytosis activities (Yokota et al., 1992). Other workers have demonstrated that murine B cells treated with an IgE monoclonal antibody to trinitrophenyl (TNP) were 100-fold more effective than were untreated B cells in presenting low concentrations of TNP coupled antigens to T cells and that such high efficiency is mediated by FceRII (Kehry et al., 1989). Recently it has been reported that human eosinophil can mediate antigen presentation function (Weller et al., 1993). On the basis of the differential functions of FcERII/CD23 a and b isoforms, the expression of CD23/FceRII a and b isoform in human eosinophils suggest that their functions in these cell can not restricted to the IgE immunity but may be extended to the B cell function such as cell adhesion (Wang et al., 1987); IgE mediated antigen presentation (Kehry et al., 1989, Pirron et al., 1990) and B cell differentiation (Gordon et al., 1987).

It is noteworthy that additional bands are detected from human eosinophils, as well as from EoL3 cell line, when additional cycles were performed during amplification step. One of them will be correspond to the transcripts designated type a' and b' CD23/FceRII isoforms respectively (Matsui *et al.*, 1993). It has been suggested that these forms may have down

regulatory effect on the expression of CD23/FceRII.

It will clearly be of interest to search for factors that influence FcERII/CD23 expression by eosinophils. Such studies will be important for identifying the specific signals regulating CD23 /FcERII expression in activated eosinophils. We have already demonstrated that IL-5 can be produced by activated eosinophils (Desreumaux*et al.*, 1992; Dubucquoi *et al.*, 1994). More recently the synthesis by eosinophils of IL-4, IL-10 and IFN $\gamma$  has been suggested (Lamkhioued *et al.*, submitted). The synthesis of these cytokines by activated eosinophils raises the possibility that autocrine or paracrine expression of IL-4 or IFN $\gamma$  might regulate the expression of CD23/FcERII molecule. On the other hand, the expression of mRNA and products for a wide variety of cytokines can be markedly increased, when the cells are stimulated via the IgE receptor as already demonstrated for the mouse mast cells (Burd *et al.*, 1989; Plaut *et al.*, 1989).

## **Experimental procedure**

## **Cells Preparations**

Human eosinophils were purified from the venous blood of patients with eosinophilia associated with idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES), or with skin diseases; or from healthy donor by centrifugation on discontinuous 18-25% (wt/vol) metrizamide gradients (Nyegaard Co, Oslo, Norway) according to a previously described technique (Capron, 1986). Cytospin slides were either stained with Giemsa for cell counts or fixed in 4% paraformaldehyde , for 20 min at room temperature and stored at -20°C before *in situ* hybridization or immunostaining. The degree of purity of eosinophil populations, estimated after staining with Giemsa, usually ranged between 98 and 100 %. For RT-PCR experiments, granulocytes were enriched in eosinophils by negative selection using the Magnetic Cell Sorting technic (Miltenyi Biotec). Cells were incubated at 4°C with anti CD16 and antiCD3 coated microbeads to deplete CD16 positive neutrophils and CD3 positive contaminating lymphocytes. Only cell preparations with purity at 100% are used for RT-PCR experiments and cloning procedure.

Cell Cultures: EoL 3 cells were cultured at 37 °c with 37% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 with 10% FCS supplemented with penicillin and streptomycin.

#### Immunostaining

The cytopreparations of purified eosinophils from HES patients, skin diseases, or healthy donor were fixed in 4% paraformaldehyde and washed three times with 0.05 M Tris-Hcl buffered isotonic saline pH. 7.6 (TBS). After saturation with 10% normal goat serum (for blocking purposes), cells were incubated with anti-CD23 mAb (135-1)(1:50) or isotypic control anti P30 direct against *Toxoplasma gondi* antigen (1:50), for 1h at room temperature. Then, cytopreparations were incubated for 30 min at room temperature with antimouse IgG antibody Fab'2 fragments at a 1:50 dilution, followed by alkaline phosphatase-anti alkaline phosphatase (APAAP) (Dako, Glostrup, Danemark). Detection was performed with the New Fuchsin Kit (Dako, Glostrup, Danemark). Counter staining was carried out with hematoxylin.

115

## Subcloning and DNA sequencing

The amplified products were separated on 1.5 % agarose gel purified using gene clean protocol (BIO. 101 Inc). After subcloning step (TA clonnig kit, Introgen, San Diego) nucleotide sequences were determined from double stranded DNA by the chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) using the ALF System (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

## Exon structure analysis

Reverse Transcription (RT) was performed by using 2 µg of total RNA in a first strand cDNA synthesis reaction utilizing MMLV1 reverse transcriptase as recommended by the supplier (All Gibco; Bethesda Research Laboratories; Gaithersburg; MD). PCR was performed by adding 1 ul of the RT product into 50 µl of total volume reaction containing 1 x buffer; (Cetus corp; Norwalk; CT); 200 µmol of each dNTPs (Boehringer Mannheim biochemicals); 2.5mM MgCI2; 20 pmol of each oligonucleotide primer and 0.2 unit of Ampli-Taq polymerase (Cetus corp; Norwalk; CT). PCR conditions were 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C for 30 cycles. The PCR products were electrophoresed on a Nusieve/Seakem (3:1) agarose gel (FMC Bio Product, Rockland, ME) and visualized by ethidium staining. Southern blot analysis: Amplified products were blotted on Hybond N membranes using standard methods. Oligonucleotide probes were labeled with T4 polynucleotide kinase and  $\gamma^{32}P$  ATP. Hybridization was carried out in the same conditions as described above. Oligonucleotides specific for sequences on either side of a splice junction were used in the PCR reaction to preclude amplification of possible contaminating genomic DNA. Oligonucleotide primers and probes were synthesized on a DNA synthesizer (Cyclone plus, Miligen / Biosearch, Burlington, MA) on the basis of the published sequences: The FceRII band a and b subtypes primers were as described (Table 1).

## Single cell in Situ RT-PCR

First Strand cDNA synthesis: Cytospin preparations were permeabilized with Methanol/ Acetone (V/V) for 20' at -20 °C. Cells were fixed again in 4% paraformaldehyde then washed extensively in DEPC-TBS and then in water. Air-dried slides were acetylated in 0.1 M triethanolamine buffer 5 min at 4°C and 0.1M triethanolamine containing 0.25% acetic anhydride for 10 min at room temperature. Cells were hybridized with 2.5 ng/ $\mu$ l of antisens

oligonucleotides to human CD23 (C7 primer) gene in buffer containing (50% formamide, 10% dextran sulfate, 300 mM NaCL, 20 mM Tris, pH 7.6 mM EDTA, 1x Denhardt, and 10 mM DTT ) for 16 hours in an humidified chamber at 37°C. Then washed in a 50% formamide, 2x standard saline citrate (SSC), 1mM EDTA, and 10 mM DTT buffer and air dried. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (3u/ $\mu$ l) in a 75 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8, 12 mM MgCl2, 2 $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 10 mM DTT buffer containing 1mM each of dATP, dGTP, dCTP and

dTTP and  $1u/\mu l$  RNAse inhibitor was applied to cells for 3 hours in a humidified chamber. Slides were washed extensively in 2xSSc, water and equilibrated with 1X PCR buffer.

cDNA Amplification.Taq polymerase (5u/µl; Promega) was added to a buffer containing 1mM of dATP, dCTP, dGTP, dig-11dUTP 0.1mM and dTTP 0.9mM, 75 mM KCl 10 mM Tris, pH 8, 10 mM MgCl2 and 10 pmol/µl each of the 5' and 3' oligonucleotides (C2-C5 and C2-C6 complementary to human CD23 a and b isotypes respectively. The reaction mixture was added to the slides and the coverslips were sealed at the edge with nail-polish to prevent desiccation. PCR conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 30 cycles. Coverslips were removed, the supernatant aspirated and submited to tube PCR with nested primers (CDint-C1).

Detection of Amplification Products. After washing step in TBS, the slides were recovered with 5% BSA inTBS for 20min at RT, rinsed in TBS. Then the slides were incubated with 1.100 sheep FAb antibody fragments specific for digoxigenin conjugated to alkaline phosphatase for 60min at RT. Revelation step was done as described for immunostaining purpose.

PCR in situ hybridization controls. Supernatants from in situ RT-PCR were recovered from slides and resubmitted to PCR analysis using specific nested primers for CD23. PCR conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 30 cycles. PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. To further confirm the specificity of the the amplified bands, Southern blot analysis was performed as described above.

## References

Bonnefoy, J.Y., Aubry, J.P., Penone, C., Widjenes, J., and J. Banchereau. 1987. Production and characterisation of a monoclonal antibody specific for human lymphocyte low affinity receptor for IgE. *J.Immunol.*, **138**: 2970-2978.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J.C. and A.B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy : A second receptor for IgE. *Immunol. Today*, 7:15-18.

Capron, M., Spiegelberg, H.L., Prin,L., Bennich, H., Butterworth, A.E., Pierce,R.J., Ouaissi,M.A., and A. Capron. 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.*, **132**:462-468.

Capron, M., Truong, M.J., Aldebert, D., Gruart, V., Suemura, M., Delespesse, G., Tourvieille, B., and A. Capron. 1991. Heterogenous expression of CD23 epitpes by eosinophils from patients. Relationships with IgE mediated functions. *Eur. J. Immunol.*, **21**:1265-1269.

Capron, M., Capron, A., Dessaint, J.P., Torpier, G., Johansson, G., and L.Prin. 1981. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.*, **126**: 2087-2092.

Delespesse, G., Suter U., Mossalayi, D., Bettler, B., Sarfati, M., Hofstetter, H., Debré, P., Dalloul, A. Expression, structure, and function of the CD23 antigen. *Adv.Immunol.*, 1991, **19**, 149.

Delespesse, G., Sarfati, M., and H. Hofstetter. 1989. Human IgE binding factor. Immunol. Today ., 10:159-169

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

Dubucquoi et al. 1994. Interleukin-5 synthesis by eosinophils : association with granules and immunoglobulin-dependant secretion. J. Exp. Med., 179, 703-708.

Fournier, S., Trans, I. D., Sutter, U., Biron, G., Delespesse, G., and M. Sarfati. 1991. The *in vivo* expression of type B CD23 mRNA in B -chronic lymphocytic leukemic cells is associated with an abnormally low CD23 upregulation by IL-4 : comparison with their normal cellular counterparts. *Leukemia. Research.*, **15**, 609.

Gordon J., Rowe M., Walker L., Guy G. Ligation of the CD23, p45 (BLAST-2, EBVCS) antigen triggers the cell-cycle progression of activated B lymphocytes. *Eur.J. Immunol.*,1986, 16, 1075.

Grangette C., Gruart V., Ouaissi M.A., Rizvi F., Delespesse G., Capron A., Capron M. IgE receptor on human eosinophils (FceRII). Comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. J. Immunol., 1989, 143, 3580.

Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Goldman M, Prin L, Capron A, & Capron M: Distinct Eosinophil populations express Th1 or Th2 cytokines. *Science.*, Submitted

Letellier M., Nakajima T., Delespesse G. IgE receptor on human lymphocytes. IV Further analysis of its structure and of the role of N-linked carbohydrates. J. Immunol., 1988, 141, 2374.

Matsui, M., Nunez, R., Sachi, Y., Lynch, R.G., and J. Yodoi. 1993. A possible novel mechanism of generating a soluble isoform in the type II cell surface receptor. *FEBS letter.*, **335**:51-56.

Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Wideman J., Bonnefoy J.Y., De Vries J.E. Interleukin 5 enhances interleukin 4 induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur. J. Immunol.*, 1988(b), **18**, 929.

Pirron, U., Schlunck, T., Prinz, J.C., and E.P. Rieber. 1990. IgE -dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low affinity receptor for IgE. *Eur. J. Immunol.*, **20**:1547-.

Sarfati M., Bron D., Lagneaux L., Fonteyn C., Frost H., Delespesse G. Elevation of IgEbinding factors in serum of patients with B cell-derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1988, **71**, 94.

Soussi Gounni, A., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., and M. Capron. 1994. High affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.*, **367**:183-186.

Sutton, B.J., and H.J.Gould. 1993. The human IgE network. Nature., 366:421-424.

Weller P.F., Rand T.H., Barett. T., Elovic A., Wang D.T.W., Finberg R.W., Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR dependent MHC antigen presentation and IL-1a

Résultats

expression . J. Immunol., 1993, 150, 2554

Yokota, A., Kikutani, H., Tanaka, T., Sato, R., Barsumian, E.L., Suemura, M., and T. Kishimito. 1988. Two species of human Fc $\epsilon$ R receptor II (Fc $\epsilon$ RII:CD23) : Tissue specific regulation of gene expression. *Cell.*, **55**: 611-615.

Yokota, A., Yukuta, K., Yamamoto, A., Sugiyama, K., Suemura, Y., Tashiro, Y., Kishimito, T. and H. Kikutani. 1992. Two forms of the low affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis. Identification of the critical cytoplasmic domains. *Proc Nat. Aca. Sci.*, **89**: 5030-5034.

Figure 1. Detection of CD23/mRNA in human eosinophils purified from hypereosinophilic patients. (a and c): Cytopreparation hybridized to <sup>35</sup>S labeled antisense and sense human CD23 riboprobes respectively. Positive eosinophils are indicated by arrowheads. Exposure was for 15 days at 4°c. After revelation step, cells were counterstained with hematoxylin.

Figure 2. Immunohistochemical detection of CD23/FccRII protein in human eosinophils. Eosinophils purified from patients with HES (a, b) or eosinophilia associated to skin diseases (Atopic dermatitis and bullous pemphigoid) (c and d; e and f) respectively or from healthy donor (g,h). Staining was performed with anti CD23 (mAb 135) and anti Toxo at 20µg /ml as isotypic control. Only eosinophils showed staining with anti CD23 (mAb 135) (a, c, e and g). No staining was observed with the isotypic control mAb (b, d, f and h ). Slides were prepared from highly purified eosinophils except for some patients with skin diseases. Hematoxylin was used for counterstainning.

Figure 3. Analysis of exon structure of low affinity IgE receptor expressed by eosinophils. I- Schematic representation of a and b CD23 cDNA

II-RTPCR analysis of FccRII/CD23 transcription.

PCR analysis of cDNA from RNA of highly purified eosinophils and EoL3 cell line, using Fc $\epsilon$ RII a primers (C2-C5) pairs (lanes 2, 3 and 4); and Fc $\epsilon$ RII primers (C2-C1) pairs (lines 5, 6 and 7) spanning common part of b and a isoforms. Lanes 8,9 and 10 correspond to  $\beta$  actin used as control. Eosinophilic patients correspond to lanes (10, 7 and 4); (9, 6 and 3); EoL3 cell lanes to (8,5 and 2).

b) Southern blot analysis of amplified CD23 CDNA from human eosinophils. Each lane correspond to as described above.

III- Sequence analysis of low affinity IgE receptor expressed by human eosinophils. A, B and C shows the nucleotidic sequences of CD23 N terminal a, b isoforms and their common part

## Résultat III

respectively.

# Figure 4. Detection of a and b CD23/ FceRII messenger in human eosinophils by single cell *in situ* RT-PCR.

-A Detection of a CD23 isoform in HES patients (a) and healthy donor (c). A positive signal correspond to the detection of amplified product cDNA by digoxigenin conjugated dUTP to alkaline phosphatase (a,b) or to fluorescein (c,d). e, Southern blot of the amplified product recovered from positive slides (lanes 1 and 2) or negative control (lanes 3 and 4) supernatants resubmitted to another round of PCR with nested primers (C1 and C2).

-B Detection of a CD23 isoform in HES patients (a) and healthy donor (c). e, as was described above. b and d in figure 4A and 4B represent negative control (Experimental procedure).





125

Table 1. Oligonucleotide Sequences

Name	Sequences 5' to 3'	Position
C1	CTGTGGCACTGGGACACCACA	342-363
C2	TGTGTGCAACACGTGCCCTGAA	686-708
C3=Cint	TGGACTGGGATTTCTGCGCCAT	447-449
C5	ACTCCACTAACCAGAGCTGTGA	118-140
C6	ATGAATCCTCCAAGCCAGGAGA	
C7	TCCCAGGAGTACACCCCA	1328-1346

## <u>NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE HUMAN EOSINOPHIL CD23/FceRII</u> cDNA SUBTYPES

## A

C5

C2

## B

C6

C2

## С

C1

**C7** 





## Résultat complémentaire

<sup>'</sup>Comme dans le cas de la lignée lymphocytaire RPMI8666 (Matsui *et al.*, 1993 ; Nunez *et al.*, 1995), nous avons pu mettre en évidence l'expression par les éosinophiles de patients de differents étiologie (HES, HES associé à des maladies dermiques) et la lignée EoL3 des isoformes tronqués a' (Figure 26). Ces isoformes semblent intervenir dans la régulation de l'expression du messager du CD23.



Figure 26: Détection par RT-PCR des ARNm codant pour les isoformes a et a' du CD23 chez l'éosinophile humain.

## Discussion et conclusion

Suggérée par Hubscher en 1975, la présence d'un récepteur FcER sur l'éosinophile, a été clairement établie par l'équipe de Capron (Capron *et al.*, 1981). Par la suite, le récepteur de faible affinité pour l'IgE (FcERII) a été mis en évidence à la surface des éosinophiles hypodenses (Capron *et al.*, 1984). L'analyse biochimique a permis de révèler une certaine analogie avec le CD23 des lymphocytes. L'évidence moléculaire de l'homologie entre les deux molécules n'avait pas encore été clairement établie.

Au cours de notre étude, nous avons pu démontrer la présence de l'ARNm et de la protéine CD23 chez les éosinophiles. Mais il reste à souligner que leur expression est très variable suivant les patients. Cette variabilité peut être due d'abord à la pathologie et par conséquent à l'état activé ou non des éosinophiles. Ainsi, par rapport aux éosinophiles de patients HES, un grand % des éosinophiles provenant de patients atteints de pemphigoïde bulleuse, expriment le messager et la protéine CD23 détectés par hybridation *in situ* et immunomarquage. Cette variabilité est observée au sein des patients HES eux même. Ceci est en accord avec l'étude de l'expression du CD23 par Northern Blot et cytofluorimétrie de flux (Capron *et al.*, 1991).

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé au niveau moléculaire ce récepteur. La stratégie adoptée pour le clonage du FcERII de l'éosinophile a consisté en l'utilisation de l'amplification génique sur l'ADNc d'une banque d'ARN total d'éosinophiles humains issue de trois patients HES. Seul l'ARN messager de cellules purifiées à 100% a été utilisé pour cette procédure. Des oligonucléotides spécifiques de chaque isotype du CD23 (a et b) ont été utilisés au cours de l'étape de l'amplification génique de l'ADNc. L'analyse des produits amplifiés montre bien la présence des bandes de taille attendue. Après l'étape de clonage et de séquencage, les séquences obtenues montrent que l'éosinophile humain exprime les deux isoformes du CD23. Les cellules B expriment constitutivement la forme "a" tandisque la forme "b"est induite par l'IL-4. Chez les autres cellules exprimant le CD23 (monocytes, EoL3, macrophages...), soit spontanément, soit après activation, on ne détecte que la forme b (Yokota et al., 1988). Les deux formes seraient impliquées dans des mécanismes cellulaires différents. Récemment, l'expression des formes a et b, a été mise en évidence chez les cellules B de patients atteint de leucemie chronique B, les cellules mononuclées de sang de cordon ombilical (Fournier et al., 1991), les éosinophiles de patients HES, ou atteints de pemphigoïde bulleuse (Soussi Gounni et al., Soumis).

L'expression de ces deux formes par l'éosinophile humain de patients HES laisse supposer que cette cellule intervient, via ces structures (forme a et b du CD23) ainsi que leur formes solubles (Aldebert *et al.*, 1994), non seulement dans les mécanismes de défense parasitaire mais aussi dans les phénomènes de maturation et de prolifération des lymphocytes et dans le contrôle de la réponse IgE.

Il est important de souligner qu'au cours de l'amplification génique par RT-PCR, outre les fragments correspondants à la taille attendue, d'autres fragments de taille inférieure ont été mis en évidence chez les éosinophiles, ainsi que dans la lignée EoL3 (Figure 26). La taille de l'un de ces fragments correspond parfaitement à un messager dont la partie codante pour la région transmembranaire est absente (100bp). Ceci peut être le résultat d'un épissage alternatif donnant naissance à un messager codant pour les fragments solubles de CD23. Ce même transcrit vient d'être détecté chez les cellules T de patients, la lignée lymphoblastoïde RPMI8666 et la lignée Eol3 (Nunez et al., 1995). Toutefois, dans un système de transfection transitoire (les cellules Cos), la protéine correspondante à ce transcrit n'a été détectée ni dans les surnageants, ni dans les extraits cellulaires (Matsui et al., 1993). Ainsi, il est improbable que ce transcrit donne naissance à la forme soluble du CD23 malgré le fait qu'il garde la partie codante pour la région extracellulaire. La présence de ce transcrit pourrait exercer un rôle régulateur négatif sur l'expression du CD23. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait judicieux de surexprimer ce transcrit, dans une lignée qui exprime constitutivement le CD23 et de tester son effet sur l'expression de la protéine et du messager endogène. Si cette hypothèse s'avère vraie, la molécule CD23 serait le premier exemple de régulation négative de l'expression par brin sens. Enfin, une première indication dans la litérature qui va dans ce sens montre que l'expression du CD23 est augmentée quand on transfecte les cellules de patients atteints de leucémie chronique par des oligonucléotides antisens du CD23 (Fournier et al., 1994).

Par ailleurs, nous avons observé d'une façon générale, pour un même patient, que la proportion des éosinophiles exprimant la protéine CD23, détectée par immunomarquage, est faible par rapport à ceux exprimant l'ARN messager détecté par RT-PCR *in situ*. Ceci peut être interprété par la grande sensibilité de cette technique, comparée à l'immunomarquage et/ou par la présence d'un contrôle négatif de l'étape de la traduction du CD23. Le mécanisme moléculaire de ce phénomène reste à identifier. Ainsi, il serait intéressant de comparer l'expression par PCR quantitative du transcrit tronqué (dépourvu du domaine transmembranaire) et les transcrits correspondants aux isoformes classiques a et b d'une part et de comparer leur taux à l'expression protéique du CD23 en diverses pathologies d'autre part. Ceci peut nous renseigner si leur rôle est de réguler négativement l'expression du CD23 *in vivo*.

## Dans ce travail, nous avons pu caractériser de façon moléculaire le récepteur de faible affinité FccRII/CD23 chez les éosinophiles humains.

D'autres études devraient permettre:

- de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du gène du récepteur CD23, en relation avec les différents pathologies.

- de caractériser les métabolismes intracellulaires lors de l'interaction avec l'IgE de ce récepteur à la surface des éosinophiles : Identification des événements biochimiques et des substrats cellulaires lors de la transduction du signal via la mobilisation de ce récepteur. Résultat IV: Etude cinétique de l'expression du Fc & RI et du Fc & RII/CD23 au cours de la différenciation des éosinophiles. Mise en évidence de mécanismes différentiels de régulation.

## RESULTAT IV : ETUDE CINÉTIQUE DE L'EXPRESSION DU FCERI ET DU FCERII AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DES EOSINOPHILES. MISE EN EVIDENCE DE MECANISMES DIFFERENTIELS DE REGULATION

Ayant mis en évidence l'expression des récepteurs de forte et de faible affinité pour l'IgE par les éosinophiles, nous avons voulu étudier la cinétique d'apparition de ces deux récepteurs (FcɛRI et FcɛRII) au cours de la différenciation et de la maturation des éosinophiles, ainsi que les facteurs régulateurs de leur expression, en particulier les cytokines.

Afin de se placer dans des conditions physiologiques, nous avons utilisé le modèle de différenciation en éosinophiles à partir du sang de cordon ombilical en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5. Dans ce système, la différenciation des cellules progénitrices en éosinophiles est suivie par numération des cellules exprimant une protéine spécifique de l'éosinophile: la peroxidase (EPO). Par technique d'immunomarquage, l'expression du FceRI apparait très tôt, dès la première semaine au stade prémyélocyte. L'expression maximale est atteinte à 3 semaines puis diminue fortement vers la quatrième semaine. En revanche, celle du CD23 apparait vers la deuxième semaine et atteint son maximum à la quatrième semaine. La coexpression maximale des deux récepteurs est observée à la troisième semaine, est trés transitoire.

Les éosinophiles purifiés chez les patients hyperéosinophiliques comportent deux sous populations qui diffèrent par des critères morphologiques, biochimiques et fonctionnels (Prin *et al.*, 1983 ; Capron *et al.*, 1984). Les éosinophiles "hypodenses" représentent les formes activées par rapport aux éosinophiles "normodenses". Afin de comparer les éosinophiles différenciés *in vitro* à partir des précurseurs présents dans le sang de cordon ombilical et les éosinophiles matures *in vivo* nous avons étudié par immunomarquage l'expression de ces deux récepteurs par les sous-populations d'éosinophiles hypodenses et normodenses de patients HES et les éosinophiles de donneurs sains. Dans le cas de donneurs sains et pour les éosinophiles normodenses, un fort % des cellules expriment le récepteur FcɛRI comparé à celles exprimant le FcɛRII. En revanche, le % des éosinophiles hypodenses exprimant le FcɛRII est très élevé comparé aux ésinophiles normodenses et ceux provenant des donneurs sains. Par ailleurs, il a été démontré que les éosinophiles et les basophiles proviennent d'un précurseur commun (Dvorak *et al.*, 1994). Plus récemment, un stade de granulocyte immature comportant des granules éosinophiles a été mise en évidence (Boyce *et al.*, 1995).

# Ces résultats suggèrent que le FceRI serait plutôt un marqueur de différenciation précoce cependant que le FceRII est plutôt un marqueur d'activation de l'éosinophile.

Par la suite, l'effet des cytokines sur l'expression du FcERI et du FcERII a été appréhendé

à la fin de la quatrième semaine de différenciation *in vitro*, en absence des facteurs de différenciation et de maturation des éosinophiles (l'IL-3, GM-CSF, et l'IL-5). Ainsi, l'incubation avec l'IL-4, l'IL-5, ou l'IFN $\gamma$  seuls diminue l'expression du récepteur Fc $\epsilon$ RI par les cellules différenciées en éosinophile mais augmente celle du CD23. En plus, l'IL-2 semble jouer un rôle négatif sur l'expression des deux marqueurs.

Ces résultats confirment donc l'hypothèse favorisant le Fc $\epsilon$ RII comme marqueur d'activation lors des syndromes hypereosinophiliques. Toutes les cytokines testées inhibent en effet l'expression du Fc $\epsilon$ RI cependant que les cytokines IL-4, l'IL-5 et l'IFN $\gamma$  augmentent l'expression du Fc $\epsilon$ RII/CD23

## DIFFERENTIAL KINETICS AND REGULATION OF FCERI AND FCERIL/CD23 EXPRESSION BY EOSINOPHILS

Masao Morita\*, Abdellilah Soussi Gounni\*, Delphine Aldebert\*, Bouchaïb Lamkhioued\*, Emmanuel Delaporte#, André Capron\* and Monique Capron\*

From \*the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM U167, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59800 Lille, France, and #Service de Dermatologie A, Hopital. Huriez, Centre Hospitalier Régional Universitaire 59037 Lille, France

Address correspondence to: Dr Monique Capron. Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM U167, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59800 Lille, France

Acknowledgements: This work was supported by Unité INSERM U167, INSERM/Agence Française du Sang (Contract n° 3FS03) and by a grant from the Centre Hospitalier Regional Universitaire of Lille, France (Contract N° CA9769). Morita, M. (Present address: Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Kyoto University. 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan) was a recipient of a post-doctoral fellowship from INSERM. We gratefully appreciate Clinic COTTEEL (Villeneuve d'Ascq, France) for continuous supply of human cord blood. We would like to thank Dr J.P. Kinet (NIH), Dr M. Sarfati (Montréal) and Dr J.Y. Bonnefoy (Geneva) for providing the required reagents.

## SUMMARY

Expression of FceRI and FceRII/CD23 was examined by immunocytochemistry on eosinophils differentiated from human cord blood cells in the presence of recombinant human interleukin-3 (rhIL-3), granulocyte/macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) and interleukin-5 (rhIL-5) and on blood eosinophils purified from normal donors or patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES). On cord blood derived eosinophils, FcERI expression started at 1 week of culture, increased to reach a plateau at 3 weeks of culture, and then sharply decreased between 3 and 4 weeks of culture. FceRII/CD23 appeared slightly later, after 2 weeks of culture, then the percentage of FceRII/CD23 positive eosinophilic cells increased and stayed in plateau. Soluble CD23 significantly decreased, in a dose-dependent manner, the expression of FCERI. FCERI expression on cord blood derived eosinophils was down-regulated after 1 week of culture with recombinant human interleukin-2 (rhIL-2), interleukin-4 (rhIL-4), rhIL-5, interferon- $\alpha$  (rhIFN- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (rhIFN- $\gamma$ ). In contrast, the expression of FceRII/CD23 on human cord blood derived eosinophilic cells was up-regulated after 1 week of culture with rhIL-4, rhIL-5 and rhIFN- $\gamma$ , and down-regulated with rhIL-2 and rhIFN- $\alpha$ . Fc $\epsilon$ RI was expressed on about 30% normal donor eosinophils as well as on normodense eosinophils from HES patients but significantly decreased on hypodense eosinophils. In contrast, FceRII/CD23 was expressed on a very small proportion of normal donor eosinophils, whereas its expression increased from normodense to hypodense eosinophils from HES patients. These results suggest that FcERI on eosinophils might represent one differentiation antigen expressed relatively early during differentiation, with a decreased expression through maturation or activation, whereas FceRII/CD23 might be rather considered as a marker of eosinophil activation. They also suggest a down regulatory effect of FceRII/CD23 on Fce RI expression.

## INTRODUCTION

Interleukin-3 (IL-3), Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and Interleukin-5 (IL-5) are involved in eosinophil proliferation and differentiation (1-3). Human cord blood cell precursors cultured in the presence of rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5 can provide a study model to investigate the kinetics of eosinophil differentiation in vitro (4). IgE is a major immunoglobulin involved in the development of immediate type allergic reactions and in host defense against parasitic infections. IgE binds to eosinophils via specific binding factors on their cell surface, and after crosslinking, induce the release of eosinophil peroxidase (EPO), which is cytotoxic for parasite larvae and mammali, GM-CSFan tissues (5). Among these IgE binding factors, FceRII was first identified on eosinophil cell surface (6, 7) and presented similarities with CD23 expressed by B lymphocytes, macrophages and platelets (8). FceRII/CD23 was shown to be involved in eosinophil-mediated EPO release and cytotoxicity against schistosomula (9). Besides FccRII/CD23, other functional IgE binding factors have been shown to be expressed on eosinophils. Mac 2, which belongs to the S-lectin (thiol-dependent) family with a specific  $\beta$ -galactoside recognition domain (10), was detected on eosinophils purified from peripheral blood of patients with hypereosinophilia (11). FcERI, a member of the immunoglobulin superfamily, (12), thought to be expressed only on mast cells and basophils (13) was recently detected on eosinophils purified from HES patients as well as on skin eosinophils from patients with atopic dermatitis (14). The evidence that eosinophils and basophils share the same pathway in their relatively early differentiation stages (15 - 17), led us to suspect that differentiating immature eosinophils might express FcERI as a common feature to basophils and that FceRI might be one of the early differentiation antigens of eosinophils. Here, we have investigated the follow-up expression of FceRI and FceRII/CD23 on eosinophilic cells derived from human cord blood precursor cells, as well as the in vivo expression of FcERI and FceRII/CD23 on normal and activated eosinophils present in the peripheral blood. Furthermore, the regulatory effect of several cytokines and sCD23 on the expression of FcERI and FceRII/CD23 was also examined on human cord blood derived eosinophils.

## MATERIALS AND METHODS

Reagents.

Recombinant hIL-3 was a gift from Sandoz Preclinical Research, Basel, Switzerland. Recombinant hIL-5 was a gift from Dr. Jan Tavernier of Roche Research, Gand, Belgium. Recombinant hGM-CSF and rhIL-4 were gifts from Schering-Plough, Dardilly, France. Murine anti-FccRI alpha chain monoclonal antibody, 15.1 was kindly donated by Dr. J.P. Kinet (National Institute of Health, Rockville, USA). Murine anti-FccRII/CD23 monoclonal antibody, 135.1 was kindly donated by Dr. M. Sarfati (Hôpital Notre-Dame, Montréal, Canada). Rabbit anti-FccRII/CD23 polyclonal antibody, Rb55 and soluble recombinant CD23 (25kd) were kindly donated by Dr. J. Y. Bonnefoy (Glaxo Institute for Molecular Biology, Geneva, Switzerland). Murine anti-Toxoplasma (P30) monoclonal antibody, was prepared at the Institut Pasteur, Lille, France. Recombinant hIFN- $\alpha$  and rhIFN- $\gamma$  were purchased from Genzyme Diagnostics. Recombinant hIL-2 was purchased from Roussel Uclaf, Romainville, France.

## Purification of human cord blood mononuclear cells.

Human cord blood samples were obtained after informed consent and cord blood mononuclear cells were purified as previously described (2). Briefly, heparinized human cord blood was diluted two times with phosphate buffered saline (PBS) and layered on Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After centrifugation at 400g for 30 minutes at room temperature, mononuclear cells were recovered and contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis. After washing with PBS, the mononuclear cells were resuspended in plastic culture bottle in RPMI 1640 medium containing 7.5% fetal calf serum (FCS) for 2 hours at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, in order to reduce the contamination by adherent macrophages.

## Eosinophilic differentiation of human cord blood mononuclear cells.

Purified human cord blood mononuclear cells at a cellular concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50µM 2 mercaptoethanol and antibiotics, referred to as the culture medium. Eosinophilic differentiation was induced by addition of rhIL-3 ( $2 \times 10^{-10}$  M), rhGM-CSF ( $2 \times 10^{-10}$  M) and rhIL-5 (1 u/mL),

as previously described (4). The culture medium containing these interleukins was replaced weekly. Cell viability was assessed by the exclusion of trypan blue and differential cell counts were obtained on cytocentrifuged preparations (Shandon, Pittsburg, PA) every 7d. Eosinophilic lineage committed cells were determined by cyanide-resistant eosinophil peroxidase staining (EPO staining) (18). Briefly, cytocentrifuged preparations were fixed with formalin-acetone (45 ml of acetone, 25 ml of formaldehyde, 20 mg of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 100 mg of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for 100 ml final volume) for 30 seconds followed by reaction with EPO staining solution which consisted of 100 ml of phosphate buffer containing 75 mg of 3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical), 39.2 mg of KCN and 0.3 ml of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes at room temperature, then counterstained with Mayer's hematoxylin. Dark brown staining was characteristic of the eosinophil-specific cyanide-resistant peroxidase (18).

## Purification of blood eosinophils.

Venous blood was obtained from normal donors, and peripheral blood samples from 5 HES patients whose eosinophil numbers were superior to 1,000/mm<sup>3</sup> were obtained, after informed consent. Normal donor eosinophils were purified by negative selection of CD16 positive neutrophils using magnetic cell sorting (MACS) technique (19). Briefly, fraction of granulocytes, obtained by centrifugation on Ficoll Hypaque and hypotonic lysis of erythrocytes, were incubated with anti-CD16 coated microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) for 30 minutes at 4°C, and the cell-beads conjugates were removed magnetically during passing through a magnetic cell sorter (SuperMACS, Miltenyi Biotec GmbH, Germany). The purity of eosinophil preparations was estimated on cytocentrifuged preparation with RAL (RAL 555, Société chimique, Clichy, France), and eosinophils of more than 98% purity were used. Normodense and hypodense eosinophils from HES patients were purified on metrizamide discontinuous gradients (20, 21). Briefly, leukocytes were recovered by sedimenting at 37°C for 30 minutes 5 vol of heparinized venous blood with 1 vol of 4.5% dextran diluted in physiological saline. The leukocyte rich supernatant was collected and washed in Tyrode's buffer + 0.1% gelatin. Contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis. The preparations of mixed leukocytes were resuspended at  $5 \times 10^7$  cells/ml in MEM/FCS and layered on discontinuous metrizamide (Nyegaard Co., Oslo, Norway) gradients. Leukocytes were placed on the top of six gradients of decreasing densities (25% metrizamide solution, 1.14 g/ml; 24%, 1.135 g/ml; 23%, 1.130 g/ml; 22%, 1.125 g/ml; 20%, 1.115 g/ml; 18%, 1.105 g/ml) and centrifuged at 1,200 g for 45 minutes at room temperature. Six cell fractions were collected from each interface, washed in calcium and magnesium-free Hanks' balanced salt solution : cell fractions in the lower density layers, corresponding to metrizamide concentrations inferior to 23% and cell fractions collected from the top of 25% and 24% layers were used as hypodense and normodense eosinophils, respectively (21).

## Immunostaining of cord blood derived eosinophils with anti FceRI and FceRII/CD23 mAb.

Every 7d, cytocentrifuged preparations of cultured cells were fixed with Tris-buffered saline (TBS) containing 4% paraformaldehyde for 30 minutes at 4°C, washed in TBS and stained with EPO staining solution to identify the eosinophilic lineage committed cells. After washing in TBS, the preparations were saturated with normal goat serum for 45 minutes at room temperature at a final concentration of 5% to inhibit nonspecific immunostaining. Then the preparations were incubated with murine anti-Fc $\in$ RI  $\alpha$ -chain monoclonal antibody (mAb) (15.1), murine anti-FceRII/CD23 mAb (135.1) or irrelevant isotype control antibody, anti-Toxoplasma P30 mAb at a concentration of 20 µg/ml overnight at 4°C. After washing 3 times with TBS for 10 minutes, the preparations were incubated with sheep biotin-conjugated anti-mouse IgG (Sigma immuno Chemicals) at a concentration of 20  $\mu$ g/ml for 1 hour at room temperature. After washing 3 times with TBS, the preparations were incubated with extravidin-conjugated alkaline phosphatase (Sigma immuno Chemicals) at concentration of 20 µg/ml for 1 hour at room temperature. After washing 3 times with TBS, the cells were developed in red colour using New Fuchsin Substrate and Chromogen System (DAKO, Carpinteria, CA) followed by counterstain with Mayer's hematoxylin. The percent of eosinophilic lineage committed cells positively stained with anti-FceRI mAb (15.1) or anti-FceRII/CD23 (135.1) mAb was calculated on least at 200 EPO positively stained cells.

## Double immunostaining of cord blood derived eosinophils.

The cytocentrifuged preparations were fixed with TBS containing 4% paraformaldehyde as above. After saturation with 5% normal goat serum for 45 minutes at room temperature, the preparations were incubated with a combination of murine anti-FceRI  $\alpha$ -chain mAb (15.1) and rabbit anti-FceRII/CD23 polyclonal antibody (Rb55) at concentrations of 20 µg/ml and 1/50, respectively or, as negative controls, with combination of murine anti-Toxoplasma mAb (P30) and normal rabbit serum at the same concentrations respectively, overnight at 4°C. After washing 3 times with TBS for 10 minutes, the preparations were incubated with swine alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (DAKO, Carpinteria, CA) at a concentration of 20 µg/ml for 1 hour at room temperature. After washing 3 times with TBS, the preparations were developed in red colour using New Fuchsin Substrate and Chromogen System followed by treatment with 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5 at room temperature for 5 minutes to stop the alkaline phosphatase reaction. After washing with TBS, the preparations were incubated with sheep biotin-conjugated anti-mouse IgG for 1 hour at room temperature at a concentration of 20 µg/ml. After washing 3 times with TBS, the preparations were incubated with extravidinconjugated alkaline phosphatase for 1 hour at room temperature at a concentration of 20 µg/ml. After washing with TBS, the preparations were developed in blue-green colour with nitro blue tetrazolium salt (NBT) / 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphatase (X-phosphate) (Boeringer Mannheim Biochemica) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Eosinophilic lineage committed cells were confirmed by their characteristic granularity using interference contrast microscopy (22, 23).

## Effect of soluble CD23 on the expression of FcERI by human cord blood derived eosinophils.

After 4 weeks of culture with rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5, cord blood derived eosinophils were incubated for another week with sCD23, at concentrations ranging from were 0.6 ng/ml (0.5 u/ml) to 600 ng/ml (485 u/ml). The expression FceRI and of FceRII/CD23 was evaluated as above after immunostaining with specific mAb.

Effect of cytokines on the expression of FceRI and FceRII/CD23 by cord blood derived

## eosinophils.

After 4 weeks of culture with rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5, non adherent cells were recovered and washed 3 times with PBS and resuspended at a cell concentration of  $2x10^6$  cells/ml in the culture medium with or without addition of 10 u/ml rhIL-2, 100 u/ml rhIL-4, 1000 u/ml rhIFN- $\gamma$ , 1000 u/ml rhIFN- $\alpha$ , or 10 u/ml rhIL-5. These concentrations were determined in preliminary experiments to show sufficient and maximum effects on the expression of FceRI and FceRII/CD23 on human cord blood derived eosinophils (data not shown). After another 1 week of culture, non adherent cells were recovered, cytocentrifuged and a combination of EPO staining and immunohistochemistry was performed to detect FceRI or FceRII/CD23. The percentages of FceRI or FceRII/CD23 positive cells were determined on at least 200 eosinophilic lineage committed cells.

## Immunostaining of blood eosinophils with anti FceRI and FceRII/CD23 mAb.

Cytocentrifuged preparations of normal donor eosinophils and eosinophils purified from the peripheral blood from HES patients were fixed and immunostained for FceRI or FceRII/CD23 detection by the same method described above, without EPO staining.

## Statistical Analysis.

The statistical significance of differences between samples was determined by the two-tailed Student's <u>t</u> test-Results are expressed as mean  $\pm$ SD (4 to 5 experiments).

## RESULTS

## Eosinophilic differentiation of human cord blood mononuclear cells.

As shown in Figure 1, EPO positive eosinophilic lineage committed cells were observed from 1 week of culture, increased in numbers and reached a plateau after 3 to 4 weeks of culture. After 2 weeks of culture, the other cells were mainly cells with mononocyte/macrophage morphology, with small numbers of lymphocytes and blast cells. No metachromatic cells were observed after alcian blue staining (data not shown). The eosinophilic lineage committed cells were almost all promyelocytes at 1 week of culture, but after 2 weeks of culture, more differentiated or matured myelocytes, metamyelocytes and segmented nuclear eosinophils appeared. After 5 weeks of culture, total and eosinophilic lineage committed cell numbers decreased, and morphologically apoptotic eosinophils and macrophages phagocytosing those eosinophils increased gradually.

Kinetic analysis of FceRI and FceRII/CD23 expression on eosinophilic lineage committed cells. In order to detect the expression of FceRI or FceRII/CD23 on eosinophilic cells, we performed a combination of EPO staining and immunocytochemistry with anti-FceRI or anti-FceRII/CD23 antibodies on the same preparations. As shown in Figures 2 (a) - (d) and 3, FceRI positive eosinophilic cells appeared at 1 week of culture on cells with the morphology of immature eosinophilic promyelocytes, they increased in numbers and reached a maximum at 2 or 3 weeks of culture, with 70% of EPO positive cells expressing FceRI. Then this population dramatically decreased between 3 and 4 weeks of culture. On the other hand, FceRII/CD23 positive cells at 4 weeks of culture and the percentage of FceRII/CD23 positive eosinophilic cells reached a maximum with about 65% positive cells at 4 weeks of culture and did not decrease thereafter. At 3 weeks of culture, both FceRI and FceRII/CD23 were detected on the majority of eosinophilic cells.

## Coexpression of FceRI and FceRII/CD23 by eosinophilic cells.

In order to confirm whether FceRI and FceRII/CD23 are coexpressed by the same eosinophilic cells, double immunocytochemistry with the two antibodies against FceRI and FceRII/CD23 was

performed on the same preparations. In this double immunostaining procedure, eosinophilic cells were identified by their characteristic coarse granularity, using interference contrast microscopy. As shown in Figure 2 (e) - (f), FceRI and FceRII/CD23 double positive eosinophilic cells were detected after 2 weeks of culture. In these FceRI and FceRII/CD23 double positive cells, FceRI staining was rather located in the cell periphery, whereas FceRII/CD23 staining was relatively perinuclear or cytoplasmic.

## Effect of sCD23 on the expression of FceRI by eosinophilic cells.

The sharp decrease of FceRI expression when FceRII/CD23 expression reached its maximum led us to suggest a negative regulatory effect of FceRII/CD23 on FceRI. Soluble recombinant CD23 (s CD23) was then added to the 4 week-culture of cord blood derived eosinophils. As shown in Figure 4, the % of FceRI positive eosinophilic cell numbers decreased in a dose dependent manner, to less than 5%, after 1 week of incubation with sCD23, for the concentration of 600 ng/ml.

## Effect of cytokines on the expression of FceRI and FceRII/CD23 by eosinophilic cells.

After 4 weeks of culture with rhIL-3, rh GM-CSF and rh IL-5, an additional 1 wk of culture without these cytokines did not decrease the viable eosinophilic cell numbers (data not shown). As presented in Figure 5, the percent Fc $\epsilon$ RI or Fc $\epsilon$ RII/CD23 positive eosinophilic cells in the absence of additional cytokine were about 30% and 60% respectively. The effect of various cytokines on Fc $\epsilon$ RI and Fc $\epsilon$ RII/CD23 expression was evaluated after 1 additional week of culture in the presence of optimal concentration of cytokines, determined in preliminary dose-response experiments. All cytokines tested (IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\alpha$  or  $\gamma$ ) significantly decreased Fc $\epsilon$ RI expression (Fig. 5 a). Similar results were obtained for IL-2 and IFN $\alpha$  on Fc $\epsilon$ RII/CD23 (Fig. 5b).

## In vivo expression of FceRI and FceRII/CD23 on peripheral blood eosinophils

The expression of FcERI and FcERII/CD23 was next investigated on various eosinophil
subpopulations, either purified from normal blood donors or separated according to their density, "normodense" on "hypodense", from HES patients. As shown in Figures 6 and 7, FceRI expression was detected on around 30% eosinophils from normal donors and increased up to 60% on the normodense eosinophil population. This expression dramatically decreased below 10% on hypodense eosinophils purified from the same patients. In order to exclude the possibility that the decrease in FceRI expression was due to the absence of binding of the mAb 15.1 to FceRI when occupied by IgE, a different mAb, (22-E-7) which still bind to occupied FceRI was used on hypodense eosinophils. Similar results were obtained with the two mAb (data not shown).In contrast to FceRI, FceRII/CD23 expression, which is very low on normal eosinophils, significantly increased from "normodense" to "hypodense" eosinophils. The latter population is known to represent the activated phenotype, characterized by cytoplasmic vacuolation and/or nucleus overlobulation.

### DISCUSSION

In addition to many common characteristics, such as part of their granule content, there is some evidence that eosinophils and basophils share the same pathway during their early differentiation stages (15, 16). Occasionally, polynuclear cells containing both eosinophilic and basophilic granules, which seem to be committed to eosinophilic and also basophilic lineage, can be observed in human peripheral blood samples. Recently, Boyce et al. showed that human cord blood mononuclear cells, when cultured with rhIL-3 and rhIL-5 in a Matrigel coated plastic vessel, differentiated into hybrid granulocytes with eosinophilic and basophilic granules (17). They showed toluidine blue positively stained basophilic granules in the hybrid granulocytes, but in our experiments, lacking the extracellular matrix, no positively metachromatic cell were detected by alcian blue staining. Basophils and mast cells were for a long time considered as the only cell populations expressing FcERI (13). Only recently, other populations of human cells such as epidermal Langerhans cells were shown to express FceRI on their cell surface (24). Soon after, it was demonstrated that blood eosinophils from HES patients or present in the skin from patients with atopic dermatitis, expressed FceRI on their cell surface (14). In the context of the existence of some common markers shared between eosinophils and basophils, we hypothesized that eosinophils might express FceRI, as one of the common features, relatively early during their differentiation. In the present work, we showed by immunocytochemistry that FccRI could be detected in the cytoplasm of cord blood derived eosinophils during early differentiation period from 1 to 3 weeks of culture, then the % FceRI positive eosinophilic cell numbers decreased after 3weeks of culture. In contrast, FceRII/CD23 could be detected in the cytoplasm of eosinophilic cells from 2 weeks of culture, then the % FcERII/CD23 positive eosinophilic cell numbers increased and reached a maximum at 4 - 5 weeks of culture. This culture system of human cord blood mononuclear cells did not allow to perform immunocytochemistry after 6 weeks of culture, because of the high numbers of morphologically apoptotic or dead eosinophilic cells. The sharp decrease in FcERI expression after 3 weeks of culture, specially when FcERII/CD23 expression reached its maximum, led us to suggest a negative regulation of FcERI expression. The inhibition of FcERI expression by the soluble form of CD23 confirm this hypothesis. The mechanism by which sCD23 exerted its effect on FceRI is unclear. Different receptors for sCD23 have been recently identified on B cells or monocytes, including CD21 and Mac 1 (). However, no data were provided on immature eosinophils. An alternative explanation is the pleiotropic effects of CD23, just as a cytokine, on IgE production by B cells (25), on early differentiation of thymocytes in synergy with IL-1 (26), on survival and differentiation of germinal center B cells and on growth and differentiation of early myeloid precursor cells (27). Furthermore, the cytokine-like effects of CD23 were shown to be mediated by a motif distinct from IgE binding site (28). The concentration of sCD23 (6 ng/ml) used in the present work corresponded to the pathophysiological concentration actually detected in peripheral blood of HES patients (29), whereas higher concentrations of sCD23 could be suspected in the locus of inflammation. In addition, sCD23 released by activated eosinophils, or by other CD23 positive effector cells, in the locus of inflammation, might interfere in an autocrine and/or paracrine fashion, with the effects of other cytokines on eosinophils. The effects of various cytokines known to be released during the immune response were also investigated on FceRI and FceRII/CD23 expression. All cytokines tested significantly decreased FceRI expression, whereas rhIL-4, rhIL-5 and rhIFN- $\gamma$  increased FceRII/CD23 expression. These results confirm the differential regulation of FceRI and FceRII/CD23, and provide evidence that FceRII/CD23 might be rather up regulated during immune response, in contrast to FcERI. This follow-up study of FCERI and FCERII/CD23 expression during in vitro eosinophilic differentiation from cord blood mononuclear cells might not reflect the physiological induction of eosinophil differentiation in vivo. Indeed rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5 used in this experimental system are not only eosinophilopoietic but also activating factors, and might induce differentiation and activation in a relatively short time and under overexposure to these cytokines. The comparison between FcERI and FceRII/CD23 expression by normal eosinophils and by blood eosinophils from HES patients might provide a better evidence of expression of these IgE receptors in vivo and allow the distinction between activation and differentiation. The present results showed that normal resting eosinophils rather expressed FcERI, whereas very few cells (less than 5%) expressed FceRII/CD23, indicating that FceRII/CD23 is not always expressed on mature eosinophils, differentiated in vivo. The comparison of FceRI and FceRII/CD23 expression by eosinophils

#### Résultat IV

from HES patients is also very instructive. In the hypodense subpopulation showing degranulation, vacuolation and/or overlobulation of nuclei, which has been considered as a morphological marker of activation (30), the majority of cells (more than 80%) expressed FceRII/CD23, and only small numbers of them (less than 10%) expressed FceRI. On the other hand, normodense subpopulations, seemed to differ both from normal cells and from hypodense eosinophils, with the highest FceRI expression and a mean expression of FceRII/CD23. Combined with the data of the kinetic study during eosinophil differentiation, these results provide evidence that  $Fc \in RI$  is expressed transiently on the majority of immature eosinophils, in their early differentiation stages, and decreased on maturation or activation. The down-regulatory effects of all cytokines tested favoured this hypothesis. These observations are also relevant with the concept that eosinophils and basophils could share the same pathway during their early differentiation stages (17). In contrast, FceRII/CD23 seemed to be mainly expressed by eosinophils under activation. This is in agreement with the low affinity binding of IgE to hypodense eosinophils purified from HES patients (31). Taken all together, these results provide further information on eosinophil heterogeneity and indicate that FcERI positive normodense eosinophils correspond rather to newly generated or slightly immature eosinophils, whereas FceRII/CD23 positive hypodense eosinophils reflect the activated state of mature eosinophils. The low degree of coexpression of the two receptors, associated to the down-regulatory effects of sCD23 have prompted speculations that FcERII/CD23 may negatively interact with FcERI. The precise underlying mechanisms have still to be explored not only on eosinophils but also in the case of other cell populations, which showed similar results, as previously reported for mast cells (32), rat basophil leukemia cells (33) and more recently for platelets (Soussi Gounni et al, submitted).

### REFERENCES

1. Sonoda, Y., N. Arai, and M. Ogawa. 1989. Human regulation of eosinophilopoiesis in vitro: analysis of the targets of interleukin-3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-5. *Leukemia* (Baltimore). 3: 14.

2. Saito, H., K. Hatake, A. M. Dvorak, K. M. Leiferman, A. D. Donnenberg, N. Arai, K. Ishizaka, and T. Ishizaka. 1988. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 2288

3. Clutterbuck, E. J., E. M. A. Hirst, and C. J. Sanderson. 1989. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow culture: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood*. 73: 1504.

4. 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 peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood*. 79: 2592.

5. Khalife, J., M. Capron, J. Y. Cesbron, P. C. Tai, H. Taelman, L. Prin, and A. Capron. 1986. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* 137: 1659.

6. Capron, M., T. Jouault, L. Prin, M. Joseph, J. C. Ameisen, A. E. Butterworth, J. P. Papin,
J. P. Kusnierz, and A. Capron. 1986. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FceR2) of eosinophils, platelets and macrophages. J. Exp. Med. 164: 72.

7. Grangette, C., V. Gruart, M. A. Ouaissi, F. Rizvi, G. Delespesse, A. Capron, and M. Capron. 1989. IgE receptor on human eosinophils (FceRII): comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.* 143: 3580.

8. Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, J. C. Ameisen, and A. B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy: the second receptor for IgE (FceR2). *Immunol. Today.* 7: 15.

9. Capron, M., M. J. Truong, D. Aldebert, V. Gruart, H. Suemura, G. Delespesse, Tourvieille, and A. Capron. 1991. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients: relationships with IgE-mediated functions. *Eur. J. Immunol.* 21: 2423.

10. Paroutaud, P., G. Levi, V. I. Teichberg, and A. D. Strosberg. 1987. Extensive amino-acid sequence homologies between animal lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 6345.

11. Truong, M. J., V. Gruart, F. T. Liu, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1993. IgEbinding molecules (Mac-2/ɛBP) expressed by human eosinophils. Inplication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 23: 3230.

12. Ravetch, J. V., and J. P. Kinet. 1991. Fc receptors. Annu. Rev. Immunol. 9:457.

13. Metzger, H., G. Alcaras, R. Holman, J. P. Kinet, V. Pribluda, and R. Quarto. 1986. The receptor with high affinity for immunoglobulin *E. Annu. Rev. Immunol.* 4: 419.

14. Soussi Gounni, A., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*. 367: 183.

15. Denburg, J. A., S. Telizyn, H. Messner, B. L. N. Jamal, S. J. Ackerman, G. J. Gleich, and J. Bienenstock. 1985. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood*. 66: 312.

16. Sillaber, C., K. Geissler, R. Scherrer, R. Kaltenbrunner, P. Bettelheim, K. Lechner, and P. Valent. 1992. Type  $\beta$  transforming growth factors promote interleukin-3 (IL-3)-dependent differentiation of human basophils but inhibit IL-3-dependent differentiation of human eosinophils. *Blood.* 80: 634.

17. Boyce, J. A., D. Friend, R. Matsumoto, K. F. Austen, and W. F. Owen. 1995. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J. Exp. Med.* 182: 49.

18. Ten, R. M., L. R. Pease, D. J. Mckean, M. P. Bell, and G. J. Gleich. 1989. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase: evidence for the peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.* 169: 1757.

19. Hansel, T. T., I. J. M. DeVries, T. Iff, S. Rihs, M. Wandzilak, S. Betz, K. Blaser, and C. Walker. 1991. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of high purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Methods.* 145: 105.

20. Vadas, M. A., J. R. David, A. E. Butterworth, N. T. Pisani, and T. A. Siongok. 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: 12.

21. Prin, L., M. Capron, A. B. Tonnel, O. Bletry, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils. I. Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72: 336.

22. Sher, R., and A. A. Wadee. 1981. Eosinophil degranulation: monitoring by interference contrast microscopy. *Inflammation*. 5: 37.

23. Jahnsen, F. L., G. Haraldsen, J. Rugtveit, T. S. Halstensen, and P. Brandtzaeg. 1994.

152

Differential interference contrast microscopy: combined with immunofluorescence: a new method to phenotype eosinophils in situ. J. Immunol. Methods. 173: 77.

24. Wang, B., A. Rieger, O. Kilgus, K. Ochiai, D. Maurer, D. Födinger, J. P. Kinet, and G. Stingl. 1992. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FccRI. J. Exp. Med. 175: 1353.

25. Delespesse, G., M. Sarfati, and H. Hofstetter. 1989. Human IgE-binding factors. *Immunol. Today.* 10: 159.

26. Mossalayi, M., J. C. Lecron, A. Dalloul, M. Sarfati, J. M. Bertho, H. Hofstetter, G. Delespesse, and P. Debré. 1990. Soluble CD23 (FceRII) and interleukin 1 synergistically induce early human thymocyte maturation. *J. Exp. Med.* 171: 959.

27. Liu, Y. J., J. Cairns, M. Holder, S. Abbot, K. Jansen, J. Y. Bonnefoy, J. Gordon, and I. MacLennan. 1991. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1  $\alpha$  promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21: 1107.

28. Mossalayi, M., M. Arock, G. Delespesse, H. Hofstetter, B. Bettler, A. H. Dalloul, E. Kilchherr, F. Quaaz, P. Debré, and M. Sarfati. 1992. Cytokine effects of CD23 are mediated by an epitope distinct from the IgE binding site. *EMBO*. J. 11: 4323.

29. Aldebert, D., L. Prin, J. P. Dessaint, D. De Groote, A. Capron, and M. Capron. 1994. Elevation of soluble CD23 in serum from patients with blood eosinophilia. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 103: 245.

30. Rothenburg, M. E., and W. F. Owen. 1989. Cytokine regulate eosinophil production and differentiation. *Allergy Today* 3: 8.

31. Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A. E. Butterworth, R. J. Pierce, M. A. Ouaissi, and A. Capron. 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132: 462.

32.Kikutani H, A. Yokata, N. Uchibayashi, K. Yukawa, T. Tanaka, K. Sugiyama, E.L. Barsumian, M. Suemura and T. Kischimoto. 1989. Structure and function of FceReceptorII (FceRII/CD23) : a point of contact between the effector phase of allergy and B cell differentiation. *In Ciba Foundation Symposium*, 147, 23-35.

33. Tournoys, A., Capron, M., Papin, J.P., Kusnierz, J.P. & Capron, A. Présence et rôle fonctionnel d'un épitope du second récepteur pour l'IgE (FceRII) sur les mastocytes et les basophiles de rat. *C. R. Acad*. *Sci*, 1990, 310 : 139-146.

### FIGURE LEGENDS

### Figure 1

Eosinophilic differentiation of human cord blood mononuclear cells. Human cord blood mononuclear cells were cultured for 6 weeks with rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5. Eosinophilic lineage committed cells were confirmed as cyanide-resistant EPO positively stained cells. Numbers of eosinophilic lineage committed cells (closed circles) were calculated on viable total cell numbers (open circles) and % EPO positively stained cell numbers estimated on at least 200 cells of cytocentrifuged preparations. Data shown represent mean  $\pm$  SD (n=5).

### Figure 2

Detection of FcERI and FcERII/CD23 on human cord blood derived eosinophils by immunocytochemistry at 3 weeks of culture. Cytocentrifuged preparations were stained in brown colour with cyanide-resistant EPO staining solution followed by immunostaining using (a) anti-FcERI  $\alpha$ -chain mAb, 15.1, (b) IgG isotype control, anti-Toxoplasma P30 mAb (c) anti-FcERII/CD23 mAb, 135.1 or (d) IgG isotype control, anti-Toxoplasma P30 mAb, developed in red colour using the New Fuchsin substrate, (arrow head). Double immunostaining against FcERI and FcERII/CD23 with (e) combination of anti-FcERI  $\alpha$ -chain mAb, 15.1 developed in blue-green colour with NBT/Xphosphate and anti-FcERII/CD23 polyclonal Ab, Rb55 developed in red colour using as substrate, New Fuchsin (arrow head), or (f) combination of anti-Toxoplasma P30 mAb and normal rabbit serum, as a negative control.

#### Figure 3

Kinetic Expression of FceRl and FceRII/CD23 on eosinophilic lineage committed cells derived from human cord blood mononuclear cells with addition of rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5. Percent FceRI (open circles) or FceRII/CD23 (closed circles) positively stained cells were determined on at least 200 EPO positively stained, eosinophilic lineage committed cells.Data shown represent mean $\pm$ SD (n=4).

Effect of sCD23 on the expression of Fc $\epsilon$ RI on human cord blood derived eosinophils. After 4 weeks of culture with rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5, cells were incubated for another week with increasing concentrations of sCD23. Percent Fc $\epsilon$ RI positive eosinophilic cell numbers were estimated on at least 200 EPO positively stained, eosinophilic lineage committed cells. Data shown represent mean  $\pm$  SD (n=4). \*p<0.01.

### Figure 5

Regulatory effect of cytokines on the expression of FcERI and FcERII/CD23 on human cord blood derived eosinophils. Cells were incubated for another week with several cytokines after 4 weeks of culture with rhIL-3, rhGM-CSF and rhIL-5. Percent FcERI (a) or FcERII/CD23 (b) positive eosinophilic lineage committed cell numbers were estimated on at least 200 EPO positively stained, eosinophilic lineage committed cells. Data shown represent mean  $\pm$  SD (n=4). \* p<0.01, \*\* p<0.05.

### Figure 6

Expression of Fc $\epsilon$ RI and Fc $\epsilon$ RII/CD23 on normal donor eosinophils, and normodense and hypodense subpopulations of eosinophils from HES patients. Normal donor eosinophils, normodense eosinophils and hypodense eosinophils from HES patients were immunostained with anti-Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ -chain mAB, 15.1 (a, d and g, respectively), anti-Fc $\epsilon$ RII/CD23 mAb, 135.1 (b, e and h, respectively) or anti-Toxoplasma mAb, P30 (c, f and i, respectively) as a negative control, and developed with New Fuchsin as substrate (arrow head).

### Figure 7

In vivo expression of FceRI and FceRII/CD23 on normal donor eosinophils, and normodense and hypodense eosinophils from HES patients. Percent FceRI (closed bars) and FceRII/CD23 (striped bars) positive eosinophil numbers were estimated on at least 200 cells. Data shown represent mean  $\pm$  SD (n=5). \* p<0.005, \*\* p<0.001.





Weeks

159





ł



### Résultats complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons aussi mis en évidence l'expression du FceRI et du FceRII par les éosinophiles périphériques de patients atteints de pemphigoïde bulleuse (Figure 27 ; ci dessous ).

### Discussion

L'ensemble de ces résultats confirme notre hypothèse de départ, postulant que le FcɛRI soit plutôt lié à un état de différenciation précoce cependant que l'expression du FcɛRII dépende de l'état d'activation de la cellule. Ces résultats sont en accord avec la faible affinité de la liaison de l'IgE que nous avons précédemment détectée (Capron *et al.*, 1984) car les éosinophiles utilisés étaient hypodenses.

Ils apportent également de nouvelles informations sur l'hétérogénéité des éosinophiles humains : la population <u>normodense</u> correspondrait plutôt à des éosinophiles jeunes cependant que les éosinophiles <u>hypodenses</u> correspondraient au phénotype activé.

L'étude de l'effet des cytokines sur l'expression des 2 récepteurs confirme cette hypothèse : toutes les cytokines testées inhibent l'expression du FceRI cependant que les cytokines IL-4, IL-5, l'IFN $\gamma$  aussi bien que le CD23 soluble augmentent l'expression du FceRII. Les 2 récepteurs ne sont que faiblement ou transitoirement coexprimés sur les mêmes cellules. De plus le CD23 soluble inhibe l'expression du FceRI, ce qui nous permet de spéculer que le FceRII/CD23 aurait un effet régulateur négatif sur l'expression du FceRI. Le mécanisme précis de cet effet reste à explorer. Néanmoins, les résultats obtenus sur d'autres populations cellulaires comme les basophiles humains(Kikutani *et al.*, 1989) les celllules RBL-2H3 (Tournoys *et al.*, 1990) et plus récemment les plaquettes (Cf Résultat II) plaident en faveur de cette hypothèse et d'un mécanisme plus général.

Ces résultats, outre leur intérêt fondamental dans la compréhension de la fonction des récepteurs IgE, pourraient avoir des implications thérapeuthiques dans le cadre du traitement des maladies allergiques.

# Chapitre III: Discussion générale et perspectives

### Discussion générale et perspectives

L'étude de la fonction des éosinophiles et des plaquettes dans e la défense antiparasitaire a permis de mettre en évidence l'intervention de nouveaux récepteurs membranaires dans ces mécanismes, en particulier les récepteurs Fcɛ. Ces résultats ont élargi l'étendue des connaissances de la pathologie allergique en particulier, et ont conféré à des populations cellulaires jusque là méconnues, des fonctions effectrices bien précises. Cependant, la caractérisation des récepteurs pour l'IgE à la surface de ces cellules soulève encore de nombreuses questions :

### 1) Le rôle fonctionnel des récepteurs pour l'IgE exprimés par les cellules proinflammatoires

Notre travail s'est inscrit dans le contexte plus vaste de l'étude des fonctions de l'IgE au cours des infections parasitaires. Ainsi, au cours de la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence l'expression par les éosinophiles et les plaquettes du récepteur de forte affinité pour l'IgE ou FceRI et son implication dans les mécanismes de cytotoxicité parasitaire. Ceci, sous réserve de confirmation *in vivo*, étend l'hypothèse déjà avancée par J.P. Dessaint et André Capron, que non seulement l'IgE et son récepteur de faible affinité mais également son récepteur de forte affinité ont probablement été planifiés pour lutter contre les agressions parasitaires plutôt que pour induire des manifestations allergiques néfastes (Capron et Dessaint, 1990).

Ces résultats, associés à ceux récemment publiés sur les cellules de Langerhans et les monocytes par le groupe de G. Stingl, ébranlent encore un peu plus le dogme de l'expression restreinte du Fc $\epsilon$ RI par les mastocytes et les basophiles, et de sa fonction unique dans les réactions d'<u>hypersensibilité immédiate</u>.

Plus récemment encore, le Fc $\epsilon$ RI vient d'être incriminé dans la fonction de <u>présentation</u> <u>d'allergènes</u> par les monocytes, laissant suspecter un rôle beaucoup plus précoce au cours de la réponse immunitaire, qui pourrait peut-être s'étendre aux cellules de Langerhans et aux éosinophiles, dont la fonction de cellule présentatrice d'antigènes est connue (Maurer *et al*, 1995).

Enfin l'expression très précoce du FceRI au cours de la <u>différenciation</u> n'est certainement pas fortuite et mérite d'être explorée. Aussi bien dans le cas des éosinophiles (modèle de différenciation in vitro) ou des plaquettes (lignée megacaryocytaire) le FceRI est exprimé très précocement et son expression diminue en fonction de la maturation ou de l'activation. Ces résultats ont permis de plus une meilleure caractérisation de l'hétérogénéité des éosinophile, le FceRI étant plutot un marqueur d'éosinophiles normodenses et le FceRII un marqueur d'éosinophile hypodenses, cela auniveau sanguin. Ces résultats méritent d'être etendus aux éosinophiles tissulaires ainsi qu'aux autres critères d'hétérogénéité récemment identifiés (comme la synthèse des cytokines de type 1 ou 2) (Lamkhioued *et al.*, soumis pour publication).

### 2) La régulation de l'expression du FcERI

Aussi bien sur les éosinophiles que sur les plaquettes, et même chez les donneurs sains, nos résultats révèlent une très grande hétérogénéité dans l'expression du Fc $\epsilon$ RI, détectée par cytofluorométrie (de 5 à 60%). Ceci représente une différence majeure avec l'expression constitutive du Fc $\epsilon$ RI par les mastocytes ou les basophiles, qui concerne régulièrement plus de 90% des cellules. Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation, qui restent à déterminer, notamment dans leur composante moléculaire.

Une première explication peut être d'ordre technologique les résultats d'immunomarquage sur préparations cytocentrifugées révélant un nombre plus élevé de cellules positives. On peut donc comme celà a été suggéré récemment, penser que un premier niveau de régulation toucherait le mécanisme de transport à la membrane, le FceRI ayant été caractérisé dans les granules (Bjerke., communication personnelle)

Le rôle de facteurs de régulation <u>exogènes</u> comme les <u>cytokines</u> est également à envisager. Dans le modèle de différenciation des éosinophiles à partir du sang de cordon ombilical, nous avons pu en effet démontrer un effet inhibiteur des cytokines (IL-4, IL-5, IFN $\gamma$ ) ainsi que du CD23 soluble sur l'expression protéique du FceRI. Il reste donc à approfondir cette étude grâce aux techniques moléculaires. Une voix intéressante s'annonce : L'effet des **cytokines** et du CD23s sur les étapes de transcription et/ ou de traduction des protéines composant le récepteur FceRI. Le modèle de différenciation des éosinophiles à partir du sang de cordon ombilical et la lignée mégacaryocytaire offrent des excellents outils pour réaliser cette étude.

## 3) <u>L'homologie moléculaire entre le récepteur FceRII exprimé par les éosinophiles et les</u> plaquettes et le FceRII/CD23 des lymphocytes <u>B</u>

Grâce aux techniques moléculaires (Clonage, séquencage, et RT-PCR) nous avons confirmé l'identité moléculaire entre le FceRII des éosinophiles et le CD23 des lymphocytes. A noter que nous avons pu mettre en évidence, en plus des ARNm classiques codant pour les isoformes a et b, d'autres ARNm tronqués dépourvus de domaine transmembranaire. Plusieurs récepteurs de surface membranaire comme les récepteurs d'hormone de croissance (Baumbach *et al.*, 1989) le récepteur de l'IL-4 (Mosley *et al.*, 1989) ou encore le récepteur du FGF(Werner *et al.*, 1992) présentent une forme soluble issue d'un épissage alternatif. La structure protéique de ces formes solubles montrent un peptide signal en 5', une région N terminale extracellulaire et une région C terminale intracellulaire. En effet, l'introduction d'un codon stop en amont de la région codante pour la partie transmembranaire n'affecte pas la région extracellulaire et préserve la séquence signal essentielle pour l'expression. Dans le cas des protéines de type II, l'introduction d'un codon stop en amont de la région codante pour la partie transmembranaire, aboutit à la délétion de la partie extracellulaire (composant la forme soluble). Dans le cas du CD23 bien que cette protéine appartient à la famille des récepteurs de type II, la délétion de l'exon 3 conserve le segment extracellulaire. Ainsi, il est plausible que ces formes tronquées génèrent la forme soluble du CD23. Toutefois dans un système de transfection transitoire (cellules COS), les formes solubles provenant de ces deux messagers n'ont pas été mises en évidence ni au niveau intracellulaire ni dans les surnageants (Matsui et al., 1993). En conséquence, le segment transmembranaire, qui a aussi une fonction de séquence signal, s'avère crucial pour l'expression de la protéine CD23, précisement au niveau du transit intracellulaire. Il est possible aussi que ces ARNm tronqués aient un rôle régulateur sur l'expression de l'ARNm du CD23 par un mécanisme à disséquer. Deux hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ce rôle régulateur : d'une part la délétion de l'exon 3 de l'ARNm du CD23 aboutit à une forme instable diminuant ainsi l'expression de la protéine CD23 ; d'autre part, il est envisageable que la stabilité de l'ARNm du CD23 soit corrélée négativement avec celles des ARNm tronqués par un mécanisme de compétition au niveau de la machinerie de dégradation.

### 4) Interactions existant entre ces deux récepteurs FceRI et FceRII membranaires

Au niveau des plaquettes, le crosslinking des récepteurs FccRII par les anticorps anti CD23 de même que l'addition du CD23s inhibe la mobilisation du récepteur FccRI. De manière intéressante, l'addition de CD23 recombinant soluble inhibe, de manière significative et dosedépendante, l'expression du Fc RI par les éosinophiles différenciés à partir du sang de cordon ombilical. Ces 2 arguments expérimentaux suggèrent donc un effet régulateur négatif de Fcc RII/CD23 sur l'expression de FccRI.

Des résultats similaires avaient déjà été obtenus par l'équipe de Kishimoto: le CD23 soluble (à des concentrations très élevées) inhibent la fixation d'IgE radiomarquée et la libération IgEdépendante d'histamine par les basophiles humains (Kikutani *et al*, 1989). De la même manière, un anticorps monoclonal dirigé contre le FceRII (BB10) se révèle capable d'inhiber la libération IgE dépendante (mais pas calcium ionophore dépendante) par les cellules RBL 2H3 de rat (Tournoys *et al.*, 1990).

L'ensemble de ces résultats obtenus sur différentes populations cellulaires (plaquettes, éosinophiles, basophiles humains et cellules RBL 2H3) suggère un mécanisme général, et devrait être exploré également sur les autres populations cellulaires capables d'exprimer FceRI et FceRII, c'est à dire les cellules de Langerhans et les monocytes/macrophages. Différentes hypothèses peuvent être avancées comme l'encombrement stérique ou encore un effet indirect via les signaux

intracellulaires. En effet, un nombre important de récepteurs membranaires des plaquettes mobilisent les mêmes substrats cellulaires (Zacchary et Rozengurt, 1992). De ce fait, il est concevable que la mobilisation du récepteur CD23 active les mêmes substrats cellulaires (protéines kinases) que le Fc $\epsilon$ RI. Ainsi, l'inhibition de la mobilisation du Fc $\epsilon$ RI, et par conséquent la libération des médiateurs cytotoxiques, résulterait d'un phénomène de capture de ou des substrats (protéine kinase) essentiels pour l'activation cellulaire.

Une régulation négative de différents récepteurs, incluant le FccRI des mastocytes par le Fc $\gamma$ RII a été récemment observée (Daeron et al, 1995). Elle se révèle liée à la présence d'une séquence particulière (ITIM ; Intracellular Tail Inhibition Motif) dans le domaine intracellulaire de Fc $\gamma$ RII (Daeron., communication personnelle). Nos résultats obtenus avec le CD23 soluble suggèrent bien évidemment l'existence d'un récepteur pour le CD23 soluble à la surface des populations cellulaires considérées. Ce récepteur, qui reste à identifier pourrait posséder une telle séquence, induisant ainsi une régulation négative de l'expression d'autres récepteurs, incluant le FccRI.

Enfin l'étude des interactions entre les 2 récepteurs Fce doit être complété par la compréhension de l'intervention de la molécule galectine-3 (autrefois appelée Mac2- $\epsilon$ BP) exprimée par les éosinophiles et participant également à ses fonctions effectrices.

L'étude des signaux intracellulaires délivrés par chacune de ces 3 molécules capables de fixer l'IgE, devrait aboutir à une meilleure compréhension de leurs interactions.

En conséquence ce travail pose plusieurs grandes questions qui doivent être élucidées dans un proche avenir :

- -L'intervention des récepteurs IgE au cours des différentes phases de la réponse immunitaire de la présentation d'antigène à la libération des médiateurs pharmacologiques
- -L'étude des mécanismes de régulation de l'expression du récepteur FceRI par les éosinophiles et les plaquettes *in vivo*.
- -La détermination du rôle des ARNm tronqués du CD23/FcERII sur son expression au niveau de l'éosinophile.
- -L'étude des mécanismes de libération des médiateurs immédiats et tardifs suite à la mobilisation des récepteurs FceRI et FceRII à la surface des éosinophiles et des plaquettes. Cette étude nécessitera une approche biochimique des signaux de transduction impliqués.
- -Enfin, il sera intéressant de caractériser les cytokines synthétisées à la suite de la mobilisation des récepteurs Fcε par les éosinophiles et les plaquettes. En particulier dans le contexte de la libération différentielle de cytokines de type 1 et 2

En conclusion, notre travail tout en aboutissant à la caractérisation moléculaire des récepteurs  $Fc_{\varepsilon}RI$  et  $Fc_{\varepsilon}RII$  sur les éosinophiles et les plaquettes et même s'il soulève de nombreuses questions encore sans réponse, permet de souligner le rôle important joué par les cellules proinflammatoires dans la réponse immunitaire.

### Références

- Abu-Ghazaleh R., Fujisawa T., Mestecky J., Kyle R., Gleich G. IgA induced eosinophil degranulation. J. Immunol., 1989, 142, 2393.
- Ackerman S., Corrette S., Rosenberg H., Bennett J., Mastrianni D., Nicholson-Weller A., Weller P., Chin D., Tenen D. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). J. Immunol., 1993, 150, 456.
- Adamczewski M., Numerof R. P., Koretzky A., Kinet J.P. Regulation by CD45 of the tyrosine phosphorylation of high affinity IgE receptor beta- and gamma-chains. J. Immunol., 1995, 154, 3047.
- Aldebert D., Prin L., Dessaint J.P., De Groote D., Capron A., Capron M. Elevation of soluble CD23 in serum from patients with blood eosinophilia. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1994, 103, 245.
- Aliakbari J., Sredharan S.P., Turck C. W., Goetzl E.J. Selective localisation of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biophys. Res. Commun.*, 1987, 148, 1440.
- Apgar J.R. Regulation of the antigen induced F-actin response in rat basophilic leukemia cells by protein kinase C. J. Cell Biol., 1991, **112**, 1157.
- Archer G. T. and Blackwood A. Formation of charcot-leyden crystals in human eosinophils and basophils and study of the composition of isolated crystals. J. Exp. Med., 1965, 122, 173.
- Archer G.T. and Hirsch J.G. Isolation of granules eosinophil leucocytes and study of their enzymes content. J. Exp. Med., 1963, 118, 277.
- Armitage R., Goff L., Beverley P. Expression and functional role of CD23 on T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19**, 31.
- Aubry J.P., Pochon S., Graber P., Jansen K., Bonnefoy J.Y. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature*, 1992, **358**, 505.
- Bacon K., Gauchat J.F., Aubry J.P., Pochon S., Graber P., Henchoz S., Bonnefoy J.Y. CD21 expressed on basophilic cells is involved in histamine release triggered by CD23 and anti-CD21 antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 2721.
- Bansal A., Roberts T., Hay E., Kay R., Pumphrey S., Wilson P. Soluble CD23 levels are elevated in the serum of patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, **89**, 452.
- Barker J. N. W. N., Alegre V. A., MacDonald D. M. Surface-bound immunoglobulin E on antigen-presenting cells in cutaneous tissue of atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol., 1988, 90, 117.
- Barnes P. J., Chung K. F., Page C. P. Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol., 1988, **81**, 919.
- Bass D. A., Grover W. H., Lewis J. C., Szejda P., DeChtelet L. R., McCall C. E. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. J. Clin. Invest., 1980, 66, 1265.
- Basten A, Beeson P.B. Mechasnism of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. J. Exp. Med.,

1970, 131, 1288.

- Basu M., Hakimi J., Dharm E., Kondas J. A., Tsien W-H., Pilson R. S., Lin P., Gilfillan A., Haring P., Braswell E. H., Nettleton M. Y., Kochan J. P. Purification and characterization of human recombinant IgE-Fc fragments that bind to the human high affinity IgE receptor. J. Biol. Chem., 1993, 268, 13118.
- Baumbach W. R., Horner L.H., Logan J.S. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes and development*, 1989, **3**, 1199.
- Beaven M.A., Cunha.-Melo J.R. Membrane phosphoinositide activated signals in mast cells and basophils. *Prog. Allergy.*, 1988, **42**, 123.
- Beavil A.J., Edmeades R.L., Gould H.J., Sutton B.J. Alpha-helical coiled-coil stalks in t the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) and related C-type lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1992, 89, 753.
- Belloni P. N., Tressler R.J. Microvascular endothelial cell heterogeneity : Interactions with leukocytes and tumor cells. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1990, **8**, 353.
- Benoist C., Mathis D. Regulation of major histocompatibility complex class-II genes : X, Y and other letters of the alphabet. Annu. Rev. Immunol., 1990, 8, 681.
- Berton. M.T., Uhr. J.W., Vitetta E.S. Synthesis of germ line gamma1 immunoglobulin heavy chain transcripts in resting cells: Induction by interleukin 4 and inhibition by interferon. *Proc.Natl. Aca.Sci.USA*, 1988, **86**, 2829.
- Bettler B., Maier R., Ruegg D., Hofstetter H. Binding site for IgE of the human low affinity Fc epsilon receptor (Fc epsilon RII/CD23) is confined to the domain homologous with lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, **26**, 1105.
- Bieber T., Dannenberg B., Prinz J. C., Rieber E. P., Stolz W., Braun-Falco O., Ring J. Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema : A study of the time course of the lesions with regard to the IgE serum level. J. Invest. Dermatol., 1989(b), 93, 215.
- Bieber T., de la Salle H., Wollenberg A., Hakimi J., Chizzonite R., Ring J., Hanau D., de la Salle C. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). J exp Med., 1992, 175, 1285.
- Bieber T., Rieger A., Neuchrist C., Prinz J.C., Rieber E.P., Boltz-Nitulescu G., Scheiner O., Kraft D., Ring J., Stingl G. Induction of Fc epsilon R2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and gamma interferon. J. Exp. Med., 1989, 170, 309.
- Bjorck P., Elenstrom-Magnusson C., Rosen A., Severinson E., Paulie S. CD23 and CD21 function as adhesion molecules in homotypic aggregation of human B lymphocytes. *Eur.* J. Immunol., 1993, 23, 1771.
- Blank U., Ra C., Kinnet J.P. Characterization of truncated alfa chain products from human, rat and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. J. Biol. Chem., 1991, 266, 2639.
- Blank U., Ra C., Miller L., White K., Metzger H., Kinet J.P. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature*, 1989, **337**, 187.

Boltz-Nitulescu G., Bazin H., Spiegelberg H.L. Specificity of Fc receptors for IgG2a,

IgG1/IgG2b, and IgE on rat macrophages. J. Exp. Med., 1981, 154, 374.

- Bonnefoy J.Y., Guillot O., Spits H., Blanchard D., Ishizaka K., Banchereau J. The low-affinity receptor for IgE (CD23) on B lymphocytes is spatially associated with HLA-DR antigens. J. Exp. Med., 1988, 167, 57.
- Bonnefoy J.Y., Henchoz S., Hardie D., Holder M. J., Gordon J. A subset of anti-CD21 antibodies promote the rescue of germinal center B cells from apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 1993, **23**, 969.
- Boukerche H., McGregor J. L. Characterization of an anti-thrombospondin monoclonal antibody (P8) that inhibits human blood platelet functions : Normal binding of P8 to thrombinactivated Glanzmann thrombasthenic platelets. *Eur. J. Biochem.*, 1988, **171**, 383.
- Bout D., Joseph M., Pontet M., Vorng H., Deslee D., Capron A. Rat resistance to schistosomiasis : platelet-mediated cytotoxicity induced by C- reactive protein, *Science*, 1986, **231**,153.
- Boyce, J. A., Friend D., Matsumoto R., Austen K.F., Owen W. F. Differentiation *in vitro* of hybrid eosinophil/basophil granulocytes : autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J. Exp. Med.*, 1995, **182**, 49.
- Brach M. A., Sott C., Kiehntopf M., Herrmann F. Expression of the transforming growth factor-alpha gene by human eosinophils is regulated by interleukin-3, interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur. J. Immunol.*, 1994, **24**, 646.
- Braun R., Franchini M., Erard F., Rihs S., De Vries I., Hansel T., Walker C. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 956.
- Breton-Gorius J., Guichard J. Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelet and megakaryocytes. Am. J. Pathol., 1972, 66, 277.
- Bruno E., Miller M. E., Hoffman R. Interacting cytokines regulate in vitro human megakaryocytopoiesis. Blood, 1989, 73, 671.
- Bruynzeel-Koomen C., Van der Donk E., Bruynzeel P., Capron M., De Gast G., Mudde G. Associated expression of T6 antigens and Fc-receptors for IgE on epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, **74**, 137.
- Burd. P. R., Rogers. H.W., Gordon. J.R. Interleukin 3-dependent and independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. J. Exp. Med., 1989, 170, 245.
- Butterworth A. E. Cell-mediated damage to helminths. Adv. Parasitol., 1984, 23, 143.
- Butterworth A. E., Sturrock R. F., Houba V., Rees P. M. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 1975, **256**, 727.
- Capron A., Dessaint J.P. Présent et future de l'allergie. Med. Sci., 1990, 10, 958.
- Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to S. mansoni schistosomules. Nature, 1975, 253, 474.
- Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Joseph M., Ameisen J.C., Tonnel A.B. From parasites to allergy : the second receptor for IgE (Fc epsilon R2). *Immunol. Today*, 1986, 7, 15.
- Capron M., Capron A., Dessaint J.P., Torpier G., Johansson G., Prin L. Fc receptors for IgE

on human and rat eosinophils. J. Immunol., 1981, 126, 2087.

- Capron M., Capron A., Joseph M., Verwaerde C. IgE receptors on phagocytic cells and immune response to schistosome infection. *Monogr Allergy*, 1983, **18**, 33.
- Capron M., Jouault T., Prin L., Joseph M., Ameisen J.C., Butterworth A.E., Papin J.P., Kusnierz J.P., Capron A. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor ( Fc epsilon RII) of eosinophils, platelets and macrophages. J. exp. Med., 1986, 164, 72.
- Capron M., Kazatchkine M. D., Fisher E., Joseph M., Butterworth A. E., Kusnierz J.P., Prin L., Papin J. P., Capron A. Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. J. Immunol., 1987, 139, 2059.
- Capron M., Plumas J. Eosinophil membrane receptors. In "Eosinophils : biological and clinical aspects" (Makino S. and Fukuda T. eds.). CRC Press, Boca Raton, FL., 1993, Chap. 5.
- Capron M., Spiegelberg H., Prin L., Bennich H., Butterworth A., Pierce R., Ouaissi A., Capron A. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. Immunol., 1984, 132, 462.
- Capron M., Spiegelberg H., Prin L., Bennich H., Butterworth A., Pierce R., Ouaissi A., Capron A. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. Immunol., 1989(a), 47, 128.
- Capron M., Tomassini M., Torpier G., Kusnierz J.P., McDonald S., Capron A. Selectivity of mediators released by eosinophils. Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1989(b), 88, 54.
- Capron M., Tomassini M., Van Der Vorst E., Kusnierz J.P., Papin J.P., Capron A. Existence et fonctions d'un récepteur pour l'immunoglobuline A sur les éosinophiles humains. Cr. Acad. Sc. / Immunol., 1988, 307, 397.
- Capron, M., Joseph M. The low affinity receptor for IgE on eosinophils and platelets. In "Monographs in Allergy", 1991, 29, 63.
- Carini C., Margolick J., Yodoi J., Ishizaka K. Formation of IgE-binding factors by lymphocytes of HIV-infected patients. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1988(a), **88**, 116.
- Carini C., Margolick J., Yodoi J., Ishizaka K. Formation of IgE-binding factors by T cells of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. acad. Sci. USA, 1988(b), 85, 9214.
- Carlson M., Peterson C., Venge P. Human eosinophil peroxidase : purification and characterization. J. Immunol., 1985, 134, 1875.
- Chen S. S., Bohn J. W., Liu F. T., Katz D. H. Murine lymphocytes expressing Fc receptors for IgE (FcR epsilon). I. Conditions for inducing FcR epsilon<sup>+</sup> lymphocytes and inhibition of the inductive events by suppressive factor of allergy (SFA). J. Immunol., 1981, **127**, 166.
- Cichowski K., McCormick F., Brugge J.S. p21<sup>ras</sup> GAP association with fyn, lyn and yes in thrombin-activated platelets. J. Biol. Chem., 1992, 267, 5025.
- Clark. E.A., Shatill. S.J., Brugge J.S. Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *TIBS*, 1994, **19**, 464.

- Clutterbuck E., Hirst E., Sanderson C. 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.*, 1989, 73, 1504.
- Coffman R. L., Ohara J., Bond M.W., Carty J., Zlotnik A., Paul W. E. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J. Immunol., 1986(a), **136**, 4538.
- Coffman R.L., Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon gamma. *J.Immunol.*, 1986(b), **136**, 949.
- Conrad D. H. Fc epsilon RII/CD23 : The low affinity receptor for IgE. Annu. Rev. Immunol., 1990, 8, 623.
- Conrad D.H., Peterson L.H. The murine lymphocyte receptor for IgE. I. Isolation and characterization of the murine B cell Fc epsilon receptor and comparison with Fc epsilon receptors from rat and human. J. Immunol., 1984, 132, 796.
- Conrad D.H., Wingard J.R., Ishizaka T. The interaction of human and rodent IgE with the human basophil IgE receptor. J. Immunol., 1983, 130, 327.
- Conway B., Baskar P., Bechtel L.J., Kaplan J.C., Hirsh M.S., Schooley R.T., Pincus S.H. Eosinophils as host cells for HIV-1. Arch. Virol., 1992, 127, 373.
- Czech W., Krutman J., Budnik A., Schöpf E., Kapp A. Induction of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cutokines. J. Invest. Dermatol., 1993, 100, 417.
- Da'ron M., Malbec O., Latour S., Arock M., Fridman W.H. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptor. J. Clin. Invest., 1995, 95, 577.
- Daëron M., Ishizaka K. Induction of Fc epsilon receptors on mouse macrophages and lymphocytes by homologous IgE. J. Immunol., 1986, 136, 1612.
- Damonneville M., Wietzerbin J., Pancré M., Joseph M., Capron A., Auriault C. Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to Schistosoma mansoni larvae. J. Immunol., 1988, 140, 3962.
- Deanin G.G., Martinez A.M., Pfeiffer J.R., Gardner M.E., Oliver J.M.. Tyrosine kinasedependent phosphatidylinostiol turnover and functional responses in the Fc epsilon RI signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **179**, 551.
- Defrance T., Aubry J.P., Rousset F., Vanbervliet B., Bonnefoy J.Y., Arai N., Takebe T., Lee F., Arai K., De Vries J., Banchereau J. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal B lymphocytes. J. Exp. Med., 1987, 165, 1459.
- Delespesse G., Sarfati M., Hofstetter H. Human IgE-binding factors. Immunol. Today, 1989, 10, 159.
- Delespesse G., Suter U., Mossalayi D., Bettler B., Sarfati M., Hofstetter H., Debré P., Dalloul A. Expression, structure and function of the CD23 antigen. *Adv.Immunol.*, 1991, **19**, 149.
- Del Poso V., De Andres B., Martin E., Maruri N., Zubeldia J.M., Palmino P., Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1 : alpha IL-1 mRNA detection by in situ hybridation. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. J. Immunol., 1990, 144, 3117.

- Denory M.C., Yodoi Y., Banchereau J. Interleukin 4 and interferon alfa and gama regulate Fc epsilon R2/CD23mRNA expression on normal human B cells. *Mol. Immunol.*, 1990, 27, 129.
- Desreumaux P., Janin A., Colombel J.F., Prin L., Plumas J., Emilie D., Torpier G., Capron A., Capron M. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. J.Exp.Med., 1992, 175, 293.
- Desreumaux P., Janin A., Dubucquoi S., Copin M.C., Torpier G., Capron A., Capron M., Prin L. Synthesis of interleukin-5 by activated eosinophils in patients with eosinophilic heart diseases. *Blood*, 1993, 82, 1553.
- Dierks S. E., Bartlett W. C., Edmeades R. L., Gould H. J., Rao M., Conrad D. H. The oligomeric nature of the murine Fc epsilon RII/CD23. Implications for function. J. Immunol., 1993, 2, 2372.
- Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. J. Biol. Chem., 1988, 263, 9557.
- Dubucquoi S., Desreumaux P., Janin A., Klein O., Goldman M., Tavernier J., Capron A., Capron M. Interleukin-5 synthesis by eosinophils : association with granules and immunoglobulin-dependant secretion. J. Exp. Med., 1994, **179**, 703-708.
- Duel T. F., Senior R. M., Huang J. S., Griffin G. L. Chemostaxis of monocytes and neutrophils to platelet derived growth factor. J. Clin. Invest., 1982, 69, 1046.
- Durack D., Ackerman S., Loegering D., Gleich G. Purification of eosinophil derived neurotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1981, 78, 5165.
- Dvorak A. M. MD. Similarities in the ultrastructural morphology and developmetal and secretory mechanisms of human basophils and eosinophils. J. Allergy Clin. Immunol., 1994, 94, 1103.
- Eiseman E., Bolen J.B. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinase. *Nature*, 1992, **355**, 78.
- Ernst L.K., Duchemin A-M., Anderson C.L. The high affinity receptor for IgG associates with the gamma subunit of the IgE receptor. *J.Immunol.*, 1993, **150**, 88A.
- Ferrel J. E., Martin . G.S. Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by plycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 1989, **86**, 2234.
- Finkelman F.D, Holmes J., Urban J.F., Paul W.E., Katona I.M. T help requirement for the generation of an *in vivo* IgE response : a late acting form of T cell help other than Il4 is required for IgE but not for IgG1 production. J. Immunol., 1989, **142**, 403.
- Finkelman F.D, Katona I.M., Urban J.F., Holmes J., Ohara. J., Tung AS., Sample J.V., Paul W.E. IL4 is required to generate and sustain *in vivo* responses. J. Immunol., 1988, 141, 2335.
- Fischer E., Capron M., Prin L., Kusnierz J.P., Kazatchine M. Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptor for cleavage fragments of C3. *Cell Immunol.*, 1986, **97**, 297.
- Flores-Romeo L., Shields J., Humbert Y., Graber P., Aubry J.P., Gauchat J.F., Ayala G., Allet B., Chavez M., Bazin H., Capron M., Bonnefoy J.Y. Inhibition of an *in vivo* antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. *Science*, 1993, **261**, 1038.

- Flores-Romo L., Cairns J., Millsum M., Gordon J. Soluble fragments of the low-affinity IgE receptor (CD23) inhibit the spontaneous migration of U937 monocytic cells : neutralization of MIF-activity by a CD23 antibody. *Immunol.*, 1989, **67**, 547.
- Fournier S., Rubio M., Delespesse G., Sarfati M. Role for low-affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukekemic B-cell proliferation. *Blood*, 1994, **84**, 1881.
- Fournier S., Trans I.D., Sutter U., Biron G., Delespesse G., Sarfati M. The *in vivo* expression of type B CD23 mRNA in B-chronic lymphocytic leukemic cells is associated with an abnormally low CD23 upregulation by IL-4 : comparison with their normal cellular counterparts. *Leukemia. Research.*, 1991, **15**, 609.
- Frick W. E., Sedgwick J. B., Busse W.W. Hypodense eosinophils in allergic rhinitis. J. Allergy Clin. Immunol., 1988, 82, 119.
- Furuichi K., Rivera J., Isersky C. The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells : effect of ligand binding on receptor expression. *Proc Natl Acad Sci* USA, 1985, 82, 1522.
- Galizzi J.P., Zuber C.E., Cabrillat H., Djossou O., Banchereau J. In ternalisation of human interleukin 4 and transient down-regulation of its receptor in the CD23-inducible Jijoye celles. J. Biol. Chem., 1989, 264, 6984.
- Galli S. J., Dvorak A. M., Ishizaka T., Nabel G., Der simonian H., Cantor H., Dvorak H. F. A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. *Nature*, 1982, **298**, 288.
- Galli S.J. New concepts about the mast cell. N. Engl. J. Med., 1993, 328, 257.
- Gearing D.P., King J.A., Gough NM., Nicola N.A. Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J.*, 1989, **8**, 3667.
- Gerard N.P., Hodges M.K., Drazen J.M., Weller P.F., Gerard C. Characterization of a receptor for C5a anaphylotoxin on human eosinophils. J. Biol. Chem., 1989, 264, 1760.
- Ghiabi M., Gallagher G.T., Wong D.TW. Eosinophils, tissue eosinophilia, and eosinophils derived Transforming Growth Factor alfa in hamster oral carcinogenesis. *Cancer-Res.*, 1992, **52**, 389.
- Gleich G., Loegering D., Maldonado J. Identification of Major Basic Protein in guinea pig eosinophil granules. J. Exp. Med., 1973, 137, 1459.
- Gleich G.J., Loegering D.A., Bell M.P., Chekel J.L., Ackerman S.J., Mckean D.J. Biochemical and functional similarities between human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationinc protein : homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1986, **83**, 3149.
- Gonzalez-Molina A., Spiegelberg H.L. Binding of IgE myeloma proteins to human cultured lymphoblastoid cells. J. Immunol., 1976, 117, 1838.
- Gordon J., Rowe M., Walker L., Guy G. Ligation of the CD23, p45 (BLAST-2, EBVCS) antigen triggers the cell-cycle progression of activated B lymphocytes. *Eur.J. Immunol.*, 1986, **16**, 1075.
- Grangette C., Gruart V., Ouaissi M.A., Rizvi F., Delespesse G., Capron A., Capron M. IgE receptor on human eosinophils (Fc epsilon RII). Comparison with B cell CD23 and

association with an adhesion molecule. J. Immunol., 1989, 143, 3580.

- Hamada A., Greene B.M. C1q enhancement of IgG-dependent eosinophil mediated killing of schiostosomula *in vitro*. J. Immunol., 1987, **138**, 1240.
- Hamawy M.M., Mergenhagen S.E, Siraganian R.P. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK by the aggregation of high affinity immunoglobulin E receptors requires cell adherence. J. Biol. Chem., 1993, 268, 6851.
- Hamid Q., Barkans J., Meng Q., Ying S., Abrams J.S., Kay A.B., Moqbel R. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin 6 *in vitro*. *Blood.*, 1992, **80**, 1496.
- Hartnell A., Kay A., Wardlaw A. IFN gamma induces expression of FC gamma RIII (CD16) on human eosinophils. J. Immunol., 1992, 148, 1471.
- Hartnell A., Moqbel R., Walsh G., Bradley B., Kay A. Fc-gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunol.*, 1990, **69**, 264.
- Helm B., Marsh P., Vercelli D., Padlan E., Gould H., Geha R. The mast cell binding site on human Immunoglobulin E. *Nature.*, 1988, **331**, 180.
- Henderson W. R., Chi E. Y., Klebanoff S.J., Eosinophil peroxidase induced mast cell secretion. J. Exp. Med., 1980, 152, 265.
- Hibbs M.L., Selvaraj P., Carpen O., Springer T.A., Küster H., Jouvin M-H., Kinet J-P. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16). *Science.*, 1989, 246, 1608.
- Hidehiko K., Yoshiaki I., Kazuhiro N., Shuichi T., Cloning of cDNAs for new subtypes of murine low-affinity Fc receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23). Int. Arch. Allergy Immunol., 1994, 105, 38.
- Hivroz C., Valle A., Brouet J. C., Banchereau J., Grillot-Courvalin C. Regulation by interleukin 2 of CD23 expression of leukemic and normal B cells : comparaison with interleukin 4. *Eur. J. Immunol.*, 1989, **19**, 1025.
- Hogarth P.M., Hibbs M.L., Bonadonna L., Scott B.M., Witfort E., Pietersz G.A., McKenzie I.F. The mouse Fc receptor for IgG (Ly-17) : molecular cloning and specificity. *Immunogenetics*, 1987, **26**, 161.
- Holowka D., Baird B. Lactoperoxidase-catalyzed iodination of the receptor for immunoglobulin E at the cytoplasmic side of the plasma membrane. J. Biol. Chem., 1984, **259**, 3720.
- Hosoda M., Makino S., Kawabe T., Maeda Y., Satoh S., Takami M., Mayumi M., Arai K., Saitoh H., Yodoi J. Differential regulation of the low affinity Fc receptor for IgE (Fc epsilon R2/CD23) and the IL-2 receptor (Tac/p55) on eosinophilic leukemia cell line (EoL-3). J. Immunol., 1989, **143**, 147.
- Hubscher T. Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. E.D.I. : an eosinophil-derived inhibitor of histamine release. J. Immunol., 1975, **114**, 1379.
- Huppi K., Mock B.A., Hilgers J., Kochan. J., Kinet J.P.Receptors for Fc epsilon and Fc gamma are linked on mouse chromosome 1. J. Immunol., 1988, 141, 2807.
- Huppi K., Siwarski D., Mock B.A., Kinet J.P. Gene mapping of the three subunits of the high affinity FcR for IgE on mouse chromosome 1 and 19. J. Immunol., 1989, 143, 3787.

- Ihle J. N., Keller J., Oroszlan S., Henderson L. E., Copeland T.D., Fitch F., Prystowsky M. B., Goldwasser E., Schr\u00e4der J. W., Palaszynski E., Dy M., Lebel B. Biological properties of homogenous interleukin-3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P-cell stimulating factor activity, colony stimulating factor activity and histamine producing cell stimulating factor activity. J. Immunol., 1983, 131, 282.
- Ikuta K., Takami M., Kim C.W., Honjo T., Miyoshi T., Taagaya Y., Kawabe T., Yodoi J. Human lymphocyte Fc receptor for IgE : Sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc. Natl. Sci. USA.*, 1987, **84**, 819.
- Irving B.A., Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 1991, **64**, 891.
- Isersky C., Rivera J., Segal D.M., Triche T.. The fate of IgE bound to rat basophilic leukemia cells. II Endocytosis of IgE oligomers and effect on receptor turnover. J. Immunol., 1983, 131, 388.
- Jabara H.H., Fu S.M., Geha R.S., Vercelli D. CD40 and IgE : synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. J. Exp. Med., 1990, 172, 1861.
- Jansen K.U., Shields J., Gordon J., Cairns J., Graber P., Bonnefoy J.Y. Expression of human recombinant CD23 in insect cells. J. Rec. Res., 1991, 11, 507.
- Jin Y.J., Clayton L.K., Howard F.D., Koyasu S., Sieh M., Steinbrich R., Tarr G.E., Reinherz E.L.: Molecular cloning of the CD3 subunit identifies a CD zeta-related product in thymus-derived cells. *Proc Natl. Acad. Sci.* USA., 1990, 87: 3319-3323.
- Johnson G. D., Hardie D. L., Ling N. R., MacLennan I. C. Human follicular dendritic cells (FDC) : A study with monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, **64**, 205.
- Jones K. A. and Tjijan R. Sp 1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus "immediate-early" gene transcription *in vitro*. *Nature*, 1985, **317**, 179.
- Jong E.C., Henderson W.R., Klebanof S.J. Bactericidal activity of eosinophil peroxidase . J. Immunol., 1980(a), **124**, 1378.
- Jong E.C., Klebanoff S.J. Eosinophil mediated mammalian tumor cell cytotoxicity : Role of the peroxidase system. J. Immunol., 1980(b), **124**, 1949.
- Jong E.C., Mahmoud A.A.F., Klebanoff S.J. Peroxidase mediated toxicity to schistosomula of *schistosoma mansoni. J. Immunol.*, 1981, **126**, 468.
- Joseph M., Auriault J.C., Capron A., Vorng H., Viens P. A new fonction for platelets : IgE dependent killing of schistosomes. *Nature.*, 1983, **303**, 810.
- Joseph M., Capron A., Ameisen J.C., Capron M., Vorng H., Pancre V., Kusnierz J.P., Auriault C. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.*, 1986, **16**, 306.
- Jouault T., Capron M., Balloul J.M., Ameisen J.C., Capron A. Quantitative and qualitative analysis of the Fc receptor for IgE (Fc epsilon RII) on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.*, 1988, **18**, 237.
- Jouvin M.H.E., Adamczewski M., Numerof R., Letourneur O., Vallé A., Kinet J.P. Differential control of the tyrosine kinases lyn and syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. J. Biol. Chem., 1994, 269, 5918.

- Justement L.B., Campbell K.S., Chien N.C., Cambier J.C. Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. *Science*, 1991, **252**, 1839.
- Kajita T., Yui Y., Mita H., Taniguchi N., Saito H., Mishima T., Shida T. Release of leucotriene C4 from human eosinophils and its relation to the cell density. Int. Archs Allergy Appl. Immunol., 1985, 78, 406.
- Kauffman H. F., Van der Belt B., De Monchy J. G. R., Boelens H., Koeter G. H., de Vries K. Leukotriene C<sub>4</sub> production by normal-density and low-density eosinophils of atopic individuals and other patients with eosinophilia. J. Allergy Clin., 1987, 79, 611.
- Kawabe T., Takami M., Hosoda M., Maeda Y., Sato S., Mayumi M., Mikawa H., Arai K., Yodoi J. Regulation of Fc epsilon R2/CD23 gene expression by cytokines and specific ligands (IgE and anti-Fc epsilon R2 monoclonal antibody). Variable regulation depending on the cell types. J. Immunol., 1988, 141, 1376.
- Keegan A.D. and Conrad D.H. The murine lymphocyte receptor for IgE. V. Biosynthesis, transport and maturation of the B cell Fc epsilon receptor. J. Immunol., 1987, **39**, 1199.
- Keegan A.D., Snapper C.M., Van Dussen R., Paul W.E., Conrad D.H. Superinduction of the murine B cell FceRII by T helper cell clones. *Immunol.*, 1989, **142**, 3868.
- Kehry M.R., Hudak S.A. Characterization of B-cell populations bearing Fc epsilon receptor II. *Cell. Immunol.*, 1989, **118**, 504.
- Khalife J., Capron M., Cesbron J. Y., Tai P. C., Taelman H., Prin L., Capron A. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. J. Immunol., 1986, 137, 1659.
- Khalife J., Capron M., Grzych J.M., Bazin H., Capron A. Extracellular release of rat eosinophil peroxidase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J Immunol.*, 1985, **134**, 1986.
- Kikuchi Y., Migita M., Takaki S., Tominaga A., Takatsu K. Biochemical and functional characterisation of soluble form of IL5 receptor alpha (sIL5R alpha). Development of ELISA system of detection of sIL5R alpha. J. Immunol. Meth., 1994, 167, 289.
- Kikutani H., Suemura M., Owaki H., Nakamura H., Sato R., Yamassaki K., Barsumian E., Hardy R.R. Kishimoto T. Fc epsilon receptor, a specific differenciation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. J. Exp. Med., 1986, **164**, 1455.
- Kikutani H., Yokata A., Uchibayashi N., Yukawa K., Tanaka T., Sugiyama K., Barsumian E.L., Suemura M., Kischimoto T. Structure and function of Fc epsilon ReceptorII (Fc epsilon RII/CD23) : a point of contact between the effector phase of allergy and B cell differentiation. In Ciba Foundation Symposium, 1989, 147, 23.
- Kimani G., Tonnesen M. G., Henseon P. M. Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells *in vitro* by platelet-activating factor. J. Immunol., 1988, **140**, 3161.
- Kimata H., saxon A. Subset of natural killer cells is induced by immune complexes to display Fc receptors for IgE and IgA and demonstrates isotype regulatory function. J. Clin. Invest., 1988, 82, 160.
- Kinet J.P., Alcaraz G., Leonard A., Wank S., Metzger H. Dissociation of the receptor for immunoglobulin E in mild detergents. *Biochem.*, 1985(b), 24, 4117.
- Kinet J.P., Blank U., Ra C., White K., Metzger H., Kochan J. Isolation and characterisation of cDNAs coding for the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1988, 85, 6483.
- Kinet J.P., Metzger H., Hakimi J., Kochan J. A cDNA presumptively coding for the alpha subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Biochem.*, 1987, 26, 4605.
- Kinet J.P., Quarto R., Perez-Monfort R., Metzger H. Noncovalently and covalently bound lipid on the receptor for immunoglobulin E. *Biochem.*, 1985(a), **24**, 7342.
- Kintner C., Sugden B. Identification of antigenic determinants unique to the surfaces of cells transformed by Epstein-Barr Virus. *Nature*, 1981, **294**, 458.
- Kita H, Ohnishi T., Okubo Y., Weiler D., Abrams J., Gleich G. Granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. J. Exp. Med., 1991, **174**, 745.
- Kitamura T., Sato N., Arai K., Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta-subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell*, 1991, **66**, 1165.
- Klausner R.D. Sorting and traffic in the central vacuolar system. Cell., 1989, 57, 703.
- Koretzky G.A., Picus J., Thomas M.L., Weiss A. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature*, 1990, 346, 66.
- Kulumberg P.A., Huber N.E., Scheer B.J., Wram M., Baumruker T. Immunoglobulin E plus antigen challenge induces a novel intecrine/ chemokine in mouse mast cells. J. Exp. Med., 1992, 176, 1773.
- Kuster H., Thompson H., Kinet J.P. Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor gama subunit. Definition of a new gene family. J. Biol. Chem., 1990, 265, 6448.
- Kuster H., Zhang L., Brini A.T., Mac Glashan D.W.J., Kinet J.P. The gene and cDNA fot the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 12782.
- Kyanaung U., Haskard D., Poston R., Thornhill M., Lee T. 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.*, 1991, **146**, 521.
- Lamkhioued B., Soussi Gounni A., Goldman M., Prin L., Capron A., Capron M. : Distinct Eosinophil populations express Th1 or Th2 cytokines. *Science.*, Soumis.
- Le Coniat M., Kinet J.P., Berger R. The human genes for the alpha and gamma subunits of the mast cell receptor for immunoglobulin E are located on human chromosome band 1q23. *Immunogenetics*, 1990, **32**, 183.
- Lebrun P., Sidman C.L., Spiegelberg H.L. IgE formation and Fc receptor-positive lymphocytes in normal, immuno-deficient, and auto-immune mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis. J. Immunol.*, 1988, **141**, 249.
- Lee C., Yoon S., Pyun K. Interleukin-4 signal regulating CD23 gene expression in human B cells : protein kinase C independent signaling pathways. *Cell. Immunol.*, 1993, **146**, 171.

- Lee T.C., Lenihan D.J., Malone B., Roddy L.L., Wasserman S.L. Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. J. Biol. Chem., 1984, 259, 5526.
- Letellier M., Nakajima T., Delespesse G. IgE receptor on human lymphocytes. IV Further analysis of its structure and of the role of N-linked carbohydrates. J. Immunol., 1988, 141, 2374.
- Letellier M., Nakajima T., Pulido-Cejudo G., Hofstetter H., Delespesse G. Mechanism of formation of human IgE-binding factors (soluble CD23) : III. Evidence for a receptor (Fc epsilon RII)-associated proteolytic activity. J. Exp. Med., 1990, **172**, 693.
- Letellier M., Sarfati M., Delespesse G. Mechanisms of formation of IgE-binding factors (soluble CD23). I Fc epsilon RII bearing B cells generate IgE binding factors of different molecular weights. *Mol. Immunol.*, 1989, 26, 1105.
- Lewis V.A., Koch T., Plutner H., Mellman I. A complementary DNA clone for a macrophagelymphocyte Fc receptor. *Nature*, 1986, **324**, 372.
- Li W., Hu P., Skolnik E.Y., Ullrich A., Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, **12**, 5824.
- Liu Y.J., Cairns J., Holder M., Abbot S., Jansen K., Bonnefoy J.Y., Gordon J., MacLennan I. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells : evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 1991, **21**, 1107.
- Lopez A., Eglinton M., Gillis D., ParkL., Vadas M. Reciprocal inhibition of binding between interleukin 3 and granulocyte macrophage colony stimulating factor to human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 1989, 86, 7022.
- Lucey D., Dorsky D., Nicholson-Weller A., Weller P. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120. J. Exp. Med., 1989, 169, 327.
- Lucey D., Nicholson-Weller A., Weller P. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1989, 86, 1348.
- Mallamaci M. A., Chizzonite R., Griffin M., Nettleton M., Hakimi J., Tsien W-H., Kochan J.
  P. Identification of sites on the human Fc epsilon RI alpha subunit Which are involved in binding human and rat IgE. J. Biol. Chem., 1993, 268, 22076.
- Mao S.Y., Varin-Blank N., Edidin M., Metzger H. Immobilization and internalization of mutated IgE receptors in transfected cells. J. Immunol., 1991, 146, 958.
- Margolis B., Hu P., Katzav S., Li W., Oliver J.M., Ullrich A., Weiss A., Schlessinger J. Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domains and transcription factor motifs. *Nature*, 1992, 356, 71.
- Masuda A., Kasajimi T., Mori N., Oka K. Immunohistochemical study of low affinity Fc receptor for IgE in reactive and neoplastic follicles. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1989, 53, 309.
- Matsui M., Nunez R., Sachi Y., Lynch R.G., Yodoi J. A possible novel mechanism of generating a soluble isoform in the type II cell surface receptor. *FEBS letter.*, 1993, 335, 51.

- Maurer D., Ebner C., Reininger B., Fiebiger E., Kraft D., Kinet J. P., Stingl G. The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. Am. Ass. Immunol., 1995, 154, 6285.
- Maurer D., Fiebiger E., Reininger B., Wolff-Winiski B., Jouvin M.H., Kilgus O., Kinet J.P., Stingl G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FceRI) on monocytes of atopic individuals. *J exp Med*, 1994, **179**, 745.
- Mawhorter S.D., Kazura J.W., Boom W.H. Human eosinophils as antigen-presenting cells : relative efficiency for superantigen- and antigen-induced Cd4<sup>+</sup> T-cell proliferation. *Immunol.*, 1994, **81**, 584.
- Mayumi M., Kawabe T., Kim K. M., Heike T., Katamura K., Yodoi J., Mikawa H. Regulation of Fc epsilon receptor expression on a human monoblast cell line U937. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, **71**, 202.
- McKenzie A.N.J., Culpepper J.A., De Waal Malefyt R., Brière F., Punnonen J., Aversa G., Sato A., Dang W., Coks B.G., Menon S., De Vries J.E., Banchereau J., Zurawski G. Interleukin-13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 3735.
- Melewicz F. M., Kline L. E., Cohen A. B., Spiegelberg H. L. Charactererization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, **49**, 364.
- Melewicz F., Spiegelberg H. Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. J. Immunol., 1980, **125**, 1026.
- Menon A.K., Holowka D., Webb W.W., Baird B. Clustering, mobility and triggering activity of small oligomers of immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells. J. cell Biol., 1985, **102**, 534.
- Metzger H. Molecular aspects of receptors and binding factors for IgE. Adv. Immunol., 1988, 43, 277.
- Metzger H., Alcaraz G., Hohman R., Kinet J.P., Pribluda V., Quarto R.. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. Annu. Rev. Immunol., 1986, 4, 419.
- Metzger H., Kinet J.P., Perez-Montfort R., Rivnay B., Wank S.A. A tetrameric model for the structure of the mast cell receptor with high affinity for IgE. *In* "Prgress in Immunology V" (Yamamara Y. and Tada T. eds.). Academic Press, Orlando, FL, 1983, 493p.
- Miller L., Blank U., Metzger H., and Kinet J.P. Expression of high affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science.*, 1989, **244**, 334.
- Moqbel R., Walsh G.M., Nagakura T., MacDonald A.J., Wardlaw A.J., Ikura Y., Kay A. The effect of platelet-activiting factor on IgE binding to, and IgE-dependent biological properties of, human eosinophils. *Immunol.*, 1990, **70**, 251.
- Mosley B., Beckmann M.P., March C. J., Idzrda R.L., Gimpel S.D., VandenBos T., Friend D., Alpert A., Anderson D., Jackson J., Wignall J.M., Smith C., Gallis B., Sims J.E., Urdal D., Widmer M.B., Cosman D., Linda S.P. The murine interleukin-4 receptor : molecular cloning and characterization of selected and membrane bound forms. *Cell*, 1989, 59, 335.
- Mossalayi D., Arock M., Bertho J.M., Blanc C., Dalloul A.H., Hofstetter H., Sarfati M., Delespesse G., Debré P. Proliferation of early human myeloid precursors induced by interleukin-1 and recombinant soluble CD23. *Blood.*, 1990(b), **75**, 1924.

- Mossalayi D., Lecron J.C., Dalloul A., Sarfati M., Bertho J.M., Hofstetter H., Delespesse G., Debré P. Soluble CD23 (Fc epsilon RII) and interleukin 1 synergistically induce early human thymocyte maturation. J. Exp. Med., 1990(a), **171**, 959.
- Mudde G., Hansel T., Reijsen F., Osterhoff B., Bruynzeel-Koomen C. IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture ? *Immunol. Today*, 1990(a), **11**, 440.
- Mudde G.C., Van reijsen F.C., Boland G.J., De Gast G.C., Bruijinzeel P.L.B., Bruijinzeel-Koomen. CAFM : Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatis is mediated by IgE . *Immunology.*, 1990(b), **69**, 335.
- Nagai T., Adachi M., Noro N., Yodoi J., Uchino H. T and B lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors (Fc epsilon R) in patients with nonallergic hyperimmunoglobulinemia E : Demonstration using a monoclonal antibody against Fc epsilon R-associated antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1985, **35**, 261.
- Nakajima T., Sarfati M., Delespesse G. Relationship between human IgE-binding factors (IgE-BF) and lymphocyte receptors for IgE. J. Immunol., 1987, 139, 848.
- Naray-Fejes-Toth A., Cornwell G.G., Guyre P.M. Glucocorticoids inhibit IgE receptor expression on the human monocyte cell line U937. *Immunol.*, 1985, 56, 359.
- Neely S.P., Hamann K.J., White S.R., Baranowski S.L., Burch R.A., Leffe A.R. Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac1, L selectin, and VLA-4 on human eosinophils and neutrophils. *Am J.Resp.Cell.Mol.Biol.*, 1993, **8**, 633.
- Nishioka Y., Leder P. Organization and complete sequence of identical embryonic and plasmacytoma K V-region genes. J.Biol.Chem., 1980, 255, 3691.
- Nogeira N.M., Klebanoff S.J., Cohn Z.A. *Tryponosoma cruzi* : sensitization to macrophage killing by eosinophil peroxidase. J. Immunol., 1982, **128**, 1705.
- Nonaka M., Hsu D. K., Hanson C. M., Aosai F., Katz D. H. Cloning of cDNA coding for low-affinity Fc receptors for IgE on human T lymphocytes. *Int. Immunol.*, 1989, 1, 254.
- Nunez R., Matsui M., Yodoi J., Lynch R.G. Identification of novel CD23 transcripts on human T and B lymphocytes and eosinophil cell line. J. Immunol., 1995, 44, 169.
- Nutman T.B., Delespresse G., Sarfati M., Volkman D.J. T-cell-derived IgE-binding factors. I. Cloned and transformed T cells producing IgE-binding factors. J. Immunol., 1987, 139, 4049.
- O'Donnel M.C., Ackerman S.J., Gleich G.J., Thomas L.L. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. J. Exp. Med., 1983, 157, 1981.
- Ohno I., Lea R.G., Flanders K.C., Clark D.A., Banwatt D., Dolovich J., Denburg J., Harley C.B., Gauldie J., Jordana M. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissue express transforming growth factor beta gene (TGF beta 1). J. Clin. Invest., 1992, 89, 1662.
- Oliver J.M., Seagrave J., Stump R.F., Pfeiffer J.R., Deanin G.G. Signal tranduction and cellular response in RBL-2H3 mast cells. *Prog. Allergy*, 1988, **42**, 185.
- Oxolom P., Winther K., Thrombocyte involvment in immune inflammatory reactions, *Allergy*, 1986, **41**, 1.
- Pancre V., Joseph M., Capron A., Wietzerbin J., Kusnierz J.P., Vorng H., Auriault C.

Recombinant human interferon-gamma induces increased IgE receptor expression on human platelets. Eur. J. Immunol., 1988, 18, 829.

- Pang J., Taylor G.R., Munroe D.G., Ishaque A., Fun-Leung W.P., Lau C.Y., Liu F.T., Zhou L. Characterisation of the gene for the human high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha-chain. J. Immunol., 1993, 151, 6166.
- Paolini R., Jouvin M.H., Kinet J.P. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature*, 1991, 353, 855.
- Paolini R., Numerof R., Kinet J.P. Phosphorylation / dephosphorylation of high affinity IgE receptors : A mechanism for coupling / uncoupling a large signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1992, **89**, 10733.
- Park D.J., Min H.K., Rhee S.G. IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells. J. Biol. Chem., 1991, 266, 24237.
- Parker C.W. Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway. Annu. Rev. Immunol., 1987, 5, 65.
- Paul-Eugene N., Dugas B., Picquot S., Lagente V., Menciahuerta J.M., Braquet P. Influence of interleukin-4 and platelet-activating factor on the Fc-epsilon-RII/CD23 expression on human monocytes. J. Lipid Med., 1990, 2, 95.
- Pecoud A.R., Conrad D.H. Characterization of the IgE receptor by tryptic mapping. J. Immunol., 1981, 127, 2208.
- Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H., Yokota T., Arai K., Banchereau J., De Vries J.E. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by IFN alpha, gamma and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 1988(a), **85**, 6880.
- Pene J., Rousset F., Briere F., Chretien I., Wideman J., Bonnefoy J.Y., De Vries J.E. Interleukin 5 enhances interleukin 4 induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur. J. Immunol.*, 1988(b), **18**, 929.
- Peterson A.P., Altman L.C., Hill J.S., Gosney K., Kadin M.E. Glucocortico•d receptors in normal human eosinophils : comparison with neutrophils. J. Allergy. Clin. Immunol., 1981, 68, 212.
- Pfeiffer J.R., Seagrave J.C., Davis B.H., Deanin G.G., Oliver J.M. Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. *J. cell Biol.*, 1985, **101**, 2145.
- Pforte A., Breyer G., Prinz J.C., Gais P., Burger G., Haussinger K., Rieber E.P., Held E., Zieglerheitbrock H.W.L. Expression of the Fc-receptor for IgE (Fc-epsilon-RII, CD23) on alveolar macrophages in extrinsic allergic alveolitis. J. Exp. Med., 1990, 171, 1163.
- Pincus S. H. Hydrogen peroxide release from eosiniphils : quantitative, comparative studies of human and guinea pig eosinophils. J. Invest. Dermatol., 1983, 80, 278.
- Pincus S. H., Shooley W. R., Dinapoli A. M., Broder S. Metabolic heterogeneity of eosiniphils from normal and hypereosinophilic patients. *Blood.*, 1981, **58**, 1175.
- Pincus S., Whitcomb E., Dinarello C. Interaction of IL-1 and TPA in modulation of eosinophil function. J. mmunol., 1986, 137, 3509.

- Pirron U., Schlunch T., Prinz J.C., Rieber E.P. IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE. *Eur. J. Immunol.*, 1990, **20**, 1547.
- Plaut M., Pierce J.H., Watson C.J., Hanley-Hyde J., Nordan R.P., Paul W.E. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature.*, 1989, **339**, 64.
- Plumas J., Gruart V., Aldebert D., Truong M.J., Capron M., Capron A., Prin L. Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 1265.
- Pochon S., Graber P., Yeager M., Jansen K., Bernard A., Aubry J.P., Bonnefoy J.Y. Demonstration of a second ligand for the low affinity receptor for immunoglobulin E (CD23) using recombinant CD23 reconstituted into fluorescent liposomes. J. Exp. Med., 1992, 176, 389.
- Prin L., Capron M., Tonnel A., Bletry O., Capron A. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils : Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int*. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 1983, 72, 336.
- Prin L., Charon J., Capron M., Gosset P., Taelman H., Tonnel A.B., Capron A. Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. Exp. Immunol.*, 1984, 57, 735.
- Prin L., Lefebvre P., Gruart V., Capron M., Storme L., Forstecher P., Loiseau S., Capron A. Heterogeneity of human eosinophil glucocorticoid receptor expression in eosinophilic patients : Absence of receptor correlates with resistance to corticotherapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, **78**, 383.
- Prinz J.C., Bauer X., Mazur G., Rieber E.P. Allergen-directed expression of Fc receptors for IgE (CD23) on human T lymphocytes is modulated by interleukin 4 and interferon gamma. *Eur. J. Immunol.*, 1990, **20**, 1259.
- Prinz J.C., Endres N., Rank G., Ring J., Rieber E. P. Expression of Fc epsilon receptors on activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1987, **17**, 757.
- Punnonen J., Aversa G., Cocks B., McKenzie A., Menson S., Zurawski G., Malefyt R., De Vries J. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1993, 90, 3730.
- Qiu W.Q., de Bruin D., Brownstein B.H., Pearse R., Ravetch J.V. Oraganisation of the human and mouse low affinity FcR genes : Evidence for duplication and recombinaison. *Science.*, 1990, **248**, 732.
- Quarto R., Kinet J.P., Metzger H. Coordinate synthesis and degradation of the alpha-, beta- and gamma-subunits of the receptor for immunoglobulin E. *Mol. Immunol.*, 1985, **22**, 1045.
- Quarto R., Metzger H. The receptor for immunoglobulin E : examination for kinase activity and as a substrate for kinases. *Mol. Immunol.*, 1986, **23**, 1215.
- Ra C., Jouvin M.H.E., Kinet J.P. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. J. Biol. Chem., 1989, 264, 15323.
- Raines M A., Liu L., Quan S.G., Joe V., Dipersio J.F., Golde D.W. Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte macrophage colony stimulating factor receptor . *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 1991, 88, 8203.

Rauscher F.J., Morris J.F., Tournay O.E., Cook D.M., Curran T. Binding of the Wilms tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, 1990, **250**, 1259.

Ravetch J.V., Kinet J.P. Fc receptors. Annu. Rev. Immunol., 1991, 9, 457.

- Ravetch J.V., Luster A.D., Weinshank J.K., Pavlovec A., Portnoy A., Hulmes J., Pan Y.C.E., Unkeless J.C. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science*, 1986, 234, 718.
- Razin E., Ihle J.N., Seldin D., Mencia-Huerta J.M., Katz H.R., Leblanc P.A., Hein A., Caulfield J.P., Austen K.F., Stevens R.L. Interleukin-3 : a differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. J. Immunol., 1984, 132, 1479.
- Reth M. Antigen receptor tail clue. Nature, 1989, 338, 383.
- Rivnay B., Wank S.A., Poy G., Metzger H. Phospholipids stabilize the interaction between the alpha and beta subunits of the solubilizaed receptor for immunoglobulin E. *Biochem.*, 1982, **21**, 6922.
- Robertson D., Holowka D., Baird B. Cross-linking of immunoglobulin-E receptor complexes induces their interaction with the cytoskeleton of rat basophilic leukemia cells. J. Immunol., 1986, 136, 4565.
- Romeo C., Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell*, 1991, **64**, 1037.
- Rot A., Krieger M., Brunner T., Bischoff S., Schall T., Dahinden C. RANTES and macrophage inflammatory protein-1alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. J. Exp. Med., 1992, **176**, 1489.
- Rowlands D.C., Hansel T.T., Crocker J. Immunohistochemical determination of CD23 expression in Hodgkins disease using paraffin sections. J. Pathol., 1990, 160, 239.
- Saito H., Hayakawa T., Yui Y., Shida T. Effect of human interferon on different functions of human neutrophils and eosinophils. Int . Arch . Allergy . Appl . Immunol., 1987, 82, 13.
- Sarfati M., Bron D., Lagneaux L., Fonteyn C., Frost H., Delespesse G. Elevation of IgEbinding factors in serum of patients with B cell-derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1988, 71, 94.
- Sarfati M., Nutman T.B., Suter U., Hofstetter H., Delespesse G. T-cell-derived IgE-binding factors. II. Purification and characterization of IgE-binding factors produced by human T cell leukemia/lymphoma virus-1-transformed T lymphocytes. J. Immunol., 1987, 139, 4055.
- Scepek S., Lindau M. Focal exocytosis by eosinophils compound exocytosis and cumulative fusion . EMBO J., 1993, 12, 1811.
- Scholl P.R., Geha R.S. Physical association between the high affinity IgG receptor (Fc gamma RI) and the gamma subunit of the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI gamma) in the human monocytic cell line THP-1. J. Immunol., 1993, 150, 88.
- Schult P. A., Lega M., Jadidi S., Vrtis R., Warner T., Graziano F.M., Busse W.W. The presence of hypodense eosinophils and diminished chemiluminescence response in asthma. J. Allergy Clin. Immunol., 1988, 81, 429.

- Sedgwick J.B., Frick W.E., Sondel P.M., Hank J.A., Borden E., Busse W.W. The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment. J. Allergy Clin. Immunol., 1990, 85, 557.
- Shaw R.J., Walsh G.M., Cromwell O., Moqbel R., Spry C.J.F., Kay A.B. Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature*, 1985, **316**, 150.
- Shimizu A., Tepler I., Benfey P.N., Berenstein E.H., Siraganian R.P., Leder P. Human and rat mast cell high affinityimmunoglobulin E receptors : characterisation of putative alpha gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 1988, 85, 1907.
- Sieh M., Bolen J.B., Weiss A. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *EMBO J.*, 1993, **12**, 315.
- Silberstein D., David J. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to Schistosoma mansoni\_larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1986, 83, 1055.
- Slighton J.L., Blechl A.E., Smithies O. Human fetal G gamma- and A gamma-globulin genes : complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 1980, **21**, 627.
- Snapper C.M., Finkelman F.D. Immunoglobulin class switching. In "Fundamental Immunology" (William E. P. ed.)., 1993, 22, 837.
- Snapper C.M., Finkelman F.D., Paul W.E. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. J. Exp. Med., 1988, 167, 183.
- Soussi Gouni A., Lamkhioued B., Ochiai K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron A., Kinet J.P., Capron M. Expression of the high affinity immunoglobulin E receptor on eosinophils : involvement in immune defence against parasites. *Nature*, 1994, **367**, 183.
- Spiegelberg H.L. Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes and macrophages . Adv. Immunol., 1984, 35, 61.
- Spiegelberg H.L., Thompson L.F., MacNeil D., Buckley R.H. Murine lymphocytes expressing Fc receptor positive T, B and NK cells in patients with the hyper-IgE syndrome. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1985, **262**, 7383.
- Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. Nature, 1990, 346, 425.
- Standfort A.J., Shirakawa T., Moffat M.F., Daniels S.E., Ra C., Faux J.A., Young R.P., Nakamura Y., Lathrop G.M., Cookson W.O. Localisation of atopy and beta subunit of high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. Lancet., 1993, 341, 332.
- Staros J.V., Lee W.T., Conrad D.H. Membrane-impermeant cross-linking reagents : application to the study of the cell surface receptor for IgE. *In* "Methods in enzymology" (Riordan J.F. and Vallee B.L. eds.). Academic Press, San Diego, California, 1988, **158**, 503.
- Sullivan K.E., Calman A.E., Nakanishi M., Tsang S.Y., Wang Y., Peterlin B.M. A model for the transcriptional regulation of MHC class II genes. *Immunol. Today*, 1987, **8**, 289.
- Sur S., Adolphson C.R., Gleich G.J. Eosinophils. Biochemical and cellular aspects. In "Allergy: principles and practice". (Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F., Yunginger J.W., Buss W. W. Eds), 4th<sup>ed</sup>, Mosby-year Book. Saint Louis, Missouri., 1993, 1, 169p.

Suter U., Bastos R., Hofstetter H. Molecular structure of the gene and the 5'-flanking region of

the human lymphocyte immunoglobulin E receptor. Nucl. Acid. Res., 1987, 15, 7295.

Suter U., Texido G., Hofstetter H. Expression of human lymphocyte IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23). Identification of the Fc epsilon RII promoter and its functional analysis in B lymphocytes. J. Immunol., 1989, 143, 3087.

Sutton B.J., Gould H.J. The human IgE network. Nature, 1993, 366, 421.

- Swendeman S., Thorley-Lawson D.A. The activation antigen BLAST-2, When shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells. *EMBO J.*, 1987, **6**, 1637.
- Taniguchi T., Kobayachi T., Kondo J., Takahashi K., Nakamura H., Suzuki J., Nagai K., Yamada T., Nakamura S., Yamamura H. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-Kda protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. J. Biol. Chem., 1991, 266, 15790.
- Tavernier J., Devos R., Cornelis S., Tuypens T., Vanderheyden J., Fiers W., Plaetinck G. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alphachain and beta-chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*, 1991, **66**, 1175.
- Tedder T.F., Klejman G., Disteche C.M., Adler D.A., Schlossman S.F., Saito H. Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human (B1) CD20 antigen, and localization of the gene to chromosome 19. J. Immunol., 1988, 141, 4388.
- Tepler I., Shimizu A., Leder P. The gene for rat mast cell high affinity IgE receptor alpha chain structure and alternative mRNA splicing patterns. J. Biol.Chem., 1989, 264, 5912.
- Thompson H.L., Metcalfe D.D., Kinet J.P. Early expression of high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI) during differentiation of mouse mast cells and human basophils. J. Clin. Invest., 1990, 85, 1227.
- Thorley-Lawson D.A., Nadler L.M., Bhan A.K., Shooley R.T. BLAST-2 (EBVCS), an early cell surface marker of human B cell activation, is superinduced by Epstein-Barr virus. J. *Immunol.*, 1985, **134**, 3007.
- Thyphronitis G., Tsokos G.C., June C.H., Levine A.D., Finkelman F.D. IgE secretion by Epstein Barr virus infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppresed by interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1989, **86**, 5580.
- Tomassini M., Tsicopoulos A., Tai P., Gruart V., Tonnel A.B., Prin L., Capron A., Capron M. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. J. All. Clini. Immunol., 1991, 88, 365.
- Tournoys A., Capron M., Papin J.P., Kusnierz J.P., Capron A. Présence et rôle fonctionnel d'un épitope du second récepteur pour l'IgE (Fc epsilon RII) sur les mastocytes et les basophiles de rat.C. R. Acad. Sci, 1990, **310**, 139.
- Truong M. J., Gruart V., Liu F., Prin L., Capron A., Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 3230.
- Tsicopoulos A., Tonnel A.B., Wallaert B., Joseph M., Ameisen J.C., Ramon P., Dessaint J.P., Capron A. Decrease of IgE-dependent platelet activation in hymenoptera hypersensitivity after specific rush desensitization. *Clin. exp. Immunol.*, 1988, **71**, 433.

Turner S.R., Tainer J.A., Lynn W.S. Biogenesis of chemotactic molecules by the arachinodate

lipogenese system of platelets. Nature, 1975, 257, 680.

- Valent P., Schmidt G., Besemer J., Mayer P., Zenke G., Liehl E., Winterberger W., Lechner K., Maurer D., Bettelheim P. Interleukin-3 is a differentiation factor for human Basophils. *Blood*, 1989, 73, 1763.
- Valerius T., Repp R., Kalden J., Platzer E. Effects of interferon on human eosinophils in comparison with other cytokines, a novel class of eosinophil activators with delayed on set of action. J. Immunol., 1990, 145, 1950.
- Vercelli D., Helm B., Marsh P., Padlan E., Geha R., Gould H. The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature*, 1989(a), **338**, 649.
- Vercelli D., Jabara H.H., Arai K., Geha R.S. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. J. Exp. Med., 1989(b), 169, 1295.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B., Sporn M.B. transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, 63, 943.
- Waldschmidt T.J., Conrad D.H., Lynch R.G. Expression of B cell surface receptors. II. IL-4 can accelerate the developmental expression of the murine B cell IgE Fc receptor. J. Immunol., 1989, 143, 2820.
- Walsh G., Hartnell A., Wardlaw A., Kurihara K., Sanderson J., Kay A. IL-5 enhances the *in vitro* adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18) dependent manner. *Immunol.*, 1990, 71, 258.
- Walsh G., Mermod J., Hartnell A., Kay A., Wardlaw A. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1 stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha4 beta1 (very late antigen-4) dependent. J. Immunol., 1991, 146, 3419.
- Wang B., Rieger A., Kilgus O, Ochiai K., Maurer D., Fodinger D., Kinet J.P., Stingl G. Epidermal langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. J. Exp. Med., 1992, 175, 1353.
- Wardlaw A.J., Moqbel R., Cromwell O., Kay A.B. Platelet activating factor : a potent chemotactic factor for human eosinophils. J. Clin. Invest., 1986, **78**, 1701.
- Warren D., Moore M. Synergism among interleukin-1, interleukin-3 and interleukin-5 in the production of eosinophils from primitive hematopoietic stem cells. J. Immunol., 1988, 140, 94.
- Warringa R.A.J., Koenderman L., Kok P.T.M., Kreukinet J., Bruijnzeel P.L.B. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interlekin 3. *Blood*, 1991, 77, 2694.
- Wassom D.L., Gleich G.J. Damage to *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil major basic protein. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, 28, 860.
- Watanabe H., Kawabe T., Tanaka M., Kim K., Nambu M., Tsuruta S., Morita M., Yorifuji T., Mayumi M., Mikawa H. Transforming growth factor beta and dexamethasone suppress the expression of Fc epsilon R2 (CD23) on a human eosinophilic cell line EOL-3. *Immunol. Letters*, 1990, 25, 313.
- Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction : A tale of tails and cytoplasmic proteintyrosine kinases. *Cell*, 1993, **73**, 209.

- Weissman A.M., Baniyash M., Hou D., Samelson L.E., Burgess W.H., Klausner R.D. Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science.*, 1988, 239, 1018.
- Weller F. The immunobiology of eosinophils. N. Eng. J. Med., 1991, 324, 1110.
- Weller P.F. Lipid, peptide and cytokine mediators elaborated by eosinophils. In "imunopharmacology of eosinophils". (Smith H., Cook R.M. eds.). Academic Press, 1993, 25p.
- Weller P.F., Goetzl E.J., Austen K.F. Identification of human lysophospholipase as the constituents of Charcol-Leyden Crystal . *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1980, **77**, 7440.
- Weller P.F., Rand T.H., Barett T., Elovic A., Wang D.T.W., Finberg R.W., Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR dependent MHC antigen presentation and IL-1 alpha expression. J. Immunol., 1993, 150, 2554.
- Wendel-Hansen V., Riviere M., Uno M., Jansson I., Szpirer J., Islam M.Q., Levan G., Klein G., Yodoi J., Rosen A. The gene encoding CD23 leukocyte antigene (Fc epsilon RII) is located on human chromosome 19. Somat. Cell. Mol. Genet., 1990, 16, 283.
- Werner S., Duan D.S.R., De Vries C., Peters K.G., Johnson D.E., Williams L.T., Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, **12**, 82.
- White J.G. Progress in clinical clinical and biochemical research. In "Platelet membrane Receptor, Molecular biology, Immunology, Biochemical and pathology". (Jamiesen G.A., Alan R. eds.), Liss, Inc. 1988, 283, 1.
- White J.G., Clawson C.C. The surface connected canalicular system of blood platelets : a fenestrated membrane system. Am. J. Pathol., 1980, 101, 353.
- Wodnar-Filipowicz A., Heusser C.H., Moroni C. Production of the haemopoeitic growth factors GM-CSF and interleukin 3 by mast cells in response to IgE receptor mediated activation. *Nature*, 1989, **339**, 150.
- Wong D., Elovic A., Matossian K., Nagura N., McBride J., Chou M., Gordon J., Rand T., Galli S., Weller P. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta1. *Blood*, 1991, **78**, 2702.
- Wong D., Weller P., Galli S., Elovic A., Rand T., Gallagher G., Chiang T., Chou M., Matossian K., McBride J., Todd R. Human eosinophils express transforming growth factor alpha. J. Exp. Med., 1990, 172, 673.
- Wu C.Y., Sarfati M., Heusser C., Fournier S., Rubio-Trujillo M., Peleman R., Delespesse G. Glucocorticoids increase the synthesis of IgE by interleukin 4 stimulated human lymphocytes. J. Clin. Invest., 1991, 87, 870.
- Yamaoka K.A., Claesson H.E., Rosen A. Leukotriene B<sub>4</sub> enhances activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. J. Immunol., 1989, **143**, 1996.
- Ye Z.S., Kinet J.P., Paul W.E. Structure of the gene of the alpha chain of the mouse high affinity receptor for IgE. J. Immunol., 1992, 149, 897.
- Yodoi J., Ishizaka T., Ishizaka K. Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. II. Induction of Fc epsilon-receptor bearing rat lymphocytes by IgE. J. Immunol., 1979, **123**, 455.
- Yokota A., Kikutani H., Tanaka T. Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon

RII/CD23) : Tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell.*, 1988, **55**, 611.

- Young M.C., Leung D.Y., Geha R.S. Production of IgE-potentiating factor in man by T cell lines bearing Fc receptors for IgE. *Eur. J. Immunol.*, 1984, **14**, 871.
- Zachary I., Rozengurt E. Focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) : a point of Convergence in the action of neuropeptides, integrins and oncogenes. *Cell*, 1992, **71**, 891.

