

gen 20106925

50376
1775
285

Université des Sciences et de Technologies de Lille I

N° d'ordre

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

SYNTHESE DES CYTOKINES DE TYPE 1 ET DE TYPE 2
PAR LES EOSINOPHILES HUMAINS.
RELATIONS AVEC LA PATHOLOGIE.

LAMKHIOUED Bouchaïb



Présentée le 19 Octobre 1995

Membres du Jury :

- Président : Mme le Pr. G. SPICK
- Rapporteurs : M. le Pr. L. PRIN
M. le Pr. D. EMILIE
- Examineurs: M. 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. A. Capron
REMERCIEMENTS



Je dédie cette thèse

A Mehdi,
A Nathalie,
A mes parents et beaux-parents,
A mes frères et soeurs,
A ma grand-mère,
A ma famille,
A mes amis.

Je remercie très chaleureusement :

- Monsieur le Professeur André Capron pour m'avoir accueilli au sein de son unité de Recherche. Qu'il trouve dans ce travail le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

- Mon Directeur de Thèse, Madame le Professeur Monique Capron, qui par son dynamisme et ses qualités d'encadrement m'a permis de réaliser ce travail au sein du groupe de recherches sur les "*Communications Cellulaires, Mécanismes Effecteurs et Régulateurs*" 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. Dominique Emilie et Lionel Prin, qui ont accepté de juger les travaux présentés dans cette thèse. Qu'ils soient assurés de toute mon estime.

- Monsieur le Dr. Ali Ouaiïssi, pour sa disponibilité et pour l'aide apportée dans les travaux de microscopie électronique. Que ce travail soit l'occasion de lui exprimer tous mes remerciements et le témoignage de mon amitié.

- Monsieur Abdelilah Soussi Gounni pour son amicale participation à mes travaux et sa disponibilité. Que cette thèse marque le début de notre future collaboration.

- Tous les médecins et les chercheurs, qui m'ont fourni tout le matériel biologique et moléculaire nécessaire à l'élaboration des expériences menées durant ce travail.

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 "*Communications Cellulaires, Mécanismes Effecteurs et Régulateurs*" pour leur aide technique et les conseils prodigués pour la réussite de ces travaux.

Publications

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

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.* (1995) **107** : 122-123.

Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, & Capron M. Synthesis of type 1 (IFN γ) and type 2 (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines by distinct eosinophil subsets. *Annals of the New York Academy of Science* (Sous presse).

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

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

Capron M, **Lamkhioued B**, Aldebert D, Soussi Gounni A, Delaporte E & Capron A. Eosinophil functional aspects. *Progress in Allergy and Clinical Immunol* (1994). Stockholm, **3**, 26-29

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.* (1994) **188** : 39-46

Aldebert D, **Lamkhioued B**, Desaint C, Soussi Gounni A, Goldman, M, Capron A, Prin L & Capron M. Eosinophils express a functional receptor for interferon alpha (IFN α R) : inhibitory role of IFN α on the release of mediators. *Blood* (sous presse).

Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Goldman M, Prin L, Capron A & Capron M. Distinct Eosinophil populations express TH1 or TH2 cytokines. *Science*. (soumis à publication).

Lamkhioued B, Soussi Gounni A, Morita M, Prin L, Capron A and Capron, M. Detection of IL-4, IL-5 and IL-10 mRNA in individual eosinophil cell by double in situ RT-PCR (en préparation)

Morita M, **Lamkhioued B**, Soussi Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Capron A & Capron M. Regulatory effects of interferons on eosinophil apoptosis. (soumis à publication).

Table des matières

GENERALITES

INTRODUCTION GENERALE

LE POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE

Historique

Les polynucléaires ou granulocytes

Ontogénèse des granulocytes

Ontogénèse des éosinophiles

Morphologie et distribution

Les molécules impliquées dans l'adhésion et le chimiotactisme

Les récepteurs impliqués dans la cytotoxicité

Phénomènes de dégranulation et libération sélective des médiateurs

L'éosinophile comme cellule présentatrice d'antigène

L'éosinophile comme cellule réservoir pour le VIH

Eosinophile et cytokines

L'éosinophile est une cellule cible des cytokines

Synthèse des cytokines par l'éosinophile (association avec les granules)

RECEPTEUR POUR LES IgA

Structure des IgA

La chaîne J

Le composant sécrétoire

Recepteur des IgA

Structure biochimique et distribution cellulaire

Structure nucléotidique

Fonctions des fragments solubles

HETEROGENEITE ET ACTIVATION DES EOSINOPHILES

Introduction

L'hétérogénéité morphologique

L'hétérogénéité des éosinophiles humains liée à leur densité

Les antigènes membranaires et l'expression des protéines par les éosinophiles hypodenses

L'hétérogénéité fonctionnelle

Génération des éosinophiles hypodenses

ROLE BENEFIQUE ET NEFASTE DE L'EOSINOPHILE DANS LA PATHOLOGIE

Rôle des sous-populations Th1 et Th2 en pathologie

L'éosinophile dans les infections parasitaires

Le syndrome hyperéosinophilique idiopathique

L'éosinophile dans la pemphigoïde bulleuse

L'éosinophile dans la dermatite atopique

L'éosinophile dans les manifestations allergiques

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Prélèvements tissulaires
Les cellules
Les anticorps

PURIFICATION DES CELLULES

Les éosinophiles
Les cellules mononuclées

ANALYSE DES PROTÉINES

Détection de la fluorescence par cytométrie en flux
Immunomarquage à la phosphatase alcaline
Double immunomarquage à la phosphatase alcaline
Microscopie électronique

ANALYSE DE L'ADN ET DE L'ARN

Transcription reverse
Amplification par RT-PCR
Southern Blot
Marquage des sondes nucléotidiques et hybridation
Sondes oligonucléotidiques
Sondes ARN (ou ribosondes)
Hybridation *in situ*
Double hybridation *in situ*
PCR *in situ*
Double PCR *in situ*

RESULTATS

RESULTAT I.

Expression par les éosinophiles humains d'un récepteur pour le composant sécrétoire.
Rôle dans l'activation dépendante d'IgA sécrétoire.
Résultats complémentaires.

RESULTAT II.

L'expression de cytokines de type 1 (IFN γ) ou type 2 (IL-4, IL-5, IL-10) par deux sous-populations distinctes d'éosinophiles.

RESULTAT III.

Coexpression des ARNm de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 au niveau des éosinophiles de patients asthmatiques. Détection par double RT-PCR *in situ*.

RESULTAT IV.

Expression de l'IFN γ par les éosinophiles dans le modèle de la pemphigoïde bulleuse. Association avec les granules.

DISCUSSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ILLUSTRATIONS

ILLUSTRATIONS

GENERALITES

Figure 1 : Morphologie, antigènes de surface, médiateurs préformés et néoformés des éosinophiles page 2

Figure 2 : A Polynucléaire éosinophile. B Polynucléaire neutrophile. C Polynucléaire basophile et mastocyte. page 8

Tableau 1 : Principales caractéristiques des protéines cationiques de l'éosinophile page 11

Figure 3 : Ontogénèse des cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques. page 13

Figure 4 : Ontogénèse des éosinophiles à partir d'un précurseur mixte granulocyte /macrophage. page 17

Figure 5 : Polynucléaire éosinophile de la cavité nasale en microscopie électronique. page 19

Figure 6 : Les molécules d'adhésion impliquées dans la migration et la domiciliation des éosinophiles. page 22

Figure 7 : L'attaque des parasites par le polynucléaire éosinophile. page 24

Figure 8 : Expression par les éosinophiles de plusieurs types de récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (RFc) . page 26

Tableau 2 : Libération sélective des protéines cationiques de la matrice granulaire de l'éosinophile. page 30

Figure 9 : Représentation schématique d'une inhibition de la liaison de l'IL-3 à son récepteur par le GM-CSF ou l'IL-5. page 34

Figure 10 : Schéma des mécanismes de transduction induits par l'IL-2 chez les lymphocytes T. page 39

Figure 11 : Schéma de la réponse transcriptionnelle à l'interféron α . page 41

Figure 12 : Structure des IgA sécrétoires. page 46

Figure 13 : Transport des IgA au niveau des cellules épithéliales par le composant sécrétoire. page 48

Figure 14 : Eosinophiles du sang périphérique et des sécrétions nasales vus par microscopie électronique. page 56

Figure 15 : Purification des éosinophiles sur gradient de densité. page 58

Figure 16 : Diagramme hypothétique du processus par lequel les éosinophiles sont activés et développent un phénotype hypodense. page 63

Figure 17 : Diagramme des interactions régulatrices entre les deux sous-populations de

lymphocytes T CD4+.	page 67
<u>Figure 18</u> : Coupe histologique obtenue à partir de biopsie cutanée de patient présentant une pemphigoïde bulleuse.	page 72
<u>Figure 19</u> : Jonction dermo-épidermique : aspects morphologiques.	page 72
<u>Figure 20</u> : Coupe histologique obtenue à partir de biopsie cutanée de patient présentant une dermatite atopique.	page 76
<u>Figure 21</u> : Interactions possibles de cytokines et leur rôle dans la pathogénèse de la dermatite atopique.	page 74
<u>Figure 22</u> : Phase de sensibilisation, activation des mastocytes et immunité retardée.	page 78
<u>Figure 23</u> : Rôle central des cytokines, produites par les lymphocytes T CD4+ TH2 spécifiques de l'allergène, dans le recrutement et l'activation des cellules responsables de l'inflammation (lymphocytes B producteurs d'IgE, éosinophiles et mastocytes).	page 80

MATERIEL ET METHODES

<u>Figure 24</u> : Purification des éosinophiles par la technique du MACS.	page 87
<u>Figure 25</u> : Principe d'obtention des ribosondes.	page 93
<u>Figure 26</u> : Schéma représentatif de l'hybridation <i>in situ</i> .	page 96
<u>Figure 27</u> : Schéma représentatif de la double hybridation <i>in situ</i> .	page 99
<u>Figure 28</u> : PCR <i>in situ</i> .	page 101
<u>Figure 29</u> : Double PCR <i>in situ</i>	page 104

RESULTATS ET DISCUSSION.

Résultat I

<u>Figure 1</u> : Flow cytometry analysis of SC binding to eosinophils	page 111
<u>Figure 2</u> : Inhibition of radiolabeled SC binding to eosinophils by unlabeled SC or by various reagents (secretory IgA, serum IgA, IgG) at a 100-fold excess.	page 111
<u>Figure 3</u> : Immunoprecipitation of ¹²⁵ I-labeled lysates of eosinophils (A, B), neutrophils (C), and radioiodinated eosinophil supernatants (D).	page 112
<u>Figure 4</u> : Immunoprecipitation of surface ¹²⁵ I-labeled extracts of eosinophils.	page 112
<u>Figure 5</u> : Autoradiogram of SDS-PAGE showing the eosinophil proteins eluted from SC-Sepharose (lane 1) and subsequent immunoprecipitation of proteins eluted from SC-Sepharose column (lane 2-8)	page 112
<u>Figure 6</u> : Release of EPO and ECP by eosinophils.	page 113

Figure 7 : Inhibitory effect of SC on IgA-dependent activation. page 113

Figure 8 : Immunomarquage à la phosphatase alcaline d'éosinophiles humains avec un anticorps monoclonal anti-Fc α R (a) et son contrôle isotypique (b). page 117

Figure 9 : Analyse par RT-PCR du récepteur pour le fragment Fc des IgA (Fc α R) à partir d'ARN d'éosinophiles et de neutrophiles hautement purifiés. page 119

Figure 10 : RT-PCR *in situ* sur des eosinophiles avec des oligonucléotides spécifiques pour le Fc α R. page 120

Résultat II.

Figure 1 : Détection de l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ dans les éosinophiles humains par immunomarquage à la phosphatase alcaline (A-F) et par hybridation *in situ* (G-L). page 135

Figure 2 : Détection de l'IL-4 dans les éosinophiles humains par immunomarquage à la phosphatase alcaline (A, B) et de l'ARNm correspondant par RT-PCR *in situ* (C, D). page 136

Figure 3 : Analyse par RT-PCR de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou de lymphocytes. page 137

Figure 4 : Double immunomarquage à la phosphatase alcaline sur des éosinophiles de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique. page 139

Figure 5 : Double hybridation *in situ* avec des ribosondes marquées au 35S-UTP ou à la dig-UTP sur des éosinophiles de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique. page 140

Résultat III

Figure 1 : Détection de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par immunomarquage à la phosphatase alcaline. page 152

Figure 2 : RT-PCR *in situ* réalisée sur des éosinophiles grâce à des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 ou la peroxydase (EPO). page 154

Figure 3 : Analyse par RT-PCR de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 ou l'EPO à partir d'ARN d'éosinophiles purifiés ou de surnageant de RT-PCR *in situ*. page 155

Figure 4 : Double RT-PCR *in situ* sur des éosinophiles en tube avec des oligonucléotides spécifiques pour les interleukines IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 pris deux à deux. page 156

Résultat VI

Figure 1 : Détection de l'IL-5 et de l'IFN γ par immunomarquage à la phosphatase alcaline dans les éosinophiles périphériques et tissulaires dans le modèle de la pemphigoïde bulleuse. page 167

Figure 2 : Analyse par RT-PCR de l'IL-5 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou de lymphocytes. page 168

Figure 3 : RT-PCR in situ sur des éosinophiles avec des oligonucléotides spécifiques pour l'IFN γ .
page **169**

Figure 4 : Microscopie électronique réalisée sur des coupes fines d'éosinophiles de sang périphérique de patient présentant une pemphigoïde bulleuse.
page **170**

RESUME.

En un siècle, l'éosinophile est passé du statut du phagocyte mal caractérisé, à celui de cellule à part entière dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Grâce à ses récepteurs membranaires et grâce au relargage de facteurs solubles et de cytokines, l'éosinophile assure des interactions multiples avec les différentes cellules du système immunitaire et traduit les signaux reçus en une variété d'activités cellulaires.

Nos travaux ont contribué à la mise en évidence d'un nouveau récepteur pour l'IgA sécrétoire (récepteur pour le composant sécrétoire de 15 kDa) ainsi qu'à la caractérisation moléculaire du récepteur pour le fragment Fc des IgA (Fc α R). Dans cette étude nous avons aussi considéré l'activation des éosinophiles via ces deux récepteurs qui rendent compte de la cytotoxicité de cette cellule dans les réactions dépendantes de l'IgA et de la dégranulation préférentielle des éosinophiles par les IgA sécrétoires par rapport aux IgA monomériques. L'ensemble de ces résultats apporte des arguments en faveur du rôle de l'éosinophile dans l'immunité muqueuse souvent associée aux immunoglobulines A sécrétoires.

L'essentiel des aspects pluripotentiels de l'éosinophile, notamment sa capacité à synthétiser des cytokines, a été appréhendé dans des situations pathologiques où les activités des cytokines semblent jouer un rôle crucial comme signaux d'activation cellulaire avec des conséquences fonctionnelles variables.

Nous avons démontré par différentes approches méthodologiques, que les éosinophiles de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique sont capables non seulement de produire des cytokines dites de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) mais aussi de type 1 (IFN γ). L'étude des profils de cytokines, montre l'existence de deux sous-populations d'éosinophiles. Comme il a été démontré pour les lymphocytes CD4⁺ et récemment pour les lymphocytes CD8⁺, nous avons remarqué l'existence d'une sous-population synthétisant exclusivement l'IFN γ et une autre prédominante, coexprimant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Nous avons pu observer en parallèle, que les éosinophiles d'un patient asthmatique, produisent de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Par double RT-PCR *in situ*, nous avons démontré une coexpression de ces trois cytokines par une même population d'éosinophiles.

Par la technique d'immunomarquage et par RT-PCR *in situ*, nous avons démontré que les éosinophiles périphériques et tissulaires de patients présentant une pemphigoïde bulleuse, expriment l'ARNm codant pour l'IFN γ ainsi que la protéine correspondante. L'examen par microscopie électronique de l'immunomarquage des éosinophiles, révèle la présence de l'IFN γ au niveau granulaire comme cela a été démontré pour plusieurs cytokines.

A la notion d'hétérogénéité cytologique et fonctionnelle des éosinophiles déjà évoquée, nos travaux soulignent une nouvelle hétérogénéité associée à la synthèse différentielle des différentes cytokines et plaide en faveur d'un mécanisme plus général démontré initialement chez les lymphocytes T CD4⁺ et élargi par la suite aux lymphocytes CD8⁺.

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

A la lumière des connaissances récemment acquises, il est maintenant admis que les éosinophiles sont incriminés dans les mécanismes de protection contre les parasites, mais qu'ils interviennent aussi dans l'agression tissulaire observée dans de nombreuses pathologies, allergiques, cutanées ou multiviscérales. On n'est guère surpris de voir l'éosinophile tenir une place importante dans la réponse immunitaire. Certains des mécanismes d'activation cellulaire, qui entraînent la mise en jeu de molécules effectrices (par exemple les médiateurs pro-inflammatoires et les cytokines) sont directement liés à l'expression de récepteurs pour différentes immunoglobulines (IgG, IgE, IgA) à la surface de sous-populations d'éosinophiles et soulignent, de ce fait, l'hétérogénéité de cette cellule déjà établie selon un critère de densité cellulaire (normodense et hypodense). Ce concept d'hétérogénéité des populations d'éosinophiles sanguins et tissulaires trouve encore son illustration aussi bien au niveau ultrastructural et phénotypique qu'au niveau biochimique. A défaut d'une claire compréhension de sa physiologie, les chercheurs ont saisi de longue date, le lien entre l'éosinophilie et les maladies parasitaires, et les réactions inflammatoires. L'un des problèmes essentiels qui se pose actuellement, est la caractérisation des facteurs d'induction et des conditions d'expression de certaines activités fonctionnelles de l'éosinophile activé, responsables de ses potentialités inflammatoires et de ses propriétés cytotoxiques. Les propriétés cytotoxiques de l'éosinophile dues à ses protéines cationiques (EPO, ECP, EDN et MBP), situent l'éosinophile sur un axe allant de l'effet bénéfique (défense anti-parasitaire) vers l'effet néfaste (lésions tissulaires de l'organisme).

Par sa localisation à dominante tissulaire, l'éosinophile participe précocement à la réaction inflammatoire et à la protection de l'organisme. Son tropisme tissulaire et son adressage spécifique sont liés à sa capacité d'expression de nombreux facteurs de communication cellulaire (molécules d'adhérence et cytokines) et de ce fait, il tient une place importante dans l'immunomodulation. L'hyperéosinophilie produite au cours de toutes les réactions inflammatoires et particulièrement lors des réactions d'hypersensibilité dépendantes d'IgE, soulignent un parallélisme entre l'existence de certains facteurs éosinopoïétiques dont l'origine est souvent attribuée aux lymphocytes et la prolifération massive des éosinophiles. Les recherches récentes sur les différentes pathologies à éosinophilie, abondent en illustrations saisissantes de cette conviction largement partagée : soit les lymphocytes sécrètent des cytokines de type 2 (IL-4 et IL-5) et activent la différenciation, le chimiotactisme et les fonctions effectrices de l'éosinophile, soit les mastocytes initient une réponse

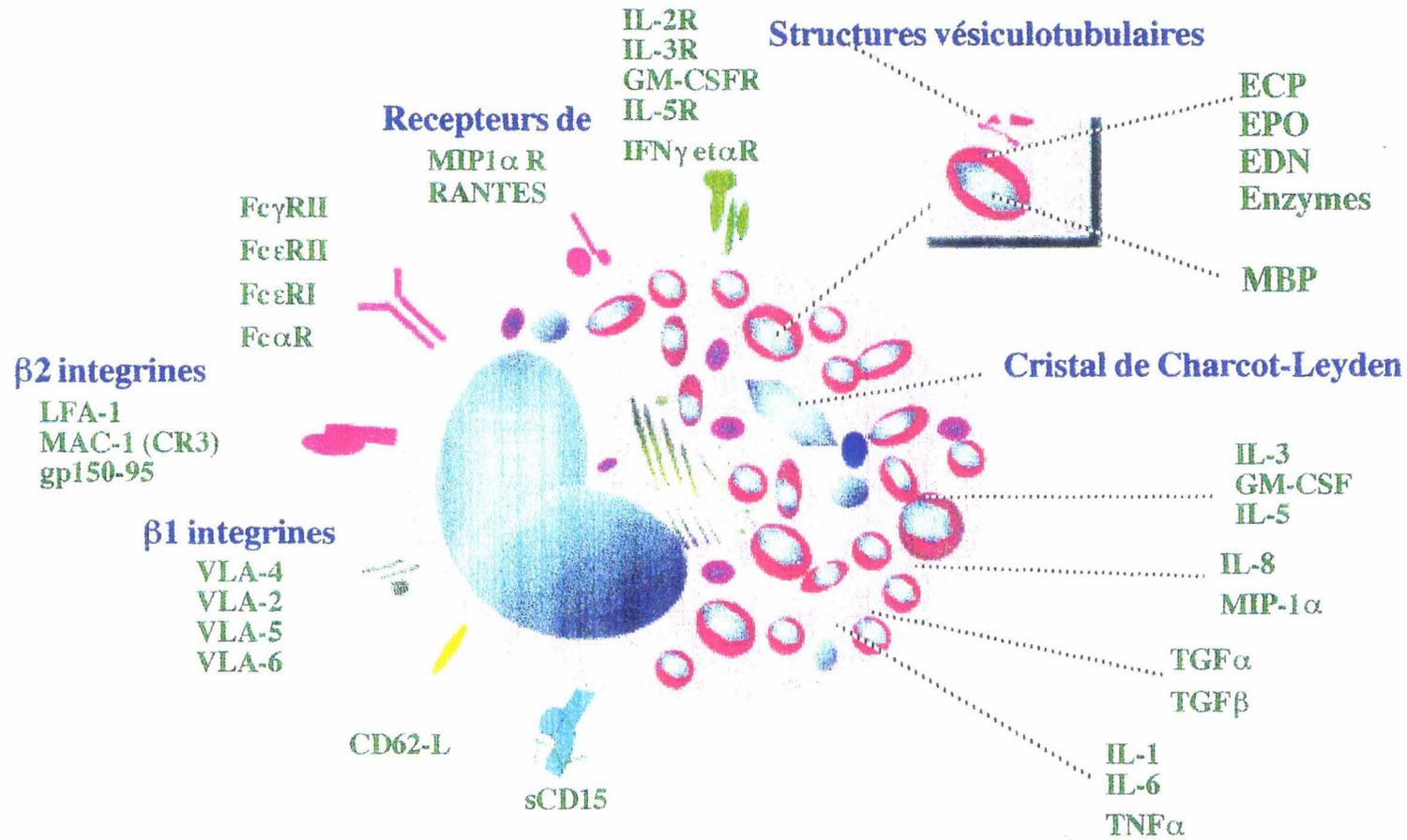


Figure 1. MORPHOLOGIE, ANTIGENES DE SURFACE, MEDIATEURS PREFORMES ET NEOFORMES DES EOSINOPHILES.

immunitaire locale grâce à leur récepteur de forte affinité pour les IgE (FcεRI) et libèrent de ce fait des médiateurs solubles responsables d'un recrutement tardif des éosinophiles. Cependant, la déplétion des lymphocytes T CD4+, lors du syndrome de l'immunodéficience acquise, causée par le HIV et la démonstration récente de l'expression du FcεRI par les éosinophiles humains, ainsi que la capacité de ces derniers à produire une variété de cytokines, sont autant d'objections qui soulignent la participation d'autres cellules dans les mécanismes aboutissant à l'éosinophilie. Ils suggèrent une participation directe de l'éosinophile dans les phases initiales de la réponse immunitaire. La capacité de l'éosinophile à synthétiser des cytokines, dont ses propres facteurs de différenciation (IL-3, IL-5 et GM-CSF) est créditée d'un pouvoir de différenciation autocrine, mais il s'agit d'un pouvoir inquiétant souvent rattaché à l'amplification de la réponse inflammatoire.

Ainsi, notre travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure caractérisation de l'éosinophile, afin de mieux élucider l'intervention de cette cellule en pathologie humaine, et peut-être dans un proche avenir, orienter la thérapeutique vers le contrôle des mécanismes de développement pathologiques de l'éosinophile.

Nous avons cherché à caractériser le récepteur des IgA chez l'éosinophile humain, puisque de telles molécules sont impliquées dans l'activation des éosinophiles et le relargage sélectif de certains médiateurs et de cytokines. Ce récepteur a été étudié dans ce travail afin de comparer son antigénicité et son homologie avec le récepteur des IgA identifié sur les neutrophiles et les monocytes.

D'autre part, l'activation préférentielle des éosinophiles par les IgA sécrétoires par rapport aux IgA sériques, nous a conduit à la recherche d'un récepteur spécifique pour le composant sécrétoire au niveau des éosinophiles humains.

Enfin, l'association de l'éosinophile à différentes pathologies et sa capacité à produire des cytokines, nous a poussé à explorer les cytokines dites de type 1 (IFNγ) et de type 2 (IL-4, IL-5, et IL-10) dans différents modèles pathologiques tels que le syndrome hyperéosinophilique, l'asthme allergique et la pemphigoïde bulleuse.

Nous définirons dans les chapitres suivants, les caractéristiques cellulaires et fonctionnelles de l'éosinophile, les différents récepteurs étudiés ainsi que certaines des pathologies où l'éosinophile semble être mis en cause.

CHAPITRE I

LE POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE

HISTORIQUE.

Début des recherches sur l'éosinophile

C'est en 1846 que l'anatomiste Wharton-jones (Charing Cross Hospital, London, England) découvrit l'existence des granulocytes et des érythrocytes dans le sang de différentes espèces incluant l'homme (Jones, 1846). L'eau et l'acide ajoutés au sang provoquaient en effet, un gonflement de la cellule qui permettaient à Wharton-jones la reconnaissance des noyaux. En 1898, Brown expliquait, dans sa publication au sujet de l'association entre la trichinose et l'éosinophilie, que plusieurs auteurs avaient remarqué, avant même les travaux de Ehrlich sur l'affinité pour l'éosine de certains leucocytes, la présence dans certaines cellules, de gros granules réfringents (Brown, 1898). Il est vraisemblable que ces auteurs avaient reconnu le même leucocyte qu'Ehrlich, baptisé ensuite par ce dernier : éosinophile. Cependant, ne disposant pas d'outils plus sophistiqués, ces chercheurs n'ont pas pu distinguer les leucocytes à gros granules (éosinophiles) des autres granulocytes. Par conséquent, le début des recherches sur l'éosinophile, commença réellement avec la démonstration par Ehrlich en 1879, de l'affinité de l'éosinophile pour les colorants acides. Ultérieurement, Ehrlich perfectionna les procédures de coloration des cellules sanguines, et adopta le terme de neutrophile pour le leucocyte neutrophile (Ehrlich, 1879; Ehrlich, 1880).

A partir de cette découverte, les recherches sur l'éosinophile furent variées et continues. L'association entre l'éosinophilie et l'asthme bronchique date ainsi de 1889 (Gollasch, 1889). Plus tard, en 1890, l'association fut faite entre l'éosinophilie et les maladies parasitaires (Crosby, 1890), les maladies cutanées (Canon, 1892; Neusser, 1892) et les maladies malignes (Reinbach, 1893).

En 1898, Brown remarqua que les patients atteints de trichinose développent une éosinophilie massive (Brown, 1898). Ces observations ont été ensuite confirmées chez l'animal (Opie et al, 1904). En 1912, après avoir découvert que les cobayes survivent à un choc anaphylactique et développent une éosinophilie massive (Schlecht et al., 1912), Schlecht a associé les éosinophiles à

l'anaphylaxie. A partir de ce moment là, l'éosinophilie a été liée aux infections parasitaires d'une part et aux réactions d'hypersensibilité d'autre part. Ceci a marqué le début d'une nouvelle ère de recherche sur l'éosinophile. Les descriptions détaillées de cette nouvelle période ont été présentées par Ehrlich et Lazarus (Ehrlich and Lazarus, 1914).

Période intermédiaire dans les recherches sur l'éosinophile.

Durant cette période, une série de controverses ont opposé les chercheurs intéressés par l'éosinophile. La relation entre l'éosinophilie tissulaire et l'anaphylaxie a été découverte. L'importance de l'éosinophile dans la phagocytose et l'ingestion des complexes antigène-anticorps ainsi que le rôle des éosinophiles dans les infections parasitaires ont été analysés .

En 1960, Rytomaa travailla sur le nombre d'éosinophiles et leur distribution chez le rat (Rytomaa, 1960). En dehors de la moelle osseuse, les éosinophiles sont localisés au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal, des tissus bronchiques et de l'utérus du rat. Ces résultats sont intéressants et prévoient le rôle de l'éosinophile dans les maladies atopiques, les maladies parasitaires de la peau, des poumons et du tractus gastro-intestinal.

Aussi, durant cette période, l'isolement des granules et l'investigation de leurs constituants occupèrent une place capitale dans ce domaine de recherche. En 1912, Petry initia les études sur les granules et décrivit les méthodes de purification des granules des éosinophiles à partir du sang de cheval traité par la trypsine à pH alcalin pendant 24 heures (Petry, 1912). Quarante années plus tard, Vercauteren isola les granules (Vercauteren et al, 1952; Vercauteren, 1953). Toutes ces études suggèrent la présence de protéines riches en arginine dans les granules. Archer et Hirsch ont eux purifié les éosinophiles du rat et du cheval et isolé les granules de ces cellules (Archer et al, 1963) .

Les investigations concernant les protéines granulaires ont été confrontées à des problèmes techniques de séparation, d'isolement et d'analyse des protéines. Finalement, c'est au cours de cette période qu'on a fait état du métabolisme de l'histamine chez l'éosinophile (Archer et al, 1963) ainsi que de l'effet toxique des protéines granulaires dans les lésions tissulaires.

Investigations actuelles sur l'éosinophile.

Depuis le début des années 70, les regards ont été pointés sur le rôle effecteur de l'éosinophile

(Gleich and Adolphson, 1986; Spry, 1988; Kay, 1979; Weller and Goetz, 1979; Butterworth, 1984; Capron M and Capron A, 1987; Silberstein and David, 1987, Beeson and Bass, 1977; Weller, 1991). Les revues de l'époque couvrent l'évolution des informations concernant le rôle des éosinophiles comme cellules tueuses de parasites (Gleich and Adolphson, 1986, Kay, 1979, Butterworth, 1984), l'isolement et la caractérisation des protéines granulaires (Gleich and Adolphson, 1986), la présentation par l'éosinophile de l'antigène aux lymphocytes T (Weller, 1991) et l'éosinophile comme cellule réservoir du VIH (Freedman et al, 1991). Les expériences testant l'hypothèse d'une fonction effectrice de l'éosinophile vis-à-vis du parasite *in vivo*, ont été réalisées grâce à des sérums anti-éosinophiles et ont montré que la déplétion des éosinophiles par ces sérums abolissent l'immunité anti-parasitaire. Les études de Butterworth ont prouvé par la suite que l'éosinophile était capable de tuer des helminthes *in vitro* (Butterworth, 1984) et que cet effet était attribué aux protéines cationiques de l'éosinophile (Gleich and Adolphson, 1986). La dégranulation de l'éosinophile se manifeste après son activation par des cytokines (Silberstein and David, 1987), par l'IgE (Capron M and Capron A, 1987) ou par l'IgA (Gleich et al, 1990). Des travaux récents ont montré que l'éosinophile est capable d'élaborer un certain nombre de cytokines dont ses propres facteurs de différenciation (Desreumaux et al, 1992).

En somme, le présent est tourné vers le rôle effecteur de l'éosinophile dans une variété de maladies comme, le syndrome hyperéosinophilique idiopathique (HES) (Prin et al, 1990), l'asthme bronchique (Frigas and Gleich, 1986; Gleich, 1990; Hamann et al, 1991) et les maladies touchant la peau (Leiferman, 1991).

Les perspectives.

Les travaux précurseurs portant sur l'influence des cytokines sur l'éosinophile montrent que des anticorps anti-IL-5 bloquent totalement l'éosinophilie chez la souris (Coffman et al, 1989). Ces expériences sont étendues à l'homme, par analyse des profils des cytokines et par blocage de l'activité des cytokines par des anticorps afin de déterminer quelle cytokine est importante dans les pathologies et quels facteurs influencent le tropisme tissulaire des éosinophiles. Différents couples de molécules (et en particulier VLA-4 sur l'éosinophile et VCAM-1 sur les cellules endothéliales) sont impliqués dans l'adhésion vasculaire sélective des éosinophiles et des basophiles (Bochner et al, 1991). La capacité de l'éosinophile à exprimer ses propres facteurs de prolifération et de différenciation, notamment l'IL-5, est prise en compte dans la recherche de nouvelles voies

thérapeutiques. La démonstration d'un récepteur de forte affinité pour l'IgE (FcεRI) au niveau de la membrane de l'éosinophile suggère une participation active du polynucléaire éosinophile dans la phase initiale de certaines maladies et particulièrement les allergies, et non dans la phase tardive comme l'ont suggéré les premiers travaux (Soussi Gounni et al, 1994). Cette nouvelle découverte ouvre de nouvelles voies de recherches thérapeutiques dans différentes pathologies où l'éosinophile semble être impliqué.

LES POLYNUCLEAIRES OU GRANULOCYTES.

Comme leur nom l'indique, les polynucléaires ou granulocytes différenciés, ont un noyau à plusieurs lobes et possèdent de nombreux granules. On peut aussi les appeler myélocytes à cause de leur origine dans la moelle osseuse. Le terme de polynucléaire est ambigu, lié au fait que le noyau, unique, est polylobé alors que dans le sens dénotatif du terme, cela signifierait qu'il y a plusieurs noyaux. Il est néanmoins entré dans la terminologie courante. Les polynucléaires représentent la majorité des leucocytes sanguins, mais sont aussi localisés à l'extérieur du système vasculaire. En fonction des besoins des tissus périphériques, le nombre et la proportion d'un type donné, peuvent s'accroître fortement.

Selon la réaction de leurs granules à différents colorants histologiques, on distingue :

Les polynucléaires neutrophiles.

Les polynucléaires neutrophiles (10-12 µm de diamètre) sont des phagocytes très mobiles. Le noyau caractéristique du neutrophile se compose de 2 à 5 lobes distincts, réunis les uns aux autres par de fins filaments de substance nucléaire; le nombre de lobules augmente avec la maturation de la cellule (figure 2). L'ingestion et la destruction des microorganismes qui envahissent les tissus est leur fonction principale. Ils sont les constituants majeurs du pus et jouent un rôle primordial dans les premiers stades de la réponse inflammatoire aiguë. Ils représentent 60 à 70% des leucocytes sanguins. Leur cytoplasme contient trois sortes de vésicules :

- *Les granulations primaires (granulations azurophiles, α)*. Ce sont les premières qui apparaissent au cours de la formation du polynucléaire neutrophile. Au microscope électronique, ces granulations sont volumineuses et denses aux électrons.

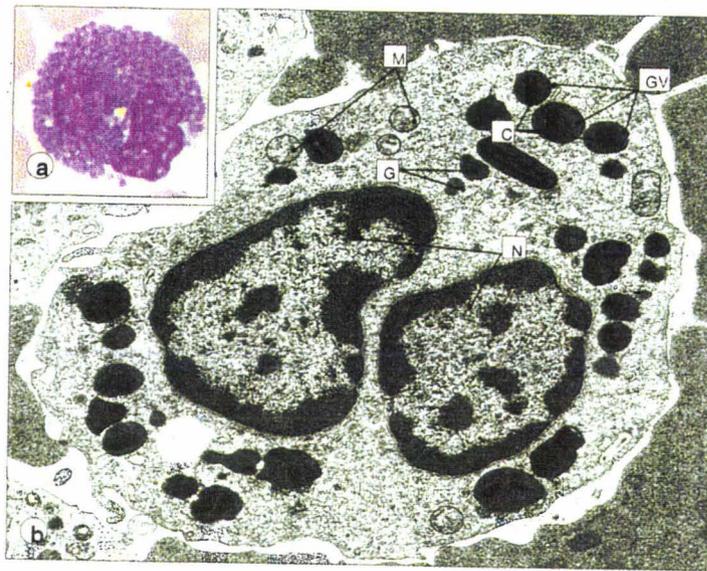
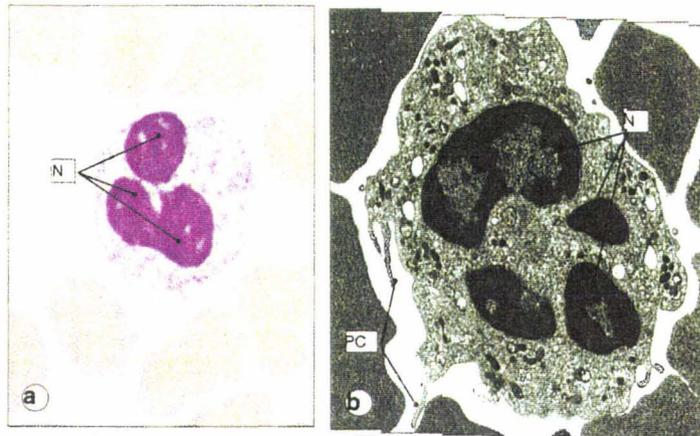
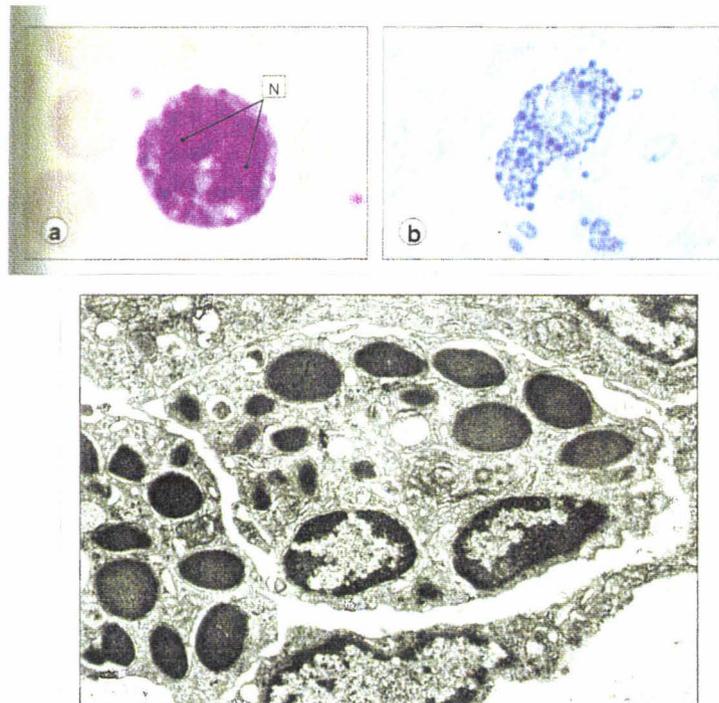
A**B****C**

Figure 2. A Polynucléaire éosinophile. a Le polynucléaire éosinophile se distingue facilement sur un frottis sanguin par ses granulations volumineuses qui se colorent en rouge à l'éosine. La plupart des polynucléaires éosinophiles ont un noyau bilobé. **b** Polynucléaire éosinophile sanguin en microscopie électronique montrant son noyau bilobé caractéristique (N), des mitochondries dispersées (M), du glycogène cytoplasmique et des granulations volumineuses (GV).

B polynucléaire neutrophile. a le neutrophile a un noyau polylobé caractéristique (N), avec un cytoplasme pâle dans lequel on ne voit qu'une petite partie des nombreuses granulations qu'il contient avec les colorations classiques. **b** polynucléaire neutrophile sanguin en microscopie électronique montrant son noyau polylobé caractéristique (N), des prolongements cytoplasmiques (PC) et des granulations de divers types dans son cytoplasme.

C Polynucléaire basophile et mastocyte. a Polynucléaire basophile avec son noyau (N) bilobé. Les granulations cytoplasmiques sont volumineuses, colorées en bleu foncé, et masquent souvent le noyau. **b** Mastocyte tissulaire ovoïde ou fusiforme avec son noyau segmenté. Les granulations qu'ils renferment donnent une coloration violette au cytoplasme sur les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine. **c** Polynucléaire basophile en microscopie électronique.

Les granulations primaires renferment des hydrolases acides, la muramidase ou lysozyme et des substances antibactériennes principalement la myéloperoxidase, qui est un marqueur utile non seulement pour mettre en évidence les granulations mais aussi pour établir la lignée cellulaire dans le diagnostic des leucémies.

- *les granulations secondaires (granulations spécifiques, β)*. Elles sont spécifiques des polynucléaires neutrophiles. Des études ultrastructurales ont montré qu'elles ont une taille, une forme et une densité variables. En plus des lysozymes, elles contiennent de la lactoferrine.

- *les granulations tertiaires (granulations nucléées, ou sécrétions)* qui n'ont été décrites que récemment et contiennent des enzymes comme l'enzyme gélatinolytique ou gélatinase, sécrétées dans l'environnement extracellulaire.

- On connaît depuis longtemps l'activité de la phosphatase alcaline comme caractéristique du polynucléaire neutrophile et utilisée comme marqueur des granulations spécifiques. Elle peut constituer le contenu d'un quatrième type de granulations, décrites sous le nom de **phosphasomes**.

Les polynucléaires basophiles.

Les polynucléaires basophiles (14-16 μm de diamètre) représentent moins de 0.5% des leucocytes sanguins. Leur noyau est bilobé, les deux lobes présentent une condensation de chromatine (figure 2). Par bien des propriétés, similitudes structurelles et fonctionnelles, les basophiles circulants ressemblent aux mastocytes qui sont présents dans les tissus et non dans la circulation sanguine. Leurs granulations cytoplasmiques sont volumineuses et riches en protéoglycanes sulfatés, héparine et chondroïtine sulfatées, leucotriène₃, histamine et autres substances qui sont libérées lorsqu'un stimulus approprié induit une dégranulation. Ce stimulus est habituellement un allergène lié aux IgE de surface. Il en résulte une réaction d'hypersensibilité de type I ou immédiate (anaphylactique). Cette réaction est la cause de la rhinite allergique (rhume des foins), de certaines formes d'asthme, d'urticaire et d'anaphylaxie.

	EPO	ECP	MBP	EDN/EPX
PM	72 kDa 2 sous-unités de 14 et 58 kDa	18-20 kDa	13.8 kDa	18 kDa
pI	>11	>11	10.9	>11
Localisation	matrice	matrice	core	matrice
ARNm	3.2-3.5 kb	1 kb	1 kb	1 kb
Gène	12 kb	-	<3 kb	-
Spécificité cellulaire	HL60 éosinophiles*	HL60 éosinophiles* cultivée en IL-5 éosinophiles	HL60 indifférenciées éosinophiles basophiles	HL60 indifférenciées HL60 éosinophiles* HL60 neutrophiles* HL60 monocytes éosinophiles neutrophiles
Fonction	-Activité peroxydasique -Toxicité vis-à-vis des microorganismes et des cellules tumorales -Induction de la dégranulation des mastocytes	-Toxicité vis-à-vis des parasite -Induction de la libération d'histamine et neurotoxine -Neutralisation de l'héparine -Activité ribonucléasique faible	-Toxique pour les parasites et les cellules de mammifères -Induit la dégranulation des basophiles et des mastocytes	-Neurotoxine -Activité ribonucléasique

*Lignée HL60 différenciée soit en éosinophiles, soit en neutrophiles ou en monocytes par des agents chimiques

Tableau 1 Principales caractéristiques des protéines cationiques de l'éosinophile.

Les polynucléaires éosinophiles.

Les polynucléaires éosinophiles (12-17 μm de diamètre) représentent 1 à 5% des leucocytes circulants chez le sujet sain. Ils ont un noyau généralement bilobé. On les reconnaît facilement par de granulations volumineuses très éosinophiles. Les granulations caractéristiques sont volumineuses, ovoïdes (0.15 à 1.5 μm de longueur sur 0.3 à 1 μm de largeur) et contiennent un cristalloïde central dense entouré d'une matrice moins dense. Chez l'homme, le cristalloïde a un réseau cubique et est constitué d'une protéine basique alcaline appelée protéine basique majeure (MBP), alors que la matrice moins dense est constituée d'autres protéines granulaires telles que : la peroxydase (EPO), qui montre une affinité de substrat différente de la myéloperoxydase du neutrophile, la protéine cationique (ECP) et la neurotoxine (EDN). Des granules contenant le cristal de Charcot-Leyden sont aussi présents au niveau du cytoplasme, ils sont homogènes et ne contiennent pas de cristalloïde central (figure 2).

De nombreux enzymes lysosomiaux ont été aussi décrits chez les éosinophiles. Parmi ceux-ci, des phosphatases acides qui se trouvent dans les petits granules sous forme inactive, des collagénases capables de dégrader le collagène I et III, ainsi que l'arylsulfatase B jouant un rôle dans le catabolisme des protéoglycanes. Les éosinophiles possèdent également des histaminases et des phospholipases D.

ONTOGENESE.

Dès les premiers jours de la vie embryonnaire, avant même que les organes ne s'individualisent, se met en place l'ébauche du système sanguin, qui commence à assurer l'oxygénation et la nutrition des tissus en formation. A l'origine de cette mise en place se trouvent les cellules endothéliales, qui donneront le revêtement interne des vaisseaux, et les cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches sont rares, environ 1 pour 10000, parmi les cellules mononucléées de la moelle osseuse. Bien qu'étant à l'origine du système cellulaire le plus prolifératif, elles restent la plupart du temps sans se diviser. Rareté et quiescence sont donc deux caractéristiques importantes de ces cellules mais aussi deux causes majeures de la difficulté de leur étude. La purification des cellules souches et la maîtrise de leur culture représentent des enjeux importants pour la clinique humaine. Le potentiel hématopoïétique du sang de cordon ombilical semble être un espoir prometteur dans les greffes pour les années à venir. Logées dans la moelle

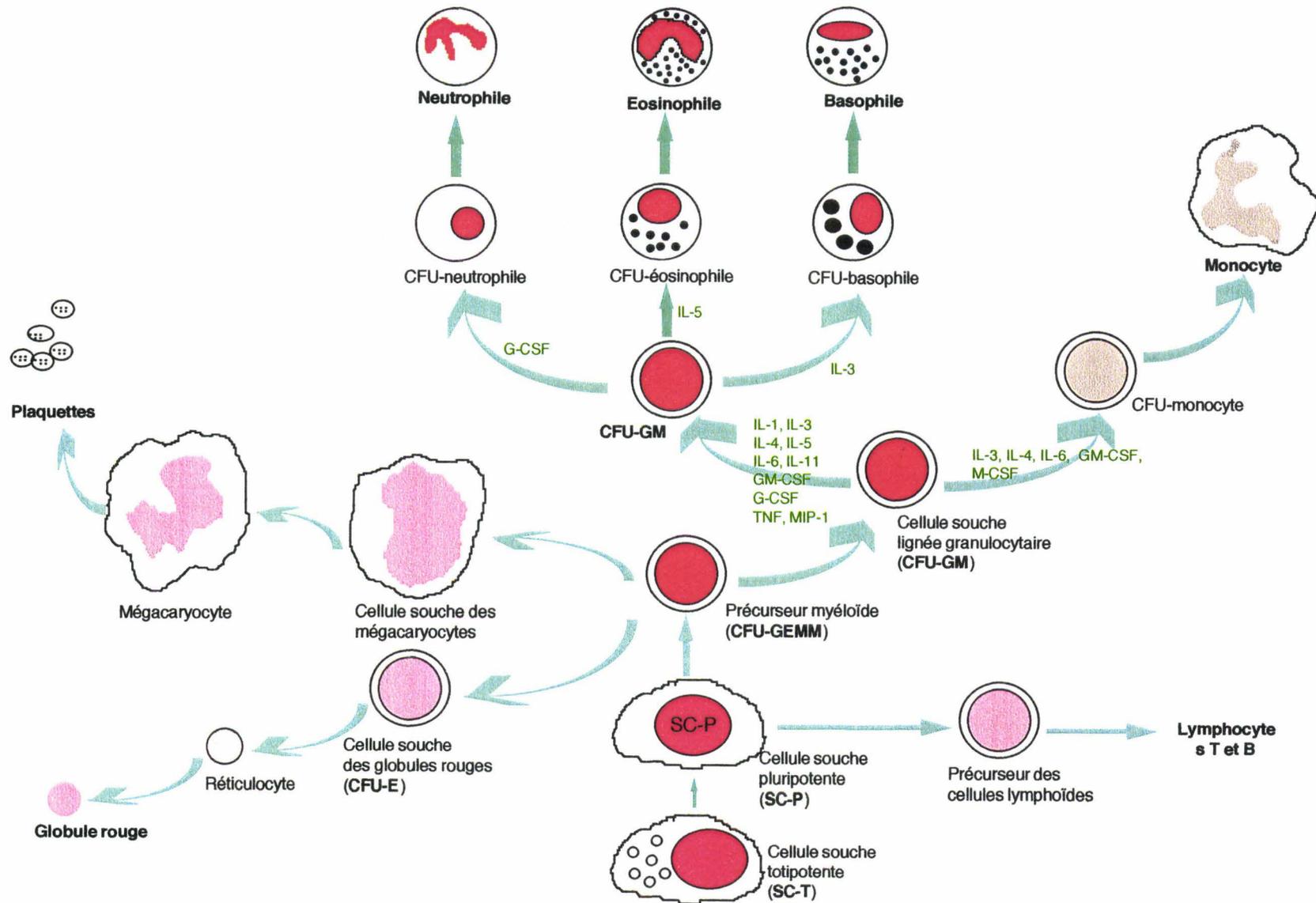


Figure 3. Ontogénèse des cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques.

osseuse chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques totipotentes (SC-T) fourniront des descendantes ou cellules souches pluripotentes (SC-P) exprimant le marqueur de différenciation cellulaire CD34 et se différencieront pour assurer la production continue des différentes cellules souches de diverses lignées hématopoïétiques qui forment des clones cellulaires appelés *Colony Forming Unit* (CFU). Toutes les cellules du système immunitaire proviennent de cellules souches pluripotentes qui s'organisent en deux principales voies de différenciation :

-la lignée lymphoïde, engendrant les lymphocytes B et T.

-la lignée myéloïde (CFU-GEMM), qui est un progéniteur mixte exprimant le CD34 et le CD33 et conduisant sous l'influence de son environnement (cellules stromales, environnement matriciel et cytokines) aux érythrocytes, mégacaryocytes/plaquettes et granulocytes/ macrophages.

Ainsi, le précurseur mixte CFU-GM granulocyte/macrophage peut se différencier soit en monoblaste conduisant aux granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) soit en myéloblaste aboutissant aux monocytes/macrophages. Les cellules souches hématopoïétiques au repos, préservent un potentiel important de prolifération et de différenciation. De la phase de quiescence aux phases effectrices, les cellules acquièrent séquentiellement les organites et les constituants cytoplasmiques et membranaires (marqueurs de différenciation) indispensables.

Deux théories se dégagent à propos de l'orientation des cellules souches vers les différentes lignées établies. En effet, selon la théorie de Till et McCulloch (Till and McCulloch, 1992), cette orientation vers une lignée déterminée plutôt qu'une autre, semble s'opérer de façon aléatoire, dite stochastique. Cette théorie a été bien étayée par les expériences de M. Ogawa (Ogawa, 1993). Mais si le hasard est à l'origine de certains choix dans la différenciation, la mise en évidence de régulations internes, en aval des progéniteurs est indispensable et explique l'homéostasie.

La deuxième théorie, plus déterministe, n'admet pas qu'un système réglé de façon aussi précise obéisse aux lois du hasard. En effet, en observant l'édifice remarquablement équilibré auquel les cellules souches donnent naissance, on est tenté de se résoudre à une programmation génétique des différentes voies de la différenciation hématopoïétique. Ceci est corroboré par le rétrocontrôle exercé par les cellules mûres monocytaires sur leurs progéniteurs (Panterne et al 1993).

Ce rétrocontrôle se fait par l'intermédiaire d'un facteur de croissance, le *macrophage-colony-stimulating factor* ou M-CSF qui est sécrété par les monocytes mûrs et qui contrôle négativement son récepteur sur les progéniteurs myélo-monocytaires. Ce rétrocontrôle diminue la production de monocytes au profit des granulocytes.

L'équipe de Walker avait suggéré une hiérarchie des différents CSF et interleukines dans le rétrocontrôle de l'expression des récepteurs de progéniteurs (Walker et al, 1985). Quatre CSFs ont été isolés et caractérisés : le Mix-CSF (IL-3), le GM-(*granulocyte/macrophage*) CSF, le G-(*granulocyte*) CSF, M-(*macrophage*) CSF, produits par différentes sources cellulaires (lymphocytes T, macrophages, cellules endothéliales et récemment l'éosinophile) et agissant de manière séquentielle sur les cellules pluripotentes sans spécificité pour une lignée donnée (Takaue et al 1990; Saeland et al, 1989), alors que le G-CSF et le M-CSF (produits par les fibroblastes) agissent sur les cellules plus matures en les soutenant respectivement dans la différenciation en granulocytes et en monocytes/macrophages.

On voit donc que si la théorie stochastique postule un mécanisme aléatoire de la différenciation dans le compartiment de la cellule souche, la deuxième théorie du contrôle de la différenciation explique les mécanismes de régulation jouant sur les progéniteurs dérivés de cette cellule.

La recherche de nouvelles cytokines a également alimenté le mythe de la cellule souche. Les cytokines peuvent avoir sur les cellules souches un rôle stimulateur (facteurs de croissance) ou inhibiteur de la prolifération et de la différenciation, ceci par fixation sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. L'équipe de A. Walker a suggéré une hiérarchie des différents colony stimulating factors (CSF) et interleukines dans le rétrocontrôle de l'expression des récepteurs des progéniteurs (Walker et al 1985). Ce contrôle peut s'exercer sur les récepteurs propres de la cytokine (*down-regulation*) ou sur le récepteur d'une autre cytokine (*down-modulation*).

Cytokines stimulant l'hématopoïèse précoce : régulation positive.

Le facteur multipotent SCF produit par les cellules du stroma médullaire semble agir à des stades très précoces de l'ontogénèse des cellules sanguines (Migliaccio et al, 1991), mais sans action spécifique sur les cellules souches; il est incapable de les sortir de l'état de quiescence. En revanche, c'est un remarquable co-stimulateur agissant en coopération ou en synergie avec de nombreuses autres cytokines pour activer différents types de progéniteurs proches de la cellule souche (Li ML et al, 1993; Berstein et al, 1991).

L'action des cytokines peut se faire de manière directe en synergie avec d'autres cytokines ou de manière indirecte, par stimulation de la sécrétion d'autres cytokines par les cellules hématopoïétiques elles-mêmes (Bot et al, 1990) ou par les cellules du microenvironnement ou cellules du stroma (Fibbe et al, 1988; Gimble et al, 1991). L'IL-1 β (Kobayashi et al, 1991), L'IL-

6 (Leary et al, 1988), l'IL-11 en synergie avec l'IL-3 (Musashi et al, 1991(a)) ou l'IL-4 (Musashi et al, 1991 (b)) agissent sur les cellules jeunes en potentialisant les effets de l'IL-3.

Les inhibiteurs de l'hématopoïèse : régulation négative.

La connaissance des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse présente des intérêts multiples :

- une meilleure compréhension de la régulation de l'hématopoïèse normale.
- une implication dans l'inhibition de l'hématopoïèse normale au cours des leucémies.
- une possibilité de mettre hors cycle les cellules souches hématopoïétiques et de les protéger ainsi de la chimiothérapie.

Les interférons (IFN) α , β et γ ont un effet inhibiteur sur la croissance des progéniteurs granulomacrophagiques (CFU-GM), érythroïdes (BFU-E) et mixtes (CFU-GEMM). Les IFN α et γ peuvent agir en synergie. Cependant, il a été remarqué que l'IFN γ augmente la production de CSF par les lymphocytes T activés et les monocytes, induisant une stimulation de la myélopoïèse. Le *transforming growth factor* β (TGF β) est un inhibiteur de l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs primitifs (Hatzfeld et al, 1925). Hatzfeld et al ont pu mettre en évidence, grâce à des oligonucléotides antisens, le fait que les progéniteurs les plus précoces sécrètent de façon autocrine du TGF β 1 qui assure leur maintien à l'état de quiescence (phase G₀). Il a été montré récemment que cette inhibition est associée à une différenciation en lignée érythroïde; le TGF β induit une conversion des BFU-E en colonies érythroïdes plus matures, les CFU-E (Krystal et al, 1994). Produits par les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK, le TNF α inhibe l'entrée en cycle des cellules souches pluripotentes CFU-S. *In vitro*, il inhibe la croissance des progéniteurs érythroïdes et granulomacrophages murins et humains. Par contre, l'effet du TNF α sur les progéniteurs CD34+ purifiés est fonction des facteurs de croissance utilisés pour stimuler leur prolifération. En effet, le TNF α inhibe la réponse proliférative du CD34+ de moelle normale, en présence d'une combinaison optimale de sept facteurs de croissance (IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, SCF et érythropoïétine) et diminue la formation de colonies de progéniteurs. En revanche, il stimule la prolifération des progéniteurs CD34+ purifiés en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF et induit leur différenciation vers les cellules dendritiques (Caux et al, 1990). Il a été également décrit que le *Macrophage-Inflammatory-Protein 1* α (MIP α) pouvait inhiber la mise en cycle des cellules souches primitives CFU-S et CFU-A (Dunlop et al, 1992) ainsi que la croissance des

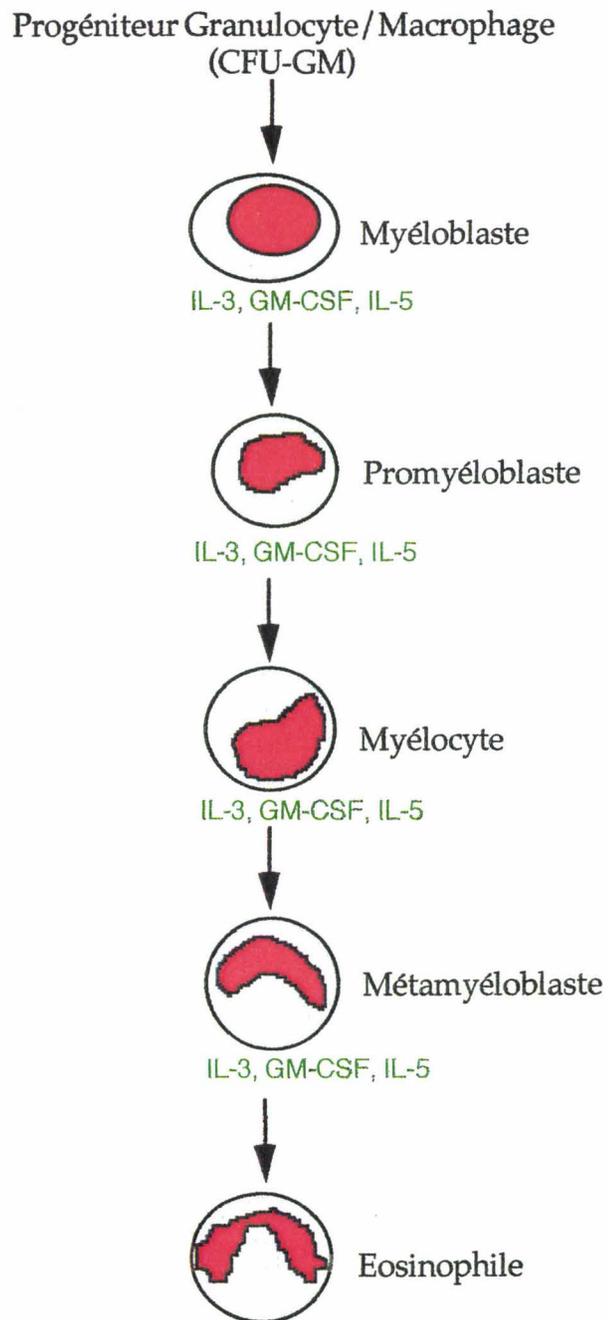


Figure 4. Ontogénèse des éosinophiles à partir d'un précurseur mixte granulocyte/macrophage.

progéniteurs CFU-GEMM, des BFU-E et des CFU-GM mais il a un effet stimulant sur les CFU-GM matures activés par le GM-CSF et le M-CSF . Il apparaît donc que le MIP α a des effets complexes, inhibant d'une part les progéniteurs les plus immatures qui sont activés par plusieurs cytokines et stimulant d'autre part les progéniteurs plus matures ne répondant qu'à une seule cytokine (Broxmeyer et al, 1993).

Comme les facteurs stimulants, les facteurs inhibiteurs peuvent être utilisés pour des applications cliniques. Il faut mentionner l'utilisation du TNF α , en raison de ses propriétés antitumorales, et des interférons dont la propriété d'inhiber le développement des cellules myéloïdes trouve son application dans le traitement des syndromes myéloprolifératifs.

ONTOGENESE DES EOSINOPHILES.

Après leur production dans la moelle osseuse, les polynucléaires éosinophiles y sont stockés pendant plusieurs jours avant d'être libérés dans la circulation où ils demeurent 3 à 8 heures avant de migrer de façon préférentielle vers la peau, les poumons et le tube digestif où ils vont séjourner pendant environ 12 jours. Ils peuvent passer dans les sécrétions du poumon et de l'intestin par migration directe. Les polynucléaires éosinophiles partagent un précurseur commun avec les autres granulocytes (CFU-GEMM) (Cline et al., 1979); leurs voies de différenciation divergent après le stade myélocyte, mais suivent des étapes de maturation comparables. Les polynucléaires éosinophiles se distinguent des neutrophiles par l'apparition des grosses granulations, pour la plupart éosinophiles, mais dont quelques-unes sont initialement basophiles. Quatre stades de précurseurs éosinophiles sont bien identifiés : les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes (figure 4). Walle et Parwadesh ont signalé que le renouvellement moyen de l'éosinophile serait de $0,22 \times 10^9$ cellules/kg/jour et que la réserve d'éosinophiles dans la moelle atteindrait $0,14 \times 10^9$ cellules/kg (Walle et al., 1979). Cette réserve importante pourrait être mobilisée au cours d'une infection parasitaire par exemple, ou contribuer à l'augmentation rapide du nombre d'éosinophiles circulants dans certaines pathologies comme le syndrome hyperéosinophilique.

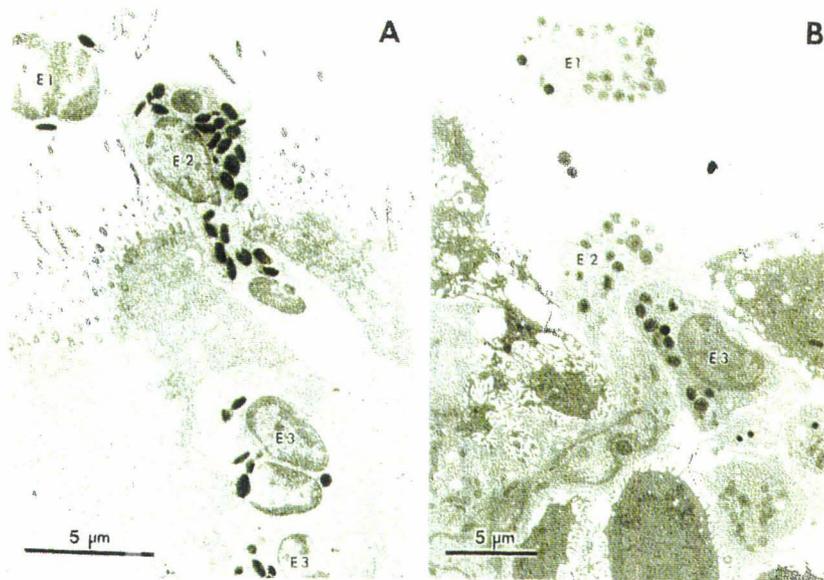


Figure 5. polynucléaire éosinophile de la cavité nasale en microscopie électronique. Les éosinophiles traversent la jonction de deux cellules épithéliales et migrent dans la cavité nasale. (A) Cobaye, (B) patient. E1 éosinophile dans la cavité nasale, E2 éosinophile traversant la jonction intercellulaire, E3 éosinophile dans l'épithélium nasal.

La notion de thymodépendance introduite en 1970 par Basten et Beeson (Basten and Beeson, 1970) a ouvert une voie de recherche sur les facteurs lymphocytaires impliqués dans les différentes voies de différenciation des cellules souches en éosinophiles. L'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 conduisent tous à la génération d'éosinophiles, mais seule l'IL-5 est spécifique de la lignée éosinophile (Sonoda et al, 1989; Clutterbuck et al, 1989; Saito et al, 1988). Ces cytokines peuvent agir seules ou en synergie, mais il semble que l'IL-3 et le GM-CSF potentialisent l'effet de l'IL-5 (Warren et al., 1988; Clutterbuck et al., 1990). L'IL-1 peut également induire la production des éosinophiles à partir des cellules souches en association avec l'IL-3 et l'IL-5 (Warren et al., 1988). De même, l'IL-2 injectée à des patients, provoque une éosinophilie sanguine, probablement en induisant la sécrétion des facteurs de différenciation de l'éosinophile par les lymphocytes T (Forni et al., 1986).

MORPHOLOGIE ET DISTRIBUTION.

Les éosinophiles matures du sang périphérique.

Contrairement à leurs précurseurs myélocytes, les éosinophiles matures du sang périphérique, ont une petite taille et un noyau bilobé avec une chromatine partiellement condensée. Des granules primaires (ou granules immatures) sans corps cristalloïde, uniformément denses aux électrons sont aussi présents (Dvorak et al., 1988). Les structures golgiennes et les ribosomes sont moins importants que chez les myélocytes. Des structures tubulovésiculaires sont variablement présentes aussi au niveau du cytoplasme. Les éosinophiles se caractérisent également par la présence de granules secondaires qui ont une avidité pour les colorants acides et qui contiennent des cristaux centraux denses aux électrons.

Les éosinophiles tissulaires activés.

Les éosinophiles tissulaires montrent des différences morphologiques comparées aux éosinophiles circulants du donneur sain (figure 5) (Dvorak et al., 1991(a)). Certaines différences morphologiques observées chez les éosinophiles tissulaires ont été aussi remarquées dans des éosinophiles purifiés à partir du sang périphérique de patients contractant le syndrome hyperéosinophilique (Dvorak et al., 1991(b)). Les éosinophiles tissulaires activés (Dvorak et al., 1990) contiennent plusieurs corps lipidiques mais moins de granules spécifiques ; le nombre des

granules primaires, un changement dans la matrice et le "core" de ces granules sont aussi importants que les structures tubulovésiculaires et les changements de forme suggérant leur mobilité. Dans de nombreuses pathologies, on assiste à des phénomènes de nécrose cellulaire qui aboutissent à la dégranulation des éosinophiles (Dvorak et al., 1990; Lieferman et al., 1990).

La numération sanguine des éosinophiles ne constitue qu'un reflet partiel de l'éosinopoïèse tissulaire et médullaire. La moelle osseuse adulte contient 3 à 3.5% d'éosinophiles dont 37% d'éosinophiles matures. La diminution de la durée de la phase G₀ permet une augmentation importante du nombre d'éosinophiles grâce à deux, voir trois divisions cellulaires qui se produisent plus rapidement qu'à la normale. La demi-vie d'un éosinophile humain dans le sang est d'environ 18 heures, et la durée de son transit est d'environ 26 heures (Steinbach et al., 1979). Par passage entre les jonctions intercellulaires endothéliales (diapédèse), les éosinophiles atteignent les tissus conjonctifs sous-jacents (Weller et al, 1991). Les mécanismes aboutissant à l'éosinophilie sanguine ou tissulaire sont loin d'être complètement élucidés. Ils font intervenir plusieurs facteurs à savoir les cytokines, les molécules d'adhésion et la chimiotaxie.

LES MOLECULES IMPLIQUEES DANS L'ADHESION ET LE CHIMIOTACTISME.

Que ce soit dans les infections parasitaires ou les manifestations allergiques, l'hyperéosinophilie est remarquable par sa fréquence, son intensité et son association aux foyers inflammatoires. La succession d'événements séquentiels (développement dans la moelle osseuse, passage dans la circulation sanguine et finalement tropisme tissulaire) et la participation de nombreuses populations cellulaires qui coopèrent entre elles grâce aux cytokines, rendent compte de l'implication des molécules d'adhésion et du chimiotactisme intervenant dans les phénomènes inflammatoires et les interactions entre les différentes cellules. L'éosinophile quitte la circulation sanguine par diapédèse sous l'influence de facteurs chimiotactiques tels que le *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (ECF-A), le LTB₄, le PAF-acéther. Les éosinophiles possèdent des récepteurs pour certains composants du complément tels que le C1q (Hamada et al, 1987), le C3a, le C5a (Gerard et al, 1989), le C3b (CR1) (Beeken et al, 1987), et le C3bi (CR3/CD11b-CD18) (Changelian et al, 1986; Fischer et al, 1986). Ces protéines interviennent en tant que stimulants des fonctions cytotoxiques (C1q), chimioattractants (C3a et C5a) mais agissent aussi dans l'adhérence et la cytotoxicité IgE-dépendante de l'éosinophile vis-à-vis du *S. mansoni*

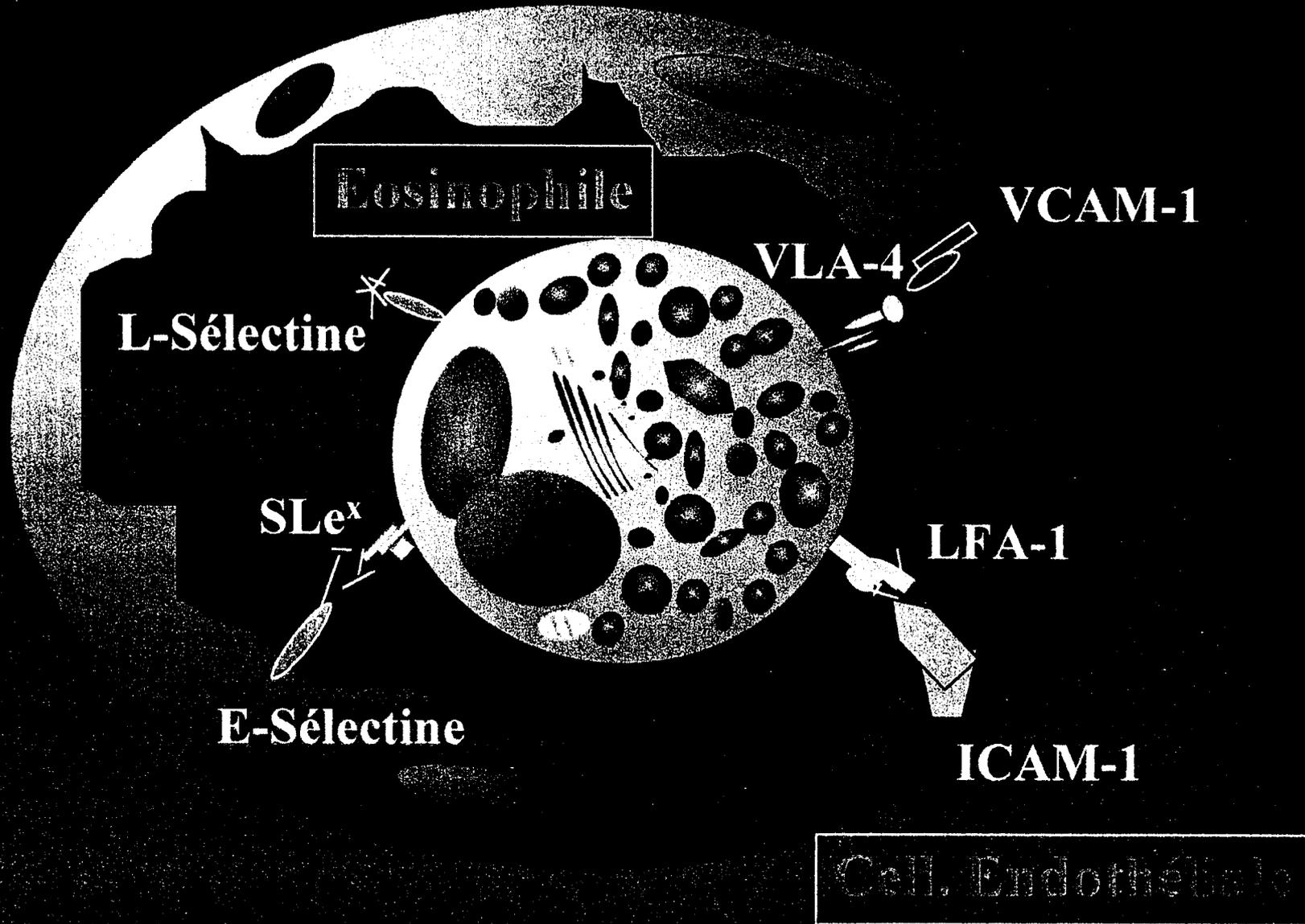


Figure 6. Les molécules d'adhésion impliquées dans la migration et la domiciliation des éosinophiles.

(CR3) (Capron et al, 1987).

L'adhérence et l'activation des éosinophiles sont sans doute deux étapes très importantes aboutissant à leur accumulation dans les foyers inflammatoires. Les substances générées au site inflammatoire activent les leucocytes circulants et l'endothélium adjacent. De cette activation résulte une induction de l'expression des molécules d'adhérence et/ou un changement de leur affinité ou de leur conformation ainsi qu'une augmentation de l'adhérence (Schleimer et al, 1991; Montefort et al, 1994). Les intégrines, les sélectines et les molécules appartenant à la famille des immunoglobulines, sont les trois familles majeures impliquées dans le phénomène d'adhésion de l'éosinophile. Les cellules endothéliales stimulées par des cytokines expriment la molécule ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*, CD54) (Czech et al., 1993), E-selectin (ELAM-1 : *Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1*) (Kyan-Aung et al., 1991), L-selectin (Mel-14/LAM-1/Leu-8/CD62L) (Neeley et al., 1993) et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). Il a été décrit que l'éosinophile présente le complexe protéique *Very Late Activation Antigen* (VLA-4) (Walsh et al, 1991; Dobrina et al, 1991).

Le VCAM-1 et son ligand $\beta 1$ intégrine, VLA-4, sont impliqués dans l'adhésion sélective des éosinophiles et non dans celle des neutrophiles qui n'expriment pas VLA-4 (Smith et al., 1993). Cependant, des expériences ont montré que, 6 heures après une injection intradermique d'un allergène, l'infiltration des éosinophiles se passe en l'absence de VCAM-1 (Kyan-Aung et al., 1991). Par ailleurs, une affluence des éosinophiles, des neutrophiles, des mastocytes et des lymphocytes a été observée lors d'une sensibilisation bronchique d'un asthmatique par un allergène, et cette infiltration cellulaire est accompagnée d'une augmentation d'expression de ICAM-1 et de E-sélectine mais pas de VCAM-1 sur les cellules endothéliales (Montefort et al., 1994). Bentley a récemment établi une corrélation entre l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 et l'infiltration éosinophile au niveau des épithéliums bronchiques, 24 heures après une sensibilisation locale (Bentley et al., 1993). A la lumière de ces résultats, il semble donc que ICAM-1 est responsable de l'infiltration leucocytaire mixte et précoce, tandis que VCAM-1 est responsable du recrutement sélectif et tardif des éosinophiles. D'autres molécules d'adhérence sont exprimées par les éosinophiles : le CD15 (Lewis X), le CDw65 (saccharide), le CD31 (PECAM-1 pour "Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) et le CD44 (Hermes/Pgp-1/récepteur de l'acide hyaluronique).

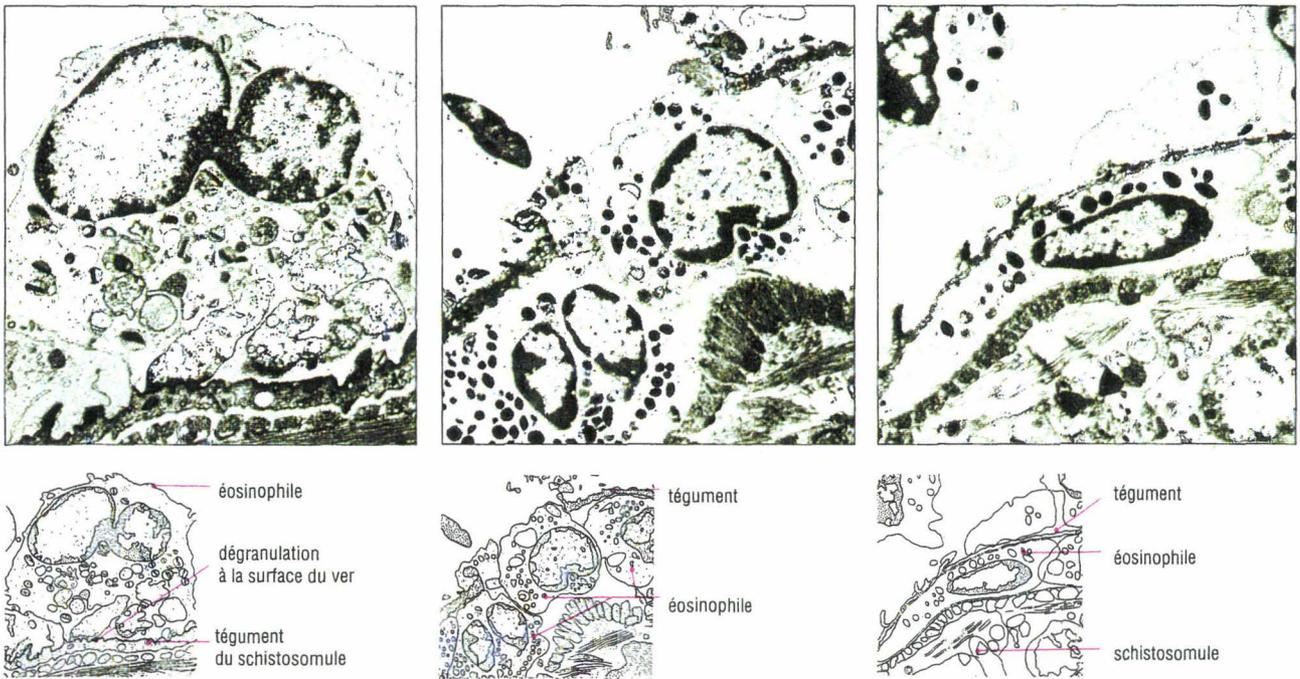


Figure 7. L'attaque des parasites par le polynucléaire éosinophile. Ces photos de microscopie électronique montrent l'adhérence de l'éosinophile et sa dégranulation à la surface de la larve (à gauche), la formation de lésions dans le tégument du parasite et la migration des éosinophiles à travers ces lésions (au milieu et à droite) (Document du Dr. D. McLaren)

(CR3) (Capron et al, 1987).

L'adhérence et l'activation des éosinophiles sont sans doute deux étapes très importantes aboutissant à leur accumulation dans les foyers inflammatoires. Les substances générées au site inflammatoire activent les leucocytes circulants et l'endothélium adjacent. De cette activation résulte une induction de l'expression des molécules d'adhérence et/ou un changement de leur affinité ou de leur conformation ainsi qu' une augmentation de l'adhérence (Schleimer et al, 1991; Montefort et al, 1994). Les intégrines, les sélectines et les molécules appartenant à la famille des immunoglobulines, sont les trois familles majeures impliquées dans le phénomène d'adhésion de l'éosinophile. Les cellules endothéliales stimulées par des cytokines expriment la molécule ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*, CD54) (Czech et al., 1993), E-selectin (ELAM-1 : *Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1*) (Kyan-Aung et al., 1991), L-selectin (Mel-14/LAM-1/Leu-8/CD62L) (Neeley et al., 1993) et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). Il a été décrit que l'éosinophile présente le complexe protéique *Very Late Activation Antigen* (VLA-4) (Walsh et al,1991; Dobrina et al, 1991).

Le VCAM-1 et son ligand $\beta 1$ intégrine, VLA-4, sont impliqués dans l'adhésion sélective des éosinophiles et non dans celle des neutrophiles qui n'expriment pas VLA-4 (Smith et al., 1993). Cependant, des expériences ont montré que, 6 heures après une injection intradermique d'un allergène, l'infiltration des éosinophiles se passe en l'absence de VCAM-1 (Kyan-Aung et al., 1991). Par ailleurs, une affluence des éosinophiles, des neutrophiles, des mastocytes et des lymphocytes a été observée lors d'une sensibilisation bronchique d'un asthmatique par un allergène, et cette infiltration cellulaire est accompagnée d'une augmentation d'expression de ICAM-1 et de E-sélectine mais pas de VCAM-1 sur les cellules endothéliales (Montefort et al., 1994). Bentley a récemment établi une corrélation entre l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 et l'infiltration éosinophile au niveau des épithéliums bronchiques, 24 heures après une sensibilisation locale (Bentley et al., 1993). A la lumière de ces résultats, il semble donc que ICAM-1 est responsable de l'infiltration leucocytaire mixte et précoce, tandis que VCAM-1 est responsable du recrutement sélectif et tardif des éosinophiles. D'autres molécules d'adhérence sont exprimées par les éosinophiles : le CD15 (Lewis X), le CDw65 (saccharide), le CD31 (PECAM-1 pour "Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) et le CD44 (Hermes/Pgp-1/récepteur de l'acide hyaluronique).

LES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LA CYTOTOXICITE.

Si l'éosinophilie a été associée à une maladie parasitaire depuis plus de 100 ans (Brown., 1898), les potentialités cytotoxiques de l'éosinophile vis à vis des parasites n'ont été découvertes que depuis une vingtaine d'années (Butterworth et al., 1975). Depuis, plusieurs études ont montré l'implication de l'éosinophile, comme cellule principale, dans la défense de l'organisme contre une variété de maladies parasitaires et surtout contre les stades tissulaires des parasites dont la taille empêche la phagocytose. D'autres cellules effectrices, les macrophages et les plaquettes participent aussi à la défense de l'hôte contre l'invasion parasitaire et permettent de contrôler la multiplication et la dissémination des parasites par un mécanisme de cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC) où les cellules tueuses, au moyen de leurs récepteurs pour les fragments Fc, se fixent aux parasites recouverts d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes cibles à la surface des parasites (figure). Trois étapes peuvent être individualisées dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophile : une première étape d'adhérence avec la cible, faisant intervenir différents facteurs (anticorps, complément et peut-être d'autres molécules), une deuxième étape de dégranulation, et enfin la lyse de la cible parasitaire par l'intermédiaire des protéines cationiques cytotoxiques contenues dans les granules de l'éosinophile (Butterworth et al, 1979; Vadas et al, 1980; Anwar et al, 1979). D'une façon générale, les réponses à médiation cellulaire sont plus efficaces contre les protozoaires intracellulaires, alors que les anticorps sont efficaces contre les parasites extracellulaires vivant librement dans le sang ou les liquides extracellulaires. Si le rôle des cellules effectrices non lymphoïdes est la destruction directe du parasite, celui des lymphocytes est loin d'être négligeable. En effet, les lymphocytes sécrètent des cytokines qui stimulent et coordonnent les mécanismes effecteurs. Les cytokines peuvent également contrôler la migration cellulaire, et induire la libération d'autres cytokines amplifiant encore les réponses inflammatoires.

L'accumulation d'éosinophiles et de macrophages autour des schistosomules morts chez les animaux immuns (Hsu et al, 1971; Von Lichtenberg et al, 1976), la diminution de l'immunité chez la souris après déplétion des éosinophiles par un sérum anti-éosinophiles (Mahmoud et al, 1975) ainsi que la protection des rats ayant reçu des éosinophiles de rats immuns (Capron et al, 1986(b)) sont autant d'arguments *in vitro*, en faveur de l'intervention réelle des éosinophiles et du mécanisme d'ADCC dans l'immunité à la réinfection. Butterworth et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer que les éosinophiles étaient capables de tuer les larves de *Schistosoma mansoni* dans un système de cytotoxicité dépendante d'IgG qui se fixent sur leurs récepteurs

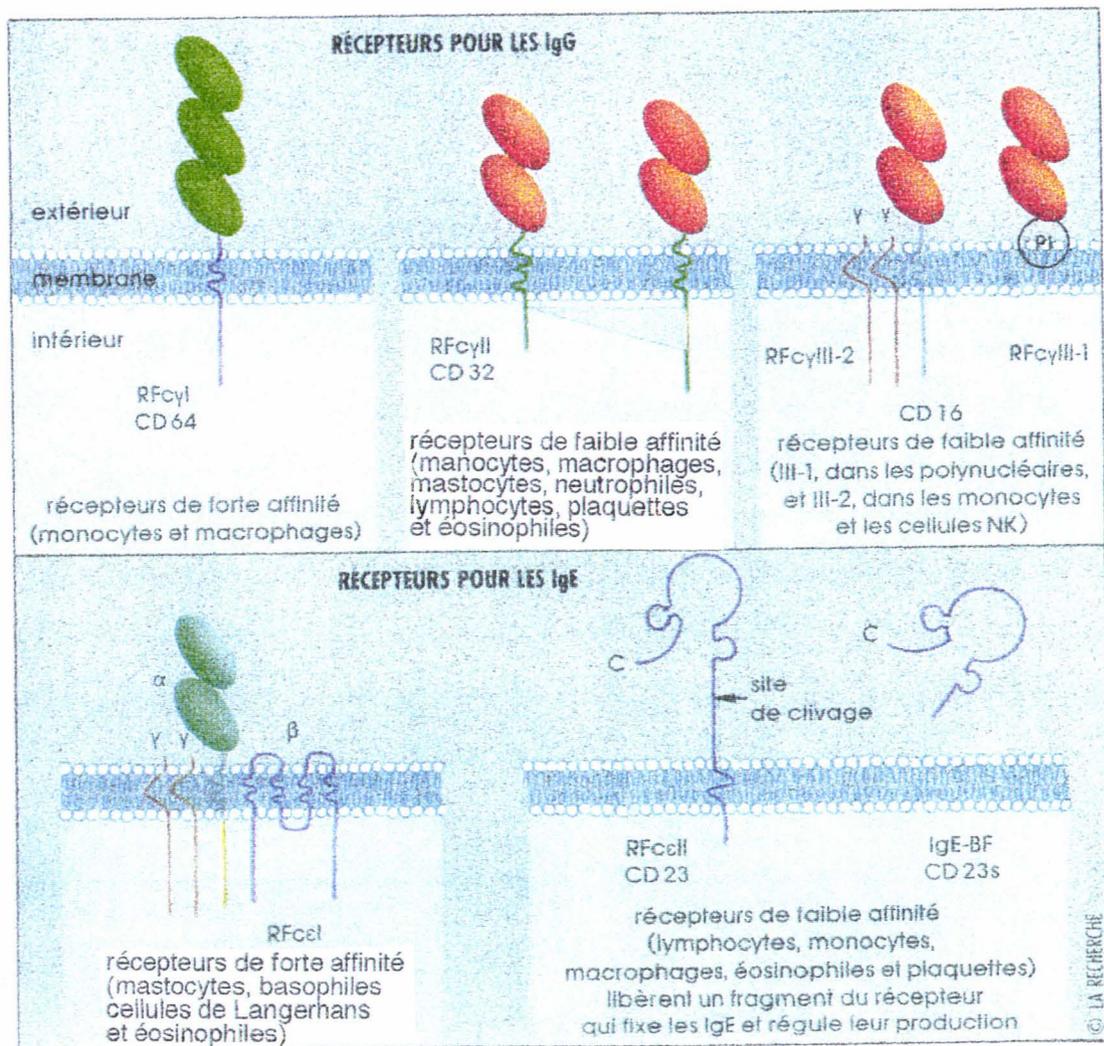


Figure 8. Comme la plupart des cellules qui participent aux réactions allergiques, les éosinophiles, expriment plusieurs types de récepteurs (RFc), présentés ici pour la portion Fc des immunoglobulines. Des récepteurs différents permettent l'interaction de ces cellules avec des IgG et des IgE ainsi que les IgA non présentés ici. Les RFc pour les IgE (RFcε) et les RFc pour les IgG (RFcγ) comprennent des récepteurs de forte affinité (RFcI) et des récepteurs de faible affinité (RFcII et III). Tous ces récepteurs sont capables d'activer les cellules qui les expriment lorsqu'ils sont agrégés par l'interaction avec des anticorps complexés à leur antigène.

LES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LA CYTOTOXICITE.

Si l'éosinophilie a été associée à une maladie parasitaire depuis plus de 100 ans (Brown., 1898), les potentialités cytotoxiques de l'éosinophile vis à vis des parasites n'ont été découvertes que depuis une vingtaine d'années (Butterworth et al., 1975). Depuis, plusieurs études ont montré l'implication de l'éosinophile, comme cellule principale, dans la défense de l'organisme contre une variété de maladies parasitaires et surtout contre les stades tissulaires des parasites dont la taille empêche la phagocytose. D'autres cellules effectrices, les macrophages et les plaquettes participent aussi à la défense de l'hôte contre l'invasion parasitaire et permettent de contrôler la multiplication et la dissémination des parasites par un mécanisme de cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC) où les cellules tueuses, au moyen de leurs récepteurs pour les fragments Fc, se fixent aux parasites recouverts d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes cibles à la surface des parasites (figure). Trois étapes peuvent être individualisées dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophile : une première étape d'adhérence avec la cible, faisant intervenir différents facteurs (anticorps, complément et peut-être d'autres molécules), une deuxième étape de dégranulation, et enfin la lyse de la cible parasitaire par l'intermédiaire des protéines cationiques cytotoxiques contenues dans les granules de l'éosinophile (Butterworth et al, 1979; Vadas et al, 1980; Anwar et al, 1979). D'une façon générale, les réponses à médiation cellulaire sont plus efficaces contre les protozoaires intracellulaires, alors que les anticorps sont efficaces contre les parasites extracellulaires vivant librement dans le sang ou les liquides extracellulaires. Si le rôle des cellules effectrices non lymphoïdes est la destruction directe du parasite, celui des lymphocytes est loin d'être négligeable. En effet, les lymphocytes sécrètent des cytokines qui stimulent et coordonnent les mécanismes effecteurs. Les cytokines peuvent également contrôler la migration cellulaire, et induire la libération d'autres cytokines amplifiant encore les réponses inflammatoires.

L'accumulation d'éosinophiles et de macrophages autour des schistosomules morts chez les animaux immuns (Hsu et al, 1971; Von Lichtenberg et al, 1976), la diminution de l'immunité chez la souris après déplétion des éosinophiles par un sérum anti-éosinophiles (Mahmoud et al, 1975) ainsi que la protection des rats ayant reçu des éosinophiles de rats immuns (Capron et al, 1986(b)) sont autant d'arguments *in vitro*, en faveur de l'intervention réelle des éosinophiles et du mécanisme d'ADCC dans l'immunité à la réinfection. Butterworth et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer que les éosinophiles étaient capables de tuer les larves de *Schistosoma mansoni* dans un système de cytotoxicité dépendante d'IgG qui se fixent sur leurs récepteurs

Fc γ RII/CD32 (Butterworth et al, 1975, Butterworth et al, 1977). L'équipe de M. Capron démontra par la suite que d'autres isotypes d'anticorps pouvaient induire la cytotoxicité des éosinophiles. Les IgE peuvent être incriminées dans les mécanismes d'ADCC, en se fixant sur différents récepteurs : le récepteur de faible affinité Fc ϵ RII/CD23 (Capron et al., 1981), les récepteurs de type lectine Mac-2/ ϵ BP (Truong et al., 1993) et récemment le récepteur de forte affinité Fc ϵ RI (Soussi Gounni et al., 1994). La cytotoxicité dépendante d'anticorps peut être médiée par des IgA (Capron et al, 1988(a)) qui se fixent sur le récepteur pour le fragment Fc des IgA (Fc α R). Il faut souligner que ces récepteurs ne s'expriment que sur une sous-population d'éosinophiles dont l'état d'activation gouverne leurs potentialités cytotoxiques. En effet, si la cytotoxicité IgG dépendante, est effectuée par les éosinophiles normodenses (Butterworth et al., 1975), les cytotoxicités IgE et IgA dépendantes sont restreintes aux éosinophiles hypodenses (Capron et al., 1988(a)). Ce phénomène semble être dû au nombre de récepteurs présents sur les éosinophiles qui est lié à leur densité (Capron et al., 1985(a)) ainsi qu'à la modulation de ces récepteurs par des cytokines (Capron et Prin, 1990) et des facteurs chimiotactiques (Capron et al., 1988).

Cytotoxicité IgG-dépendante.

L'utilisation de cellules et de fractions sériques purifiées provenant d'individus immuns a permis d'évaluer la participation sélective des isotypes d'anticorps dans la cytotoxicité contre les schistosomules. Dans le cas de l'éosinophile, ces études ont permis de révéler encore une fois l'hétérogénéité de ses capacités cytotoxiques. Les anticorps IgG, présents dans le sérum immun chauffé, furent les premiers incriminés dans cette cytotoxicité (Butterworth et al., 1977). L'inhibition de l'effet des IgG, par des complexes immuns, confirme le rôle effecteur de ces immunoglobulines (Butterworth et al., 1977). Cependant, plus récemment il a été démontré que la cytotoxicité IgG dépendante de l'éosinophile n'est pas imputable à l'ensemble des sous-classes d'IgG. En effet, dans le modèle du rat, la cytotoxicité IgG2a-dépendante des éosinophiles est observée uniquement au stade précoce de l'immunité acquise. Le côté transitoire de ce phénomène n'est pas dû à la disparition des anticorps anti-parasite d'isotype IgG2a, mais à l'apparition d'anticorps bloquants (Grzych et al, 1982). Non seulement les anticorps IgG2c s'avèrent capables d'inhiber la cytotoxicité *in vitro*, mais leur administration inhibe également l'effet protecteur conféré au rat par le transfert passif d'anticorps IgG2a (Grzych et al, 1982). Chez l'homme, les

IgG1 et les IgG3 purifiés de sérums de patients bilharziens, se sont révélés les plus efficaces dans les réactions de cytotoxicité par les éosinophiles (Khalife et al, 1989). Quant aux anticorps IgG2, ils présentent une dualité fonctionnelle suivant l'état d'activation des éosinophiles : ils sont effecteurs en présence des éosinophiles activés et bloquants lorsqu'ils sont en présence des éosinophiles normaux (Khalife et al, 1989). D'autres anticorps de classe IgM et IgG4 dotés d'une activité bloquante ont été trouvés chez l'homme (Khalife et al., 1986; Hagan et al., 1985). Ainsi, l'activité cytotoxique d'un sérum et sa capacité d'activer les cellules inflammatoires résultent à la fois de la spécificité des anticorps pour des antigènes exposés par le schistosomule et de leur isotypie, réalisant un équilibre entre les anticorps effecteurs et les anticorps bloquants.

Cytotoxicité IgE-dépendante.

A la lumière des connaissances récemment acquises, il est maintenant reconnu que les éosinophiles sont incriminés dans les mécanismes de la réponse allergique et de défense vis-à-vis des parasites par une activation IgE-dépendante. Le rôle des IgE dans les mécanismes de cytotoxicité fut mis en évidence dans un système de cytotoxicité faisant intervenir les éosinophiles comme cellules effectrices et le sérum immun. Ces résultats furent obtenus d'abord chez le rat (Capron et al., 1981), puis chez l'homme (Capron et al., 1984). A partir de ces travaux effectués dans le cadre de l'immunité parasitaire, la recherche du ou des récepteurs pour les IgE au niveau de l'éosinophile a été entreprise. Le rôle des IgE dans l'activité anti-parasitaire des éosinophiles fut suspecté pour diverses raisons : 1) La labilité à la chaleur du facteur sérique, 2) l'analyse statistique révélant une corrélation positive entre la capacité de cytotoxicité du sérum immun et la présence d'anticorps IgE spécifiques dirigés contre les schistosomules, 3) l'inhibition de la cytotoxicité IgE-dépendante par de l'IgE agrégée par rapport aux IgG agrégées qui n'ont aucun effet, 4) l'absence de compétition croisée entre les récepteurs pour les IgG et les récepteurs pour l'IgE. Ce mécanisme, contrairement à la cytotoxicité IgG-dépendante, est restreint aux éosinophiles hypodenses. Il semble que dans le cas de la cytotoxicité IgE, plusieurs récepteurs ou corécepteurs exprimés par l'éosinophile soient impliqués dans l'interaction entre l'éosinophile et le schistosome. D'autre part, l'expression par l'éosinophile de différentes molécules d'adhérence, a permis de suggérer leur intervention dans les mécanismes de cytotoxicité. En effet, il avait été démontré tout d'abord grâce à des expériences d'inhibition de cytotoxicité, que le CR3 (CD11b) était impliqué dans l'adhérence et la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles hypodenses vis-

à-vis des schistosomules (Capron et al., 1987) alors que, au contraire, ni les anticorps anti-CD11a (chaîne α du LFA-1) ni les anticorps anti-CD18 (chaîne β commune des intégrines) n'inhibaient l'adhérence et la cytotoxicité, même si ces molécules sont exprimées par l'éosinophile (Capron et al., 1987). Ces études suggéraient un rôle de corécepteur pour la chaîne α de CR3 et vis-à-vis des récepteurs de l'IgE, dans les mécanismes effecteurs de l'éosinophile, cependant la nature du ligand potentiel de CR3 au niveau du schistosome n'avait pas été envisagée. Récemment, au sein de notre laboratoire, l'exploration des molécules d'adhérence au niveau du Schistosome a permis la détection d'une molécule présentant des réactions croisées avec la famille des sélectines ainsi que de son ligand oligosaccharidique Lewis^x (CD15) (Manuscrit en cours de préparation). D'autres travaux ont montré l'existence du déterminant CD15 chez le schistosome (Srivatsan et al., 1992). Ces études soulignent les interactions multiples entre le schistosome et les cellules de l'hôte et ouvrent une nouvelle voie de recherche prometteuse quant à la maîtrise des phénomènes biologiques intervenant dans la domiciliation et le développement du parasite.

Cytotoxicité IgA-dépendante.

La participation des récepteurs pour les IgA, dans les mécanismes d'ADCC, a été recherchée par des méthodes expérimentales similaires. La préincubation des éosinophiles humains avec des IgA agrégées ou des IgA monomériques inhibait d'une manière significative la cytotoxicité induite par un sérum immun (Capron et al., 1988 (a)). Des études de cytofluorométrie en flux (Capron et al., 1988), ainsi que des études biochimiques montrent l'existence d'au moins un récepteur pour le fragment Fc des IgA (Monteiro et al, 1993).

L'immunisation par l'antigène parasitaire Sm28GST, provoque chez le rat et chez la souris une réponse IgA sérique. Chez le rat, ces anticorps IgA induisent une cytotoxicité dirigée contre le schistosomule, en présence d'éosinophiles. (Grezel et al, 1993)

Stimulus	Médiateurs libérés	Références
IgG	ECP, pas d'EPO EDN	Khalife et al, 1986; Tomassini et al, 1991; Capron et al, 1987 Abu-Ghazaleh et al, 1989
IgE	EPO, pas d'ECP pas d'EDN	Khalife et al, 1986; Tomassini et al, 1991; Capron et al, 1987 Abu-Ghazaleh et al, 1989
IgA	EPO, ECP EDN	Tomassini et al, 1991; Capron et al, 1987; Capron et al, 1988

Tableau 2. Libération sélective des protéines cationiques de la matrice granulaire de l'éosinophile

PHENOMENES DE DEGRANULATION ET LIBERATION SELECTIVE DES MEDIEATEURS.

L'étude des mécanismes effecteurs de l'immunité vis-à-vis des schistosomes révèle une véritable immunodéviaton s'exprimant par l'absence de mécanismes conventionnels de cytotoxicité à médiation lymphocytaire et par une restriction isotypique des anticorps. L'activation de l'éosinophile par différents isotypes d'anticorps (IgG, IgE et IgA) et l'analyse de la libération des protéines cationiques ainsi que la génération des médiateurs néoformés montrent un phénomène de dégranulation à la fois sélectif et dynamique. En effet, le pontage des récepteurs membranaires permet une libération des médiateurs de l'éosinophile. Ce mécanisme a été bien étudié dans le cas des mastocytes, après une activation médiée par le récepteur pour les IgE de forte affinité (Fc ϵ RI). L'activation peut se manifester après pontage direct de ce récepteur par des anticorps anti-récepteur, ou par l'addition, après liaison du ligand avec son récepteur (IgE par exemple), d'un second stimulus (allergène ou anticorps anti-IgE par exemple). Cette deuxième approche expérimentale a été également utilisée dans le cas des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques qui portent des immunoglobulines de surface *in vivo* (Capron et al, 1985 (a)). Ainsi, les éosinophiles portant des IgE de surface et purifiés à partir de patients bilharziens (Khalife et al, 1986) ou allergiques (Tomassini et al, 1991) libèrent la peroxydase granulaire (EPO) après incubation avec un antigène spécifique ou un anticorps monoclonal anti-IgE. Cependant, aucune détection d'EPO n'a été obtenue après addition des anticorps anti-IgG que ce soit avec des éosinophiles de patients bilharziens, allergiques ou non allergiques (Khalife et al, 1986; Tomassini et al, 1991). Dans ces mêmes conditions expérimentales, la libération d'autres protéines cationiques (ECP et MBP) de l'éosinophile a été étudiée grâce à des dosages radioimmunologiques. La MBP est relarguée par l'éosinophile après addition d'un antigène spécifique ou d'un anti-IgE (Capron et al, 1987), suggérant que ces deux protéines granulaires (EPO et MBP) peuvent être libérées après une activation IgE-dépendante. Dans les mêmes conditions l'activation des éosinophiles par de l'anti-IgE n'est pas suivie d'une libération d'ECP, alors que des quantités significatives d'ECP ont été détectées après activation par des anticorps anti-IgG (Khalife et al, 1986; Tomassini et al, 1991). Récemment, il a été montré que l'activation des éosinophiles par des anticorps anti-IgA permet le relargage simultané de l'EPO, l'ECP (Tomassini et al, 1991) et de l'EDN (Abu Ghazaleh et al, 1989). Il semble que comme dans le cas des protéines cationiques, d'autres médiateurs de l'éosinophile soient soumis au même phénomène

de relargage sélectif. Le PAF est relargué par les éosinophiles après activation par des anticorps anti-IgE, cependant que des anticorps anti-IgG sont sans effet (Capron et al, 1988 (b)).

Ce phénomène de libération des protéines cationiques et des médiateurs qui ne répond pas à la loi du tout ou rien et qui se manifeste par son hétérogénéité de dégranulation soulève plusieurs hypothèses explicatives : 1) les signaux transductionnels délivrés par les trois récepteurs des immunoglobulines (FcεR, FcγR et FcαR) présents sur les éosinophiles sont différents. 2) Des cas de déficience en protéine cationique ont été signalés, ce qui suggère que l'hétérogénéité des éosinophiles purifiés à partir de patients hyperéosinophiliques puisse être liée à l'hétérogénéité des granules. 3) Une libération graduelle des médiateurs avec des temps de relargage très différents pourrait aussi expliquer cette sécrétion différentielle des médiateurs.

L'EOSINOPHILE COMME CELLULE PRESENTATRICE D'ANTIGENE.

Si la synthèse de l'IL-1 par les éosinophiles (Weller et al, 1993) ne semble pas représenter, dans l'état actuel de nos connaissances, un des paramètres majeur de la présentation de l'antigène, l'expression par l'éosinophile de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-DR) (Lucey et al, 1989 (b)) pourrait jouer par contre, un rôle incontestable dans cette présentation. En effet, il a été démontré que les éosinophiles pouvaient jouer un rôle de cellules présentatrices d'antigène en stimulant la prolifération lymphocytaire (Weller et al, 1993). L'IL-1 pourrait donc avoir un rôle potentiel de facteur co-stimulant les lymphocytes durant la présentation d'antigène.

L'EOSINOPHILE COMME CELLULE RESERVOIR DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH).

Depuis plusieurs années, on connaît l'existence de l'immunité à médiation humorale, dont les effecteurs sont les molécules d'anticorps produites par les lymphocytes B, et de l'immunité à médiation cellulaire caractérisée par exemple par les réactions d'hypersensibilité retardée. Si les lymphocytes T CD4+ semblent jouer un rôle essentiel dans ces deux types de réponses immunitaires, l'analyse phénotypique des lymphocytes n'avait pas permis de mettre en évidence l'existence de sous-populations T différentes et douées d'activités fonctionnelles distinctes.

En 1986, Mosmann et ses collaborateurs (Mosmann et al, 1986), démontraient que des lignées

T spécifiques de divers antigènes sont hétérogènes quant aux cytokines qu'elles peuvent produire après stimulation et proposaient l'existence de deux sous-populations Th1 et Th2 ayant des capacités différentes de produire diverses cytokines. Depuis, plusieurs chercheurs ont étudié les profils des cytokines et leur relevance dans différentes pathologies, notamment dans le cas des infections par le VIH. Plusieurs cas d'association du VIH et d'une hyperéosinophilie ont été rapportés (Caterino-de- Araujo, 1994). La sécrétion sélective de l'IL-4 et de l'IL-5, qui contrôlent la migration et la différenciation des éosinophiles, par les cellules Th2 durant l'infection, peuvent être à l'origine de cette éosinophilie observée (Caterino-de- Araujo 1994).

A côté de ces données cliniques, d'autres équipes ont démontré que les éosinophiles eux-mêmes peuvent être une cible potentielle du virus VIH qui peut se répliquer *in vitro* dans ces cellules (Freedman et al 1991). Certaines souches de virus VIH sont incapables d'infecter l'éosinophile laissant supposer que comme pour les macrophages (Cordonnier et al, 1989) et les mégacaryocytes (Sakaguchi et al, 1991), il y a un tropisme des différentes souches du VIH pour les éosinophiles. Par ailleurs, seuls les éosinophiles cultivés à partir de cellules souches de la moelle osseuse sont infectables alors que les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques sont réfractaires à l'infection *in vitro*. L'activation et la différenciation des éosinophiles par l'apport de l'IL-5 exogène peut être à l'origine de la réplication du virus VIH à l'intérieur de ces cellules. Une différence d'expression de la molécule CD4 entre les éosinophiles hypodenses et normodenses peut aussi expliquer cette infectabilité différentielle.

En plus de l'effet cytopathogène direct qui peut entraîner une destruction cellulaire des éosinophiles, comme conséquence directe de l'infection et de la réplication, un autre mécanisme de destruction cellulaire indirect peut être évoqué où l'infection d'autres cellules conduit à une dérégulation de la synthèse des cytokines notamment celles influençant la production et la différenciation des éosinophiles. Les cytokines telles que l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'éosinophile et plusieurs données soulignent l'effet anti-apoptotique de ces cytokines sur l'éosinophile (Stern et al, 1992).

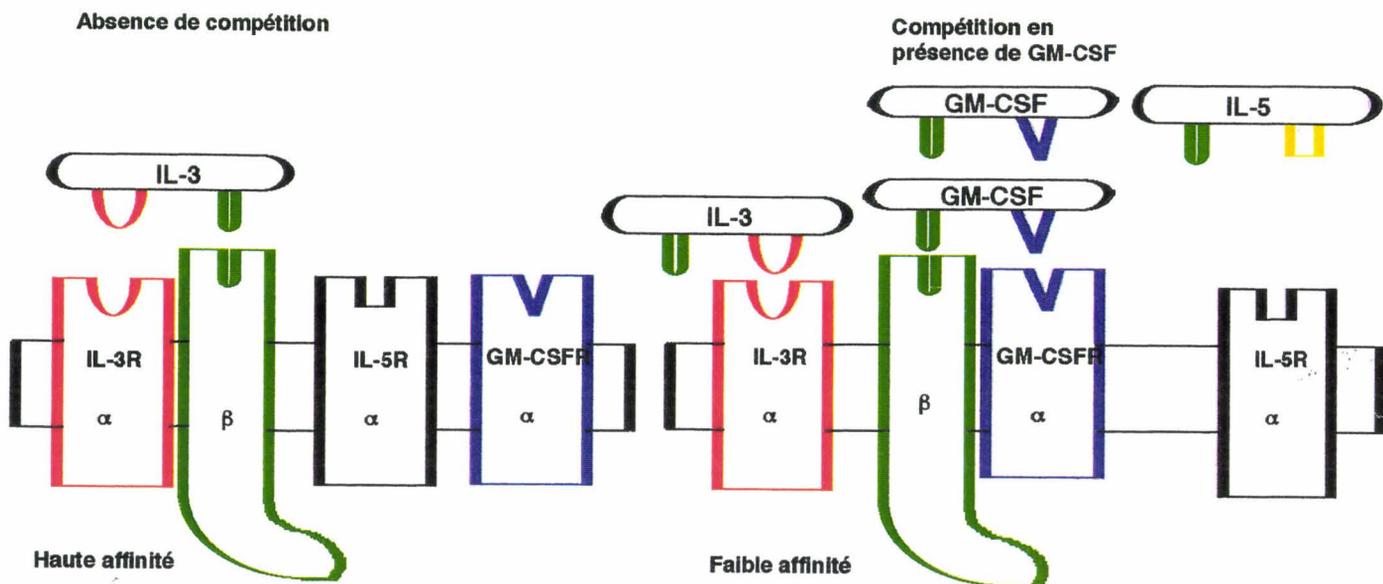


Figure 9. Représentation schématique d'une inhibition de la liaison de l'IL-3 à son récepteur par le GM-CSF ou l'IL-5. L'IL-3 se lie à son récepteur de haute affinité en absence de compétiteur. En présence de grande quantité de GM-CSF, la chaîne β forme un complexe de haute affinité avec la chaîne α du récepteur de GM-CSF. Il en résulte une perte de liaison de l'IL-3 pour son récepteur.

EOSINOPHILE ET CYTOKINES

L'éosinophile est une cellule cible des cytokines.

La communication entre les cellules est assurée par une interaction directe entre les cellules et/ou par l'intermédiaire de facteurs solubles : les cytokines. Aujourd'hui, les cytokines représentent un langage universel dans le dialogue mené entre les différentes cellules de l'organisme et du système immunitaire en particulier. L'éosinophile n'échappe pas à cette règle puisqu'il possède à sa surface des récepteurs spécifiques pour différentes cytokines. Il voit ses activités modifiées à la suite du message délivré par la cytokine.

Récepteurs de l'IL-3, du GM-CSF et de l'IL-5.

L'IL-3 comme l'IL-5 et le GM-CSF initient leurs activités biologiques en se fixant sur des récepteurs spécifiques présents à la surface de l'éosinophile. Ces interleukines ont été découvertes par différentes équipes dans des modèles murins et divers acronymes leurs ont été attribués en fonction des cellules cibles sur lesquelles elles agissent et de l'activité biologique qu'elles induisent. L'obtention de ces trois cytokines sous forme de protéines recombinantes purifiées a permis d'en établir les principales caractéristiques. La production et la différenciation des éosinophiles sont contrôlées par ces trois facteurs hématopoïétiques qui ont une activité chevauchante (Figure 9) au cours de la différenciation des éosinophiles (Lopez et al 1989). Cependant, seule l'IL-5 paraît restreinte et sélective de la lignée éosinophile en induisant la stimulation de la production et de la maturation des éosinophiles (Sonoda et al, 1989; Clutterbuck et al, 1989). La redondance de l'action du GM-CSF, de l'IL-3 et de l'IL-5 a été surtout bien étudiée dans le cas de l'éosinophile qui est influencé par ces cytokines. Le nombre et la fonction des éosinophiles sont influencés de la même manière par chacune de ces cytokines (Sanderson et al, 1992). La caractérisation des récepteurs pour le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5 a permis d'expliquer cette redondance d'action et sa causalité. Les travaux de Gesner et ses collaborateurs (Gesner et al, 1988) ont démontré que la liaison de l'IL-3 radiomarquée à son récepteur sur la lignée cellulaire KG-1 est inhibée par le GM-CSF. Cette compétition entre le GM-CSF et l'IL-3 a été confirmée par la suite sur les monocytes (Park et al, 1989; Elliott et al, 1989), sur les éosinophiles (Lopez et al, 1989), les basophiles (Lopez et al, 1990) et a été étendue à l'IL-5 (Lopez et al, 1990; Lopez et al, 1991). Cette réaction croisée entre le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5 a été mise à jour par plusieurs

observations : 1) il s'agit d'un phénomène membranaire détecté au niveau de la surface cellulaire, en absence de toute transmodulation de récepteur. 2) Elle se manifeste seulement pour les cellules qui ont une affinité pour plus d'une des cytokines précitées. 3) C'est un phénomène naturellement hiérarchisé (Lopez et al, 1991). 4) Les expériences d'éluion acide montrent que cette compétition croisée se déroule en surface.

Ces observations ont suggéré que les récepteurs de ces trois cytokines (GM-CSF, IL3 et IL5) contiennent un ou plusieurs éléments en commun. Les bases moléculaires de ce phénomène de compétition ont été élucidées par le clonage des différentes chaînes de ces récepteurs et ont montré que chaque récepteur est formé d'au moins deux chaînes : une chaîne α spécifique pour le ligand mais ayant une faible affinité (Gearing et al, 1989; Kitamura et al, 1991; Tavernier et al, 1991; Murata et al, 1992), et une chaîne β commune qui ne lie aucune cytokine mais permet une haute affinité quand elle est cotransfectée avec la chaîne α (Hayashida et al, 1990). Ce modèle suppose que la concentration de la chaîne β est limitante et que le complexe $\alpha\beta$ n'est formé qu'en présence du ligand. Par ailleurs, la chaîne β semble jouer le rôle de transduction du signal.

Le gène du récepteur de l'IL-3 a été récemment cloné. Il est composé de deux chaînes chez l'homme et de trois chaînes chez la souris (Hara et al, 1992; Gordman et al, 1990; Itoh et al, 1990; Kitamura et al, 1991).

Chez la souris, le récepteur pour l'IL-3 est composé d'une chaîne α spécifique de l'IL-3 de faible affinité qui peut s'associer soit à une chaîne β fixant l'IL-3 avec une faible affinité, soit à une chaîne β commune aux récepteurs de l'IL-5 et le GM-CSF et qui ne fixe aucune cytokine.

-La chaîne α : la molécule mature a un poids moléculaire apparent de 60 à 70 kDa et cinq sites potentiels de glycosylation au niveau du domaine extracellulaire. Son homologie avec la chaîne humaine n'est que de 47% en acides nucléiques et 30% au niveau des acides aminés. La transfection de la chaîne α , dans les cellules COS ou CTLL-2, induit à elle seule un récepteur de faible affinité pour l'IL-3.

-Les Chaines β : deux ADNc ont été isolés, l'un codant pour une molécule fixant l'IL-3 avec une faible affinité (AIC2A) et l'autre ne fixant aucune cytokine (AIC2B). L'AIC2B code pour une molécule de 896 acides aminés et possède 91% d'homologie avec l'AIC2A. L'association de la chaîne α et des deux chaînes β chez la souris crée deux récepteurs fonctionnels de haute affinité pour l'IL-3.

L'analyse des chaînes α et β du récepteur pour l'IL-3 montre qu'elles possèdent toutes les caractéristiques propres à la superfamille des récepteurs pour les hématopoïétines. Ces caractéristiques sont partagées par les récepteurs pour l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, le GM-CSF, le LIF/HILDA, l'érythropoïétine et l'hormone de croissance.

Chez l'homme, le récepteur pour l'IL-3 est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . La chaîne α a un poids moléculaire de 70 kDa et 6 sites potentiels de glycosylation, ce qui explique la différence avec le poids moléculaire calculé à partir de la séquence génomique (4.1254 kDa). Cette chaîne α possède dans sa partie extracellulaire N terminale, 100 acides aminés possédant une homologie significative avec la chaîne α du GM-CSF et de l'IL-5. De même, une courte séquence d'acides aminés située juste après le domaine transmembranaire est remarquablement conservée dans ces trois récepteurs. La chaîne α du récepteur pour l'IL-3 possède une homologie de 54% au niveau des acides aminés avec la chaîne α du récepteur pour le GM-CSF et 43% avec celle de l'IL-5.

La chaîne β humaine a été clonée à partir de lignées hématopoïétiques. Cette chaîne ne fixe ni l'IL-3, ni aucune autre cytokine.

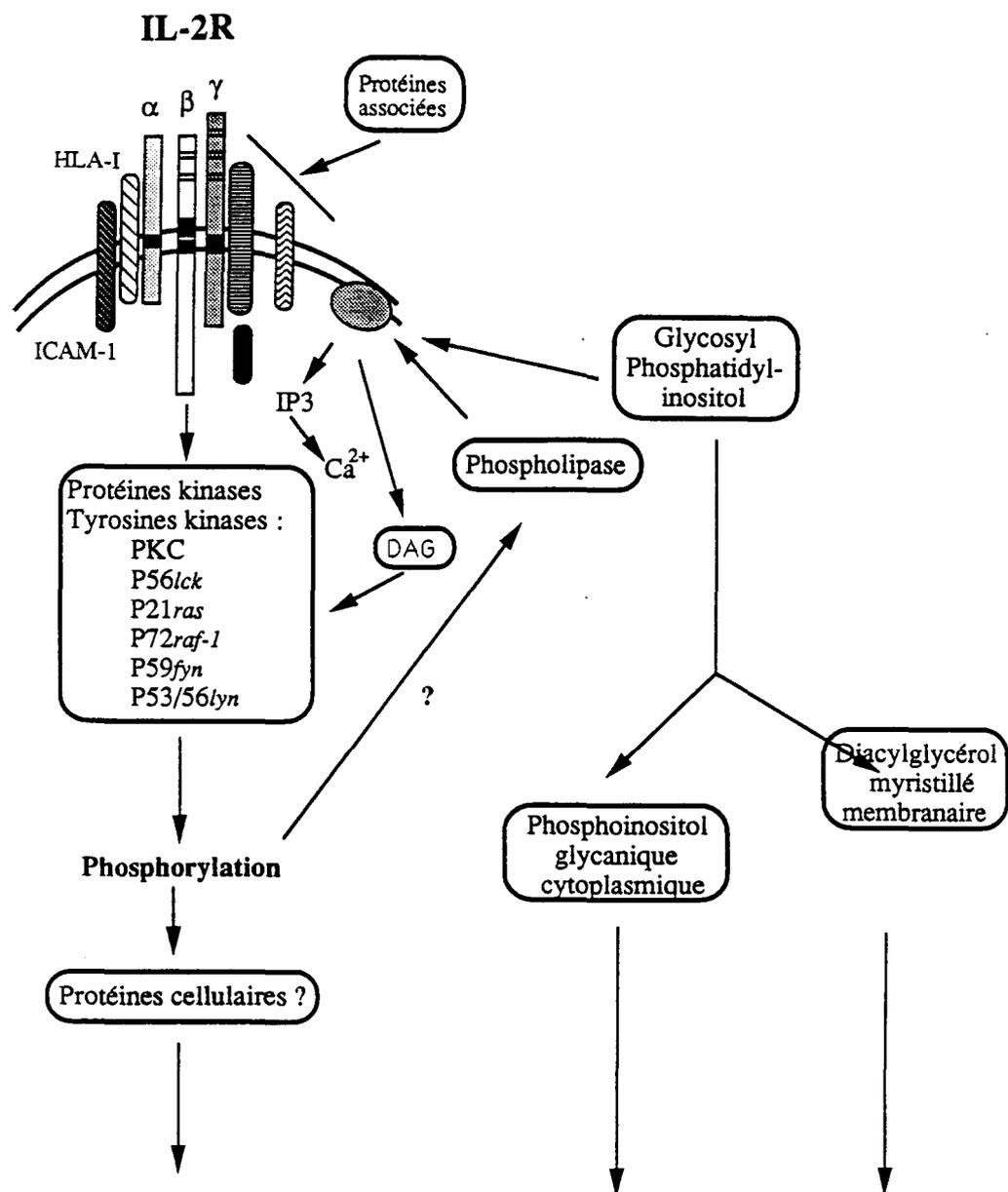
Le GM-CSF comme l'IL-3 possède un spectre d'activités très large. Connu pour son effet sur la prolifération et la différenciation des monocytes/macrophages et des neutrophiles, il induit également la différenciation des mégacaryocytes, des érythrocytes en présence d'érythropoïétine et des éosinophiles. Il fait partie des cytokines dont l'intérêt thérapeutique est le plus évident. Les récepteurs humains et murins pour le GM-CSF sont composés d'une chaîne α spécifique pour le ligand et d'une chaîne β ne fixant aucune cytokine. Ils possèdent les caractéristiques permettant de les rattacher à la superfamille des récepteurs pour les hématopoïétines. La chaîne α murine mature de 358 acides aminés dérive d'un précurseur de 387 acides aminés qui est séparé du peptide signal de 29 acides aminés. Elle partage moins de 35% d'homologie au niveau des acides aminés avec son homologue chez l'homme. La chaîne β est l'AIC2B commune au récepteur pour le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5.

Chez l'homme, la chaîne α a un poids moléculaire de 43.728 kDa, ce qui correspond à la moitié de celui observé après pontage de GM-CSF radiomarqué sur des cellules HL-60. Cette différence est probablement due aux onze sites de glycosylation contenus dans la partie extracellulaire. Quant à la

chaîne β humaine elle est partagée avec le récepteur pour l'IL-3 et l'IL-5. Ses principales caractéristiques ont été citées plus haut.

Outre les molécules d'adhérence qui permettent une infiltration site-spécifique des éosinophiles au niveau tissulaire, l'IL-5 semble présenter des propriétés chimiotactiques pour les éosinophiles. Promoteur de leur activation, l'IL-5 est synthétisée par les éosinophiles eux-mêmes au niveau tissulaire (Desreumaux et al, 1992). L'existence d'un récepteur spécifique de l'IL-5 a été suggérée dès 1980, par les travaux de Tominiga et ses collaborateurs (Tominiga et al, 1980). 1990 correspond à la date du clonage moléculaire du récepteur de l'IL-5 murin (Takaki et al, 1990). C'est une glycoprotéine de 415 acides aminés, glycosylée dans sa partie extracellulaire, hydrophobe dans sa région N terminale, dotée d'un seul segment transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique ne présentant pas de séquence consensus pour des activités kinases. En 1991, les bases moléculaires soutenant l'hypothèse de l'existence de récepteurs à haute et faible affinités ont été définies (Devos et al, 1991). Ces travaux ont permis de définir le récepteur pour l'IL-5 comme étant un complexe bicaténaire : le récepteur de faible affinité (chaîne α de 60 kDa) liant le ligand et les protéines de 130-140 kDa (chaîne β identique à la chaîne β de l'IL-3R et à celle du GM-CSFR) incapables de lier les ligands par elles-mêmes. L'association des deux chaînes α et β génère un récepteur de forte affinité pour l'IL-5. Contrairement à la chaîne α murine de 60 kDa, qui ne lie l'IL-5 qu'avec une faible affinité, la chaîne α humaine homologue peut, par elle même, lier l'IL-5 avec une affinité plus forte. Le second composant de l'IL-5R humain serait identique à la chaîne β du récepteur humain liant le GM-CSF (Tavernier et al, 1991) ou l'IL-3 avec une haute affinité de 120 à 130 kDa.

Ce partage de la sous-unité α entre ces trois récepteurs liant différentes cytokines peut affecter leur liaison mutuelle. Ainsi la liaison d'un ligand à son récepteur peut conduire à la formation d'un complexe qui sera internalisé et mener à une déplétion des chaînes β , ce qui empêchera la formation subséquente de récepteurs de haute affinité pour les autres ligands (Lopez et al, 1991).



ACTIVATION, PROLIFERATION, DIFFERENCIATION

Figure 10. Schéma des mécanismes de transduction induits par l'IL-2 chez les lymphocytes T. la fixation de l'IL-2 à son récepteur entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol avec la formation d'inositol triphosphate et de diacylglycérol secondée par la mobilisation du calcium intracellulaire et une activation de protéines kinases dépendantes de phospholipides, du calcium et de la protéine kinase C. Une autre voie d'activation indépendante de calcium, induit rapidement la phosphorylation de résidus tyrosines de la chaîne β et de multiple protéines qui lui sont associées. Les protéines $p59^{fyn}$ et $p53/56^{lyn}$ peuvent être également activées par l'IL-3 mais pas par l'IL-6. La stimulation par l'IL-2 fait également appel au glycosyl phosphatidylinositol, qui sous l'action d'une phospholipase est hydrolysé en diacylglycérol myristylé localisé à la membrane et en phosphoinositol glycanique libéré dans le cytosol.

Récepteur de l'interleukine-2.

Plusieurs travaux ont suggéré un effet de l'IL-2 sur la physiologie de l'éosinophile. 1) L'injection de l'IL-2, lors d'un traitement du cancer, produit une éosinophilie massive mais réversible (Lotze et al, 1986). 2) Les éosinophiles de ces patients semblent être activés et correspondent aux éosinophiles hypodenses (Silberstein et al, 1989). 3) Le sérum des patients souffrant d'un syndrome hyperéosinophilique idiopathique est très riche en récepteur soluble de l'IL-2 (IL-2R p55) (Prin et al, 1990). 4) Une corrélation positive entre le pourcentage d'éosinophiles hypodenses et le récepteur soluble de l'IL-2 chez ces patients a été démontrée (Prin et al, 1991). Ces observations suggèrent un effet direct ou indirect de l'IL-2 sur l'éosinophile et ont conduit récemment à la caractérisation de ce récepteur IL-2R (p55) à la surface des éosinophiles, spontanément (Plumas et al, 1991) ou après stimulation avec le GM-CSF et l'IL-3 (Riedel et al, 1990). Cependant l'expression de ce récepteur ne peut être liée à une pathologie donnée, puisque les éosinophiles de patients allergiques ou parasités l'expriment également ainsi que les éosinophiles de patients ayant un syndrome hyperéosinophilique associé ou non à un syndrome myéloprolifératif (Plumas et al, 1991). Par ailleurs, selon le temps de stimulation, l'IL-2 paraît avoir un effet double sur la différenciation des cellules de sang de cordon ombilical en éosinophiles. Présente pendant toute la culture, l'IL-2 inhibe la formation d'éosinophiles, alors qu'ajoutée pendant seulement les six premiers jours de culture, cette cytokine augmente la différenciation. Cette régulation semble être médiée par la modulation de l'expression d'un certain nombre de cytokines ou de récepteurs spécifiques (Plumas et al, 1992).

On connaît actuellement trois composants du récepteur pour l'IL-2 : le récepteur de basse affinité ($K_d \sim 10\text{nM}$) qui correspond à la chaîne α (p55 IL-R ou CD25); le récepteur d'affinité intermédiaire ($K_d \sim 1\text{nM}$) qui est composé de la chaîne polypeptidique β (IL-2R β ou p70 IL-2R) et la chaîne γ (IL-2R γ ou p64 IL-2R), et le récepteur de haute affinité ($K_d \sim 10\text{pM}$) qui correspond à l'association non covalente de ces trois sous-unités (figure 10).

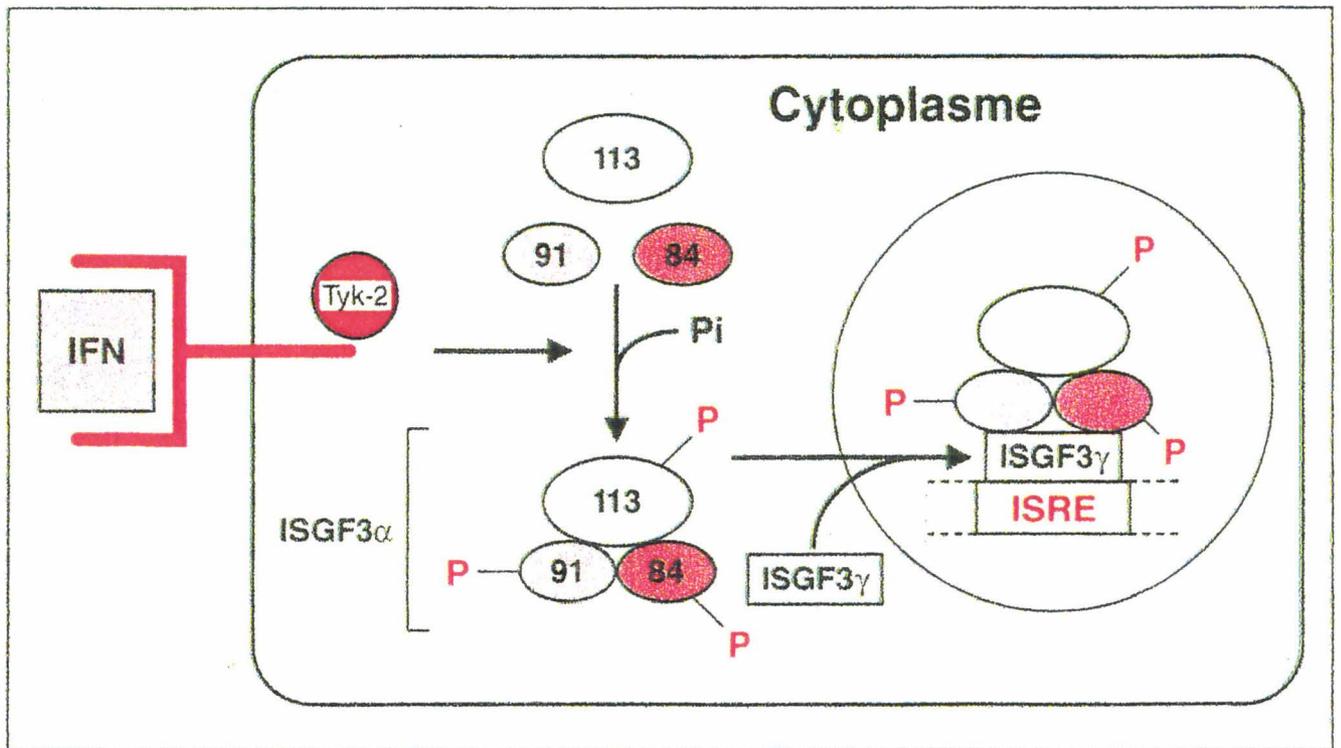


Figure 11 . Schéma de la réponse transcriptionnelle à l'interféron α . la fixation d'IFN α à son récepteur entraîne, par l'intermédiaire de la tyrosine kinase Tyk-2, la phosphorylation de résidus tyrosines au niveau des trois sous-unités ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*), p113 et p91/84. Celles-ci forment alors un complexe qui se fixe à l'ISGF γ de 48 kDa, le tout étant transloqué dans le noyau. L'affinité de ce complexe pour l'élément d'ADN ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*) est au moins 20 fois supérieure à celle de l'ISGF γ seul. De plus les sous-unités ISGF 3 α possèdent des domaines d'activation transcriptionnelle qui permettent la stimulation de la transcription des gènes avoisinants. L'effet de l'IFN α requiert aussi la présence d'une autre tyrosine kinase appelée Jak1. Les protéines p84 et p91 sont issues de l'épissage différentiel du transcrit d'un même gène. Les protéines p91 et p113 ont été dénommées Stat, pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*.

Récepteur de l'interféron α .

Les interférons se distinguent des autres cytokines par leur activité antivirale qu'ils mettent en place en amont du système immunitaire. A cette activité antivirale s'ajoutent des activités antiprolifératives et immunomodulatrices, dues à la grande variété des protéines induites par les interférons. Ce sont des puissants agents pharmacologiques protéiques qui servent de messagers intercellulaires. Les techniques du génie génétique ont permis de les produire en grande quantité et d'en tester les effets thérapeutiques. L'IFN α fut la première cytokine découverte et produite par génie génétique en 1975. Son adaptation comme nouvelle conduite thérapeutique chez les patients hyperéosinophiliques a révélé son potentiel antiprolifératif et modulateur vis-a-vis des éosinophiles. Comme les autres ligands protéiques l'IFN α exerce son action grâce à un récepteur spécifique situé à la surface de la membrane cellulaire. Les travaux menés au sein de notre laboratoire ont abouti à la mise en évidence de l'ARN messager codant pour un récepteur pour l'IFN par la RT-PCR, ainsi que de la protéine correspondante au niveau de l'éosinophile. De plus les études fonctionnelles ont montré l'effet direct de l'IFN α sur l'éosinophile humain. En effet, la présence de l'IFN α empêche la libération des médiateurs (EDN, EPO et ECP) de l'éosinophile activé par des immuns complexes IgA ou IgE ainsi que celle de l'IL-5 libérée par les éosinophiles. L'IFN α est de plus capable d'inhiber la fonction cytotoxique antiparasitaire de l'éosinophile (Aldebert et al, sous presse)

Synthèse des cytokines par l'éosinophile (association avec les granules).

Les capacités de synthèse, voire de libération des différentes cytokines par les éosinophiles, sont l'une des découvertes les plus récentes qui vient modifier le schéma classique d'interactions cellulaires notamment au niveau tissulaire. Les cytokines, jusqu'à présent considérées comme provenant des lymphocytes T, peuvent être synthétisées par d'autres cellules. Des travaux récents montrent que comme les cellules NK ou les mastocytes, l'éosinophile est capable de synthétiser et de libérer différentes cytokines.

L'IL-1 α .

Del Pozo et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer par la technique d'hybridation *in situ*, que les éosinophiles murins expriment l'ARNm codant pour l'IL-1 α (Del Pozo et al,

1990). La capacité des éosinophiles humains à synthétiser l'IL-1 α a été mise à jour par Weller et ses collaborateurs (Weller et al, 1993). Les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques expriment l'ARNm avant et après leur stimulation par le PMA. La protéine a été aussi détectée par la technique d'immunomarquage.

TGF α .

Le TGF α a été démontré chez des patients ayant un carcinome associé à une éosinophilie tissulaire (Wong et al, 1990). Une colocalisation de l'ARNm et de la protéine a été observée au niveau des éosinophiles tissulaires infiltrant la tumeur et confirmée par la suite chez les éosinophiles de patients ayant un syndrome hyperéosinophilique.

TGF β .

Les travaux de Wong et ses collaborateurs ont démontré qu'en plus du TGF α les éosinophiles sont capables de synthétiser et de sécréter le TGF β (Wong et al, 1991). Le TGF β a aussi été localisé dans les éosinophiles issus de patients ayant la maladie de Hodgkin (Kadin et al, 1993).

GM-CSF.

Les éosinophiles normodenses obtenus par gradient de métrizamide sont capables d'exprimer l'ARNm codant pour le GM-CSF et de le traduire en protéine (Moqbel et al, 1991) après stimulation avec soit de l'IFN γ ou du calcium ionophore A23187. L'identification des éosinophiles qui expriment le GM-CSF a été réalisée par combinaison de l'hybridation *in situ* et l'immunomarquage grâce à un anticorps (EG2) dirigé contre l'ECP de l'éosinophile. Les travaux de Kita et ses collaborateurs ont aussi démontré la synthèse du GM-CSF par les éosinophiles stimulés par l'ionomycine (Kita et al, 1991). L'ARNm du GM-CSF a été détecté *in vivo* dans des éosinophiles en association avec des polypes nasaux (Ohno et al, 1991). Cette cytokine semble être localisée au niveau du cristalloïde des granules de l'éosinophile (Levi-Schaffer et al, 1994).

L'IL-3.

Les études de stimulation de l'éosinophile par l'ionomycine ont révélé que l'éosinophile est capable de sécréter dans le même surnageant de l'IL-3 et du GM-CSF (Kita et al, 1991). En

revanche, jusqu' à maintenant, aucune étude n'a rapporté la présence du messenger pour l'IL-3 au niveau de l'éosinophile que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

L'IL-5.

Les travaux de Desreumaux et ses collaborateurs ont montré la présence d'ARNm pour l'IL-5 dans les éosinophiles infiltrant la muqueuse duodénojunale de patients atteints de la maladie de coeliaque, suggérant que les éosinophiles pouvaient eux-même constituer une source d'IL-5 (Desreumaux et al, 1992). L'expression de l'ARNm pour l'IL-5 *in vivo* par les éosinophiles a été aussi rapportée dans le cas des lavages bronchoalvéolaires obtenus à partir des patients asthmatiques (Broide et al, 1992) ainsi que dans d'autres pathologies comme le syndrome hyperéosinophilique (Desreumaux et al, 1992) ou la dermatite atopique (Tanaka et al, 1994). L'analyse ultrastructurale par microscopie électronique montre que cette cytokine est localisée au niveau des granules de l'éosinophile et est libérée après stimulation avec les IgA, les IgE ou les IgG (Dubucquoi et al, 1994).

L'IL-6.

L'ARNm pour l'IL-6 a été démontré dans les éosinophiles normodenses par la technique d'hybridation *in situ* (Hamid et al, 1992). 20% d'éosinophiles non stimulés sont capables d'exprimer le messenger pour l'IL-6, alors que ce pourcentage augmente après stimulation avec l'IFN γ . La libération de l'IL-6 dans les surnageants de culture a été détectée avant et après stimulation (Hamid et al, 1992). Ces observations ont été confirmées par la technique de RT-PCR et l'hybridation *in situ* (Melani et al, 1993). L'analyse par fractionnement cellulaire montre que l'IL-6 est associée au cristalloïde des granules (Moqbel et al, 1994).

L'IL-8.

L'analyse de la production de l'IL-8 par les éosinophiles a fait l'objet de travaux récents. Les éosinophiles stimulés par le calcium ionophore libèrent l'IL-8 dans les surnageants de culture (Moqbel et al, 1994). Cette libération est inhibée en présence d'inhibiteurs de synthèse protéique comme le cyclohexamide et la cyclosporine. La présence de l'ARNm a été démontrée par la technique de RT-PCR. Là aussi, l'immunomarquage suggère une association de cette cytokine avec les granules de l'éosinophile (Braun et al, 1993).

Le TNF α .

En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, des travaux récents ont rapporté que 44 à 100% des éosinophiles purifiés à partir de sang de patients hyperéosinophiliques ou de donneurs sains expriment l'ARNm pour le TNF α (Costa et al, 1993). La libération spontanée du TNF α par les éosinophiles de patients atopiques est inhibée par un prétraitement à la cyclohexamide. Le TNF α a été localisé aussi au niveau de la matrice des granules (Beil et al, 1993).

Le Macrophage Inflammatory Protein -1 α (MIP-1 α).

Les travaux de Costa et ses collaborateurs ont démontré qu'un très grand nombre d'éosinophiles (39 à 91%) obtenus à partir de patients hyperéosinophiliques expriment l'ARNm pour le MIP-1 α (Costa et al, 1993).

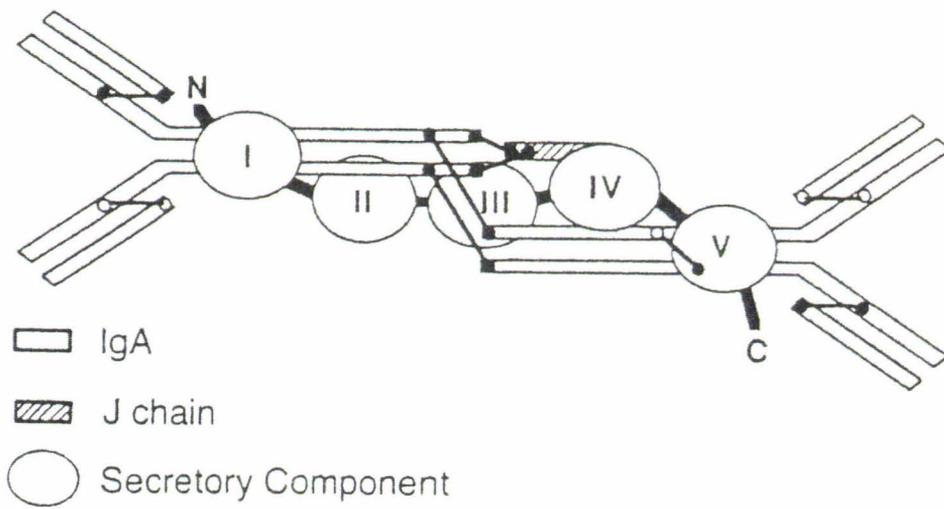


Figure 12. Structure des IgA sécrétoires. Les IgAs sont formées d'au moins deux monomères d'IgA liés par une liaison covalente à la chaîne J. Le composant sécrétoire (SC) qui se lie aux IgA durant le transport transépithélial est constitué de cinq domaines "Ig-like". Le site de liaison des IgA est situé au niveau du premier domaine.

CHAPITRE II

RECEPTEUR POUR LES IgA

STRUCTURE DES IgA.

Les microorganismes ainsi que leurs produits toxiques potentiels, les antigènes présents dans les repas ingérés et l'air respiré sont autant de sources de stimulation constante pour les surfaces muqueuses de l'organisme. Les surfaces muqueuses humaines représentent les plus larges aires de contact avec le microenvironnement. Le péristaltisme intestinal, les sécrétions muqueuses, le renouvellement rapide de l'épithélium sont des facteurs mécaniques de protection auxquels s'ajoute la sécrétion dans la muqueuse de l'IgA. Une caractéristique importante des IgA, est leur concentration relativement élevée sous forme d'IgA sécrétoire, par rapport aux IgG dans les sécrétions externes telles que la salive, le colostrum ou le lait, les larmes, les sécrétions intestinales, bronchiques, nasales et urogénitales (Mestecky et al, 1987). Les IgA humaines ont été répertoriées en deux classes (IgA1 et IgA2), et la synthèse totale d'IgA représente 66 mg/kg/jour (Conley et al, 1987) soit plus de 60% de l'ensemble des immunoglobulines produites par jour (Soloman et al, 1981). Le pourcentage des IgA, qui n'est que de 12% dans le sérum normal, est de 80-90% ou plus dans la majorité des sécrétions.

La molécule d'IgA présente dans le sérum, l'IgA monomère (mIgA), est composée de deux chaînes lourdes H (α) et deux chaînes légères L (κ ou λ). La sous-classe IgA2 se distingue de l'IgA1 par ses déterminants antigéniques et par une délétion de 13 acides aminés dans la région charnière, ainsi que par une absence de pont disulfure entre H et L, avec un pont disulfure entre les deux chaînes légères L. Une des caractéristiques des IgA est leur capacité à former des polymères (Underdown et al, 1974). Les IgA polymériques sont sécrétées par les plasmocytes, cependant on ne sait pas si un même plasmocyte est capable de sécréter soit les IgA monomériques soit les IgA polymériques ou si les deux formes sont sécrétées simultanément ou séquentiellement par le même plasmocyte (Mestecky et al, 1987). Les IgA polymériques sont souvent sous forme dimérique mais on peut trouver des formes trimériques, tétramériques et pentamériques en faible quantité. L'abondance des IgA dans les myélomes à IgA a permis de déterminer la séquence en acides aminés des IgA humaines et la structure conformationnelle des IgA (Figure 12).

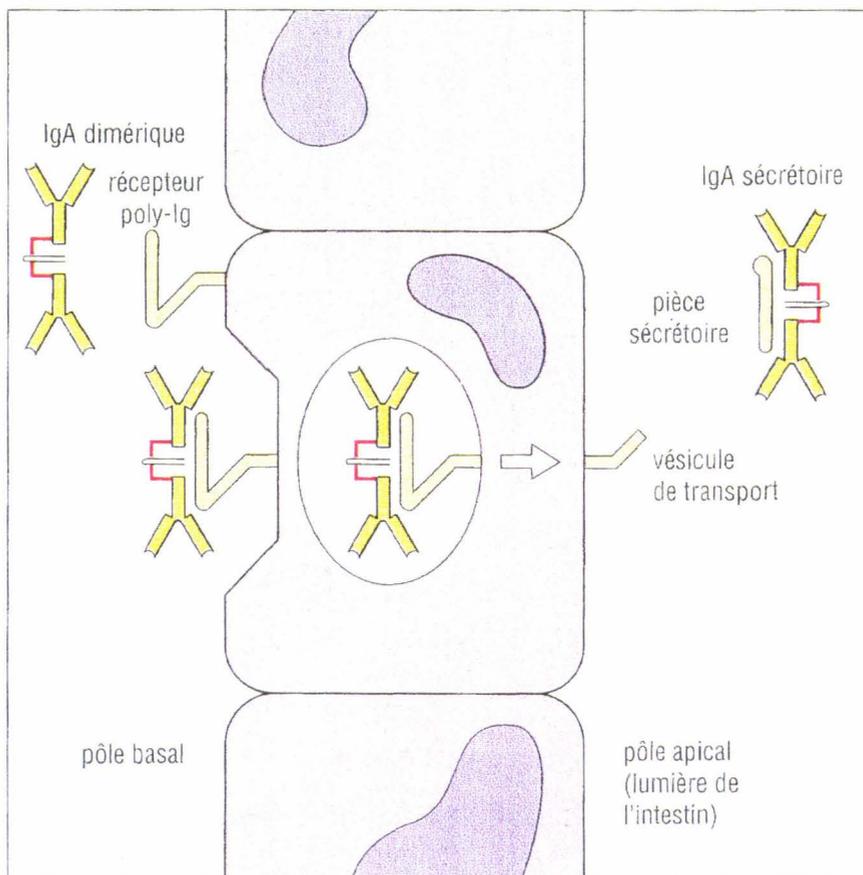


Figure 13. Transport des IgA au niveau des cellules épithéliales par le composant sécrétoire.

LA CHAÎNE J.

La chaîne J est un polypeptide de 15.600 kDa associé aux formes polymériques des IgA et des IgM. Elle permet aux IgA polymériques de se lier aux récepteurs de membrane (composant sécrétoire) présents sur la surface intestinale des cellules épithéliales. Le complexe formé est endocyté et transporté à travers la cellule épithéliale, associé à la membrane de vésicules de transport (figure 13). La structure polymérique des IgA contenant la chaîne J permet une résistance aux enzymes protéolytiques et augmente l'avidité pour l'antigène (Underdown et al, 1974; Underdown et al, 1986). Des travaux sur les IgA humaines ont révélé que le site d'attachement de la chaîne J se situe au niveau de la portion Fc de la molécule d'IgA, la cystéine pénultième de la chaîne α formant un pont disulfure avec la chaîne α . Les IgA sécrétoires existent principalement sous forme 11S de 380 kDa, formés de deux unités d'IgA monomériques, d'une chaîne J et d'une molécule de composant sécrétoire (Mestecky et al, 1987) (figure 12). L'agencement des différentes chaînes peptidiques n'est pas encore clairement établi. La séquence primaire en acides aminés de la chaîne J et les immunoglobulines partagent peu d'homologie, cependant la structure secondaire de la chaîne J montre qu'elle contient un domaine similaire à celui d'un domaine d'immunoglobuline (Zikan et al, 1985).

LE COMPOSANT SECRETOIRE.

Contrairement aux IgA et à la chaîne J synthétisées par les plasmocytes, le composant sécrétoire (80 kDa) est synthétisé par les cellules épithéliales des muqueuses et glandes exocrines. Cette glycoprotéine est essentielle pour le transport sélectif des IgA dans les sécrétions et les protège des attaques protéolytiques (Brandtzaeg et al, 1981) (figure 13). Elle a été découverte en examinant les diverses spécificités des antisérums obtenus après immunisation d'animaux avec de l'IgA purifiée à partir de lait ou de salive humaine. De tels antisérums contenaient souvent, outre des anticorps anti-chaînes légères et anti-chaînes lourdes, des anticorps dirigés contre une glycoprotéine qui se trouvait à la fois liée aux IgA et sous forme libre dans les mêmes sécrétions mais qui ne se trouvait pas dans le sérum. Le clonage du gène du composant sécrétoire humain ou de lapin a montré que cette molécule est formée d'une seule chaîne peptidique et porte cinq domaines d'immunoglobuline, qui ont une certaine homologie avec la région variable des chaînes légères (Eiffert et al, 1984; Mostov et al, 1984). Le composant sécrétoire contient aussi des

carbohydrates (25%), dont le rôle n'est pas encore élucidé mais qui peut être impliqué dans l'interaction du composant sécrétoire avec les IgA. Le composant sécrétoire purifié possède une bonne affinité ($\pm 10^8$ l/M) pour les IgA polymériques et les IgM. C'est un récepteur pour le transport transépithélial pour les IgA polymériques contenant la chaîne J. Exprimée à la surface cellulaire, cette molécule a un peptide signal de 18 acides aminés, une partie extracellulaire qui lie les IgA de 629 acides aminés, un domaine transmembranaire de 23 résidus hydrophobes et un domaine cytoplasmique de 103 acides aminés. La partie extracellulaire de la molécule contient les cinq domaines d'immunoglobulines qui ont entre 100 et 105 acides aminés chacun et constitue la forme sécrétée. Le site de clivage du récepteur pour les immunoglobulines qui induit la libération du composant sécrétoire et du fragment résiduel qui contient le segment transmembranaire et le segment cytoplasmique, n'est pas encore déterminé.

RECEPTEUR DES IgA

Structure biochimique et distribution cellulaire.

Le Fc α R humain est une glycoprotéine transmembranaire de poids moléculaire hétérogène avec six sites de glycosylation (N-glycosylation) situés sur le segment extracellulaire du récepteur. La nature biochimique de ce récepteur a été récemment déterminée. Les monocytes/macrophages et les neutrophiles sont munis d'un récepteur pour les IgA d'un poids moléculaire variant entre 55 et 75 kDa (Monteiro et al, 1990; Mazengera et al, 1990). Ce récepteur peut lier les IgA1 et les IgA2 (Monteiro et al, 1990; Mazengera et al, 1990). La présence du RFc α chez les éosinophiles a été suggérée suite à des tests d'inhibition de la cytotoxicité vis-à-vis des schistosomes en présence des IgA (Capron et al, 1988(a)) ou par la dégranulation de l'éosinophile par des IgA et mesure de la libération d'une protéine cationique de l'éosinophile (EDN) (Abu-Ghazaleh et al, 1989). L'évidence de l'expression de RFc α a été initiée par des expériences de cytofluorométrie en flux (Capron et al, 1988(b)) montrant une large variation de liaison des IgA (5 à 60%) aux éosinophiles de patients hyperéosinophiliques suggérant ainsi une modulation de ce récepteur semblable à celle observée pour les récepteurs d'IgE (Capron et al, 1981). Chez les patients allergiques, contrairement au RFc α des neutrophiles, une augmentation de l'expression de RFc α des

éosinophiles a été aussi observée (Monteiro et al, 1993). Le RFc α des éosinophiles a un poids moléculaire variant entre 70 et 100 kDa (Monteiro et al, 1993). La déglycosylation du RFc α des éosinophiles et des neutrophiles révèle une protéine majeure de 32 kDa et une autre de 36 kDa, alors que la masse moléculaire estimée d'après la séquence nucléotidique est de 30 kDa (Maliszewski et al, 1990). A cette hétérogénéité de masses moléculaires du RFc α attribuée à la glycosylation différentielle (régulation traductionnelle) des différentes lignées myéloïdes (Monteiro et al, 1993), peut s'ajouter une multitude de gènes gouvernant la synthèse de différents cDNA (régulation transcriptionnelle). En effet, deux transcrits de 2.6 et 2.8 kb ont été observés, en utilisant des ribosondes correspondant à la région 5' codant pour une région extracellulaire du RFc α et les ARN polyadénylés de monocytes, de PMN, et de la lignée monocyttaire U937 (Maliszewski et al, 1990).

Si l'existence du RFc α au niveau de la lignée myéloïde est bien documentée, plusieurs controverses alimentent la discussion quant à son expression par les lymphocytes. Des études biochimiques ont démontré que les lymphocytes T et B humains sont dotés d'un RFc α (Lum et al, 1979; Gupta et al, 1979; Fanger et al, 1981(b)). Ce récepteur est impliqué dans la cytotoxicité des lymphocytes T vis-à-vis des bactéries en présence d'IgA (Tagliabue et al, 1983) et dans la régulation de la synthèse d'IgA (Hoover et al, 1983; Kiyono et al, 1985). Cependant, des expériences de Northern blot n'ont pas donné de signal lorsqu'elles étaient effectuées avec de l'ARN polyadénylé de lymphocytes T ou B (Maliszewski et al, 1990). Ceci peut être dû, soit à la différence de structure de ces récepteurs, soit aux conditions d'induction de leur expression qui n'étaient pas réunies dans ces expériences.

Structure nucléotidique.

L'ADNc du RFc α a été récemment cloné et exprimé dans les cellules COS (Maliszewski et al, 1990). Sa taille est de 1.6 kb avec un cadre de lecture ouvert de 861 bp, une région de 39 bp au niveau 5' non traduite et une région de 711 bp non traduite contenant la séquence poly-A. Ce cDNA code pour une protéine de 287 acides aminés dont les 21 premiers ont la caractéristique d'une séquence signal hydrophobe. La séquence mature du RFc α commence au niveau de la Gln22 donnant un peptide de Mr ~29.900 kDa. Les 206 acides aminés du segment extracellulaire

contiennent 6 sites potentiels de N-glycosylation donnant une protéine fonctionnelle de haut poids moléculaire. La séquence en acides aminés du Rf α montre certaines homologies avec les récepteurs des autres immunoglobulines (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII et Fc ϵ RI) et des résidus conservés, caractéristiques de deux domaines contigus "Ig-like" (Williams et al, 1988). Ces résidus contiennent deux cystéines dans chaque domaine qui forment des ponts disulfures. Vu la conservation des domaines "Ig-like", il est probable que la Cys 28 soit liée par un pont disulfure à la Cys79 dans le domaine 1 et la Cys125 à la Cys 172 dans le domaine 2. L'analyse de l'hydrophobicité de la protéine, indique que la région extracellulaire de Rf α est suivie de 19 acides aminés hydrophobes (Leu 207-Val 225) qui correspondraient à une région transmembranaire. La région intracytoplasmique serait donc composée de 41 acides aminés.

L'analyse de la région transmembranaire putative présume deux caractéristiques atypiques et importantes : 1) Présence d'un acide aminé chargé (Arg 230) dans ce domaine hydrophobe transmembranaire. 2) Absence d'une séquence de résidus basiques immédiatement après le segment hydrophobe (Ferguson et al, 1988). Plusieurs protéines contenant des résidus chargés dans la région transmembranaire sont liées à la membrane cytoplasmique soit par le glycosyle phosphatidyle inositol (GPI) (exemple de l'antigène Qa-2 MHC (Clevers et al, 1988) soit par l'association à une autre protéine ancrée dans la membrane (exemple du récepteur TCR, qui nécessite l'association avec le complexe CD3 pour l'expression membranaire) (Waneck et al, 1988). Concernant les récepteurs pour les fragments Fc, la chaîne α du récepteur de haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI) contient un résidu Asp dans la région transmembranaire et est ancrée à la membrane par le deuxième mécanisme qui est une interaction avec la chaîne γ (Blank et al, 1989). Les séquences des deux gènes du récepteur Fc γ RIII indiquent aussi un résidu Asp dans la région transmembranaire (Ravetch et al, 1989). L'isoforme exprimé par les PMN est lié à la membrane par le GPI (Ravetch et al, 1989; Simmons et al, 1988), alors que l'isoforme exprimée par les cellules NK et les macrophages semble nécessiter un autre peptide pour l'expression membranaire, Cette fonction est médiée par la chaîne γ du Fc ϵ RI (Hibbs et al, 1989; Kurosaki et al, 1989). La différence capitale entre ces deux isoformes semble être la présence ou l'absence du résidu Ser 203 dans la région extracellulaire, qui conditionne la liaison via le GPI (Hibbs et al, 1989; Kurosaki et al, 1989; Lanier et al, 1989). L'analyse de la séquence protéique indique la présence d'une sérine au site analogue de Fc α R (Ser 197), cependant la liaison de ce récepteur par le GPI est peu probable. En effet, le Fc α R des monocytes, des granulocytes et la lignée monoclaire U937

sont résistants au clivage par une phospholipase spécifique de GPI (PLC) (Monteiro et al, 1990). Des observations similaires montrent que les cellules COS transfectées par le Fc α R ne sont pas affectées par la PLC (Maliszewski et al, 1990). La présence d'une autre protéine associée au Fc α R n'est donc pas exclue.

Fonction des fragments solubles.

Durant les dix dernières années, plusieurs données de la littérature ont mis l'accent sur le rôle que jouent les récepteurs pour les portions Fc des immunoglobulines (Fc receptors, FcR) dans la régulation de la synthèse des différents isotypes d'immunoglobulines. Les FcR sont exprimés par des cellules variées de la lignée myéloïde et par les lymphocytes B et T (Dickler et al, 1976) et sous une interaction appropriée avec les immunoglobulines, ils délivrent un signal porteur de plusieurs activités biologiques qui dépend du type cellulaire. Cependant, la nature moléculaire, la fonction potentielle de ces FcR sur les lymphocytes T et leur rôle dans la potentialisation ou la suppression isotypique spécifique restent très controversés.

Au niveau des lymphocytes T, les FcR initient la libération des lymphokines, désignées collectivement sous le nom de "Immunoglobulin-Binding Factors (IBF)" doués de propriétés régulatrices (Daëron and Fridman, 1985). Les IgG-binding factors (Löwy et al, 1983), IgE-binding factors (Yodoi et Ishizaka, 1980) et les IgA-binding factors (Yodoi et al, 1983) semblent réguler respectivement la réponse anticorps IgG, IgE et IgA. Inversement, les IgG, IgE, IgA, IgM et les IgD peuvent réguler respectivement l'expression du récepteur Fc γ R (Daëron et al, 1985), Fc ϵ R (Yodoi et al, 1979), Fc α R (Yodoi et al, 1982), Fc μ R (Daëron et al, 1985) et Fc δ R (Coico et al, 1985).

Les travaux de Hoover montrent que le nombre des cellules T ayant un récepteur Fc α R augmente dans la rate des souris contractant un myélome à IgA (Hoover et al, 1980; Hoover et al, 1982). La plupart de ces cellules ont été identifiées comme étant des cellules T CD8⁺ et possèdent une abilité pour supprimer les réponses IgA (Hoover et al, 1983). D'autres études ont montré également que de l'incubation avec les IgA des hybridomes T2D4 de cellules T, exprimant le Fc α R et le Fc γ R, résulte une libération de facteurs solubles appelés IgA-Binding Factors (IgA-BF), qui suppriment la synthèse d'IgA dans des cultures de cellules spléniques (Yodoi et al, 1983; Noro et al, 1986). Des IgA-BF dotés d'activités suppressives ont été obtenus dans des cultures spléniques de souris stimulées avec des IgA ou de la Concavaline A (Noro et al, 1986; Adachi et al, 1984).

Ces études postulent que : 1) des récepteurs $Fc\alpha R$ membranaires, dérivent les IgA-BF qui sont des glycoprotéines de 45kDa (Noro et al, 1986). 2) Ces IgA-BF réduisent spécifiquement la synthèse de l'ARNm des chaînes α et λ des cellules myélomateuses MOPC 315 et suggèrent que cet effet suppressif se manifeste au niveau des cellules B par la régulation de la transcription du gène de la chaîne α en ARNm (Müller et al, 1985; Roman et al, 1988).

Une autre sous population de lymphocytes T a été remarquée par son expression du $Fc\alpha R$ et l'augmentation de la production des IgA. Des clones de lymphocytes T de souris sensibilisés par des globules rouges de mouton, expriment le $Fc\alpha R$ et manifestent une forte réponse IgA vis-à-vis des érythrocytes de mouton (Kiyono et al, 1982; Kiyono et al, 1984 (a)). De plus, quand des fractions contenant des sIgA et riches ou déplétées en cellules B sont mises en présence de ces clones $Fc\alpha R$ positifs, seules les fractions riches en cellules B montrent une augmentation de la réponse IgA (Kiyono et al, 1984 (a)). Il a été démontré par la suite que les concentrations d'IgA exogène peuvent réguler les cellules T via leur $Fc\alpha R$ (Kiyono et al, 1984 (b)) et induire la sécrétion d'IgA-BF et/ou d'interleukines. L'IL-5 et l'IL-6 semblent être impliquées dans la régulation de la synthèse d'IgA (McGhee et al, 1989).

CHAPITRE III

HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'EOSINOPHILE

De nombreuses études ont révélé l'hétérogénéité cytologique et fonctionnelle des éosinophiles et établi leur rôle dans divers mécanismes immunopathologiques. Par rapport aux éosinophiles isolés du sang normal, les éosinophiles des patients hyperéosinophiliques sont particulièrement cytotoxiques vis-à-vis des parasites (Vadas et al, 1979 (a); David et al, 1980) et présentent une capacité accrue de phagocytose (Spry et al, 1976) et un métabolisme oxydatif supérieur (Bass et al, 1980 ; Pincus et al, 1981). Ces données suggèrent que les éosinophiles de patients ayant une éosinophilie sont dans un état d'activation ou de stimulation *in vivo* (Spry et al, 1988).

Purifiés par gradient de densité discontinu sur métrizamide, les éosinophiles ont été individualisés en deux sous-populations (Prin et al, 1983). Les éosinophiles de basse densité ou "hypodenses" hypogranuleux sont essentiellement présents chez les sujets ayant une hyperéosinophilie, par opposition aux éosinophiles de densité normale ou "normodenses" granuleux, les seuls présents chez les sujets normaux (Winqvist et al, 1982; Prin et al, 1983; Spry et al, 1988). La proportion d'éosinophiles hypodenses s'accroît au cours de certaines pathologies associées à l'éosinophilie, ce qui laisse penser qu'au moins certaines de ces cellules hypodenses représentent la sous-population des cellules activées.

Les études *in vivo* ou *in vitro* des éosinophiles hypodenses, ont rapporté de nouvelles informations sur le processus par lequel les propriétés fonctionnelles, biochimiques, physiques et morphologiques des éosinophiles activés se développent. Les mécanismes séquentiels d'activation de l'éosinophile doivent être repensés en terme d'hétérogénéité de l'éosinophile lui-même ainsi qu'en terme d'environnement immunologique (cytokines par exemple), initiateur de cette activation.

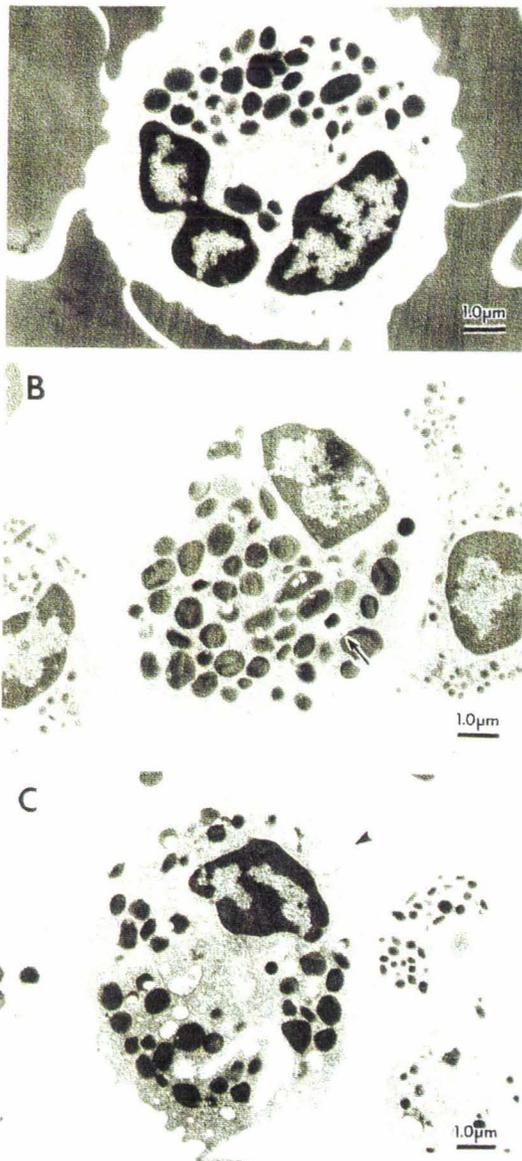


Figure 14. Eosinophiles de sang périphérique et des sécrétions nasales vus par microscope électronique. (A) Eosinophile normodense de sang périphérique. (B) Eosinophile hypodense de sang périphérique avec une diminution de la densité aux électrons de la matrice granulaire. (C) Eosinophile hypodense des sécrétions nasales montrant une diminution de la densité aux électrons, une désintégration et une vacuolisation des granules spécifiques.

L'HETEROGENEITE MORPHOLOGIQUE.

Des anomalies morphologiques des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques ont été décrites (Spry et al, 1976; Connell et al, 1968). Ces anomalies ont été associées aux éosinophiles hypodenses. A la différence des normodenses d'aspect typique (voir Chapitre II), ces éosinophiles hypodenses ont un cytoplasme très vacuolé et sont partiellement dégranulés. L'examen ultrastructural des éosinophiles hypodenses de patients ayant un syndrome hyperéosinophilique idiopathique et celui des éosinophiles normodenses de sujets contrôle, montrent le même nombre de granules dans les deux types d'éosinophiles (Peters et al, 1988; Henderson et al, 1988; Caulfield et al, 1990). Cependant, l'analyse des granules montre que ceux ci ont une taille inférieure dans le cas des hypodenses, et contiennent moins de protéines cationiques (Peters et al, 1988; Winqvist et al, 1982), ce qui peut expliquer leur densité inférieure par rapport aux éosinophiles normodenses. En plus de cette hypogranularité, une faible augmentation du nombre des corps lipidiques (Peters et al, 1988; Henderson et al, 1988) a été rapportée.

Les éosinophiles purifiés à partir de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques montrent un vide partiel ou complet de la matrice granulaire ou du cristalloïde (Fukuda and Makino, 1989; Metzger et al, 1986), indiquant que l'état de dégranulation des éosinophiles peut être une autre explication pour leur hypodensité.

HETEROGENEITE DES EOSINOPHILES LIEE A LEUR DENSITE.

Deux techniques sont fréquemment utilisées pour purifier les éosinophiles selon leur densité soit avec le Percoll (Gartner, 1980) soit avec la métrizamide (Vadas et al, 1979(b)). Sur gradient de percoll la majorité des éosinophiles de donneurs normaux purifiés sédimentent à une densité >1.081 g/ml (Fukuda et al, 1985; Shult et al, 1988), alors que les éosinophiles avec une densité <1.081 (Shut et al, 1988) ou <1.082 g/ml (Fukuda et al, 1985) sont considérés comme des hypodenses (Figure 14). Les éosinophiles de donneurs normaux purifiés sur gradient de métrizamide sédimentent à l'interface 23-24% et 24-25% de métrizamide, par contre les éosinophiles qui sédimentent aux interfaces de 18 à 20%, 20 à 22% et 22 à 23% sont considérés comme hypodenses (Prin et al, 1983; Prin et al, 1984) (Figure).

1 : PURIFICATION DES LEUCOCYTES
SUR GRADIENT DE DENSITE

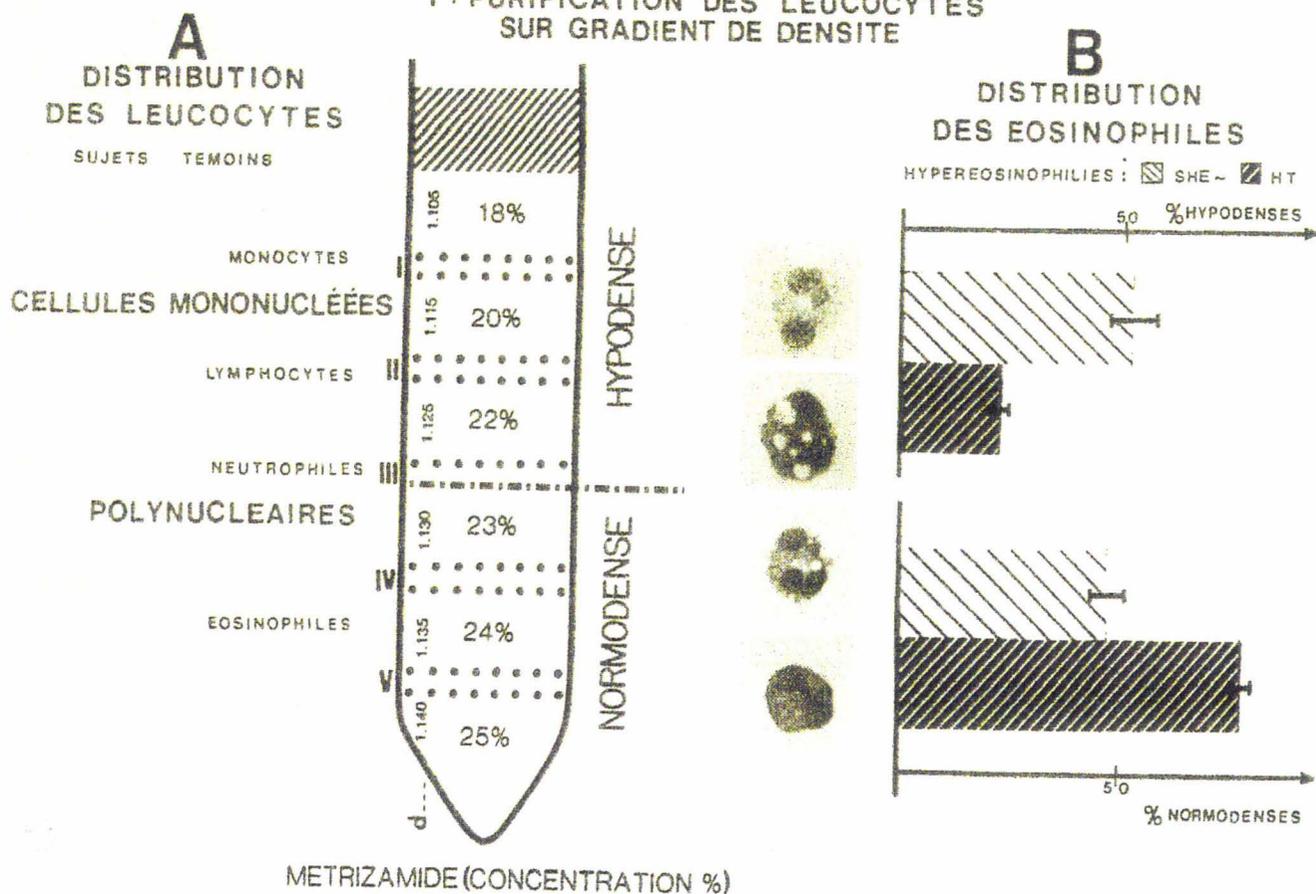


Figure 15. Purification des éosinophiles sur gradient de densité. Distribution des leucocytes (A) chez les sujets témoins. Distribution des éosinophiles (B) dans le cas de syndromes hyperéosinophiliques (SHE) et dans le cas d'hyperéosinophilie transitoire (HT).

L'identité entre les différentes populations d'éosinophiles obtenues par les deux techniques, est désormais la question centrale. Cependant, les deux méthodes indiquent que le pourcentage des éosinophiles hypodenses chez les sujets donneurs avoisine les 10% (Fukuda et al, 1985; Prin et al, 1984). De ce fait, ces cellules sont probablement les mêmes. De plus, les déterminations répétées des densités des éosinophiles sur le même sujet, indiquent un profil constant de distribution et une bonne reproductibilité de ces deux méthodes (Prin et al, 1983; Fukuda et al, 1985; Shult et al, 1988).

Une proportion importante d'éosinophiles hypodenses a été trouvée dans le sang périphérique de patients atteints de différentes pathologies associées à une éosinophilie, tels que le syndrome idiopathique hyperéosinophilique (Prin et al, 1983; Winqvist et al, 1982; Peters et al, 1988), le parasitisme (Prin et al, 1984; DeSimone et al, 1982; DeSimone et al, 1983), l'allergie (Prin et al, 1984; Fukuda et al, 1985; Shult et al, 1988; Kauffman et al, 1987) et certains syndromes néoplasiques (Winqvist et al, 1982; Prin et al, 1983; Prin et al, 1984). Le nombre d'éosinophiles hypodenses a été corrélé positivement à la sévérité de certaines maladies (Fukuda et al, 1985; Shult et al, 1988; White et al, 1986). Cependant certains traitements à l'IL-2 augmentent le nombre d'éosinophiles hypodenses sans éosinophilie périphérique massive comparative au HES (Sedgwick et al, 1990).

LES ANTIGENES MEMBRANAIRES ET L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR LES EOSINOPHILES HYPODENSES.

Pour mieux définir cette hypodensité des éosinophiles, plusieurs équipes se sont lancées à la recherche de la ou des molécules spécifiques de cette sous-population permettant de les différencier des normodenses.

Des anticorps monoclonaux ont été préparés pour analyser les différences d'expression d'antigènes membranaires des éosinophiles de différentes densités. Parmi toute une panoplie d'anticorps monoclonaux utilisés, seul un était capable de reconnaître préférentiellement les éosinophiles hypodenses (Tai et al, 1985). Un autre anticorps monoclonal (BB10) dirigé contre le FcεRII se lie spécifiquement aux éosinophiles hypodenses et aux plaquettes mais ne se lie pas aux éosinophiles normodenses (Capron et al, 1986 (a)).

Une autre étude comparative des profils protéiques des extraits membranaires, a révélé la présence d'une protéine basique de 51 kDa présente chez les éosinophiles normodenses ou de

densité intermédiaire mais difficilement décelable chez les éosinophiles hypodenses (Gruart et al, 1989). Par contre, deux autres protéines de 23 et 41 kDa sont prédominantes chez les éosinophiles hypodenses (Gruart et al, 1989). L'analyse de la protéine de 51 kDa montre qu'il s'agit d'une molécule "peroxidase-like". Cependant, les deux autres protéines de 23 et 41 kDa semblent être synthétisées lors d'une activation *in vivo* des éosinophiles.

La dynamique des événements cellulaires doublée de la complexité d'établir l'inventaire des différents facteurs présents dans l'environnement et agissant sur l'éosinophile, ont empêché toutes ces études d'aboutir à une limite constante en terme moléculaire entre les éosinophiles hypodenses et normodenses.

L'HETEROGENEITE FONCTIONNELLE.

Depuis longtemps, différentes études se sont penchées sur l'examen comparatif des éosinophiles de sujets normaux et ceux de patients hyperéosinophiliques. Les éosinophiles de ces derniers ont un métabolisme oxydatif et une activité de la phosphatase acide lysosomale supérieure à ceux des éosinophiles de sujets normaux. Une étude comparative des éosinophiles du même patient, montre que les hypodenses produisent plus de leucotriène C4 (LTC4) quand ils sont stimulés par les IgG (Shaw et al, 1985) ou le calcium ionophore A23187 (Hodges et al, 1988; kajita et al, 1985). De même, une quantité importante de LTC4 est libérée par les éosinophiles hypodenses mis en présence de *Schistosoma mansoni* et de l'IgE alors qu' aucune quantité décelable n'a été générée par les éosinophiles normodenses (Moqbel et al, 1990). Les éosinophiles hypodenses de patient ayant un HES, génèrent trois fois plus de PAF que les normodenses et en libèrent une grande quantité dans les surnageants de culture après stimulation par le calcium ionophore A23187. La cytotoxicité IgE dépendante des éosinophiles vis-à-vis de *S-mansoni* est restreinte aux éosinophiles hypodenses (Capron et al, 1984). Le relargage exclusif de la peroxydase par les éosinophiles hypodenses de patients infectés par des filaires après stimulation par un antigène spécifique ou un anti-IgE, vient corroborer les observations précédentes (Khalife et al, 1986). Ainsi, les éosinophiles hypodenses sont métaboliquement et fonctionnellement différents des normodenses et semblent posséder un grand potentiel d'activité leur permettant d'endommager les tissus qu'ils envahissent suite à une réponse chimiotactique (Wardlaw et al, 1986) et une grande spontanéité d'adhésion aux cellules endothéliales (Kimani et al, 1988).

A ces particularités que possède l'éosinophile hypodense, plusieurs tentatives d'explications ont été énoncées. 1) Les éosinophiles de basse densité ne peuvent être séparés adéquatement des neutrophiles par centrifugation sur gradients de densité. Cette appartenance à la même zone d'isodensité, suggère que l'interaction entre ces deux leucocytes est un des éléments de base dans la modulation des fonctions de l'éosinophile. Cette hypothèse a été testée en ajoutant des neutrophiles à des éosinophiles hautement purifiés (Kauffman et al, 1987; Hodges et al, 1988; Kajita et al, 1985; Kloprogge et al, 1989). Une seule étude a pu établir une interaction entre ces deux polynucléaires, examinée par la libération de LTC₄ (Kloprogge et al, 1989). 2) A cette réponse considérable des éosinophiles hypodenses aux différents stimuli, on a associé un nombre équivalent de récepteurs membranaires comme valeur intrinsèque et support de cette réponse consécutive. Les éosinophiles hypodenses expriment par rapport aux normodenses, un grand nombre de récepteurs pour le complément et pour les immunoglobulines (FcR) (Winqvist et al, 1982). Les éosinophiles hypodenses tissulaires et particulièrement ceux des alvéoles pulmonaires représentent la proportion majeure de cellules portant à leur surface de l'IgE cytophile (Capron et al, 1985(a); Capron et al, 1985(b)). De plus, la capacité de cytotoxicité des éosinophiles hypodenses, en présence d'IgE, est bien plus importante que celle des éosinophiles normodenses (Capron et al, 1984).

Si ces résultats ont contribué à l'élucidation de l'énigme de cet éosinophile hypodense, ils pâlissent singulièrement dès qu'ils sont rapportés aux événements et aux facteurs initiateurs et responsables de cette différence de densité. Ainsi, l'éosinophile lié aux autres cellules de l'immunité, par l'appartenance à une même sphère d'échanges matériels et à la domination des réseaux de cytokines, n'échappera pas à l'influence de son environnement. Dans cette perspective, plusieurs modèles ont essayé de générer des éosinophiles hypodenses par l'apport de facteurs exogènes.

GENERATION DES EOSINOPHILES HYPODENSES.

Le PAF, les cytokines, le surnagent de culture de cellules endothéliales et le sérum de patients hyperéosinophiliques sont autant de facteurs potentiels capables d'influencer l'éosinophile.

Action du PAF.

Les éosinophiles normodenses exposés au PAF pendant une durée de 15 à 60 minutes deviennent hypodenses (Kloprogge et al, 1989; Fukuda et al, 1989). Ces derniers ont une activité peroxydasique plus importante que les normodenses (Kloprogge et al, 1989) mais ne manifestent aucune dégranulation sous l'effet du PAF. Le mécanisme par lequel le PAF génère cette sous-population de cellules n'a pas été évoqué.

Action des cytokines et des cellules endothéliales.

La culture des éosinophiles normodenses purifiés à partir de sang humain en présence d'IL-3 humaine recombinante (rhIL-3) (Rothenberg et al, 1988), d'IL-5 murine purifiée (mIL-5) (Rothenberg et al, 1989), d'IL-5 humaine recombinante (rhIL-5) (Kita et al, 1991), de GM-CSF humain recombinant (rhGM-CSF) (Owen et al, 1987) ou des facteurs solubles produits constitutivement par des cellules endothéliales humaines ou bovines (Rothenberg et al, 1987) permet leur conversion en éosinophiles hypodenses. L'examen de l'ultrastructure de ces éosinophiles hypodenses obtenus *in vitro*, reflète certaines caractéristiques de l'hétérogénéité fonctionnelle et morphologique observée chez les cellules obtenues *in vivo* (Caulfield et al, 1990).

Certains auteurs ont remarqué que les éosinophiles de patients recevant un traitement à l'IL-2, ont une basse densité et une plus grande capacité à tuer les larves de *S. mansoni* (Sedgwick et al, 1990; Silberstein et al, 1989). Cependant, l'effet de cette interleukine semble indirect, en générant une autre source de cytokines (notamment l'IL-5) qui semblent être la cause de cette éosinophilie.

Action du sérum de patients hyperéosinophiliques.

Le sérum ou le plasma des patients HES semblent contenir une activité qui confère aux éosinophiles une extension de viabilité, une augmentation des fonctions et une conversion du phénotype normodense en phénotype hypodense (Owen et al, 1989). Des activités similaires ont été caractérisées dans le syndrome EMS (Eosinophilia-myalgia syndrome) (Owe, et al, 1990) et dans le liquide de bulle de patient souffrant de la pemphigoïde bulleuse (Miyasato et al, 1989). L'atténuation de cette activité a été obtenue par des anticorps anti-IL-5 et souligne le rôle important de cette cytokine dans la génération du phénotype hypodense. Des taux très importants d'IL-5 ont

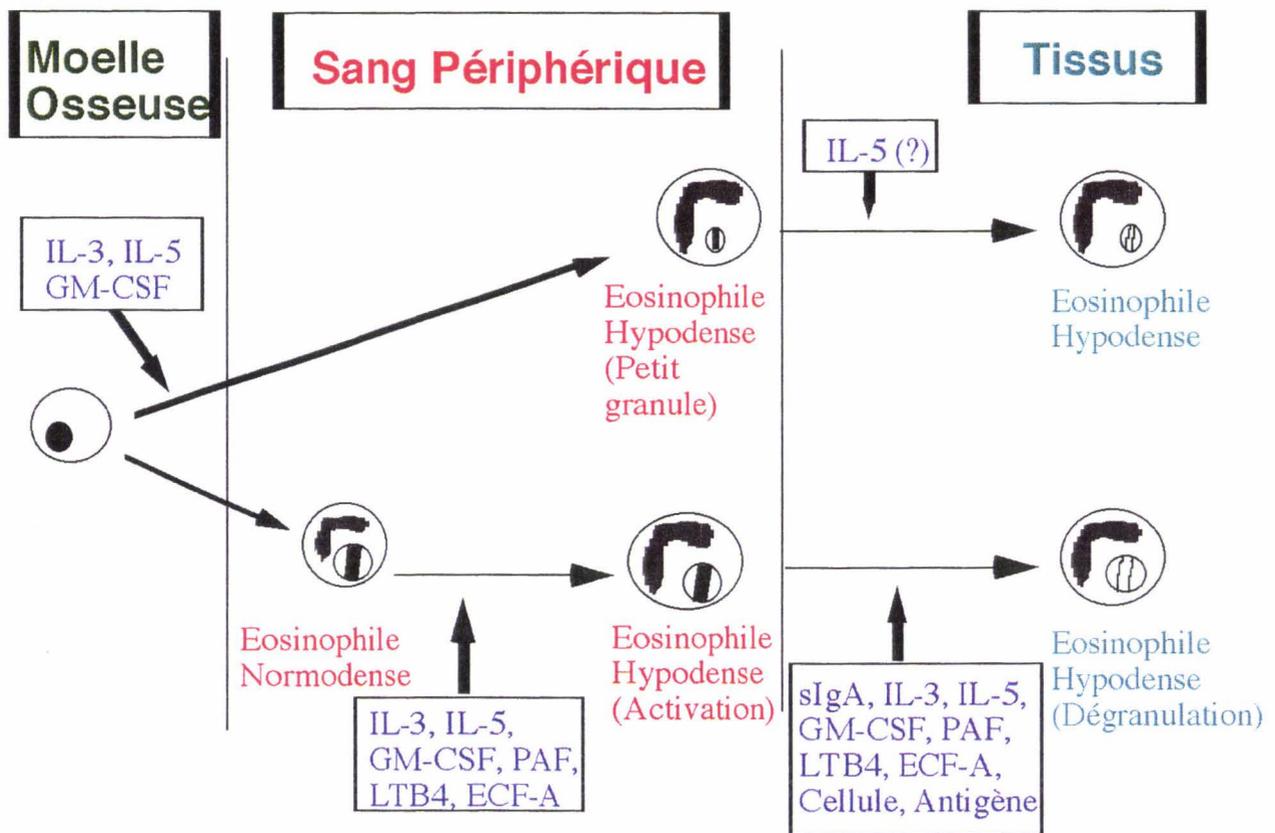


Figure 16. Diagramme hypothétique du processus par lequel les éosinophiles sont activés et développent un phénotype hypodense.

été trouvés dans les sérums de patients HES. Cependant, la différenciation des éosinophiles à partir de sang de cordon ombilical n'induit pas des éosinophiles hypodenses possédant les caractéristiques de ceux des patients HES (Dvorak et al, 1991). De ce fait, la génèse des éosinophiles hypodenses ne peut être l'apanage de l'IL-5 uniquement, mais d'autres facteurs semblent y contribuer *in vivo*.

GENERATION DES EOSINOPHILES HYPODENSES DANS L'HYPERSENSIBILITE.

Le ou les mécanismes par lequel l'éosinophilie se développe n'est toujours pas complètement élucidé. Ainsi on est tenté de se résoudre à deux hypothèses selon la figure 16.

Les éosinophiles hypodenses apparaissent dans le sang périphérique comme une conséquence directe de l'affluence d'éosinophiles immatures de la moelle osseuse. Ainsi, selon ce modèle, les éosinophiles sont libérés dans le sang avant de compléter leur maturation et on s'attend à voir dans le sang des cellules de basse densité avec des granules immatures. Cependant les études morphologiques n'ont pas abouti à caractériser de telles cellules dans le sang périphérique (Shult et al, 1988; Kauffman et al, 1987; Fukuda et al, 1989).

Une autre hypothèse stipule que les éosinophiles hypodenses prennent naissance dans le sang périphérique suite à une activation. Les arguments en faveur de ce modèle s'énoncent comme suit : 1) le nombre d'éosinophiles hypodenses augmente suite à une sensibilisation par inhalation d'antigène chez des patients ayant un asthme atopique (Frick et al, 1989), ou des patients ayant une rhinite allergique et sensible aux pollens (Frick et al, 1988). 2) L'implication des cytokines est devenue de plus en plus évidente (voir plus haut). 3) Le PAF, contrairement à l'IL-5, peut convertir les éosinophiles normodenses en éosinophiles hypodenses mais sans causer leur dégranulation et leur ultrastructure s'apparente étroitement à celle des cellules hypodenses des patients asthmatiques (Fukuda et al, 1989). Mais si l'activation par l'antigène conduit directement ou indirectement à l'éosinophile hypodense elle ne peut expliquer, à elle seule, leur présence persistante et l'éosinophilie chez les patients allergiques et encore moins chez les patients HES où l'identification d'un antigène causal n'a pas encore été possible. La synthèse de l'IL-5 par les lymphocytes T activés par l'IL-2 (Enokihada et al, 1989) ou par les éosinophiles eux-même des patients hyperéosinophiliques (Desremaux et al, 1992) suggèrent l'implication directe de cette

cytokine dans le développement de ce phénotype. La localisation par microscopie électronique des éosinophiles hypodenses (Fukuda et al, 1989; Metzger et al, 1986) dans les tissus bronchiques est en faveur d'une activation locale de ces cellules . Les IgA sécrétoires, très abondants dans les sécrétions des muqueuses, stimulent préférentiellement les éosinophiles (Abu-Gazaleh et al, 1989) et peuvent être des bons candidats pour cette activation locale . De même le composant sécrétoire libre peut stimuler directement l'éosinophile localement au niveau tissulaire.

CHAPITRE VI

ROLE BENEFIQUE ET NEFASTE

DE L'EOSINOPHILE

Différentes situations cliniques suggèrent la participation de l'éosinophile en pathologie. Le polynucléaire éosinophile est capable de lyser des larves de parasites par cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps. Cette activité cytolytique vis-à-vis du parasite peut s'étendre à de nombreuses cibles cellulaires créant des lésions tissulaires. Plusieurs travaux ont rapporté une corrélation entre l'hyperéosinophilie et la sévérité des réactions d'hypersensibilité (notamment l'asthme allergique) ou le syndrome hyperéosinophilique (HES). Cependant, les données actuelles soulignent aussi la participation des éosinophiles dans les pathologies cutanées regroupant l'eczéma atopique, la pemphigoïde bulleuse et certaines pathologies digestives. Si l'importance de la contribution immunopathogène de l'éosinophile a été bien étudiée, l'intérêt des recherches actuelles se porte vers les mécanismes responsables de l'infiltration et de l'activation de ces cellules aux sites lésionnels.

RÔLE DES SOUS-POPULATIONS TH1 ET TH2 EN PATHOLOGIE.

En 1986, Mosmann et ses collaborateurs démontraient, chez la souris, que des lignées T spécifiques de divers antigènes sont hétérogènes quant aux cytokines qu'elles peuvent produire (Mosmann et al, 1986). La stimulation plus au moins prolongée des clones lymphocytaires par le même antigène permet d'obtenir différentes cytokines. Les cellules TH1 sécrètent de façon prédominante de l'IL-2, du TNF β et de l'IFN γ . Les cellules TH2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10. Les deux populations sécrètent de l'IL-3, du GM-CSF et du TNF α . Une autre sous-population nommée TH0 produit l'ensemble des cytokines caractéristiques de TH1 et TH2 et semble dominer dans les stades précoces de certaines réponses immunitaires. Une fois établie, chaque profil de réponse tend à supprimer le profil opposé. En effet, l'IFN γ des cellules TH1 inhibe la prolifération des cellules TH2, tandis que l'IL-4 et l'IL-10 bloquent la production des cytokines produites par les TH1.

Les deux sous-populations TH1 et TH2 sont capables de collaborer avec les lymphocytes B

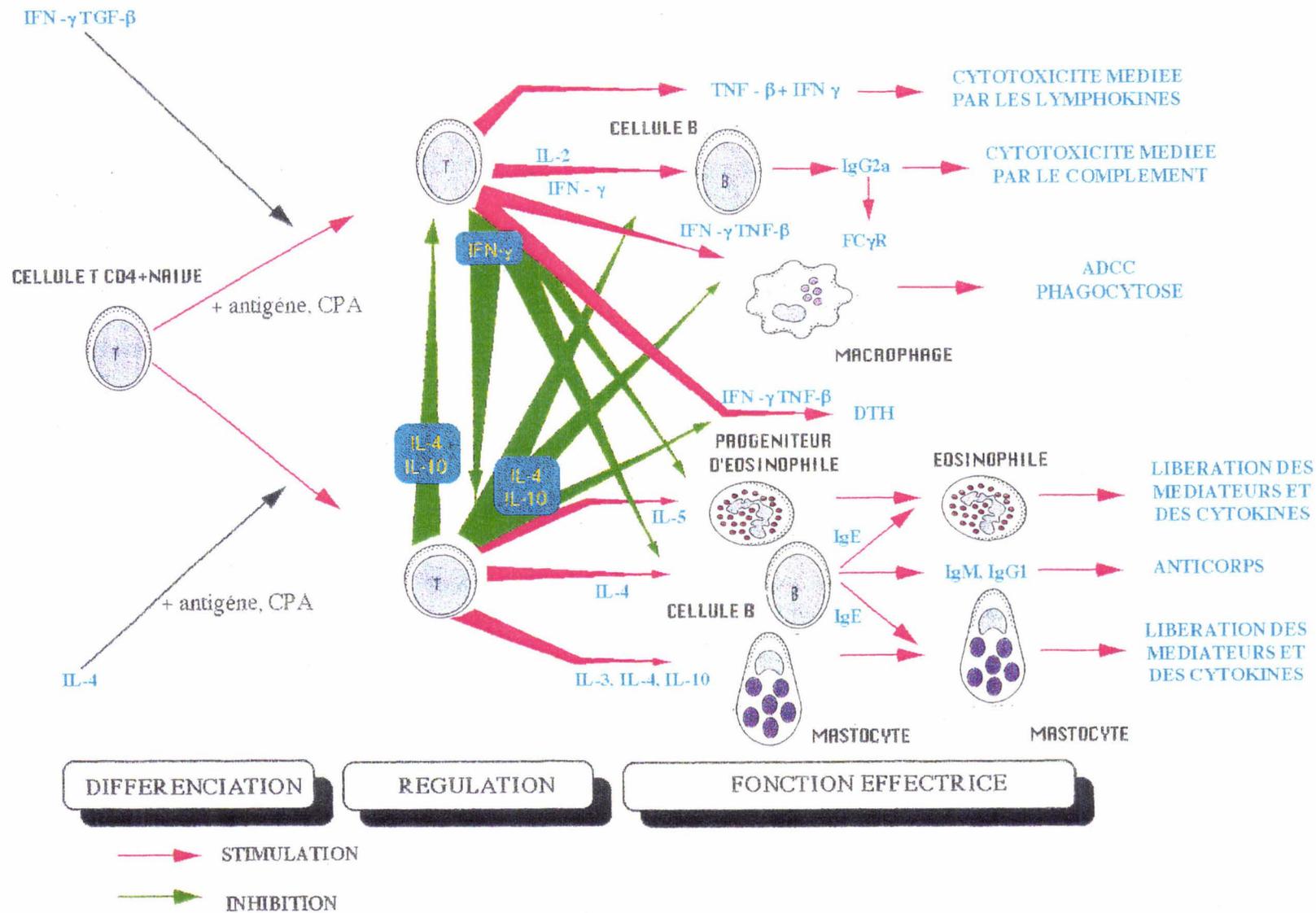


Figure 17. Diagramme des interactions régulatrices entre les deux sous-populations de lymphocytes T CD4+. Ces interactions ont été démontrées chez la souris *in vitro* et *in vivo* et confirmées en partie chez l'homme. Le contrôle de ces sous-populations et leurs fonctions effectrices sont indiqués.

mais induisent la production d'anticorps d'isotypes différents. Ainsi, les TH1 induisent la sécrétion des IgG2a, tandis que les TH2 induisent les IgG1. Les cellules TH2 stimulent aussi la production des éosinophiles et des mastocytes ainsi que les immunoglobulines E qui permettent la dégranulation de ces cellules effectrices de l'allergie. Les cytokines responsables de cette activité sont l'IL-4 pour la synthèse des IgE (Coffman et al, 1986), l'IL-5 pour les éosinophiles (Sanderson et al, 1986) et la combinaison de l'IL-3, l'IL-4 et l'IL-10 pour les mastocytes (Thompson et al, 1991). Quant aux cellules TH1, elles mettent en jeu un autre mécanisme effecteur. L'activation des macrophages par l'IFN ou le TNF est secondé par une augmentation de la présentation d'antigène, de la phagocytose, des récepteurs pour le fragment Fc et la production des peroxydes (Murray, 1990). Les macrophages voient donc augmenter leur capacité de tuer une variété de pathogènes intracellulaires et extracellulaires ainsi que leur durée de vie pour combattre ces organismes (Murray et al, 1985). En plus, les cellules TH1 peuvent être directement cytotoxiques vis-à-vis de certaines cellules par leur production de l'IFN γ et le TNF (Tite et al, 1985).

Le développement d'une réponse immunitaire TH1 ou TH2 prédominante vis-à-vis d'un antigène dépend de facteurs aussi divers que la nature et la dose de l'antigène ou des épitopes présents, la nature de la cellule présentant l'antigène et, dans certains exemples, de la nature des allèles du complexe majeur d'histocompatibilité qu'elles expriment, la nature des cytokines et des facteurs produits localement par des cellules diverses, éventuellement autres que des lymphocytes T CD4+ (l'IFN γ et l'IL-12 favorisent le développement de réponses TH1, l'IL-4 celui de réponses TH2).

L'identification de cette balance régulatrice distinguant au sein du pool des lymphocytes T CD4+ auxiliaires, des cellules TH1 et TH2 semble avoir des retombées importantes en immunologie. Cette spécialisation des cellules T CD4, initialement décrite chez la souris est maintenant démontrée chez l'homme (Romagnani, 1992). Comme chez la souris, le spectre de cytokines de type Th1 est généralement élevé dans les réponses contre les pathogènes intracellulaires (Yamamura et al, 1991). Les cytokines de type Th2 sont par contre élevées dans les maladies allergiques et les infections helminthiques (Limaye et al, 1990; Maggi et al, 1992).

L'EOSINOPHILE AU COURS DES INFECTIONS PARASITAIRES.

Presque un siècle nous sépare des observations initiales de Brown décrivant l'importance de l'éosinophilie dans le diagnostic de la trichinose (Brown et al, 1898). Depuis, l'éosinophilie

sanguine ou tissulaire a été admise comme l'un des signes souvent associés aux infections helminthiques dues aux parasites nématodes, trématodes et cestodes. L'éosinophilie associée à d'autres pathologies (HES, allergies, cancers) vient compliquer le tableau clinique et la détermination de l'étiologie de telle ou telle éosinophilie .

La fonction de l'éosinophile dans les maladies parasitaires est restée méconnue jusqu'en 1975, date à laquelle Butterworth et ses collaborateurs ont découvert que l'éosinophile est une des cellules effectrices participant à la défense de l'hôte contre l'invasion parasitaire, ceci par un mécanisme d'ADCC et permettant le contrôle de la multiplication et la dissémination des parasites (Butterworth et al, 1975) . L'administration *in vivo* d'un sérum anti-éosinophile à des souris résulte en une augmentation du taux de vers et une sensibilisation à l'infection, renforçant l'implication des éosinophiles dans l'immunité anti-schistosomes (Mahmoud et al, 1975). D'autres observations ont mis en évidence une accumulation tissulaire des éosinophiles autour des schistosomes. Elles prévoyaient aussi un rôle protecteur des éosinophiles contre la bilharziose (Hsu et al, 1971). Mais, si ces observations n'informent pas sur la nature du mécanisme déclenchant la cytotoxicité de l'éosinophile vis-à-vis du schistosome, la mise en évidence des rôles des immunoglobulines IgG (Butterworth et al, 1977) et particulièrement les IgG2a (Capron et al, 1978) dans la médiation de l'ADCC a été suivie par la démonstration de la dégranulation de l'éosinophile et la libération de ses médiateurs cytotoxiques. Enfin, une autre observation importante fut la démonstration du rôle des IgE dans le mécanisme de l'ADCC vis-à-vis du schistosome dans laquelle en plus de l'éosinophile, les macrophages et les plaquettes sont aussi des cellules effectrices (Capron et al, 1975; Capron et al, 1981(b); Joseph et al, 1983).

L'hyperéosinophilie sanguine et tissulaire et la production accrue d'IgE, particulièrement les IgE spécifiques anti-schistosomes sont des conséquences habituelles de l'infection par le schistosome observées chez l'homme et les modèles animaux (Capron M and Capron A, 1994). Les cytokines sécrétées par les lymphocytes CD4 TH2 contrôlent la synthèse d'IgE et l'éosinophilie. Aux immunoglobulines E, on peut adjoindre la synthèse d'IgA qui joue un rôle important dans l'acquisition de l'immunité contre ce parasite (Grzych et al, 1993). Dans la schistosomiase humaine, les effets de type TH2 semblent être associés à l'immunité protectrice. L'augmentation de la synthèse d'IL-5 chez l'homme infecté est associée à la résistance à la réinfection, cependant qu'aucune corrélation à la production d'IFN γ n'est observée (Roberts et al, 1993). Chez la souris, les deux réponses TH1 et TH2 sont observées suite à l'infection par le schistosome (Pearce and Sher, 1991). Les deux sous-populations de lymphocytes TH sont

stimulées de façon séquentielle au cours de l'infection. Il semble que les schistosomes stimulent une réponse protectrice de type TH1 alors que les oeufs sollicitent une réponse TH2. Les antigènes de l'oeuf du parasite, libérés au stade où le ver adulte commence à pondre, semblent susceptibles de diminuer le taux d'IFN γ et donc la fonction TH1 et d'augmenter la production d'IL-5 par les TH2 (Pearce et al, 1991; Grzych et al, 1991). Chez les souris rendues résistantes par vaccination, le taux d'IgE et le nombre d'éosinophiles sont bas et les cellules produisant de l'IFN γ sont prédominantes. Cependant, des vaccinations répétées produisent une réponse TH2 qui contribue aussi à l'immunité protectrice (Caulada et al, 1991).

LE SYNDROME IDIOPATHIQUE HYPEREOSINOPHILIQUE.

Alors que l'éosinophilie normale est $\leq 0.4 \times 10^9$ éosinophiles /l, le syndrome idiopathique hyperéosinophilique (HES) se définit par une hyperéosinophilie sanguine supérieure à 1.5×10^9 éosinophiles par litre de sang, évoluant depuis au moins six mois et sans qu'aucun agent causal n'ait été identifié. En 1968, Hardy et Anderson ont examiné le cas de trois patients ayant une hyperéosinophilie, une hépatosplénomégalie et des symptômes cardiaques ou pulmonaires. A la suite de cette étude, ces chercheurs ont suggéré le terme de syndrome hyperéosinophilique (Hardy et Anderson, 1967). Mais c'est en 1975, qu'apparaît une définition claire et précise de ce syndrome (Chusid et al, 1975). 1) les patients doivent avoir une hyperéosinophilie $>1500/\mu\text{l}$ depuis plus d'un mois. 2) Absence d'une autre étiologie comme les maladies parasitaires ou les allergies. 3) Les patients doivent avoir des signes et des symptômes d'organes touchés par l'éosinophilie. De nos jours, cette définition est encore valable. Ce syndrome est souvent accompagné de complications cliniques affectant principalement le coeur, le système nerveux central, les poumons, la peau, le système vasculaire et le tube digestif (Chusid et al, 1975). Ces lésions multi-viscérales sont causées par les médiateurs cytotoxiques libérés par l'éosinophile infiltrant les tissus massivement. L'examen des éosinophiles au microscope optique montre une vacuolisation du cytoplasme, une diminution dans le nombre et la taille des granules ainsi qu'une hypersegmentation du noyau (Chusid et al, 1975; Spry et Tai, 1976; Ackerman, 1964). La neutrophilie peut accompagner dans certains cas l'éosinophilie et contribuer à l'augmentation du nombre de globules blancs. Des neutrophiles immatures, avec une altération du noyau et des granules cytoplasmiques sont présents dans le sang périphérique (Flaum et al, 1981; Ackerman, 1964). Une basophilie moyenne est observée dans certains cas d'HES (Flaum et al, 1981). Le taux de vitamine B12 et des protéines liant la vitamine B12 peut être à la fois normal ou

élevé (Chusid et al, 1975; Zitoun et al, 1984; Ghosh et al, 1985).

Le syndrome hyperéosinophilique est souvent accompagné d'une élévation du taux d'IgE (Parrillo et al, 1979). Les patients ayant un taux très élevé d'IgE ne nécessitent pas de thérapie ou répondent bien aux corticoïdes avec une normalisation de l'éosinophilie et du taux d'IgE (Parrillo et al, 1978; Parrillo et al, 1979). Un autre groupe de patients avec un taux normal d'IgE semble être résistant aux traitements par les corticoïdes et ne donnent pas de réponse satisfaisante. Chez ces derniers, on trouve des éosinophiles hypodenses qui n'expriment pas de récepteur pour les corticostéroïdes (Prin et al, 1989).

L'HES se manifeste le plus souvent par des taux très élevés d'IL-5 dans le sérum et plus particulièrement chez les patients résistants aux stéroïdes (Owen et al, 1989). Les lymphocytes T ne sont pas les seules cellules productrices d'IL-5 dans cette pathologie. Les éosinophiles eux même sont capables de synthétiser et de sécréter l'IL-5 (Desreumaux et al, 1992; Broide et al, 1992; Desreumaux et al, 1993; Dubucquoi et al, 1994). Le nombre de neutrophiles peut augmenter dans cette maladie. Comme l'IL-5 n'a pas une action directe sur les neutrophiles, il est vraisemblable que d'autres cytokines sont la cause de cette neutrophilie. Les éosinophiles peuvent également produire de l'IL-3 et du GM-CSF (Moqbel et al, 1991; Ohno et al, 1991; Broide et al, 1992). Les clones issus des lymphocytes CD4+ obtenus à partir de patients HES, sont capables de libérer des éosinopoïétines et particulièrement l'IL-5 (Raghvachar et al, 1987) et le GM-CSF (Schrezenmeier et al, 1993). Les taux élevés de récepteurs solubles pour l'IL-2 dans les sérums de patients HES témoignent d'une activation des lymphocytes T (Prin et al, 1990; Vijayan et al, 1990). Les éosinophiles sont capables d'exprimer un récepteur de forte affinité pour l'IL-2 (Plumas et al, 1991; Rand et al, 1991; Riedel et al, 1990). La forme soluble du récepteur pour l'IL-2 détectée dans les sérums de patients HES semble provenir des éosinophiles.

Des travaux récents rapportent la synthèse de grandes quantités d'IL-5 et d'IL-4 par les lymphocytes T de patients HES, mais très peu d'IFN γ (Cogan et al, 1994).

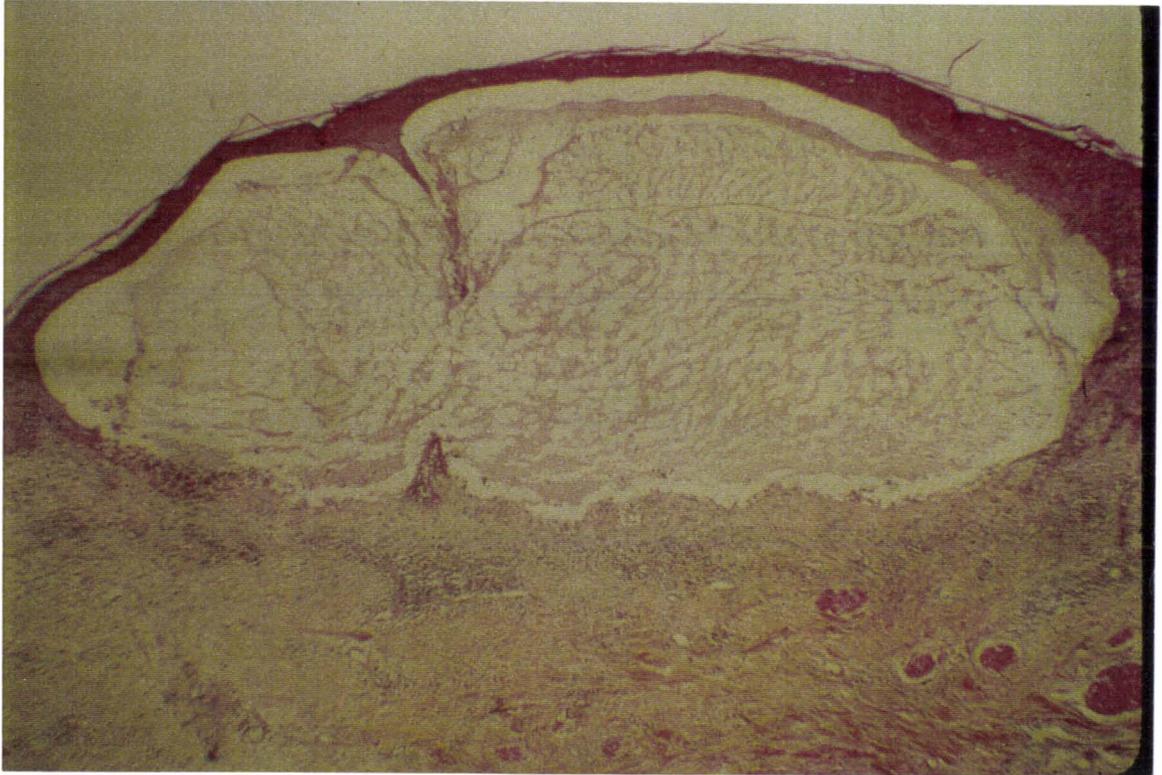


Figure 18. Coupe histologique obtenue à partir de biopsie cutanée de patient présentant une pemphigoïde bulleuse. La pemphigoïde est caractérisée par une bulle sous-épidermique et un infiltrat inflammatoire dermique riche en éosinophiles.

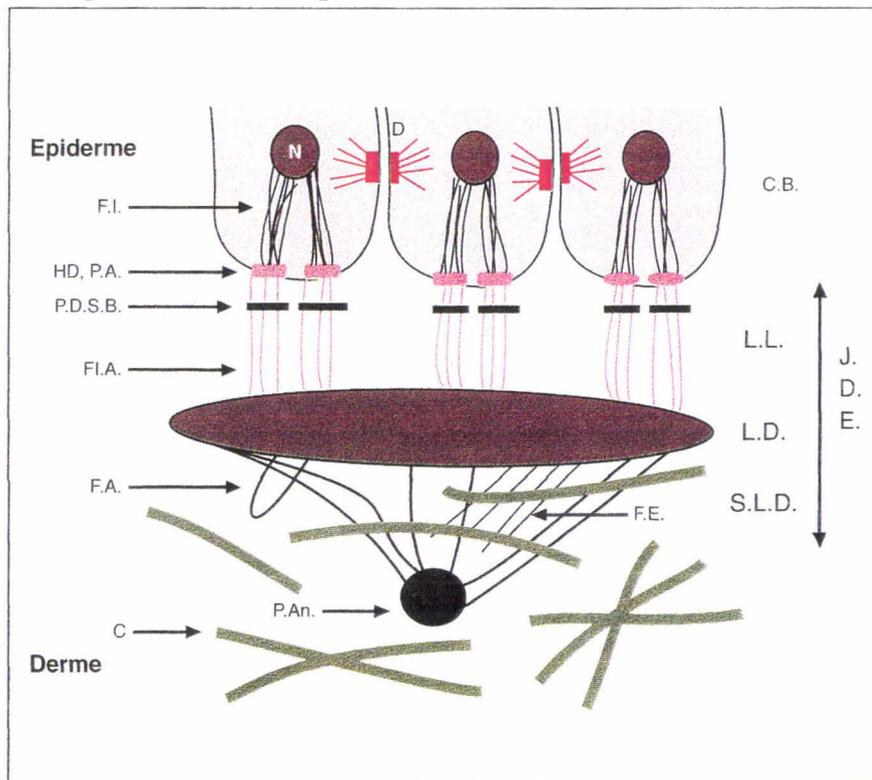


Figure 19 Jonction dermo-épidermique : aspects morphologiques. D : desmosomes ; N : noyau ; F.I. : filaments intermédiaires ; C.B. : kératinocytes de la couche basale de l'épiderme ; HD : hémidesmosomes ; P.A. : plaques d'attachement ; P.D.S.B. : plaques denses sub-basales ; F.I.A. : filaments d'ancrage ; F.A. : fibrilles d'ancrage ; C : collagène ; L.L. : lamina lucida ; L.D. : lamina densa ; S.L.D. : sublamina densa ; J.D.E. : jonction dermo-épidermique ; F.E. : pseudofibrilles élastiques ; P.An. : plaque d'ancrage.

L'EOSINOPHILE DANS LA PEMPHIGOÏDE.

Les dermatoses bulleuses auto-immunes comprennent un ensemble de maladies caractérisées par la perte de la cohésion des constituants cutanés à la suite d'une réaction auto-immune, aboutissant à la formation de bulles. Deux grands groupes de dermatoses bulleuses auto-immunes peuvent être individualisés en fonction du site de survenue de la bulle et en fonction des antigènes cibles de la réponse auto-immune. 1) Les dermatoses bulleuses auto-immunes intraépidermiques regroupant les pemphigus, définis par la perte de la cohésion des kératinocytes entre eux, secondaire à la perte d'intégrité des desmosomes. Plusieurs antigènes desmosomiaux différents peuvent être en cause avec génération d'une réponse inflammatoire aboutissant à des tableaux cliniques distincts. 2) Les dermatoses bulleuses auto-immunes sous-épidermiques sont liées à la perte d'intégrité de la jonction dermo-épidermique ou de la zone dermique superficielle sous-basale. Elles comportent les maladies du groupe de la pemphigoïde, les maladies du groupe de l'épidermolyse bulleuse acquise et la dermatose à IgA linéaire (Ortonne et al, 1992).

La pemphigoïde bulleuse est la plus fréquente des dermatoses bulleuses acquises de la jonction dermo-épidermique, ce qui explique les progrès récents dans la compréhension de cette affection.

Les recherches récentes se sont attachées à apprécier la place de l'immunité cellulaire dans la pathogénie de la maladie. Les lymphocytes T CD4⁺ de phénotype mémoire activé (CD25⁺, CD45RO⁺, HLA-DR⁺) représentent un contingent notable des cellules de l'infiltrat inflammatoire. Ils sont retrouvés précocement dans les lésions pré-bulleuses en contact avec la jonction dermo-épidermique (Michalaki et al, 1991). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel des lymphocytes T dans l'initiation du processus inflammatoire, mais méritent d'être confirmés par l'existence de lymphocytes T spécifiques des antigènes de la pemphigoïde chez les patients.

En plus des anticorps et du complément (Jordon et al, 1967), on observe dans les lésions de la pemphigoïde des lymphocytes (Nestor et al, 1987), des neutrophiles (Nally et al, 1984; Naito et al, 1984), des monocytes/macrophages (Iwatsuki et al, 1983; Wintroub et al, 1987) des thrombocytes (Iwatsuki et al, 1983; Lohrisch et al, 1982) et en particulier des éosinophiles (Emmerson et al, 1968; Nishioka et al, 1984). L'accumulation des basophiles et des mastocytes (Dvorak et al, 1982) ainsi que des dépôts d'IgE au niveau de la membrane basale et des taux élevés d'IgE dans le sérum et le liquide de bulles ont été énoncés (Baba et al, 1976; Nieboer et al, 1980).



Figure 20. Coupe histologique obtenue à partir de biopsie cutanée de patient présentant une dermatite atopique.

Les polynucléaires éosinophiles constituant le type cellulaire prédominant dans l'infiltrat inflammatoire lésionnel semblent jouer un rôle très important dans la pathogénèse. A partir de là, on peut admettre que les protéines cationiques relarguées par l'éosinophile activé pourraient être responsables de la dégradation du complexe d'adhérence de l'épiderme à la lamina densa (Dubertret et al, 1980).

L'affluence des éosinophiles semble due au facteur ECF (Eosinophil Chemotactic factor) qui est présent dans les liquides de bulles (Dierksmeier et al, 1980). Dans ces liquides, on a trouvé aussi de l'histamine (Katayama et al, 1984). Plusieurs travaux ont montré la présence de différentes cytokines dans les liquides de bulles. Des taux élevés de TNF α ont été détectés dans les liquides de bulles par les tests d'ELISA (Zillikens et al, 1992). D'autres médiateurs de l'inflammation ont été impliqués dans cette maladie. La présence d'IL-1 et d'IL-2 (Grando et al, 1989), de lymphotoxine (Jeffes et al, 1984) et d'IL-5 (Delaporte et al, communication personnelle) a été rapportée. Des travaux récents ont énoncé la synthèse de l'IFN γ par les lymphocytes de l'infiltrat inflammatoire lésionnel (Kaneko et al, 1992). Cependant, aucune étude n'a démontré que ces cytokines soient impliquées directement dans la formation de la bulle. Le rôle exact des différents antigènes de la pemphigoïde sur la polarisation TH1/TH2 reste encore obscur.

L'ÉOSINOPHILE DANS LA DERMATITE ATOPIQUE.

La dermatite atopique (DA) regroupe l'ensemble des manifestations cutanées qui surviennent chez un sujet prédisposé génétiquement au développement d'autres affections atopiques (asthme bronchique et rhinite allergique par exemple) sans que cette association ne soit absolue et/ou nécessaire. Dans plus d'un tiers des cas, l'éruption de cette maladie débute de façon caractéristique avant l'âge de trois mois. Le symptôme majeur, commun à toutes les lésions, est la sécheresse cutanée responsable du prurit : il est si accusé que les enfants acquièrent un réflexe de grattage exacerbé.

L'histogénèse des lésions reste complexe, mais en cas d'application répétée d'antigènes par voie épicutanée on observe un infiltrat mixte de lymphocytes T CD4⁺ prédominant (Lever et al, 1987; Rocha et al, 1984) dont la majorité expriment les antigènes HLA-DR comme signe d'activation locale (Zachary et al, 1985), et de mastocytes qui infiltrent en particulier la peau

lichénifiée (Mihm et al, 1976; Soter et al, 1989; Sugiura et al, 1993).

Les techniques immunohistochimiques révèlent la présence d'au moins deux protéines cationiques de l'éosinophile (MBP et l'EDN) et signalent une dégranulation des éosinophiles au niveau du site de l'inflammation (Leiferman, 1989; Leiferman et al, 1985). Une corrélation entre la sévérité de la maladie et le dépôt des granules de l'éosinophile a été rapportée (Leiferman, 1989). Les cellules de Langerhans portant à leur surface des IgE, ont aussi été observées dans les lésions cutanées (Bieber et al, 1989).

L'inflammation de la peau est souvent associée à un taux très élevé d'IgE (Wittig et al, 1980; Hoffman et al, 1975). Plusieurs travaux soulignent une induction d'une réponse spécifique de l'allergène via les cellules de Langerhans exprimant le récepteur de haute affinité (FcεRI) pour les IgE (Bieber et al, 1992). L'activation sélective de cellules T CD4 de type TH2 joue un rôle important dans la pathologie par production et libération de cytokines nécessaires à l'inflammation allergique telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13.

Le rôle des éosinophiles dans la DA est resté longtemps sujet à controverse (Dvorak et al, 1990; Leiferman et al, 1991). On a d'abord attribué un rôle bénéfique à l'éosinophile. Cependant, des travaux récents ont démontré la libération des protéines toxiques de l'éosinophile responsables de différents symptômes inflammatoires (Weller, 1991). L'ECP sécrétée durant le processus inflammatoire induit la libération de l'histamine des mastocytes et semble causer la destruction des cellules épithéliales et des kératinocytes (Leiferman et al, 1991). Le taux d'ECP dans le sérum des patients atteints de la DA est très élevé (Kägi et al, 1992; Leiferman et al, 1991; Jakob et al, 1991; Kapp et al, 1991; Paganelli et al, 1991; Sugai et al, 1992; Tsuda et al, 1992).

En se basant sur des données récentes, le mécanisme de l'inflammation de la dermatite atopique peut être schématisé comme l'indique la figure. La présentation de l'antigène est médiée par les cellules de Langerhans dans la DA seulement si ces cellules ont des IgE à leur surface (Mudde et al, 1990; Mudde et al, 1992). L'allergène pénétrant la peau des patients induit une activation des cellules de Langerhans associée à une libération de l'IL-1. Il en résulte une activation des lymphocytes T de type TH2 spécifiques de l'atopie qui à leur tour libèrent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 (Romagnani, 1992; Romagnani et al, 1993). L'IL-4, comme cytokine clé dans cette inflammation atopique est capable d'induire le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII) sur les cellules de Langerhans et les monocytes et régule la synthèse d'IgE en influençant le switch des IgM en IgE. L'IL-4 contrôle aussi la migration des éosinophiles à travers

les cellules endothéliales des patients atopiques (Moser et al, 1992). L'IL-5 est capable de stimuler la prolifération et les fonctions des éosinophiles et particulièrement leur dégranulation dans les tissus (Weller, 1991). Il a de plus été récemment démontré dans notre laboratoire que les éosinophiles présents dans le derme de patients atteints de dermatite atopique exprimaient l'ARN messager et la protéine IL-5 (Tanaka et al, 1994). Ces résultats associés à la démonstration que les mêmes éosinophiles expriment le récepteur de forte affinité pour l'IgE, FcεRI (Soussi-Gouni et al, 1994), suggèrent une possibilité d'amplification de la dégranulation des éosinophiles tissulaires au cours de la dermatite atopique et renforcent l'hypothèse impliquant une réponse Th2 dans cette pathologie.

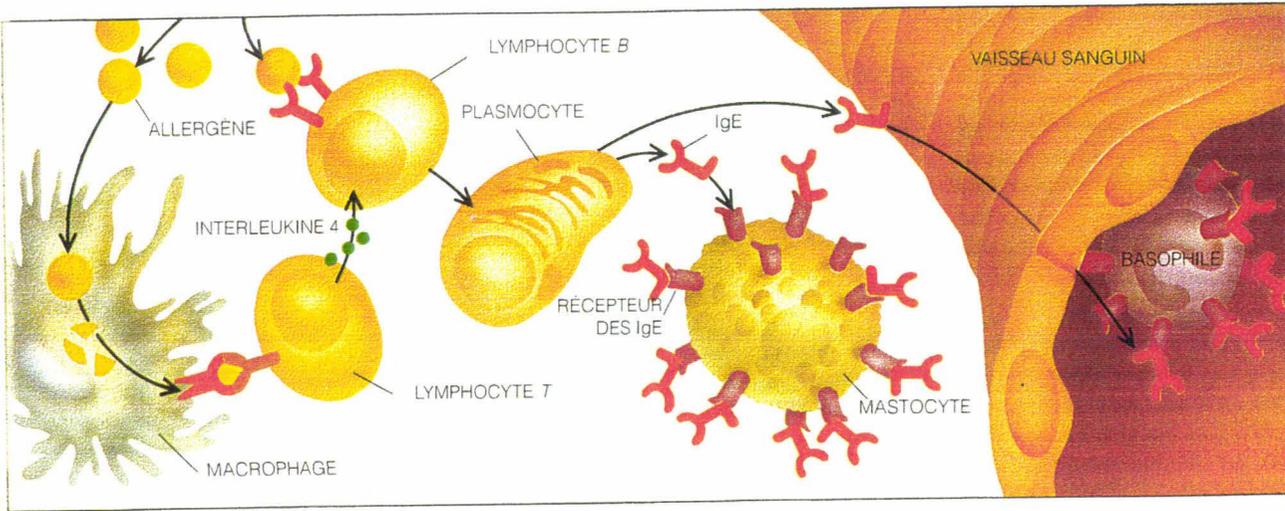
Le rôle des mastocytes n'est pas complètement élucidé, mais on leur reconnaît un rôle dans la réaction de l'hypersensibilité immédiate dépendante d'IgE. L'activation des mastocytes du derme après liaison des IgE au récepteur FcεRI conduit à une libération de différentes cytokines et plus particulièrement le TNFα (Walsh et al, 1991). Ce dernier peut à son tour activer les cellules de Langerhans ainsi que les éosinophiles. Les mastocytes peuvent être aussi une source d'IL-4 qui peut initier la réponse TH2.

Par ailleurs, les basophiles par leur production de l'IL-4 (Brunner et al, 1993; MacGlashan et al, 1994) suite à une stimulation par les IgE et l'antigène, contribuent à l'amplification et la propagation de la réponse inflammatoire. Les basophiles peuvent aussi produire de l'IL-4 par un mécanisme indépendant de la stimulation par les IgE et l'antigène (MacGlashan et al, 1994). De ce fait, il est possible que les basophiles jouent un rôle initiateur dans le développement de la réponse allergique en induisant la différenciation des TH0 en TH2.

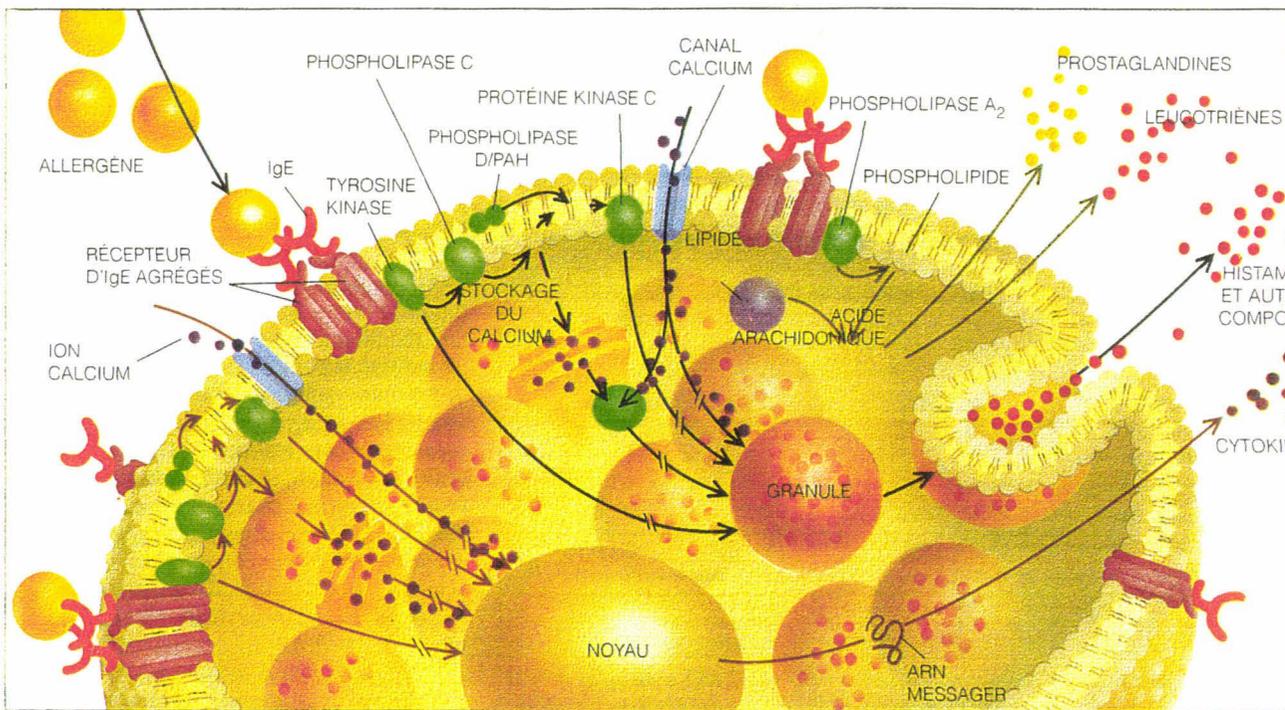
Des travaux récents montrent que l'expression de l'ARNm de l'IL-4 et celui de l'IFNγ est régulé au niveau des lésions causées par la DA (Grewe et al, 1994). Les cytokines de type TH2 sont cruciales lors de l'initiation de la DA, alors que l'IFNγ est important dans la propagation de l'inflammation.

L'ÉOSINOPHILE DANS L'ASTHME ALLERGIQUE

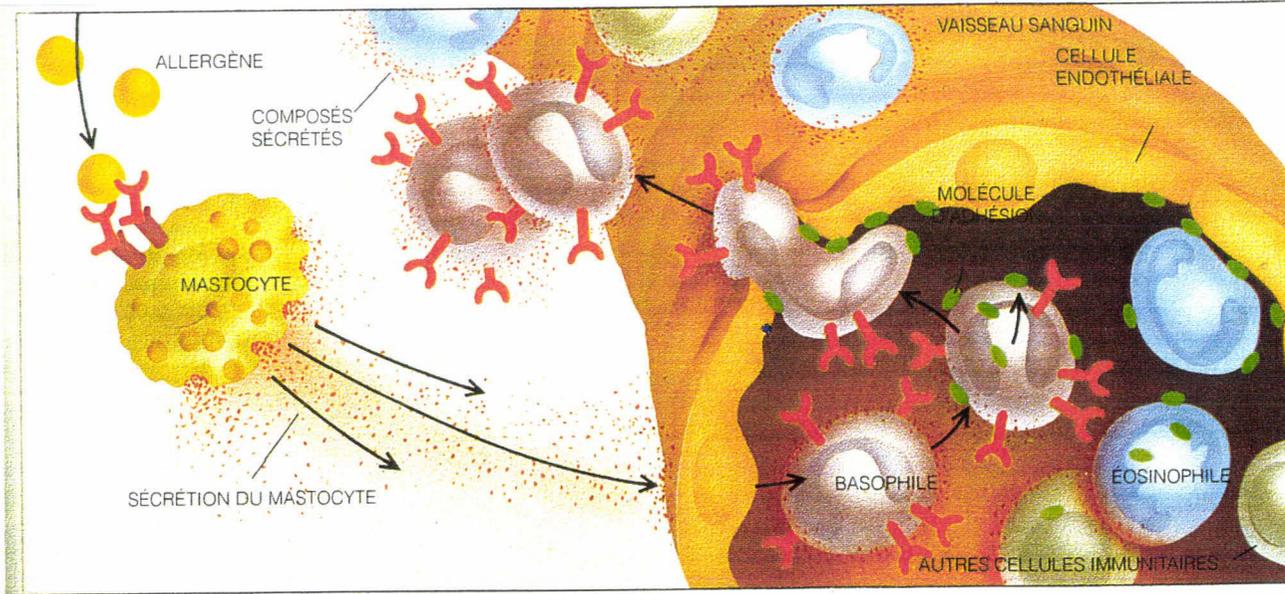
Réaction à part, l'asthme allergique est cantonné dans les réactions d'hypersensibilité de type I à IgE ou hypersensibilité immédiate. Il est causé par l'association d'une bronchoconstriction et d'une production excessive de mucus particulièrement visqueux, les deux processus obstruant les voies aériennes. Des crises d'asthme répétées entraînent un épaissement permanent des couches



Phase de sensibilisation



Activation des mastocytes



L'immunité retardée

musculaires des parois des voies respiratoires.

L'asthme se présente généralement sous deux formes. La forme extrinsèque où l'allergène agresseur peut être identifié, et la forme intrinsèque dans laquelle aucune substance capable de stimuler la production d'IgE ne peut être incriminée. Manifestement, les substances libérées par les mastocytes et les basophiles ainsi que les protéines toxiques des éosinophiles se combinent pour stimuler la production du mucus, pour endommager les tissus des voies respiratoires et peut être même pour augmenter l'hyper-réactivité bronchique. Ces médiateurs préexistent à la réaction et sont stockés dans les granules de ces cellules effectrices.

De nombreux travaux suggèrent, en plus de l'éosinophilie périphérique, une infiltration de la muqueuse de l'arbre bronchique par les éosinophiles qui semblent participer à la pathogénèse de l'asthme. Les éosinophiles peuvent être observés dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire chez les personnes asthmatiques. L'intensité du syndrome obstructif et la sévérité de l'asthme peuvent être corrélés à l'éosinophilie tissulaire. Les éosinophiles sont responsables des lésions de la muqueuse bronchique secondaires à la libération de protéines cationiques contenues dans les granules de ces cellules (Bousquet et al, 1990). La protéine basique majeure (MBP) de l'éosinophile est capable d'activer les basophiles, les mastocytes, les neutrophiles et les plaquettes (Gleich et al, 1993). Chez les singes sensibilisés, le nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire ainsi que le taux de la MBP sont corrélés au degré de l'hyper-réactivité (Gleich et al, 1993). La capacité de la MBP à augmenter la réponse des voies respiratoires peut être mimée par des polycations synthétiques, laissant supposer l'importance de la charge cationique dans l'hyper-réactivité (Coyle et al, 1993). Enfin, la MBP à des concentrations équivalentes à celle trouvées dans les expectorations des patients asthmatiques est capable d'altérer expérimentalement les cellules épithéliales d'une manière similaire à celle observée au cours de l'asthme (Gleich, C.J. and Alphonson, C.R, 1986). Toutes ces observations suggèrent que ces protéines sont des effecteurs directs des lésions observées dans cette pathologie.

L'un des apports les plus originaux des recherches récentes a été la démonstration que des populations cellulaires impliquées dans la physiopathologie de l'asthme pouvaient, en même temps qu'elles libéraient des médiateurs pro-inflammatoires, produire des cytokines régulant toutes les étapes de la réponse allergique. C'est ainsi que le mastocyte dans le contexte de réactions dépendantes d'IgE a été identifié comme une source potentielle d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 qui lui permet de jouer un rôle essentiel dans le recrutement et l'activation des cellules de l'inflammation, voire la régulation de la production d'anticorps dont l'IgE elle-même.

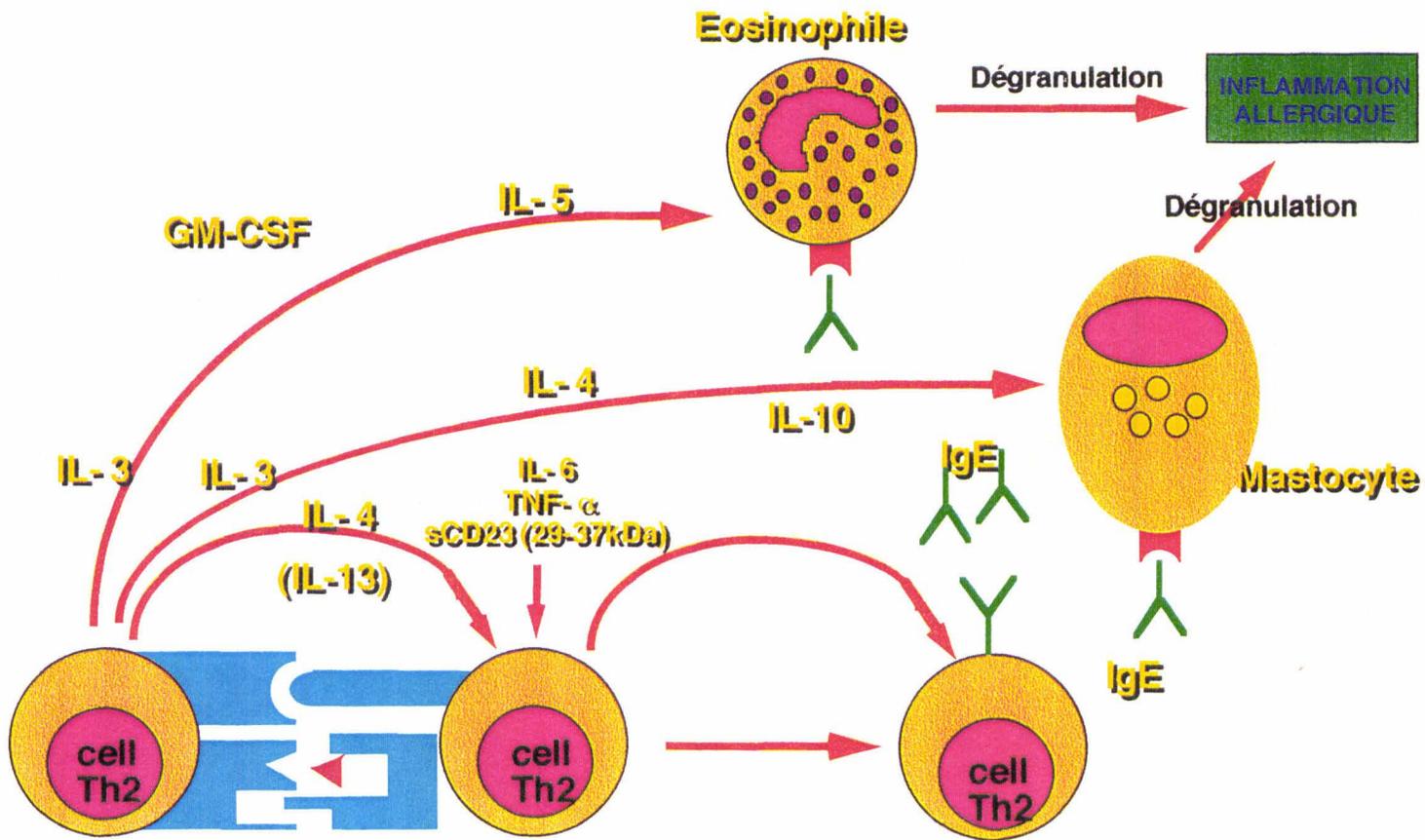


Figure 23. Rôle central des cytokines, produites par les lymphocytes T CD4+ TH2 spécifiques de l'allergène, dans le recrutement et l'activation des cellules responsables de l'inflammation (lymphocytes B producteurs d'IgE, éosinophiles et mastocytes)

Dans ce contexte, l'éosinophile a également été reconnu comme une source d'IL-5 dans cette pathologie (Broide et al, 1992). La sévérité de la maladie a été corrélée à l'expression de l'IL-5. L'IL-5 prolonge en effet la survie des éosinophiles en inhibant leur apoptose et son hyperproduction pourrait être un facteur de résistance aux corticostéroïdes (Quan et al, 1993).

Selon le schéma classique, les basophiles, les éosinophiles et les autres globules blancs sont groupés autour des mastocytes activés qui jouent un rôle initiateur de la réponse immune. Les mastocytes, en présence de complexes antigène-anticorps libèrent différents composés (leucotriènes, facteur d'activation plaquettaire et cytokines qui passent dans les vaisseaux sanguins voisins et augmentent l'expression des molécules d'adhésion (intégrines, sélectines, et molécules appartenant à la famille des immunoglobulines) à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. Les leucocytes migreraient ensuite à travers les cellules endothéliales et gagneraient les tissus environnants. Des vagues de cellules inflammatoires se succèdent, appelées par les produits des précédentes étapes et constituent la phase retardée.

Si l'asthme allergique ne se réduit pas aux IgE, il n'est pas davantage restreint aux mastocytes et aux basophiles, pendant longtemps considérés comme les seules cellules dotées d'un récepteur de forte affinité pour les IgE (FcεRI). La démonstration de l'expression de ce récepteur par d'autres populations cellulaires dont les cellules de Langherans (Bieber et al, 1992) et les éosinophiles (Soussi-Gouni et al) donne à l'allergie en général un éclairage nouveau qui a révolutionné les concepts physiopathologiques des maladies allergiques. L'éosinophile n'est plus un effecteur de la phase tardive de l'hypersensibilité mais intervient au premier plan dans le déclenchement des phénomènes allergiques. Plus récemment, il a même été envisagé que le FcεRI exprimé par les monocytes puisse participer à la présentation d'allergènes (Maurer et al, 1995). Ces résultats très récents seraient évidemment à considérer dans le contexte de la fonction présentatrice d'antigènes de l'éosinophile.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

LES REACTIFS.

Le composant sécrétoire (CS) humain purifié à partir de colostrum humain nous a été donné généreusement par Mme le Professeur Spik (Faculté des sciences et techniques, Lille I).

Un sérum de lapin dirigé contre le composant sécrétoire (polyc a CS) purifié a été obtenu après deux injections par la technique de Vaitukaitis. Sa réactivité vis-à-vis du composant sécrétoire a été vérifiée en Western blot.

L'IgA sérique (IgA) humaine purifiée à partir du plasma humain provient du laboratoire Cappel (Inc-Malvern, USA).

L'IgA sécrétoire purifiée à partir du colostrum humain provient des laboratoire Sigma (St-Louis, MO, USA).

L'anticorps monoclonal de souris anti-IgA humaine (anti-IgA mAb), dirigé contre la chaîne α , préparé chez la souris et d'isotype IgG1 provient de la firme Sigma.

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le CS (mAb anti-SC) nous a été donné par le Dr Tlaskalova (Prague, Tchèqueoslovaquie).

L'anticorps **My 43**, anticorps monoclonal de souris de type IgM à chaîne kappa dirigé contre le récepteur du fragment constant des IgA des monocytes humains (Shen et al, 1989) nous a été donné par le Dr Li Shen, (Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Hanover, USA).

Un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal de type IgG anti *Toxoplasma gondii* ainsi que l'anticorps **5G3**, anticorps monoclonal de souris d'isotype IgM dirigé contre des antigènes d'excretion - sécrétion de *Trypanosoma cruzi* (donné par le Dr Ali Taïbi, CIBP, Institut Pasteur, Lille) ont été utilisés comme contrôles négatifs.

Un anti sérum de lapin dirigé contre l'IL-5 humaine a été aimablement donné par le Dr Jan Tavernier (Roche, Gand, Belgium).

Un anti sérum de lapin et un anticorps monoclonal dirigés contre l'IFN γ humain proviennent du laboratoire Genzyme. Ces anticorps ne reconnaissent ni l'IFN α ni l'IFN β , comme il a été démontré par un test ELISA.

Un anti sérum de chèvre et un anticorps monoclonal dirigés contre l'IL-4 humaine proviennent du laboratoire R&D Systems. La spécificité de ces anticorps vis-à-vis de l'IL-4 a été démontrée par Western Blot et un test ELISA.

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'IL-4 humaine nous a été donné

aimablement par le Dr Heuser (Basel, Suisse).

Un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'IL-10 humaine nous a été donné aimablement par le Dr Goldman (Bruxelle, Belgique).

PRELEVEMENTS TISSULAIRES.

Les biopsies cutanées ont été fixées dans le paraformaldéhyde à 4% et incluses en paraffine pour l'immunohistochimie, l'hybridation *in situ* ou la RT-PCR *in situ*. Avant utilisation, les coupes étalées sont séchées à l'étuve puis déparaffinées dans des bains de toluène pendant 5 minutes. La réhydratation est ensuite assurée par des bains successifs de 2 minutes dans l'alcool à 100°, dans l'alcool à 95°, puis dans du tampon TBS contenant 10% de Tris-HCL / 0.5 M pH 7.6 et 10% de NaCl 1.5 M.

LES CELLULES.

Les éosinophiles humains.

Les éosinophiles de sang périphérique proviennent de sujets présentant une hyperéosinophilie liée au syndrome hyperéosinophilique idiopathique, à l'asthme ou à la pemphigoïde bulleuse. Les éosinophiles présents dans le lavage bronchoalvéolaire d'un patient allergique ont été purifiés par sélection négative. Le sang est prélevé sur 0.2 ml d'héparinate de calcium. Les éosinophiles sont isolés par sélection négative (MACS).

Les lymphocytes humains proviennent de sujets présentant un hyperéosinophilie d'étiologie variée et servent de témoin positif dans les techniques de RT-PCR.

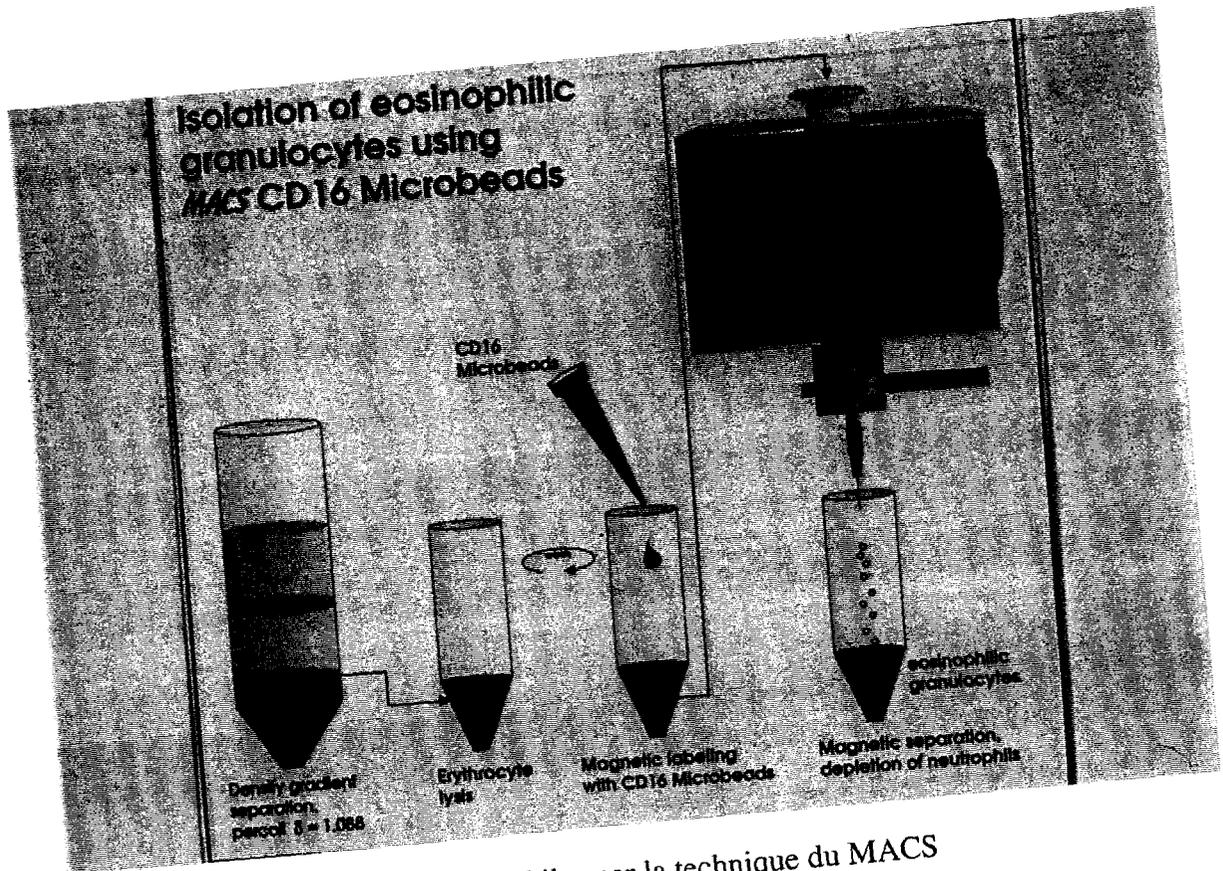


Figure 24. Purification des éosinophiles par la technique du MACS

METHODES

PURIFICATION DES EOSINOPHILES

Les éosinophiles purifiés par gradient de densité (métrizamide), présentent souvent une faible proportion de neutrophiles contaminants. La purification par sélection négative est basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre la molécule CD16 (Fc γ RIII) couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Allemagne). La forte expression du CD16 par les neutrophiles permet leur rétention sur la colonne par l'intermédiaire d'un champ magnétique (figure 24).

Les granulocytes (50.10^6), obtenues séparation des cellules mononuclées sur gradient de Ficoll, sont réparties dans 50 μ l de PBS-BSA 0.5% en présence des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD16 pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont alors déposées au sommet de la colonne du MACS (Magnetic Antibody Cell Sorting, Miltenyi Biotec, Allemagne). L'élution est effectuée par une solution de PBS-BSA 0.5%. Les cellules seront identifiées, après cyto-centrifugation et coloration au May Grünwald Giemsa. On obtient généralement une pureté de 98 à 100%.

Les suspensions d'éosinophiles purifiés sont cyto-centrifugées sur lames et fixées par le paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes. La déshydratation est assurée par des bains successifs d'alcool de 2 minutes, alcool à 30%, alcool à 70%, puis alcool à 100%. Les lames sont stockées à -20°C avant d'être analysées.

ANALYSE DES PROTEINES

IMMUNOMARQUAGE A LA PHOSPHATASE ALCALINE.

Les cyto-préparations et les coupes tissulaires sont rehydratées dans des bains décroissants d'alcool, lavées dans du TBS puis saturées pendant une heure avec du TBS-BSA 0.5%. Après une incubation pendant deux heures avec le premier anticorps : un immunosérum de lapin anti-IL-5 dilué au 1/50 ou des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'IFN γ , l'IL-10, l'IL-4 humains à 10 μ g/ml. Un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés à titre de contrôles isotypiques dans les mêmes conditions. Après lavage dans du TBS, les lames sont incubées pendant 45 minutes avec des anticorps anti-Ig de lapin marqués à la phosphatase alcaline dilués au 1/50, ou d'abord avec un immunosérum de lapin anti-Ig de

souris non marqué dilué au 1/50 et puis avec un anticorps de souris marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/50 où la réaction est amplifiée par un système phosphatase alcaline/anti-phosphatase alcaline (APAAP) (Dako, Glostrup, Danemark). Les substrats utilisés pour la révélation de la phosphatase alcaline sont la New Fuchsin (New Fuchsin Substrate System, Dako, Carpinteria, USA) ou le 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate / nitrobleu tetrazolium substrate (BCIP/NBT, Boehringer) donnant respectivement des colorations rouge et bleue. Après lavage les noyaux sont colorés à l'hématoxyline.

DOUBLE IMMUNOMARQUAGE A LA PHOSPHATASE ALCALINE.

Les cyto-préparations sont réhydratées dans des bains décroissants d'alcool, lavées dans du TBS puis saturées pendant une heure avec du TBS-BSA 0.5%. Les cellules sont incubées avec un immunosérum de lapin anti-IL-5, immunosérum de lapin anti-IFN γ ou immunosérum de chèvre anti-IL-4 dilués au 1/50. Après lavage dans du TBS, les lames sont incubées pendant 45 minutes avec des anticorps anti-Ig de lapin ou anti-Ig de chèvre marqués à la phosphatase alcaline dilués au 1/50. Le substrat utilisé pour la révélation de ce premier immunomarquage est la New Fuchsin. Les cellules colorées en rouge semblent exprimer les cytokines correspondantes. Après lavage les cellules sont traitées par du tampon Tris 10 mM et l'EDTA à 1mM pour dénaturer la phosphatase alcaline et incubées une nuit à 4°C avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'IFN γ , l'IL-10, l'IL-4 humains à 10 μ g/ml. Après 3 lavages au TBS, un second anticorps biotinylé de lapin anti-Ig de souris dilué au 1/100 dans du TBS est ajouté pendant 30 minutes. La révélation est réalisée grâce au complexe streptavidine-phosphatase alcaline (Dako) et le substrat BCIP/NBT (Boehringer). Les cellules positives pour chaque cytokine sont colorées en bleu. Des sérums de chèvre et de lapin sains et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés à titre de contrôles isotypiques dans les mêmes conditions. Après lavage les noyaux sont colorés à l'hématoxyline.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les cellules sont fixées dans du glutaraldéhyde et l'acide picrique à 1%, déshydratées et incluses dans une résine (LR-White) à -20°C. Les coupes ultrafines sont collectées sur des grilles métalliques, saturées dans le tampon PBSO (PBS-Ovalbumine 2%) et incubées pendant une

heure à température ambiante avec des immunosérums de lapin dirigés contre l'IL-5 ou contre l'IFN γ humains dilués au 1/50 dans le PBSO. Après trois lavages dans le PBS, les grilles sont incubées pendant une heure avec le complexe protéine A-or colloïdal dilué au 1/200 dans le PBSO, contre-colorées par la suite à l'acétate d'uranyl à 3% et observées au microscope électronique. Les grilles incubées en présence de la protéine A-or colloïdal servent de contrôles négatifs.

ANALYSE DE L'ADN ET DE L'ARN

PREPARATION DE L'ARN.

Afin de limiter la dégradation de l'ARN par les ribonucléases, le matériel et les solutions sont autoclavés à 200°C pendant deux heures. L'ARN total des cellules est préparé selon la méthode décrite par Chirgwin (Chirgwin et al, 1979). Les cellules sont recueillies dans une solution de guanidine thiocyanate (guanidium thiocyanate 4mM, EDTA 1mM pH 7.4, d'acétate de sodium 5mM, N-Lauryl-sarcosine 6.8 mM et 2- β mercaptoéthanol 0.7M) permettant l'inhibition des ARNases cellulaires. Après passage à travers une aiguille pour casser les molécules d'ADN, les ARN sont séparés par ultracentrifugation (32000 tours/min pendant 20 heures à 20 °C), sur coussin de chlorure de césium (CsCl 5.1 M, NaOAc 25 mM pH 5). Le culot d'ARN est repris dans l'eau et précipité en présence de 1/10 volume d'acétate de Sodium 3M pH5 et de 2.5 volume d'éthanol à 100% pendant 15 minutes à -80°C. Après lavage à l'éthanol à 70%, l'ARN est séché sous vide et repris dans l'eau stérile. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie d'absorption à 260 nm. 1 DO260 = 40 μ g/ml. Un rapport d'absorption 260/280 compris entre 1.5 et 2 traduit la pureté de l'échantillon. Dans tous les cas, la qualité de l'échantillon est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1% dans le tampon TAE en présence de bromure d'éthidium.

TRANSCRIPTION REVERSE.

L'ARN (2 μ g) est dénaturé à 60°C pendant 2 minutes et la transcription en cDNA a été réalisée à 37°C pendant une heure dans un volume de 20 μ l en présence de 0.5 μ l oligo dT (0.8 μ g/ml) (Promega), 1.5 μ l MMLV (200U/ μ l) (Gibco BRL), 1 μ l de dNTPs (100mM)

Nom	Séquence	Fragment amplifié
IFN γ	5'AAGCTTATTCTCTCGGAAACGATG3'	513 pb
	5'GAATTCTTACTGGGATGCTCTTCG3'	
IL-5	5'AAGCTTATGAGGATGCTTCTGCAT3'	392 pb
	5'ATGCCCCAAGCTGAGAACCAGACCCA3'	
IL-4	5'TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA3'	370 pb
	5'GAATTCTATCCACTCGGTGTTTCAT3'	
IL-10	5'AAGCTTATGGGTCTCACCTCCCAAC3'	351 pb
	5'GAATTCAAGCCCGCCAGGCCCCAG3'	

(Pharmacia), 0.5 µl de RNasine (4000 U/ml) (Promega) et 4 µl de tampon MMLV (Gibco BRL). L'ADNc obtenu est dénaturé à 100°C pendant 2 minutes, puis congelé à -20 °C jusqu'à utilisation.

AMPLIFICATION PAR RT-PCR.

L'amplification s'effectue sur 1 µl d'ADNc dans un volume final de 25 µl. Le mélange réactionnel est composé de 0.5 µl de chaque amorce (20 µM), 0.2 µl de dNTPs (100mM), 0.2 µl de Taq polymérase (5U/ µl) (Appligene) et 2.5 µl de tampon X10 (Appligene). Ce mélange est ensuite couvert par de l'huile minérale afin d'éviter l'évaporation. Les tubes subissent ensuite un chauffage à 95°C pendant 5 min afin de dénaturer l'ADN puis une succession de 40 cycles de température. Chaque cycle se décompose de la façon suivante : 2 min à 60°C, permettant aux amorces de se fixer sur les séquences d'ADN complémentaires, puis 3 min à 72°C, température optimale d'élongation de la polymérase et enfin 1 min à 94°C pour dénaturer les nouveaux brins d'ADN synthétisés. La réaction se termine par un passage de 7 min à 72°C afin de permettre à la polymérase de terminer la synthèse de tous les fragments d'ADN amplifiés. Après extraction au phénol/chloroforme, les produits de PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose afin de déterminer la taille des fragments amplifiés puis par Southern blot à l'aide d'un oligonucléotide interne afin de déterminer la spécificité de ces fragments. Le tableauX représente les amorces des différentes interleukines utilisées.

SOUTHERN BLOT.

Afin de démontrer que la région amplifiée correspond bien à celle recherchée, l'ADN amplifié par PCR est analysé par Southern blot à l'aide d'un oligonucléotide interne à la région amplifiée. Après électrophorèse, le gel permettant la séparation de l'ADN est plongé pendant 30 minutes dans une solution contenant 1.5 mM de NaCl et 1.5 M de NaOH afin de dénaturer l'ADN. La neutralisation s'effectue pendant 30 minutes en présence de 1.5 M de NaCl et 1M de Tris pH 7.5. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon, par flux passif à l'aide d'une solution de SSC 10x pendant une nuit et fixé ensuite à la membrane par exposition pendant 3 minutes aux rayons ultra-violet. La membrane de nylon est alors conservée à +4°C jusqu'à utilisation.

MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATION.

Sondes oligonucléotidiques.

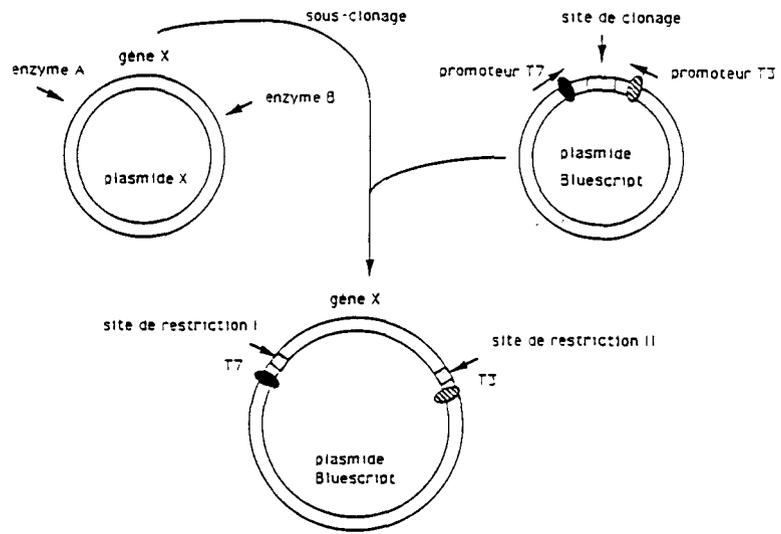
L'enzyme utilisée est la terminale désoxynucléotidyle transférase qui permet d'ajouter des désoxynucléotides marqués à la digoxygénine à l'extrémité 3'OH de l'oligonucléotide. La réaction s'effectue dans un volume de 20 µl contenant 4 µl de tampon (composé du cacodylate de potassium 1M, du tris-HCl 0.125M, de la BSA 1.25 M pH6.6) (Boehringer) en présence de 100 pmoles de l'oligonucléotide, de 1 µl de digoxygénine-dUTP 1mM, 1 µl de dATP 10mM, 1 µl de CoCl₂ 25mM et 1 µl de terminale désoxynucléotidyle transférase (50U/µl) . Après une incubation pendant 1 heure à 37°C, la réaction est arrêtée par adjonction de 2 µl d'EDTA

La sonde est séparée des nucléotides libres par précipitation avec 2.5 µl de LiCl 4M et 75 µl d'éthanol absolu pendant 30 min à -70°C. Après centrifugation à 13000 tr/min, la sonde est lavée à l'éthanol, séchée sous vide et reprise dans 20 µl d'eau.

Le marquage des oligonucléotides est vérifié par transfert sur membrane après électrophorèse et addition d'un anticorps polyclonal anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer) et le substrat de cet enzyme (New Fuchsin).

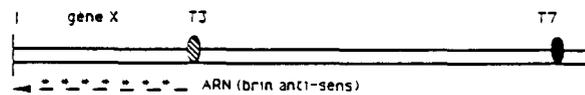
Hybridation.

Le membrane de nylon est préhybridée pendant 2 heures à 42 °C dans un tampon d'hybridation composé de SDS 0.1% , SSPE 4X, Tris-HCl 20 mM pH7.4, solution de Denhardt 1X et l'ADN de sperme de hareng 20 µg/ml. La solution de Denhardt est constituée de 0.02% d'albumine bovine, de 0.02% de Ficoll 400 et de 0.02% de polyvinylpyrrolidon. L'hybridation est effectuée pendant une nuit à 42 °C dans le même tampon d'hybridation en présence de la sonde marquée. Trois lavages de 30 minutes sont ensuite réalisés, les deux premiers à 42 °C en SSC 1X et 0.1% de SDS et le troisième en présence de SSC 0.1% et de 0.1% de SDS à 42°C. Le filtre est ensuite lavé dans une solution d'acide maléique 0.1M, NaCl 0.15 M pH 7.5 et de Tween 20 à 0.3%, saturé par une solution de blocage (Boehringer) pendant



Cas 1:

- coupure par l'enzyme I
- utilisation de la T3 polymérase



Cas 2:

- coupure par l'enzyme II
- utilisation de la T7 polymérase

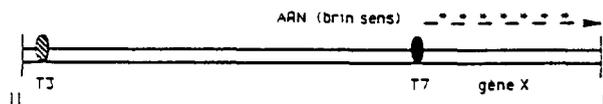


Figure 25. Principe d'obtention des ribosondes. Exemple du plasmide Bluescript. Le gène X est inséré dans le sens 5'-3' entre les promoteurs T7 et T3. En utilisant l'enzyme I et la T3 polymérase (cas 1) ou l'enzyme II et la T7 polymérase (cas 2), on obtient, respectivement, une sonde anti-sens ou une sonde sens.

30 minutes à température ambiante et incubé pendant 30 minutes avec des anticorps de chèvre anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline. Le filtre est ensuite lavé puis équilibré dans une solution composée de tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM et du MgCl₂ à 50 mM pH 9.5. La révélation est assurée par le substrat BCIP/NBT ou la New Fuchsin.

HYBRIDATION IN SITU.

En pratique, le principe de cette méthode peut être calqué sur celui de l'immunocytologie où la détection d'un épitope antigénique d'une protéine par un anticorps spécifique monoclonal, est substituée par la détection d'un acide nucléique par une sonde génique.

Préparation des sondes.

La sonde d'ADNc codant pour l'IL-5, aimablement donnée par le Dr Emilie (U 131, Clamart) a été sous clonée dans le plasmide Bluescript contenant deux promoteurs T7 et T3 en orientation inverse, séparés par un site de clonage multiple. Ces deux promoteurs sont issus de bactériophages d'E. Coli. Ils sont utilisés car ils sont reconnus de façon extrêmement spécifique par leurs ARN polymérases respectives, celles-ci étant en outre capables de transcrire de longs fragments. La démarche pour la synthèse de ribosondes est résumée dans le schéma n° x. Les sondes codant pour l'IFN γ et l'IL-10 ont été amplifiées par RT-PCR grâce à des oligonucléotides spécifiques à partir d'ARN de lymphocytes et clonées dans le plasmide x à l'aide du kit TA cloning (Invitrogen). Le sous-clonage est effectué dans le plasmide Bluescript (Figure 25). Les ADNc codant pour l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ ont été introduits entre les deux promoteurs au niveau du site de clonage. Les plasmides linéarisés au niveau d'un site de restriction unique situé en 3' et en 5' du brin à synthétiser permettent ainsi la transcription en un brin anti-sens, donnant un signal positif, ou en un brin sens, servant de contrôle négatif.

Transcription et marquage des sondes par le ³⁵S ou à la digoxygénine.

Le marquage à la digoxygénine ou par le ³⁵S lors de la transcription des sondes sens et anti-sens a été réalisé de la manière suivante :

- **Incuber** pendant une heure à 37°C, dans un volume final de 15 μ l :

100 ng de plasmide linéarisé traité à la protéinase K (1 μ l)

5 μ l de tampon 5X

1.5 μ l de DTT 0.1 M

1.5 µl de mélange d'ATP (5mM), GTP (5mM), CTP (5mM)
1 µl d'inhibiteur de ribonucléase
4 µl de ³⁵S UTP (Amersham) ou de **digoxygénine** (Boehringer)
0.5 µl de T3 ou T7 polymérase
2.5 µl d'eau

- **Ajouter** 1 µl de DNase I (RNase free), incuber 5 minutes à 37 °C.
- **Extraire** les protéines : ajouter 84 µl d'eau DEPC et extraire au phénol (vol/vol); puis au sevag (vol/vol).
- **Fragmenter** la sonde par hydrolyse alcaline en ajoutant 33 µl de tampon bicarbonate de Na 0.4 M pH 10.2 pendant 20 minutes à 60 °C.
- **Ajouter** :

HCl 0.5 M.....	6.5 µl
Tris-HCl 2M pH 7.5.....	3 µl
Yeast RNA.....	3 µl
DTT 1M.....	1.5 µl

- **Précipiter** en ajoutant 12 µl d'acétate de Na 3 M pH 5.3 et 300 µl d'éthanol 100% et laisser 1 heure à -80 °C.
- **Centrifuger** 15 minutes à 4°C à 13000 tr/min; aspirer à la pipette Pasteur le surnageant et ajouter 500 µl d'éthanol 70%.
- **Centrifuger** 15 minutes à 4°C à 13000 tr/min, aspirer le surnageant et sécher sous vide.
- **Reprendre** dans 10 µl de DTT 0.01M dilué dans l'eau DEPC.
- **Compter** la radioactivité. La marquage habituel est supérieur à 5.10⁶ cpm/ µl de sonde non diluée.

Les sondes froides marquées à la digoxygénine sont analysées par gel d'électrophorèse et transfert sur membrane de nylon. La révélation est assurée par addition d'un sérum de chèvre anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline et par le substrat BCIP/NBT.

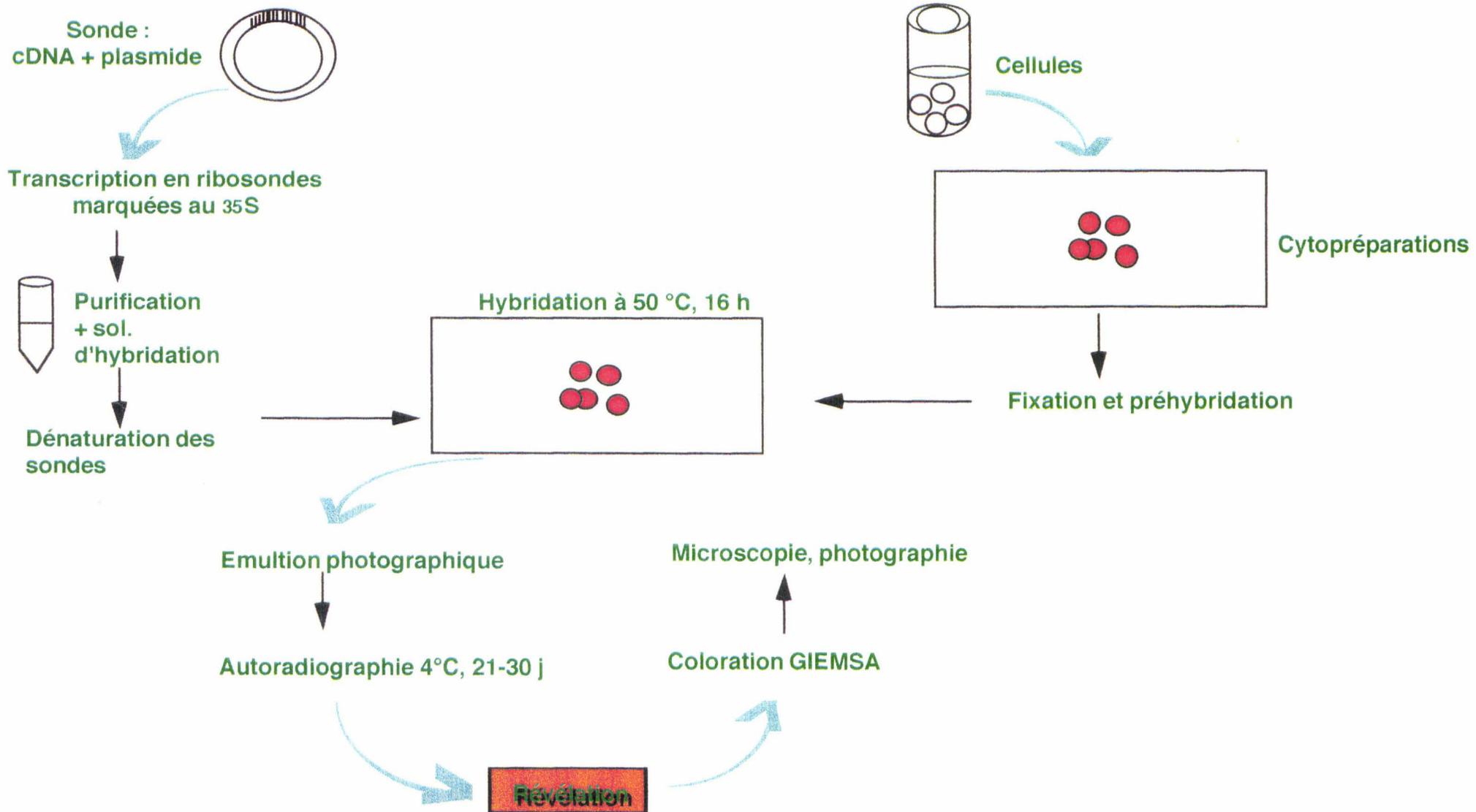


Figure 26. Schéma représentatif de l'hybridation *in situ*

Préparation des cytopréparations avant l'hybridation.

Les cellules sont fixées pendant 20 min à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4% puis rincées dans du PBS pendant 1 min à température ambiante. L'acétylation est effectuée dans du triéthanolamine 0.1 M pendant 5 minutes à 4 °C puis dans la même solution contenant 0.25% d'anhydride acétique pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées à l'eau, déshydratées dans l'éthanol à 95% et l'acétate d'ammonium 0.3 M puis séchées sous cloche à vide pendant une heure avant l'hybridation proprement dite.

Malgré l'étape d'acétylation, une fixation non spécifique de la sonde sur les éosinophiles riches en protéines basiques a été observée. Afin d'éviter cette fixation non spécifique, une préhybridation avec une sonde d'ARN soufrée non radioactive (Amersham, UK) et non spécifique a été effectuée, dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessous pendant 2 heures à 42°C.

Hybridation et lavages.

Les sondes anti-sens et sens de l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ sont reprises dans le milieu A puis ajoutées au milieu B. Le milieu d'hybridation comporte un mélange (vol/vol) de milieu A et de milieu B. Le milieu A est composé de : 60 μ l de NaCl (5 M), 10 μ l de Tris-HCl (2 M) pH7.5, 10 μ l d'EDTA (0.5 M), 10 μ l de phosphate de sodium (1M) pH 8, 40 μ l de Denhardt (50X), 10 μ l de DTT (1M), 50 μ l de Yeast RNA (10 mg/ml) et de 310 μ l d'eau. Le milieu B contient du sulfate de Dextran à 20% dans de la formamide désionisée.

L'hybridation est effectuée en chambre humide pendant 16 heures à 50°C (Figure 26). Un volume de 30 μ l de solution d'hybridation est déposé sur chaque lame puis recouvert d'une lamelle siliconée.

Après hybridation les lames sont lavées dans une solution contenant du SSC 5X et DTT 1mM pendant 15 minutes afin de décoller les lamelles. Des lavages ont ensuite été effectués sous agitation dans les bains suivants :

-SSC 5X, DTT 1mM, à 42 °C pendant 30 minutes.

-SSC 2X, formamide 50%, DTT 1mM, à 60 °C pendant 30 minutes.

-NaCl 0.4 M, EDTA 5mM pH 8, Tris-HCl 10 mM, pH7.4, à 37 °C, pendant deux fois 10 minutes.

-NaCl 0.4 M, EDTA 5mM pH 8, Tris-HCl 10 mM, pH7.4 et RNase A 20 μ g/ml à 37 °C,

pendant 30 minutes.

-SSC 2X pendant 15 minutes à 37 °C.

-SSC 0.1X pendant 15 minutes à 37 °C.

-Ethanol 95 °, acétate d'ammonium 0.3 M, à température ambiante pendant deux fois 5 minutes.

Les lames sont soit séchées dans le cas d'hybridation avec des sondes chaudes soit révélées immédiatement à l'immunoenzymologie dans le cas d'hybridation avec des sondes froides.

Autoradiographie en chambre noire.

Les lames sont trempées dans une émulsion nucléaire NTB-2 préchauffée à 42 °C à l'obscurité complète, puis séchées en position verticale pendant une heure à température ambiante, puis exposées dans des boîtes étanches à l'abri de la lumière (Figure 26). La révélation est effectuée entre 21 à 30 jours après l'hybridation. Après révélation (Kodak D19, France) et fixation (Unifix, Kodak, France) en chambre noire, les cellules ont été colorées au May Grünwald Giemsa pour une visualisation en microscope optique. Les cellules sont considérées comme positives lorsque le marquage avec la sonde anti-sens est supérieur au marquage avec la sonde sens.

Révélation des sondes froides.

Les lames d'hybridation avec des ribosondes marquées à la digoxygénine sont lavées dans du PBS, saturées avec du sérum de chèvre à 2 %, puis incubées avec un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/100 dans le TBS en chambre humide pendant une heure. L'anticorps en excès non fixé est éliminé par lavage au PBS et 50 µl de substrat BCIPT/NBT sont déposés sur la lame pendant 30 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par immersion des lames dans une solution de Tris-EDTA à pH 8. Après lavage les noyaux sont colorés à l'hématoxyline.

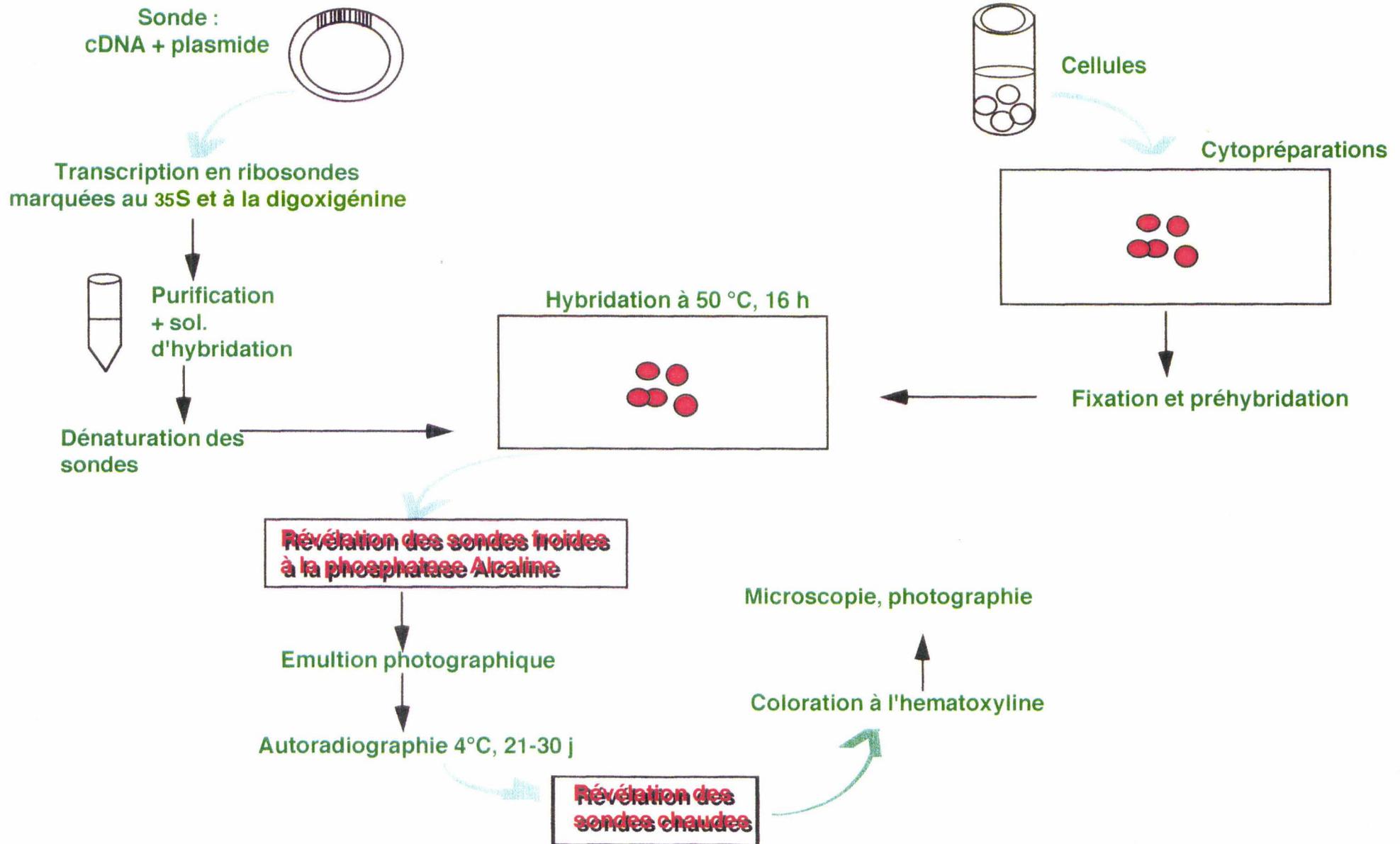


Figure 27. Schéma représentatif de la double hybridation *in situ*.

DOUBLE HYBRIDATION *IN SITU*.

La technique de base de la double hybridation *in situ* est réalisée dans les conditions précédemment décrites avec quelques modifications mineures. Elle est réalisée avec deux ribosondes de deux interleukines différentes, marquées l'une au ^{35}S -UTP et l'autre à la digoxygénine-UTP. Les deux sondes chaude et froide ont été ajoutées en même temps sur les cellules dans les mêmes conditions que la simple hybridation *in situ* (Figure 27). Après révélation des sondes marquées à la digoxygénine à la phosphatase alcaline, les lames sont déshydratées dans des bains croissants d'éthanol. Après séchage à l'air libre pendant une heure, les lames sont trempées dans une émulsion nucléaire NTB-2 préchauffée à 42 °C à l'obscurité complète, séchées en position verticale pendant une heure à température ambiante, puis exposées dans des boîtes étanches à l'abri de la lumière. Après révélation des sondes chaudes à l'obscurité, les noyaux des cellules sont colorés à l'hématoxyline et les lames sont visualisées au microscope optique pour la coexpression ou l'expression exclusive des différentes cytokines.

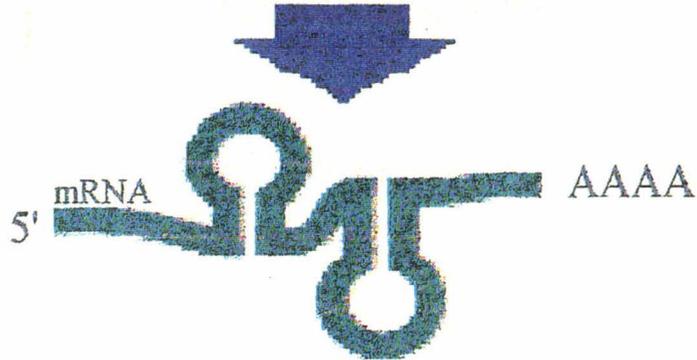
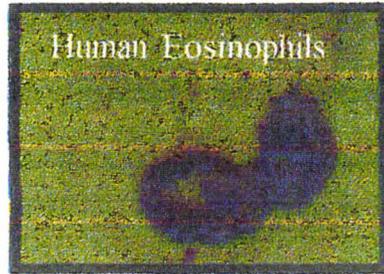
L'hybridation *in situ* avec des sondes froides est une technique facile, fiable et reproductible pour rechercher la présence de séquence d'ARNm codant pour différentes protéines. Cependant, la faible sensibilité des sondes froides par rapport aux sondes chaudes est un inconvénient majeur pour apprécier un petit nombre de copies d'ARN et le nombre de cellules productrices d'une interleukine donnée. En plus des conditions d'hybridation, cette technique dépend de la méthode de révélation (immunofluorescence, immunoenzymologie) et de la méthode d'observation (microscopie optique, microscopie électronique, cytométrie en flux). Afin de pallier à ces inconvénients, nous avons mis au point une technique de RT-PCR *in situ*.

RT-PCR *IN SITU*.

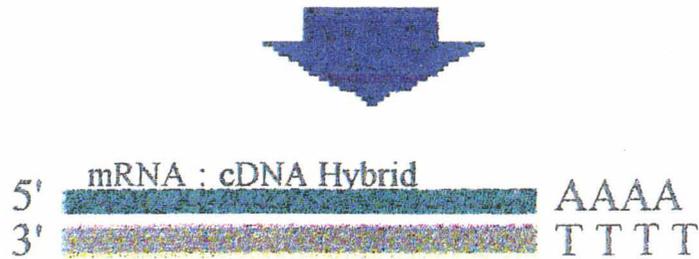
Préparation des cyto-préparations avant la RT-PCR *in situ*.

Les cyto-préparations et les tissus sont perméabilisés par la protéinase K à 10 µg/ml pendant 30 minutes puis fixés pendant 20 minutes dans du paraformaldéhyde à 4% et lavés plusieurs fois dans de l'eau et du PBS. Les cellules sont acétylées dans du triéthanolamine 0.1 M pendant 5 minutes à 4 °C puis dans la même solution contenant 0.25% d'anhydride acétique pendant 10 minutes à température ambiante. Après acétylation, les cellules sont soumises à la reverse transcription (Figure 28).

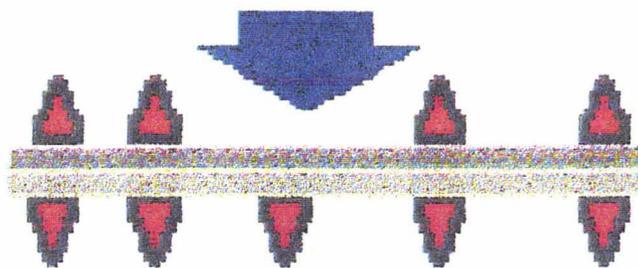
In Situ Polymerase Chain Reaction



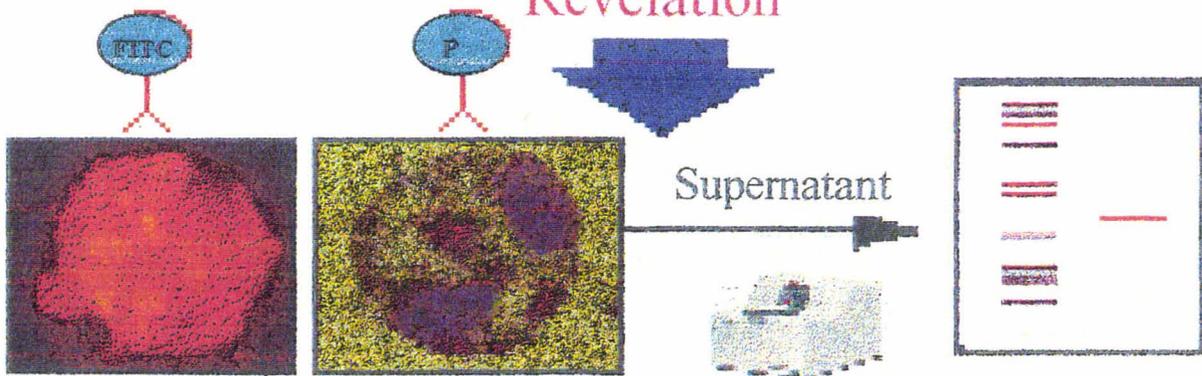
Reverse Transcription



Gene Amplification



Revelation



RTTC

P

Supernatant

A diagram showing the final detection steps. On the left, two circular spots are shown: one labeled 'RTTC' (red) and one labeled 'P' (purple). Below them are two corresponding micrographs: a red-stained spot and a purple-stained spot. A line labeled 'Supernatant' points from the purple spot to a gel electrophoresis image on the right. The gel shows several horizontal bands, with a single red band in the lane corresponding to the purple spot.

Transcription réverse.

la transcription en cDNA a été réalisée à 37°C pendant une heure en présence de 2.5 ng/μl d'oligo dT (Promega), MMLV (3U/μl) (Gibco BRL) dans un tampon composé de 75 mM de KCl, 10 mM Tris pH 8, 12 mM MgCl₂ 2 mg/ml BSA, 10 mM DTT ainsi qu'en présence de 1 mM de dNTPs (Pharmacia) et 0.1 mM de dig-dUTP et 1 μl de RNasine (4000 U/ml) (Promega). Les lames sont lavées plusieurs fois dans le SCC 2X et séchées pendant 1 heure à l'air libre.

PCR in situ proprement dite

La Taq polymérase (5U/μl) est ajoutée à 2.5 μl de tampon X10 et 1mM de dATP, dGTP et dCTP, 0.9 mM de dTTP, 0.1 mM dig-dUTP (Boehringer) et 0.5 μl de chaque amorce (20 μM). Ce mélange est ensuite déposé sur chaque lame puis recouvert d'une lamelle siliconée collée par du Rubber Cement (Kleer tak, Mecanorma). Les lames subissent ensuite un chauffage à 95°C pendant 5 min afin de dénaturer l'ADN puis une succession de 40 cycles de température. Chaque cycle se décompose de la façon suivante : 2 min à 60°C, permettant aux amorces de se fixer sur les séquences d'ADN complémentaires, puis 3 min à 72°C, température optimale d'élongation de la polymérase et enfin 1 min à 94°C pour dénaturer les nouveaux brins d'ADN synthétisés. La réaction se termine par un passage de 7 min à 72°C afin de permettre à la polymérase de terminer la synthèse de tous les fragments d'ADN amplifiés.

Détection des produits d'amplification.

Les lames sont récupérées, lavées plusieurs fois dans le SCC 2X et le PBS et séchées à l'air libre pendant 1 heure. Après saturation des sites non spécifiques avec du sérum de chèvre à 2% pendant une heure à température ambiante, un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/200 dans du PBS-BSA 0.5% est ajouté pendant 30 minutes à température ambiante puis les lames sont lavées plusieurs fois dans du PBS. La révélation est réalisée grâce au substrat BCIP/NBT (Boehringer). Les cellules colorées en rouge expriment les cytokines correspondantes. Après lavage les noyaux sont colorés à l'hématoxyline.

Contrôle de la spécificité de la RT-PCR in situ.

La spécificité et la stabilité de l'appariement entre deux molécules d'acides nucléiques (particulièrement les amorces et le cDNA) sont fonction de leur degré de complémentarité, dépendant lui-même de leur composition respective en bases. Ainsi, lors des étapes de PCR, les oligonucléotides se fixent avec une très forte affinité aux molécules de cDNA parfaitement complémentaires, mais se fixent également, avec une affinité plus faible à des séquences nucléiques ne présentant qu'une homologie partielle (*cross-hybridation*).

Pour vérifier la spécificité de la RT-PCR, plusieurs contrôles ont été effectués :

- RT-PCR *in situ* **en absence de reverse transcriptase**. Ce contrôle permet de s'assurer de l'amplification du cDNA et non du DNA génomique.
- RT-PCR *in situ* **en absence de Taq polymérase**. Ce contrôle permet de vérifier la révélation positive due à l'amplification et non à un accrochage non spécifique de la dig-dUTP sur des structures nucléiques ou non de la cellule.
- Après l'étape d'amplification, le **surnageant contenant de l'ADN amplifié** qui diffuse dans la solution de PCR, est récupéré et réamplifié une seconde fois dans un tube. La taille du produit de PCR réamplifié est comparée sur gel d'agarose avec des produits de RT-PCR à partir d'ARN purifié. Le gel est ensuite dénaturé et le matériel d'ADN est transféré sur membrane pour subir un southern blot avec un oligonucléotide interne marqué à la biotine.

DOUBLE RT-PCR IN SITU.

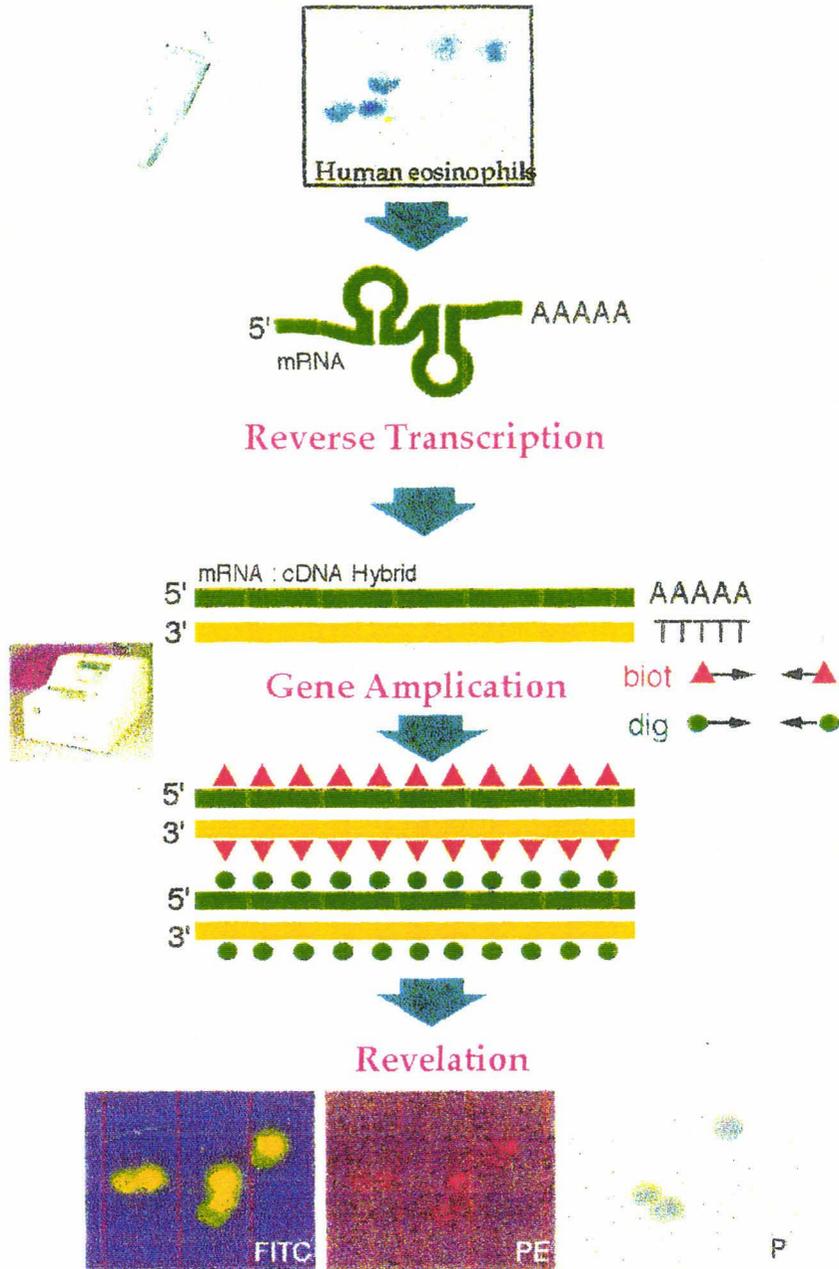
La technique de PCR *in situ* a l'avantage de réduire le seuil de détection du signal spécifique puisque l'ADN devient facilement visible. Le seuil de détection constitue un facteur limitant pour la microscopie standard, mais il peut être considérablement réduit en utilisant la fluorescence dans l'étape de révélation au lieu des méthodes enzymatiques.

La double PCR *in situ* est effectuée avec des amorces de deux interleukines différentes marquées à la digoxigénine, à la biotine ou à la fluoresceine (Figure 29).

Préparation des cyto-préparations avant la RT-PCR in situ.

Les cellules sont ajustées à 1×10^6 cellules/ml et 500 μ l sont déposés dans chaque tube. Les tubes sont centrifugés à 1500 tr/mn et le surnageant est aspiré. Après plusieurs lavages dans du PBS, les cellules sont fixées pendant 20 minutes dans 50 μ l de paraformaldéhyde à 4%, les cellules sont à nouveau centrifugées et resuspendues dans une solution de protéinase K à 1mg/ml

Double In situ Polymerase Chain Reaction



dans du tris-HCL 0.1 M et l'EDTA 50 mM pH 8 pendant 30 minutes à 37 °C. Les cellules sont centrifugées et lavées dans du PBS plusieurs fois.

Transcription réverse.

la transcription en cDNA a été réalisée à 37°C pendant une heure en présence de 2.5 ng/μl d'oligo dT (Promega), MMLV (3U/μl) (Gibco BRL) dans un tampon composé de 75 mM de KCl, 10 mM Tris pH 8, 12 mM MgCl₂ 2 mg/ml BSA, 10 mM DTT ainsi qu'en présence de 1 mM de dNTPs (Pharmacia) et 0.1 mM de dig-dUTP et 1 μl de RNasine (4000 U/ml) (Promega). les cellules centrifugées sont lavées plusieurs fois dans le SCC 2X et incubées avec la solution de PCR.

Double PCR in situ avec des oligonucléotides marqués

Les cellules sont lavées et incubées avec 100 μl de tampon de PCR contenant 10 mM tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 MgCl₂, 0.25 mM de chaque déoxyadénosine 5'-triphosphate (dATP), déoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP), déoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP), et déoxythymidine 5'-triphosphate (dATP), 1 μl (5U) de Taq polymérase (Apligen) et 100 pmol de chaque amorce 5' et 3' spécifique pour l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 marquée à la fluoresceine, à la digoxygénine ou à la biotine respectivement. La réaction est amplifiée dans des tubes de PCR appropriés au cours de 40 cycles de température. Chaque cycle se décompose de la façon suivante : 2 min à 60°C, permettant aux amorces de se fixer sur les séquences d'ADN complémentaires, puis 3 min à 72°C, température optimale d'élongation de la polymérase et enfin 1 min à 94°C pour dénaturer les nouveaux brins d'ADN synthétisés. La réaction se termine par un passage de 7 min à 72°C afin de permettre à la polymérase de terminer la synthèse de tous les fragments d'ADN amplifiés.

Détection des produits d'amplification.

Les cellules sont lavées plusieurs fois dans le PBS pour éliminer surtout les oligonucléotides libres, et incubées pendant 30 minutes avec différents anticorps suivant les couples d'oligonucléotides qui ont servi dans l'étape d'amplification. Des anticorps anti-digoxygénine couplés à la phycoérythrine et dilués au 1/100 sont ajoutés dans le cas des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-5 marqués à la digoxygénine et l'IL-4 marqués à la fluoresceine. La streptavidine couplée à la phycoérythrine et diluée au 1/100 est ajoutée dans le

cas des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-10, marqués à la biotine et l'IL-4, marqués à la fluoresceine. Des anticorps anti-digoxigénine couplés à la phycoérythrine et la streptavidine couplée à la phycoérythrine dilués au 1/100 sont ajoutés dans le cas des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-5 marqués à la digoxigénine et l'IL-10 marqués à la biotine. Les cellules sont lavées plusieurs fois dans le PBS, cyto-centrifugées sur lames et puis observées sous microscope.

Contrôle de la spécificité de la RT-PCR in situ.

Les contrôles assurant la spécificité de cette technique sont semblables à ceux cités plus haut.

RESULTATS

RESULTAT I.

**EXPRESSION PAR LES EOSINOPHILES HUMAINS
D'UN RECEPTEUR POUR LE COMPOSANT SECRETOIRE.
ROLE DANS L'ACTIVATION DEPENDANTE D'IgA SECRETOIRE.**

RESULTAT I.

EXPRESSION PAR LES EOSINOPHILES HUMAINS

D'UN RECEPTEUR POUR LE COMPOSANT SECRETOIRE.

ROLE DANS L'ACTIVATION DEPENDANTE D'IgA SECRETOIRE.

Différentes études sur la dégranulation de l'éosinophile ont montré que les anticorps d'isotype IgG (Butterworth et al, 1977), les anticorps IgE (Capron et al, 1981; Capron et al, 1984) et le C3b (Ramalho-Pinto et al, 1978; Metcalf et al, 1977) interviennent dans l'induction d'une fonction effectrice de l'éosinophile vis-à-vis de cibles parasitaires et en particulier le schistosome. Plus récemment, il a été démontré aussi que les IgA sécrétoires semblent être des inducteurs préférentiels de la dégranulation de l'éosinophile (Abu-Ghazaleh et al, 1988). Les mécanismes de l'activation de l'éosinophile par les IgA restent encore inconnus. Cette dégranulation est régulée par des cytokines (Fujisawa et al, 1990). Les études antérieures réalisées dans notre laboratoire avaient montré que :

- L'activation préférentielle par les IgA sécrétoires n'était due ni à leur structure polymérique ni à la présence d'une proportion importante d'IgA2 (Desreumaux et al, 1992).

- L'éosinophile libérait sous forme soluble des molécules de petits PM (15 kDa) capables de fixer le composant sécrétoire (Broussole, 1990).

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation préférentielle des éosinophiles par les IgA sécrétoires était liée à la présence du composant sécrétoire, capable de se fixer sur un récepteur de membrane.

La capacité des IgA à induire un signal d'activation provoquant la dégranulation des éosinophiles suggère la présence d'un récepteur fonctionnel au niveau de la membrane cellulaire (Capron et al, 1988; Abu-Ghazaleh et al, 1989). Des études entreprises grâce à la technique d'immunoprécipitation à partir d'éosinophiles de patients allergiques ont révélé la présence du Fc α R avec une taille de 70 -100 kDa, alors que chez les neutrophiles la taille de ce récepteur est de 55-75 kDa (Monteiro et al, 1993). Cette différence de masse moléculaire a été attribuée à la

glycosylation différentielle entre l'éosinophile et le neutrophile. Cependant, d'autres études ont révélé grâce à des techniques de chromatographie d'affinité avec les IgA, la présence d'une protéine de 55 à 60 kDa sur les éosinophiles (Capron et al, 1993). Ces résultats laissent à penser qu'il existe une hétérogénéité du Fc α R au niveau moléculaire suite à un épissage alternatif d'ARNm ou à l'existence de plusieurs polypeptides composant le Fc α R. La nature du Fc α R sur les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles reste à définir.

Ainsi la première partie de ce travail a consisté à caractériser les structures moléculaires présentes sur la surface de l'éosinophile, qui permettent de fixer le composant sécrétoire libre. Cette étude s'est effectuée en deux temps : (1) une étude en cytofluorométrie sur les éosinophiles de plusieurs patients en utilisant le CS, des immunsérums de lapin (polyc anti-SC) dirigés contre le CS ou des anticorps monoclonaux anti-CS (anti-SC mAb).(2) une étude biochimique ayant pour but la caractérisation des molécules synthétisées par l'éosinophile et capables de fixer le CS ainsi que les IgA sécrétoires.

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer l'activation des éosinophiles par le composant sécrétoire via son site de liaison, laissant envisager une fonction physiologique de cette glycoprotéine très abondante dans les sécrétions où elle peut être en contact avec l'éosinophile. On a choisi le relargage de deux protéines cationiques (EPO et ECP) par des éosinophiles hypodenses, connues pour être impliquées dans la cytotoxicité vis-à-vis des cibles parasitaires. Les éosinophiles hypodenses des patients HES sont plus cytotoxiques que les éosinophiles normodenses et sont capables de libérer de très grandes quantités de ces protéines.

La troisième partie de ce travail a consisté à démontrer l'existence du Fc α R sur les éosinophiles eux-mêmes au niveau protéique et moléculaire, ceci par la technique d'immunomarquage et de RT-PCR *in situ*. Sachant que les neutrophiles sont les principales cellules qui synthétisent le Fc α R, cette étude a été effectuée sur des éosinophiles hautement purifiés par la technique de MACS qui permet de retenir les neutrophiles par sélection négative.

Bouchaib Lamkhroued[•],
Abdelillah Soussi Gounni[•],
Valérie Gruart[•],
Annick Pierce[△],
André Capron[•] and
Monique Capron[•]

Centre d'Immunologie et de
Biologie Parasitaire, Unité Mixte
INSERM U167- CNRS 624, Institut
Pasteur[•] Lille and Laboratoire de
Chimie Biologique, Unité Mixte du
CNRS 111, Université des Sciences
et Technologies de Lille[△],
Villeneuve d'Ascq

Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation*

The existence of a functional receptor for secretory component (SC) on the eosinophil membrane might explain the preferential degranulation induced by secretory IgA (sIgA) when compared to serum IgA. Indeed, flow cytometry analysis revealed that purified human SC could bind to a subpopulation (4–59 %) of blood eosinophils purified from 19 patients with eosinophilia. Binding of radiolabeled human SC could be competitively inhibited using unlabeled SC or secretory IgA but not with serum IgA or IgG. Immunoprecipitation and immunosorbent chromatography using human SC revealed the presence of a major component at 15 kDa in eosinophil extracts as well as in culture supernatants but not in neutrophils. The 15-kDa protein eluted from the human SC immunosorbent was able to bind to SC or to sIgA but not to serum IgA. Eosinophils preincubated with human SC or sIgA released eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil peroxidase (EPO) after addition of anti-SC or anti-IgA monoclonal antibody as respective cross-linking reagents. These results indicated that binding of free or complexed SC to human eosinophils could induce eosinophil degranulation. Furthermore, the dose-dependent inhibition by SC of mediator release induced by sIgA but not by serum IgA, suggested that the receptor for SC could be involved in the preferential degranulation mediated by sIgA. These results indicate a novel pathway of eosinophil activation and its potential involvement in mucosal immunity, particularly in inflammatory diseases associated with infiltration of eosinophils and the enhanced production of sIgA.

1 Introduction

The eosinophil leukocyte can exert a dual function, beneficial or detrimental to the host and represents one of the major effector cells in allergic manifestations and parasitic diseases [1]. The release of eosinophil granule proteins, by degranulation or exocytosis, can contribute to local pathology by causing damage to adjoining cells [2–4]. It is noteworthy that eosinophils are detected in large numbers in the lamina propria of the small and large intestines of patients with intestinal parasitic diseases as well as in intestinal biopsies from patients with allergic gastroenteritis or with coeliac disease [1]. The presence in such diseases of deposits of eosinophil granule proteins such as major basic protein (MBP) or eosinophil cationic protein (ECP), indicate that eosinophils could act as effector cells in parasitic infections as well as in various bowel diseases [5, 6].

Previous studies have suggested that interactions between eosinophils and IgA, could be involved in immunity at mucosal surfaces [7, 8]. Secretory IgA (sIgA) seemed to represent the more potent stimulus for eosinophil degranulation, as evidenced by the release of one granule protein, eosinophil-derived neurotoxin (EDN) [8]. However, the reasons for this phenomenon are not clear. We thus tested the hypothesis that the preferential release of granule proteins by sIgA might be mainly due to the presence of secretory component (SC) in the sIgA molecule and its binding to a specific receptor on the eosinophil membrane.

SC is an integral membrane protein localized on the basolateral face of secretory epithelial cells where it mediates the transepithelial transport of polymeric Ig and particularly of polymeric IgA [9]. During transport or at the cell surface, the polymeric Ig receptor with or without its ligand is cleaved and SC is bound to IgA (sIgA) as well as free SC in excess being released into secretions [10]. However, despite numerous studies on SC, nothing is known about the function of free SC and its capacity to bind to cells. In the present report, we demonstrate the existence of a functional receptor for SC involved in the binding of sIgA to human eosinophils and in their activation.

[I 13157]

* This work was supported by Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624.

Correspondence: Monique Capron, C.I.B.P., Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette – B.P. 245, F-59019 Lille Cedex, France (Fax: +3320.87.78.88)

Abbreviations: HE: Hypereosinophilic EPO: Eosinophil peroxidase ECP: Eosinophil cationic protein SC: Secretory component sIgA: Secretory IgA HBSS: Hanks' balanced salt solution

Key words: Secretory component / Secretory immunoglobulin A / Eosinophil / Eosinophil cationic protein / Eosinophil peroxidase

2 Materials and methods

2.1 Reagents

Serum and sIgA were purchased from Sigma (St. Louis, MO). mAb anti-human IgA and FITC-labeled anti-rabbit IgG were purchased from Cappel Laboratories (Cochranville, PA). The rabbit antiserum raised against human SC was prepared according to the previously published Vaitu-

kaitis technique and its specificity for SC was determined by Western blotting. A mouse mAb raised against human SC was kindly provided by Dr. H. Tlaslakova (Institute of Microbiology, Prague, Czechoslovakia). As controls, irrelevant IgG mAb (directed against the P30 Ag of *Toxoplasma gondii*) or normal rabbit serum were used.

2.2 Isolation of SC

SC was purified from pooled, delipidated and decaseinated human milk by ammonium sulfate precipitation (50%) associated with a pH gradient [11]. The precipitate was then subjected to ion exchange and gel filtration chromatographies. Visualization of SC was achieved using the radial immunodiffusion method in the presence of anti-SC (Behring, Rueil Malmaison, France). The precipitate was dissolved in 0.22 M sodium acetate pH 7.8 and fractionated on a column of SP-Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The SC eluted from column was further submitted to DEAE-Sephadex (Pharmacia). The SC-enriched fraction was eluted and then directly chromatographed on Ultrogel ACA 44 (IBF, Villeneuve la Garenne, France). The free SC eluted from the column was dialysed against distilled water and lyophilized. Contaminating proteins were removed by further separation on an SP-Sephadex column. The purity of preparation was assessed by immunoelectrophoresis in the presence of rabbit antiserum to milk proteins and by SDS-PAGE.

2.3 Purification of eosinophils

Human eosinophils were purified from the venous blood of patients with eosinophilia by centrifugation on discontinuous 18–25% (wt/vol) metrizamide gradients (Nyegaard Co, Oslo, Norway) according to the technique previously described [12]. Cells with intermediate density (interface between 22% and 23% metrizamide solutions) were collected and the degree of purity of eosinophil populations estimated after staining the cytocentrifuged preparations with Giemsa ranged between 85 and 99%. Contamination by neutrophils in the eosinophil preparations was < 15%.

2.4 Neutrophil preparations

Human neutrophils were obtained from the venous blood of eosinophilic patients, by centrifugation through Metrizamide discontinuous gradients as in the case of purification of eosinophils. The neutrophils were collected in the lower density layer (layer II) corresponding to 20–22% metrizamide solutions. The degree of purity (up to 96%) and the morphologic integrity of cell populations were estimated after staining of cytocentrifuged preparations with Giemsa. Contamination by eosinophils in neutrophil preparation was < 10%.

2.5 Preparation of cell extracts

Purified eosinophils or neutrophils were lysed with a cell extract buffer consisting of 0.5% NP40 in 1 mM PBS, 2 mM PMSF and 2 mM EDTA. After 30 min of incubation at 4°C, the insoluble material was removed by centrifugation at

13 000 × g for 15 min at 4°C. Bradford's method, using the microassay procedure outlined in the Bio-Rad technique, was employed to estimate the protein concentration as previously described [13].

2.6 Preparation of cell supernatants

To obtain culture supernatants, eosinophils (5×10^6 /ml) were incubated for 16 h at 37°C in a 95% air-5% CO₂ humidified chamber in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, without serum. The cell suspensions were centrifuged at 13 000 × g for 10 min, the supernatants were harvested and concentrated 100-fold using centricon 10 membranes (Amicon, Epernon, France). The protein concentration was determined as described above.

2.7 Flow cytometry analysis

Eosinophils (5×10^6 /ml) in Hank's balanced salt solution (HBSS) were first incubated with or without human SC (100 µg/ml) for 60 min at 4°C. After washing with HBSS, cells were incubated with the polyclonal rabbit anti-SC Ab or with normal rabbit serum at a final dilution of 1/200, for 60 min at 4°C and washed twice with HBSS. Eosinophils were incubated in the same conditions with the mAb to SC as described above or with control mAb (100 µg/ml). The cells were then incubated with FITC-labeled anti-rabbit Ig antibodies or FITC-labeled anti-mouse IgG antibodies for 30 min at 4°C, at a final dilution of 1/40, and then washed twice with HBSS. The proportion of positive cells at the peak of fluorescence was determined by using an orthofluorograph system H50 (Ortho Diagnostic System Inc, Raritan, NJ) after subtraction of results obtained with normal rabbit serum or control mAb instead of anti-SC antibodies. Only eosinophil populations able to bind SC to more than 30% cells were selected for further studies.

2.8 Inhibition of ¹²⁵I-labeled SC binding to eosinophils

Human SC was iodinated by the chloramine-T method as previously described [14]. Twenty micrograms of protein were labeled with 500 µCi ¹²⁵I Na. Human eosinophils (1×10^6) were incubated with the presence or absence of a 100-fold excess of unlabeled SC in a total volume of 50 µl PBS 0.3% BSA. After washing, cell suspensions were centrifuged at 8500 × g for 2 min through 1 ml of 20% sucrose and the radioactivity of pellets was measured in a gamma scintillation spectrometer. The effect of unlabeled SC was compared to the inhibitory effects of cold reagents (sIgA, serum IgA or IgG) in competition experiments performed with a 100-fold excess of each inhibitory reagent. The percentage of inhibition of radiolabeled SC binding by a 100-fold excess dose of unlabeled SC was considered as the maximum. All results obtained were presented as mean % inhibition ± SEM in comparison to the results obtained with unlabeled SC.

2.9 Labeling of eosinophil and neutrophil proteins and immunoprecipitation

Cell extracts and culture supernatants were iodinated with ¹²⁵I as described above and submitted to immunoprecipita-

tion as previously described [15]. Briefly, radioiodinated proteins were incubated with 10 µg of SC or anti-SC antiserum, normal rabbit serum at a 1/100 final dilution, mAb to SC or control mAb (at 10 µg/ml) in TNSTE (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 500 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % Triton-X 100, 5 mM EDTA). After 3 h of incubation at room temperature, immunoprecipitations were carried out by adding protein A-Sepharose coated beads (Pharmacia) (preincubated with anti-SC antiserum at a 1/10 final dilution or 10 µg/ml anti-SC mAb in the case of SC preincubated with radiolabeled proteins) at 4°C overnight. The beads were washed ten times with 1 ml of TNSTE and then boiled for 3 min in 50 µl of 1 × SDS-PAGE sample buffer. The labeled components were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. Gels were submitted to autoradiography at -70°C by using X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.10 Cell surface radiolabeling

Eosinophils (50×10^6) resuspended in 0.5 ml PBS pH 7.4 were incubated for 15 min on ice with 500 µCi Na¹²⁵I and 400 µg of Iodogen (Pierce, Paris, France). After radiolabeling, cell pellets were washed three times with PBS containing NaI (5 mM). Cells were then treated with lysis buffer (100 mmol/l phosphate, 150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1000 U/ml aprotinin, 0.5 % NP40; pH 7.4) for 30 min on ice and centrifuged for 20 min at 13 000 × g at 4°C and the supernatant was then immunoprecipitated as described above.

2.11 Preparation of affinity beads

According to a previously described technique [16], 100 mg of CNBr-activated Sepharose beads (Pharmacia) were coupled with 1 mg of human SC. Cell extracts or culture supernatants of eosinophils were iodinated with ¹²⁵I, concentrated 100-fold by using the centricon 10 membranes (Amicon) and incubated with SC bound to Sepharose for 16 h at 4°C. The beads were then placed in a 1-ml syringe which was used as a small column. After several extensive washes until the washing fluid contained less than 1500 cpm, the bound material was eluted with 3 M NaSCN by fractions of 400 µl. The eluted fractions were then concentrated using the Centricon 10 membranes. The radiolabeled eluted material was prepared for SDS-PAGE analysis under reducing conditions or immunoprecipitation as described above.

2.12 Eosinophil activation procedure

Purified eosinophils (2×10^5 cells/100 µl HBSS) were washed once with HBSS and preincubated at 4°C for 60 min in the presence of human SC (75 µg/ml) or sIgA (150 µg/ml) or IgA (150 µg/ml). The tubes were centrifuged at 500 × g for 10 min, eosinophils were harvested and further incubated for 2 h (37°C, 5 % CO₂) with 10 µg/ml anti-SC mAb or anti-IgA mAb, respectively. Controls consisted of eosinophils incubated either with SC, anti-SC mAb, anti-IgA mAb or medium alone. All tubes were immediately centrifuged at 500 × g for 10 min. The supernatants were recovered and kept overnight at 4°C before

performing the EPO release assay as previously described [17]. Samples of each supernatant were stored at -20°C until they were assayed for ECP.

2.13 Measurement of EPO release

The determination of EPO was carried out by a chemiluminescence (CL) assay as previously described [17]. Briefly, 50 µl of each supernatant were transferred in to plastic tubes containing 50 µl of D-Luciferin (160 µl/l in Tris-HCl buffer, 0.01 mol/l, pH 6), 50 µl of Luminol (250 µg/ml in Tris-HCl buffer, pH 6) and 50 µl of H₂O₂ (1.35 mmol/l in Tris-HCl buffer, pH 6). The enzymatic reaction was started by adding the cell supernatant, and light emission was monitored by a photometer (Nucleotimetre 107, Interbio CIV, Paris, France). Only cell populations with at least 90 % eosinophils (Eo) were submitted to the EPO release assay. Results were arbitrarily expressed as the "index" of EPO release calculated as follows:

$$\text{EPO index} = \frac{\text{CL units (Eo + stimulus)} - \text{CL units (stimulus alone)}}{\text{CL units (Eo + medium)} - \text{CL units (medium alone)}}$$

The test was considered positive for index values ≥ 2 [17].

2.14 Measurement of ECP release

ECP release was measured by a double antibody radioimmunoassay (Pharmacia). The radioactivity in the pellet was then measured and is inversely proportional to the quantity of ECP in the sample. Results were expressed as micrograms per liter on the basis of a standard curve obtained with purified ECP. However, to allow the comparison with the EPO data, the results were also expressed as an ECP index calculated by the following formula, since no ECP was detected with the stimulus or medium alone:

$$\text{Index} = \frac{\text{ECP } \mu\text{g/l (Eo + Stimulus)}}{\text{ECP } \mu\text{g/l (Eo + Medium)}}$$

For inhibition experiments, eosinophils (Eo) were preincubated with various concentrations of SC for 1 h at 4°C before incubation with sIgA or serum IgA (150 µg/ml) and stimulation with anti-IgA mAb (10 µg/ml). Results presented as percentage of release were compared to those obtained with cells preincubated with medium instead of SC. The index of release of ECP or EPO after stimulation of eosinophils with sIgA or IgA and anti-IgA mAb was considered as the maximum of release.

3 Results

3.1 Expression of a binding site for SC on eosinophils

The expression of a binding site for SC on the eosinophil surface was first analyzed by flow cytometry. When eosinophils were incubated with human SC before the addition of anti-SC rabbit antiserum and staining with FITC-labeled anti rabbit Ig antibodies, flow cytometry allowed us to

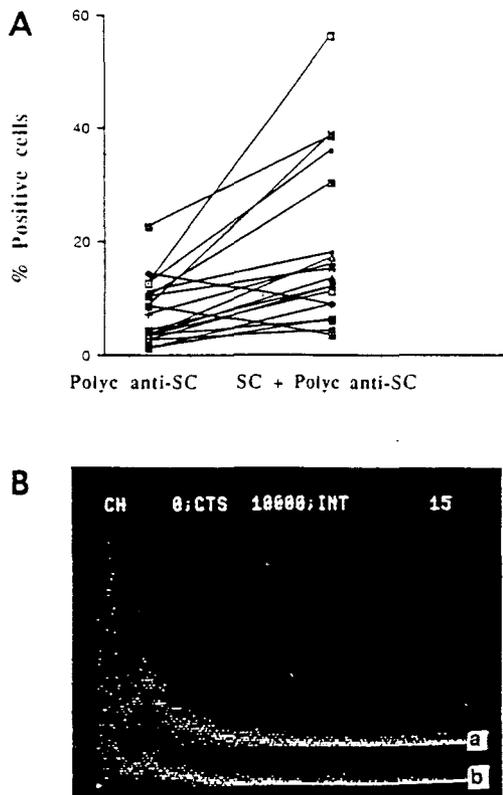


Figure 1. Flow cytometry analysis of SC binding to eosinophils. (A) Purified human blood eosinophils (> 90% purity) from 19 patients were first incubated with or without SC (100 μ g/ml) or medium for 1 h, then the cells were incubated with polyclonal anti-SC rabbit antibodies prior to addition to FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1/40 final dilution). The normal rabbit serum was used as a control. The percentage of positive cells was obtained after subtraction of nonspecific binding with the normal rabbit serum. The results from each individual were connected by a line. (B) Histogram of one representative experiment. Flow-cytometric analysis with SC and polyclonal anti-SC rabbit antibodies (a); SC and normal rabbit serum (b).

detect the staining of a subpopulation (4–59% cells) of blood eosinophils from 19 patients with eosinophilia (Fig. 1A). Similar results were obtained when mAb to SC was used (from 10 to 56% positive cells). The intensity of fluorescence was rather weak, as illustrated in Fig. 1B. Eosinophils from some patients also bound anti-SC antibodies suggesting that eosinophils purified from blood might have SC or cross-reactive molecules bound to their surface. No significant binding of SC was detected on purified neutrophils from patients (data not shown).

3.2 Inhibition of 125 I-SC binding to eosinophils

A binding assay using radiolabeled SC was performed in order to investigate the specificity of the binding site for SC on eosinophils. Purified eosinophils were incubated with 125 I-SC in the presence of 100-fold excess of unlabeled or of sIgA, serum IgA or IgG (Fig. 2). The inhibition of radiolabeled SC binding by sIgA was highly significant and reached the level of inhibition observed for unlabeled SC. In contrast, no significant inhibition was detected with serum IgA or human IgG used at the same concentration.

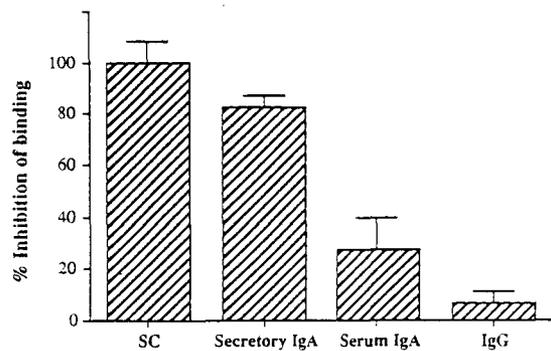


Figure 2. Inhibition of radiolabeled SC binding to eosinophils by unlabeled SC or by various reagents (secretory IgA, serum IgA, IgG) at a 100-fold excess. Purified eosinophils were incubated with 125 I-labeled SC together with the unlabeled reagent for 2 h at 4°C. The % inhibition of binding was calculated by comparison to cells incubated with unlabeled SC (mean of three experiments \pm SEM).

3.3 Immunoprecipitation of cell detergent extract or culture supernatants

Detergent lysates of eosinophils were radiolabeled as described above and submitted to immunoprecipitation with SC (Fig. 3A). Autoradiography of SDS-PAGE showed a protein of 15 kDa when immunoprecipitation of eosinophil extracts was performed with SC and polyclonal anti-SC antibodies (lane 1), but not with polyclonal anti-SC antibodies alone (lane 2). An additional molecule of 70 kDa was detected after immunoprecipitation with polyclonal anti-SC antibodies, with or without SC (lanes 1 and 2). In contrast, no band was revealed with normal rabbit serum (lane 3). A similar band at 15 kDa was seen when mAb to SC₁ was used instead of rabbit antiserum (Fig. 3B, lane 1).

To ensure that the SC binding activity was not due to contaminating neutrophils present in eosinophil preparations, immunoprecipitation experiments were performed on highly purified neutrophils. The results of one representative experiment are shown in Fig. 3C. No band at 15 kDa was detected when immunoprecipitation of neutrophil extracts was performed with SC and polyclonal anti-SC antibodies (lane 1). However similarly to eosinophils, a 70-kDa band could be detected in neutrophils when immunoprecipitation was performed with SC and polyclonal anti-SC antibodies or polyclonal anti-SC antibodies alone (lanes 1, 2), but not with normal serum (lane 3).

To determine whether the SC binding molecules could be released in a soluble form by eosinophils, culture supernatants of eosinophils were radiolabeled and submitted to immunoprecipitation. As shown in Fig. 3D, the 15-kDa molecule could be detected in the culture supernatant after incubation with SC and polyclonal anti-SC antibodies (lane 1), indicating the release in a soluble form of the 15 kDa molecules able to bind to SC. The 70-kDa band was also detected in culture supernatant after immunoprecipitation with SC and polyclonal anti-SC antibodies (lane 1) as well with polyclonal anti-SC antibodies alone (lane 2), but not with normal rabbit serum (lane 3).

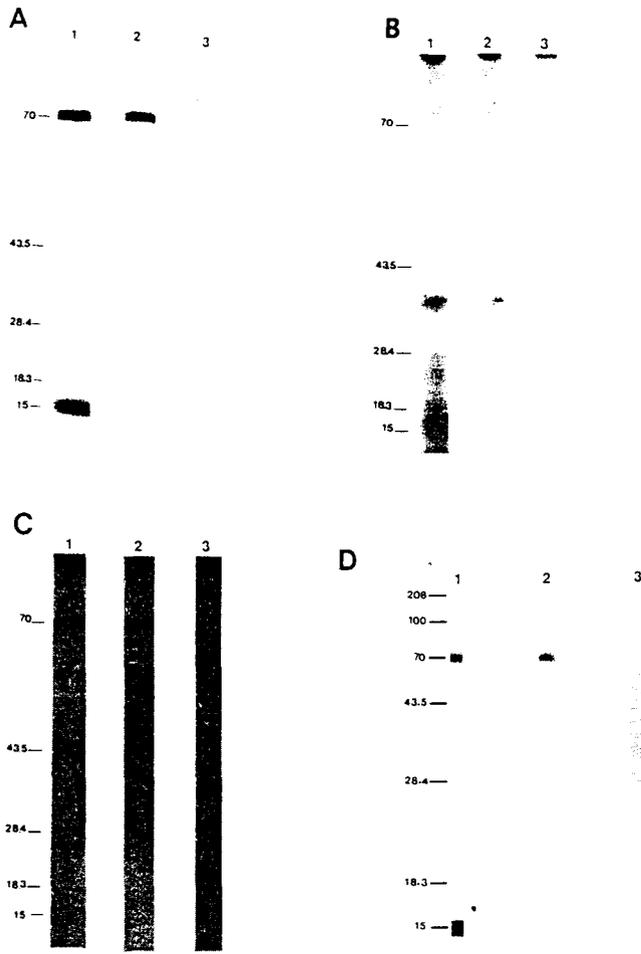


Figure 3. Immunoprecipitation of ¹²⁵I-labeled lysates of eosinophils (A,B), neutrophils (C), and radioiodinated eosinophil supernatants (D). The molecules were immunoprecipitated with SC (lanes 1A, 1B, 1C and 1D), rabbit anti-human SC (lanes 2A, 2C and 2D), anti-SC mAb (lane 2B), IgG isotype control (lane 3B) or normal rabbit serum (lanes 3A, 3C and 3D). Immunoprecipitation was carried out by incubation with SpA-Sepharose-coated beads [preincubated (for 2 h at room temperature) with polyclonal anti-SC rabbit antibodies or anti-SC mAb in the case of SC glycoprotein] at 4°C overnight. The beads were washed and the precipitate was dissolved in sample buffer and run on a 13% polyacrylamide gel under reducing conditions. The dried gels were autoradiographed by exposing to Kodak X-ray film.

3.4 Immunoprecipitation of ¹²⁵I-labeled cell surface components

After cell surface iodination, eosinophils were lysed in the presence of NP40 and the lysate was immunoprecipitated. As shown in Fig. 4, SC and polyclonal anti-SC antibodies precipitated a molecule at 15 kDa (lane 1). An additional molecule at 70 kDa was detected in the same conditions as well as with polyclonal anti-SC antibodies alone (lane 2). In contrast, no band was revealed with normal rabbit serum (lane 3).

3.5 Analysis of eosinophil molecules bound to SC immunosorbent

Immunsorbent chromatography of eosinophil extracts was performed to further characterize molecules able to

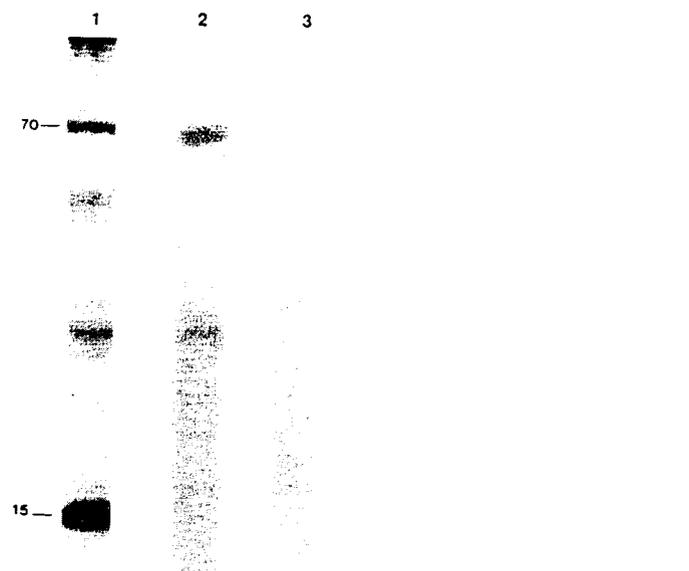


Figure 4. Immunoprecipitation of surface ¹²⁵I-labeled extracts of eosinophils. Eosinophils (50×10^6) freshly purified from peripheral blood of patients were labeled with 500 μ Ci Na¹²⁵I, solubilized with 0.5% NP40 buffer and immunoprecipitated as described in Sect. 2.9. The radiolabeled membrane lysates were preincubated with SC (lane 1), polyclonal anti-SC (lane 2), or normal rabbit serum (lane 3) as negative control. After 3 h of incubation at room temperature, immunoprecipitation was carried out by adding protein A-Sepharose coated beads (anti-SC coupled beads were added to SC in lane 1). The bound proteins were dissociated by SDS-PAGE sample buffer and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. Gels were submitted to autoradiography at -70°C by using X-ray film.



Figure 5. Autoradiogram of SDS-PAGE showing the eosinophil proteins eluted from SC-Sepharose (lane 1) and subsequent immunoprecipitation of proteins eluted from SC-Sepharose column (lanes 2-8). The radiolabeled proteins were affinity purified using SC bound to the Sepharose support matrix (lane 1). Affinity-purified fractions were pooled, dialyzed against PBS buffer and immunoprecipitated, as described in Sect. 2.9 with SC and polyclonal anti-SC (lane 2), polyclonal anti-SC (lane 3), normal rabbit serum as control (lane 4), sIgA and anti-IgA mAb (lane 5), IgA and anti-IgA mAb (lane 6), anti-IgA mAb alone (lane 7) or IgG mAb anti-*Toxoplasma gondii* as control (lane 8). Eluted materials were subjected to 13% SDS-PAGE under reducing conditions. The dried gels were autoradiographed by exposure to Kodak X-ray films. Molecular mass standards in kDa are on the left.

bind to SC. After incubation of eosinophil detergent extracts with SC bound to Sepharose, the eluate fractions contained a major band of 15 kDa (Fig. 5, lane 1). The 16-kDa protein eluted from SC immunosorbent was then submitted to immunoprecipitation in the presence of SC, sIgA or IgA. The 15-kDa protein eluted from SC immunosorbent was immunoprecipitated by SC (lane 2) or sIgA (lane 5) but not by anti-SC polyclonal antibodies alone (lane 3) or by serum IgA (lane 6) or in the presence of various controls: normal rabbit serum (lane 4), anti-IgA mAb alone (lane 7) or control IgG mAb anti-*Toxoplasma gondii* (lane 8).

3.6 Eosinophil activation by SC

Compared to other immunoglobulins, secretory IgA provided the most potent stimulus for eosinophil degranulation [8]. To know whether SC receptors could be involved in eosinophil activation, the release of EPO and ECP was evaluated after incubation of eosinophils with SC (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and anti-SC mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). EPO was measured in aliquots of the supernatants by a method based on chemiluminescence [17]. ECP was measured in the same supernatants by a radioimmunoassay. As shown in Fig. 6, the incubation of eosinophils with SC and mAb anti-SC but

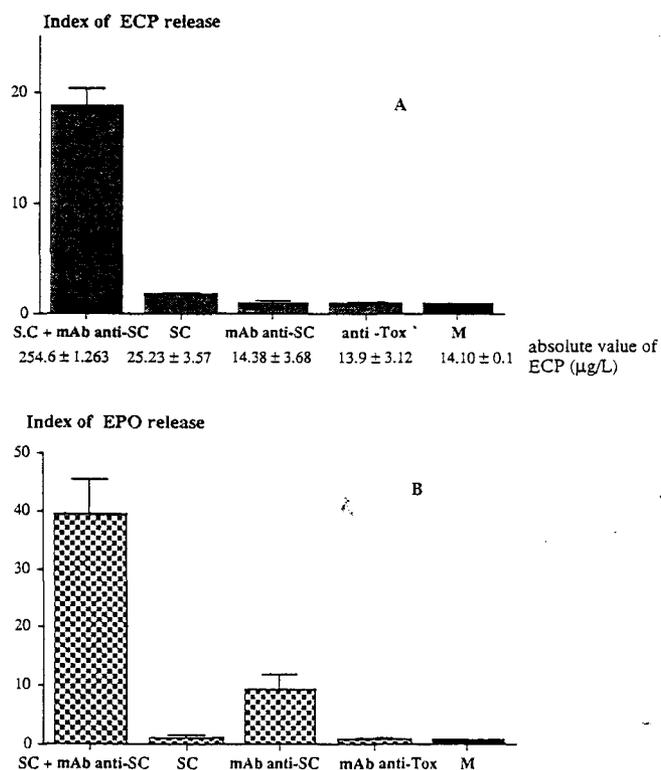


Figure 6. Release of EPO and ECP by eosinophils. Purified eosinophils ($2 \times 10^6/\text{ml}$) were first preincubated with SC (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 4°C for 1 h prior to addition of mAb anti-SC antibodies (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 h at 37°C. In parallel, eosinophils were directly stimulated with SC (75 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and anti-SC mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, anti-*Toxoplasma* mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final dilution) or HBSS medium (M). ECP (measured in $\mu\text{g}/\text{l}$ by a radioimmunoassay) (A) and EPO (measured in chemiluminescence units) (B) were evaluated in the same supernatants of activated eosinophils and expressed as a stimulation index. (mean of four experiments \pm SEM).

not with SC alone induced the release of highly significant levels of both ECP (Fig. 6A) and EPO (Fig. 6B). These results suggested that at least two granule proteins, EPO and ECP, could be released after SC-dependent activation. When an irrelevant mAb (mouse anti-*Toxoplasma gondii* mAb) was tested in three separate experiments, no cell activation was detected. When results of ECP were presented as absolute values ($\mu\text{g}/\text{l}$), low levels were observed in the presence of medium or after activation with SC, mAb anti-SC alone or anti-*T. gondii* mAb, whereas the release was strongly enhanced after incubation with SC and mAb anti-SC.

3.7 Role of the SC-binding site in secretory IgA-dependent eosinophil activation

To investigate whether the molecules involved in SC binding to eosinophils might participate in the mediator release induced by secretory IgA, inhibition procedures with various amounts of SC were performed. As shown in Fig. 7, SC significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the release of ECP (Fig. 7A) and EPO (Fig. 7B) induced by sIgA and anti-IgA mAb. In contrast, no significant inhibition was detected in the case of activation with serum IgA and anti-IgA mAb.

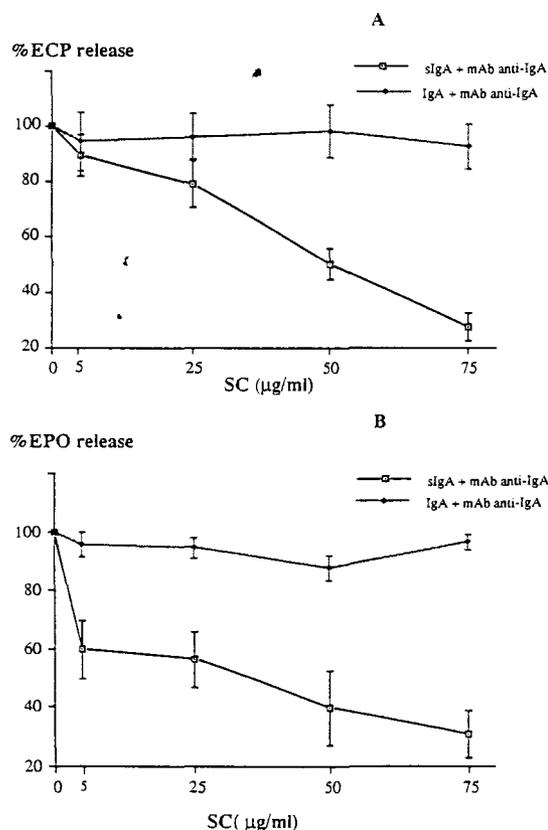


Figure 7. Inhibitory effect of SC on IgA-dependent activation. Eosinophils were incubated with or without SC for 1 h at 4°C before addition of sIgA or serum IgA and stimulation with anti-IgA mAb. The index of release of ECP or EPO after stimulation of eosinophils in the absence of SC was considered as the maximum of release. In each case, the percentage of ECP (A) and EPO (B) was calculated by comparison with cells incubated only with sIgA and anti-IgA mAb or IgA and anti-IgA mAb in the absence of SC (mean of four experiments \pm SEM).

4 Discussion

The existence of IgA receptors has been demonstrated on various cell populations, in particular human monocytes, macrophages, neutrophils and myeloid cell lines [18–21]. The existence of a functional receptor for IgA on human eosinophils has been also suggested [7, 8, 22]. Although cell surface receptors have been implicated in a variety of immune effector mechanisms, the preferential eosinophil mediator release induced by secretory IgA *versus* serum IgA has not yet been elucidated [8]. In the present report, we have tested the hypothesis that the responsible factor might be the presence of SC in the sIgA molecule, and its binding to a receptor for SC on human eosinophils. Analysis of the binding of SC using flow cytometry was performed on eosinophils from individual patients. Results indicate that highly enriched human eosinophils, but not neutrophils, freshly purified from the blood of hypereosinophilic patients, can interact with free SC. A variable expression ranging from 4% to 59% positive cells, was obtained on eosinophils from different patients. Similar results were obtained with polyclonal or monoclonal anti-SC Ab. This heterogeneity of expression, already described for other molecules such as the receptor for IgA [7] or CD23 [14] might be related to the different state of activation of eosinophils, which were all purified from eosinophilic patients. Additional studies are required to determine whether this receptor is inducible after *in vitro* activation of eosinophils [23] or in some pathologic situations, as previously demonstrated for other receptors such as IgE receptors and IgA receptors on lymphocytes [24] or eosinophils [25]. Binding of ^{125}I -labeled human SC was used to confirm the existence and the specificity of the receptor for SC on human eosinophils. A previous Scatchard analysis had suggested that existence of a saturable binding site, with an association constant of $2.78 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and a mean number of 11×10^4 receptor sites per cell [26].

In order to know whether this receptor could be involved in the binding of sIgA, we investigated the competing effects of sIgA and serum IgA on the specific SC binding. The present results indicate that secretory IgA was able to inhibit the binding of radiolabeled SC to purified eosinophils. In contrast, serum IgA failed to inhibit SC binding. These findings suggest that the specific inhibition of SC binding by sIgA can be related to the presence of SC in the sIgA molecule. All these observations led us to envisage the possible conformational changes in sIgA or the expression of a co-receptor molecule specific for SC.

As a first step in exploring the molecular form of the SC receptors, we examined the reactivity of SC with radiolabeled extracts of eosinophils by immunoprecipitation. Immunoprecipitation with SC and polyclonal anti-SC antibodies revealed two major components at 15 kDa and 70 kDa, whereas immunoprecipitation with polyclonal anti-SC antibodies alone detected only the 70-kDa component. In contrast immunoprecipitation with the mAb to SC revealed only the 15-kDa molecule, suggesting that the mAb did not recognize the 70-kDa component. These findings, together with the negative results obtained with normal rabbit serum, suggested the specific binding of SC to a 15-kDa molecule. Similar results were obtained when immunoprecipitation was performed on surface-iodinated eosinophils excluding the possible cross-reactivity with

cytoplasmic molecules. In contrast, immunoprecipitation performed on neutrophils did not reveal the 15-kDa molecule, but only the 70-kDa molecule. We also noted that significant amounts of soluble SC receptor with a 15-kDa molecular mass could be released in the supernatants of eosinophils. Such a spontaneous release has been described for other proteins and especially for immunoglobulin-binding factors [27–29]. The mechanism for this spontaneous release still has to be investigated. The SC receptor might function not only as a versatile cell surface recognition unit but also a soluble “sIgA binding factor” in immunoregulatory networks.

The similarities between SDS-PAGE patterns of eosinophil extracts, eluted from SC immunosorbents or immunoprecipitated with SC and polyclonal anti-SC antibodies, confirmed the binding of the 15-kDa molecule to SC. Furthermore, the 15-kDa molecule eluted from SC immunosorbent was still able to bind to sIgA but not to serum IgA, suggesting the specificity of the binding for sIgA. The precise nature of the 15-kDa molecule is now under investigation but preliminary observations indicate that it might be of lectin type. The similarity between the molecular mass of the molecule immunoprecipitated in cell extracts or in supernatants has to be discussed. The molecule could be a glycosyl phosphatidyl inositol-anchored protein and further experiments of treatment with phospholipases or proteases are needed to clarify this point. Alternatively, this 15-kDa molecule could belong to the family of S-type lectins, such as CBP 15, cytosolic molecules which although lacking a signal sequence are secreted in a soluble form and which were recently identified in eosinophils [30]. Microsequencing and cloning experiments, now in progress, will certainly give precise information on the structure and the membrane anchoring of the 15-kDa molecule. On the other hand, our experiments suggest that the 70-kDa molecule detected in eosinophil or neutrophil extracts as well as in eosinophil supernatants shared sufficient homology with SC to be immunoprecipitated by antisera to SC (Fig. 3). These results support the hypothesis that a 70-kDa molecule, which might be at least antigenically related to SC, a 70–80 kDa glycoprotein [31], can be released by eosinophils. Experiments are now in progress to further characterize the nature of the 70-kDa molecule, which might also correspond to a recently cloned new member of the Ig gene, superfamily, CMRF35, homologous to the polymeric immunoglobulin receptor [32].

Effector functions of eosinophils against parasites, as well as against host cells, appear to be mainly mediated by the release of cationic proteins, such as MBP, ECP, EDN and EPO [1]. Moreover, studies performed on patients with parasitic infections or allergic diseases have indicated that not all granule proteins were simultaneously released under the same stimulation, suggesting a differential release process of EPO and ECP [18, 33]. Recent studies have shown that IgA antibodies could participate in human and rat eosinophil-mediated cytotoxicity towards schistosome targets [7] and that IgA antibodies to a protective antigen were significantly associated with resistance to schistosomiasis [7, 34, 35]. Besides, it has been previously reported that sIgA antibodies preferentially induced the release of EDN [8]. Among others, the presence of SC in the sIgA molecule could represent the major factor involved in this

mechanism. Similar amounts of ECP and EPO evaluated in aliquots of the same eosinophil supernatants were released after incubation of eosinophils with SC and anti SC mAb or sIgA and anti IgA mAb. mAb to SC were preferred for stimulation since polyclonal antiserum to SC alone was able to induce eosinophil degranulation (data not shown). Together with these results, the inhibition of sIgA-mediated release of ECP and EPO by preincubation of eosinophils with SC suggests that sIgA-dependent activation of eosinophils might involve the binding of SC to the eosinophil membrane. The release of SC from serous glandular cells or epithelial cells of the mucosa and its binding to dimeric IgA or to the receptor for SC presently described might induce the release of eosinophil granule proteins. In addition, elevated levels of sIgA and SC have been detected in serum samples from patients with liver [36, 37] or coeliac disease [38]. Our results suggest that SC and sIgA may interact with eosinophils, not only in the mucosa but also in peripheral blood, at least in liver or intestinal diseases. On the other hand, it has been recently described that IL-5, the main cytokine involved in eosinophil differentiation, activation and degranulation could be synthesized by mucosal eosinophils from patients with coeliac disease [39] or asthma [40] and was secreted in particular after activation with sIgA [41]. Moreover, IL-5 associated with IL-3 and GM-SCF can enhance eosinophil degranulation induced by sIgA [8]. These findings therefore indicate that not only toxic granule proteins but also pleiotropic cytokines might be released by eosinophils activated by SC or sIgA. Although a very low proportion of neutrophils could contaminate eosinophil preparations, it is unlikely that the SC receptor derived from neutrophils. This possibility has been excluded by cytofluorometry and by immunoprecipitation of neutrophils, also by studies on the effect of SC on the degranulation of eosinophils, especially by measuring the release of EPO and ECP, which are specific mediators of eosinophils. This novel binding site for SC, is distinct from the receptor for the Fc fragment of IgA (myeloid Fc α R), expressed by neutrophils and monocytes [18]. This is shown in particular by the respective molecular masses (SC receptor: 15-kDa and the Fc α R: 30 to 55 kDa according to the degree of glycosylation [22]) and by the specificity of binding: secretory IgA, but not serum IgA was able to inhibit SC binding. Moreover, SC inhibited only the release of mediators induced by secretory IgA and not by serum IgA.

Taken together, these results suggest that the IgA-mediated mucosal immune response might be manifested through binding of IgA-coated targets either to Fc α R or to a receptor for SC. In addition, the surface expression of a receptor for SC on eosinophils might explain why secretory IgA could preferentially activate eosinophil populations. The participation of this new pathway of eosinophil activation in immune defence against parasites like schistosomes which have a mucosal tissue life-cycle stage, or in diseases characterized by the mucosal localization of eosinophils, is presently under investigation.

The authors wish to thank Dr. H. Tlaskalova (Institute of Microbiology, Prague, Czech Republic) for the gift of mAb to human SC and Dr. G. Spik for the purification of human SC. The authors also sincerely thank Dr. J. M. Grzych and R. Pierce for critically reading

the manuscript; J. P. Papin, A. Broussolle and J. P. Decottignies for their participation in the experimental procedure.

Received May 3, 1994; in final revised form September 26, 1994; accepted October 27, 1994.

5 References

- Gleich, G. J. and Adolphson, C. R., *Adv. Immunol.* 1986, **39**: 177.
- Filley, W. V., Holley, K. E., Kephart, G. M. and Gleich, G. J., *Lancet* 1982, **2**: 11.
- Harlin, S. L., Ansel, D. G., Lane, S. R., Myers, J., Kephart, G. M. and Gleich, G. J., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988, **81**: 867.
- Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., Farrow, G. M. and Gleich, G. J., *Mayo Clin. Proc.* 1981, **56**: 345.
- Torpier, G., Colombel, J. F., Mathieu-Chandelier, C., Capron, M., Dessaint, J. P., Cortot, A., Paris, J. C. and Capron, A., *Clin. Exp. Immunol.* 1988, **74**: 404.
- Hallgren, R., Colombel, J. R. and Dahl, R., *Am. J. Med.* 1989, **86**: 56.
- Capron, M., Tomassini, M., Van der Vorst, E., Kusnier, J. P., Papin, J. P. and Capron, A., *C. R. Acad. Sci. Paris* 1988, **307**: 379.
- Abu-Ghazaleh, R. I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R. A. and Gleich, G. J., *J. Immunol.* 1989, **142**: 2393.
- Brandzaeg, P., *Clin. Exp. Immunol.* 1981, **44**: 221.
- Mostov, K. E., Kraehenbuhl, J. P. and Blobel, G. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, **77**: 7257.
- Montreuil, J., Chosson, A., Havez, R. and Mullet, S., *C. R. Soc. Biol.* 1960, **154**: 732.
- Prin, L., Capron, M., Tonnel, A. B., Bletry, O. and Capron, A., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1983, **72**: 336.
- Gruart, V., Balloul, J. M., Prin, L., Tomassini, M., Loiseau, S., Capron, A. and Capron, M., *J. Immunol.* 1989, **142**: 4416.
- Capron, M., Truong, M. J., Aldebert, D., Gruart, V., Suemura, M., Delespesse, G., Tourvieille, B. and Capron, A., *Eur. J. Immunol.* 1991, **21**: 2423.
- Grangette, C. V., Gruart, M. A., Ouaisi, F., Rizvi, F., Delespesse, G., Capron, A. and Capron, M., *J. Immunol.* 1989, **143**: 3580.
- Jouault, T., Capron, M., Balloul, J. M., Ameisen, J. C. and Capron, A., *Eur. J. Immunol.* 1988, **18**: 237.
- Tomassini, M., Tsicopoulos, A., Tai, P. C., Gruart, V., Tonnel, A. B., Prin, L., Capron, A. and Capron, M., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991, **88**: 365.
- Fanger, M. W., Shen, L., Pugh, J. and Bernier, G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, **77**: 3640.
- Gauldie, J., Richards, C. and Lamontagne, L., *Mol. Immunol.* 1983, **20**: 1029.
- Maliszewski, C. R., Shen, L. and Fanger, M. W., *J. Immunol.* 1985, **135**: 3878.
- Chevalier, A., Monteiro, R. C., Kubagawa, H. and Cooper, M. D., *J. Immunol.* 1989, **142**: 2244.
- Monteiro, R. C., Hostoffer, R. W., Cooper, M. D., Bonner, J. R., Gartland, G. L. and Kubagawa, H., *J. Clin. Invest.* 1993, **92**: 1681.
- Fujisawa, T., Abu-Ghazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C. J. and Gleich, G. J., *J. Immunol.* 1990, **144**: 642.
- Yodoi, J. and Ishizaka, T., *J. Immunol.* 1979, **123**: 455.
- Capron, M., Grangette, C., Torpier, G. and Capron, A., *Chem. Immunol.* 1989, **47**: 128.
- Capron, M., Gruart, V., Broussolle, A. and Capron, A., *FASEB J.* 1991, **5**: 1567.
- Kiyono, H., Mosteller-Barnum, L. M., Pitts, A. M., Williamson, S. I., Michalek, S. M. and McGhee, J. R., *J. Exp. Med.* 1985, **161**: 731.

- 28 Letellier, M., Nakajima, T., Pulido-Cejudo, G., Hofstetter, H. and Delespesse, G., *J. Exp. Med.* 1990, 172: 693.
- 29 Tama, S. M. L. and Coico, R. F., *J. Immunol.* 1992, 7: 2050.
- 30 Truong, M. J., Gruart, V., Liu, F. T., Prin, L., Capron, A. and Capron, M., *Eur. J. Immunol.* 1993, 23: 3230.
- 31 Solari, R. and Kraehenbuhl, J. P., *Cell* 1984, 36: 61.
- 32 Jackson, D. J., Hart, D. N. J., Starling, G. and Bell, J. I., *Eur. J. Immunol.* 1992, 22: 1157.
- 33 Khalife, J., Capron, M., Cesbron, J. Y., Tai, P. C., Taelman, H., Prin, L. and Capron, A., *J. Immunol.* 1986, 137: 1659.
- 34 Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. and Capron, A., *J. Immunol.* 1993, 150: 527.
- 35 Grezel, D., Capron, M., Grzych, J. M., Fontaine, J., Lecocq, J. P. and Capron, A., *Eur. J. Immunol.* 1993, 23: 454.
- 36 Delacroix, D. L., Reynaert, M., Pauwels, S., Geubel, A. P. and Vaerman, J. P., *Dig. Dis. Sci.* 1982, 27: 333.
- 37 Kvale, D., Rognum, T. O., Thorud, E., Fossa, S. D., Rø, J. S. and Brandtzaeg, P., *J. Clin. Pathol.* 1987, 40: 621.
- 38 Volta, U., Molinaro, N., Fratangele, D. and Bianchi, F. B., *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 80: 192.
- 39 Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J. F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A. and Capron, M., *J. Exp. Med.* 1992, 175: 293.
- 40 Broide, D. H., Paine, M. M. and Firestein, G. S., *J. Clin. Invest.* 1992, 90: 1414.
- 41 Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A. and Capron, M., *J. Exp. Med.* 1994, 179: 703.

Résultats complémentaires.

1) Expression du $Fc\alpha R$ au niveau protéique.

Dans le but de confirmer que les éosinophiles expriment le récepteur ($Fc\alpha R$) pour le fragment Fc des IgA, des expériences d'immunomarquage à la phosphatase alcaline avec un anticorps monoclonal (My43) dirigé contre ce récepteur ont été effectuées. Par rapport aux autres techniques biochimiques, l'immunomarquage permet de déterminer si la cellule elle-même contient la protéine considérée. La figure 8 illustre une expérience représentative réalisée avec des éosinophiles d'un patient présentant un syndrome hyperéosinophilique. On peut voir un immunomarquage cytoplasmique sur la figure 8 a, qui témoigne de la présence de ce récepteur au niveau de l'éosinophile lui-même, alors que le contrôle isotypique est négatif (Figure 8, b).

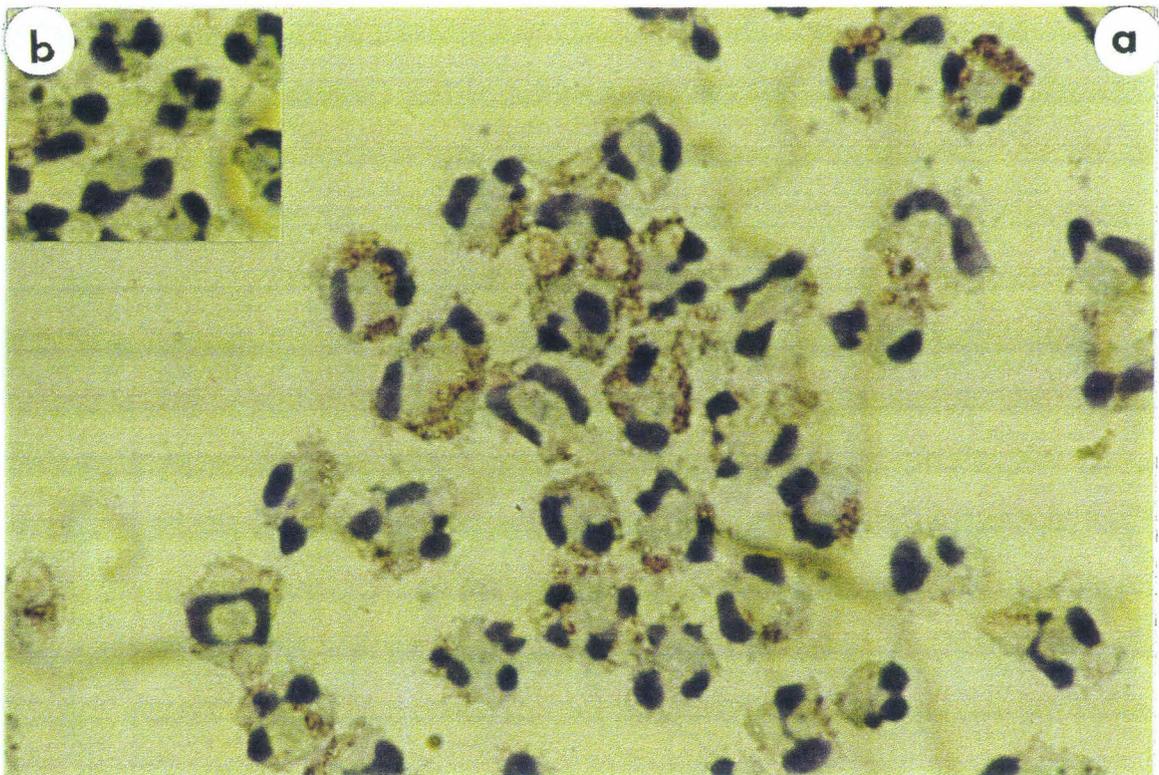


Figure 8. Immunomarquage à la phosphatase alcaline d'éosinophiles humains avec un anticorps monoclonal anti $Fc\alpha R$ (a) et son contrôle isotypique (b).

2) Expression du Fc α R au niveau moléculaire.

Afin de savoir si l'éosinophile synthétisait un ARNm pour le Fc α R qui correspondait à la protéine détectée par immunomarquage, deux approches expérimentales ont été utilisées. La première approche consistait à détecter des séquences spécifiques du récepteur Fc α R par RT-PCR sur un extrait d'ARN purifié à partir des éosinophiles et des neutrophiles de patients (Figure 9). Les neutrophiles sont connus pour leur expression constitutive de ce récepteur et servent de témoin positif dans cette expérience.

Grâce à des oligonucléotides spécifiques pour le Fc α R (Maliszewski et al, 1990), le cDNA des éosinophiles provenant de deux patients différents présentant une hyperéosinophilie (Figure 9 a, pistes 1 et 2) ainsi que du cDNA provenant des neutrophiles (Figure 9 a, piste 3) amplifiés par RT-PCR, montrent la présence de l'ARNm du Fc α R. Une expérience de RT-PCR réalisée dans les mêmes conditions et en l'absence de cDNA ne donne aucun signal et témoigne de l'absence de toute contamination (Figure 9 a, piste 4). La spécificité de cette amplification est vérifiée par southern blot avec un oligonucléotide interne à la région amplifiée et marqué à la digoxygénine (Figure 9 b). Par ailleurs, une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction PstI, coupait le fragment amplifié en 2 fragments de taille attendue, et dont la visualisation sur gel a permis de confirmer que le fragment amplifié était bien celui recherché (Figure 9 c).

La deuxième approche consistait à visualiser sur les cellules elles-mêmes la présence de l'ARNm correspondant au Fc α R par RT-PCR *in situ* (Figure 10). Par la technique de RT-PCR *in situ* et révélation, de la digoxygénine incorporée dans l'ADN amplifié, par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la fluoresceine, on obtient un marquage (figure 10 a et c) indiquant que les éosinophiles synthétisent l'ARNm codant pour le Fc α R. La même expérience réalisée en absence de transcriptase inverse ne donne aucun signal (figure 10 b), confirmant que la RT-PCR *in situ* permet la détection de l'ARNm et non l'ADN génomique. De même le surnageant (source d'ADN amplifié qui diffuse) récupéré de plusieurs lames a été réamplifié dans un tube de PCR. Les résultats de la réamplification (figure 10 d, piste 1) ont été comparés à la RT-PCR réalisée avec de l'ARN purifié à partir d'éosinophiles (figure 10 d, piste 2). La taille de l'ADN amplifié analysée sur gel d'agarose confirme la spécificité de ces résultats.

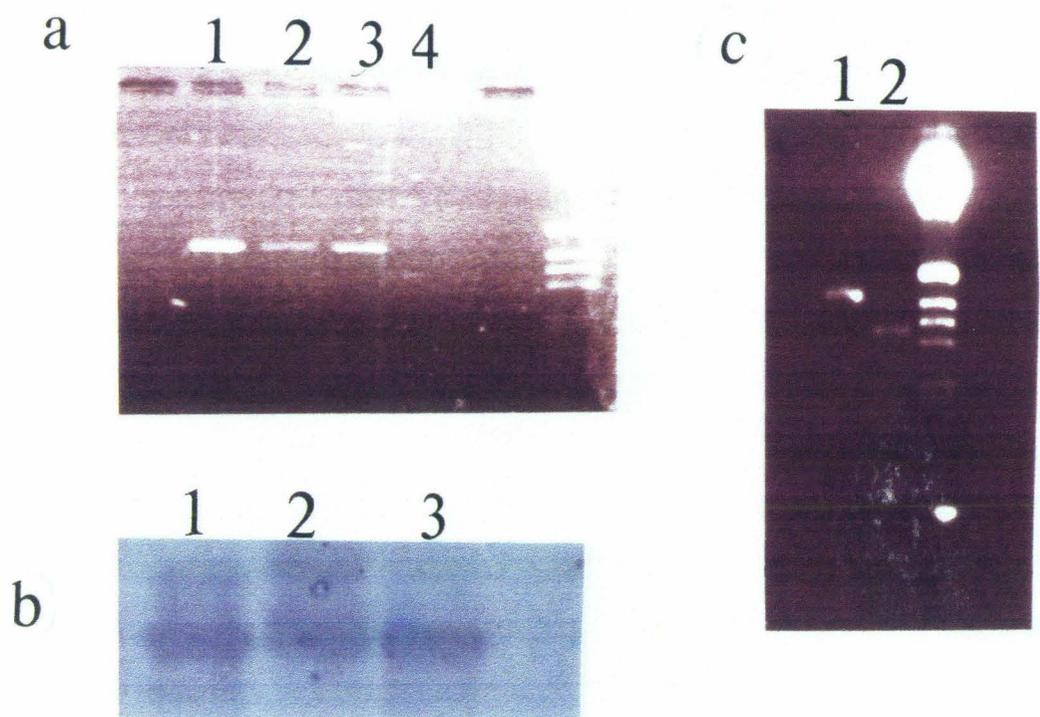


Figure 9. Analyse par RT-PCR du récepteur pour le fragment Fc des IgA ($Fc\alpha R$) à partir d'ARN d'éosinophiles et de neutrophiles hautement purifiés. **a** : Après une étape de transcription inverse, le cDNA obtenu est amplifié dans un tube par PCR et visualisé sur un gel d'agarose. Les pistes 1 et 2 correspondent à des éosinophiles, la piste 3 à des neutrophiles et la piste 4 au contrôle négatif (absence de cDNA). **b** : Les produits de PCR ont été transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec un oligonucléotide interne à la région amplifiée et marqué à la digoxygénine. **c** : Amplification par PCR du $Fc\alpha R$ (piste 1); digestion du fragment amplifié par PCR par l'enzyme de restriction *Pst*I (piste 2) donnant deux fragments de taille 314 et 84 pb.

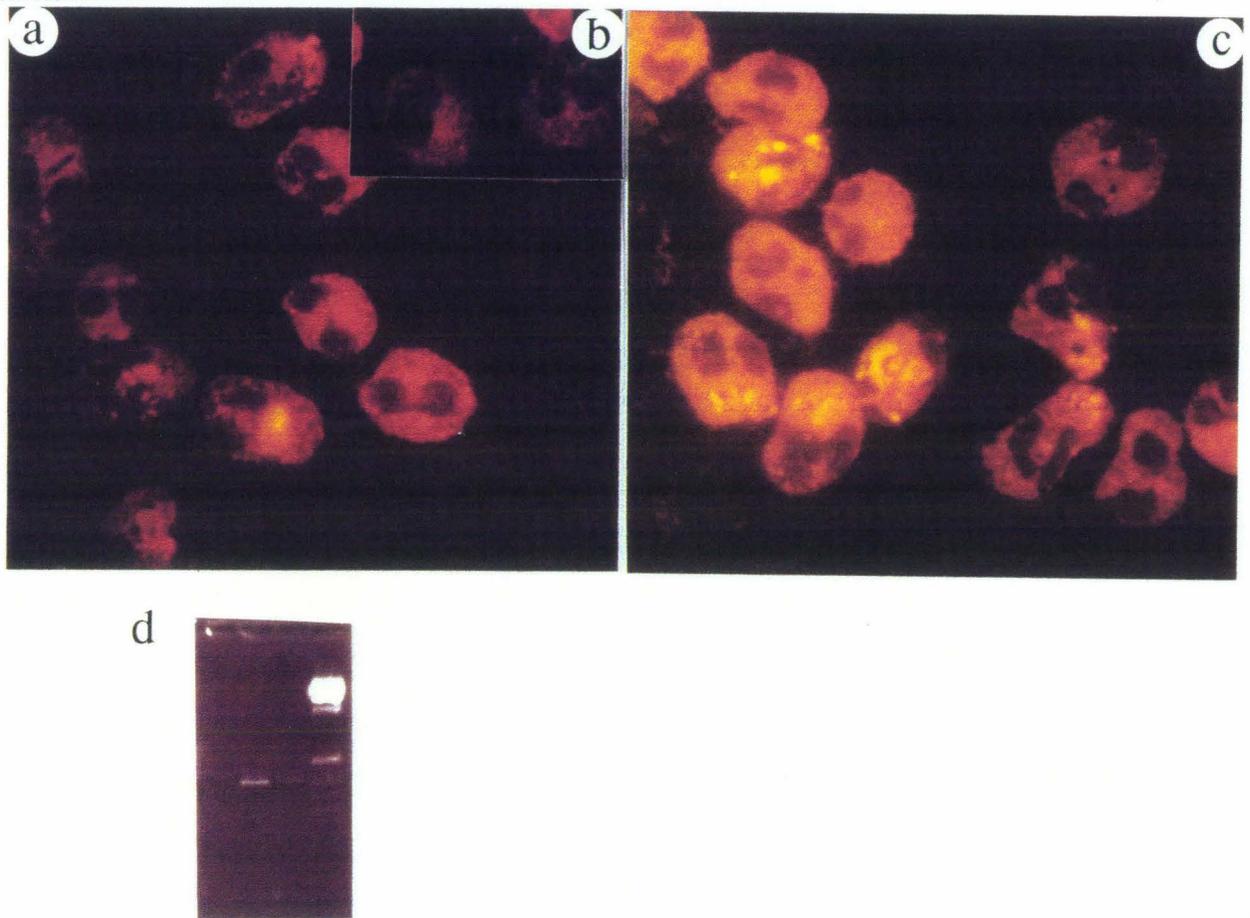


Figure 10. RT-PCR *in situ* sur des éosinophiles avec des oligonucléotides spécifiques pour le Fc α R. L'amplification du cDNA cellulaire est effectuée en présence de digoxygénine-dUTP pendant 40 cycles. La révélation des hybrides DNA-DNA marqués à la digoxygénine est effectuée par incubation des cellules en présence d'anticorps anti-digoxygénine couplés à la fluorescéine puis examen par microscopie standard à lumière ultra-violet sans contre-coloration. **a** et **c**: Eosinophiles exprimant l'ARNm du Fc α R. **b** : PCR *in situ* dans les mêmes conditions sans l'étape de transcription inverse servant de témoin négatif (pas d'amplification de DNA génomique). **d** : PCR effectuée sur des surnageants obtenus après PCR *in situ*, avec les mêmes oligonucléotides. La piste 1 correspond au surnageant; la piste 2 à l'ARN purifié à partir d'éosinophiles

Discussion

De nombreuses études ont démontré le rôle de l'éosinophile au cours des infections parasitaires, du syndrome hyperéosinophilique idiopathique (HES) ou des allergies. Cependant, les mécanismes précis d'activation des éosinophiles, notamment tissulaires, au cours de différentes pathologies restent encore inconnus. Les IgA sécrétoires, dont la production locale est accrue dans certaines pathologies, comme la maladie coeliaque par exemple (Colombel et al, 1990), peuvent induire une activation des éosinophiles. Par ailleurs, l'activation *in vitro* des éosinophiles par les IgA, conduit, en plus de leur dégranulation (libération d'EPO, de MBP et d'ECP), à une sécrétion d'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994). De plus, comme le révèle la technique d'hybridation *in situ*, les éosinophiles infiltrant la muqueuse duodénale expriment l'ARNm de l'IL-5 (Desreumaux et al, 1992). Connaissant l'action de cette cytokine sur la maturation et l'activation des éosinophiles (Lopez et al, 1988), et compte-tenu de l'activité autocrine et paracrine des cytokines, il est vraisemblable que les éosinophiles impliqués dans la maladie coeliaque puissent être au coeur d'un cercle vicieux en induisant le recrutement et l'activation tissulaire de leur congénères. De par cette interaction tissulaire entre l'éosinophile et les IgA, il a été démontré que les IgA sécrétoires semblent être des inducteurs préférentiels de la dégranulation de l'éosinophile (Abu-Ghazaleh et al, 1989) dont les mécanismes restent à élucider. Des études antérieures réalisées au laboratoire, avaient montré que l'activation préférentielle par les IgA sécrétoires, n'était pas due à un excès d'IgA2 par rapport aux IgA1 (Desreumaux et al, 1992). La forme polymérique et la présence de la chaîne J ne sont pas non plus responsables de ce phénomène. Cela nous a conduit à envisager le rôle du composant sécrétoire dans ce phénomène. L'expression des molécules fixant le composant sécrétoire sur les éosinophiles de sujets HES a été étudiée d'abord par des techniques de cytofluorimétrie et ensuite par la caractérisation biochimique de site(s) potentiel(s) de liaison.

L'analyse par cytofluorimétrie en flux, par la technique indirecte, sur 19 patients ayant une hyperéosinophilie, nous a permis de mettre en évidence une fixation du CS à la surface des éosinophiles. Les neutrophiles, contaminants majeurs des préparations d'éosinophiles, ne semblent pas exprimer de site de liaison pour le CS. Le pontage du CS par un immunosérum anti-CS (4 à 59% de cellules positives) donne des résultats similaires à ceux obtenus avec un anticorps monoclonal anti-CS (10 à 56% de cellules positives). De ce fait, la variabilité du taux

de fixation du CS et donc du pourcentage des cellules fixant le CS est probablement liée aux éosinophiles eux-mêmes qui proviennent de patients hyperéosinophiliques présentant des pathologies différentes. Cette variabilité est similaire à l'expression d'autres molécules de surface comme le CD23 (Capron et al, 1989), la molécule CD4 (Lucey et al, 1989), le récepteur pour l'IL-5, dont l'expression est accrue chez les éosinophiles hypodenses (Chihara et al, 1991) et le récepteur pour le Fc des IgA, qui est détecté en pourcentage plus important chez les patients allergiques (Monteiro et al, 1993). Différentes études suggèrent une augmentation du nombre de lymphocytes ayant un récepteur à IgA dans différentes maladies associées à un taux élevé d'IgA, comme la néphropathie à IgA (Sakai et al, 1989). D'autres travaux sont nécessaires pour savoir s'il y a ou non une induction de l'expression du récepteur pour le CS comme cela a été démontré pour le récepteur des IgE et des IgA au niveau des lymphocytes (Yodoi et al, 1979) et des éosinophiles (Capron et al, 1989).

La fixation spécifique du CS radiomarqué à l' ^{125}I observée à la surface des éosinophiles est caractéristique de la présence de sites de liaison de haute affinité. L'analyse par méthode de Scatchard de la fixation du CS montre une saturation de ce site de liaison avec une constante d'association de $2.78 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ (Capron et al, 1991). Seuls le CS et les IgA sécrétoires sont capables d'inhiber cette fixation. Ces résultats nous ont suggéré la synthèse par l'éosinophile d'une ou plusieurs molécules capables de lier le CS d'une façon spécifique. Nous avons donc tenté de caractériser ces molécules par différentes méthodes biochimiques. Nos résultats révèlent l'existence d'une molécule de 15 kDa, à la fois par immunoprécipitation avec du CS et des anticorps anti-CS et par immunoadsorption sur une colonne de sépharose recouverte de CS. Ceci suggère que cette molécule de 15 kDa puisse présenter le site de liaison du CS au niveau de l'éosinophile. Les expériences de marquage de surface démontrent sa présence en surface. De plus, il est intéressant de souligner la libération de cette molécule sous forme soluble. Cette caractéristique associée au faible poids moléculaire, suggère qu'il pourrait donc agir comme une molécule de type "IgA binding factor" déjà identifiée pour d'autres types cellulaires (Yodoi et al, 1987). Pour cela, il reste à déterminer si le site de liaison pour le composant sécrétoire que nous avons identifié peut également exercer certaines fonctions, notamment la liaison aux IgA sécrétoires et un rôle régulateur sur la synthèse des IgA ou du CS.

Si le CS fait partie de la famille multigénique des immunoglobulines, nous n'avons pas

d'argument sur la structure de son récepteur identifié chez l'éosinophile. Cependant, la nature hautement glycosylée du CS (Purkayastha et al, 1979) suggère l'hypothèse de sa fixation sur une structure lectinique. Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire montrent en effet que le CS déglycosylé est incapable de se lier à la protéine de 15 kDa purifiée par chromatographie d'affinité. De plus, le CS lié à un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope glycanique est incapable de se fixer sur la protéine de 15 kDa. L'implication des composants glucidiques dans les interactions entre la protéine de 15 kDa et le CS a été démontrée par des tests d'inhibition de la fixation du CS sur les éosinophiles par différents carbohydrates (glucose, galactose, lactose, mannose).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'éosinophile synthétise une protéine de 15 kDa capable de lier le CS grâce à une liaison lectine - carbohydrates. Tout laisse à penser qu'il pourrait s'agir d'une lectine de type C, dont l'affinité pour les sucres n'est pas déterminée de manière spécifique. Comme le processus d'ADCC met en jeu des intractions entre la cellule effectrice et le parasite, la molécule de 15 kDa présente à la surface de l'éosinophile, peut être impliquée dans ces interactions de la même manière que les lectines des macrophages (Mac-2) qui sont impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-membrane basale (Woo et al, 1990).

Au cours de nos travaux, nous avons remarqué l'existence sur la membrane de l'éosinophile d'une protéine de 70 kDa reconnue par des anticorps anti-CS, donc présentant au moins une antigénicité croisée avec le CS humain. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. (1) D'une part, l'éosinophile pourrait synthétiser du CS de poids moléculaire inférieur à celui décrit sur d'autres cellules (80 kDa) suite à une différence de glycosylation ou à un épissage alternatif de l'ARNm. (2) D'autre part, une molécule (CMRF35) appartenant à la superfamille des immunoglobulines et présentant une homologie de séquence avec le CS a été clonée (Jackson et al, 1992). La protéine de 70 kD trouvée au niveau de l'éosinophile pourrait correspondre à cette molécule. (3) Enfin, l'existence d'une troisième molécule ne peut être écartée.

Parmi les cellules inflammatoires, les éosinophiles jouent un rôle important dans les réactions allergiques et parasitaires. Le rôle de l'éosinophile dans les processus de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'IgA, implique directement des récepteurs à la surface cellulaire. La mobilisation de ces récepteurs par les IgA aboutit à une décharge des protéines cationiques,

EPO, ECP, MBP, grâce à un processus d'exportation par l'intermédiaire de structures tubulo-vésiculaires (Torpier et al, 1988). Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que le site de liaison du CS était impliqué dans les mécanismes d'activation de l'éosinophile. Des concentrations importantes d'EPO et d'ECP sont libérées par addition du CS et pontage par un anticorps monoclonal anti-CS. Nous avons choisi cet anticorps car il ne reconnaît aucune structure au niveau de l'éosinophile et de ce fait il n'intervient que pour potentialiser l'effet de l'activation. Si l'IgA sécrétoire induit à elle seule une libération massive d'EPO et d'ECP par l'intermédiaire du CS, il peut sembler paradoxal que le CS seul ne puisse pas activer l'éosinophile. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. (1) Des modifications de la structure conformationnelle du CS suite à sa fixation aux IgA pourraient aboutir à une meilleure présentation de l'IgA à son site de liaison. (2) Inversement, l'IgA pourrait permettre la stabilisation de la structure tertiaire du CS et augmenter l'affinité de la liaison CS-protéine de 15 kDa. (3) Le CS se fixe de façon covalente au deuxième domaine constant de l'IgA (Kerr, 1990); ce domaine, lieu de fixation de l'IgA sur le récepteur des cellules myéloïdes (Fanger et al, 1981), pourrait être modifié par le CS et permettre la stimulation directe de l'éosinophile par l'IgA sécrétoire. Inversement, des études ont montré le rôle du CS dans la stabilisation de l'IgA (Kerr, 1990), cette stabilisation de la structure tertiaire de l'IgA pourrait expliquer l'activation des éosinophiles par l'IgA sécrétoire et l'absence de libération d'ECP et d'EPO lorsque les éosinophiles sont stimulés par le CS sécrétoire seul. Les expériences d'inhibition de la fixation de l'IgA sécrétoire par une préincubation des éosinophiles en présence du CS, montrent que la protéine membranaire de 15 kDa est impliquée dans la liaison des IgA sécrétoires à l'éosinophile. D'autres travaux sont nécessaires pour savoir si la protéine de 15 kDa est liée ou non au récepteur Fc α R.

L'expression du Fc α R par les éosinophiles a été confirmée par trois méthodes d'analyse différentes : (1) l'analyse de l'expression protéique par immunomarquage à la phosphatase alcaline, (2) l'étude de l'ARNm codant pour le Fc α R par RT-PCR sur l'ARN purifié à partir d'éosinophiles (100% de pureté) et de neutrophiles servant de témoin positif.

L'analyse par immunomarquage a été réalisée grâce à un anticorps monoclonal (My43) dirigé contre le récepteur du fragment constant des IgA des monocytes humains. Nos résultats suggèrent que l'épitope reconnu par cet anticorps n'est exprimé que par une sous-population

d'éosinophiles et de ce fait suggèrent que soit (1) les récepteurs sont hétérogènes et présentent des affinités différentes (glycosylation, masse moléculaire), (2) soit le stade d'activation des éosinophiles (hypodenses ou normodenses) conditionne l'expression de ce récepteur. D'autres travaux ont rapporté l'expression de quantités plus importantes de Fc α R par les éosinophiles de patients allergiques par rapport aux neutrophiles de ces mêmes patients (Monteiro et al, 1993). Par ailleurs, le clonage du récepteur à IgA des monocytes (Maliszewski et al, 1990) montre une certaine analogie avec le récepteur du polynucléaire neutrophile et du macrophage. Ces récepteurs ont le même poids moléculaire et sont reconnus spécifiquement par le même anticorps monoclonal, le My 43, capable d'induire la libération d'anions superoxydes par le monocyte (Shen et al, 1989). La fixation de l'anticorps My 43 à l'éosinophile humain suggère donc que le récepteur à IgA des éosinophiles ait des épitopes communs avec celui des monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles.

L'utilisation de sondes nucléotidiques (oligonucléotides spécifiques du Fc α R) a permis de révéler la présence de l'ARNm au niveau des éosinophiles par la technique de RT-PCR et de visualiser directement sur les éosinophiles grâce à la technique de RT-PCR *in situ*. Il est à noter que seule une sous - population d'éosinophiles est capable d'exprimer l'ARNm correspondant au récepteur. Le même résultat a été obtenu avec les sondes immunologiques (anticorps anti-Fc α R, My43). En plus des arguments évoqués plus haut, la diffusion des produits d'amplification dans les surnageants de PCR lors de la RT-PCR *in situ* peut expliquer le faible pourcentage de cellules capables d'exprimer ce récepteur. Tout laisse à penser qu'une certaine analogie, du moins pour le fragment d'ADNc amplifié par PCR, est partagée entre le récepteur des éosinophiles et celui des monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles. De plus des analogies fonctionnelles entre le récepteur du polynucléaire neutrophile et celui de l'éosinophile est à remarquer. En effet, il a été décrit que l'IgA1 et l'IgA2, monomériques ou polymériques, agrégées par la chaleur ou la glutaraldéhyde provoquent la libération par le neutrophile d'une quantité de myéloperoxydase (Stewart et al, 1990) comparable à la quantité d'EPO et d'ECP libérée par l'éosinophile (Desreumaux, 1991)

Outre une meilleure connaissance des différents récepteurs susceptibles d'intervenir dans la liaison des IgA sécrétoires sur l'éosinophile, notre travail a permis de révéler que ses récepteurs sont fonctionnels et sont associés à une activation cellulaire. Il serait intéressant de

définir la voie de signalisation transductionnelle correspondant à chacune de ces molécules réceptrices (complémentarité et synergie) afin d'élucider le phénomène d'activation préférentielle des éosinophiles par les IgA sécrétoires.

RESULTAT II.

EXPRESSION DE CYTOKINES DE TYPE 1 (IFN γ) OU DE TYPE 2 (IL-4, IL-5, IL-10) PAR DEUX SOUS-POPULATIONS DISTINCTES D'EOSINOPHILES.

Les capacités cytotoxiques de l'éosinophile, son rôle éventuel de cellule présentatrice d'antigène et sa capacité de libération de nombreuses molécules inflammatoires ou cytotoxiques lui confèrent un rôle particulièrement important dans la réponse immune vis-à-vis d'allergènes ou d'antigènes parasitaires. Mais la non spécificité des molécules toxiques fait apparaître également l'éosinophile comme étant une cellule agressive vis-à-vis de l'hôte, en particulier dans le contexte d'hyperéosinophilie. On retrouve donc l'éosinophile associé à de nombreuses pathologies, mais ce sont tout d'abord les hyperéosinophilies sans cause définie qui ont retenu notre attention. Plusieurs travaux ont rapporté l'association de l'éosinophilie au lymphome T (Chan et al, 1991; Merlio et al, 1991; O'Shea et al, 1987; Sato et al, 1983), à la leucémie lymphoblastique (Fishel et al, 1990; Troxel et al, 1984; Kolleger et al, 1986; Yoo et al, 1984) ou encore au lymphome B (Watanabe et al, 1989). Une étude réalisée dans le cas particulier de lymphomes gastrointestinaux, a montré que plus de 10% des cas sont associés à une éosinophilie tissulaire massive (Shepherd et al, 1987). Ces observations suggèrent que le développement des hyperéosinophilies est en étroite relation avec l'activation des lymphocytes. Cependant les éléments moléculaires de cette activation, en dehors des anomalies chromosomiques affectant notamment le chromosome 5 (Meeker et al, 1990; Grimaldi et al, 1989), sont à ce jour encore mal définies.

Des études extensives depuis plusieurs années ont permis de considérables progrès dans la compréhension des mécanismes cellulaires en jeu. L'intérêt s'est porté depuis plusieurs années sur le rôle des lymphocytes T dans cette pathologie. L'émergence d'une balance régulatrice distinguant, au sein du pool des lymphocytes T CD4+ auxiliaires, des cellules TH1 et TH2 semble avoir des retombées importantes en immunologie. Des travaux récents ont montré que des clones de lymphocytes T CD4+ CD3- de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique caractérisé par une production massive d'IL-5, produisent plus d'IL-5 et d'IL-4 par rapport à l'IL-2 et à l'IFN γ (Cogan et al, 1993). Cependant cette étude ne renseigne

pas sur l'autre groupe de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique avec un taux normal d'IgE. De plus, la notion de synthèse de cytokines longtemps confinée au lymphocyte T, s'est en fait enrichie au cours ces dernières années par la mise en évidence de la contribution des mastocytes et des éosinophiles à cette production.

Malgré tout, la capacité de l'éosinophile à produire d'autres cytokines reste à définir dans différentes situations pathologiques.

Ainsi, la première partie de notre travail a consisté à poursuivre les investigations sur la recherche d'autres cytokines de type 1 (IFN γ) et de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) au niveau des éosinophiles provenant de plusieurs patients atteints de syndrome hyperéosinophilique. Cette étude s'est effectuée d'abord sur (1) la production des protéines détectées par immunomarquage et puis (2) au niveau moléculaire en cherchant les ARNm qui correspondent à ces protéines soit par (2) hybridation *in situ* soit par (3) RT-PCR *in situ*. La technique de RT-PCR en tube a permis par la suite de chercher les ARNm de ces 4 cytokines chez les éosinophiles de 3 patients pris individuellement.

D'autres travaux, ont montré récemment qu'en plus des lymphocytes T CD4+, les lymphocytes CD8+ (connu pour leur profil TH1) peuvent aussi s'orienter vers un profil de type 2 en synthétisant l'IL-4 et de l'IL-5 (Erard et al, 1993). La description de cette nouvelle dichotomie fonctionnelle attira notre attention.

La deuxième partie du travail a donc consisté à démontrer l'existence de deux sous-populations d'éosinophiles différentes par leur profil de cytokines. Ceci grâce à la technique de (1) double immunomarquage à la phosphatase alcaline et puis de (2) double hybridation *in situ* pour chaque couple de cytokines à la fois.

1) Expression des cytokines IL-5, IL-10 et l'IFN γ au niveau protéique et moléculaire par les éosinophiles humains.

Etant donné le rôle très important que joue l'IFN γ dans la régulation de la réponse immunitaire (Trinchieri et al, 1985), nous avons recherché au départ la synthèse par l'éosinophile de cette cytokine pléiotropique. L'immunomarquage à la phosphatase alcaline est préféré à celui utilisant la peroxydase, afin d'éliminer un marquage non spécifique dû à la peroxydase endogène de l'éosinophile. Après immunomarquage à la phosphatase alcaline avec un anticorps monoclonal anti - IFN γ , on observe un marquage cytoplasmique sur quelques éosinophiles (figure 1A), alors qu'aucun signal n'est observé avec le contrôle isotypique (figure 1B). Ces résultats suggèrent que l'IFN γ synthétisé par les lymphocytes T activés et les cellules NK (Young et al, 1990) peut être synthétisé par les éosinophiles.

Pour analyser l'expression des cytokines de type 2, nous avons effectué la même technique d'immunomarquage avec un anticorps monoclonal anti-IL-10. L'IL-10 est produite par les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes B ainsi que les kératinocytes (Spits et al, 1992). Un marquage est obtenu sur quelques éosinophiles (figure 1 C), alors que le contrôle isotypique est négatif (figure 1 D). L'immunomarquage avec un antiserum de lapin anti-IL-5 (figure 1 E) confirme la présence de cette cytokine dans l'éosinophile humain (Desreumaux et al, 1993), alors qu'aucun marquage n'est obtenu avec un sérum de lapin sain (figure 1 F).

Ces résultats suggèrent donc que l'éosinophile puisse être une source d'IFN γ , d'IL-10 et d'IL-5, mais la possibilité d'endocytose de ces cytokines ne peut être exclue. Pour prévenir cette critique, nous avons recherché la présence d'ARNm de ces trois cytokines au niveau de l'éosinophile par l'hybridation *in situ* grâce à des ribosondes marquées au ³⁵S-UTP. A la quatrième semaine, après hybridation, on observe un signal important avec la sonde anti-sens de l'IFN γ (figure 1 G), la sonde anti-sens de l'IL-10 (figure 1 I) et la sonde anti-sens de l'IL-5 (figure 1 K), cependant que l'hybridation dans les mêmes conditions avec des sondes sens de l'IFN γ (figure 1 H), l'IL-10 (figure 1 J) et l'IL-5 (figure 1 L) ne donne qu'un faible bruit de fond. Ces données confirment la spécificité de l'hybridation *in situ* et montrent l'expression de l'ARNm correspondant à chaque cytokine considérée par l'éosinophile.

2) Expression d'IL-4 au niveau protéique (immunomarquage) et moléculaire (RT-PCR *in situ*) par les éosinophiles humains.

Comme l'IL-4 est la cytokine principalement produite aussi par les lymphocytes TH2 et pas par les lymphocytes TH1, nous avons recherché cette cytokine au niveau de l'éosinophile. Un marquage est obtenu, lorsque les éosinophiles sont incubés avec un antisérum de chèvre anti-IL-4 (figure 2 A), alors qu'aucun marquage n'est observé avec un sérum de chèvre normal (figure 2 B). Par la technique de RT-PCR *in situ* et révélation, de la digoxygénine incorporée dans l'ADN amplifié, par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la fluoresceine, on obtient un marquage (figure 2 C) indiquant que les éosinophiles synthétisent l'ARNm codant pour l'IL-4. La même expérience réalisée en l'absence de transcriptase inverse ne donne aucun signal (figure 2 D), confirmant que la RT-PCR *in situ* permet la détection de l'ARNm et non l'ADN génomique. De même, le surnageant (source d'ADN amplifié qui diffuse) récupéré de plusieurs lames a été réamplifié dans un tube de PCR. Les résultats de la réamplification (figure 2 E, piste 1 et 2) ont été comparés à la RT-PCR réalisée avec de l'ARN purifié à partir d'éosinophiles (figure 2 E, piste 3) et des lymphocytes (figure 2 E, piste 4). La taille de l'ADN amplifié analysée sur gel d'agarose et le Southern blot réalisé à l'aide d'un oligonucléotide interne spécifique de l'IL-4, confirment la spécificité de ces résultats.

Ainsi, en plus des cytokines proinflammatoires et des facteurs de croissance, les éosinophiles peuvent être une source de cytokines de type 1 et de type 2 régulatrices de la réponse immunitaire comme l'IFN γ , l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-10.

La fréquence des cellules qui expriment l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 est très importante dans toutes les expériences réalisées par rapport aux cellules qui expriment l'IFN γ . Il faut signaler par ailleurs que les lymphocytes T de patients présentant un HES produisent de grandes quantités d'IL-4 et d'IL-5 comparé à l'IFN γ (Cogan et al, 1994).

3) Analyse par RT-PCR de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou des lymphocytes.

Les expériences réalisées ci-dessus, ont été effectuées sur des éosinophiles provenant de différents patients. Nous avons cherché à savoir si les éosinophiles d'un seul patient exprimaient une seule ou plusieurs cytokines. Lors de l'amplification par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de l'IFN γ (figure 3 A), de l'IL-10 (figure 3 A), de l'IL-5 (figure 3 D) et de l'IL-4 (figure 3 E), on observe les bandes d'ADN de tailles attendues pour chaque cytokine et similaires à celles obtenues avec les lymphocytes. Les Southern blot effectués avec des oligonucléotides internes spécifiques pour l'IFN γ (figure 3 B), l'IL-10 (figure 3 C), l'IL-5 (figure 3 F) et l'IL-4 (figure 3 G) confirment la spécificité des amplifications par RT-PCR.

Dans toutes les expériences de PCR effectuées, il n'y a pas d'amplification de DNA génomique, car l'ARN est hautement purifié et chaque oligonucléotide est choisi sur deux exons chevauchants de telle façon que leur hybridation ne peut pas s'effectuer avec l'ADN génomique. Ces résultats montrent que les éosinophiles de chaque patient présentant le syndrome hyperéosinophilique expriment aussi bien l'ARNm codant pour l'IFN γ que ceux codant pour l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10.

4) Existence de deux sous-populations d'éosinophiles en fonction de leur profil de cytokines.

a) Double immunomarquage à la phosphatase alcaline.

Pour examiner si les cytokines détectées par RT-PCR sont produites par des éosinophiles distincts ou coexprimés par les mêmes éosinophiles, nous avons fait appel à la technique de double immunomarquage à la phosphatase alcaline. Après révélation de la première cytokine, la phosphatase alcaline est dénaturée par un tampon contenant l'EDTA et les éosinophiles sont soumis au deuxième immunomarquage à la phosphatase alcaline. Dans le cas des anticorps polyclonaux, les cellules colorées en rouge après révélation de la phosphatase alcaline à la New Fuchsin, expriment les cytokines considérées. Dans le cas des anticorps monoclonaux, les cellules colorées en bleu après révélation de la phosphatase alcaline avec le substrat BCIP/NBT, expriment les cytokines considérées. Le double immunomarquage avec un anticorps polyclonal

anti-IL-5 et un monoclonal anti-IFN γ montre que l'IL-5 et l'IFN γ ne semblent pas être exprimés par les mêmes éosinophiles (figure 4 A). Les cellules qui expriment l'IL-5 et pas d'IFN γ sont plus fréquentes (54-62%) que les cellules qui expriment l'IFN γ seulement (11-32%). Une proportion plus faible de cellules semble cependant coexprimer les deux cytokines (13-27%). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'un double immunomarquage avec un antisérum de lapin anti-IFN γ et un antisérum de chèvre anti-IL-4 (figure 4 E) ainsi qu'un antisérum de lapin anti-IFN γ et un anticorps monoclonal anti-IL-10 (résultats non présentés). Cependant, comme le montrent les figures 4 D, 4 G et 4 I la majorité des cellules coexpriment les cytokines IL-5 et IL-10 (60-75%), l'IL-4 et l'IL-5 (75-80%) ainsi que l'IL-4 et l'IL-10 (69-73%).

Ces résultats suggèrent l'existence de deux sous-populations d'éosinophiles et illustrent une nouvelle facette de l'hétérogénéité de l'éosinophile. Comme les lymphocytes CD4+ et plus récemment les CD8+ (Erard et al, 1993), les éosinophiles peuvent être polarisés en sous-populations de type 1 ou type 2, avec une majorité de cellules produisant des cytokines de type 2. Des expériences de cytométrie en flux sont en cours pour déterminer de manière plus quantitative la proportion respective de ces sous-populations.

b) Double hybridation *in situ* avec des ribosondes marquées à la dig-UTP et des ribosondes marquées au ^{35}S -UTP.

L'existence de ce profil de cytokines de l'éosinophile a été aussi recherché au niveau de l'ARNm et ceci pour trois cytokines : l'IFN γ , l'IL-5 et l'IL-10. La révélation des sondes est effectuée par incubation des cellules avec un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline et le substrat BCIP/NBT qui donne une coloration bleue. Les cellules sont considérées comme positives lorsque le marquage au niveau cellulaire est 4 fois supérieur au bruit de fond. La double hybridation *in situ* effectuée avec des ribosondes antisens de l'IFN γ (marqués au dig-11-UTP) et antisens de l'IL-5 (marquées au ^{35}S -UTP) révèle l'existence d'éosinophiles qui n'expriment que l'ARNm pour l'IFN γ (figure 5 A) alors que l'hybridation avec des ribosondes antisens de l'IL-5 (marquées au dig-11-UTP) et antisens de l'IL-10 (marquées au ^{35}S -UTP) montre que la majorité des cellules coexpriment l'ARNm pour ces deux cytokines (figure 5 C). Il n'est retrouvé aucun signal positif lors des doubles hybridations avec des ribosondes contrôles sens de l'IFN γ (marquées au dig-11-UTP) et sens de l'IL-5 (marquées

au ^{35}S -UTP) (figure 5 B) ni lors de l'hybridation *in situ* avec des ribosondes contrôles sens de l'IL-5 (marquées au dig-11-UTP) et sens de l'IL-10 (marquées au ^{35}S -UTP).

Figure 1. Détection de l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ dans les éosinophiles humains par immunomarquage à la phosphatase alcaline (A-F) et par hybridation *in situ* (G-L). Les éosinophiles purifiés à partir de sang périphérique de patient présentant un syndrome hyperéosinophilique (A-F et I-L) ou à partir de lavage broncho-alvéolaire (G et H) ont été soumis à l'immunomarquage (A-F) en présence d'un anticorps monoclonal anti-IFN γ (A), d'un anticorps monoclonal anti-IL-10 (C), d'un contrôle isotypique (B et D), du sérum de lapin anti-IL-5 (E) ou du sérum de lapin sain utilisé comme contrôle (F). Les cellules positives sont marquées par des flèches.

G-L : hybridations *in situ* avec des ribosondes marquées au ^{35}S -UTP. Hybridation *in situ* avec une ribosonde antisens de l'IFN γ (G), une ribosonde antisens de l'IL-10 (I) ou une ribosonde antisens de l'IL-5 (K). Hybridations *in situ* effectuées avec des ribosondes contrôles sens de l'IFN γ (H), de l'IL-10 (J) ou de l'IL-5 (L). Les cellules positives sont signalées par des flèches. Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline après immunomarquage ou au Giemsa après hybridation *in situ*.

Figure 1.

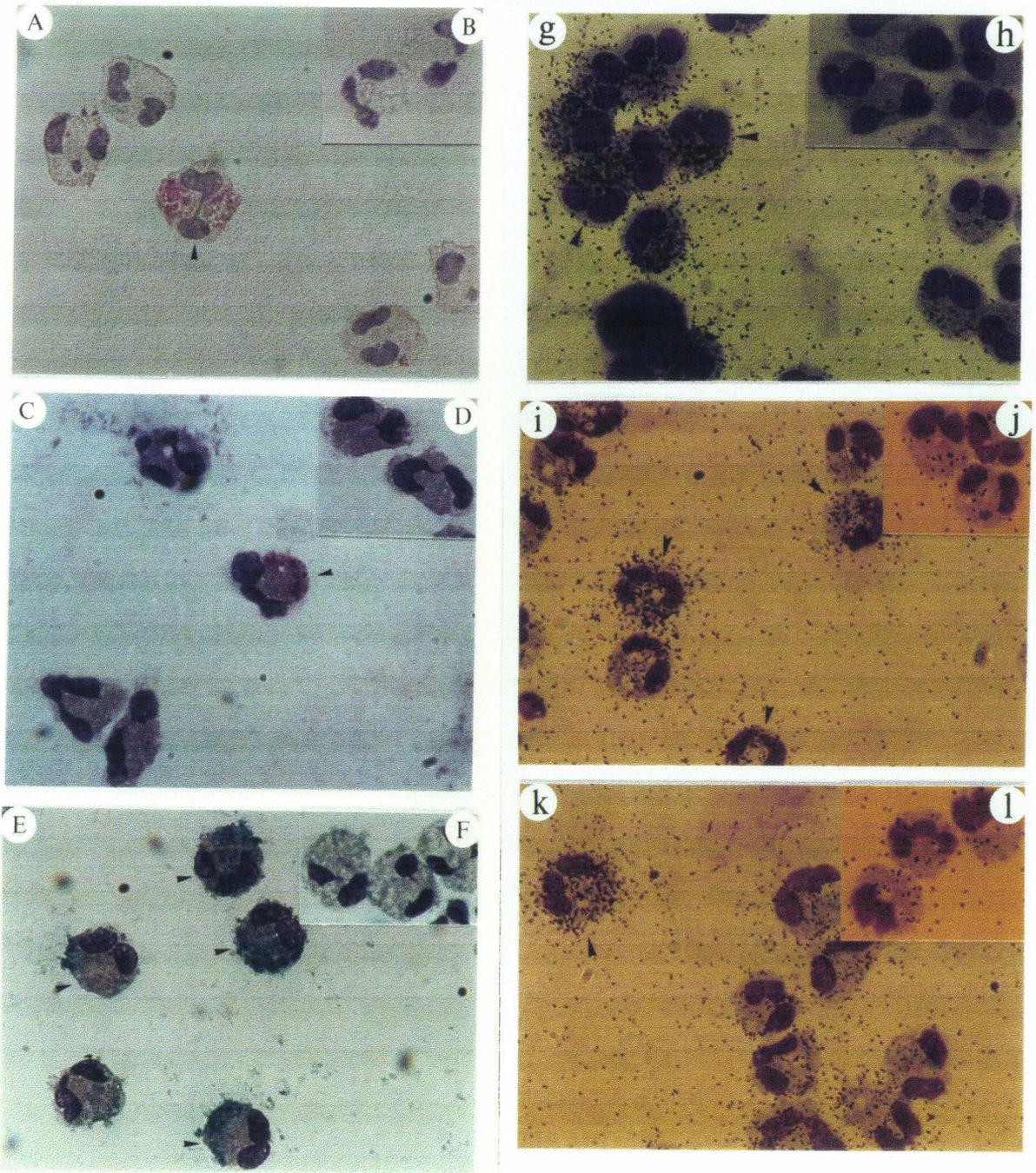


Figure 2

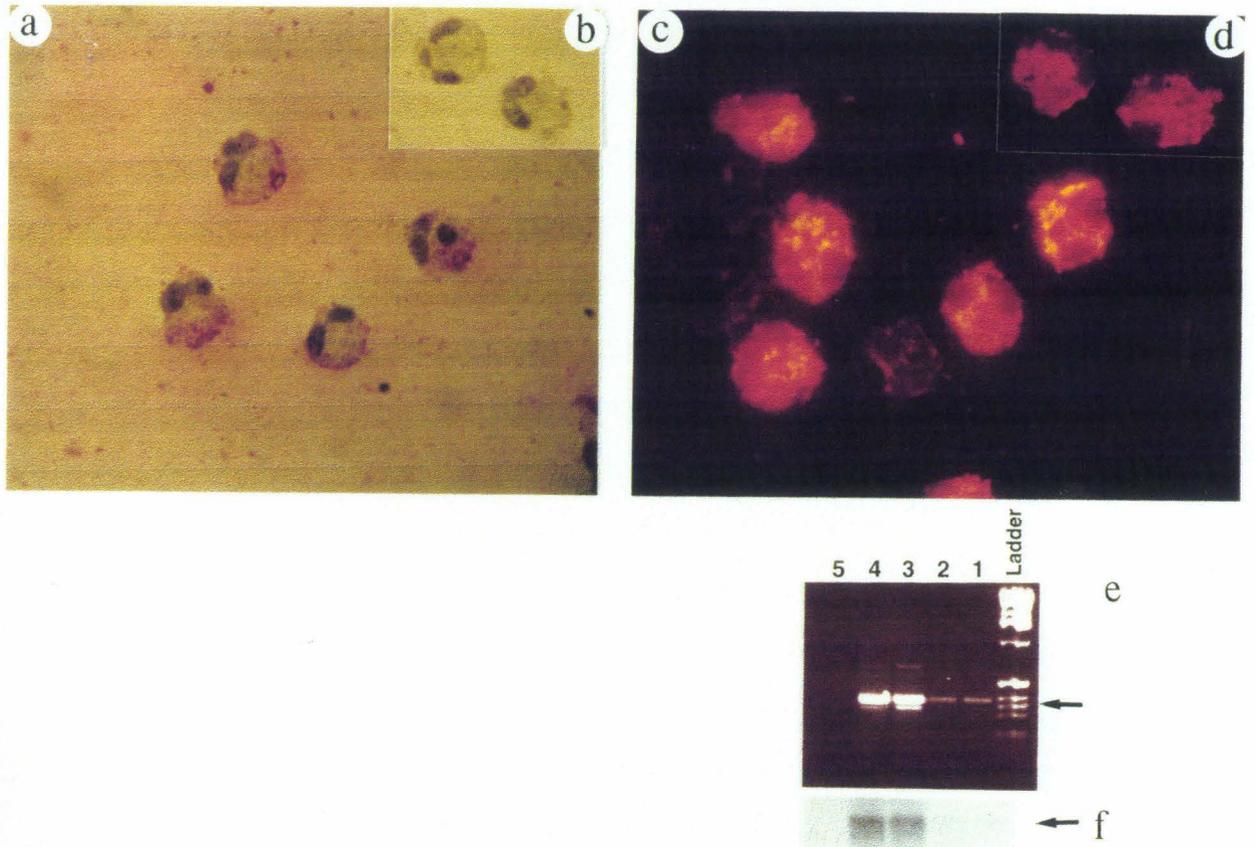


Figure 2. Détection de la cytokine IL-4 dans les éosinophiles humains par immunomarquage à la phosphatase alcaline (A, B) et de l'ARNm correspondant par RT-PCR *in situ* (C,D). Les éosinophiles humains purifiés à partir de sang périphérique de patient présentant un syndrome hyperéosinophilique, ont été cyto-centrifugés sur lames et incubés en présence d'un sérum de chèvre dirigé contre l'IL-4 humaine (A) ou un sérum de chèvre normal servant de contrôle négatif (B). Les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline. La détection de l'ARNm de l'IL-4 a été effectuée par RT-PCR *in situ* en présence de la digoxygénine-dUTP. La révélation par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la fluorescéine permet de visualiser directement le signal amplifié (C). Quand la PCR *in situ* est effectuée en l'absence de reverse transcriptase, aucun signal n'est visualisé (D). Pour démontrer la spécificité de l'amplification, le surnageant de la PCR *in situ* a été récupéré à partir de plusieurs lames et réamplifié une deuxième fois par PCR dans un tube avec les mêmes oligonucléotides (E). Pistes 1, 2 : surnageant de PCR *in situ*; 3 : ARN d'éosinophiles purifiés; 4 : ARN de lymphocytes utilisé comme contrôle positif; 5, contrôle négatif (pas de cDNA); piste "ladder", marqueurs de taille (Gibco-BRL). L'analyse par Southern blot (F) des produits amplifiés par PCR avec un oligonucléotide interne marqué à la biotine montre la spécificité de l'amplification.

Figure 3

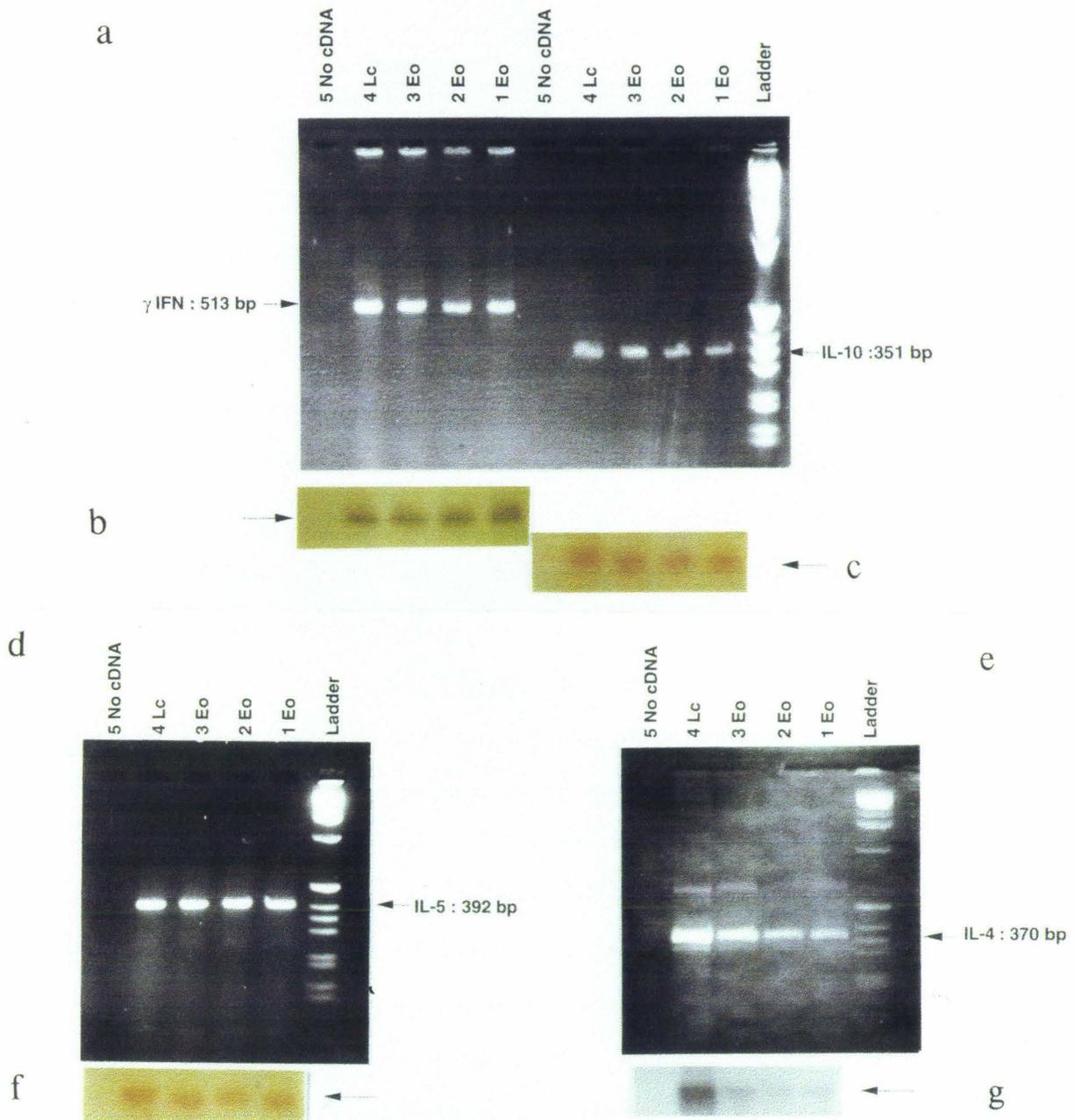
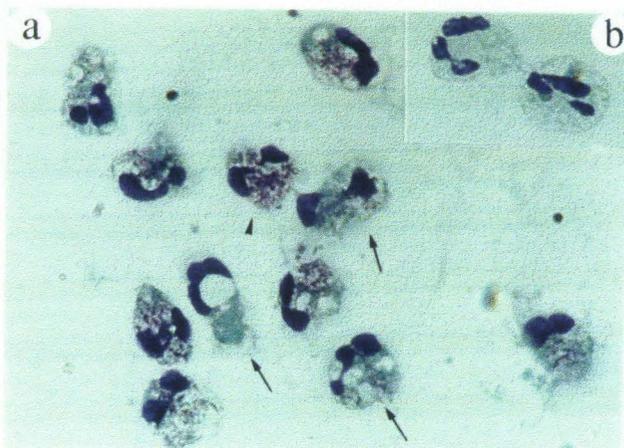


Figure 3. Analyse par RT-PCR de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou de lymphocytes. Après une étape de reverse transcription, une amplification a été effectuée avec des oligonucléotides spécifiques pour chaque interleukine et visualisée sur gel d'agarose (A, D et E). L'analyse par Southern blot confirme la spécificité de l'amplification par PCR (B, C, F et G). Les pistes 1, 2 et 3 correspondent à des éosinophiles de 3 patients différents et sont utilisés lors de l'amplification de chaque cytokine. La piste 4 correspond à des lymphocytes utilisés comme contrôle positif et la piste 5 au contrôle négatif (sans cDNA). La piste "Ladder" correspond aux marqueurs de taille (Gibco-BRL).

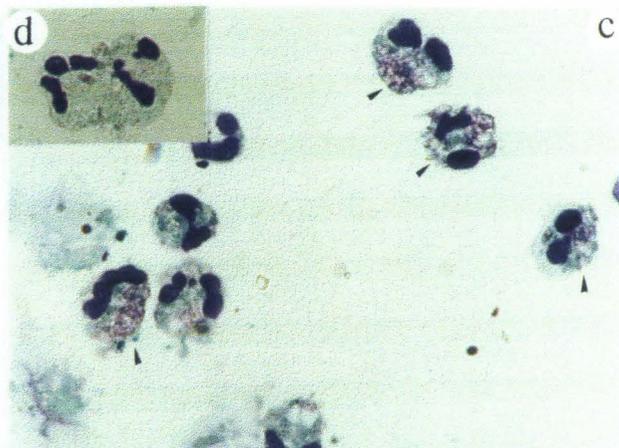
Figure 4. Double immunomarquage à la phosphatase alcaline sur des éosinophiles de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique. Dans le cas des anticorps polyclonaux, les cellules colorées en rouge après révélation de la phosphatase alcaline à la New Fuchsin, expriment les cytokines considérées. Dans le cas des anticorps monoclonaux, les cellules colorées en bleu après révélation de la phosphatase alcaline avec le substrat BCIP/NBT, expriment les cytokines considérées. Les éosinophiles ont été soumis au double immunomarquage en utilisant un sérum de lapin anti-IL-5 et un anticorps monoclonal anti-IFN γ (A). les éosinophiles exprimant seulement l'IL-5 sont marqués par des flèches et ceux exprimant seulement l'IFN γ sont marqués par des pointes de flèches. Un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés comme contrôles (B) dans les mêmes conditions; sérum de lapin anti-IL-5 et anticorps monoclonal anti-IL-10 (C). Les éosinophiles qui coexpriment l'IL-5 et l'IL-10 sont signalés par des flèches; un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés comme contrôles (D); sérum de lapin anti-IFN γ et anticorps monoclonal anti-IL-4 (E). Les éosinophiles exprimant seulement l'IL-4 sont marqués par des flèches et ceux exprimant seulement l'IFN γ sont marqués par des pointes de flèches. un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés comme contrôles (F); sérum de lapin anti-IL-5 et anticorps monoclonal anti-IL-4 (G); Les éosinophiles qui coexpriment l'IL-5 et l'IL-4 sont signalés par des flèches; un sérum de lapin sain et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés comme contrôles (H); sérum de chèvre anti-IL-4 et anticorps monoclonal anti-IL-10 (I), Les éosinophiles qui coexpriment l'IL-4 et l'IL-10 sont signalés par des flèches; un sérum de chèvre normal et un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* ont été utilisés comme contrôles (J).

Le pourcentage des cellules positives pour les cytokines considérées dans chaque expérience est indiqué.

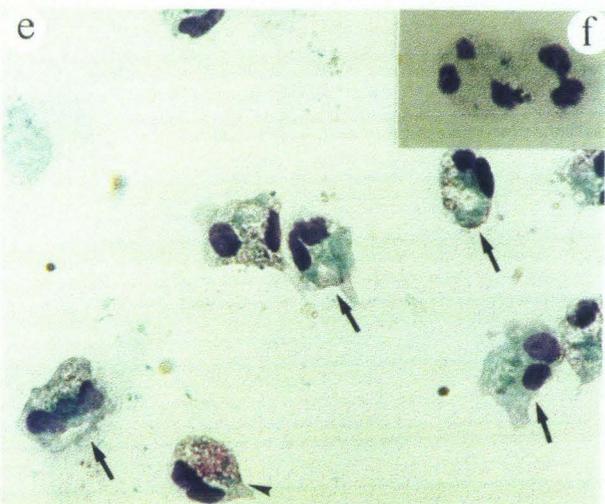
Figure 4.



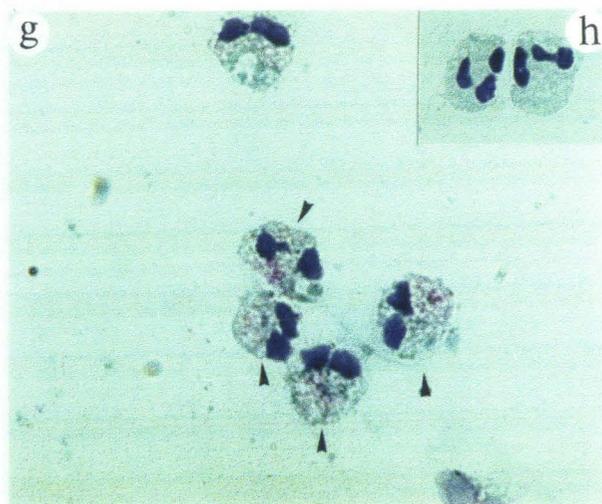
Cytokines	IFN γ ⁺ IL-5 ⁺	IFN γ ⁻ IL-5 ⁻	IFN γ ⁺ IL-5 ⁻	IFN γ ⁻ IL-5 ⁺
Frequency	13-27	0-1	11-32	54-62



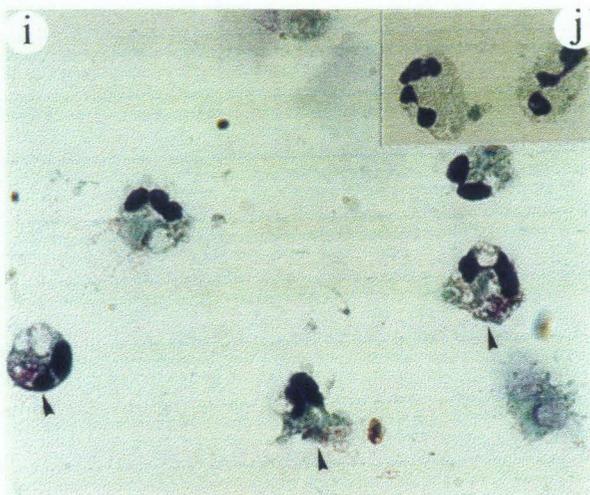
Cytokines	IL-5 ⁺ IL-10 ⁺	IL-5 ⁻ IL-10 ⁻	IL-5 ⁺ IL-10 ⁻	IL-5 ⁻ IL-10 ⁺
Frequency	60-75	5-21	15-17	2-2



Cytokines	IFN γ ⁺ IL-4 ⁺	IFN γ ⁻ IL-4 ⁻	IFN γ ⁺ IL-4 ⁻	IFN γ ⁻ IL-4 ⁺
Frequency	10-19	0-0	17-20	64-70



Cytokines	IL-4 ⁺ IL-5 ⁺	IL-4 ⁻ IL-5 ⁻	IL-4 ⁺ IL-5 ⁻	IL-4 ⁻ IL-5 ⁺
Frequency	75-80	0-2	12-15	6-10



Cytokines	IL-4 ⁺ IL-10 ⁺	IL-4 ⁻ IL-10 ⁻	IL-4 ⁺ IL-10 ⁻	IL-4 ⁻ IL-10 ⁺
Frequency	69-73	2-6	11-13	12-14

Figure

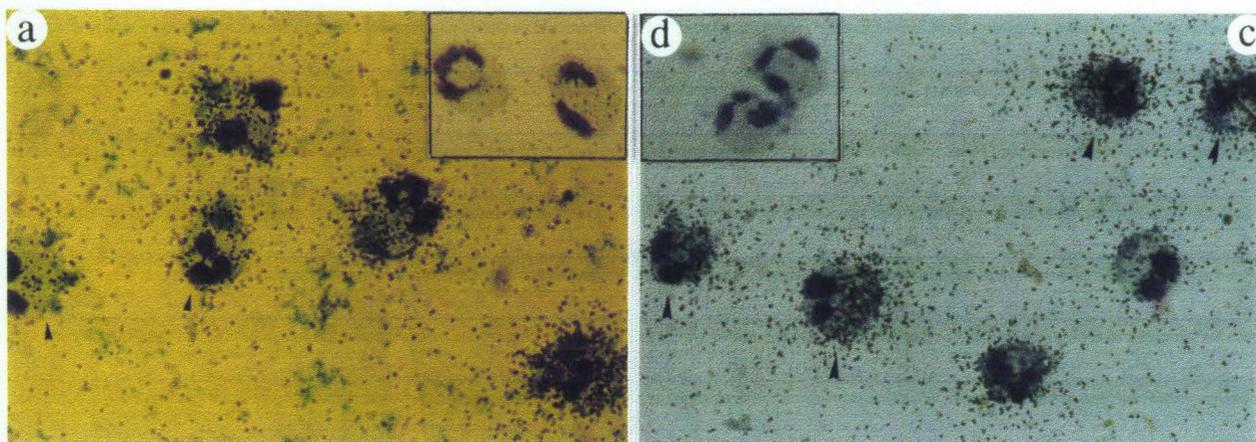


Figure 5. Double hybridation *in situ* avec des ribosondes marquées au ^{35}S -UTP ou à la dig-UTP sur des éosinophiles de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique.

a : correspond à l'hybridation *in situ* avec des ribosondes antisens de l'IFN γ (marquées au dig-11-UTP) et antisens de l'IL-5 (marquées au ^{35}S -UTP); **b** : hybridation *in situ* avec des ribosondes contrôles sens de l'IFN γ (marquées au dig-11-UTP) et sens de l'IL-5 (marquées au ^{35}S -UTP); **d** : hybridation *in situ* avec des ribosondes antisens de l'IL-5 (marquées au dig-11-UTP) et antisens de l'IL-10 (marquées au ^{35}S -UTP); **c** : hybridation *in situ* avec des ribosondes contrôles sens de l'IL-5 (marquées au dig-11-UTP) et sens de l'IL-10 (marquées au ^{35}S -UTP). La révélation des sondes froides est effectuée grâce à des anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline. La révélation des sondes marquées au ^{35}S -UTP est effectuée dans une émulsion photographique (NTB2, kodak). Les cellules sont contre-colorées à l'hématoxyline.

Discussion

Parmi les diverses pathologies où l'éosinophilie est dérégulée de façon significative, le syndrome hyperéosinophilique présente des aspects cliniques et biologiques intéressants pour la compréhension de la physiopathologie de l'éosinophile. Cellules immunorégulatrices grâce à leur capacité de synthèse de cytokines, les éosinophiles ne sont plus considérés uniquement comme des cellules effectrices cytotoxiques et proinflammatoires. Le rôle crucial des éosinophiles dans le syndrome hyperéosinophilique, nous a conduit à évaluer la capacité des éosinophiles à synthétiser différentes cytokines dans cette pathologie.

Une attention particulière a été portée sur les cytokines (IFN γ , IL-4, IL-5 et IL-10) qui déterminent une dichotomie fonctionnelle des lymphocytes T chez la souris (Mosmann et al, 1989) et chez l'homme (Romagnani, 1991).

Nous avons débuté notre étude par la recherche de l'IFN γ dans les éosinophiles de patient présentant un HES mais aussi sur des éosinophiles issus de lavage bronchaloéolaire. Les résultats d'immunomarquage et de l'hybridation *in situ* montrent que les éosinophiles sont capables d'exprimer l'ARNm codant pour cette cytokine et qu'il est traduit en protéine au niveau cytoplasmique. Ces résultats suggèrent que l'IFN γ synthétisé habituellement par les lymphocytes T activés et les cellules NK (Young et al, 1990) peut être synthétisé par les éosinophiles. Grâce à la sécrétion de cette cytokine, l'éosinophile pourrait ainsi participer à la défense de l'organisme contre les bactéries (Niesel et al, 1992), les parasites (Gabriel et al, 1993), les infections virales (Gewet et al, 1992) ou exercer une activité anti-tumorale (Fleischman et al, 1992).

Pour explorer l'expression des cytokines de type 2 versus type 1, nous avons analysé la synthèse de l'IL-10. Au cours des dernières années, il est apparu que les sources d'IL-10 sont en fait multiples et que ses effets biologiques s'exercent sur différentes cibles cellulaires. Les cellules CD4+ ne sont pas les seuls lymphocytes producteurs d'IL-10, puisque les lymphocytes B peuvent également en sécréter (Spits et al, 1999). Les monocytes et les macrophages représentent également une importante source d'IL-10 (De Waal Malefyt et al, 1992). Par les mêmes techniques que précédemment sur des éosinophiles d'un deuxième patient présentant un HES, nous avons observé l'expression de la protéine ainsi que l'ARNm correspondant. La présence d'IL-5, démontrée récemment chez les éosinophiles de patient HES (Desreumaux et al,

1992) a été confirmée dans cette étude. Tant *in vitro* qu'*in vivo*, la production d'un type de cytokine (TH1 ou TH2) s'accompagne d'une inhibition de la production des cytokines de l'autre type. Cette inhibition mutuelle des réponses TH1 et TH2 est liée à des médiateurs solubles qui sont l'IL-10 et l'IFN γ (Romagnani, 1991). Des expériences sont en cours pour démontrer que ces cytokines sont libérées par l'éosinophile et savoir si ce mécanisme d'inhibition mutuelle est réalisé au niveau de cette cellule. De plus, aucune évidence de la présence de ces cytokines sous forme soluble dans les sérums de patients n'existe à l'heure actuelle.

L'une des conséquences essentielles des mécanismes d'activation cellulaire dépendante d'IgE est la libération par des populations cellulaires impliquées dans les fonctions effectrices, de nombreux médiateurs et des cytokines régulatrices de toutes les étapes de la réponse immunitaire. C'est ainsi que certains mastocytes, libèrent une variété de cytokines dont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 (Stevens et al, 1989) qui peuvent jouer un rôle essentiel dans la production d'IgE et l'activation des cellules de l'inflammation. De même, en réponse à l'IgE, l'éosinophile peut produire de l'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994). Dans cet esprit, et connaissant la synthèse de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par la même sous-population de lymphocytes T CD4⁺ (Romagnani, 1991) nous avons recherché l'IL-4 au niveau des éosinophiles humains. La première approche, consistant à détecter la protéine par immunomarquage, s'est révélée informative. L'ARNm de l'IL-4 a été recherché au niveau des mêmes cellules par RT-PCR *in situ*. Il est intéressant de noter que les cellules expriment l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ en dehors de toute stimulation et reflètent probablement la situation *in vivo*. La proportion de cellules exprimant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 est plus importante que celle qui exprime l'IFN γ . Des résultats similaires ont été obtenus avec des clones lymphocytaires (Cogan et al, 1994). La synthèse protéique des éosinophiles diffère selon leur densité, suggérant l'existence de stades distincts d'activation (Gruart et al, 1989). Cette variation pourrait expliquer l'hétérogénéité de l'expression de ces cytokines par les éosinophiles.

Au cours de nos expériences, nous n'avons pas conduit la recherche de ces cytokines sur des éosinophiles d'un même patient principalement pour des raisons quantitatives. Afin de savoir si les éosinophiles issus d'un même patient étaient capables de synthétiser l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ , nous avons examiné leur expression au niveau transcriptionnel. Par RT-PCR nous avons détecté les ARNm correspondant à chaque cytokine et ceci chez les éosinophiles de

patients HES hautement purifiés. Nous avons inclus des lymphocytes comme témoin positif dans cette expérience. Nos résultats indiquent que les éosinophiles de chaque patient HES expriment les quatre cytokines considérées.

La présence de cytokines de type 1 et de type 2 au niveau des éosinophiles, nous a conduit à étudier l'existence de sous-populations d'éosinophiles, à l'image des lymphocytes T. Autrement, on s'est posé la question de savoir si ce sont les mêmes éosinophiles qui synthétisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ ou s'il y a une expression différentielle de ces cytokines par différents éosinophiles. Une première approche au niveau protéique grâce à la technique de double immunomarquage révèle une hétérogénéité du profil d'expression des cytokines : l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-4 sont coexprimés par les mêmes éosinophiles, alors qu'une autre sous-population d'éosinophiles exprime seulement l'IFN γ . Nous avons réalisé en parallèle la recherche des ARNm de l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN γ par double hybridation *in situ*, où les cellules sont considérées comme positives, lorsque le marquage est 4 fois supérieur au bruit de fond. Il faut noter, que le pourcentage des cellules qui coexpriment les cytokines de type 2 est plus important que les cellules qui expriment l'IFN γ chez les deux patients HES testés par double immunomarquage. Ces résultats ne sont pas sans analogie avec d'autres rapportés chez les lymphocytes T, où le syndrome hyperéosinophilique pourrait être associé à une réponse TH2 prédominante (Cogan et al, 1994). Cette observation est très intéressante car elle apporte un élément nouveau dans la contribution directe de l'éosinophile dans cette pathologie. Outre la production de cytokines par les cellules T activées, on pourrait envisager la contribution de l'IL-5 et l'IL-4 dont la production serait induite par l'IgE ou par des cytokines. On ne connaît pas encore la cinétique d'expression de ces protéines, ni leur degré de contribution à la sévérité de la pathologie. Cependant, plusieurs travaux ont rapporté une activité antagoniste entre les cytokines de type 2 (l'IL-4, IL-10) et l'IFN γ (Mosman et al, 1989).

La coexistence de ces deux profils de cytokines chez les éosinophiles de patients HES, pose la question de leur présence et de leur cinétique de sécrétion au cours de la maladie. Le phénotype des cellules exprimant les ARNm codant pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-2 ou l'IFN γ a été recherché par d'autres équipes sur des biopsies bronchiques d'asthmatiques et comparé avec des témoins non asthmatiques (Durham et al, 1995). Les données obtenues montrent que malgré une dominance de l'IL-4 et l'IL-5 chez les asthmatiques il y a une expression de l'IFN γ et de l'IL-2. N'ayant pas pu identifier précisément la nature des cellules positivement marquées, ces auteurs

en suspectaient la nature lymphocytaire. D'autres expériences sont à effectuer sur des éosinophiles de patients HES avec un taux excessif d'IgE qui répondent positivement à une thérapie systémique par les corticostéroïdes et des éosinophiles de patients résistants à ce traitement dont le taux d'IgE est normal ou inférieur aux valeurs normales et ne présentent pas de récepteurs pour les corticostéroïdes (Prin et al, 1989).

RESULTAT III.

**COEXPRESSION DES ARNm DES CYTOKINES DE TYPE 2
(IL-4, IL-5 ET L'IL-10) PAR LES EOSINOPHILES
AU COURS DE L'ASTHME.**

RESULTAT III.

COEXPRESSION DES ARNm DES CYTOKINES DE TYPE 2 (IL-4, IL-5 ET L'IL-10) PAR LES EOSINOPHILES AU COURS DE L'ASTHME.

Au cours des manifestations allergiques, on assiste généralement à une augmentation des taux d'immunoglobulines E, par rapport à ceux des autres classes d'immunoglobulines qui varient peu. Cette abondance d'IgE s'explique par la nature des lymphocytes actifs chez les sujets allergiques; en effet, une corrélation positive entre l'allergie et l'orientation de la réponse immunitaire vers le profil TH2 des lymphocytes T CD4⁺ a été rapportée par plusieurs chercheurs. L'interaction de l'IgE avec ses récepteurs de haute affinité (FcεRI), semble conduire, dans le cas des mastocytes, à des phénomènes d'activation cellulaire conduisant à une libération de médiateurs de l'inflammation ainsi que de cytokines de type 2 (surtout IL-4 et IL-5). Cette interaction privilégiée entre les IgE et les mastocytes, repose essentiellement sur la capacité de cette cellule à exprimer sur sa membrane un récepteur de haute affinité pour l'IgE, et sur son pouvoir de libération des médiateurs préformés et néoformés participant à l'inflammation. Une interaction IgE-récepteur permet aussi à d'autres cellules inflammatoires (monocytes-macrophages, éosinophiles et plaquettes), munies d'un récepteur de faible affinité (FcεRII), de rentrer tardivement dans le concert de la réaction allergique. Cependant, la découverte récente, dans notre laboratoire de récepteurs de haute affinité (FcεRI), à la surface des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques et de patients présentant une dermatite atopique (Soussi-Gounni et al, 1994) ainsi que sur les plaquettes (Soussi-Gounni et al, manuscrit en préparation), suggère que ces cellules pourraient jouer un rôle plus précoce dans l'inflammation allergique. Dans ce contexte, le récepteur de haute affinité a été également retrouvé chez les cellules de Langerhans (Bieber et al, 1992) et les monocytes (Maurer et al, 1994) et pourrait participer à la présentation d'allergènes comme le suggèrent Maurer et al)

La démonstration que les mastocytes pourraient se comporter comme des cellules TH2, lorsqu'ils sont stimulés par l'IgE de par la synthèse de taux élevés des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5), ainsi que la participation active des éosinophiles au cours de l'asthme allergique, a orienté nos recherches vers l'analyse de la synthèse de cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 par les éosinophiles provenant de sang périphérique d'un patient asthmatique en comparaison avec des donneurs normaux.

Le premier but de ce travail a consisté à chercher la présence de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 dans les éosinophiles tant au niveau protéique qu'au niveau moléculaire. Les protéines sont explorées par (1) immunomarquage révélé par technique à la phosphatase alcaline et les ARNm correspondants par (2) RT-PCR *in situ* et par (3) RT-PCR en tube sur l'ARN purifié. Cette étude s'est effectuée sur des éosinophiles périphériques d'un patient présentant un asthme extrinsèque et sur des éosinophiles périphériques de trois donneurs sains.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché la coexpression de ces cytokines par une nouvelle méthode de PCR *in situ*. En effet, grâce à des oligonucléotides marqués à la digoxygénine, la biotine ou la fluorescéine, la double RT-PCR *in situ* par sa sensibilité et sa spécificité nous a permis d'examiner la coexpression de différentes cytokines au niveau des cellules individuelles ("single cell PCR").

1) Immunolocalisation intracellulaire des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et l'IL-10) dans les éosinophiles de sang périphérique de patient asthmatique et de donneur sain.

La mise en évidence directe de la synthèse par les éosinophiles d' IL-4, d' IL-5, et d' IL-10 ainsi que l'estimation de la fréquence des cellules productrices de ces cytokines ont été obtenues grâce à une technique d'immunomarquage révélée par la phosphatase alcaline, à la fois sur des éosinophiles d'un patient asthmatique et sur des éosinophiles de donneurs sains purifiés à partir du sang périphérique. Une réaction positive a été observée lors de l'immunomarquage avec un antisérum de chèvre dirigé contre l'IL-4 sur des éosinophiles de patient asthmatique (figure 1 A, a) ainsi que les éosinophiles du donneur sain (figure 1B, a). Cependant, aucun marquage positif ne fut obtenu avec un sérum de chèvre normal (figure 1 A, b, 1B, b). L'immunomarquage avec un antisérum de lapin anti-IL-5 confirme la présence de l'IL-5 au niveau de l'éosinophile (figure 1A, c, 1 B, c), qui avait été démontrée dans les études antérieures réalisées sur des éosinophiles de patients atteints d'HES (Desreumaux et al, 1992) ainsi que sur les éosinophiles de patients asthmatiques (Broide et al, 1992). La fréquence des éosinophiles de patient asthmatique exprimant l'IL-4 (68%) est plus importante que chez les éosinophiles du donneur sain (35%). De même, l'IL-5 semble être plus exprimée chez les éosinophiles du patient asthmatique (76%) que chez les éosinophiles du donneur sain (41%). Le comptage a été réalisé sur 4 lames d'immunomarquage pour les éosinophiles d'un patient asthmatique et 4 lames d'éosinophiles de donneurs sains (trois donneurs) et ceci en comptant le nombre de cellules positives, sur 200 cellules à la fois.

La cinétique de synthèse des cytokines par les éosinophiles n'est pas nécessairement uniforme au cours du temps. De ce fait, lors de l'expérience, les fréquences des cellules exprimant l'IL-4 et l'IL-5 dans cette étude représentent une estimation minimale. Afin d'analyser la synthèse d'une autre cytokine de type 2 par les éosinophiles, nous avons réalisé un immunomarquage avec un anticorps monoclonal anti-IL-10. Un marquage positif a été obtenu au niveau des éosinophiles du patient asthmatique (figure 1A, e) et du donneur sain (figure 1B, e). Là aussi, la fréquence des cellules productrices de l'IL-10 chez le patient asthmatique (54%) est plus importante par rapport aux éosinophiles du donneur sain (22%).

L'augmentation du nombre de cellules synthétisant les cytokines de type 2 chez l'éosinophile du patient asthmatique, suggère un rôle important joué par cette cellule dans la

pathogénèse de cette maladie. Par ailleurs, d'autres travaux ont rapporté des résultats similaires pour la synthèse de l'IL-3 (Kita et al, 1991), l'IL-5 et le GM-CSF (Broide et al, 1992) par les éosinophiles humains. L'expression de l'ARNm de l'IL-6 (Hamid et al, 1992) ainsi que des concentrations élevées de l'IL-8 chez les éosinophiles des patients asthmatiques ont fait l'objet d'autres études. Il faut signaler par ailleurs, que toutes ces cytokines ont été localisées soit au niveau de la matrice soit au niveau du core des granules des éosinophiles. Ceci laisse à penser qu'elles sont probablement relarguées par dégranulation, suite à l'activation par un stimulus donné, qui reste bien évidemment à déterminer.

Le phénotype des cellules exprimant les ARNm codant pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-2 ou l'IFN γ a été recherché, par d'autres équipes, à partir de liquide de lavage bronchoalvéolaire et de biopsies bronchiques d'asthmatiques et comparé avec des témoins non asthmatiques grâce à un couplage de l'immunomarquage suivi de l'hybridation *in situ* (Durham et al, 1995). Les données obtenues ont montré que (1) l'expression des ARNm de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-5 est plus importante chez les sujets asthmatiques par rapport aux sujets non asthmatiques. (2) Une expression par les mastocytes et les éosinophiles a été signalée, mais n'ayant pas pu identifier les cellules par cette technique, la majorité des cellules ont été identifiées comme des lymphocytes T CD3+.

2) Expression des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et l'IL-10) au niveau moléculaire (RT-PCR *in situ*) par les éosinophiles périphériques de patient asthmatique et de donneur sain.

Si l'éosinophile peut représenter la source de différentes cytokines, il est difficile d'exclure l'endocytose de ces cytokines exogènes par l'éosinophile. Afin de démontrer la synthèse de ces cytokines par l'éosinophile lui même, nous avons examiné d'abord la présence des ARNm correspondants et celui de l'EPO par RT-PCR *in situ*. L'EPO est une protéine cationique exprimée constitutivement par les éosinophiles, et sa détection permet d'estimer la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR *in situ*. L'amplification par RT-PCR *in situ* de l'ARNm de l'EPO, montre un marquage positif de la majorité des éosinophiles (96%) (figure 2 A, a, 1B, a).

La figure 2 illustre un marquage positif des produits amplifiés par des anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline ou à la fluorescéine. Les éosinophiles humains

semblent exprimer l'ARNm de l'IL-5 (figure 2 c), de l'IL-4 (figure 2 e), et de l'IL-10 (figure 2 g) à la fois chez le patient asthmatique (figure 2 A) et chez le donneur sain (figure 2 B). La même expérience réalisée en absence de transcriptase inverse ne donne aucun signal (figure 2 b, d, f et h), confirmant ainsi que la RT-PCR *in situ* permet la détection de l'ARNm et non l'ADN génomique. La révélation des lames se fait par comptage des cellules exprimant les ARNm sur un champ comportant 200 cellules. Les pourcentages des éosinophiles de patient asthmatique exprimant l'ARNm de l'IL-4 (53%), de l'IL-5 (85%) et de l'IL-10 (62%) sont plus importants que ceux du donneur sain où l'ARNm de l'IL-4 est détecté au niveau de 18% d'éosinophiles, l'IL-5 est exprimé par 38% d'éosinophiles et l'IL-10 par 42% d'éosinophiles.

Afin de confirmer la spécificité de la RT-PCR *in situ*, le surnageant (source d'ADN amplifié qui diffuse) récupéré de plusieurs lames a été réamplifié dans un tube de PCR. Les résultats de la réamplification (figure 3 a, b, c, piste 1) ont été comparés à la RT-PCR réalisée avec de l'ARN purifié à partir d'éosinophiles de donneur sain (figure 3, a, b, c, piste 2) et d'éosinophiles de patient asthmatique (figure 3 a, b, c, piste 3). La taille de l'ADN amplifié analysée sur gel d'agarose confirme la spécificité de ces résultats.

3) Coexpression de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par les éosinophiles du patient asthmatique. Détection par double RT-PCR *in situ* sur des cellules en tube.

Plusieurs travaux ont suggéré l'accumulation des cellules de type 2 dans différents organes cibles au cours de l'allergie, en réalisant des clones cellulaires et l'hybridation *in situ*. Même si la technique d'hybridation *in situ* permet d'associer une cytokine donnée à un type cellulaire, elle reste cependant limitée quant à la détection de cytokines faiblement exprimées. De ce fait, la double hybridation *in situ* est compromise par la limite de la sensibilité et la spécificité. Pour analyser la coexpression ou l'expression exclusive de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par les éosinophiles, nous avons mis au point la technique de double RT-PCR *in situ* avec des oligonucléotides marqués et spécifiques de chaque cytokine. Pour estimer le pourcentage de cellules qui coexpriment les cytokines considérées, nous avons amplifié le cDNA de l'EPO dans les mêmes conditions grâce à des oligonucléotides marqués à la biotine (résultats personnels). Les cellules ont été cytocentrifugées sur lames et visualisées sous un microscope optique après

révélation à la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline ou grâce à un anticorps anti-biotine couplé à la fluorescéine. Une spécificité et une sensibilité de 100% ont été obtenus lors de l'amplification de l'EPO et révélation avec les deux techniques précitées. La double RT-PCR *in situ* sur les éosinophiles de patient asthmatique suivie d'une révélation à la fluorescéine et la phycoérythrine montre que les éosinophiles qui coexpriment l'IL-4 (figure 4 a) et l'IL-5 (figure 4 b) sont plus fréquents (68%) que les éosinophiles qui expriment l'IL-4 (14%) ou l'IL-5 (18%) seulement. Des résultats similaires de coexpression (64%) ont été obtenus avec l'IL-5 (figure 4 c) et l'IL-10 (figure 4 d) ainsi que lors de l'amplification de l'IL-4 (figure 4 e) et l'IL-10 (figure 4 f) avec une fréquence de coexpression avoisinant les 54%.

En utilisant cette technique, nous avons observé la présence de l'ARNm de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 dans les mêmes cellules. Les éosinophiles sont impliqués dans les réactions allergiques et libèrent leurs médiateurs et particulièrement l'IL-5 après une stimulation appropriée. Une des questions importantes est de savoir si ces cytokines sont libérées par un mécanisme IgE-dépendant ou indépendant. Les travaux de Plaut et ses collaborateurs, ont montré que la stimulation IgE dépendante des mastocytes de souris résulte en une augmentation de l'ARNm pas seulement de l'IL-4 mais aussi de l'IL-3, de l'IL-5 et de l'IL-6. L'IL-4 n'est pas seulement un produit des cellules Th2, mais semble nécessaire par elle même pour la différenciation et le développement des cellules T CD4 et des CD8 vers un phénotype de type 2. Ainsi, probablement la coexpression de ces cytokines par les éosinophiles et les lymphocytes peut avoir un mécanisme de régulation commun.

Figure 1. Détection de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par immunomarquage à la phosphatase alcaline.
Les éosinophiles humains purifiés à partir du sang périphérique de patient asthmatique (**A**) ou d'un donneur sain (**B**), ont été cytocentrifugés sur lames et incubés en présence d'un sérum de chèvre dirigé contre l'IL-4 humaine (**a**), un sérum de chèvre normal servant de contrôle négatif (**b**), un sérum de lapin anti-IL-5 (**c**), un sérum de lapin sain (**d**), un anticorps monoclonal anti-IL-10 (**e**) ou un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* comme contrôle négatif (**f**). Après révélation à la phosphatase alcaline et utilisation de la new fuchsin comme substrat, les noyaux des cellules sont contre-colorés à l'hématoxyline.

Fig. 1A

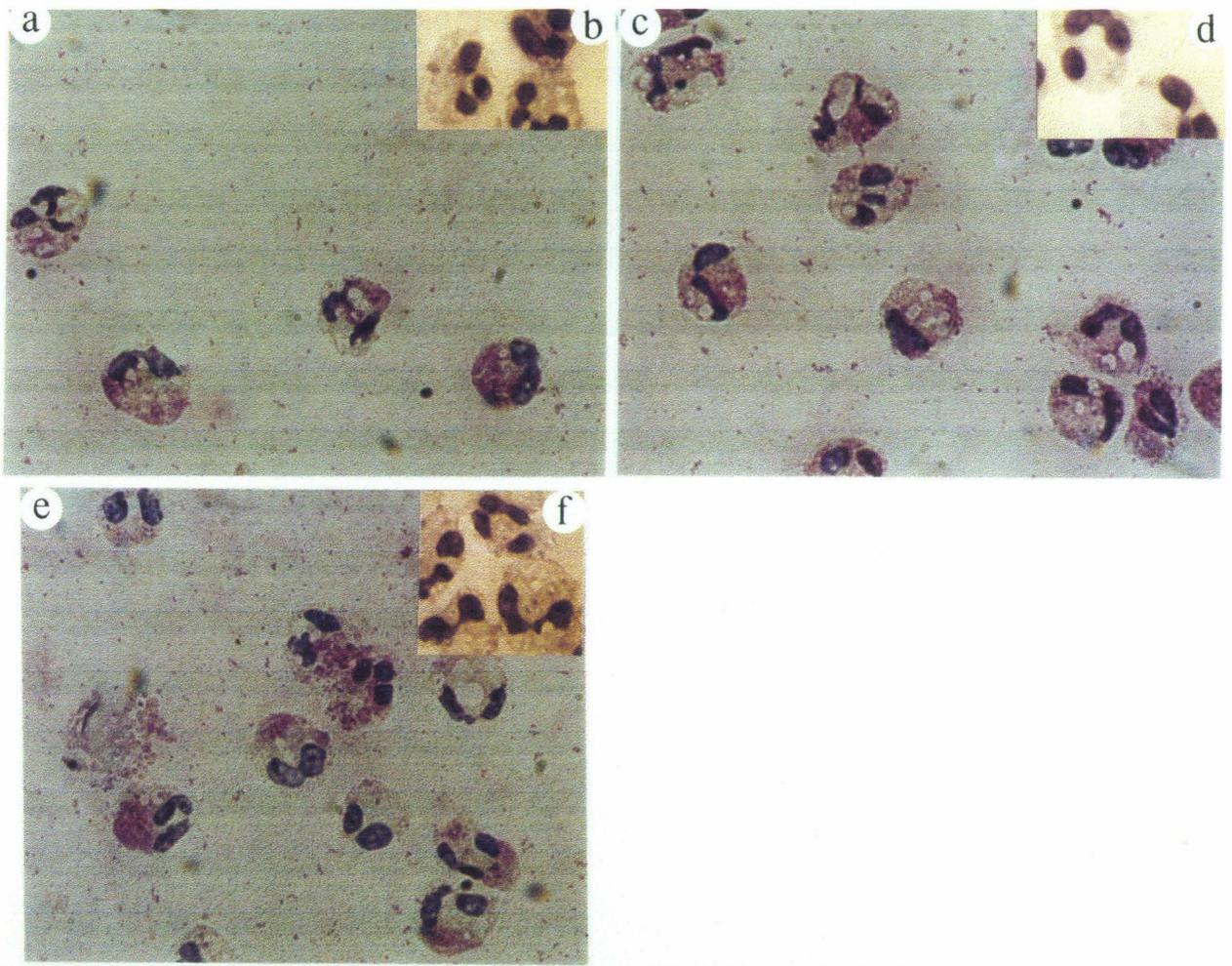


Fig. 1B

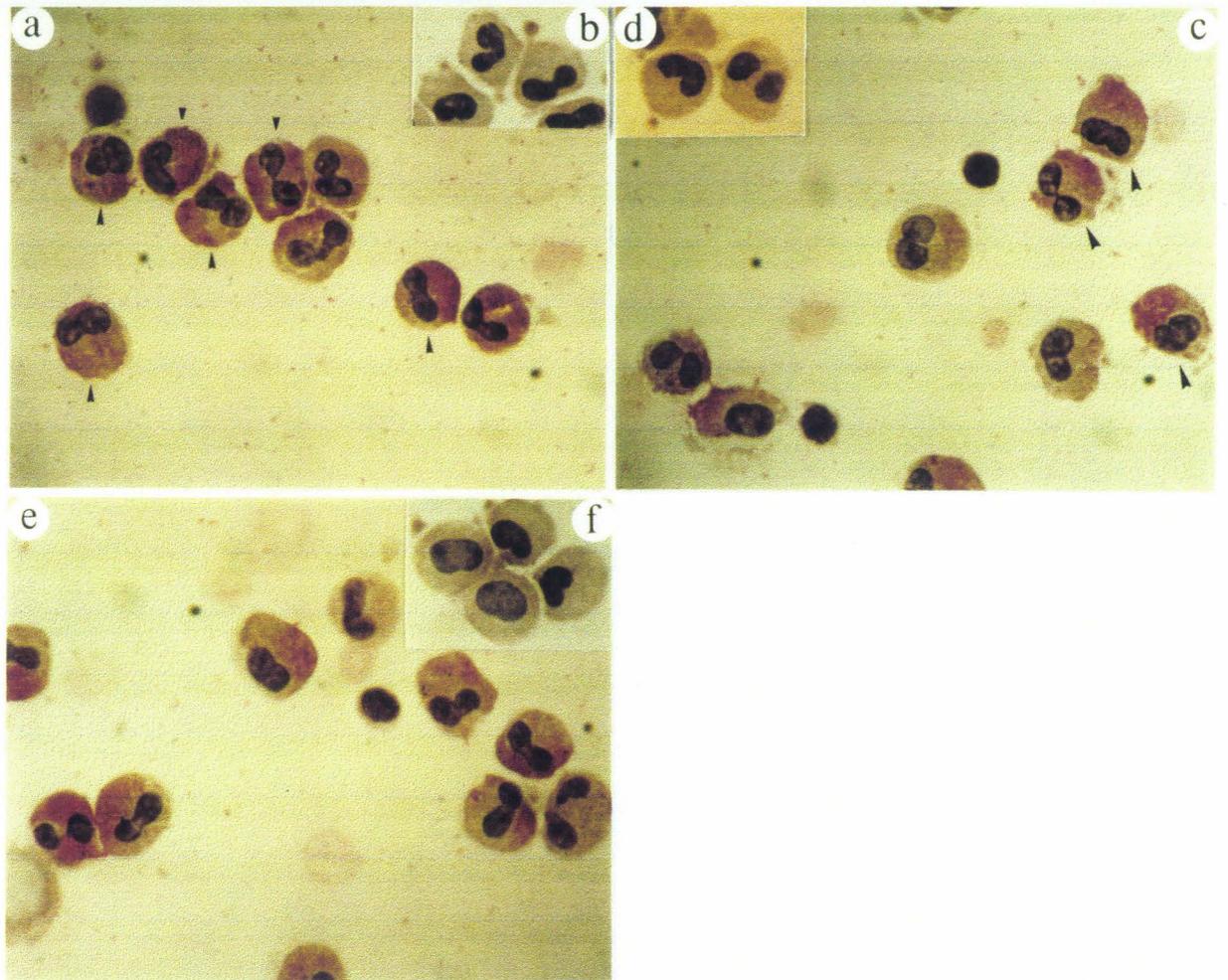


Figure 2. RT-PCR *in situ* réalisée sur des éosinophiles grâce à des oligonucléotides spécifiques pour l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 ou la peroxydase (EPO). Les éosinophiles purifiés à partir de sang périphérique d'un patient asthmatique (**A**) ou d'un donneur sain (**B**) ont été soumis à la PCR *in situ* en présence de digoxygénine -11 -dUTP. La révélation est effectuée soit par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline soit à la fluorescéine. EPO (**a**), IL-5 (**c**), IL-4 (**e**), IL-10 (**g**). Aucun signal n'est observé quand la transcriptase inverse est absente lors de la réaction d'amplification (**b**, **d**, **f** et **h**).

Fig. 2A

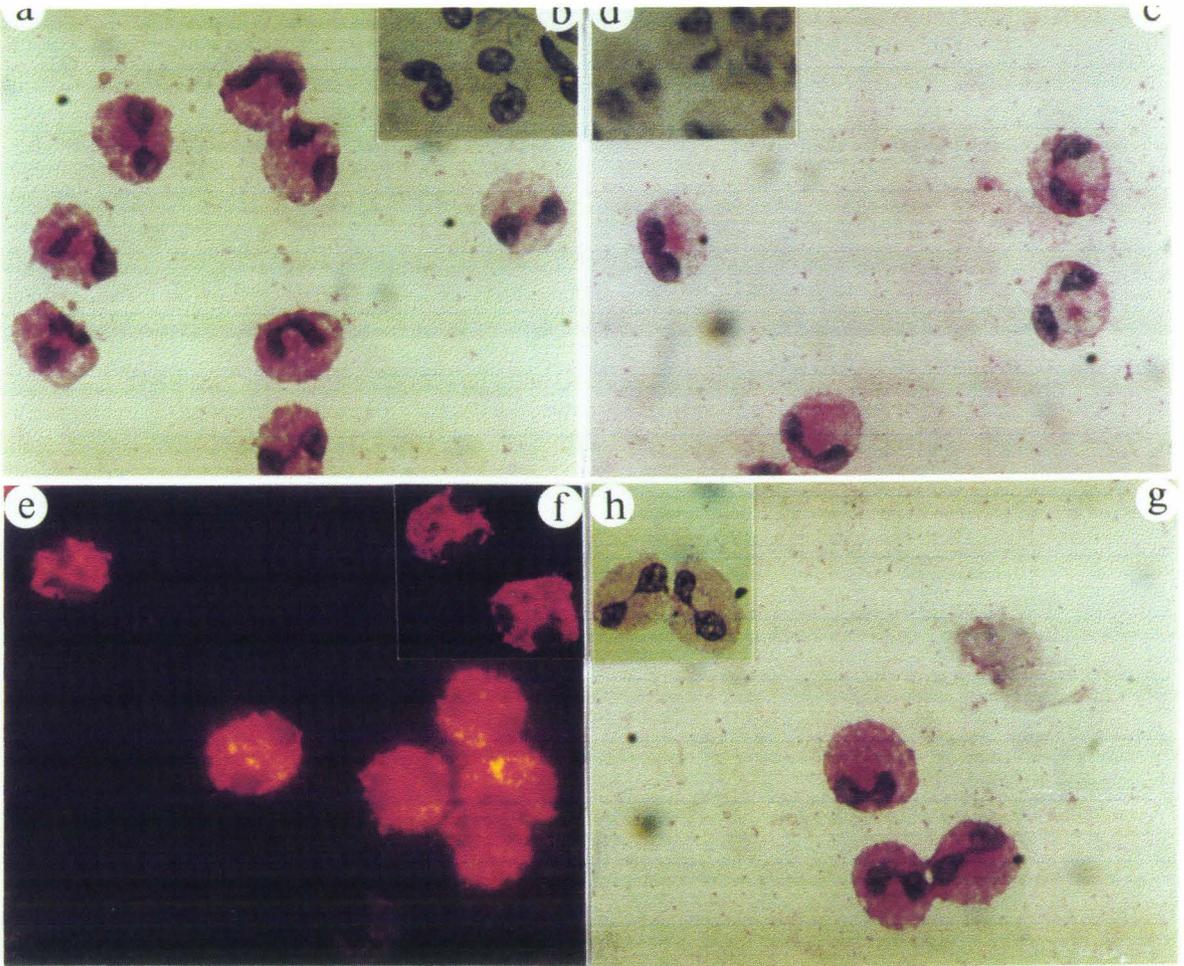
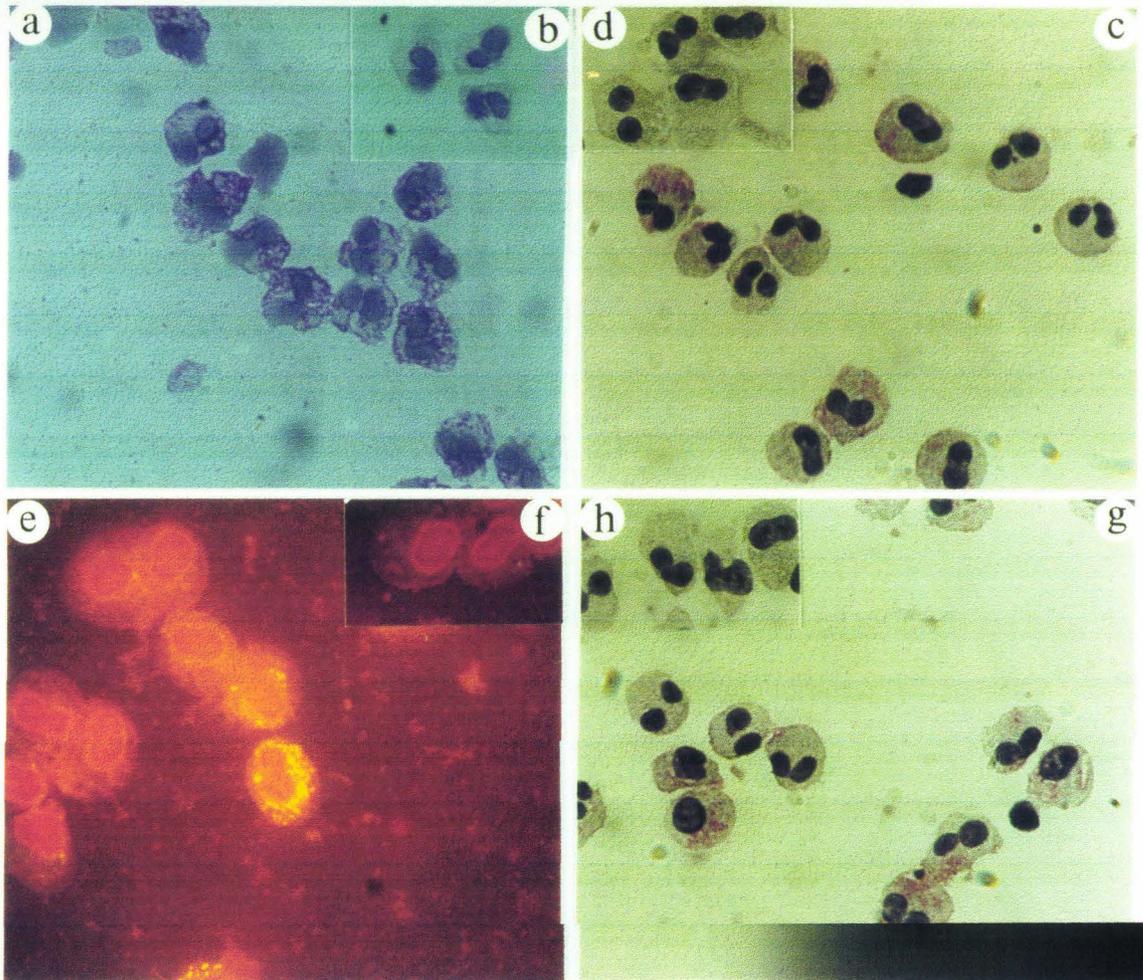


Fig. 2B



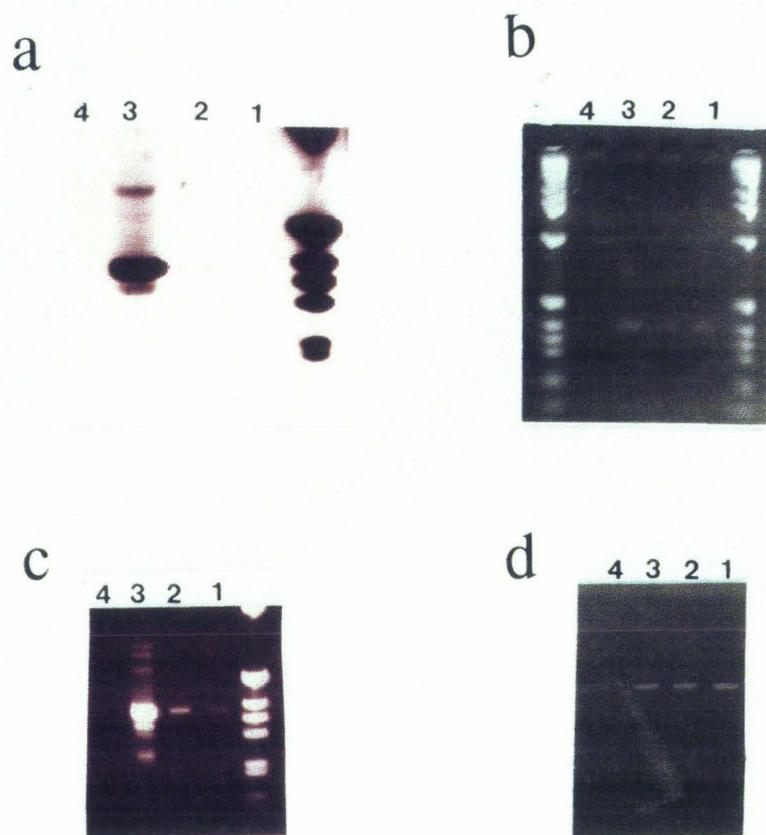


Figure 3. Analyse par RT-PCR de l'IL-4, L'IL-5, l'IL-10 et l'EPO à partir d'ARN d'éosinophiles purifiés ou de surnageants de RT-PCR *in situ*. EPO (a), IL-5 (b), IL-4 (c), IL-10 (d). La piste 1 correspond au surnageant recupéré après l'expérience de RT-PCR *in situ* , les pistes 2 et 3 aux ARN purifiés respectivement à partir d'éosinophiles de donneur sain ou de patient asthmatique.

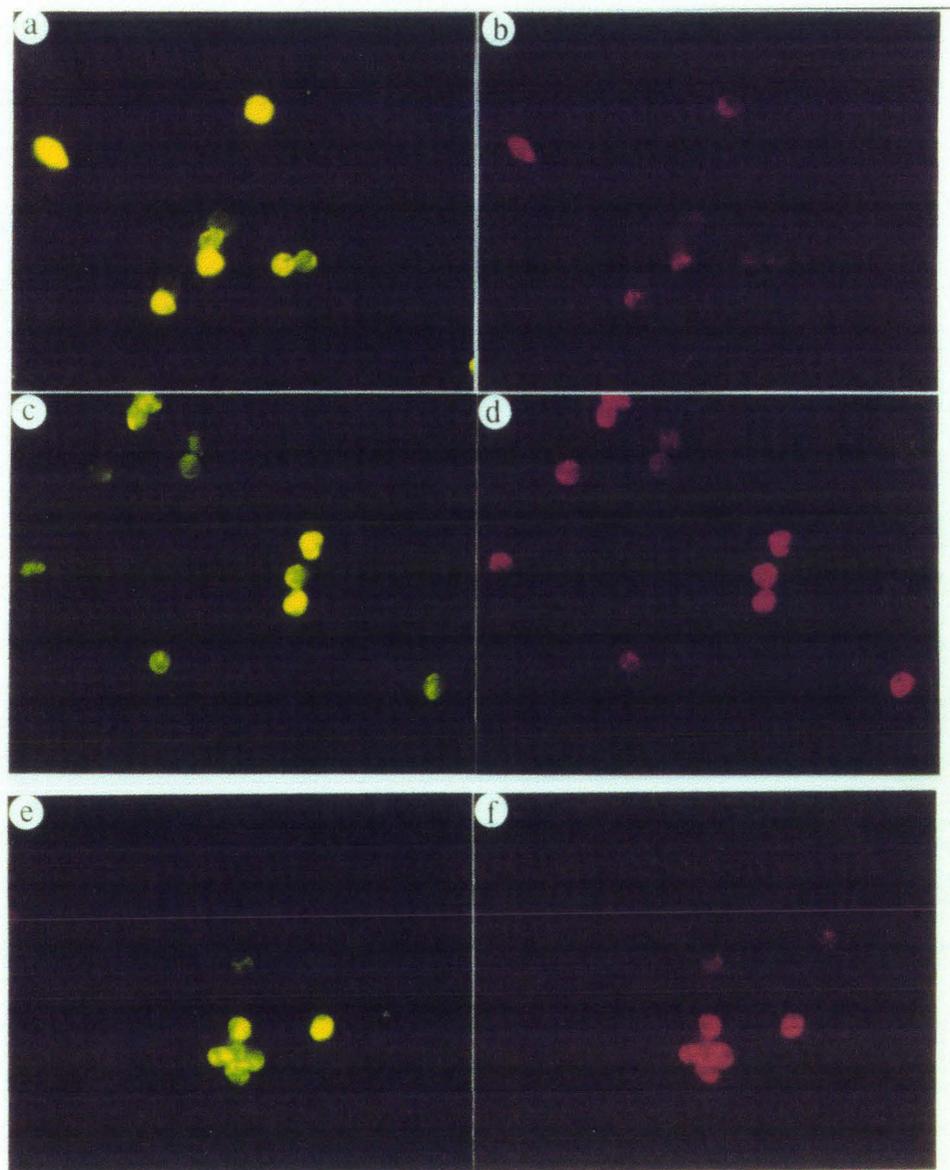


Figure 4. Double RT-PCR *in situ* sur des éosinophiles en tube avec des oligonucléotides spécifiques pour les interleukines IL-4, IL-5 et l'IL-10 pris deux à deux. Les éosinophiles de patient asthmatique en suspension dans un tube ont été soumis à la double RT-PCR *in situ* pour les interleukines IL-4 (a) et IL-5 (b), l'IL-5 (c) et l'IL-10 (d), l'IL-4 (e) et l'IL-10 (f). La révélation est effectuée à la fluorescéine et la phycoérythrine (voir méthode).

Discussion

L'asthme se caractérise localement par la présence de différentes populations cellulaires dont les mastocytes et les macrophages activés et par l'infiltration spécifique de la muqueuse respiratoire par les éosinophiles. La prédominance d'une réponse de type 2 médiée par les lymphocytes et les mastocytes se manifeste par une synthèse excessive d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, caractéristique de cette pathologie et explique l'infiltration sélective des éosinophiles. Par la production de leurs protéines toxiques, dont certaines potentialisent celles des mastocytes et des basophiles, les éosinophiles parviennent à stimuler la production de mucus, à endommager les tissus et à épaissir les parois des voies respiratoires et peut-être même à augmenter l'hyper-réactivité bronchique. L'intensité du syndrome obstructif a d'ailleurs été corrélée à l'éosinophilie. De plus, grâce à la production de cytokines, l'éosinophile pourrait participer à d'autres phases de la réaction inflammatoire au cours de l'asthme. La production d'IL-5 par les éosinophiles a été rapportée (Broide et al, 1992), et son expression excessive a été corrélée à la sévérité de la maladie. Le rôle de l'éosinophile dans l'asthme nous a conduit à évaluer la capacité de cette cellule à synthétiser différentes cytokines dans cette pathologie et à la comparer à celle des éosinophiles issus d'un donneur sain où le nombre d'éosinophiles est normal.

Nous avons considéré les cytokines dites de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) dont l'expression par l'éosinophile a été démontrée au cours de l'étude précédente. Les résultats d'immunomarquage montrent que les éosinophiles semblent exprimer les cytokines en question à la fois chez le patient asthmatique et le donneur sain. Bien que cette étude n'ait été effectuée que sur un seul patient, d'autres chercheurs ont observé une synthèse de l'IL-5 et de l'IL-4 au niveau des éosinophiles issus de lavage bronchoalvéolaire et tissulaires de patients asthmatiques. Nos résultats montrent, que le nombre de cellules exprimant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 est plus important chez le patient asthmatique que chez le donneur sain, ce qui suggère probablement une activation et libération de ces cytokines qui pourraient contribuer directement à l'inflammation, soit par synthèse de l'IgE (grâce à l'IL-4) soit à la différenciation et la dégranulation de l'éosinophile lui-même (grâce à l'IL-5). Le gène codant pour l'IL-4 est localisé sur le bras long du chromosome 5 en q23-31 à proximité des gènes codant pour l'IL-5, l'IL-3, le GM-CSF (5q23-31) et l'IL-13 (Van Leewen et al, 1989; McKenzie et al, 1993). Les structures tertiaires de l'IL-4 et l'IL-5 sécrétés semblent être similaires, et leurs fonctions biologiques indiquent un rôle

central dans l'inflammation éosinophilique. Ces deux cytokines sont transcrites ensemble dans les lymphocytes TH2 (Mossman et al, 1986) et en réponse à une sensibilisation par un allergène dans les tissus de patients atopiques (Durham et al, 1992; Kay et al, 1991; Bentley et al, 1993). Ces données suggèrent que les gènes codant pour l'IL-4 et l'IL-5 ont une origine d'évolution commune et que leur expression du moins en partie est sous un contrôle génomique commun. Même si ces gènes semblent être induits ensemble sous l'influence d'un même stimulus, des études récentes suggèrent qu'ils peuvent aussi être contrôlés séparément. En effet, les concentrations de l'IL-4 et de l'IL-5 augmentent dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire chez les patients présentant un asthme allergique par rapport aux sujets sains, cependant que seule l'IL-5 est affectée chez les patients asthmatiques non allergiques (Walker et al, 1992). Par ailleurs, les corticostéroïdes semblent inhiber l'expression de l'ARNm de l'IL-4 ainsi que la protéine correspondante dans la muqueuse nasale des patients présentant une rhinite allergique, par contre ils n'ont aucun effet sur l'expression de l'ARNm de l'IL-5 ni sur la protéine (Masuyama et al, 1994; Bradding et al, 1995). Nos résultats suggèrent que ces deux gènes semblent être sous le contrôle d'un mécanisme commun et spécifique.

Les propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires de l'IL-10 ont été liées essentiellement à ses effets sur les monocytes et les macrophages. Bien que des données très récentes suggèrent que l'IL-10 puisse agir directement sur les lymphocytes T, l'inhibition de la production de cytokines TH1 (en particulier de l'IFN γ) a surtout été observée dans des systèmes où l'activation lymphocytaire fait intervenir des monocytes ou des macrophages (Howard et al, 1992). Rappelons que les éosinophiles possèdent des capacités de phagocytose et expriment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II après activation, comme les cellules présentatrices d'antigène. Même si ses capacités de dégradation protéique sont modérées, l'éosinophile pourrait donc initier la réponse lymphocytaire spécifique d'antigène. Dans un second temps, l'activation des éosinophiles pourrait l'amener à la production de cytokines et peut-être même à l'orientation du profil des cytokines lymphocytaires (sous l'effet de l'IL-10 ou de l'IL-4). L'IL-10 agirait donc indirectement sur les lymphocytes T en interférant avec les signaux d'activation délivrés aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène, et l'inhibition des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à la surface de ces cellules pourrait être aussi un des mécanismes impliqués. Plusieurs autres fonctions des éosinophiles et des monocytes/macrophages sont inhibées par l'IL-10, notamment la synthèse de

cytokines et la production de radicaux libres oxygénés. Parmi les cytokines d'origine monocytaire/macrophage et éosinophile, certaines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'IL-1 sont d'importants médiateurs des réponses inflammatoires, alors que le TGF- β inhibe ces mêmes réactions et semble causer l'apoptose de l'éosinophile (Alam et al, 1994). Si l'IL-10 bloque puissamment les médiateurs proinflammatoires (Takanaski et al, 1994) en inhibant l'accumulation des ARNm du TNF α , de l'IL-1 α et de l'IL-2 β sans modifier la transcription des gènes, elle ne semble pas agir sur la production du TGF β et stimule même celle de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1ra) (Malefyt et al, 1992). Cette action post-transcriptionnelle de l'IL-10 nécessite une synthèse protéique et pourrait correspondre à l'induction d'une ribonucléase (Borgan et al, 1992). Grâce à la sécrétion de cette cytokine, l'éosinophile est donc susceptible de jouer aussi un rôle important dans le contrôle des réactions immunes et inflammatoires *in vivo* à travers la synthèse de l'IL-10 et aussi du TGF β (Wong et al, 1991).

La plupart des études réalisées sur la production des cytokines par les cellules se trouvent limitées par les techniques de détection faisant appel à des tests biologiques ou ELISA, qui mesurent l'intégralité des cytokines produites par l'ensemble des cellules considérées ainsi que par les cellules contaminantes plutôt que la contribution individuelle des cellules à cette synthèse. Quant aux techniques de Northern blot et d'hybridation *in situ* elles souffrent aussi d'une limitation de spécificité et de sensibilité, surtout lorsqu'il s'agit de cytokines dont l'expression est transitoire et faible. Au cours de notre travail, la production de l'ARNm des cytokines (IL-4, IL-5 et l'IL-10) a été effectuée par RT-PCR *in situ*. Cette technique permet l'amplification du messenger considéré et facilite donc sa détection lorsque les conditions de RT-PCR sont maîtrisées et que les contrôles de la spécificité de l'amplification par PCR sont sans ambiguïté. Pour cela, nous avons effectué d'une part l'étape de transcription inverse grâce à des oligonucléotides spécifiques de chaque cytokine, afin de sélectionner l'ARNm d'intérêt par rapport à une amorce d'oligo dT qui permet l'obtention des cDNA correspondant à la totalité des ARNm et par conséquent peut être une source d'amplification non spécifique. D'autre part, des expériences préliminaires ont été effectuées sur des éosinophiles hautement purifiés en amplifiant le cDNA qui correspond à la peroxydase. La peroxydase (ou EPO) est une protéine spécifique de l'éosinophile, sa détection par PCR *in situ* permet d'estimer la sensibilité de cette technique et aussi sa spécificité puisqu'aucun signal n'est visualisé sur des cellules copurifiées avec les éosinophiles (notamment les neutrophiles qui expriment la myéloperoxydase (MPO) qui a une

homologie importante avec l'EPO). Le choix de l'oligonucléotide pour la transcription inverse et ceux de la PCR est fait sur les régions 3' et 5' en dehors des zones d'homologie entre ces protéines et celles des autres protéines cationiques qui montrent aussi certaines homologies de séquences avec l'EPO. La spécificité de la RT-PCR *in situ* a été contrôlée par la réamplification des produits de PCR qui diffusent dans la cellule par les mêmes oligonucléotides et comparée à l'amplification réalisée sur l'ARNm purifié à partir des cellules du même sujet qui ont subi la RT-PCR *in situ*.

Nos résultats montrent une spécificité et une bonne sensibilité de cette méthode qui permet d'estimer le nombre des cellules positives pour telle ou telle cytokine. Les éosinophiles proviennent du sang périphérique de patient asthmatique ou de donneur sain, et reflètent sans doute une situation plus proche de la situation *in vivo* par rapport aux travaux menés sur des clones de lymphocytes T maintenus en culture par l'apport de l'IL-2 exogène qui pourrait modifier le profil des cytokines synthétisées *in vitro*.

La production des ARNm de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 confirment la synthèse par l'éosinophile lui-même, de ces cytokines détectées par immunomarquage. La fréquence des éosinophiles exprimant ces trois cytokines est plus importante chez le patient que le donneur normal et suggère un état d'activation commun pour ces cytokines dont le mécanisme est encore inconnu. La présence de l'IL-4 au niveau de l'éosinophile pourrait être sécrétée par une activation dépendante d'IgE comme pour les mastocytes (Gordon et al, 1990), mais une activation en dehors des mécanismes IgE-dépendants est aussi envisageable grâce à des enzymes protéolytiques. En effet, les protéases libérées par les parasites pourraient endommager l'éosinophile et causer une libération de ses cytokines ou induire l'expression de certaines cytokines. C'est ainsi que les Schistosomes libèrent des sérines protéases qui potentialisent la réponse IgE et sécrètent des molécules semblables à l'hormone adrénocorticotropique qui régule la production de l'IFN γ (Verwaerde et al, 1994; Duvaux-Miret et al, 1992). D'autres travaux ont montré aussi que les infections par *Heligmosoides polygyrus*, induisent chez la souris une production de cytokines orientée vers un profil de type TH2, initiée par une réponse indépendante des cellules T, mais qui se termine par une réponse dépendante de ces cellules (Svetic et al, 1993).

Pour explorer la coexpression de ces différentes cytokines par l'éosinophile, nous avons mis au point une technique de double RT-PCR *in situ*. Une première approche par double

immunomarquage (voir résultat II) nous a permis de distinguer deux sous - populations d'éosinophiles où l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 semblent être exprimés par les éosinophiles de type 2 et l'IFN γ par les éosinophiles de type 1. La méthode de double PCR *in situ* en suspension ouvre un champ d'investigation très important pour la détermination des différents profils de cytokines sans passer par le clonage des lymphocytes par exemple. La détection peut être aisée par cytofluorométrie en flux qui peut renseigner directement sur l'aspect quantitatif. La sensibilité est améliorée par l'emploi de fluorochromes à fort rendement quantique, ou en augmentant le nombre de molécules de biotine et de digoxygénine incorporées dans l'oligonucléotide. Mais, il faut signaler que dans certains cas (amorces d'IL-5 et d'IL-10 marquées à la digoxygénine et à la biotine respectivement), la précipitation des fluorochromes non couplés aux anticorps dirigés contre la digoxygénine ou la biotine peut induire un bruit de fond non spécifique (Wessendorf et al, 1992). Pour améliorer la spécificité de cette méthode, des oligonucléotides marqués directement aux fluorochromes sont préférables. Bien qu'on ait obtenu les mêmes résultats avec des révélations à la phosphatase alcaline, il était difficile de les immortaliser sur des photos à partir du microscope. D'autres conditions d'amplification pourraient améliorer ces résultats comme l'emploi de mélange d'amorces ou l'augmentation du nombre de cycles, l'addition de la Taq polymérase après la première dénaturation. Les méthodes d'analyse histologique ont également leur importance dans la détection des différents messagers et l'identification des cellules concernées. L'emploi de cette méthode grâce à des oligonucléotides d'une molécule spécifique (EPO de l'éosinophile par exemple) et des oligonucléotides spécifiques pour une cytokine donnée peut répondre à cette demande. Enfin, l'identification lors d'un cancer de la cellule souche hématopoïétique concernée ainsi que la proportion de cellules infectées par des virus peuvent être envisageables par cette technique.

En conclusion, les progrès récents réalisés en biologie moléculaire et l'application des méthodes de PCR *in situ* à la cytologie ou à l'histologie rendent la détection des acides nucléiques (ARN ou ADN) à l'échelle cellulaire particulièrement fiable. Le seuil de détection constitue un facteur limitant pour la microscopie standard, mais il peut être considérablement réduit avec la microscopie confocale. L'emploi de la microscopie confocale représente sans doute une bonne alternative à celui de la microscopie standard pour la détection de faibles copies d'acides nucléiques.

Ces résultats ouvrent de nouvelles voies pour le diagnostic cytologique ou histopathologique, ainsi que pour l'étude de certains gènes peu représentés.

RESULTAT IV.

**EXPRESSION DE L'IFN γ PAR LES EOSINOPHILES DANS
LE MODELE DE LA PEMPHIGOIDE BULLEUSE.
ASSOCIATION AVEC LES GRANULES.**

RESULTAT IV.

EXPRESSION DE L'IFN γ PAR LES EOSINOPHILES DANS LE MODELE DE LA PEMPHIGOÏDE BULLEUSE. ASSOCIATION AVEC LES GRANULES.

De nombreuses observations ont suggéré la participation des éosinophiles dans la constitution des lésions de la pemphigoïde bulleuse. Les observations ultrastructurales ont permis de montrer l'activation et la dégranulation des éosinophiles au niveau des lésions (Iryo et al, 1992). La présence des protéines cationiques (EPO, ECP, EDN et MBP) connues par leur cytotoxicité a été démontrée dans les tissus péri-lésionnels (Maynard et al, 1990; Dubertret et al, 1980). D'autres travaux ont démontré aussi une augmentation de la proportion des éosinophiles circulants activés (hypodenses) (Tsuda et al, 1992) ainsi qu'une production de protéases par les éosinophiles tissulaires pouvant dégrader les structures d'adhésion dermo-épidermique (Stahle-Backdahl et al, 1994). Les mécanismes physiopathologiques à l'origine des lésions de pemphigoïde bulleuse sont encore inconnus, tant au niveau initial de l'inflammation qu'au niveau tardif de la formation de la bulle. Deux théories non mutuellement exclusives ont été avancées pour expliquer l'afflux des éosinophiles qui constituent le type cellulaire prédominant dans l'infiltrat inflammatoire lésionnel. La théorie humorale suppose une interaction auto-antigène/auto-anticorps à l'origine d'une activation du complément, ainsi qu'une activation et dégranulation des mastocytes qui libèrent entre autres des facteurs chimiotactiques pour l'éosinophile. La théorie cellulaire fait intervenir une activation des lymphocytes T spécifiques de l'auto-antigène, avec production de cytokines, notamment d'IL-4 et d'IL-5, aboutissant au recrutement des cellules inflammatoires et plus particulièrement les éosinophiles (Nicolas et al, 1993). Les recherches récentes se sont attachées à apprécier la place de l'immunité cellulaire dans la pathogénie de la maladie. Les lymphocytes T CD4+ de phénotype mémoire activés (CD25+, CD45RO+, HLADR+) représentent un contingent notable des cellules de l'infiltrat inflammatoire et sont retrouvés précocement dans les lésions prébulleuses en contact avec la jonction dermo-épidermique (Michalaki et al, 1991). Une utilisation préférentielle de certains segments codant pour les régions variables du récepteur T a été démontrée lors de l'étude du répertoire du récepteur T *in situ* au niveau de la peau lésionnelle (Michalaki et al, 1992; Nicolas et al, 1991).

Ces résultats, s'ils suggèrent un rôle potentiel des lymphocytes T dans le processus de l'inflammation pathogène, méritent d'être confirmés par la démonstration de l'existence de lymphocytes T spécifiques des constituants des hémidesmosomes (BP Ag) chez les patients. Les travaux menés au laboratoire, ont démontré une activation IgE-dépendante des éosinophiles et qui semble être impliquée dans la constitution des lésions au cours de cette maladie auto-immune (Dubost-Brama et al, manuscrit en rédaction) . En effet, des auto-anticorps de classe IgE dirigés contre des auto-antigènes de 230 kDa ont été détectés dans le sérum de 12 patients. Les éosinophiles semblent capables *in vitro* , en réponse à ces auto-antigènes, de libérer des médiateurs cytotoxiques comme l'EPO, classiquement induits par la voie d'activation IgE. Le rôle pathogène des éosinophiles dans la formation des lésions se trouve donc fortement consolidé.

Cependant, beaucoup d'inconnues persistent sur la place des cytokines et particulièrement celles synthétisées par l'éosinophile dans cette pathologie.

Le but de notre travail a donc été d'étudier la synthèse locale de l'IFN γ par les éosinophiles au niveau de la peau des patients présentant une pemphigoïde bulleuse, ainsi qu'au niveau des éosinophiles de sang périphérique de ces mêmes patients. (1) une première approche a été effectuée grâce à l'immunomarquage à la phosphatase alcaline; (2) la localisation de l'ARNm a été entreprise soit sur l'ARN purifié des éosinophiles périphériques, soit au niveau des cellules elles mêmes de sang périphérique et tissulaires par RT-PCR *in situ*.

Connaissant la localisation de la plupart des cytokines au niveau granulaire des éosinophiles (Moqbel et al, 1994), le deuxième but de notre travail était la recherche grâce à la microscopie électronique de cette cytokine au niveau cytoplasmique et sa localisation subcellulaire.

1) Immunolocalisation intracellulaire de l'IFN γ et de l'IL-5 dans des éosinophiles de sang périphérique et tissulaires de patient présentant une pemphigoïde bulleuse.

Plusieurs travaux ont démontré la présence de l'IFN γ dans la pemphigoïde bulleuse à la fois au niveau tissulaire et dans les liquides de bulles. Cette synthèse a été associée à l'infiltrat lymphocytaire. La présence de l'IFN γ au niveau des éosinophiles a été étudiée par immunomarquage à la phosphatase alcaline (figure 1). un marquage positif a été obtenu sur des éosinophiles de sang périphérique (figure 1 A) et des éosinophiles tissulaires au niveau de la bulle (figure 1 E) incubés avec un antisérum de lapin anti-IFN γ , alors qu'aucun marquage n'est obtenu avec un serum de lapin normal (figure 1 B). De même, un signal positif est obtenu avec un antiserum de lapin anti-IL-5 sur des éosinophiles de sang périphérique (figure 1 C), par rapport au contrôle isotypique (figure 1 D). L'immunomarquage réalisé avec un antisérum de lapin anti-EPO permet d'identifier les éosinophiles présents dans la bulle (figure 1 F).

2) Analyse par RT-PCR de l'IL-5 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou des lymphocytes.

Les expériences réalisées ci-dessus, suggèrent que les éosinophiles de patients atteints de pemphigoïde bulleuse puissent exprimer les cytokines IFN γ et IL-5 au niveau protéique. Nous avons cherché par la suite l'expression de ces deux cytokines au niveau moléculaire par RT-PCR sur de l'ARN d'éosinophiles périphériques de deux patients et purifiés à 100%. Lors de l'amplification par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de l'IFN γ (figure 2 A) on observe les bandes d'ADN de tailles attendues pour cette cytokine et similaires à celles obtenues avec les lymphocytes ou les éosinophiles provenant de patient HES pris comme témoins positifs. Une expérience de RT-PCR réalisée dans les mêmes conditions et en absence de cDNA ne donne aucun signal et témoigne de l'absence de toute contamination. De même les éosinophiles de sang périphérique de patient présentant la pemphigoïde bulleuse expriment l'ARNm pour l'IL-5 (figure 2 B). L'expression de ces deux cytokines de type 1 et de type 2 par l'éosinophile suggère une hétérogénéité de l'éosinophile.

3) Expression de l'ARNm de l'IFN γ par les éosinophiles de patients présentant une pemphigoïde bulleuse, détectée par RT-PCR *in situ* .

Par la technique de RT-PCR *in situ* et révélation de la digoxygénine incorporée dans l'ADN amplifié, par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la fluorescéine, on obtient un marquage (figure 3 A) indiquant que les éosinophiles synthétisent l'ARNm codant pour l'IFN γ . La même expérience réalisée en absence de transcriptase inverse ne donne aucun signal (figure 3 B), confirmant que la RT-PCR *in situ* permet la détection de l'ARNm et non l'ADN génomique. L'amplification par RT-PCR du cDNA de l'IFN γ au niveau des éosinophiles tissulaires est révélée par la phosphatase alcaline et la New Fuchsin qui donne une coloration rouge. On reconnaît sur la coupe histologique des cellules à noyau bilobé exprimant l'ARNm pour l'IFN γ au niveau de la bulle (figure 3 C).

4) Association de l'IFN γ avec les granules de l'éosinophile.

Plusieurs travaux ont rapporté l'association des interleukines synthétisées par les éosinophiles avec les granules de ceux-ci et notamment l'IL-5. Nous avons donc cherché à savoir si l'IFN γ est présent au niveau des granules des éosinophiles de sang périphérique de patient présentant une pemphigoïde bulleuse. La figure 4 illustre un marquage positif avec un antisérum de lapin anti-IFN γ (figure 4 A) reconnu par son cristal de Charcot-Leyden et ses granules. L'examen des coupes à plus fort grossissement montre la localisation de cette cytokine au niveau des granules de l'éosinophile (figure 4 B). L'examen par microscope électronique de l'immunomarquage des éosinophiles avec un antisérum de lapin anti-IL-5, montre la présence de cette cytokine au niveau granulaire comme il a été démontré au laboratoire (figure 4 C).

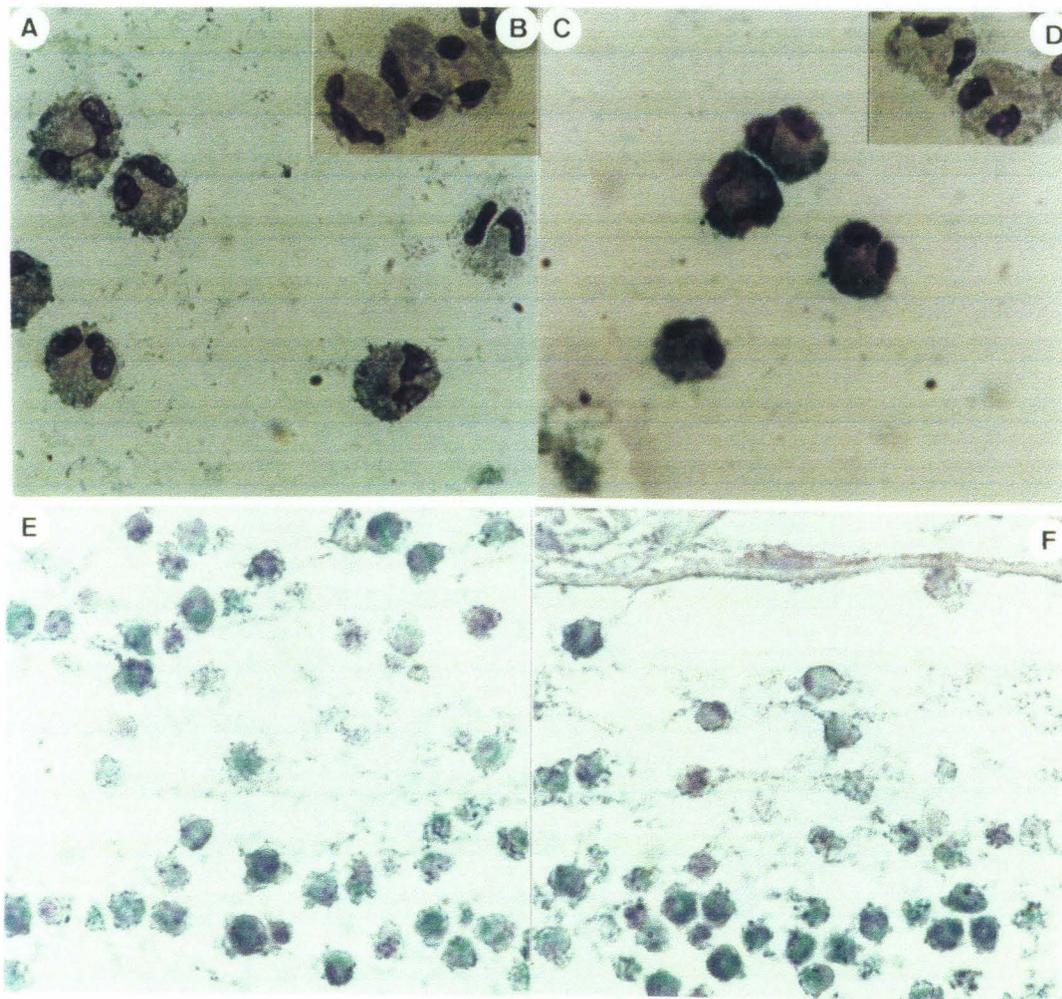


Figure 1. Détection de l'IL-5 et de l'IFN γ par immunomarquage à la phosphatase alcaline dans les éosinophiles périphériques et tissulaires dans le modèle de la pemphigoïde bulleuse. Les éosinophiles purifiés à partir de sang périphérique (A-D) et les coupes tissulaires de patient présentant une pemphigoïde bulleuse (E-F) ont été soumis à l'immunomarquage en présence d'un anticorps monoclonal anti-IFN γ (A, E), d'un antisérum de lapin anti-IL-5 (C), d'un antisérum de lapin anti-EPO (F) utilisé comme contrôle positif, ou du sérum de lapin sain utilisé comme contrôle (B, D). Les cellules positives sont marquées par des flèches.

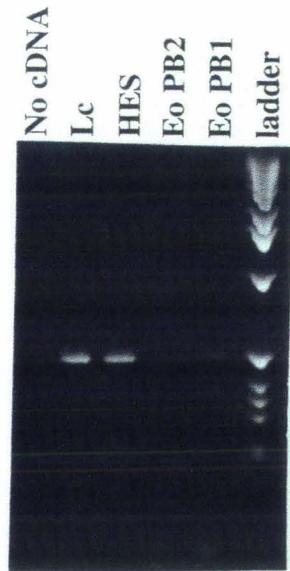
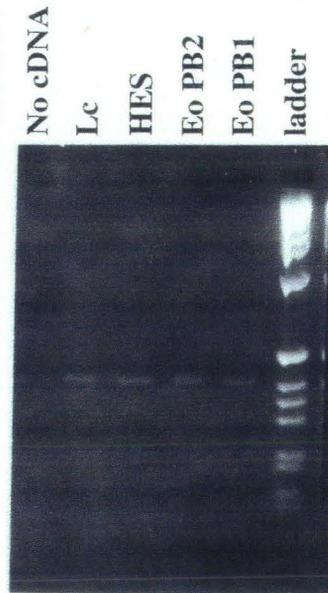
A**B**

Figure 2. Analyse par RT-PCR de l'IL-5 et de l'IFN γ à partir d'ARN d'éosinophiles hautement purifiés ou de lymphocytes. Après une étape de transcription inverse, une amplification a été effectuée avec des oligonucléotides spécifiques pour chaque interleukine et visualisée sur gel d'agarose. L'ARN purifié à partir de plusieurs patients a été utilisé pour l'amplification de l'IFN γ (A) et de l'IL-5 (B). Les pistes 1 et 2 correspondent à l'ARN purifié à partir des éosinophiles circulant de patients présentant la pemphigoïde bulleuse. La piste 3 correspond à l'ARN d'éosinophiles de patient ayant un HES. La piste 4 correspond à des lymphocytes utilisés comme contrôle positif et la piste 5 au contrôle négatif (sans cDNA). La piste "Ladder" correspond aux marqueurs de taille (Gibco-BRL).

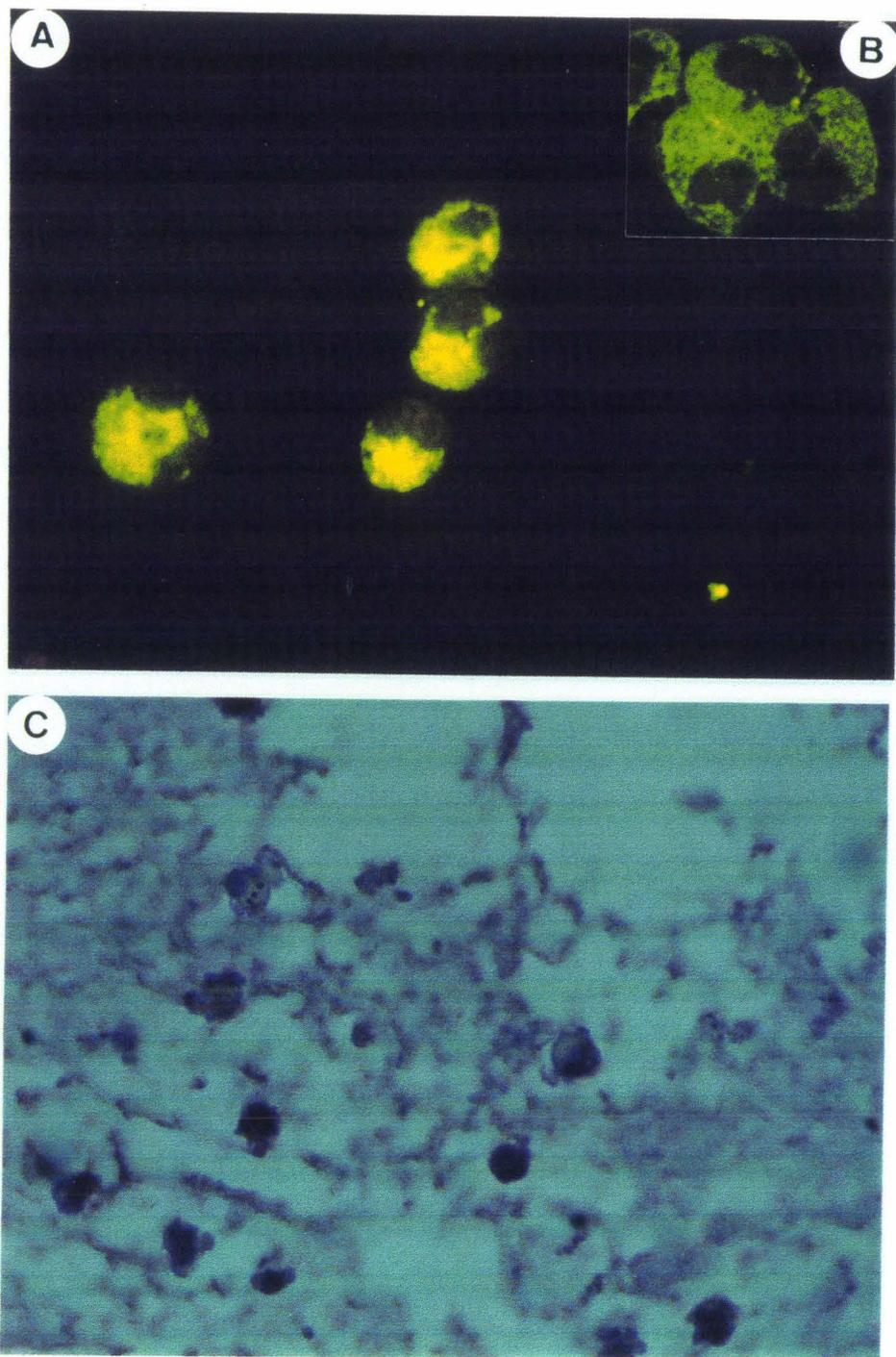


Figure 3. RT-PCR *in situ* sur des éosinophiles avec des oligonucléotides spécifiques pour l'IFN γ . Les éosinophiles purifiés à partir de sang périphérique (A, B) et les coupes tissulaires d'un patient présentant la pemphigoïde bulleuse (C) ont été soumis à la PCR *in situ* en présence de digoxygénine -11 -dUTP. La révélation est effectuée soit par un anticorps anti-digoxygénine couplé soit à la fluorescéine (A et B), soit à la phosphatase alcaline (C). Les planches A et C correspondent à l'amplification de l'IFN γ . Aucun signal n'est observé quand la transcriptase inverse est absente lors de la réaction d'amplification (B).

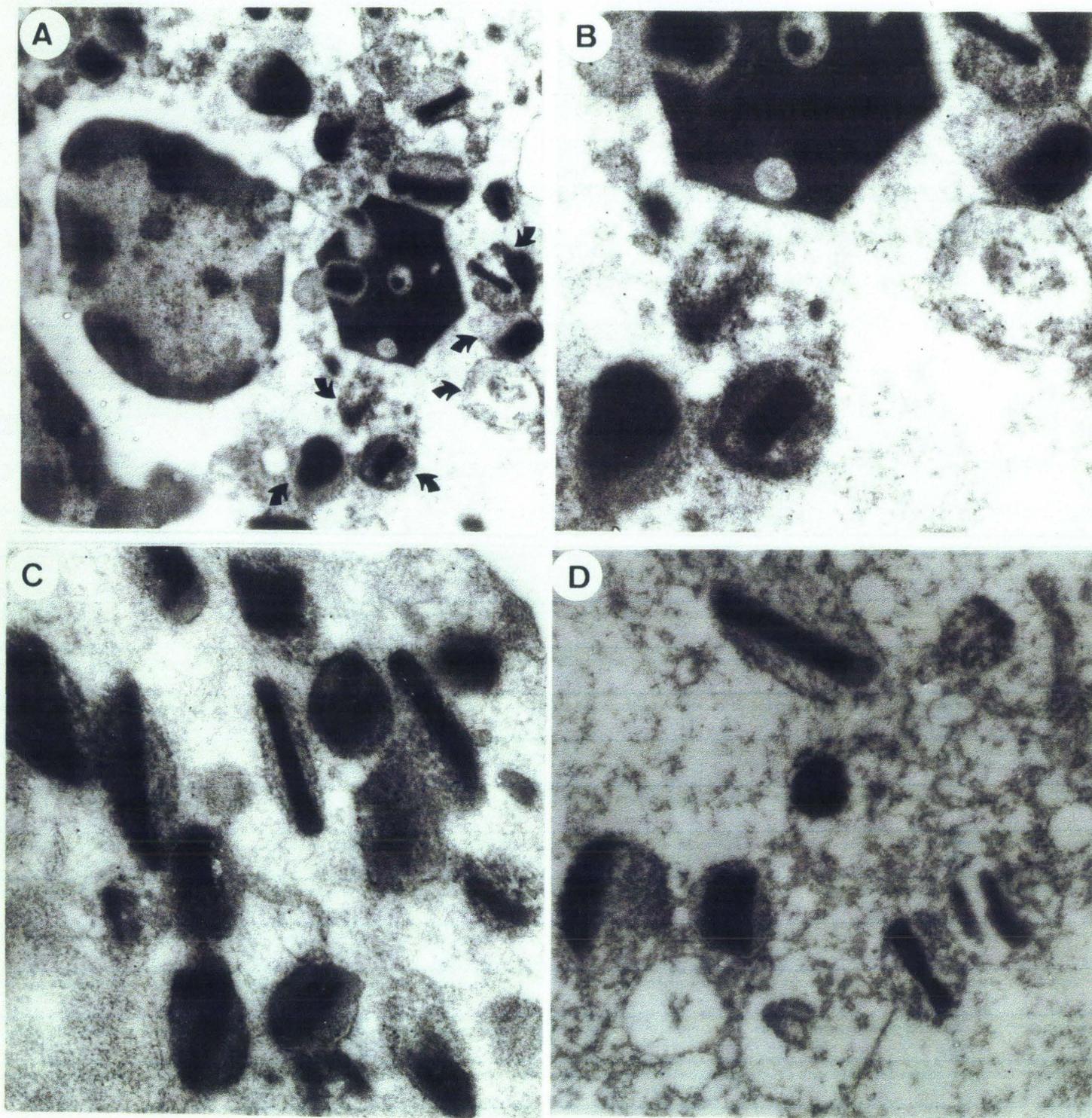


Figure 4. Microscopie électronique réalisée sur des coupes fines des éosinophiles de sang périphérique de patient présentant une pemphigoïde bulleuse. On reconnaît les éosinophiles par le cristal de Charcot Leyden et les granules ayant un core central dense aux électrons. Les coupes sont incubées avec un antisérum de lapin anti-IFN γ (A), un antisérum de lapin anti-IL-5 (C), ou la protéine A couplée à l'or colloïdal seulement (D). La planche B correspond à un agrandissement de A pour mieux visualiser les granules.

Discussion

Maladie auto-immune spécifique d'organe, la pemphigoïde est un modèle intéressant par plusieurs aspects. (1) La possibilité de disposer de biopsies de peau, rend facilement accessible à des études paracliniques. Les liquides de bulle, qui résultent de la destruction de la jonction dermo-épidermique, permet notamment l'étude des mécanismes en jeu localement. (2) L'implication préférentielle des éosinophiles dans la physiopathogénie des lésions, en fait un bon modèle d'étude de leur rôle *in vivo*, encore mal connu dans la pathologie auto-immune. Des études récemment réalisées au laboratoire avaient décrit la présence de l'ARNm codant pour l'IL-5 au niveau des éosinophiles tissulaires ainsi que la protéine correspondante (Delaporte, manuscrit en préparation). D'autre part, les mécanismes IgE-dépendants semblent intervenir dans la physiopathologie de cette maladie auto-immune. Les IgE membranaires ont été détectées au niveau des mastocytes (Nieboer et al, 1980) ainsi que des éosinophiles tissulaires (Dubost-Brahma et al, 1994) et pourrait jouer un rôle dans leur activation aboutissant à la libération des protéines toxiques mais aussi à des cytokines. D'autres travaux ont concerné plutôt l'étude de l'activation des lymphocytes T de l'infiltrat inflammatoire lésionnel, et ont rapporté une synthèse d'IFN γ (Kaneko et al, 1992) ainsi que de l'IL-2 par ces cellules (Schaller et al, 1990). Cependant, la contribution des cytokines dans la formation de la bulle et leur profil exact reste encore obscur. Notre travail a consisté à étudier la synthèse de l'IFN γ par des éosinophiles impliqués dans cette pathologie avant et après traitement aux corticostéroïdes.

Dans notre étude, plusieurs arguments permettent de penser que les cellules positives sont des éosinophiles. (1) L'importance de l'infiltrat à éosinophile (plus de 80%) dans la peau lésée, appréciée par l'analyse histologique après coloration par le May Grünwald Giemsa ou immunohistochimie après marquage des cellules par un anticorps anti-péroxydase de l'éosinophile. (2) L'existence des cellules à noyau bilobé produisant l'ARNm de l'IFN γ détecté par RT-PCR *in situ*. Cette méthode permet la mise en évidence de l'ARNm au niveau cytoplasmique sans difficulté de distinguer la nature des cellules marquées par rapport à l'hybridation *in situ* aux sondes radioactives où les grains d'argent peuvent masquer les cellules. Dans notre expérience, la nature bilobé des noyaux suggère que les cellules marquées sont des éosinophiles. (3) La capacité de l'éosinophile à synthétiser l'ARNm codant pour l'IFN γ a été confirmée par l'analyse en RT-PCR *in situ* directement sur les éosinophiles périphériques de ces

mêmes patients et déjà signalée dans les résultats précédents. L'analyse par RT-PCR sur l'ARN purifié des éosinophiles de ces patients démontrent la synthèse de l'IFN γ au niveau périphérique par les éosinophiles.

Il est intéressant de noter que dans tous les cas, les éosinophiles tissulaires ou périphériques exprimant l'ARNm codant pour l'IFN γ sont activés. Les études ultérieures réalisées par microscopie électronique (Miyasato et al, 1989) ont objectivé l'activation des éosinophiles dans l'infiltrat inflammatoire lésionel au niveau de la peau des patients présentant une pemphigoïde bulleuse. D'autres études, réalisées sur la muqueuse de patients présentant la maladie coeliaque, ont montré une activation des éosinophiles synthétisant l'IL-5 (Desreumaux et al, 1992). Des expériences de double immunomarquage grâce à des anticorps dirigés contre l'IFN γ et des anticorps (EG2) dirigés contre l'ECP seront nécessaires pour savoir s'il y a une corrélation entre l'expression de l'IFN γ et l'état d'activation des éosinophiles.

Au cours de nos travaux on a remarqué une expression de l'IFN γ par un nombre d'éosinophiles plus important chez les patients traités aux corticoïdes par rapport au nombre d'éosinophiles du même patient avant ce traitement. Le dosage par la technique d'ELISA de l'IFN γ dans le sérum de ces patients ou dans les liquides de bulles confirme ces résultats. Des études sont en cours pour déterminer le nombre de cellules exprimant l'IL-5 chez ces mêmes patients avant et après traitement pour savoir s'il y a corrélation ou pas entre l'expression de ces cytokines et l'avancement du stade de la maladie. La mise en jeu de récepteurs de membrane pour les IgE au niveau de l'infiltrat inflammatoire lésionel au niveau de la peau des patients présentant une pemphigoïde bulleuse (Dubost-Brama, 1994) et des processus d'activation cellulaire par le PAF acéther ou par la boucle autocrine de cytokines, telle que l'IL-5 pourrait favoriser un état de stimulation cellulaire défavorable pour les patients atteints de cette maladie. Les corticoïdes ont par contre un rôle régulateur sur les éosinophiles. Il a été mis en évidence chez les patients présentant une dermatite atopique, où l'éosinophile est impliqué, un rôle bénéfique des corticoïdes qui augmentent l'expression de l'IFN γ et diminuent celle de l'IL-4 et l'IL-5. Le traitement de ces patients par l'IFN γ permet aussi une amélioration de leur état de santé (Hanifin et al, 1993).

Connaissant la capacité des éosinophiles à synthétiser une multitude de cytokines, il serait

intéressant d'étendre les recherches des cytokines exprimées par cette cellule à l'IL-4 et l'IL-10 et voir leur profil de synthèse avant et après traitement afin que des implications thérapeutiques puissent trouver le jour.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

En un siècle, l'éosinophile est passé du statut du phagocyte mal caractérisé à celui de cellule à part entière dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Par sa localisation à dominante tissulaire, l'éosinophile exerce une dualité fonctionnelle en participant à la réaction inflammatoire ainsi qu'à la protection de l'organisme contre les éléments pathogènes. S'il n'est pas aisé d'établir une hiérarchie dans la cascade des interactions cellulaires et celle de leurs médiateurs libérés qui accompagnent les phénomènes inflammatoires locaux, il apparaît néanmoins que l'éosinophile puisse jouer un rôle très important dans ces réactions. Les fonctions effectrices du polynucléaire éosinophile ont été identifiées grâce aux modèles de cytotoxicité antiparasitaire *in vitro*, en particulier le mécanisme d'ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) vis-à-vis des larves de schistosomes. Dans le contexte de ces interactions éosinophiles - anticorps, il n'est pas surprenant que les récepteurs pour le Fc des immunoglobulines aient bénéficié de nombreuses études. Outre le récepteur pour le Fc des IgG qui fut le premier caractérisé et maintenant identifié comme Fc γ RII (CD32), les éosinophiles possèdent plusieurs types de récepteurs pour les IgE (Fc ϵ RII/CD23, Fc ϵ RI et galectine 3). L'existence d'un récepteur pour le Fc des IgA a été également démontrée. L'interaction des différentes immunoglobulines avec leurs récepteurs respectifs à la surface de l'éosinophile déclenche leur activation, responsable de la décharge des médiateurs préformés (protéines cationiques) et stockés dans les granules cytoplasmiques, de la sécrétion de médiateurs néoformés ainsi que de la libération des cytokines. Des études ont également montré que l'adressage des éosinophiles vers les tissus est régi par de nombreux facteurs de communication cellulaire (molécules d'adhérence et cytokines). Ces composants moléculaires (récepteurs, molécules d'adhésion, protéines cationiques et cytokines) confèrent à l'éosinophile un rôle effecteur et immunorégulateur important qui le place au coeur et non comme un spectateur passif de la réaction immunitaire.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont abouti :

- à la démonstration de l'existence d'un nouveau récepteur pour le composant sécrétoire de l'IgA sur les éosinophiles.

- à la mise en évidence de sous - populations d'éosinophiles capables de synthétiser soit une cytokine de type 1, l'IFN γ , soit des cytokines de type 2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10.

Nos travaux ont tout d'abord contribué à la mise en évidence d'un nouveau récepteur pour les IgA sécrétoires (récepteur du composant sécrétoire) ainsi qu'à la caractérisation moléculaire du récepteur pour le Fc des IgA (Fc α R). Au cours de cette étude, nous avons étudié les processus d'activation des éosinophiles via ces récepteurs qui interviennent dans la cytotoxicité vis-à-vis des parasites et permettent d'élucider la dégranulation préférentielle des éosinophiles par l'IgA sécrétoire par rapport à l'IgA monomérique. Différentes études ont pu montrer que les IgA, en particulier sous leur forme sécrétoire, immobilisées sur des billes de sépharose ou complexées avec des anticorps, anti-IgA, représentaient un stimulus puissant de la dégranulation induisant non seulement la libération de protéines basiques granulaires (EPO, ECP, EDN) mais aussi la production de certaines cytokines, comme l'IL-5 (Abu-Ghazaleh et al, 1989; Tomassini et al, 1991; Dubucquoi et al, 1994). De plus, nous avons pu montrer dans notre laboratoire que le relargage de protéines basiques de l'éosinophile était orienté par l'isotype d'immunoglobulines stimulant la cellule (mécanisme de libération sélective par "peace-meal degranulation). Plus récemment, nous avons suggéré que cette hypothèse pourrait être élargie à la libération des cytokines, en particulier l'IL-5 et l'IL-4, également localisées dans les granules de l'éosinophile (Dubucquoi et al, 1994; Moqbel et al, 1995). Si les mécanismes de signalisation intracellulaire permettant d'expliquer la degranulation sélective, ne sont pas encore élucidés, il est clair que la propriété des éosinophiles à libérer des protéines très toxiques ainsi que des cytokines multipotentiels sous l'effet d'une stimulation par les IgA lui donnent une place encore plus importante lors des réponses immunitaires associées aux muqueuses où la réponse IgA est prédominante.

Les anomalies du système immunitaire au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont multiples et paraissent s'amplifier mutuellement sans qu'il soit possible de déterminer une anomalie primitive et de proposer un schéma pathogénique simple les intégrant. Le relargage des cytokines par l'éosinophile peut sans doute contribuer au cours des MICI à l'amplification de la réponse humorale et à sa modification qualitative. Pour déterminer expérimentalement l'implication locale des cytokines dans les sites effecteurs des muqueuses, il est impératif de considérer la nature des cellules résidentes dans ces tissus qui sécrètent ces cytokines. Plusieurs travaux indiquent que non seulement les lymphocytes et les cellules épithéliales (Krueger et al, 1991; Hedges et al, 1991) mais les éosinophiles sont aussi capables de produire l'IL-6 et le TGF β (Hamid et al, 1992; Wong et al, 1990) qui sont impliqués dans la

différentiation des lymphocytes B en plasmocytes à IgA. Par ailleurs, une abondance des ARNm codant pour l'IFN γ , l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5 a été détectée dans l'intestin au niveau de *la lamina propria* chez des primates non humains (James et al, 1990). Ainsi, nos travaux, joints à ceux d'autres équipes, démontrent que les cytokines impliquées dans la régulation des composants des IgA sécrétoires, notamment les IgA (IL-4, IL-5, IL-6 et TGF β), le composant sécrétoire (IL-4, IFN γ et TNF α) (Kvale et al, 1988; Phillips et al, 1990) et la chaîne J (IL-2 et IL-5) (McFadden et al, 1991) peuvent être synthétisées localement, non seulement par les cellules épithéliales et les lymphocytes T, mais aussi par les éosinophiles, qui n'avaient pas encore été considérés jusqu'ici comme capables d'influencer la production sélective des IgA polymériques, de la chaîne J ou du composant sécrétoire.

L'éosinophile n'est pas uniquement une cellule effectrice cytotoxique et proinflammatoire, mais est également une cellule immunorégulatrice, grâce à sa capacité de synthèse de cytokines. La démonstration de la synthèse d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5, qui sont les facteurs d'activation et de différenciation de l'éosinophile fut apportée de manière presque simultanée (Moqbel et al, 1991; Desreumaux et al, 1992). Mais c'est dans notre laboratoire que fut proposé pour la première fois l'hypothèse de la synthèse et la sécrétion d'IL-5, une cytokine classiquement associée à la population Th2 (Desreumaux et al, 1992; Dubucquoi et al, 1994). L'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des éosinophiles ainsi que l'éventail des pathologies associées à l'hyperéosinophilie sont des notions bien connues. Ces notions, associées à des arguments expérimentaux nous ont conduit tout naturellement à envisager l'hypothèse d'une hétérogénéité dans le profil de cytokines synthétisées par les éosinophiles au cours de différentes situations pathologiques. En effet, ces cytokines participent au recrutement des éosinophiles dans différentes pathologies où l'hyperéosinophilie est associée à des processus lésionnels locaux (pemphigoïde bulleuse, asthme, dermatite atopique, maladie coeliaque etc...) ou des atteintes multiviscérales (syndrome hyperéosinophilique idiopathique). Les cytokines, semblent jouer un rôle crucial dans l'activation cellulaire, avec des conséquences fonctionnelles variables. Nos travaux ont contribué à étudier, dans différents modèles pathologiques, la production par les éosinophiles de différentes cytokines de type 1 (IFN γ) ou de type 2 (IL-4, IL-5, IL-10), longtemps limitée aux lymphocytes. Nos résultats suscitent de nombreuses questions qui concernent par exemple :

- La présence d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 dans les éosinophiles de sujets sains ainsi que dans

une proportion importante d'éosinophiles de patients. Ceci suggère une production constitutive par l'éosinophile de ces cytokines, ce qui n'est pas le cas des lymphocytes. Il faut toutefois souligner que l'éosinophile, contrairement aux lymphocytes, est une cellule inflammatoire, ayant déjà été *in vivo* sous l'influence de facteurs de recrutement et d'activation multiples. La technique de purification pourrait également apporter une activation non spécifique.

- la cinétique d'expression de cytokines de type 1 et de type 2. Nos résultats laissent supposer que le phénotype "normal" des éosinophiles serait plutôt de type 2, cependant qu'une faible proportion serait de type 1. Ces résultats demandent bien évidemment confirmation sur un groupe plus important de patients ainsi que par une approche plus quantitative. Pour résoudre ce problème, une méthode de cytofluorométrie intracellulaire est actuellement en cours de réalisation pour quantifier par double marquage la proportion de chaque phénotype d'éosinophiles. D'autres part, l'étude du modèle de sang de cordon ombilical qui permet de suivre la cinétique de différenciation des éosinophiles *in vitro* permettra d'apporter des renseignements intéressants sur la cinétique d'expression des différentes cytokines par les éosinophiles.

- L'évaluation de la production de cytokines. Il semble en effet qu'à l'instar de l'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994), l'IFN γ soit également détecté dans la matrice des granules, cependant que l'IL-4 serait présente dans le cristalloïde de ces granules (Moqbel et al, communication personnelle). Ceci soulève de nombreuses interrogations, puisque cette particularité ne semble pas rapportée pour d'autres cellules que l'éosinophile (ou en tout cas n'a pas été clairement étudiée). On peut en particulier supposer que ces cytokines soient libérées par dégranulation, ce qui est tout à fait compatible avec l'hypothèse de libération différentielle qui s'applique non seulement aux protéines cationiques mais aussi à l'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994). Des approches de double marquage à l'or colloïdal permettront de savoir si certaines de ces cytokines sont co-localisées dans les mêmes granules. Une méthode de dosage des cytokines dans les surnageants d'éosinophiles est actuellement en cours et semble révéler que l'IFN γ ne soit pas libéré dans les mêmes conditions d'activation cellulaire que l'IL-4 et l'IL-5 (Aldebert et al, communication personnelle).

- l'hétérogénéité de l'expression de cytokines par les éosinophiles. Cette hétérogénéité peut-elle être par exemple reliée à une hétérogénéité morphologique basée sur la densité cellulaire

(éosinophiles “normodenses” et “hypodenses”) ou à une hétérogénéité fonctionnelle (existence de sous - populations d'éosinophiles n'exprimant que FcεRII/CD23 ou que FcεRI) (Morita et al, soumis pour publication). Des expériences sont actuellement en cours pour apporter des solutions à cette question.

A ce propos, des recherches récentes sur les mastocytes, considérés comme les cibles initiales de la réaction inflammatoire allergique, ont montré qu'en plus des sous-populations distinctes par leur profil de cytokines (Bradding et al, 1995), les mastocytes peuvent être divisés en deux phénotypes distincts basés sur leur contenu en sérine protéase et qui diffèrent par leur rôle biologique et immunopathologique (Irani et al, 1986). Une sous-population nommée MC_{TC} (tryptase+ chymase+ mast cells) contient la tryptase, la chymase, la cathepsine et la carboxypeptidase, alors qu'une autre sous-population désignée par MC_T contient uniquement la tryptase. L'étude de la distribution des différentes cytokines à l'intérieur de ces deux sous-populations, montre une expression préférentielle de l'IL-4 par les cellules MC_{TC} alors que l'IL-5 et l'IL-6 sont restreintes aux cellules MC_T. L'immunomarquage des mastocytes isolés à partir de la peau (>95% MC_{TC}) montre aussi une forte expression de l'IL-4 alors que l'IL-5 et l'IL-6 sont faiblement exprimées (Bradding et al, 1995). La mise en évidence de la présence de ces cytokines au niveau des granules cytoplasmiques de l'éosinophile pourrait amener à étendre l'hétérogénéité du profil des cytokines à une hétérogénéité liée aux protéines cationiques de l'éosinophile.

Même si nombre de ces questions sont encore actuellement sans réponse, la démonstration de la synthèse de cytokines par les éosinophiles permet d'éclairer d'un jour nouveau le rôle régulateur de cette population cellulaire dans la réponse immunitaire. Cette régulation peut s'effectuer à deux niveaux :

(1) dans l'initiation de la réponse immune. Par la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNFα, l'éosinophile participe au recrutement des autres cellules inflammatoires et au cortège d'effets généraux liés à l'inflammation. De même, l'éosinophile est capable de synthétiser l'IL-5, l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-4 qui amplifient la réaction inflammatoire par le recrutement des éosinophiles périphériques et par l'activation de l'éosinopoïèse et le tropisme tissulaire. Certaines voies de stimulation de l'éosinophile semblent favoriser la synthèse de certaines cytokines comme il a été démontré pour le mastocyte (Stevens et al, 1989). L'IgA et l'IgE semblent deux voies

privilegiées pour la production d'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994).

(2) Contrôle de la réaction inflammatoire. Par sa production de TGF β et d'IFN γ , l'éosinophile peut contrôler sa propre différenciation. En plus de leur activité cytolytique vis-à-vis des cibles parasitaires, les protéines cationiques présentent une cytotoxicité qui peut être élargie à de très nombreuses cibles cellulaires par exemple, les cellules épithéliales de la trachée, les cellules cardiaques ou les cellules nerveuses (Gleich et al, 1986). Le contrôle de cette agressivité de l'éosinophile pour les tissus avoisinant dans l'état normal peut être effectué par une mort programmée ou apoptose de ces cellules (Grigg et al, 1991). De ce fait, la phagocytose de ces granulocytes apoptotiques par les macrophages n'induit pas d'inflammation (Savill et al, 1993). Cependant la régulation de cette mort programmée peut être défectueuse et résulte en une hyperéosinophilie. Malgré l'absence d'une évidence directe *in vivo*, plusieurs travaux ont montré l'effet apoptotique de certaines cytokines sur l'éosinophile, contrasté par d'autres cytokines qui inhibent l'apoptose de ces cellules. C'est ainsi que l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 prolongent la survie des éosinophiles (Her et al, 1982; Rothenberg et al, 1986; Yamaguchi et al, 1991) alors que le TGF β induit l'apoptose de ces cellules (Alam et al, 1994). Les travaux réalisés dans notre laboratoire, sur l'influence de l'IFN γ sur la différenciation des éosinophiles à partir de sang de cordon ombilical, montrent une inhibition de cette différenciation et une activation des monocytes au cours desquelles les éosinophiles à noyau condensé sont groupés (Morita et al, soumis). Les éosinophiles du sang périphérique de patient hyperéosinophilique mis en présence de l'IFN γ voient leur noyau condensé et meurent par apoptose comme le montre la fragmentation d'ADN visualisée sur un gel d'agarose (résultats personnels). L'ensemble de ces travaux suggère que l'éosinophilie normale et l'hyperéosinophilie pathologique dépendent de l'équilibre entre les cytokines en particulier de type 1 et de type 2.

CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La réponse immunitaire est le fruit d'interactions multiples entre les différentes cellules du système immunitaire. Cette communication est assurée d'une part, grâce au relargage de facteurs solubles ou cytokines qui traduisent un langage universel dans le dialogue mené entre les différentes cellules de l'organisme, et d'autre part grâce à des récepteurs spécifiques placés au niveau de la membrane des cellules réceptrices qui traduisent les signaux en une variété d'activités cellulaires. Au fur et à mesure des découvertes, le monde des cytokines est apparu de plus en plus complexe. Du type de cytokines produites par les cellules T (TH1 et TH2) dépend la sélection des mécanismes effecteurs mis en place. La découverte des sous-populations de lymphocytes CD4+ nommées TH1 et TH2 suite à leur profil de cytokines qui semble être différent a été élargie aux lymphocytes T CD8+ longtemps considérés comme des cellules de phénotype TH1 strict (Erard et al, 1993). Le primat d'un profil par rapport à un autre, contenu dans une limite naturelle, définit les conséquences pathologiques lors d'une maladie donnée. Tout déséquilibre plus accusé est synonyme de maladie et il convient de ramener les cellules à la normale par l'apport des cytokines manquantes. Ce premier axe de recherche emporte avec lui plusieurs difficultés. L'étude des profils des cytokines chez des cellules autre que les lymphocytes est un thème difficile à aborder pour plusieurs raisons : la complexité des phénomènes étudiés, les difficultés méthodologiques pour avancer les preuves incontestables, les chausse-trappes dogmatiques qui parsèment ce domaine de recherche.

Tout au long de ce travail, nous avons voulu déterminer la présence au niveau des éosinophiles des molécules fixant les IgA, et particulièrement les IgA sécrétoires, qu'elles soient de nature transmembranaire de type Fc α R, ou de nature soluble de type CS-R, récepteur pour le composant sécrétoire sur les éosinophiles. A ce cadre général s'ajoute l'activation de ces cellules médiée par des récepteurs membranaires qui se traduit par la libération de médiateurs et différentes cytokines. Cela suffit à désigner l'importance centrale de l'éosinophile dans les réactions bénéfiques contre les parasites et néfastes au cours des différentes pathologies auxquelles il est associé.

Grâce aux différentes techniques biochimiques, il nous a été possible de démontrer que

l'activation préférentielle de l'éosinophile par les IgA sécrétoires correspondait à la présence d'un site de liaison pour le composant sécrétoire au niveau membranaire de cette cellule, alors que le neutrophile ne semble pas l'exprimer. Ce récepteur a un poids moléculaire (15 kDa) différent de celui du Fc α R (Monteiro et al, 1993) et peut être impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité anti-parasitaire après relargage des médiateurs cytotoxiques. Ces résultats, associés à ceux publiés sur le récepteur Fc α R (Capron et al, 1988) suggèrent que l'éosinophile peut participer au niveau des muqueuses aux mécanismes de défense de l'organisme contre des pathogènes étrangers. Ces résultats méritent d'être étendus aux éosinophiles tissulaires ainsi qu'aux autres critères d'hétérogénéité morphologique (Prin et al, 1983) et de synthèse d'interleukines que nous avons identifié sur les éosinophiles. La différence d'expression du récepteur pour le CS (4 à 59%) et du Fc α R (5 à 60%) (Capron et al, 1988) détectée par cytofluorométrie confirme encore une fois l'hétérogénéité des éosinophiles. Des mécanismes de régulation, sont certainement mis en place et restent à déterminer dans leur composante moléculaire. L'effet des cytokines sur cette régulation peut être aussi envisageable.

Grâce aux techniques de RT-PCR, nous avons remarqué une identité moléculaire (basée sur la taille des bandes amplifiées) entre le Fc α R des éosinophiles et celui des monocytes. Il est à noter aussi que nous avons pu mettre en évidence non seulement l'ARNm du Fc α R au niveau du cytoplasme cellulaire des éosinophiles, mais aussi l'expression membranaire par immunomarquage. Des études de clonage et de séquençage de Fc α R à partir de l'ARN purifié d'éosinophiles pourraient être utiles pour déterminer l'identité totale entre ce récepteur et celui décrit chez les neutrophiles et les monocytes, ainsi que l'existence d'un épissage alternatif permettant d'expliquer cette hétérogénéité de masse moléculaire en dehors des différences de glycosylation (Monteiro et al, 1993).

Enfin l'étude de l'interaction entre le récepteur pour le composant sécrétoire et le Fc α R, doit être utile pour la compréhension des fonctions effectrices de l'éosinophile et des signaux de transduction intracellulaire. Des expériences d'immunoprécipitation en conditions réductrices et non réductrices avec des IgA sécrétoires et des IgA sériques permettront de déterminer le type de liaison entre le récepteur pour le composant sécrétoire et le Fc α R.

Le relargage par l'éosinophile du récepteur pour le composant sécrétoire sous forme

soluble suggère des propriétés physiologiques de cette protéine, cependant que des récepteurs potentiels au niveau d'autres cellules à localisation périphérique ou tissulaire sont envisageables. Vu la localisation tissulaire des éosinophiles, la libération de ce récepteur sous forme soluble pourrait jouer un rôle local dans la régulation de la synthèse du CS ou des IgA sécrétoires. On pourrait également envisager un effet régulateur de la dégranulation des éosinophiles "*in situ*" par compétition entre le composant sécrétoire libre et le récepteur pour le composant sécrétoire sous forme soluble. L'étude des maladies inflammatoires du tube digestif comme la maladie coeliaque ou la maladie de Crohn, actuellement à l'étude dans notre laboratoire permettront de mieux connaître le processus de régulation tissulaire.

Les éosinophiles, qui ont été considérés pendant longtemps comme des cellules méconnues accompagnant les infections parasitaires et les manifestations allergiques, sont aujourd'hui reconnus capables de synthétiser des cytokines. De manière inattendue, nous avons démontré que ces cellules sont capables non seulement de synthétiser des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10) mais aussi de type 1 (IFN γ). Cette capacité de synthèse de cytokines de type 2 a été récemment démontrée pour les lymphocytes T CD8+ (Wierenga et al, 1990; Maggi et al, 1991). En effet les lymphocytes T CD8+, en présence d'IL-4, peuvent se développer en deux sous populations, l'une non cytotoxique CD8- et l'autre CD8+ qui produit de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 mais ne produit pas d'IFN γ . Ces cellules CD8+ "TH2 like" peuvent augmenter la réponse TH2, activer la synthèse d'IgE par les lymphocytes B et inhiber la réponse TH1. De ce fait, la permutation du phénotype cytotoxique, des cellules CD8+ productrices d'IFN γ est un important compromis pour la réponse de l'hôte contre les agents infectieux comme le virus du SIDA (Le Gos et Erard, 1994). N'en va-t-il pas de même pour les éosinophiles et les mastocytes qui semblent synthétiser l'IFN γ aussi ? (Gordon et al, 1990). Ces remarques étaient nécessaires pour justifier, l'itinéraire adopté dans ces travaux. Grâce aux techniques moléculaires et d'immunomarquage nous avons démontré la synthèse de l'IFN γ par les éosinophiles humains de patients HES ainsi que par les éosinophiles de patient présentant une pemphigoïde bulleuse. Cette synthèse d'IFN γ est moins importante que celle des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-10). On peut donc comme cela a été suggéré récemment pour les CD8+ (Erard, 1993), penser que l'environnement immunologique (présence d'IL-4) permet aux éosinophiles de s'orienter vers un phénotype de type 2. Le modèle de sang de cordon ombilical, représente pour cela un bon modèle d'étude. Nos expériences préliminaires lors de la différenciation des éosinophiles à

partir de sang de cordon ombilical en présence d'IFN γ , montrent une inhibition de la différenciation des éosinophiles (Morita et al, soumis). Les mêmes expériences, mais en présence de l'IFN α vont dans le même sens, et confirment les effets de cette cytokine sur la différenciation des éosinophiles observée *in vivo* lors d'un traitement des patients présentant un syndrome hyperéosinophilique (Fruehauf et al, 1993). L'effet de l'IFN α peut s'effectuer d'une manière directe sur les éosinophiles qui expriment un récepteur pour cette cytokine (Aldebert et al, sous presse) ou d'une manière indirecte en stimulant la synthèse de l'IFN γ comme il a été démontré récemment au niveau des lymphocytes T CD4+(Brinkmann et al, 1993). Des études de différenciation des éosinophiles à partir de sang de cordon ombilical en présence d'IL-4 ou d'IL-10 pourraient aussi apporter des informations sur le phénotype de cytokines synthétisées par les éosinophiles au cours de leur différenciation. La détection de l'IFN γ , de l'IL-4 et de l'IL-5 par immunomarquage effectué sur des éosinophiles en début de différenciation à partir de sang de cordon ombilical montre un profil de cytokines mixtes après une première semaine de culture. Même si ces études sont préliminaires, elles sont encourageantes pour pousser les investigations sur les cytokines pouvant stimuler l'éosinophilie et celles pouvant la contrôler. Connaissant la variété des cellules qui existe dans le sang de cordon ombilical et qui peuvent synthétiser des cytokines, il serait préférable de travailler sur des cellules souches hématopoïétiques CD34+ purifiées.

L'exemple de l'effet d'une déplétion des cellules CD4+ (source principale d'IL-4) sur la synthèse d'IgE n'a pas été bien exploré. Chez un groupe de patients avec un taux d'IgE très élevé (20 à 100 fois supérieur à la normale), une déplétion de lymphocytes CD4+ a été observée, ce qui suggère que ces cellules ne sont pas les seules responsables de la synthèse d'IgE. Ces patients présentent néanmoins des symptômes allergiques et une hyperéosinophilie et représentent de ce fait même un modèle possible de la contribution d'autres cellules CD4- aux réponses de type 2 (Paganelli et al, 1993). Par la synthèse des différentes cytokines, l'éosinophile peut contribuer selon un modèle interactionniste à l'orientation et l'influence sur un phénotype global de type 1 ou de type 2. A ce cadre général, s'ajoute l'influence de l'IL-12 qui augmente la synthèse de l'IFN γ (Chan et al, 1992; D'Andrea et al, 1992; Wu et al, 1993) et inhibe celle de l'IL-4 (McKnight et al, 1994) et de ce fait joue un rôle dans la régulation des réponses cellulaires immunitaires et qui a été proposé comme agent de traitement pour les

maladies allergiques (Manetti et al, 1993; Marshall et al, 1995). L'étude de la synthèse des différentes cytokines immunorégulatrices doit être complétée par la recherche de l'IL-12 chez les éosinophiles et la compréhension de son action sur la différenciation, l'activation et la libération des cytokines de type 1 et de type 2 comme nous l'avons démontré au cours de cette étude.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire, associés à toute une série d'études récemment publiées, ont permis d'enrichir nos connaissances sur le polynucléaire éosinophile et de suggérer qu'à l'instar d'autres populations cellulaires, l'éosinophile puisse jouer un rôle important à toutes les étapes de la réponse immunitaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abu-Ghazaleh, RI, Kujisawa, RI, Mestecky, J, Kyle, RA and Gleich, GJ. (1989). IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* 142: 2393.

Ackerman, GA (1964). Eosinophilic leukemia. A morphologic and histochemical study. *Blood* 24: 372.

Adachi, M, Yodoi, J, Noro, N, Masuda, T and Uchino, H (1984). Murine IgA binding factors produced by FcaR(+) and formation of IgA binding factor in Con A-activated cells. *J. Immunol.* 133: 65.

Alam, R, Forsythe, P, Stafford, S and Fukuda, Y. (1994). Transforming Growth Factor b Abrogates the Effects of Hematopoietins on Eosinophils and Induces Their Apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 1041

Anwar, ARE, Smithers, SR and Kay, AB. (1979). Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leucocytes in vitro : requirement for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.* 122: 628.

Archer, GT and Hirsch, JG. (1963). Isolation of granules from eosinophil leucocytes and study of their enzyme content. *J. Exp. Med.* 118: 277.

Baba, T, Sonozaki, H and Sek, K. (1976). An eosinophil chemotactic factor present in blister fluids of bullous pemphigoid patients. *J. Immunol.* 116 : 112.

Bass, DA, Grover, WH, Lewis, JC, Szejda, P, DeChtelet, LR and McCall, CE. (1980). Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J. Clin. Invest.* 66: 1265.

Basten, A and Beeson, PB. (1970). Mechanism of eosinophilia II. Role of the lymphocyte. *J. Exp. Med.* 131: 1288.

Beeken, WL, Northwood, I, Beliveau, C, Baigent, G and Gump, D. (1987). Eosinophils of human colonic mucosa : C3b and Fc gamma receptor expression and phagocytic capabilities. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 43: 289.

Beeson, PB and Bass, DA. (1977). The eosinophil. *Major Probl. Intern. Med.* 14: 269.

Beil, WJ, Weller, PF, Tzizik, DM, Galli, SJ and Dvorak, AM. (1993). Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor- α to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 1611.

Bentley, AM, Duram, SR, Robinson, DS, Menz, G, Storz, C, Cromwell, O, Kay, AB and Wardlaw, AJ. (1993). Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 857.

Bentley, AM, Meng, Q, Robinson, DS, Hamid, Q, Kay, AB and Durham, SR. (1993). Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte:macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 35.

Bernstein, ID, Andrews, R and Zsebo, KM. (1991). Recombinant human Stem Cell Factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of Colony-Forming Cell Progeny from CD34+lin- cells cultured with IL-3, G-CSF, or GM-CSF. *Blood* . 77: 2316.

Bieber, T, Dannenberg, B and Prinz, JC. (1989). Occurrence of IgE-bearing Langerhans cells in atopic eczema : a study of the time course of the lesions and with regard to the serum IgE level. *J. Invest. Dermatol.* 93: 215.

Bieber, T, dela Salle, H and Wollenberg, A. (1992). Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI). *J. Exp. Med.* 175: 1285.

Blank, U, C, Miller, L, White, K, Metzger, H and Kinet, JP. (1989). Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337: 187.

Bochner, BS, Luscinskas, FW, Gimbrone, MAJ, Newman, W, Sterbinsky, SA, Derse-Anthony, CP, Klunk, D and Schleimer, RP. (1991). Adhesion of human basophils, eosinophils and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells : contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J. Exp. Med.* 173: 1553.

Bot, FJ, Schipper, P, Broeders, L, Delwel, R, Kaushansky, K and Löwenberg, B. (1990). IL-6 also induces GM-CSF in immature normal bone marrow cells. *Blood* 76: 307.

Bradding, P, Feather, IH, Wilson, S, Holgate, ST and Horwarth, PH. (1995). Cytokine immunoreactivity in seasonal rhinitis : regulation by a topical corticosteroid. *AM. J. Respir. Crit. Care Med.* In Press.

Brading, P, Okayama, Y, Howarth, PH, Church, MK and Holgate, ST. (1995). Heterogeneity of Human Mast Cells based on Cytokine Content. *The Journal of Immunology* 155: 297.

Brandtzaeg, P. (1985). Role of J chain and secretory component in receptor mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand. J. Immunol.* 22: 111.

Braun, RK, Franchini, M, Erard, F, Rihs, S, De Vries, IJM, Blaser, K, Hansel, TT and Walker, C. (1993). Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.* 23: 956.

Brinkmann, V, Geiger, T, Alkan, S and Heusser, CH. (1993). Interferon α increases the frequency of Interferon γ-producing Human CD4 + T Cells. *J. Exp. Med.* 178: 1655

Broide, DH, Paine, MM and Firestein, GS. (1992). Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J. Clin. Invest.* 90: 1414.

Brown, TR. (1898). Studies on trichinosis, with especial reference to the increase of the eosinophilic cells in the blood and muscle, the origin of these cells and their diagnostic importance. *J. Exp. Med.* 3: 315.

Broxmeyer, HE, Sherry, B, Cooper, S, Lu, L, Maze, R, Beckmann, MP, Cerami, A and Ralph, P. (1993). Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells : interacting effects involving suppression, synergistic suppression and blocking of suppression. *J. Immunol.* 150: 3448.

Brunner, T, Heusser, CH and Dahinden, VA. (1993). Human peripheral basophils primed by IL-3 produce IL-4 in response to IgE receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 177: 605.

Butterworth, AE, Sturrock, RF, Houba, V, Mahmoud, AA, Sher, A and Rees, PH. (1975). Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256: 727.

Butterworth, AE, Remold, HG, Houba, V, David, JR, Franks, D, David, PH and Sturrock, RF. (1977). Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 51 Cr-labelled schistosomula of *S.mansoni*: mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118: 2230.

Butterworth, AE, Wassom, DL, Gleich, GJ, Loegering, DA and David, JR. (1979). Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 122: 221.

Butterworth, AE. (1984). Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Immunol.* 27: 339.

Canon, P (1892). Über Eosinophile Zellen und Mastzellen in Blute Gesunder und Kranker. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 10: 206.

Capron, A, Dessaint, JP, Capron, M and Bazin, H (1975). Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophage to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* 253: 475.

Capron, M, Bazin, H, Joseph, M and Capron, A. (1981(a)). Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126: 1764.

Capron, M, Capron, A, Dessaint, JP, Torpier, G, Johansson, SG and Prin, L (1981 (b)). Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126: 2087.

Capron, M, Spiegelberg, HL, Prin, L, Bennich, H, Butterworth, AE, Pierce, RJ, Ouassi, MA and Capron, A (1984). Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132: 462.

Capron, M, Kusnierz, JP, Prin, L, Spiegelberg, HL, Ovlaque, G, Gosset, P, Tonnel, AB and Capron, A (1985 (a)). Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils : detection by flow microfluorometry. *J. Immunol.* 134: 3013.

Capron, M, Kusnierz, JP, Prin, L, Spiegelberg, HL, Khalife, J, Tonnel, AB and Capron, A. (198 (b)). Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 77: 246.

Capron, M, Jouault, T, Prin, L, Joseph, M, Ameisen, JC, Butterworth, AE, Papin, JP, Kusnierz, JP and Capron, A. (1986 (a)). Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FCeR2) of eosinophils, platelets and macrophages. *J. Exp. Med.* 164: 72.

Capron, M, Jouault, T, Prin, L, Joseph, M, Ameisen, JC, Butterworth, AE, Papin, JP, Kusnierz, JP and Capron, A. (1986(b)). Functional study of a monoclonal antibody to IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.* 47: 128.

Capron, M and Capron, A. (1987). The IgE receptor of human eosinophils, in *Allergy an Inflammation*. Kay, A. B. ,Ed., Academic Press, London : 151.

Capron, M, Kazatchkine M.D., Fischer, E, Joseph, M, Butterworth, AE, Papin, JP, Kusnierz, JP and Capron, A (1987). Functional role of the a chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J. Immunol.* 139: 2059.

Capron, M, Tomassini, M, Vandervorst, E, Kusnierz, JP, Papin, JP and Capron, A (1988(a)). Existence et fonction d'un récepteur pour l'IgA sur les éosinophiles humains. *C.R. Acad. Sci.* 307: 397.

Capron, M, Benveniste, J, Braquet, P and Capron, A (1988(b)). Role of PAF-acether in IgE-dependent activation of eosinophils, in Braquet. *New trends in lipid mediators research*. 2: 10.

Capron, M, Grangette, C, Torpier, G and Capron, A (1989). The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.* 147: 128.

Capron, M and Prin, L (1990). The IgE receptor of eosinophils. *Springer Semin. Immunopathol.* 12: 327.

Capron, M and Capron, A (1994). Immunoglobulin E and effector cells in Schistosomiasis. *Science* 264: 1876.

Caterino-de Araujo, A (1994). HIV-infection and eosinophilia. *Immunology Today* 15: 498.

Caulada-Benedetti, Z, Al-Zamel, F, Sher, A and James, S (1991). Comparison of Th1- and Th2- associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Immunol.* 146: 1655.

Caulfield, JP, Hein, A, Rothenberg, ME, Owen, WF, Soberman, RJ, Stevens, RL and Austen, KF (1990). A morphometric study of normodense and hypodense human eosinophils that are derived in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* 137: 27.

Caux, C, Saeland, S, Favre, C, Duvert, V, Mannoni, P and Banchereau, J (1990). TNF α strongly potentiates IL-3 and GM-CSF-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 75: 2292.

Chan, SH, Kobayashi, M, Santoli, D, Perussia, B and Trinchieri, G (1992). Mechanisms of IFN- γ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) : role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.* 148: 92.

Changelian, PS and Fearon, DT. (1986). Tissue-specific phosphorylation of complement receptors CR1 and CR2. *J. Exp. Med.* 163: 101.

Chusid, MJ, Dale, DC, West, BC and Wolff, SM (1975). The hypereosinophilic syndrome : analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine Baltimore* 54: 1.

Clevers, H, Alarcon, B, Wileman, T and Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex : a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 629.

Cline, MJ and Golde, DW (1979). Controlling the production of blood cells. *Blood* 53: 157.

Clutterbuck, EJ, Hirst, EM and Sanderson, CJ (1989). Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures : comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 73: 1504.

Clutterbuck, EJ and Sanderson, CJ (1990). Regulation of Human Eosinophil Precursor Production by Cytokines - A Comparison of Recombinant Human Interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, and rh Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 75: 1774.

Coffman, RL and Carty, J (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . *J. Immunol.* 136: 949.

Coffman, RL, Seymour, BWP, Hudak, S, Jackson, J and Rennick, D (1989).

Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophil in mice. *Science* 245: 308.

Cogan, E (1994). clonal proliferation of type 2 helper T cells in a man with the hypereosinophilic syndrome. *New. Engl. J. Med.* 330: 535.

Coico, RF, Xue, B, Wallace, D, Pernis, B, Siskind, GW and Thorbecke, GJ (1985). T cells with receptors for IgD. *Nature* 316: 744.

Colombel, JF, Mascart-Lemone, F, Nemeth, J, Vaerman, JP, Dive, C and Rambaud, JC (1990). Jejunal immunoglobulin and antigliadin antibody secretion in adult coeliac disease. *Gut.* 31: 1345.

Conley, ME and Delacroix, DL (1987). Intravascular and musocal immunoglobulin A : two separate but related systems of immune defense ? *Ann. Int. Med.* 106: 892.

Connell, JT (1968). Morphological changes in eosinophils in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 41: 1.

Cordonnier, AL, Montagnier and Emerman, M (1989). Single amino acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 340: 571.

Costa, JJ, Matossian, K, Resnick, MB, Beil, WJ, Wong, DTW, Gordon, JR, Dvorak, AM, Weller, PF and Galli, SJ (1993). Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Clin Invest* 91: 2673.

Crosby, WH (1890). The hematology of hookworm disease : contribution of Bailey K.Ashford. P.R. *Health Sci. J.* 4: 113.

Czech, W, Krutmann, J, Budnik, A, E., S and Knapp, A (1993). Induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 100: 417.

D'Andrea, A, Rengaraju, M, Valiante, NM, Chehimi, J, Kubin, M, Aste, M, Chan, SH, Kobayashi, M, Young, D, Nickbarg, E, Chizzonite, R, Wolf, SF and Trinchieri, G (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176: 1387.

Daëron, M, Neauport-Sautes, C, Yodoi, J, Moncuit, J and Fridman, WH (1985). Receptors for immunoglobulin isotypes (FcR) on murine T cells. II. Multiple FcR induction on hybridoma T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 15: 668.

Daëron, M and Fridman, WH (1985). Fc receptors as regulatory molecules. *Ann. Inst. Pasteur/immunol.* 136: 383.

David, JR, Vadas, MA, Butterworth, AE, De Brito, PA, Carvalho, EM, David, RA, Bina, JC and Andrade, ZA (1980). Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patient with eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* 303: 1147.

Del Pozo, V, De Andres, B, Martin, E, Maturi, N, Zubeldia, JM, Palamino, P and Lahoz, C (1990). Murine eosinophils and Il-1 : alpha Il-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of Il-1 from peritoneal eosinophils. *J. Immunol.* 144: 3117.

DeSimone, C, Donelli, G, Meli, D, Rosati, F and Sorice, F (1982). Human eosinophils and parasitic diseases. II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clin. Exp. Immunol.* 48: 249.

DeSimone, C, Ferrri, M and Sorice, F (1983). LDH isoenzyme distribution in human eosinophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71: 193.

Desreumaux, P (1991). Mécanismes d'activation de l'éosinophile dans la maladie coeliaque. Interactions avec l'IgA sécrétoire et expression d'ARN codant pour l'IL5. *DEA*.

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

Desreumaux, P, Janin, A, Dubucquoi, S, Copin, MC, Torpier, G, Capron, A, Capron, M and Prin, L (1993). Synthesis of interleukin 5 by activated eosinophils in patients with eosinophilic heart diseases. *Blood* 82: 1553.

Devos, R, Plaetinck, G, Van der Heyden, J, Cornelis, S, Vandekerchove, J, Fiers, W and Tavernier, J (1991). Molecular basis of high affinity murine interleukin-5 receptor. *EMBO J.* 10: 2133.

Dickler, HB (1976). Lymphocyte receptors for immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 24: 167.

Dierksmeier, U, Frosch, PJ and Czarnetzki, BM (1980). Eosinophil chemotactic factor (ECF) in blister fluids of dermatological diseases. *Br J Dermatol* 102: 43.

Dobrina, A, Menegazzi, R, Carlos, TM, Nardon, E, Cramer, R, Zacchi, T, Harlan, JM and Patriarca, P (1991). Mechanism of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. Eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J. Clin. Invest.* 88: 20.

Dubertret, L, Bertaux, B, Fosse, M and Touraine, R (1980). Cellular events leading to blister formation in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 104: 615.

Dubost-Brama, A (1994). Etude des interactions entre les IgE et les éosinophiles dans un modèle de maladie auto-immune : la pemphigoïde. *DEA*.

Dubucquoi, SP, Desreumaux, P, Janin, A, Klein, O, Goldman, M, Tavernier, J, Capron, A and Capron, M (1994). Interleukin 5 synthesis by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med* 179: 703.

Duhram, SR, Ying, S, Varney, A, Jacobson, MR, Sudderick, RM, Mackay, S, Kay, AB and Hamid, QA (1992). Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4 and IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the nasal mucosa after allergen provocation : relationship to tissue eosinophilia. *J. Immunol.* 148: 2390.

Dunlop, DJ, Wright, EG, Lorimore, S, Graham, GJ, Holyoake, T, Kerr, DG, Wolpe, SD and Pragnell, IB (1992). Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of sci/rhMIP1a in vivo. *Blood* 88: 2221.

Dvorak, AM, Mihm, MC and Osage, JE (1982). Bullous pemphigoid, an ultrastructural study of the inflammatory response : Eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopsies from one patient. *J Invest Dermatol* 78: 91.

Dvorak, AM, Letourneau, L, Login, GR, Weller, PF and Ackermann, SJ (1988). Ultrastructural localization of the Charcot-leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood* 72: 150.

- Dvorak, AM, Weller, PF, Monahan-Early, R, Letourneau, L and Ackerman, SJ** (1990). Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) and peroxidase in macrophages, eosinophils and extracellular matrix of the skin in the hypereosinophilic syndrome. *Lab. Invest.* 62: 590.
- Dvorak, AM, Ackerman, SJ and Weller, PF** (1990). Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. in : Blood cell biochemistry, Vol. 2 : Megakaryocytes, platelets, macrophages, and eosinophils (Harris JR ed), Plenum, New York/London : 237.
- Dvorak, A, Ackerman, SJ and Weller, PF** (1991). Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. I. Piecemeal degranulation of specific granules and distribution of Charcot-Leyden crystal protein. *Am. J. Pathol.* 138: 69.
- Dvorak, AM, Fritsu, T, Letourneau, L, Ishizaka, T and Ackerman, SJ** (1991). Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultured supplemented with recombinant human interleukin-5. part. 1. piecemeal degranulation of specific granules and distribution of Charcot-Leyden crystal protein. *Am. J. Pathol.* 138: 69.
- Ehrlich, P** (1879). Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch. Anat. Physiol.* (Physiol. Abstr.) : 166.
- Ehrlich, P** (1880). Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Z. Klin. Med.* 1: 553.
- Ehrlich, P and Lazarus, A** (1914). Histology of the Blood : Normal and Pathological. *Cambridge University Press* : 148.
- Eiffert, H, Uentin, E, Decker, J, Hillemeier, S, and Hugschmidt, M.** (1984). The primary structure of human free secretory component and the arrangement of disulfide bonds. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 365: 1489.
- Elliott, ME, Vadas, MA, Eglington, JM, Park, LS, To, LB, Cleland, LG, Clark, SC and Lopez, AF** (1989). Recombinant human Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor show common biological effects and binding characteristics on human monocytes. *Blood* 74: 2349.
- Emmerson, RW and Wilson-Jones, E** (1968). Eosinophilic spongiosis in pemphigus : A report of an unusual histological change in pemphigus. *Arch Dermatol* 97: 252.
- Enokihara, H, Furusawa, S, Nakakubo, H, Kajitani, H, Nagashima, S, Saito, K, Shishido, H, Hitoshi, Y, Takatsu, K, Noma, T, Shimizu, A and Honjo, T** (1989). T cells from eosinophilic patients produce interleukin-5 with interleukin-2 stimulation. *Blood* 73: 1809.
- Erard, F** (1993). Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 260: 1802.
- Fanger, MW, Pugh, J and Bernier, GM** (1981 (a)). The specificity of receptors to IgA on human peripheral blood polymorphonuclear cells and monocytes. *Cell. Immunol.* 60: 324.
- Fanger, MW and Lydyard, PM** (1981 (b)). Receptors for IgA on human lymphocytes. I. Detection and specificity. *Mol. Immunol.* 18: 189.
- Ferguson, MAJ and Williams, AF** (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu.Rev. Biochem.* 57: 285.

Ferguson, MAJ and Williams, AF (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285.

Fibbe, WE, Van Damme, J, Billau, A, Goselink, HM, Voogt, PJ, Van Eeden, G, Ralph, P, Altonic, BW and Falkenberg, JHF (1988). IL-1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce GC-SF and MC-SF. *Blood* 71: 430.

Fischer, E, Capron, M, Prin, L, Kusnierz, JP and Kazatchkine, M (1986). Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell. Immunol.* 97: 297.

Flaum, MA, Schooley, RT, Fauci, AS and Gralnick, HR (1981). A clinicopathologic correlation of the idiopathic hypereosinophilic syndrome. I. Hematologic manifestations. *Blood* 58: 1012.

Forni, G, Giovarelli, M, Santoni, A, Modesti, A and Forni, M (1986). Tumour inhibition by interleukin-2 at the tumour/host interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 868: 307.

Freedman, AR, Gibson, FM, Fleming, SC, Spry, CJ and Griffin, GE (1991). Human immunodeficiency virus infection of eosinophils in human bone marrow cultures. *J Exp Med* 174: 1661.

Frick, WE, Sedgwick, JB and Busse, WW (1988). Hypodense eosinophils in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 119.

Frick, WE and Segwick, JBB, W. W. (1989). The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139: 1401.

Frigas, E and Gleich, GJ (1986). The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77: 5277.

Fruehauf, S, Fiehn, C, Haas, R, Doehner, H and Hunstein, W (1993). Sustained remission of idiopathic hypereosinophilic syndrome following a-interferon therapy. *Acta Haematol* 89: 91.

Fujisawa, T, Abu-Ghazaleh, R, Kita, H, Sanderson, CJ and Gleich, GJ (1990). Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *j. Immunol* 144: 642.

Fukuda, T, Dunnette, SL, Reed, CE, Ackerman, SJ, Peters, MS and Gleich, GJ (1985). Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 981.

Fukuda, T and Makino, S (1989). Eosinophil heterogeneity, in *Eosinophils in Asthma. Academic Press Morley, J., Ed. : 125.*

Gartner, I (1980). Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel.(Percoll). *Immunology* 40: 133.

Gearing, DP, King, JA, Gough, NM and Nicola, NA (1989). Expression cloning of a receptor for human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor. *EMBO J.* 8: 3667.

Gerard, NP, Hodges, MK, Drazen, JM, Weller, PF and Gerard, C (1989). Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 264: 1760.

Gesner, TG, Mufson, RA, Norton, CR, Turner, KJ, Yang, YC and Clark, SC (1988). Specific binding, internalization, and degradation of human recombinant interleukin-3 by

cells of the acute myelogenous, leukemia line, KG-1. *J. Cell. Physiol.* 136: 493.

Ghosh, K, Shome, DK, Marwaha, N, Mohanty, D and Das, KC (1985). Normal plasma levels of B12 binding proteins in hypereosinophilic syndrome and secondary hypereosinophilia. *Blood.* 65: 510.

Gimble, JM, Hudson, J, Henthorn, J, Hua, XX and Burstein, SA (1991). Regulation of IL-6 expression in family of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7603.

Gleich, GJ and Adolphson, CR (1986). The eosinophilic leukocyte : structure and function. *Adv. Immunol.* 39: 177.

Gleich, GJ (1990). The eosinophil and bronchial asthma : current understanding. Review article. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85: 422.

Gleich, GJ, Adolphson, CR and Leifermann, KM. The eosinophil, in Inflammation. Gallin, J.L., Ed, : (in Press)

Gollash (1889). Zur Kenntniss der Asthmatischen Sputums. *Forschr. Med.* (Berlin) 7: 361.

Gordon, JR, Burd, PR and Galli, SJ. (1990). Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today.* 11: 458.

Gordon, JR, Burd, PR and Galli, SJ (1990). Mast cells as source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 11: 458.

Gorman, DM, Itoh, N, Kitamura, T, Schreuers, J, Yonehara, S, Yamara, I, Arai, KI and Miyajima, A (1990). Cloning and expression of a gene encoding an IL-3 receptor-like protein : identification of another member of the cytokine gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5459.

Grando, SA, Glukhenky, BT, Drannik, GN, Epshtein, EV, Kostromin, AP and Korostash, TA (1989). Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 125: 925.

Grewe, M, Gyufko, K, Schöpf, E and Krutmann, J (1994). Lesional expression of interferon-g in atopic eczema. *Lancet* 343: 25.

Grezel, D, Capron, M, Grzych, JM, Fontaine, J, Lecocq, JP and Capron, A (1993). Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen : effector mechanisms involving IgE and IgA. *Eur. J. Immunol.* 23: 454.

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

Grzych, JM, Capron, M, Bazin, H and Capron, A (1982). In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J. Immunol* 129: 2739.

Grzych, JM, Pearce, E, Cheever, A, Caulada, ZA and Caspar, P (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoni. *J. Immunol* 146: 1322.

Grzych, JM, Grezel, D, Xu, BO, Neyrinck, J-L, Capron, M, Ma, JH, Butterworth, AE and Capron, A (1993). IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis mansoni. *J. Immunol* 150: 527.

Gupta, S, Platsoucas, CD and Good, RA (1979). Receptors for IgA on a subpopulation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4025.

Hagan, P, Wilkins, HA, Blumenthal, UJ, Hayes, RJ and Greenwood, BM (1985). Eosinophilia and resistance to *S. haematobium* in man. *Parasite Immunol* 7: 625.

Hamada, A and Greene, BM (1987). Clq enhancement of IgG-dependent eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. *J. immunol.* 138: 1240.

Hamann, KJ, Gleich, GJ, Gundel, RH and R., WS (1991). Interactions between respiratory epithelium and eosinophil granule proteins in asthma : the eosinophil hypothesis in the airway epithelium : Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. Farmer, S. G. and Hays D. W. P. , Eds. , Marcel Dekker, New York. 255.

Hamid, Q, Barkans, J, Meng, Q, Ying, S, Abrams, JS, Kay, AB and Moqbel, R (1992). Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80: 1496.

Hanifin, J, Schneider, LC and Leung, DYM (1993). Recombinant interferon-gamma therapy for atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol* 28: 189.

Hara, T and Miyajima, A (1992). Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin 3 (IL-3). *EMBO* . 5: 1875.

Hardy, WR and Anderson, RE (1968). The hypereosinophilic syndrome. *Ann. Intern. Med* 68: 1220.

Hatzfeld, J, Li, ML, Brown, EL, Sookdeo, H, Lévesque, JP, O'Toole, T, Gurney, C, Clark, SC and Hatzfeld, A (1991). Release of early hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor b1 or Rb oligonucleotides. *J. Exp. Med.* 174: 925.

Hayashida, K, Kitamura, T and Gorman, DM(1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) . reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9655.

Hedges, S, Anderson, P, Lidin-Janson, G, De Man, P and Swanborg, C (1991). Interleukin-6 response to deliberate colonization of the human urinary tract with gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 59: 421.

Henderson, WR, Harley, JB, Fauci, AS and Chi, EY (1988). Hypereosinophilic syndrome human eosinophil degranulation induced by soluble and particulate stimuli. *Br. J. Haematol.* 69: 13.

Her, E, Frazer, J, Austen, KF and Owen, WF (1991). Eosinophil hematopoietins antagonize the programmed cell death of eosinophils. Cytokine and glucocorticoid effects on eosinophils maintained by endothelial cell-conditioned medium. *J. Clin. Invest* 88: 1982.

Hibbs, ML, Selvaraj, P, Carpen, O, Springer, TA, Kuster, H, Jouvin, MH and Kinet, JP (1989). Mechanism for regulating expression of membrane isoforms of FcγRIII (CD16). *Science* 246: 1608.

Hodges, MK, Weller, PF, Gerard, NP, Akerman, SJ and Drazen, JM (1988). Heterogeneity of leukotriene C4 production by eosinophils from asthmatic and from normal subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 799.

Hoffman, DR, Yamato, FY, Geller, B and Hadad, Z (1975). Specific IgE antibodies in atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 55: 256.

Hoover, RG and Lynch, RG (1980). Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. II. T cells with IgA-Fc receptors are markedly increased in mice with IgA plasmacytomas. *J. Immunol.* 125: 1280.

Hoover, RG, Dieckgraefe, BK, Lake, J, Kemp, JD and Lynch, RG (1982). Lymphocyte surface membrane immunoglobulin in myeloma. III. IgA plasmacytomas induce large numbers of circulating, adult-thymectomy-sensitive. q+Lyt-1-2+ lymphocytes with IgA-Fc receptors. *J. Immunol.* 129: 2329.

Hoover, RG and Lynch, RG (1983). Isotype-specific suppression of IgA : suppression of IgA responses in BALB/c mice by Ta cells. *J. Immunol.* 130: 521.

Hsu, SYL, Lust, GL and Hsu, HF (1971). The fate of challenge schistosome cercariae in a monkey immunized by cercariae and exposed to high doses of x-irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136: 727.

Irani, AM, Schelter, NM, Craig, SS, Deblois, G and Schwartz, LB (1986). Two types of mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4464.

Iryo, K, Tsuda, S and Sasai, Y (1992). Ultrastructural aspects of infiltrated eosinophils in bullous pemphigoid. *J. Dermatol.* 19: 393.

Itoh, N, Yonehara, S, Schreurs, J, Gorman, DM, Mauyama, K, Ishii, A, Yahara, I, Arai, KI and Miyajima, A (1990). Cloning of an IL-3 receptor gene : a member of a distinct receptor gene family. *Science* 247: 324.

Iwatsuki, K, Tagami, H and Yamada, M (1983). Pemphigus antibodies mediate the development of an inflammatory change in the epidermis : A possible mechanism underlying the feature of eosinophilic spongiosis. *Acta Derm Venereol.* 63: 495.

Jakob, T, Hermann, K and Ring, J (1991). Eosinophil cationic protein in atopic eczema. *Arch Dermatol Res* 283: 5.

James, SP, Kwan, WC and Sneller, MC (1990). T cells in inductive and effector compartments of the intestinal mucosal immune system of non human primates differ in lymphokine mRNA expression, lymphokine utilization, and regulatory function. *J. Immunol.* 144: 1251.

Jeffes, EWB, Yamamoto, RS, Ahmed, AR and Granger, GA (1984). Lymphotoxin detected in the blister fluid of bullous pemphigoid patients. *J Clin Immunol* 4: 31.

Jones, TW (1846). The blood corpuscle considered in its different phases of development in animal series. Memoir I Vertebrate. *Philos. Trans. R. Soc. London* 136: 63.

Jordon, RE (1967). Complement activation in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 67: 366.

Joseph, M, , A, J. C., Capron, A, Vorng, H and Viens, P (1983). A new fonction for platelets : IgE dependent killing of schistosomes. *Nature* 303: 810.

Kadin, M, Butmarc, J, Elovic, A and Wong, D (1993). Eosinophils are the major source of transforming growth factor-beta 1 in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 142: 11.

Kajita, T, Yui, Y, Mita, H, Taniguchi, N, Saito, H, Mishima, T and Shida, T

(1985). Release of leukotriene C4 from human eosinophils and its relation to the cell density. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78: 406.

Kaneko, F, Minagawa, T, Takiguchi, Y, Suzuki, M and Itoh, N (1992). Role of cell-mediated immune reaction in blister formation of bullous pemphigoid. *Dermatology* 184: 34.

Kapp, A, Czech, W, Krutmann, J and Schöpf, E (1991). Eosinophil cationic protein (ECP) in sera of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 24: 555.

Katayama, TD and Nishioka, K (1984). High histamine level in the blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch dermatol Res* 276: 126.

Kauffman, HF, Van der Belt, B, DE Monchy, JGR, Boelens, H, Koeter, GH and De Vries, K (1987). Leukotriene C4, production by normal-density and low-density eosinophils of atopic individuals and other patients with eosinophilia. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 79: 611.

Kay, AB (1979). The role of eosinophil. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64: 90.

Kay, AB, Ying, S, Varney, V, Gaga, M, Durham, R, Moqbel, R, Wardlaw, AJ and Hamid, Q (1991). Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin-3 (IL-3), IL4 and granulocyte:macrophage colony-stimulating factor, in allergen induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* 173: 775.

Kägi, MK, Joller-Jemelka, H and Wüthrich, B (1992). correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology* 185: 88.

Kerr, MA (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 271: 285.

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

Khalife, J, Dunne, DW, Richardson, BA, Mazza, G, Thorne, KJI, Capron, A and Butterworth, AE (1989). Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 142: 4422.

Kimani, G, Tonnesen, MG and Henson, PM (1988). Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet-activating factor. *J. Immunol.* 140: 3161.

Kita, H, Abu-Ghazaleh, RI, Sanderson, CJ and Gleich, GJ (1987). Human eosinophils cultured with human interleukin 5 are hypodense, activated and have a distinct morphology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 349.

Kita, H, Ohnishi, T, Okubo, Y, Weiler, D, Abrams, JS and Gleich, GJ (1991). GM-CSF and Interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.* 174: 743.

Kitamura, T, Sato, N, Arai, KL and Miyajima, A (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared b subunit for the human IL3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66: 1165.

Kiyono, H, McGhee, JR, Mosteller, M, Eldridge, JH, Koopman, WJ, Kearney, JF and Michalek, SM (1982). Murine Peyer's patch T-cell clones / characterization of antigen-specific helper T-cells for immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.* 156: 1115.

Kiyono, H, O., PJ, Colwell, DE, Michalek, SM, Koopman, WJ and McGhee, JR (1984(a)). Isotype-specificity of helper T cell clones : Fca receptors regulate T-cell and B-cell collaboration for IgA responses. *J. Immunol.* 133: 1087.

Kiyono, H, Cooper, MD, Kearney, JF, Mosteller, LM, Michalek, SM, Koopman, WJ and McGhee, JR (1984(b)). Isotype-specificity of helper T-cell clones. Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA responses. *J. Exp. Med.* 159: 798.

Kiyono, H, Mosteller-Barnum, LM, Pitts, AM, Williamson, SI, Michalek, SM and McGhee, JR (1985). Isotype-specific immunoregulation. IgA-binding factors produced by Fca receptor-positive T cell hybridomas regulate IgA responses. *J. Exp. Med.* 161: 731.

Kloprogge, E, DE Leeuw, AJ, De Monchy, JGR and Kauffman, HF (1989). Cellular communication in leukotriene C4 production between eosinophils and neutrophils. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 90: 20.

Kobayashi, M, Imamura, M, Gotohda, Y, Maeda, S, Iwasaki, H, Sakurada, K, Kasai, M, Hapel, AJ and Miyazaki, T (1991). Synergistic effects of IL-1b and IL-3 on the expansion of human hematopoietic progenitor cells in liquid cultures. *Blood* 78: 1947.

Krueger, J, Ray, A, Tamm, I and Sehgal, PB (1991). Expression and function of Interleukin-6 in epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 45: 327.

Krystal, G, Lam, V, Dragowska, W, Takahashi, C, Appel, J, Gontier, A, Jenkins, A, Lam, H, Quon, L and Landsdorp, P (1994). Transforming growth factor b is an inducer of erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 180: 851.

Kurosaki, T and Ravetch, JV (1989). A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of FcγRIII. *Nature* 342: 805.

Kvale, D, Brandtzaeg, P and D., L (1988). Up-regulation of the expression of secretory component and HLA molecules in a human colonic cell line by tumor necrosis factor-α and γ interferon. *Scand. J. Immunol.* 28: 351.

Kyan-Aung, U, Haskard, DO, Poston, RN, Thornhill, MH and Lee, TK (1991). Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *J. Immunol.* 146: 521.

Lanier, LL, Cwirla, S, YU, G, Testi, R and Phillips, JH (1989). Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor(CD16) determined by a single amino acid. *Science* 246: 1608.

Le Gros, G and Erard, F (1994). Non-cytotoxic, IL-4, IL-10 producing CD8+ T cells : their activation and effector functions. *Current Opinion in Immunology* 6: 453.

Leary, AG, Ikebuchi, K, Hirai, Y, Wong, GG, Y.C., Y, Clark, SC and Ogawa, M (1988). Synergism between IL-6 and IL-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells : comparison with IL-α. *Blood* 71: 1759.

Leiferman, KM, Ackerman, SJ and Sampson, HA (1985). Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. Comparison with onchocerciasis. *N Engl J Med* 313: 282.

- Leiferman, KM** (1989). Eosinophils in atopic dermatitis. *Allergy* 44 Suppl 9: 20.
- Leiferman, KM, Fujisawa, T, Gray, BH and Gleich, GJ** (1990). Extracellular deposition of eosinophil and neutrophil granule proteins in the IgE-mediated cutaneous late phase reaction. *lab. Invest.* 62: 219.
- Leiferman, KM** (1991). A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24: 1101.
- Lever, R, Turbitt, M, Sanderson, A and Mackie, R** (1987). Immunophenotyping of the cutaneous infiltrate and of the mononuclear cells in peripheral blood in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 89: 4.
- Levi-Schaffer, F, Lacy, P, Mannan, M, North, J, Gomperts, B, Kay, AB and Moqbel, R** (1994). GM-CSF as a granule-associated pre-formed mediator in peripheral blood eosinophils from asthmatic subjects (abstract). *J. Allergy Clin. Immunol.* 93: 268.
- Li, ML, Cardoso, A, Sansilvestri, P, Hatzfeld, A, Batard, P, Lévesque, JP and Hatzfeld, J** (1993). Co-stimulatory effects of Steel Factor, the kit-ligand, on purified human hematopoietic progenitors in low cell density culture. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 35: 81.
- Limaye, AP, Abrams, JS, Silver, JE, Ottesen, EA and Nutman, TB** (1990). regulation of parasite induced eosinophilia : selectively increased Interleukin-5 production in helminth-infected patients. *J Exp Med* 172: 399.
- Lohrlich, I, Hermann, K and Haustein, UF** (1982). Cell distribution in blood and blister fluid in bullous pemphigoid. *Dermatol Monatsschr.* 168: 82.
- Lopez, AF, Sanderson, CJ, Gamble, JR, Campbell, HD, Young, IG and Vadas, MA** (1988). Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 167: 219.
- Lopez, AF, Eglington, JM, Gillis, D, Park, LS, Clark, S and Vadas, MA** (1989). Reciprocal inhibition of binding between IL-3 and GM-CSF to human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7022.
- Lopez, AF, Eglington, JM, Lyons, AB, Tapley, PM, To, LB, Park, LS, Clark, SC and Vadas, MA** (1990). Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J. Cell. Physiol.* 145: 69.
- Lopez, AF, Vadas, MA, and Woodcock, JM** (1991). Interleukin-5, Interleukin-3, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor cross compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 266: 24741.
- Lotze, MT, Matory, YT, Rayner, AA, Ettinghausen, SE, Vetto, JT, Seipp, CA and Rosenberg, CA** (1986). Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer* 58: 2764.
- Löwy, I, Brezin, C, Neauport-Sautes, C, Theze, J and Fridman, WH** (1983). Isotype-specific regulation of antibody production : T cell Hybrids can be selectively induced to produce IgG and IgG2 subclass-specific suppressive immunoglobulin-binding factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2323.
- Lucey, DR, Dorsky, DI, Nicholson-Weller, A and Weller, PF** (1989 (a)). Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus I gp120. *J. Exp. Med.* 169: 327.

Lucey, DR, Nicholson-Weller, A and Weller, PF (1989(b)). Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1348.

Lum, LG, Muchmore, AV, Keren, D, Decker, J, Koshi, I, Strober, W and Blaese, RM (1979). A receptor for IgA on human T lymphocytes. *J. Immunol* 122: 65.

MacGlachan, JD, White, JM, S-K., H, Ono, SJ, Schroeder, JT and Lichtenstein, LM (1994). Secretion of IL-4 from human basophils. *J. Immunol* 152: 3006.

Maggi, E, Biswas, P, Del Prete, G, Parronchi, P, Macchia, D, Simonelli, C, Emmi, L, De Carli, M, Tiri, A, Ricci, M and Romagnani, S (1991). Accumulation of Th2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. *J. Immunol.* 146: 1169.

Maggi, E (1992). reciprocal regulatory effects of IFN-g and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148: 2142.

Mahmoud, AAF, Warren, KS and Peters, PA (1975). A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by anti-eosinophil serum. *J. Exp. Med.* 142: 805.

Maliszewski, CR, March, CJ, Schoenborn, MA, Gimpel, S and Shen, L (1990). Expression cloning of a human Fc receptor for IgA. *J. Exp. Med.* 172: 1665.

Manetti, R, Parronchi, R, Giudizi, MG, Piccinni, MP, Maggi, E, Trinchieri, G and Romagnani, S (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177: 1199.

Marshall, JD, Secrist, H, DeKruyff, RH, Wolf, SF and Umetsu, DT (1995). IL-12 Inhibits the production of IL-4 and IL-10 in Allergen-Specific Human CD4+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* 155: 111.

Masuyama, K, Jacobson, MR, Rak, S, Sudderick, RM, Kay, AB, Lowhagen, O and Durham, SR (1994). Topical glucocorticosteroid inhibits cytokine messenger RNA expression for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 24: 118.

Maurer, D, Ebner, C, Reininger, B, Fiebiger, E, Kraft, D, Kinet, JP and Stringl, G (1995). The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J. Immunol.* 154: 6285.

Maurer, D, Ebner, C, Reininger, B, Fiebiger, E, D., K, Kinet, JP and Stingl, G (1995). The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J. Immunol.* 154: 6285.

Maynard, B, Peters, MS, Butterfield, JH and Leiferman, KM (1990). Bullous pemphigoid : eosinophil, neutrophil and mast cell degranulation in lesional tissue (abstract). *J. Invest. Dermatol.* 4: 553.

Mazengera, RL and Kerr, MA (1990). The specificity of the IgA receptor purified from human neutrophils. *Biochem. J.* 272: 159.

Mc Kenzie, ANJ, Li, X, Largaespada, A, Sato, A, Keneda, S, Zurawski, SM, Doyle, EL, Milatovich, A, Francke, U, Copeland, NG, Jenkins, NA and Zurawski, G (1993). Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J. Immunol.* 136: 2348.

Mc Niece, IK, Langley, KE and Zsebo, KM (1991). Recombinant human Stem cell factor synergies with GM-CSF, G-SCF, IL-3 and EPO to stimulate human progenitor cells of myeloid and erythroid lineages. *Exp. hematol.* 19: 226.

McFadden, HJ and Koshland, ME (1991). Interleukin 2- and interleukin 5-induced changes in the binding of regulatory factors to the J chain gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 11027.

McGhee, JR, Mestecky, J, Elson, O and Kiyono, H (1989). Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* 9: 175.

McKnight, AJ, Zimmer, GJ, Fogelman, I, Wolf, SF and Abbas, AK (1994). Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J. Immunol* 152: 2172.

Melani, C, Mattia, GF, Silvani, A, Carè, A, Rivoltini, L, Parmiani, G and Colombo, MP (1993). Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood* 81: 2744.

Mestecky, J and Mc Ghee, JR (1987). Immunoglobulin A (IgA) : molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40: 153.

Metcalf, DD, Gadek, JE, Raphael, DG, Frank, MM, Kaplan, A and Kaliner, M (1977). Human eosinophil adherence to serum-treated sepharose : granule associated enzyme release and requirement for activation of the alternative complement pathway. *J. Immunol* 119: 1744.

Metzger, WJ, Richerson, HB, Worden, K, Monick, M and Hunninghake, GW (1986). Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. *Chest.* 89: 477.

Michalaki, H, Nicolas, JF, Kanitakis, J, Machado, P, Roche, P and Thivolet, J (1991). T cells in bullous pemphigoid. Presence of activated CD4+ T cells at the basement membrane zone in pre- and peribullous skin. *Regional Immunol* 3: 151.

Michalaki, H, Nicolas, JF, Gaucherand, M, Thivolet, J, Hercend, T and Ferradini, L (1992). In situ preferential usage of Va8 T cell receptor gene segments in a patient with bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* 98: 839.

Migita, M, Yamaguchi, N, Mita, S, Higuchi, S, Hitoshi, Y, Yoshida, Y, Tomonaga, M, Matsuda, I, Tominaga, A and Takatsu, K (1991). Characterisation of the human IL-5 receptors on eosinophils. *Cell. Immunol.* 133: 484.

Migliacco, G, Migliacco, AR, Valinsky, J, Langley, K, Zsebo, K, Visser, JWM and Adamson, JW (1991). Stem Cell Factor induces proliferation and differentiation of highly enriched murine hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7420.

Mihm, MC, Soter, NA, Dvorak, HF and Austen, KF (1976). The structure of normal skin and morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 67: 305.

Miyasato, M, Tsuda, S, Kasada, M, Iryo, K and Sasai, Y (1989). Alteration in the density, morphology, and biological properties of eosinophils produced by bullous pemphigoid blister fluid. *Arch. Dermatol Res* 281: 304.

Montefort, S, Gratiou, C, Goulding, D, Polosa, R, Haskard, DO, Howarth, PH, Holgate, ST and Carroll, MP (1994). Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte -endothelial cell adhesion molecules in 6 hours after

local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J. Clin. Invest.* 93: 1411.

Monteiro, RC, Kubagawa, H and Cooper, MD (1990). Cellular distribution, regulation and biochemical nature of Fc α receptor in humans. *J. Exp. Med.* 171: 597.

Monteiro, RC, Hostoffer, RW, Kubagawa, H and Cooper, JR (1993). Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J. Clin. Invest.* 92: 1681.

Moqbel, R, MacDonald, AJ, Cromwell, O and Kay, AB (1990). Release of leukotriene C₄ (LTC₄) from human eosinophils following adherence to IgE and IgG-coated schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Immunology* 69: 435.

Moqbel, R, Hamid, Q, Ying, S, Barkans, J, Hartnell, A, Tsicopoulos, A, Warlaw, AJ and Kay, AB (1991). Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J Exp Med.* 174: 749.

Moqbel, R, Lacy, P and Levi-Schaffer, F (1993). Interleukin-6 as a granule-associated pre-formed mediator in peripheral blood eosinophils (PBE) from asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 149: A836.

Moqbel, R, Levi-Schaffer, F and Kay, AB (1994). Cytokine generation by eosinophils. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 94: 1183.

Moser, R, Kehr, J and Bruijnzeel, PBL (1992). IL-4 controls the selective endothelium driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 149: 1432.

Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA and Coffman, RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348.

Mossmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA and Coffman, RL (1993). Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348.

Mostov, KE, Friedlander, M and Blobel, G (1984). Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311: 71.

Mudde, GC, Van Reijssen, FC and Boland, GJ (1990). Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 69: 335.

Mudde, GC, Van Reijssen, FC and Bruijnzeel-Koomen, CA (1992). IgE-positive Langerhans cells and TH2 allergen-specific T cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 99: 103.

Murata, Y, Takasi, S, and Migita, YK (1992). Molecular cloning and expression of the human Interleukin-5 receptor. *J. Exp. Med.* 175: 341.

Murray, HW, Spitalny, GL and Nathan, CF (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-g. *J Immunol* 134: 1619.

Murray, HW (1990). Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation, and antimicrobial host defense. In vitro, in animal models, and in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 411.

Musashi, M, Yang, YC, Paul, SR, Clark, SC, Sudo, T and Ogawa, M (1991(a)). Direct and synergistic effects of IL-11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 765.

Musashi, M, Clark, SC, Sudo, T and Ogawa, M (1991(b)). Synergistic interactions between interleukin-11 and Il-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 78: 1448.

Müller, S and Hoover, RG (1985). T cell with Fc receptors in myeloma : suppression of growth and secretion of MOPC-315 by Ta cells. *J. Immunol.* 134: 644.

Naito, K, Morioka, S and Ikeda, S (1984). Experimental bullous pemphigoid in guinea pigs : the role of pemphigoid antibodies, complement, and migrating cells. *J Invest Dermatol* 82: 227.

Nally, FF (1984). The sore mouth : A review. *J R Soc Med* 77: 50.

Neeley, SP, Hamann, KJ, White, SR, Baraowski, SL, Burch, RA and Leff, AR (1993). Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VL4 on human eosinophils and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8: 633.

Nestor, MS, Cochran, AJ and Ahmed, AR (1987). Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. *J Invest Dermatol* 88: 172.

Neusser, E (1892). Klinisch-haematologische mittheilungen. *Wien. Klin. Wochenschr.* 5: 41.

Nicolas, JF, Michalaki, H and Demidem, A (1991). Récepteurs à l'antigène des lymphocytes T. In : Thivolet, J., Faure, M., Schmitt, D., eds. Implication dans les dermatoses inflammatoires et auto-immunes. *Biologie de la peau. Colloque INSERM.* 104: 35.

Nicolas, JF, Michalaki, H, Peyron, E, Machado, P, Cozzani, E and Schmitt, D (1993). Pathologie acquise de la jonction dermo-épidermique. *Médecine/Sciences* 9: 376.

Nieboer, C and Van Leeuwen, HJE (1980). IgE in the serum and on mast cells in bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol.* 116: 555.

Nishioka, K, Hashimoto, K and Katayama, I (1984). Eosinophilic spongiosis in bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 120: 1116.

Noro, N, Adachi, M, Yasuda, K, Masuda, T and Yodoi, J (1986). Murine IgA binding factors (IgA-BF) suppressing IgA production : Characterization and target specificity of IgA-BF. *J. Immunol.* 136: 2910.

Ogawa, M (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844.

Ohno, I, Lea, R, Finotto, S, Marshall, J, Denburg, J, Dolovich, J, Gauldie, J and Jordana, M (1991). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene expression by eosinophils in nasal polyposis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 505.

Ojima-Ushiyama, A, Masuzawa, Y, Sugiura, T, Waku, K, Fukuda, T and Makino, S. Production of platelet-activating factor by human normodense and hypodense eosinophils. *Lipids* : in Press.

Opie, EL (1904). An experimental study of the relation of cells with eosinophil granulation to infection with an animal parasite. *Am. J. Med. Sci.* 127: 477.

Ortonne, JP (1992). La jonction dermo-épidermique et sa pathologie acquise et héréditaire. *Path. Biol.* 40: 121.

Owen, WF, Rothenberg, ME, Silberstein, DS, Gasson, JC, Stevens, RL, Austen, KF and Soberman, RJ (1987). Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte : macrophage colony-stimulating factor in presence of 3T3 fibroblasts. *J. Exp. Med.* 166: 129.

Owen, WF, Rothenberg, ME, Peterson, J, Weller, PF, Silberstein, D, Sheffer, AL, Stevens, RL, Soberman, RJ and Austen, KF (1989). Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J Exp Med* 170: 343.

Owen, WF, Peterson, J, Sheff, DM, Folkert, RD, Anderson, RJ, Corson, JM, Sheffer, AL and Austen, KF (1990). Hypodense eosinophils and IL-5 activity in the blood of patients with the eosinophilia-myalgia syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87: 8647.

Paganelli, R, Fanales-Belasio, E and Carmini, D (1991). Serum eosinophil cationic protein in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96: 175.

Paganelli, R, Scala, E, Ansotegui, IJ, Mezzaroma, I, Pinter, E, Ferrara, R, D'Offizi, GP and Aiuti, F (1993). Hyper-IgE syndrome induced by HIV infection. *Immunodeficiency* 4: 149.

Paganelli, R, Scala, E, Ansotegui, IJ, Aussielo, CM, Halapi, E, Fanales-Belasio, E, D'Offizi, G, Mezzaroma, I, Pandolfi, F, Fiorilli, M, Cassone, A and Aiuti, F (1995). CD8+ T Lymphocytes Provide Helper Activity for IgE Synthesis in Human Immunodeficiency Virus-infected Patients with Hyper-IgE. *J. Exp. Med.* 181: 423.

Panterne, B, Zhou, YQ, Hatzfeld, J, Li, ML, P., LJ, Clark, SC and Hatzfeld, A (1993). CSF-1 control of c-fms expression in normal human bone marrow progenitors. *J Cell Physiol.* 155: 282.

Park, LS, Friend, D, Price, V, Anderson, D, Singer, J, Prickett, KS and Urdal, DL (1989). Heterogeneity in human Interleukin-3 receptors. *J. Biol. Chem.* 264: 5420.

Parrillo, JE, Fauci, AS and Wolff, SM (1978). Therapy of hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med.* 89: 167.

Parrillo, JE, Lawley, TJ, Frank, MM, Kaplan, AP and Fauci, AS (1979). Immunologic reactivity in the hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 64: 113.

Pearce, EJ and Sher, A (1991). Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 73: 110.

Pearce, EJ, Caspar, P, Grzych, JM, Lewis, FA and Sher, A (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173: 159.

Peters, MS, Gleich, GJ, Dunnette, SL and Fukuda, T (1988). Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome : a morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* 71: 780.

Petry, E (1912). Die Zusammensetzung der eosinophilen granula des Pferderknochenmarks. *Biochem. Z.* 38: 92.

Philips, JO, Everson, MP, Moldoveanu, Z, Lue, C and Mestecky, J (1990).

Synergistic effect of Il-4- and IFN-g on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J. Immunol.* 145: 1740.

Pincus, SH, Schooley, WR, Dinapoli, AM and Broder, S (1981). Metabolic heterogeneity of eosinophils from normal and hypereosinophilic patients. *Blood* 58: 1175.

Plaut, M, Pierce, JH, Watson, CJ, Hanley-Hyde, J, Nordan, RP and Paul, WE (1989). Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature* 339: 64.

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

Plumas, J (1992). Bases moléculaires du développement de l'éosinophilie dans les syndromes hyperéosinophiliques. *Thèse*.

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

Prin, L, Charron, J, Capron, M, Gosset, P, Taelman, H, Tonnel, AB and Capron, A (1984). Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 735.

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

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

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

Purkayastha, S, Rao, CVN and Lamm, ME (1979). Structure of carbohydrate chain of free secretory component from human milk. *J. Biol. Chem.* 254: 6583.

Quan, SF, Sedgwick, JB, Nelson, MW and Busse, WW (1993). Corticosteroid resistance in eosinophilic gastritis. relation to in vitro eosinophil survival and interleukin 5. *Ann. Allergy.* 70: 256.

Raghavachar, A, Fleischer, S, Frickhofen, N, Heimpel, H and Fleischer, B (1987). T-lymphocyte control of human eosinophilic granulopoiesis : clonal analysis in an idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J Immunol* 139: 3753.

Ramalho-Pinto, FJ, McLaren, DJ and Smithers, SR (1978). Complement-mediated killing of schistosomula of schistosoma mansoni by rat eosinophils in vitro. *J. Exp. Med.* 147: 147.

Rand, TH, Silberstein, DS, Kornfeld, H and Weller, PF (1991). Human eosinophils express functional interleukin-2 receptors. *88*: 825.

Ravetch, JV and Perussia, B (1989). Alternative membrane forms for Fc-γRIII(CD16) of

human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170: 481.

Reinbach, G (1893). Über das Verhalten der Leukocyten bei malignen Tumoren. *Arch. Klin. Chir.* 46: 486.

Riedel, D, Lindemann, A, Brach, M, Mertelsmann, R and Herrmann, F (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce surface expression of interleukin-2 receptor p55 chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* 70: 258.

Roberts, M, Butterworth, AE, Kimani, G, Kamau, T, Fulford, A, Dunne, DW, Ouma, JH and Sturrock, RF (1993). Immunity after treatment of human Schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immun* 61: 4984.

Rocha, C, de Maubeuge, J, Sarfati, M, Song, M and Delespesse, G (1984). Characterization of cellular infiltrates in skin lesions of atopic eczema. *Dermatologica* 169: 330.

Romagnani, S (1992). Human TH1 and TH2 subsets : regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 98: 279.

Romagnani, S, Del Prete, GF, Maggi, E and Ricci, M (1993). TH1 and TH2 cells and their role in disease. *ACI News* 5: 19.

Roman, S, Moore, JS, Darby, C, Müller, S and Hoover, RG (1988). Modulation of Ig gene expression by Ig binding factors. Suppression of a-H chain and I-2-L chain mRNA accumulation in mopc-315 by IgA-binding factor. *J. Immunol.* 140: 3622.

Rothenberg, ME, Owen, WF, Silberstein, DS, Soberman, RJ, Austen, KF and Stevens, RL (1987). Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science* 237: 645.

Rothenberg, ME, Petersen, JE, Stevens, RL, Silberstein, DS, Sobermann, RJ, Austen, KF and Stevens, RL (1988). Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J. Clin. Invest* 81: 1986.

Rothenberg, ME, Peterson, JE, Stevens, RL, Silberstein, DS, McKenzie, DT, Austen, KF and Owen, WF (1989). IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J. Immunol.* 143: 2311.

Rytoma, T (1960). Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 50 (Suppl 140): 1.

Saeland, S, Caux, C, Favre, C, Duvert, V, Pebusque, MJ, Mannoni, P and De Vries, JE (1989). Combined and sequential effects of human IL-3 and GM-CSF on the proliferation of CD34-positive hematopoietic cells from cord blood. *Blood* 66: 1233.

Saito, H, Hatake, K, Dvorak, AM, Leiferman, KM, Donnenberg, AD, Arai, N, Ishizaka, K and Ishizaka, T (1988). Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2288.

Sakaguchi, M, Sato, T and Groopman, JE (1991). Human immunodeficiency virus infection of megakaryocytic cells. *Blood* 77: 481.

Sakai, H, Miyazaki, M, Endoh, M and Nomoto, Y (1989). Increase of IgA-specific

switch T cells in patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 67: 14.

Sanderson, CJ, O'Garra, AO, Warren, DJ and Klauss, GG (1986). Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity : proposed name Interleukin-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 437.

Sanderson, CJ (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79: 3101.

Savill, J, Fadok, V, Hensen, P and Haslett, C (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol.Today* 14: 131.

Schaller, J, Giese, T, Ladusch, M and Haustein, UF (1990). Interleukin-2 receptor expression and interleukin-2 production in bullous pemphigoid. *Arch. Dermatol. Res.* 282: 223.

Schlecht, H and Schwenker, G (1912). Über lokale Eosinophilie in den Bronchien und in der Lunge anaphylaktischer Meerschweinschen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 68: 163.

Schleimer, RP, Benenati, SV, Friedman, B and Bochner, BS (1991). Do cytokines play a role in leukocyte recruitment and activation in the lungs ? *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 1169.

Schrezenmeier, H, Thome, SD, Tewald, F, Fleischer, B and Raghavachar, A (1993). Interleukin 5 is the predominant eosinophilopoietin produced by cloned T lymphocytes in hypereosinophilic syndrome. *Exp Hematol* 21: 358.

Scott, P, Pearce, E and Cheever, AW (1989). Role of cytokines and CD4+ T cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* 112: 161.

Seder, RA and Le Gros, GG (1995). The Functional Role of CD8+ T Helper Type 2 Cells. *J Exp Med* 181: 5.

Sedgwick, J, Frick, W, Sondel, P, Hank, J, Borden, E and Busse, W (1990). The appearance of hypodense eosinophils during interleukin 2 treatment. *J. Allergy Clin. Immunol* 85: 557.

Segwick, JB, Frick, WE, Sondel, PM, Hank, JA, Borden, E and Busse, WW (1990). The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85: 557.

Shaw, RJ, Walsh, GM, Cromwell, O, Moqbel, R, Spry, JF and Kay, AB (1985). Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature* 316: 150.

Shen, L, Lasser, R and Fanger, MW (1989). My 43, a monoclonal antibody that react with human myeloid cells inhibits monocyte IgA binding and triggers function. *J. Immunol.* 143: 4117.

Shult, PA, Lega, M, Jadidi, S, Vrtis, R, Warner, T, Graziano, FM and Busse, WW (1988). The presence of hypodense eosinophils and diminished chemiluminescence response in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81: 429.

Silberstein, DS and David, JR (1987). The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunol.Today* 8: 380.

Silberstein, DS, Schoof, DD, Rodrick, ML, Tai, P, Spry, CJF, David, JR and Eberlein, TJ (1989). Activation of eosinophils in cancer patients treated with IL-2 and IL-2 generated lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* 142: 2162.

Simmons, D and Seed, B (1988). The Fcγ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 339: 568.

Simon, H and Blaser, K (1995). Inhibition of programmed eosinophil death : a key pathogenic event for eosinophils ? *Immunol.Today* 16: 53.

Smith, H, Barker, JNWN and Lee, TH (1993). Adhesion molecules in allergic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148(suppl): S75.

Soloman, A (1981). Current development in immunoglobulins. *Contemp. Hematol. Oncol.* 2: 399.

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

Soter, NA (1989). Morphology of atopic eczema. *Allergy* 44: 16.

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

Spry, CJF and Tai, PC (1976). Studies on blood eosinophils. II. Patients with Loeffler's cardiomyopathy. *Clin. Exp. Immunol.* 24: 423.

Spry, CJF (1987). Eosinophils and endomyocardial fibrosis : a review of clinical and experimental studies 1980-86, in Pathogenesis of Myocarditis and cardiomyopathy : Recent Experimental and Clinical Studies : Cardiomyopathie update. 1. Kawai, C and Abelmann, W. A., Eds , University of Tokyo Press. : 293.

Spry, CJF (1988). Eosinophils. A Comprehensive Review and guide to the Scientific and Medical Literature. *Oxford University Press* : 484.

Spry, CJF, Ed (1988). Eosinophil activation , cytotoxicity and interactions in Eosinophils : A comprehensive review and Guide to the Scientific and Medical Literature. Oxford University Press : 103.

Srivatsan, J, Smith, DF and Cummings, RD (1992). The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen. *Parasitology* 108: 433.

Stahle-Backdahl, M, Inoue, M, Giudice, GJ and Parks, CW (1994). 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J. Clin. Invest.* 93: 2022.

Steinbach, KH, Schick, P, Trepel, F, Raffler, H, Dohrmann, J, Heilgeist, G, Hetezl, W, Li, K, Past, W, Van der Woerd de Lange, JA, Thöml, H, Fliedner, TM and Begemann, H (1979). Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic and basophilic granulocytes in human blood. *Blut* 39: 27.

Stern, M, Meagher, L, Savill, J and Haslett, C (1992). Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophils leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J Immunol* 148: 3543.

Stevens, RL and Austen, KF (1989). Recent advances in the cellular biology of mast cells.

Immunol.Today. 10: 381.

Stewart, WW and Kerr, MA (1990). The specificity of the human neutrophil IgA receptor (Fc alpha R) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2. *Immunol.* 71: 328.

Sugai, T, Sakiyama, Y and Matumoto, S (1992). Eosinophilic cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 22: 275.

Sugiura, H and Uehara, M (1993). Mitosis of mast cells in skin lesions of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (stockh)* 73: 296.

Tai, PC, Bakes, DM, Barkans, JR and Spry, CJF (1985). Plasma membrane antigens on light density and activated human blood eosinophils. *Clin Exp Immunol.* 60: 427.

Takaki, S, Tominaga, A, Hitoshi, Y, Mita, S, Sonoda, E, Yamaguchi, N and Takatsu, K (1990). Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor. *EMBO J.* 9: 4367

Takansky, S, Nonaka, R, Xing, Z, O'Byrne, P, Dolovich, J and Jordana, M (1994). Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J. Exp. Med.* 180: 711.

Takaue, Y, Kawano, Y, Reading, CL, Watanabe, T, Abe, T, Nimomiya, T, Shimizu, E, Ogura T, Kuroda, Y, Yokobayashi, A, Nakahata, T, Asano, S and Ventura, G (1990). Effects of recombinant human G-CSF, GM-CSF, IL-3 and IL-1a on the growth of purified human peripheral blood progenitors. *Blood* 76: 330.

Tanaka, Y, Delaporte, E, Dubucquoi, S, Soussi-Gounni, A, Porchet, E, Capron, M and Capron, A (1994). Interleukin-5 messenger RNA and immunoreactive protein expression by activated eosinophils in lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. dermatol.* 103: 589.

Tavernier, J, Devos, R, Cornelis, S, Tuypens, T, Van der Heyden, J, Fiers, W and Plaetinck, G (1991). A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL-5-specific a chain and b chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 66: 1175.

Thompson-Snipes, L (1991). Interleukin-10 : a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 173: 507.

Till, JE, Mc Culloch, EA and Siminovitch, L (1964). A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 29.

Tite, JP, Powell, MB and Ruddle, NH (1985). Protein-antigen specific Ia-restricted cytolytic T cells : analysis of frequency, target cell susceptibility, and mechanism of cytolysis. *J Immunol* 135: 25.

Tomassini, M, Tsicopoulos, A, Tai, PC, Gruart, V, Tonnel, AB, Prin, L and Capron, A (1991). Release of granule proteins by eosinophils from allergic and non-allergic patients with eosinophilia upon immunoglobulin-dependent activation. *J. Immunol.* 137: 1659.

Tominaga, A, Takatsu, K and Hamaoka, T (1980). Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). II. X-linked gene control for the expression of TRF-acceptor site(s) on B lymphocytes and preparation of specific antiserum to that acceptor. *J Immunol.* 124: 2423.

Torpier, G, Colombel, JF and Mathieu-Chandelier, C (1988). Eosinophilic

gastroenteritis : ultrastructural evidence for a selective for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin. Exp. Immunol.* 74: 404.

Truong, MJ, Gruart, V, Kusnierz, JP, Liu, FT, Prin, L, Capron, A and Capron, M (1993). IgE-binding molecules (Mac2/eBP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 23: 3230.

Tsuda, S, Kato, K, Miyasato, M and Sasai, Y (1992). Eosinophil involvement in atopic dermatitis as reflected by elevated serum levels of cationic protein. *J Dermatol* 19: 208.

Tsuda, S, Miyasato, M, Iryo, K, Nakama, T, Kato, K and Sasai, Y (1992). Eosinophil phenotypes in bullous pemphigoid. *J Dermatol.* 19: 270.

Underdown, BJ and Dorrington, KJ (1974). Studies on the structural and conformational basis for the relative resistance of serum and secretory immunoglobulin A to proteolysis. *J. Immunol.* 112: 949.

Underdown, BJ and Schiff, JM (1986). Immunoglobulin -A : strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 389.

Vadas, MA, David, J, Butterworth, AE, Pisani, NT and Siongok, TA (1979). A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 122: 1228.

Vadas, MA, David, JR, Butterworth, AE, Houba, V, David, L and Pisani, NT (1979 (a)). Comparison of the ability of eosinophils and neutrophils, and eosinophils from patients with *S. mansoni* infection and normal individuals, to mediate in vitro damage to schistosomula of *S. mansoni*. *Adv. Exp. Med. viol.* 114: 677.

Vadas, MA, Butterworth, AE, Sherry, B, Dessein, A, Hogan, M, Bout, D and David, JR (1980(b)). Interactions between human eosinophils and schistosomula of *S. mansoni*. I. Stable and irreversible antibody dependent adherence. *J. Immunol.* 124: 1441.

Van Leeuwen, BH, Martison, ME, Webb, GC and Young, IG (1989). Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* 73: 1142.

Vercauteren, R and Peeters, G (1952). On the presence of an antihistaminicum in isolated eosinophilic granulocytes. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 89: 10.

Vercauteren, R (1953). The properties of isolated granules from blood eosinophils. *Enzymologia* 16: 1.

Vijayan, V, Kuppurao, KV, Venkatesan, P, Sankaran, K and Prabhakar, R (1990). High levels of soluble interleukin-2 receptor in the serum of 30 patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 74: 233.

Von Lichtenberg, F, Sher, A, Gibbons, N and Doughty, BL (1976). Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *S.mansoni*. *Am. J. Pathol.* 84: 479.

Walker, F, Nicola, NA, Metcalf, D and Burgess, AW (1985). Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 43: 269.

Walker, C, Bode, E, Boer, T, Hansel, TT, Blaser, K and Virchow, JC (1992). Allergic and non-allergic asthmatics have distinct patterns of Tcell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 109.

Walle, AS and Parwaesh, MR (1979). Estimation of effective eosinopoiesis and bone marrow eosinophil reserve capacity in normal man. *Cell Tissue Kinet* 12: 249.

Walsh, GM, Mermod, JJ, Hartnell, A, Kay, AB and Wardlaw, AJ (1991). Human eosinophil, but not neutrophil adherence to IL-1 stimulated human umbilical vascular endothelial cells is a4b1 (very late antigen 4) dependent. *J. Immunol.* 146: 3419.

Walsh, LJ, Trinchieri, G, Waldorf, HA, Whitaker, D and Murphy, GH (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4220.

Waneck, GL, Stein, E and Flavell, RA (1988). Conversion of PI-anchored protein to an integral membrane protein by a single amino acid mutation. *Science* 241: 187.

Wardlaw, AJ, Moqbel, R, Cromwell, O and Kay, AB (1986). Platelet-activating factor, a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 78: 1701.

Warren, DJ and Moore, MAS (1988). Synergism among interleukin 1, interleukin 3, and interleukin 5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 140: 94.

Weller, PF and Goetzl, EJ (1979). The regulatory and effector roles of eosinophils. *Adv. Immunol.* 27: 339.

Weller, PF (1991). The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* 324: 1110.

Weller, PF, Rand, TH, Goetzl, SE, Chi Rosso, G and Lobb, RR (1991). Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7430.

Weller, PF, Rand, TH, Barret, Elovic, A, Wong, DTW and Finberg, RW (1993). Accessory cell function of human eosinophils : HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen presentation and IL- α expression. *J Immunol.* 150: 2554.

White, CJ, Maxwell, CJ and Gallin, JI (1986). Changes in the structural and functional properties of human eosinophils during experimental hookworm infection. *J. Infect. Dis.* 154: 778.

Wierenga, EA, Snoek, M, deGroot, C, Chretien, I, Bos, JD, Jansen, HK and Kapsenberg (1990). Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.* 144: 4651.

Williams, AF and Barclay, AN (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 141: 2807.

Winqvist, I, Olofsson, T, Olsson, I, Persson, A and Hallberg, T (1982). Altered density metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology* 47: 531.

Wintroub, BU, Mihm, MC and Coetzl, EJ (1978). Morphologic and functional evidence for release of mast-cell products in bullous pemphigoid. *N Engl J Med.* 298: 417.

Wittig, HJ, Belloit, J, Fillipi, ID and royal, G (1980). Age-related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 66: 201

Wong, DTW, Weller, PF, Galli, SJ, Elovic, A, Rand, TH, Gallagher, GT, Chiang, T, Chou, MY, Matossian, K, McBride, J and Todd, R (1990). Human eosinophils express transforming growth factor α . *J. Exp. Med.* 172: 673.

Wong, DTW, Elovic, A, Matossian, K, Nagura, N, McBride, J, Chou, MY, Gordon, JR, Rand, TH, Galli, SJ and Weller, PF (1991). Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming factor b1. *Blood* 78: 2702.

Wu, CY, Demeure, C, Kiniwa, M, Gately, M and Delespesse, G (1993). IL-12 induces the production of IFN γ by neonatal human CD4 T cells. *J. Immunol.* 151: 1938.

Yamamura, M (1991). Defining protective responses to pathogens : cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277.

Yamguchi, Y, Suda, T, Ohta, S, Tominaga, K, Miura, Y and Kasahara, T (1991). Analysis of the survival of mature human eosinophils : interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood* 78: 2542.

Yodoi, J, Ishizaka, T and Ishizaka, K (1979). Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. II. Induction of Fc receptors bearing rat lymphocytes by IgE. *J. Immunol.* 123: 455.

Yodoi, J and Ishizaka, K (1980). Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. IV. Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. *J. Immunol.* 124: 1322.

Yodoi, J, Adachi, M and Masuda, T (1982). Induction of Fc α R on murine lymphocytes by IgA in vitro. *J. Immunol.* 128: 888.

Yodoi, J, Adachi, M, Teshiga Wara, K, Miyamainaba, M, Masuda, T and Fridman, WH (1983). T cell hybridomas coexpressing Fc receptors (FcR) for different isotypes. II. IgA-induced formation of suppressive IgA binding factor(s) by a murine T hybridoma bearing Fc γ R and Fc α R. *J. Immunol.* 131: 303.

Yodoi, J, Adachi, M and Noro, N (1987). IgA binding factors for IgA : Comparative studies between IgA and IgE Fc receptor systems. *Intern. Rev. Immunol.* 2: 117.

Zachary, CB, Allen, MH and MacDonald, DM (1985). In situ quantification of T-lymphocyte subsets and Langerhans cells in the inflammatory infiltrate of atopic eczema. *Br J Dermatol* 112: 149.

Zikan, J, Novotny, J, Trapane, TL, Khoshland, ME, Urry, DW, Benett, JC and Mestecky, J (1985). Secondary structure of the immunoglobulin J chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5905.

Zillikens, D, Schuessler, M, Dummer, R, Porzolt, F, Hartmann, AA and Burg, G (1992). Tumour necrosis in blister fluids of bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol* 2: 429.

Zittoun, J, Farcet, JP, Marquet, J, Sultan, C and Zittoun, R (1984). Cobalamin (vitamin B12) and B12 binding proteins in hypereosinophilic syndromes and secondary eosinophilia. *Blood*. 63: 779.