

N° d'ordre :

Sophie NUTTEN

**Thèse de Doctorat en
Sciences de la Vie et de la Santé
- Immunologie -**

**ROLE DES MOLECULES D'ADHERENCE DANS LES
INTERACTIONS HOTE-PARASITE AU COURS DE LA
SCHISTOSOMIASE**

Présentée et soutenue publiquement devant la commission d'examen composée de:

Président	Mr le Professeur A. VERBERT
Rapporteurs	Mme le Docteur N. HAEFFNER-CAVAILLON Mme le Docteur M. PRETOLANI
Examineurs	Mr le Docteur C. AURIAULT Mr le Professeur M. GOLDMAN
Directeur de thèse	Mme le Professeur M. CAPRON



**A mes parents,
merci d'avoir toujours été là.**

**A Nath,
pour notre complicité.**

Remerciements

A Monsieur le Professeur André Verbert,
pour avoir accepté de présider au jury de ma thèse.

A Madame le Professeur Monique Capron,
pour m'avoir accueillie dans son groupe, et qui par son dynamisme m'a beaucoup aidée à la réalisation de ce travail. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Claude Auriault,
pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Michel Goldman,
pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

A Mesdames les Professeurs Marina Pretolani et Nicole Haeffner-Cavaillon,
pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

A Monsieur le Professeur André Capron,
pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

A tous les membres du laboratoire,
pour m'avoir « prêter » l'ordinateur du labo et m'avoir permis de « squater » deux bureaux !
Pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant ces quatre années.

A François,
pour ton aide scientifique précieuse.

A Gaëtane,
pour nos soirées labo lors de mon apprentissage du « nouveau FACS », et surtout, pour ta disponibilité...et ton oeil de lynx...!!

A Jean-Paul,
pour ta gentillesse et pour ton aide lors de mes premiers pas dans le labo !

A Sylvie,
pour les « purif d'éos », qui m'ont fait gagner beaucoup de temps précieux !

A Eric et Véro,
pour leur bonne humeur communicative.

A Kader,
pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces années. Pour nos longues discussions et nos moments de détente...

A Estelle,
pour tous les moments passés ensemble. Merci encore pour ta patience devant Photoshop et Power Point !

A Isa et Olivier,
pour notre collaboration et nos discussions enrichissantes.

A Suzanne, Michèle, Monique, Anita et Isabelle,
pour l'entretien du cycle parasitaire qui m'a permis de faire toutes ces manips.

A Jean-Marc et Arnaud,
pour les photos, les scans, les diapos qu'il me fallait en général « le plus rapidement possible »!

A Maria, Nadine, Charlotte, Monique, Pilou, et Chantal,
que j'ai beaucoup sollicitées, en particulier ces derniers mois...!

A Myriam et Nicole,
pour votre accueil agréable dès 8 heures du matin !

A Marina,
en souvenir de nos moments partagés.

A François,
pour avoir admiré mes « pizzas » et écouté avec attention mes histoires de « Zéosinophiles » !!
Pour m'avoir supportée avec patience pendant ces années Pasteuriennes, et avoir partagé avec moi la joie des manips qui marchent...et la déception de celles qui ne marchent pas...!!

A Edwige, Bruno, Karine, Laurent, Jean, Nancy, Laurent, Anne et Olivier,
pour m'avoir rappelé dans les moments difficiles qu'on ferait la fête après la thèse !!

A Sarah,
pour ton entrain et ton dynamisme.
En souvenir de nos folles années Lyonnaises !

A Françoise et Albert,
pour votre générosité débordante...
Et pour le coca réparateur du samedi midi !!

A ma grand-mère,
pour ta gentillesse...

A Nath,
pour ta joie de vivre, pour toutes les richesses que tu m'apportes.
Pour tout le reste..., merci.

A mes parents,
pour tout ce que vous me donnez.
Merci de m'avoir encouragée dans cette voie et m'avoir appris à ne pas baisser les bras devant la
difficulté...

A tous ceux que je ne cite pas, mais qui m'ont aidé, d'une façon ou d'une autre...

Table des matières

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	7
INTRODUCTION GENERALE	9
Chapitre 1: Les molécules d'adhérence	11
1- Description des molécules d'adhérence	13
I- Les sélectines.....	13
A- La sélectine E.....	13
B- La sélectine P.....	14
C- La sélectine L.....	14
D- Les ligands des sélectines.....	15
1- Les carbohydrates	
2- Les ligands de la sélectine L	
3- Les ligands de la sélectine P	
4- Les ligands de la sélectine E	
E- Fonction des sélectines.....	20
II- Les intégrines.....	20
A- Les $\beta 1$ intégrines.....	22
B- Les $\beta 2$ intégrines.....	22
C- Les $\beta 7$ intégrines.....	23
D- Fonction des intégrines.....	25
III- La super famille des immunoglobulines.....	25
A- Les ICAMs.....	25
B- VCAM-1.....	26
C- PECAM / CD31.....	26
IV- Les protéines « mucine-like ».....	28
V- Les cadhérines.....	28
2- Principales fonctions des molécules d'adhérence	29
I- Rôle structurel.....	29
II- La migration des leucocytes.....	30
A- Description du phénomène.....	30
B- Migration transendothéliale des leucocytes.....	34
1- Roulement/fixation	
2- Activation	
3- Adhésion forte	
4- Migration transendothéliale	
C- Recrutement des lymphocytes à des sites particuliers.....	36
1- Ganglions périphériques	
2- Tissus associé à l'intestin	
3- Peau	
D- Recrutement des leucocytes lors d'une inflammation.....	37
E- Conclusion.....	38
III- L'activation des cellules T.....	40
IV- Rôle des molécules d'adhérence dans différentes pathologies.....	40

Chapitre 2: Les éosinophiles.....	42
1- Morphologie et structure.....	44
2- Ontogénèse.....	46
I- Généralités.....	46
II- Les facteurs de croissance.....	48
III- L'éosinopoïèse.....	50
IV- Les cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon.....	51
3- Les médiateurs.....	53
I- Les protéines basiques.....	53
II- Les cytokines.....	55
III- Les radicaux oxygénés.....	57
IV- Les médiateurs lipidiques.....	57
V- Les neuropeptides.....	58
4- Récepteurs et marqueurs de surface.....	60
5- Hétérogénéité des éosinophiles.....	63
6- Fonctions.....	65
I- Cytotoxicité vis-à-vis des larves de schistosomes.....	68
A- ADCC dépendante des IgG.....	68
B- ADCC dépendante des IgE.....	69
C- ADCC dépendante des IgA.....	70
II- Cytotoxicité contre d'autres cibles.....	71
III- Réaction d'hypersensibilité immédiate.....	71
A- Généralités.....	71
B- Les IgE.....	72
C- Les récepteurs des IgE.....	72
D- Les cellules participant à l'inflammation allergique.....	73
 Chapitre 3: La schistosomiase.....	 75
1- cycle évolutif de <i>Schistosoma mansoni</i>	77
2- Défense de l'hôte contre le parasite.....	78
I- Immunité naturelle.....	78
II- Immunité acquise.....	79
A- Réponse humorale.....	79
B- Réponse cellulaire.....	80
C- Mécanismes d'échappement.....	82
1- Le mimétisme moléculaire	
2- Modulation de la réponse immune	
3- Interactions schistosome et cellules endothéliales.....	84
I- Rôle effecteur des cellules endothéliales au cours de la schistosomiase.....	85
II- Rôle des cellules endothéliales dans la néovascularisation.....	85
III- Interaction entre les cellules endothéliales et les oeufs.....	86
4- Molécules d'adhérence et schistosome.....	87
I- Lewis ^x	87
II- ICAM-1, LFA-1 et sélectine L.....	89

MATERIEL ET METHODES.....	91
1- Matériel.....	93
A- Les réactifs.....	93
B- Les anticorps.....	93
C- Les oligosaccharides et les sélectines recombinantes.....	94
2- Méthodes.....	95
A- Les cellules.....	95
a- Purification des éosinophiles humains.....	95
b- Différenciation des éosinophiles à partir de sang de cordon ombilical....	96
c- Purification des plaquettes.....	97
d- Les cellules endothéliales.....	97
e- Lignées cellulaires.....	98
B- Les parasites.....	98
a- Obtention des différents stades larvaires.....	98
b- Préparation des fractions cytosoliques solubles de parasites.....	99
c- Récupération des produits d'excrétion / sécrétion des parasites.....	99
C- Mise en évidence de l'expression de molécules d'adhérence.....	101
a-Sur les éosinophiles.....	101
Principe du QIFIKIT	
Eosinophiles de sang périphériques	
Eosinophiles en cours de différenciation	
b- Sur les cellules endothéliales.....	103
Cell-ELISA	
Extracion d'ARNm et Northern-Blot	
c-Sur les parasites.....	104
Immunofluorescence sur schistosomules entiers	
Immunomarquage enzymatique sur coupes	
Méthode immunoenzymatique sur extraits parasitaires	
D- Mise en évidence de la liaison de la sélectine P aux éosinophiles et aux schisto- somules.....	106
a- Biotinylation des sélectines solubles.....	106
b- Cytométrie en flux.....	106
c- Immunomarquage.....	106
d- Méthode immunoenzymatique sur extraits parasitaires.....	107
E-Expériences de cytotoxicité.....	107
a- ADCC dépendante des éosinophiles.....	107
b-ADCC dépendante des plaquettes.....	108
c- ADCC dépendante d'un seul isotype d'anticorps.....	108
d- Expériences d'inhibition de cytotoxicité.....	108
F- Relargage d'ECP par les éosinopiles.....	109
a- Activation des éosinophiles.....	109
b- Dosage de l'ECP.....	110
G- Test d'adhérence des schistosomules aux cellules endothéliales.....	110
H- Détermination des concentrations en AMPc intracellulaire.....	111
I- Plasmides et transfection des cellules endothéliales.....	111
J- Test d'adhérence en conditions statiques.....	112

RESULTAT 1	
Evolution cinétique des molécules d'adhérence au cours de la différenciation des éosinophiles <i>in vitro</i>	113
Introduction	114
Résultats et discussion	116
1- Suivi de la différenciation <i>in vitro</i> des éosinophiles.....	116
2- Etude quantitative de l'expression des molécules d'adhérence au cours de la différenciation de cellules précurseurs en éosinophiles.....	117
3- Mise en évidence de la fonctionnalité des éosinophiles différenciés <i>in vitro</i>	121
Conclusion	122

RESULTAT 2	
Les interactions sélectine/carbohydrate agissent en tant que co-récepteurs dans l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis des schistosomules de <i>Schistosoma mansoni</i>	125
Introduction	126
Résultats et discussion	128
1- L'ADCC dépendante des éosinophiles vis-à-vis de <i>Schistosoma mansoni</i> est inhibée par des Ac dirigés contre la chaîne α de Mac-1, les sélectines E et L, et le déterminant (s)Lewis ^x	128
2- L'incubation des schistosomules avec des anticorps dirigés contre les sélectine E et P et contre le déterminant Le ^x inhibent l'ADCC.....	130
3- L'ADCC dépendante des éosinophiles est inhibée par les sélectines L et P recombinantes et par des ligands solubles des sélectines.....	132
4- Les interactions sélectine/carbohydrate sont impliquées dans la cytotoxicité dépendante des IgG1 mais pas des IgA.....	134
5- Les Ac dirigés contre le déterminant Le ^x et contre la chaîne α du CD11b inhibent le relargage d'ECP par les éosinophiles.....	135
6- Les interactions sélectine/carbohydrate ne sont pas impliquées dans la cytotoxicité dépendante des plaquettes.....	138
Conclusion	138

RESULTAT 3	
Expression du déterminant Le^x et de molécule(s) de la famille des sélectines par le schistosome	141
Introduction	142
Résultats et discussion	144
1- Les schistosomules expriment des épitopes reconnus par des Ac anti-Le ^x	144
2- Les schistosomules expriment des épitopes reconnus par des Ac anti-sélectines humaines.....	146
3- La sélectine P se lie aux éosinophiles et aux schistosomules.....	148
Conclusion	150
RESULTAT 4	

Regulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les cellules endothéliales par <i>Schistosoma mansoni</i>.....	151
Introduction.....	152
Résultats et discussion.....	154
1- Les schistosomules adhèrent aux cellules endothéliales.....	154
2- Les schistosomules n'induisent pas l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales <i>in vitro</i>	156
3- Les produits d'excrétion / sécrétion des schistosomules induisent une diminution de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α	158
4- La régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les HMVEC-1 stimulées au TNF- α est spécifique du stade larvaire.....	161
5- Les produits ES des schistosomules inhibent l'adhésion VLA-4/VCAM-1 dépendante des cellules HL-60 aux HMVEC-1 stimulées par le TNF- α	161
6- Les produits ES des schistosomules diminuent les taux d'ARNm de la sélectine E et de VCAM-1 des HMVEC-1 stimulés au TNF- α	164
7- Etude du mécanisme impliqué.....	166
Conclusion.....	167
DISCUSSION.....	168
CONCLUSION GENERALE.....	180
BIBLIOGRAPHIE.....	182
PUBLICATIONS.....	197

ABBREVIATIONS

AA	Acide Aminé
Ac	Anticorps
ADCC	Antibody-Dependent Cellular-mediated Cytotoxicity
Ag	Antigène
APC	Antigen Presenting Cell
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BSA	Bovine Serum Albumine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRP	Complement Binding Protein
CSF	Colony Stimulating Factor
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochlorure
DO	Densité Optique
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Eosinophil Peroxydase
ES	Excretory / Secretory
FcR	Récepteur aux immunoglobulines
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Isothiocyanate de Fluoreceine
GAPDH	Glutaraldéhyde Phosphatase Déshydrogénase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor
HBSS	Hank's Balanced Saline Solution
HES	Syndrome Hypereosinophilique
HEV	High Endothelial Veinules
HMVEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial cell
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
kDa	kilo Dalton
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency syndrome
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
MACS	Magnetic Antigen Cell Sorting
MBP	Major Basic Protein
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MLE	Mouse microvascular Lung Endothelial cell line
NIP	5-iodo-4-hydroxyl-3-nitrophenacetyl
OPD	Orthophénylènediamine
PAF	Paraformaldéhyde ou Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Prostaglandine
PM	Poids Moléculaire
SCF	Stem Cell Factor
sFIg	Super famille des Immunoglobulines
SHI	Sérum Humain Immun
SHN	Sérum Humain Normal
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLA	Very Late Antigen

Introduction

Introduction générale

Chez les mammifères, les molécules d'adhérence sont impliquées dans la communication intercellulaire, incluant l'adhésion des cellules entre elles, mais aussi, la transduction de signal. Elles jouent un rôle au cours de réponses biologiques variées telles que l'hémostase, la réparation tissulaire et la réponse immune et inflammatoire.

L'interaction hôte-parasite repose sur un dialogue moléculaire permanent au cours duquel s'expriment les stratégies de survie du parasite et les mécanismes de défense de l'hôte. Ce dialogue se traduit par un échange de facteurs solubles et/ou nécessite un contact direct entre les deux partenaires biologiques.

L'adhésion des parasites aux cellules de l'hôte est assurée généralement par des adhésines, dont certaines présentent des homologies avec les molécules d'adhérence de mammifères. Ces adhésines ne servent pas seulement à l'attachement et/ou à l'invasion des parasites dans les cellules de l'hôte, mais permettent également la communication entre les deux partenaires. Il résulte de cette interaction une stimulation des cellules de l'hôte engendrant une réponse qui peut soit aider à la progression du parasite, soit participer à son élimination.

Au cours de notre travail nous avons étudié le rôle des molécules d'adhérence dans l'interaction hôte/parasite au cours de la schistosomiase. Ce travail visait à mieux comprendre la vie du parasite chez son hôte (adaptation, développement, maturation et migration) mais également à mieux appréhender la réponse immunitaire mise en place par l'hôte en réponse à l'invasion.

La réponse immunitaire dirigée contre le schistosome fait intervenir différents mécanismes effecteurs aboutissant à la destruction des formes larvaires et donc à une réduction de la charge parasitaire. Parmi ces mécanismes, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) est médiée par des cellules effectrices telles que les éosinophiles et les macrophages, et nécessite une reconnaissance et une adhésion des cellules à la cible parasitaire. Cette interaction

induit l'activation des cellules effectrices, et a pour conséquence la libération de molécules cytotoxiques.

Dans un premier temps, nous avons analysé le rôle des molécules d'adhérence dans l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. Cette étude nous a permis de mettre en évidence et d'étudier les molécules d'adhérence exprimées par la cible parasitaire.

Parallèlement à ce modèle d'étude, nous nous sommes attachés à étudier les conséquences immunologiques des interactions schistosome/cellule endothéliale. Le recrutement cellulaire observé au cours du séjour prolongé du parasite dans les microvaisseaux des poumons, nous a incité à étudier l'expression de des molécules d'adhérence endothéliales pulmonaires en réponse à ce parasite. La capacité du schistosome à moduler l'expression de molécules d'adhérence pourrait, en effet, participer à la régulation de l'inflammation observée.

Chapitre I

les molécules d'adhérence

Longtemps considérées comme de simples acteurs de l'adhésion cellulaire, les molécules d'adhérence possèdent des fonctions biologiques importantes et variées. La connaissance de leur structure, des interactions avec leurs ligands respectifs, des mécanismes de signalisation et de régulation, ainsi que de leurs fonctions dans les processus biologiques s'est fortement enrichie ces dernières années.

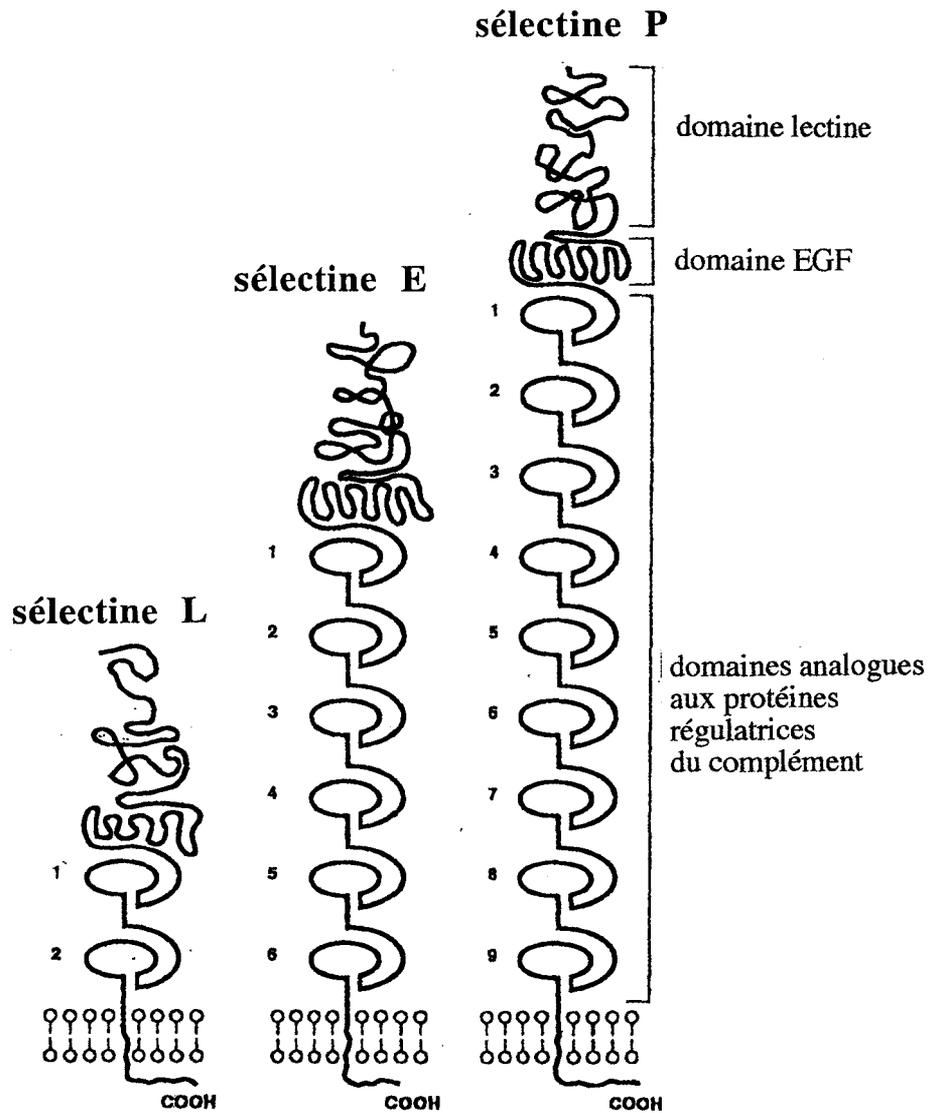
Une grande diversité les caractérise, tant au niveau structural qu'au niveau de leurs implications dans différents processus biologiques. Il est aujourd'hui clairement établi que ce sont des molécules hautement régulées au niveau de leur expression ainsi que de leur activité.

Les molécules d'adhérence sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques tels que la cohésion des tissus, la migration des leucocytes (réponse immune et inflammatoire), l'hémostase, la cicatrisation, l'adhésion à certains pathogènes (*Plasmodium falciparum*, rhinovirus) et aux cellules tumorales.

Les molécules d'adhérence ont été classifiées en plusieurs familles multigéniques en fonction de leur structure et de leur fonction. On différencie ainsi : les sélectines, les intégrines, la superfamille des immunoglobulines, les protéines de type mucine et les cadhérines.

Figure 1: Schématisation des 3 sélectines (d'après Imhof and Dunon, 1995)

Chacune des sélectines comprend un domaine lectine, un domaine similaire au domaine EGF et plusieurs domaines analogues aux protéines régulatrices du complément (CRP)



1- Description des molécules d'adhérence

I- Les sélectines

La famille des sélectines comprend 3 membres désignés par les préfixes E (endothelial), P (platelets) et L (leukocytes) (Carlos and Harlan, 1994), schématiquement représentées sur la Figure 1.

La structure commune aux 3 sélectines comprend une partie NH₂ terminale correspondant à un domaine de liaison de type lectine de type C (dépendant du calcium), une région analogue à l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), un nombre variable de séquences consensus répétées similaires à celles présentes dans les protéines régulatrices du complément (CRP), une région transmembranaire et une courte partie intracytoplasmique (Figure 1).

Les sélectines présentent entre elles 40 à 60 % d'homologie au niveau protéique et jusqu'à 60-70 % en ce qui concerne les domaines EGF et lectinique.

A- La sélectine E (CD62-E)

La sélectine E possède 6 domaines CRP. C'est une protéine de 115 kDa exprimée sur les cellules endothéliales 2 à 4 heures après induction par des cytokines inflammatoires (telles que l'interleukine-1, le TNF- α) ou par le LPS. Sur des cultures de cellules endothéliales *in vitro*, telles que les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), l'expression de la sélectine E atteint un pic entre 3 et 6 heures après la stimulation par le TNF- α et décroît, même en présence de cytokine, pour revenir à un taux d'expression basale en 10 à 12 heures. *In vivo* cependant, la sélectine E pourrait être exprimée de façon chronique aux sites de l'inflammation, notamment dans la peau lors des réactions d'hypersensibilité retardée.

La transcription du gène de la sélectine E, inductible par les cytokines, nécessite l'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B, impliqué dans l'induction de nombreux gènes activés lors de la réponse immune et inflammatoire. Trois sites NF- κ B ont été définis dans le promoteur de la sélectine E.

Le retour à l'expression basale de la sélectine E à la surface cellulaire après activation serait expliqué par différents facteurs : la régulation de la transcription du gène, 6 à 9 heures après son induction, la durée de vie courte de l'ARNm de la sélectine E, et l'internalisation et la dégradation rapide de la sélectine E dans des lysosomes.

B- La sélectine P (CD62-P)

La sélectine P a été caractérisée initialement sur les plaquettes et elle a été nommée PADGEM (Platelet Activation-Dependent Granule-External Membrane Protein) ou GMP-140 (Granule-Membrane Protein 140). Elle a ensuite été décrite sur les cellules endothéliales. Elle présente 9 domaines CRP et a un PM de 122 kDa.

Deux formes de sélectine P, résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm, ont été décrites. La sélectine P soluble a été détectée dans le plasma d'individus normaux (0,15 à 0,30 µg/ml). Sous cette forme, elle pourrait moduler l'adhésion des leucocytes à la sélectine P exprimée par l'endothélium.

La sélectine P est synthétisée et stockée dans les granules cytoplasmiques des cellules : α -granules des plaquettes et corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Lors de l'activation cellulaire, la sélectine P est mobilisée à la membrane plasmique par fusion des granules avec la membrane.

L'expression de la sélectine P est transitoire : une fois exprimée à la surface, elle est rapidement internalisée et dégradée dans des lysosomes ou recyclée dans les granules.

L'expression de la sélectine P sur l'endothélium est également régulée de façon transcriptionnelle. La transcription de son gène est induite transitoirement par le LPS, le TNF- α et l'IL-1, et l'expression de la molécule a lieu 2 à 4 heures après la stimulation.

C- La sélectine L (CD62-L)

Elle est exprimée uniquement par les leucocytes, de façon constitutive. La sélectine L est l'homologue humain du "lymph node homing receptor" murin. Elle possède 2 domaines CRP.

Le PM de la sélectine L diffère selon les cellules qui l'expriment : 75 kDa pour les leucocytes, 95 à 105 kDa pour les neutrophiles et 110 kDa pour les monocytes. Cette variabilité résulte vraisemblablement de différentes glycosylations post-transcriptionnelles.

L'expression transitoire de la sélectine L après activation des leucocytes s'expliquerait par un mécanisme qui n'est pas complètement compris mais qui implique de façon claire un clivage protéolytique au niveau de l'insertion de la molécule dans la membrane. Cependant, aucune protéase responsable de ce phénomène n'a pu être identifiée jusqu'alors, et la voie de transduction du signal qui mène au clivage n'a pas été définie. On trouve de la sélectine L soluble dans le plasma d'individus normaux (1,6 µg/ml). La signification physiologique de ce clivage pourrait être un mécanisme de régulation négative de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium stimulé par des cytokines.

La sélectine L, tout comme la sélectine P, serait donc capable sous sa forme soluble circulante, de moduler l'adhésion des leucocytes à l'endothélium lors de l'inflammation.

D- Les ligands des sélectines

Bien que les ligands qui interagissent *in vitro* avec les sélectines ne correspondent pas toujours aux structures qui se lient réellement aux sélectines *in vivo*, des techniques telles que la cytofluorométrie, la chromatographie d'affinité ou le blotting ont permis de déceler des ligands biologiques des sélectines. Ce sont des macromolécules diverses et complexes qui ont en commun certains types de structures carbohydrates anioniques (Varki, 1994; Imhof et Dunon, 1995; Kansas, 1996).

L'adhérence des sélectines à leurs ligands dépend de la présence de l'acide sialique sur ces derniers (inhibition par traitement des cellules portant les ligands à la neuraminidase), ainsi que de fucose. Seuls les ligands biologiques des sélectines L et P doivent comporter du sulfate.

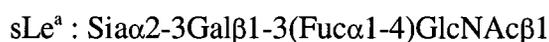
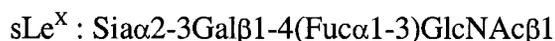
Différents facteurs peuvent contribuer à l'avidité ou à la fonctionnalité des interactions sélectine/ligand. Tout d'abord, la structure fine des épitopes carbohydrates individuels présents sur le ligand, ensuite, les contraintes géométriques imposées par le nombre et la disposition des épitopes carbohydrates. La flexibilité de la sélectine et du ligand et l'organisation oligomérique

de la sélectine déterminent la façon dont les interactions s'établissent. Enfin, les interactions protéine / protéine entre la sélectine et le squelette protéique du ligand pourraient influencer leur interaction.

1- Les carbohydrates

La présence d'un domaine lectine dans la structure des sélectines laissait suggérer leur liaison à des carbohydrates (Vestweber, 1996). Le tétrasaccharide sialyl Lewis^x (sLe^x) a été le premier ligand suspecté de la sélectine E. On a montré ensuite que son stéréoisomère, le sialyl Lewis^a (sLe^a) pouvait se lier lui-aussi à des cellules transfectées avec la sélectine E (Berg et al, 1991; Tyrrell et al, 1991). On sait maintenant que le sLe^x est capable de se lier aux 3 sélectines (Foxall, 1992).

Les formules des tétrasaccharides sLe^x et sLe^a sont les suivantes :



De nombreux dérivés de sLe^x se lient aux sélectines avec une affinité plus forte que le sLe^x. Le point commun entre la plupart des oligosaccharides ligands des sélectines est le fucose et un groupement chargé tel que l'acide sialique, un groupe sulfate ou l'acide uronique. L'implication physiologique du fucose dans les ligands des sélectines E et P a été montrée grâce à l'étude de 2 patients atteints d'un défaut dans l'adhésion des neutrophiles dû à un métabolisme anormal du fucose. Les patients avaient les mêmes symptômes que les patients atteints du syndrome de déficience d'adhérence leucocytaire classique (LAD) mais avaient des taux normaux de $\beta 2$ intégrines. Ce syndrome a été désigné sous le terme de LAD II et correspond à une absence de sLe^x sur les neutrophiles qui, de ce fait, ne peuvent adhérer ni à la sélectine E ni à la sélectine P (Etzioni et al, 1992).

Les carbohydrates peuvent être présentés aux sélectines sur un squelette protéique ou sur des glycolipides. Les glycoprotéines ont l'avantage d'être plus accessibles à la surface cellulaire que les glycolipides courts (Springer, 1990). En général, le squelette protéique des ligands n'est

pas spécifique des cellules exprimant ces ligands. Ce sont les modifications carbohydrates greffées sur ces squelettes protéiques qui en font des ligands des sélectines. Ces modifications carbohydrates ne sont possibles qu'en présence d'enzymes de modification spécifiques d'un type cellulaire. Le domaine de liaison lectinique à ces carbohydrates a été cartographié et sa conformation protéique correcte semble dépendre de la liaison de cations Ca^{2+} .

Les meilleurs ligands des sélectines appartiennent en fait à une famille de molécules d'adhérence décrite récemment : les mucines (Rosen and Bertozzi, 1994). Un pourcentage significatif de leur masse moléculaire est composé de chaînes carbohydrates sulfatées liées en O au niveau de régions riches en sérine et en thréonine. Ces protéines fortement glycosylées portent le tétrasaccharide sLe^x , sLe^a ou leur forme sulfatée. Les mucines représentent donc une région dense d'oligosaccharides sur un squelette polypeptidique, permettant la reconnaissance des sélectines, spécialement si celles-ci sont elles-mêmes oligomérisées sur la cellule opposée. Bien que la liaison de la sélectine dépende du carbohydrate, le composant protéique est impliqué dans l'avidité de ces épitopes.

Les motifs structuraux des ligands qui déterminent la reconnaissance par une sélectine n'ont pas encore été clairement identifiés. Cependant, puisque la plupart des ligands bien définis des sélectines sont des sialomucines, on a suggéré que des groupes d'oligosaccharides classiques pourraient s'associer en plaques de polysaccharides uniques ("clustered polysaccharides patches") générés par plusieurs oligosaccharides (Norgard, 1993), en forçant une chaîne dans une conformation inhabituelle ou en combinant certains groupes de chaînes différentes en un épitope.

2- Les ligands de la sélectine L

Grâce à l'utilisation de formes solubles de sélectines comme sondes affines, deux sialomucines, exprimées par les cellules endothéliales des high endothelial veinules (HEV) des ganglions lymphatiques ont été identifiées et clonées : GlyCAM-1 (Lasky, 1992) et CD34 (Baumhueter, 1993). MadCAM-1 se lie également à la sélectine L ainsi qu'aux $\alpha 4$ -intégrines.

GlyCAM-1 est exprimée principalement sur les HEV des ganglions lymphatiques périphériques et se lie également à la sélectine E. Les chaînes oligosaccharidiques de GlyCAM-1 contiennent de l'acide sialique, du fucose et du sulfate qui semblent tous les trois essentiels à la liaison de la sélectine L (Imai et al, 1993).

CD34 (GlyCAM-2) est une sialomucine exprimée sur les vaisseaux sanguins des ganglions lymphatiques, sur les progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que sur la plupart des cellules endothéliales. CD34 semble impliqué dans la circulation des leucocytes en condition normale (non inflammatoire); sa régulation par les cytokines est inverse de celle des sélectines.

L'addressine mucosale MadCAM-1 est une protéine transmembranaire de structure complexe, expliquant sa dualité de fonction. Elle est composée de 3 domaines homologues aux Ig et d'une région de type mucine entre les domaines Ig 2 et 3. Elle est exprimée par les HEV des plaques de Peyer et sur les veinules de la lamina propria de l'intestin grêle, sur le sinus marginal de la rate et sur les HEV des ganglions lymphatiques embryonnaires. MadCAM-1 sert de ligand à la sélectine L ainsi qu'à l' $\alpha 4\beta 7$ intégrine, toutes 2 impliquées dans la domiciliation des leucocytes aux plaques de Peyer.

3- Les ligands de la sélectine P

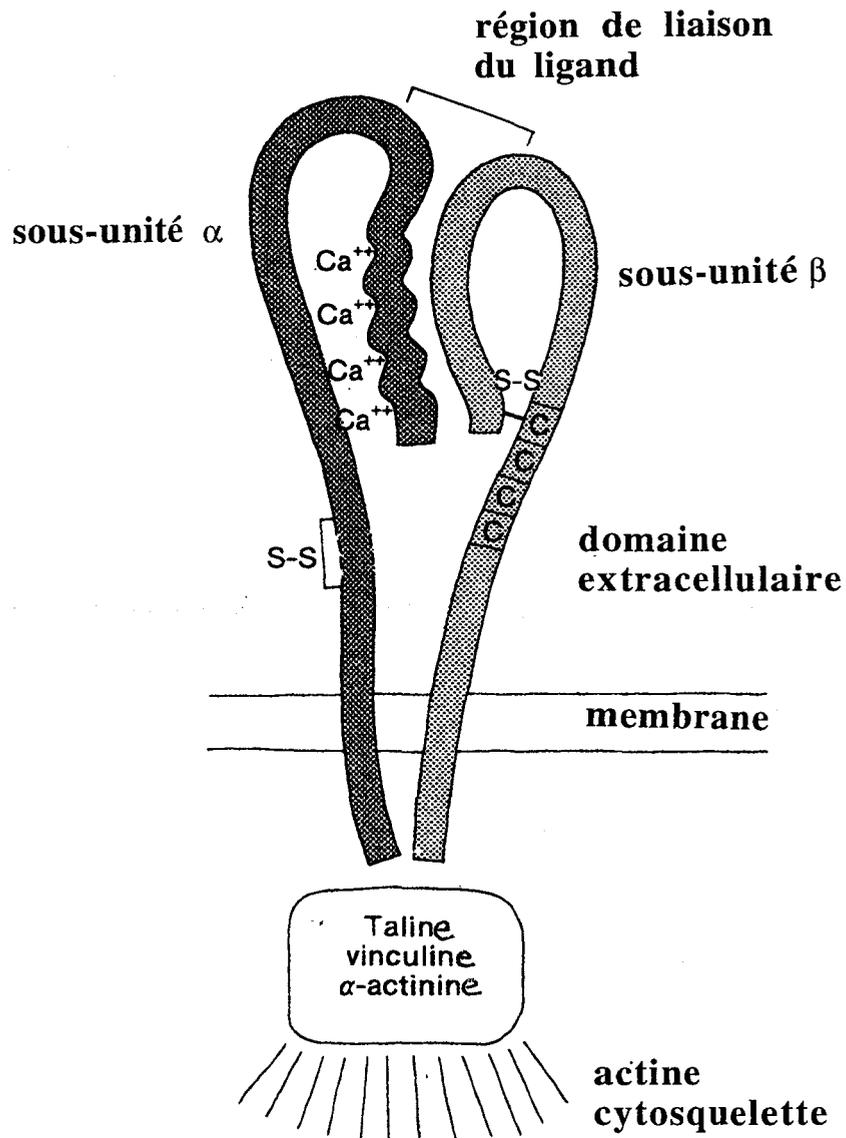
Deux ligands de la sélectine P ont été caractérisés jusqu'alors : PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1), cloné en 1992 par Moore, et un ligand de 120 kDa.

La sialoprotéine de 120 kDa contient un motif sLe^x et des acides sialiques liés en α -2,3. PSGL-1 est une sialomucine transmembranaire de 110 kDa associée en dimère par des ponts disulfure et exprimée sur différents leucocytes. Elle est exprimée sur les cellules myéloïdes.

PSGL-1 sert également de ligand à la sélectine E mais a une affinité moindre. De façon surprenante, la sélectine L pourrait être aussi ligand des sélectines E et P, car elle peut porter des carbohydrates sialylés.

Figure 2: Structure schématique d'une intégrine (d'après Albelda and Buck, 1990)

Les intégrines sont composées de 2 sous-unités α et β associées de façon non covalente. La sous-unité α contient des régions pouvant lier le calcium. La sous-unité β contient des domaines répétés riches en cystéine. Les régions cytoplasmiques des deux chaînes sont petites et contiennent des domaines capables de se lier à des éléments du cytosquelette permettant la liaison de l'intégrine à l'actine.



4- Les ligands de la sélectine E

Les ligands de la sélectine E n'ont pas encore été clonés. Ils forment une série d'antigènes trouvés sur les leucocytes cutanés : CLA 5 (Cutaneous Leukocyte Antigen), un récepteur de 250 kDa, le SSEA-1 (Sialyl stage-Specific Embryonic Antigen) et ESL-1.

La famille de ligands CLA sont des molécules fortement sialylées et trouvées sur une population de lymphocytes mémoires au niveau des lésions inflammatoires de la peau.

Le SSEA-1 sialylé est exprimé sur les cellules NK et est absent des lymphocytes T et B au repos.

ESL-1 est une protéine de 150 kDa, homologue au récepteur du *Fibroblast Growth Factor* (FGF) riche en cystéine, qui ne présente pas, contrairement aux autres ligands des sélectines, de structure de type mucine, mais qui est fucosylé.

E- Fonctions des sélectines

La principale fonction des sélectines est bien sûr leur rôle dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, détaillée plus loin. En effet, les sélectines font partie des premières molécules d'adhérence impliquées dans le passage transendothélial des leucocytes vers les sites inflammatoires ainsi que lors de la recirculation des lymphocytes.

Le domaine intracytoplasmique des sélectines étant très court, on a cru pendant longtemps que ces molécules étaient dépourvues de rôle dans la signalisation. Cependant, différents travaux ont montré récemment que les sélectines étaient capables de transmettre des signaux (Brenner et al, 1997; Lorenzon et al, 1998)

II- Les intégrines

Ce sont des protéines hétérodimériques comprenant 2 sous-unités, α et β , associées de façon non covalente, de 150 et 100 kDa respectivement (Imhof and Dunon, 1995) (Figure 2). Quinze chaînes α et 8 chaînes β sont connues à ce jour et 21 hétérodimères différents ont été

trouvés. Leurs ligands sont des membres de la superfamille des immunoglobulines et des protéines de la matrice extracellulaire.

Les chaînes α et β sont des glycoprotéines transmembranaires et différents domaines cytoplasmiques de la sous-unité $\beta 1$ interagissent indirectement avec les filaments d'actine du cytosquelette via les protéines taline ou α -actinine.

Les chaînes α ont des caractéristiques structurales communes. Elles ont 7 domaines répétés en tandem de 60 AA qui partagent des homologies avec les structures présentes chez les protéines liant le calcium (calmoduline et troponine). Trois ou 4 de ces régions sont susceptibles de contribuer au domaine de liaison pour des cations bivalents. En effet, la présence de cations Ca^{2+} ou Mg^{2+} est essentielle pour la fonction de l'intégrine et la nature du cation peut affecter l'affinité et la spécificité pour le ligand. De plus, une région de 180 AA, appelée domaine I, est insérée entre les domaines répétés en tandem liant les cations divalents. Cette région présente quelques régions riches en cystéine et des sites de N-glycosylation suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans la liaison du ligand.

La spécificité du ligand des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ dépend majoritairement de la chaîne α associée.

Les chaînes β ont également des caractéristiques particulières. Des répétitions en tandem de 4 régions riches en cystéine semblent être essentielles pour la structure tertiaire de l'intégrine. De plus, 100 AA environ sont conservés dans la partie NH₂ terminale et sont nécessaires au maintien de l'hétérodimère α/β .

L'activité fonctionnelle des intégrines nécessite la transition rapide d'une forme non adhésive, de faible affinité, à un état transitoire de haute affinité. Cette modification de l'adhérence est due à un changement conformationnel (activation des intégrines) en réponse à des stimuli inflammatoires. C'est le « inside-out signalling ». Ainsi, la modulation de l'adhérence, via les intégrines, permet l'adhésion forte des leucocytes circulants sur l'endothélium vasculaire, suivie rapidement par une adhésion de force intermédiaire pendant la migration transendothéliale et finalement par un arrêt de l'adhésion, lors de l'extravasation.

En plus de cette modulation de l'affinité des intégrines par des signaux provenant de l'intérieur de la cellule, des études montrent que les intégrines elles-mêmes peuvent transmettre des signaux à la cellule, c'est le « outside-in signalling » (Sastry et al, 1993).

La liaison de l'intégrine à son ligand peut initier différentes réponses cellulaires telles que la différenciation, la prolifération, l'expression de gènes, l'assemblage du cytosquelette, la migration cellulaire (Hynes, 1992). Les premiers événements moléculaires qui en résultent sont la phosphorylation des tyrosines et l'activation de la voie protéine kinase C (Sastry et al, 1993). Le signal transmis par les intégrines est différent de celui médié par les récepteurs classiques puisque les domaines intracytoplasmiques des intégrines ne possèdent ni d'activité kinase ni d'activité phosphatase. Après liaison de l'intégrine à son ligand, le domaine cytoplasmique de l'intégrine interagit donc avec des tyrosines kinases, permettant la transduction du signal.

A- Les $\beta 1$ intégrines

La chaîne $\beta 1$ (CD29) se lie aux chaînes $\alpha 1$ à $\alpha 9$ pour former les « very late antigens » (VLA) (Imhof and Dunon, 1995). Leur nom vient du fait que les premiers découverts, VLA-1 et 2 ne sont exprimés qu'à des stades tardifs après activation des cellules T. La majorité d'entre eux est exprimé dans la plupart des tissus et leurs ligands sont des molécules de la matrice extracellulaire.

$\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, CD49d/CD29) est principalement exprimé sur les leucocytes et se lie au VCAM-1 des cellules endothéliales, ainsi qu'à la fibronectine de la matrice extracellulaire. L'interaction VLA-4/VCAM-1 est probablement la plus importante paire adhésive impliquée dans l'attachement des leucocytes à l'endothélium aux sites inflammatoires ainsi que lors de la différenciation lymphocytaire.

B- Les $\beta 2$ intégrines

Trois chaînes α sont associées de façon non covalente à la chaîne $\beta 2$ (CD18) : CD11a (LFA-1, Lymphocyte Function-associated Antigen-1), CD11b (Mac-1, Mo-1) et CD11c

(p150,95) (Carlos and Harlan, 1994). L'expression des $\beta 2$ intégrines est restreinte aux leucocytes.

Les lymphocytes du sang périphérique expriment principalement CD11a/CD18, alors que les polynucléaires, les monocytes et les cellules NK expriment les trois $\beta 2$ intégrines.

LFA-1 participe à l'interaction leucocyte/cellule endothéliale, à l'activation des cellules T par les APC (Antigen Presenting Cell) et à la destruction de cellules infectées par un virus par les lymphocytes T cytotoxiques. Mac-1 participe au recrutement des cellules myéloïdes aux sites inflammatoires. Mac-1 a également un rôle dans la liaison du complément (Albelda and Buck, 1990) et est impliqué dans la phagocytose (Larson and Springer, 1990).

Les ligands des $\beta 2$ intégrines sont des protéines exprimées à la surface des cellules et appartenant à la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1 pour CD11a/CD18 et CD11b/CD18, ICAM-2 pour CD11a/CD18 et ICAM-3 pour CD11a/CD18) ainsi que des protéines solubles (fibrinogène, facteur X pour CD11b/CD18 et fragments du complément pour CD11b/CD18 et CD11c/CD18).

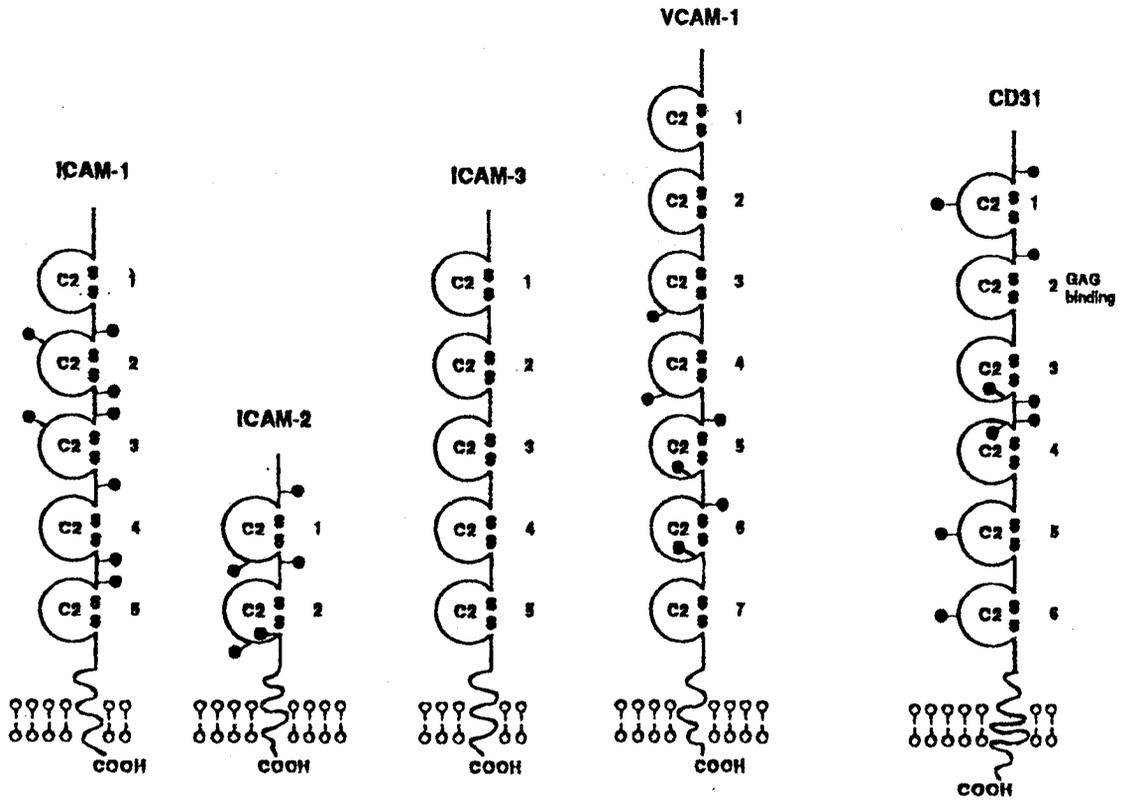
Le rôle des $\beta 2$ intégrines dans les processus de diapédèse a été mis en évidence très tôt chez des patients génétiquement déficients en intégrines leucocytaires par une mutation de la sous-unité $\beta 2$ (déficit d'adhésion leucocytaire de type I, LAD I). Cela résulte en un défaut dans le recrutement des neutrophiles aux sites de l'inflammation. D'autres leucocytes, tels que les éosinophiles sont cependant capables de migrer vers les sites de l'inflammation, probablement via VLA-4 ($\beta 1$ intégrine).

C- Les $\beta 7$ intégrines

Deux intégrines font partie de cette famille : $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha E\beta 7$.

$\alpha 4\beta 7$, exprimé sur une sous-population de lymphocytes qui colonisent l'intestin et les tissus lymphoïdes associés à l'intestin. $\alpha 4\beta 7$ reconnaît le ligand MadCAM-1 et joue un rôle dans la domiciliation des lymphocytes aux plaques de Peyer. $\alpha E\beta 7$ est impliqué dans l'interaction des lymphocytes avec l'épithélium intestinal via la E-cadhérine.

Figure 3: Structure générale des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines (d'après Imhof and Dunon, 1995)



D- Fonctions des intégrines

Brièvement, les intégrines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques dont le développement embryonnaire, le maintien de l'intégrité tissulaire et la domiciliation des leucocytes (adhésion forte des leucocytes aux cellules endothéliales) (Hynes et al, 1992; Albelda et al, 1990; Sonnenberg, 1993). L'ensemble de ces fonctions est détaillé page 30.

III- La superfamille des immunoglobulines (SFIg)

La SFIg comprend différentes molécules possédant plusieurs domaines « immunoglobulin-like » (Imhof and Dunon, 1995). Chaque domaine est classiquement codé par un exon et comprend une séquence primaire de 60 à 70 acides aminés reliés par un pont disulfure (Figure 3).

Ces molécules sont impliquées principalement dans les interactions leucocyte /endothélium, dans le développement (notamment du système nerveux), ainsi que dans la régulation du système immunitaire.

A- Les ICAMs

ICAM-1 (CD54) et ICAM-2 interagissent avec LFA-1, d'où leur rôle dans la médiation de la réponse immune et inflammatoire.

ICAM-1 se lie également à l'intégrine Mac-1. De plus, ICAM-1 est un ligand pour le groupe majeur de sérotypes de rhinovirus humain (Stauton et al, 1989). Les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* utilisent également ICAM-1 en tant que récepteur des cellules endothéliales via un site de liaison qui recouvre partiellement le domaine de liaison de LFA-1. Les nombreux ligands de ICAM-1 indiquent que cette molécule d'adhésion joue un rôle central dans les interactions avec les cellules immunes. ICAM-1 est également impliqué dans la formation des métastases tumorales.

ICAM-1 est faiblement exprimé sur l'endothélium non activé, mais son expression est fortement augmentée après quelques heures de stimulation par l'IL-1, le TNF- α ou l'IFN- γ .

ICAM-1, 2 et 3 jouent un rôle dans la réponse cellulaire T : des Ac dirigés contre ces 3 molécules inhibent complètement les réponses des cellules T aux antigènes spécifiques, dépendantes de LFA-1 (de Fougerolles et al, 1994).

B- VCAM-1 (CD106)

VCAM-1 est le ligand de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) et se lie faiblement à $\alpha 4\beta 7$.

VCAM-1 n'est pas exprimé par les cellules endothéliales au repos, mais son expression est régulée positivement par l'IL-1 et le TNF- α . L'analyse du gène révèle la présence de deux sites NF- κ B dans la région 5' flanquante.

VCAM-1 est également exprimé sur des types cellulaires non vasculaires tels que les cellules dendritiques des ganglions et de la peau, les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules synoviales.

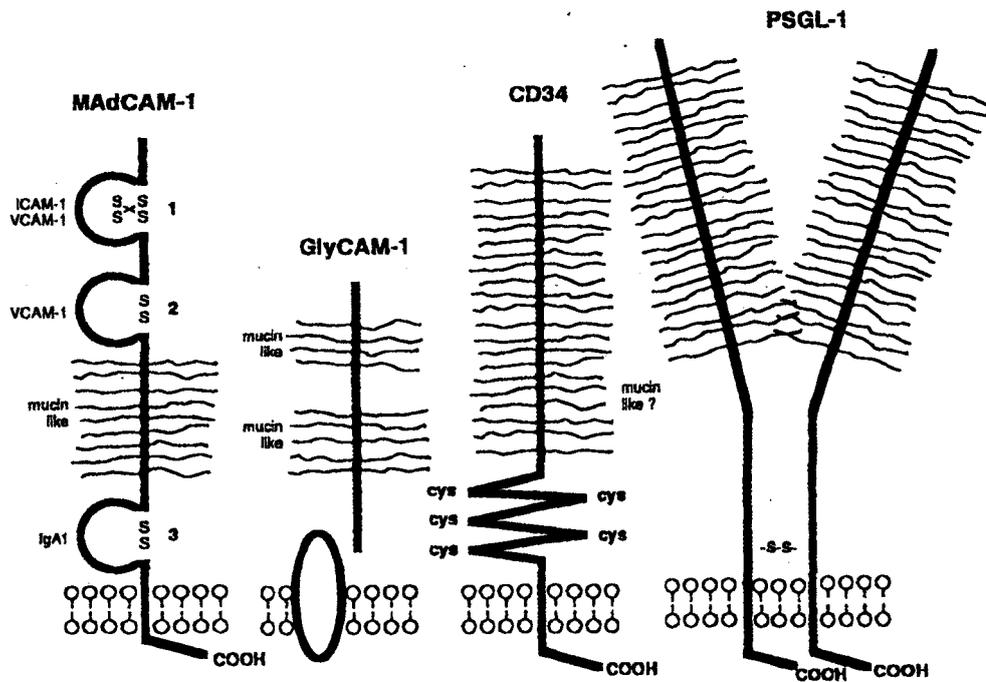
Cette molécule est importante dans le recrutement des leucocytes aux sites de l'inflammation. D'autre part, la liaison des cellules T à VCAM-1 induirait une activation antigène/récepteur dépendante.

C- PECAM / CD31

C'est une molécule comprenant 6 domaines. Elle est exprimée sur les plaquettes et sur la plupart des leucocytes et est impliquée dans leur adhésion aux cellules endothéliales, ainsi que dans leur migration transendothéliale. L'adhésion se fait par des interactions homophiliques. CD31 est, de plus, capable d'activer les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$, lui conférant un rôle important dans la régulation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

Figure 4: Schéma de la structure des protéines de type mucine (d'après Imhof and Dunon, 1995)

Les homologies avec ICAM-1, VCAM-1, les mucines ou les IgA sont indiquées



IV- Les protéines « mucine-like »

Une nouvelle famille de molécules d'adhérence a été proposée à la suite du clonage de GlyCAM-1 (Mebius and Watson, 1993), MadCAM-1 (Berg et al, 1993), PSGL-1 (Sako et al, 1993) et de l'identification de CD34 (Baumhueter et al, 1993) en tant que ligand des sélectines (Figure 4) (Imhof and Dunon, 1995).

Les molécules de cette famille ont en commun des régions riches en sérine et en thréonine, fortement O-glycosylées par des oligosaccharides courts, formant une structure étendue présentant de nombreux sucres terminaux. Leur nom vient du fait que leur structure ressemble à celle des mucines qui sont des protéines abondamment trouvées dans les sécrétions mucoales.

Une de ces sialomucines, MadCAM-1, contient également des régions Ig-like, permettant ainsi sa liaison à une intégrine.

V- Les cadhérines

Les cadhérines sont une famille de récepteurs exprimés par toutes les cellules formant les tissus (Koch and Franke, 1994). Elles permettent les liaisons homotypiques cellule/cellule calcium-dépendantes et sont retrouvées dans les zonula adherens, les jonctions serrées et les desmosomes. Elles jouent un rôle important dans la morphologie des cellules et des tissus, ainsi que dans la localisation des différents types cellulaires à leur site respectif lors du développement. Pendant la morphogénèse embryonnaire, l'expression des différents membres de la famille des cadhérines est régulée de façon spatio-temporelle et corrèle avec une variété d'évènements morphogénétiques, qui impliquent l'aggrégation ou la désaggrégation des cellules.

On distingue 4 types de cadhérines appelées E-(endothelial), P-(placental), N-(neuronal) cadhérine et L-CAM (Liver Cell Adhesion Molecule). Chaque type cellulaire exprime plusieurs cadhérines et leur profil d'expression des cadhérines est spécifique.

2- Principales fonctions des molécules d'adhérence

Certaines molécules d'adhérence sont impliquées dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, ainsi que dans l'association des cellules entre elles pour former les tissus. La communication entre les cellules du système immunitaire et entre les cellules endothéliales ou des cellules cibles et les cellules du système immunitaire est nécessaire à la mise en place de réponses immunes efficaces. Deux mécanismes principaux sont impliqués dans ces interactions cellule / cellule : l'un implique des facteurs solubles tels que les cytokines, l'autre implique les molécules d'adhérence agissant via des interactions ligand / récepteur.

Les molécules d'adhérence peuvent également avoir un rôle néfaste, puisqu'elles servent à l'entrée de certains pathogènes dans les cellules, à la formation des métastases, au rejet de greffe.

I. Rôle structurel

Les cellules des tissus conjonctifs sont enfouies dans une matrice extracellulaire, qui, non seulement assure la cohésion des cellules et des tissus, mais influe aussi sur le développement, la polarité et le comportement des cellules avec lesquelles elle est en contact. La matrice contient différentes protéines fibreuses enchevêtrées dans un gel hydraté constitué d'un réseau de chaînes de glycosaminoglycanes. Parmi les protéines fibreuses, la fibronectine et la laminine sont des glycoprotéines d'adhérence. Grâce à leurs multiples domaines de liaison, ces protéines facilitent l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et leur organisation par cette dernière. Ces protéines contiennent une séquence tripeptidique commune (RGD), qui forme une partie de la structure reconnue par les intégrines. Les intégrines facilitent ainsi la liaison des cellules à la matrice extracellulaire.

L'association des cellules entre elles fait également intervenir des molécules d'adhérence et essentiellement les cadhérines et les membres de la superfamille des immunoglobulines. Ces

molécules d'adhérence semblent jouer un rôle important dans la conduite de la morphogénèse des vertébrés. Un seul type cellulaire utilise de nombreux mécanismes moléculaires pour adhérer à d'autres cellules et la spécificité de l'adhérence intercellulaire observée dans le développement embryonnaire doit résulter d'un mécanisme qui additionne les affinités d'un certain nombre de systèmes d'adhérence différents.

Les contacts cellule/cellule sont également nécessaires lors de la cicatrisation. En ce qui concerne la cicatrisation cutanée, les kératinocytes (reconstitution de l'épiderme), les cellules endothéliales (angiogénèse), les fibroblastes et les cellules inflammatoires communiquent entre elles par des contacts cellule/cellule via les intégrines, impliquant des cytokines et d'autres médiateurs solubles. La cicatrisation nécessite donc des contacts permanents entre les cellules, les cytokines, et la matrice extracellulaire. Le caillot sanguin qui se forme lors d'une blessure sert de matrice provisoire pendant la migration des cellules des tissus adjacents. Il est principalement constitué d'un réseau de fibrine et de fibronectine plasmatique. De nombreuses cytokines sont relarguées par dégranulation des plaquettes. Beaucoup plus encore sont produites par les cellules migrant vers la blessure et certaines sont libérées par les compartiments de la matrice ou par des précurseurs activés.

II- La migration des leucocytes

A- Description du phénomène

Les leucocytes sont les principaux acteurs du système de défense de l'organisme contre les microorganismes qui l'envahissent (Weissman and Cooper, 1993; Paul, 1993). Ce système de défense résulte d'une réponse non spécifique assurée par les granulocytes et les macrophages et d'une réponse spécifique faisant intervenir les lymphocytes, responsables de la défense immune spécifique d'antigène. Les lymphocytes B produisent les anticorps qui se lient aux organismes étrangers et facilitent leur destruction, soit en activant le système du complément, soit en « opsonisant » les microorganismes. Les lymphocytes T agissent principalement par

contact cellule-cellule. Une sous-population de lymphocytes T cytotoxiques reconnaît et détruit les cellules qui portent les antigènes étrangers; une seconde population module l'activité des autres cellules hématopoïétiques dans la réponse immune ou participe à la multiplication des cellules effectrices (T helper).

Ces différents leucocytes patrouillent le corps en recirculant dans le système sanguin et lymphatique, constituant une surveillance continue, nécessaire à une défense efficace de l'organisme. Lors d'une altération des tissus ou d'une inflammation, les leucocytes sont recrutés du sang vers le site de la lésion (Butcher, 1991; Springer, 1994; Dunon et al, 1993).

Les cellules, à l'état non adhérent, circulent dans le sang et la lymphe et migrent dans les tissus lorsque cela est nécessaire. La transition rapide d'un état adhérent à un état non adhérent est la clé de la double fonction de surveillance et de réponse immune.

Les lymphocytes circulant dans le sang doivent d'abord adhérer et ensuite traverser l'endothélium (phénomène de diapédèse) pour entrer dans les différents tissus lymphoïdes impliqués dans la recirculation. Dans tous les organes lymphoïdes secondaires, un pourcentage important de l'extravasation des lymphocytes se fait au niveau de veinules postcapillaires particulières, les « high endothelial veinules » (HEV), qui ont une morphologie cubique typique (Ager, 1987). La plupart des lymphocytes recirculant se lient de façon sélective aux HEV mais pas à l'endothélium vasculaire normal (Mackay et al, 1990; Hall and Morris, 1965). Ceci contraste avec la situation qui existe dans les sites inflammatoires, où le tissu endommagé semble déclencher de nouvelles propriétés adhésives de l'endothélium adjacent, résultant en une extravasation locale des leucocytes, dont de nombreux lymphocytes.

Chez les mammifères adultes, les précurseurs des lymphocytes T et B se trouvent dans la moelle osseuse. Les précurseurs des lymphocytes B restent dans la moelle osseuse pour effectuer leur différenciation *in situ*, alors que les précurseurs des lymphocytes T migrent vers le thymus et se différencient dans cet organe. Les lymphocytes produits dans ces organes lymphoïdes primaires sont appelés naïfs car ils n'ont pas encore rencontré de molécules spécifiques de leur récepteur (Gray, 1992). Ces lymphocytes naïfs sont exportés et localisés préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires organisés, dont les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et la rate (Mackay, 1993).

A la suite d'une stimulation antigénique, en présence du second signal approprié, les cellules T naïves (CD45RA+) se transforment en cellules T activées, le plus souvent effectrices (Mackay, 1993). Ces cellules se transforment ensuite en cellules mémoires (CD45RO+), deviennent plus petites et perdent certains de leurs marqueurs associés à l'activation.

Les lymphocytes effecteurs et mémoires sont exportés à nouveau dans le sang et possèdent des propriétés migratoires différentes de celles des cellules naïves. Ils migrent dans les tissus non-lymphoïdes et recirculent continuellement à partir du sang en passant par les vaisseaux lymphatiques afférents du ganglion lymphatique spécifique de l'organe et finalement retournent dans le sang par le canal thoracique. Une fois activées, les cellules mémoires migrent de façon spécifique vers les tissus où elles seront en contact avec les antigènes étrangers.

Contrairement à ce phénomène de migration spécifique, le flux de lymphocytes dans les tissus augmente au cours de l'inflammation grâce à une diminution de la sélectivité qui gouverne la domiciliation dans les conditions normales.

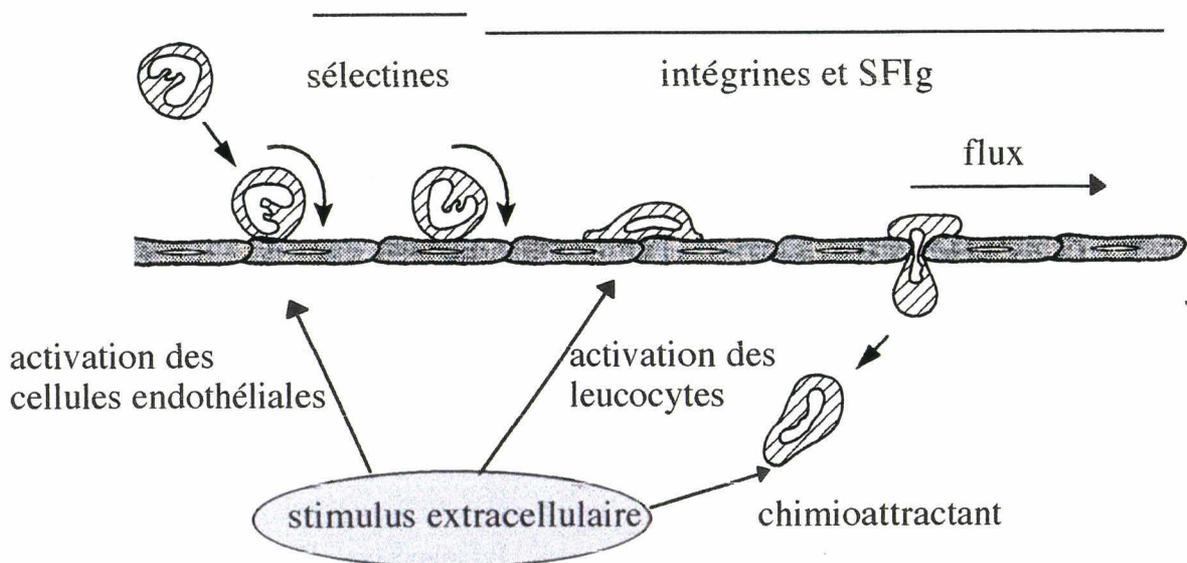
La compréhension de la domiciliation des lymphocytes B est plus limitée. Quantitativement, la rate est l'organe prédominant pour la recirculation des lymphocytes B.

Parmi les autres leucocytes circulants, les granulocytes (les neutrophiles majoritairement et les éosinophiles) sont les plus nombreux. Ce sont les premières cellules qui arrivent au site de l'inflammation. Contrairement aux lymphocytes, ils ont une durée de vie courte et ne recirculent pas. Ils sont produits dans la moelle osseuse et circulent à l'état mature dans le sang pendant plusieurs heures avant d'entrer dans les tissus. Des changements moléculaires se produisent à la surface des cellules endothéliales vasculaires, signalant la réaction inflammatoire ou la lésion. Cela permet l'adhésion et l'extravasation des granulocytes circulants (diapédèse). Cette interaction adhésive est localisée et s'effectue au niveau des veinules postcapillaires.

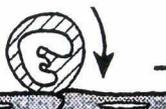
La diapédèse des leucocytes met en jeu des interactions spécifiques entre de nombreux couples de molécules d'adhérence. Par ailleurs des interactions avec la matrice extracellulaire et certains types cellulaires dans les tissus peuvent contribuer à la spécificité de la localisation des leucocytes.

Figure 5: A- Interactions adhésives lors de la migration des leucocytes (d'après Carlos and Harlan, 1994)

contact aléatoire → roulement → adhérence → diapédèse → chimiotactisme



B- Molécules d'adhérence impliquées dans les différentes phases de la migration des leucocytes (d'après Carlos and Harlan, 1994)

	roulement	activation → adhésion ferme	migration transendothéliale	migration subendothéliale	
leucocyte	sLe ^x , CLA structures sialylées et fucosylées, sélectine L	récepteurs de cytokines, de chimiokines, de chimioattractants	β1, β2, et β7 intégrines	PECAM-1, β2, β1 et β7 intégrines	β1 et β2 intégrines CD44
endothélium					
tissu	sélectine P ligand de sélectine L sélectine E CD34 MadCAM-1	chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1α...) PAF PECAM-1 sélectine-E	ICAM-1 ICAM-2 VCAM-1 MadCAM-1	PECAM-1 ICAM-1 VCAM-1	
	histamine, thrombine oxidants, LPS leucotriènes cytokines (IL-1, TNFα...)	cytokines (GM-CSF, IL-5...), chimiokines (IL-8, MCP-1,...) chimioattractants (C5a, fMLP...)	cytokines (TNF-α, IL-1, IFN-γ, IL-4,...)	chimiokines chimioattractants	composants de la matrice extracellulaire chimiokines chimioattractants

B- Migration transendothéliale des leucocytes

La diapédèse leucocytaire est un processus complexe que l'on peut schématiser par une cascade d'adhésions (Butcher, 1991) (Figure 5).

Les leucocytes sont transportés dans le flux sanguin et interagissent faiblement et transitoirement avec les cellules endothéliales. Ce phénomène se caractérise, dans les conditions physiologiques de flux sanguin, par le roulement lent des leucocytes sur l'endothélium. En l'absence de stimulus spécifique, les leucocytes restent dans le flux sanguin. En revanche, sous l'action de facteurs inflammatoires, une adhérence ferme et stable des leucocytes à l'endothélium est observée, suivie de leur migration vers les jonctions des cellules endothéliales, leur infiltration et éventuellement leur rétention dans les tissus. Chacune des étapes de la diapédèse leucocytaire fait intervenir des molécules d'adhérence spécifiques et repose sur des mécanismes de régulation propres.

1- Roulement / fixation

Ce sont les *sélectines* qui initient le premier contact des leucocytes avec l'endothélium et permettent le roulement. Toutefois, cette adhérence brève, assurée par les sélectines, ne permet pas, à elle seule, la diapédèse leucocytaire. Le contact avec l'endothélium induit l'activation des intégrines des leucocytes via les chimiokines, qui sont sécrétées ou présentées par l'endothélium ou les cellules adjacentes. L'adhésion induite par les intégrines activées est forte et permet l'immobilisation des leucocytes.

2- Activation

La liaison des leucocytes aux ligands présents à la surface des cellules endothéliales résulte en un signal qui induit une adhésion forte, vraisemblablement en quelques secondes. Les intégrines passent alors dans leur état adhésif. L'activation des intégrines se fait via des chimiokines, qui peuvent s'associer avec les protéoglycanes des cellules endothéliales. C'est le cas notamment du CD44, qui s'associe avec la chimiokine MIP-1 β (Tanaka et al, 1993). La chimiokine est alors disponible pour la présentation aux cellules T naives, qui roulent sur les

cellules endothéliales. Ces cellules répondent au contact de la chimiokine par l'activation de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, permettant une adhésion forte. Cette étape peut se faire également via la molécule CD31 (SFlg), présente sur l'endothélium, les monocytes, les neutrophiles et certaines populations de lymphocytes T. Une interaction homotypique entre 2 molécules de CD31 délivrerait un signal déclenchant l'activation des intégrines (Shimizu, 1992).

3- Adhésion forte

Après activation de leurs fonctions adhésives, les *intégrines* assurent l'adhésion forte des leucocytes à l'endothélium et permet leur arrêt. Cette étape est médiée par les paires de molécules d'adhérence suivantes : VLA-4/VCAM-1, LFA-1/ICAM-1, LFA-1/ICAM-2 et Mac-1/ICAM-1. De plus, la liaison $\alpha 4\beta 7$ /MadCAM-1 est spécifique de la domiciliation des leucocytes aux plaques de Peyer.

4- Migration transendothéliale

La migration transendothéliale, dirigée selon un gradient chimiotactique (PAF, fMLP, leucotriène, C5a, chimiokines), est un phénomène rapide. La molécule *PECAM-1* (CD31) joue un rôle dans la migration des monocytes et des neutrophiles à travers les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales (Muller, 1993). Le processus de transmigration commence par le passage des leucocytes adhérents à travers les jonctions localisées entre les cellules endothéliales. Alors qu'elles migrent, les cellules forment de nouveaux contacts avec les cellules endothéliales sur le front de migration, alors que l'adhérence en amont est réduite. A ce stade, l'adhérence leucocyte/endothélium doit être moins forte et différents mécanismes contribuent à sa modulation. Le premier mécanisme impliqué est la décroissance de la fonction adhésive des intégrines (Muller, 1993). Le second mécanisme est le clivage de molécules d'adhérence, démontré notamment pour la sélectine L. De nombreuses molécules d'adhérence solubles sont également trouvées dans le sang (sélectine E (Kishimoto et al, 1989), sélectine P (Bevilacqua et al, 1989), VCAM-1 (Hahne et al, 1993a; Terry, 1993), ICAM-1 (Rothlein et al, 1991) et GlyCAM-1 (Lasky et al, 1992; Brustein et al, 1992)); elles permettent de réduire la force de l'adhésion des leucocytes par blocage de leurs ligands (Schleiffenbaum et al, 1992). La

présence de ces molécules solubles pourrait également empêcher l'arrêt inopportun des leucocytes à des sites non appropriés (Gearing and Newman, 1993).

Il a été montré *in vitro* que des anticorps dirigés contre $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, LFA-1, CD44 et CD31 inhibent la migration des leucocytes à travers des monocouches de cellules endothéliales. Leur rôle précis dans le processus de migration transendothéliale n'a cependant pas encore été élucidé.

C- Recrutement des lymphocytes à des sites particuliers

1- Ganglions périphériques

Il existe 2 voies d'entrée des lymphocytes du sang dans les ganglions périphériques.

Les cellules T entrent, soit directement via la barrière des HEV, soit par les tissus périphériques, via l'endothélium plat, et circulent par les vaisseaux lymphatiques afférents vers le parenchyme des ganglions lymphatiques. Il a été suggéré que la plupart des cellules T naïves prennent la première voie, alors que les cellules activées ou mémoires prennent la seconde (Mackay, 1993). Les molécules d'adhérence impliquées sont GlyCAM-1, LFA-1, CD34, ICAM-1 et ICAM-2 et la sélectine L.

2- Tissus associés à l'intestin

Les plaques de Peyer de la paroi intestinale sont spécialisées dans la capture de l'antigène à partir de la lumière intestinale et dans sa présentation aux lymphocytes dispersés dans la lamina propria, sous l'épithélium digestif et dans la couche épithéliale. Les interactions sélectine L/MadCAM-1 se feraient préférentiellement entre les cellules naïves et les HEV des plaques de Peyer de l'endothélium intestinal, alors que les interactions $\alpha 4\beta 7$ /MadCAM-1 s'effectueraient entre les cellules mémoires et l'endothélium intestinal (Mackay, 1993; Mackay et al, 1992a et b; Hamann et al, 1994).

3- Peau

Mises à part les voies aériennes et digestives, l'entrée principale des pathogènes est la peau. Les cellules T, qui sont localisées et qui migrent à travers la peau, sont quasiment toutes des cellules mémoires, mais, contrairement aux cellules mémoires de l'intestin, elles expriment la glycoprotéine CLA qui peut se lier à la sélectine E (Picker, 1990). La sélectine E est induite sur les cellules endothéliales dermiques lors des réactions d'hypersensibilité retardée et dans la peau présentant une inflammation de façon chronique. L'interaction sélectine E/CLA pourrait contribuer au tropisme des cellules T pour la peau. L'adhésion forte serait quant à elle assurée par les interactions VLA-4/VCAM-1. Cependant, l'implication de liaison LFA-1/ICAM-2 n'est pas exclue.

Borges et al ont montré que chez la souris, PSGL-1 est exprimé sur les lymphocytes Th1 mais pas Th2 et que cette molécule aurait un rôle dans la migration des cellules Th1 aux sites d'inflammation dans la peau (Borges et al, 1997).

D- Recrutement des leucocytes pendant l'inflammation

Les leucocytes adhèrent faiblement aux cellules de l'endothélium non stimulées. Lors d'une inflammation, le phénotype de l'endothélium est fortement modifié. Ce changement résulte de la stimulation des cellules endothéliales avec des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α (produites essentiellement par les macrophages stimulés par des produits microbiens) ou l'IFN- γ (relargué par les cellules NK et les cellules T qui ont rencontré un antigène spécifique).

La première molécule d'adhérence qui apparaît en réponse à ce stimulus est la sélectine P, transloquée des corps de Weibel-Palade vers la membrane plasmique en quelques secondes après la stimulation par ces cytokines, par la thrombine ou par l'histamine. La sélectine P permet la fixation et le roulement des leucocytes au site de la lésion tissulaire.

La sélectine E est principalement trouvée dans les sites d'inflammation cutanée après induction ou synthèse par l'IL-1 ou le TNF- α . Son expression est maximale 4 à 6 heures après la stimulation des cellules endothéliales par les cytokines. La sélectine E permet l'attachement

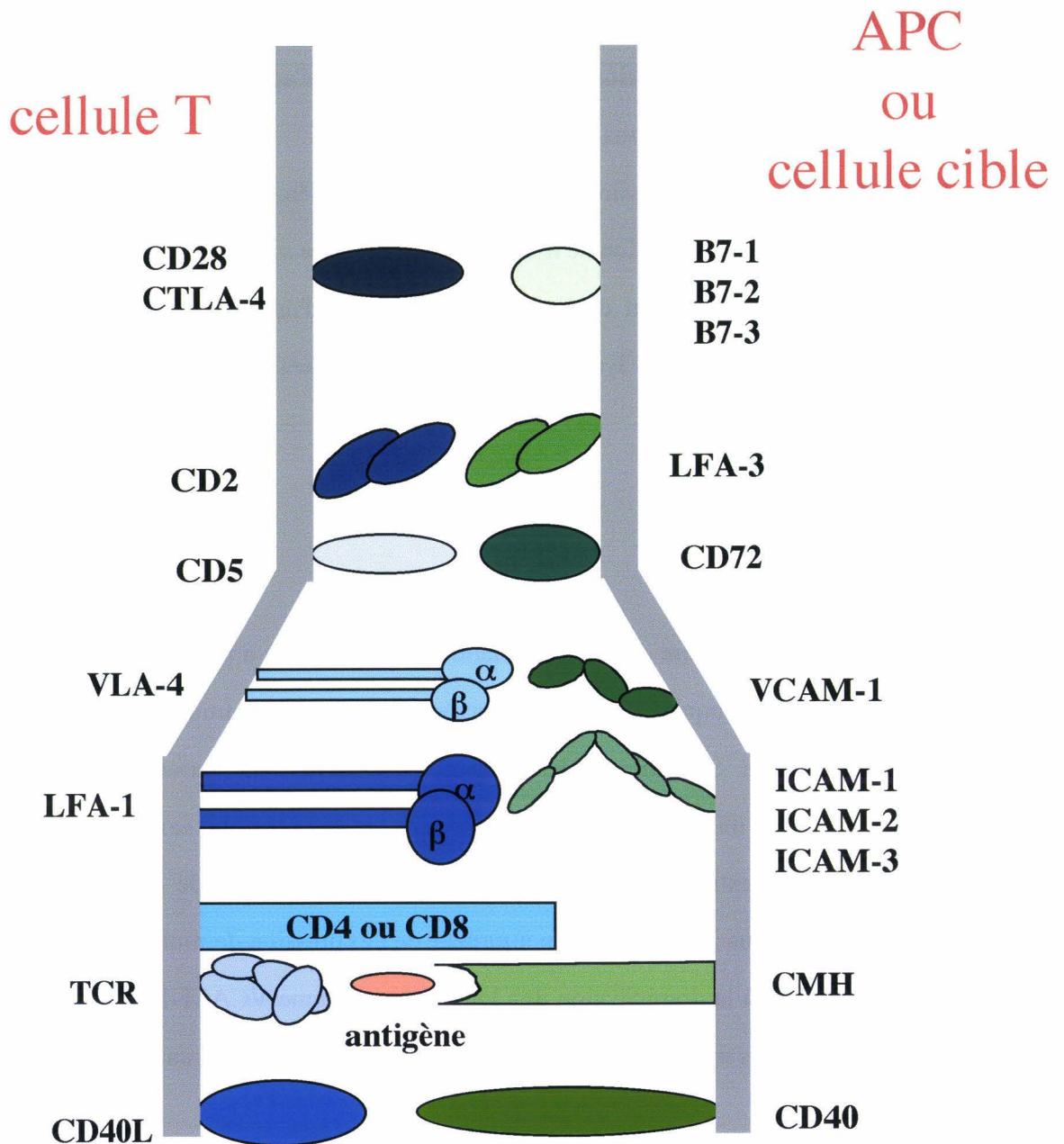
des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes. Quelques minutes après stimulation par des cytokines, les cellules endothéliales produisent des chimiokines, du leucotriène B4 et du PAF, agents inflammatoires qui activent les intégrines exprimées par les leucocytes qui roulent. Les leucocytes adhèrent alors aux molécules de la SFIg (ICAM-1 et VCAM-1), dont l'expression est augmentée en quelques heures par les mêmes cytokines. La production de ces molécules inflammatoires et l'induction de quelques molécules d'adhérence semble suffisant au recrutement massif des leucocytes aux sites de l'inflammation.

La diminution de l'expression des molécules d'adhérence à la surface cellulaire (ICAM-1, sélectine E) et la production de molécules d'adhérence solubles par épissage alternatif (sélectine P, VCAM-1) permettent de limiter le processus d'inflammation. Elles réduisent l'efficacité de la domiciliation des lymphocytes, qui, finalement, a un effet modérateur sur l'inflammation.

E- Conclusion

La dissection moléculaire de la domiciliation des leucocytes a permis le développement de nouvelles drogues qui bloquent l'adhésion dans les maladies autoimmunes et l'inflammation chronique. Cela pourrait également aider à la compréhension du processus métastatique puisqu'il est formé des mêmes étapes : transport des cellules par le sang, reconnaissance spécifique d'un organe, extravasation et processus invasif. La capacité de certaines cellules à métastaser pourrait être due à une régulation anormale de l'expression de molécules d'adhérence connues pour participer à la domiciliation des leucocytes, comme VCAM-1, ICAM-1, CD44, $\alpha 6\beta 1$ et beaucoup d'autres molécules (Ruiz et al, 1993; Rice and Becilacqua, 1989; Günthert et al, 1991).

Figure 6: Interactions entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène (APC) ou les cellules cibles



III - L'activation des cellules T

Les lymphocytes dérivés du thymus sont des cellules effectrices et régulatrices de la réponse immunitaire. La spécificité de cette réponse est médiée par le complexe récepteur T (TCR)-CD3, qui interagit avec les antigènes en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La reconnaissance spécifique de l'antigène résulte en l'activation et en la prolifération de la cellule T. Bien que cette activation spécifique des cellules T soit médiée par le complexe CD3 - TCR, l'interaction peptide / CMH (sur l'APC ou sur la cellule cible) avec le TCR est insuffisante pour la mise en place d'une réponse cellulaire T complète. Des signaux additionnels sont requis. Ils sont induits par la liaison de contre-récepteurs sur la cellule T à des molécules accessoires sur l'APC ou la cellule cible. Beaucoup d'études ont suggéré que les molécules B7 (CD80 / CD86) en se liant au CD28 induisaient ce second signal. Il est maintenant clairement établi que d'autres molécules ont cette fonction accessoire et qu'une réponse efficace n'est induite qu'à la suite d'interactions multiples (Croft and Dubey, 1997) (Figure 6). Parmi ces molécules appelées accessoires, ICAM-1 / ICAM-2 et son ligand LFA-1 sont particulièrement importants (Springer, 1990). Alors que tous deux facilitent le déclenchement de la réponse cellulaire T, LFA-1 et CD28 ont des rôles distincts. LFA-1 faciliterait l'activation cellulaire T en diminuant les quantités d'antigène nécessaires à l'activation, alors que CD28 diminuerait le nombre de TCR qui doit être impliqué et permettrait l'activation des cellules T par des ligands de plus faible affinité (Bachmann et al, 1997).

IV- Rôle des molécules d'adhérence dans différentes pathologies

Les molécules d'adhérence peuvent servir de récepteurs à certains virus. C'est le cas notamment des rhinovirus qui s'attachent à la molécule ICAM-1 pour rentrer dans les cellules (Staunton et al, 1989).

Certains parasites utilisent également les molécules d'adhérence à leurs fins. Les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*, par exemple, se lient aux cellules endothéliales des vaisseaux post-capillaires par l'intermédiaire de la molécule ICAM-1 (phénomène de séquestration) (Berendt et al, 1989).

Les molécules d'adhérence sont également impliquées dans l'interaction de certaines bactéries aux cellules. La FHA (Filamentous Hemagglutinin) de *Bordetella pertussis* se lie à l'intégrine CD11b/CD18 (CR3, Mac-1) des macrophages (Relman et al, 1990).

La formation des métastases est un processus qui implique l'attachement des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire, suivi d'une migration de ces cellules dans la matrice subendothéliale puis dans les tissus sains alentours. Bien qu'il possède des caractéristiques propres, le phénomène de dissémination des tumeurs montre un certain parallèle avec la réponse inflammatoire. Différentes molécules (cadhérines, sélectines, intégrines), ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire, sont impliquées dans ce phénomène invasif. De plus, les cellules de carcinome exprimeraient sLe^x, ce qui faciliterait leur arrêt dans les vaisseaux sanguins ou permettrait leur interaction avec les plaquettes pour former les microemboli.

Chapitre II

Les éosinophiles

La présence de granulocytes et d'érythrocytes dans le sang de différentes espèces a été montrée pour la première fois en 1846 par l'anatomiste Wharton-Jones à Londres (Jones et al, 1846). Cependant, c'est Ehrlich en 1879 qui montra qu'une nouvelle cellule, l'éosinophile, avait une affinité particulière pour les colorants acides. C'est à cette époque qu'ont réellement démarré les recherches sur les éosinophiles et qu'ont été montrées les associations entre l'éosinophilie et différentes maladies telles que l'asthme bronchique (Gollasch et al, 1889), les maladies parasitaires (Crosby et al, 1890), les maladies cutanées (Canon et al, 1892; Neusser et al, 1892), et les maladies prolifératives (Reinbach et al, 1893). L'éosinophilie a également été associée un peu plus tard à l'anaphylaxie (Schlecht and Schwenker, 1912).

Les recherches se sont alors concentrées sur l'isolement des granules des éosinophiles et de leurs constituants. Toutes les études ont suggéré la présence dans les granules, de protéines riches en arginine et ont souligné leur effet toxique dans les lésions tissulaires.

Depuis les années 70, les recherches portent essentiellement sur les fonctions effectrices de l'éosinophile (Beeson and Bass, 1977; Weller and Goetz, 1979; ; Capron and Capron, 1987; Silberstein and David, 1987; Spry, 1988). Il a été montré notamment que les éosinophiles étaient capables de tuer certains parasites (Butterworth et al, 1975; Gleich and Adolphson, 1986), de présenter l'antigène aux lymphocytes T (Weller, 1991), d'être réservoir pour le VIH (Freedman et al, 1991) et plus récemment de synthétiser et de libérer certaines cytokines dont ses propres facteurs de différenciation (Dubucquoi and Capron, 1998). Des données récentes ont permis de comprendre les mécanismes d'attraction, d'infiltration et d'activation des éosinophiles au cours de l'inflammation, confirmant, si cela était encore nécessaire, la place de l'éosinophile en tant que cellule à part entière dans le système immunitaire.

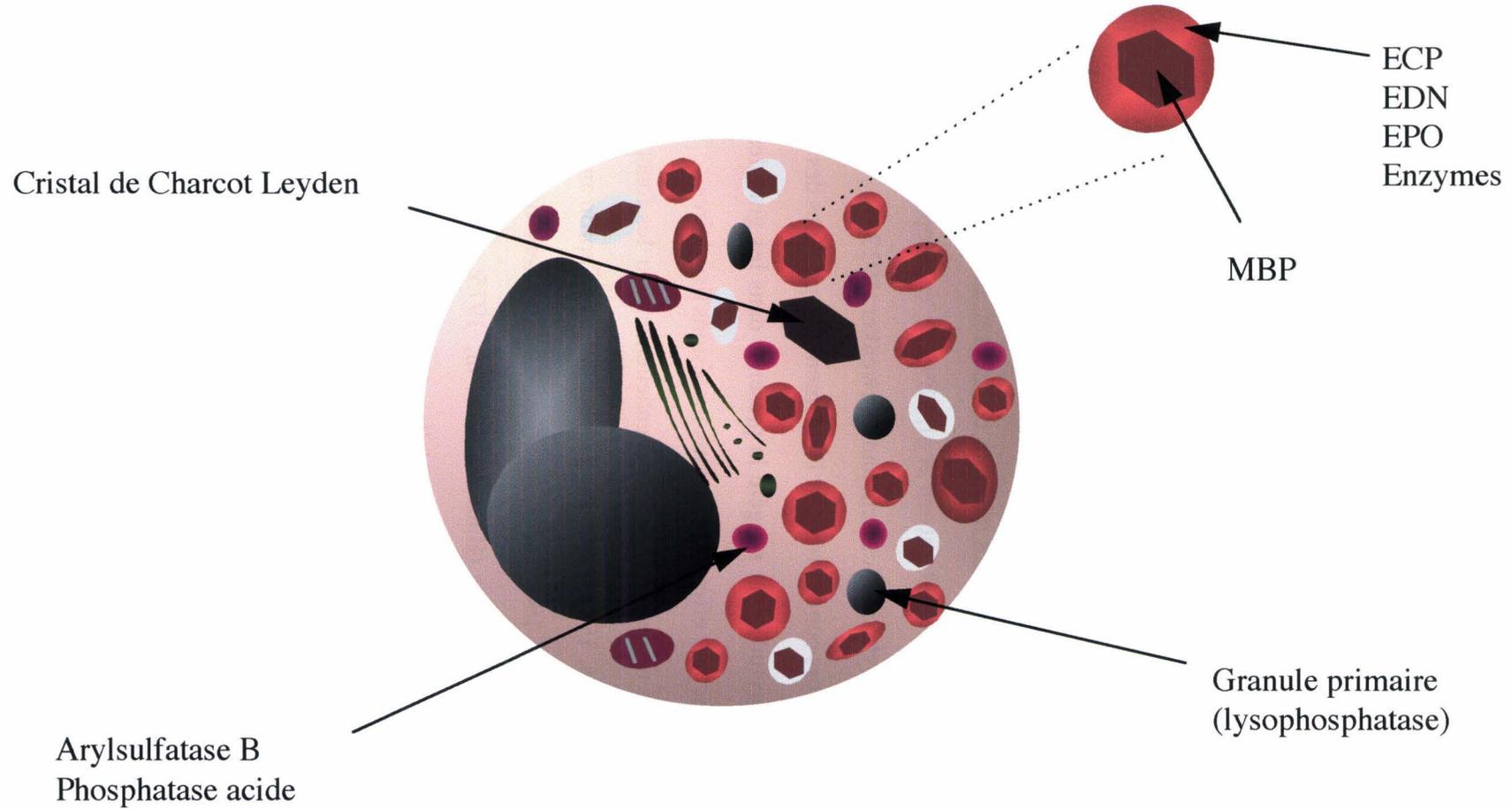


Figure 7: Protéines cationiques de l'éosinophile (d'après Dubucquoi et Capron, 1998)

1- Morphologie et structure

Les polynucléaires représentent la majorité des leucocytes sanguins, mais sont également localisés au niveau tissulaire. On différencie 3 types de polynucléaires selon la réaction de leurs granules à différents colorants histologiques : les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles.

L'éosinophile est une cellule de 12 à 17 μm de diamètre représentant 1 à 5% des leucocytes circulants chez les sujets sains. Son noyau bilobé et ses granules volumineux, colorés en orange par l'éosine en font une cellule facilement identifiable. Les principales caractéristiques morphologiques et les médiateurs de l'éosinophile sont présentés dans la Figure 7.

On distingue différents types de granules qui apparaissent au stade promyélocyte :

- des granules caractéristiques, ovoïdes, contenant une partie dense aux électrons (cristalloïde) constituée d'une protéine alcaline appelée protéine basique majeure (MBP) et entourée d'une matrice moins dense aux électrons constituée par la peroxydase (EPO), la protéine cationique (ECP) et la neurotoxine (EDN).

- des granules contenant le cristal de Charcot-Leyden (lysophosphatase, qui protègerait l'éosinophile des effets toxiques des lysophospholipides), homogènes, ne contenant pas de cristalloïde central.

- des petits granules, dont le nombre augmente avec le stade de maturation et la localisation tissulaire des éosinophiles, contenant l'arylsulfatase B (qui joue un rôle dans le métabolisme des protéoglycanes), des collagénases et la phosphatase acide.

- enfin, des formations vésicotubulaires qui participeraient au transport des constituants granulaires vers le milieu extracellulaire.

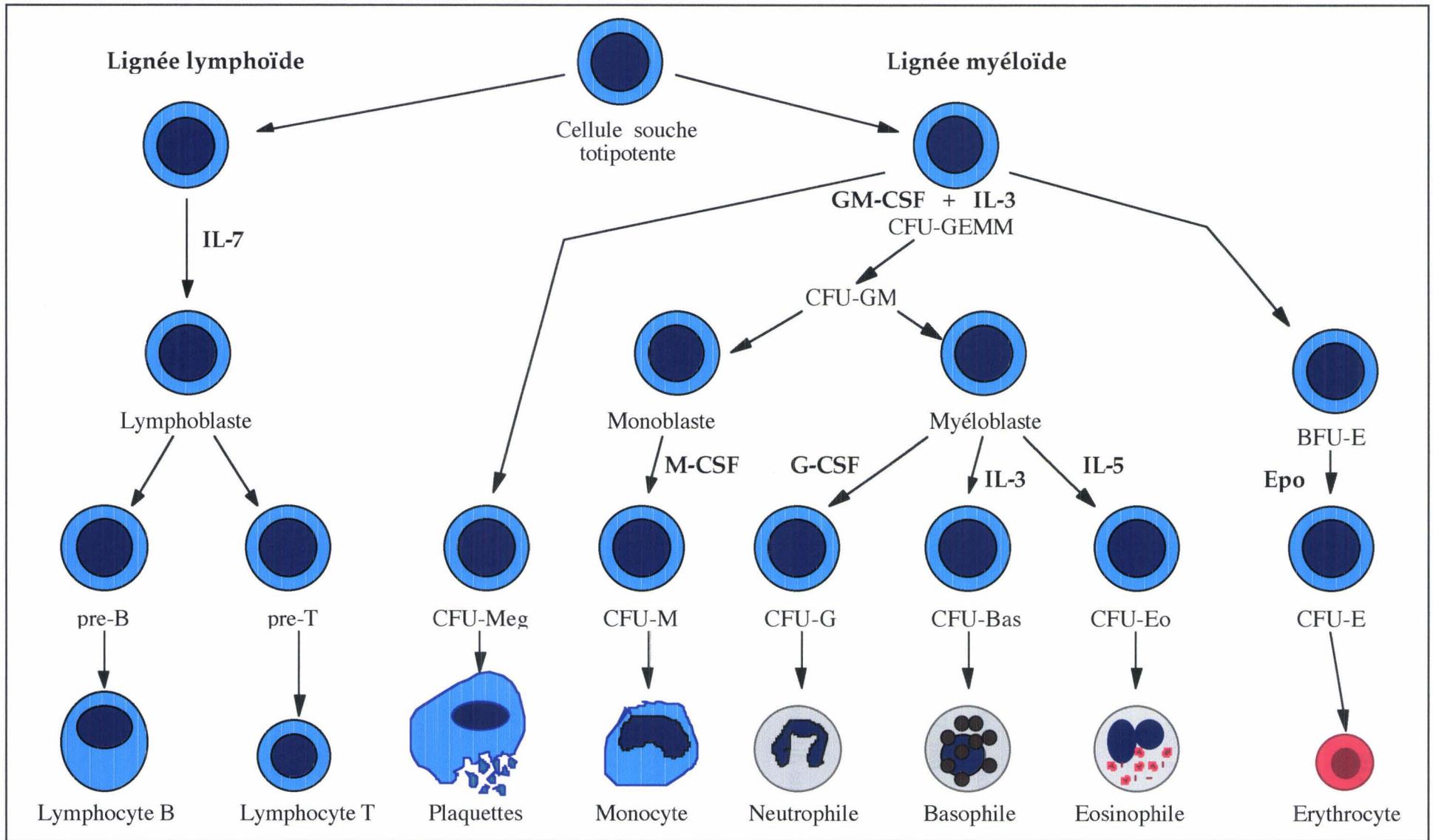


Figure 8 :

Les grandes étapes de l'hématopoïèse

Croissance et différenciation des cellules précurseurs se déroulent sous l'influence des cellules stromales et des facteurs de croissance environnants. (CFU et BFU = Colony / Burst forming units)

2- Ontogénèse (Figure 8)

I- Généralités

Les populations de cellules différenciées et fonctionnelles identifiables dans les organes et tissus hématopoïétiques et dans le sang périphérique dérivent d'une population de cellules souches qui ne représentent qu'une infime fraction du tissu hématopoïétique. Le passage de la cellule souche aux cellules matures se fait par étapes successives où interviennent des phénomènes de survie et de mort cellulaire, de prolifération et de différenciation. Ces phénomènes sont sous la dépendance de signaux régulateurs complexes, incluant de nombreuses interactions cellulaires et des cytokines, dont un nombre croissant a été identifié au cours des dernières années. Durant l'ontogénèse, les premières cellules hématopoïétiques identifiables apparaissent au 6ème jour de gestation au niveau du tissu extra-embryonnaire. A partir de la 10ème semaine de gestation, les cellules hématopoïétiques colonisent le tissu osseux qui restera le site exclusif de l'hématopoïèse après la naissance.

En effet, chez l'homme adulte, l'hématopoïèse se fait dans la moelle osseuse, au niveau de sites bien définis contenant des cellules mobiles ou cellules hématopoïétiques et des cellules fixes ou cellules du microenvironnement hématopoïétique. Il existe cependant, chez l'enfant et l'adulte, un compartiment de cellules souches circulantes, dont la signification physiologique n'est pas définitivement établie. Le nombre de cellules souches du sang périphérique à l'état d'homéostasie est très faible, plus encore que dans la moelle osseuse. Cependant, il a été montré que la fréquence de ces cellules augmentait chez des patients sortant de la phase d'aplasie succédant à une chimiothérapie, ou après administration d'un facteur de croissance de l'hématopoïèse. L'hématopoïèse peut ainsi se définir comme l'ensemble des mécanismes qui assurent le remplacement continu et régulé des cellules sanguines.

Les deux caractéristiques des cellules souches sont leur rareté (1 pour 10 000 environ dans la moelle osseuse) et leur faible capacité à se diviser.

L'hématopoïèse génère une hiérarchie cellulaire complexe via 2 processus : la prolifération (ou multiplication cellulaire) et la différenciation, qui assure la transformation de cellules immatures en cellules matures.

Les cellules hématopoïétiques peuvent être classées en 3 compartiments :

- 2 compartiments de cellules immatures ou cellules souches primitives : des cellules souches primitives capables d'autorenouvellement et à différenciation très lente et des progéniteurs incapables de s'autorenouveler, à différenciation rapide.

- 1 compartiment de maturation : des cellules engagées dans la différenciation vers une ou plusieurs lignées, incapables de s'autorenouveler, à différents stades de maturation, morphologiquement reconnaissables, comprenant la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde.

A la fin du processus de maturation, les cellules matures passent dans le sang. Dans les vaisseaux, ces cellules ont une durée de vie relativement courte (hématies 120 jours, plaquettes 7 jours, polynucléaires 24 heures). Dans les tissus, en revanche, les monocytes et certains lymphocytes sont capables de se diviser plusieurs fois et de vivre pendant des mois voire des années.

Logées dans la moelle osseuse chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques totipotentes (SC-T) vont se différencier en cellules souches pluripotentes (SC-P) exprimant le marqueur de différenciation cellulaire CD34. Elles se différencieront à leur tour pour assurer la production continue des différentes cellules souches des 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 suivent deux voies principales de différenciation :

- la lignée lymphoïde, aboutissant aux lymphocytes T et B et aux cellules NK.

- la lignée myéloïde, composée de progéniteurs mixtes (CFU-GEMM), exprimant CD34 et CD33 et conduisant sous l'influence de l'environnement (cellules stromales, matrice, cytokines) aux érythrocytes, aux mégacaryocytes/plaquettes ou aux granulocytes/macrophages.

Le précurseur mixte granulocyte/macrophage (CFU-GM) peut lui même se différencier, soit en monoblaste conduisant aux granulocytes (basophiles, éosinophiles, neutrophiles), soit en myéloblaste, conduisant aux monocytes/macrophages (Figure 8).

II- Les facteurs de croissance

Deux théories se dégagent pour l'orientation des cellules souches vers les différentes lignées. Pour Till et McCulloch (1992), l'orientation vers une lignée plutôt qu'une autre est aléatoire. L'autre théorie refuse la place au hasard dans un système aussi précis et équilibré et privilégie une programmation génétique des différentes voies de différenciation hématopoïétiques. Cette théorie est corroborée par le rétrocontrôle exercé par les cellules monocytaires sur leurs progéniteurs. Ce rétrocontrôle se fait via le Macrophage-Colony-Stimulating Factor ou M-CSF, qui diminue la production de monocytes au profit des granulocytes. D'autres CSF ont été isolés et caractérisés : le Mix-CSF (IL-3), le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage), le G-CSF (Granulocyte), le M-CSF (Macrophage). Les CSF sont produits par différentes sources cellulaires (lymphocytes T, macrophages, cellules endothéliales, éosinophiles...) et agissent de manière séquentielle sur les cellules pluripotentes. Le G-CSF et le M-CSF (produits par les fibroblastes) agissent sur les cellules matures, en les soutenant respectivement dans leur différenciation en granulocytes ou en monocytes/macrophages. Il a été aussi montré que les cytokines pouvaient avoir un rôle stimulateur sur les cellules souches (facteurs de croissance) ou inhibiteur de la prolifération et de la différenciation, par fixation sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Elles agissent essentiellement selon 2 modes sécrétoires : autocrine, agissant sur la cellule qui les a synthétisées, ou, paracrine, ayant un effet sur les cellules voisines. Les facteurs de croissance ont un rôle dans la survie et la prolifération mais ne dirigent pas la différenciation des progéniteurs. L'apparente induction de différenciation par les facteurs de croissance est à interpréter comme une conséquence de la prolifération et de la maturation d'une population

spécifique de progéniteurs qui sont influencés par un facteur particulier et la mort concomitante de progéniteurs qui ne sont pas influencés par ce même facteur (Ogawa, 1993).

D'autre part, la plupart des cytokines sont redondantes. Les facteurs de croissance peuvent être divisés en 3 groupes :

1) facteurs affectant la cinétique du cycle cellulaire des progéniteurs primitifs quiescents.

Plusieurs facteurs ont été identifiés pour être impliqués dans le déclenchement des divisions cellulaires des progéniteurs hématopoïétiques « dormants ». Très tôt, il a été montré que l'IL-1 (ou hématopoïétin-1) agissait en synergie avec l'IL-3 pour supporter la prolifération des cellules souches hématopoïétiques murines. Plus tard, on a montré que l'IL-6, le G-CSF, l'IL-11, le SCF (Stem Cell Factor) et l'IL-12 agissaient en synergie avec l'IL-3 pour supporter la formation de colonies à partir de progéniteurs hématopoïétiques murins quiescents. En plus de ces facteurs, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) peut augmenter la prolifération des progéniteurs humains primitifs.

2) facteurs non-spécifiques agissant à un niveau intermédiaire dans la différenciation.

Les facteurs non-spécifiques agissant dans les phases intermédiaires sont l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-4. Ils soutiennent la prolifération des progéniteurs multipotentiels lorsqu'ils sont sortis de la phase G0. La découverte de l'identité entre la sous-unité β du récepteur de l'IL-3 humain et celle du récepteur du GM-CSF humain ajoute encore à la redondance fonctionnelle entre ces deux cytokines.

3) facteurs spécifiques agissant tardivement dans la différenciation.

La plupart supportent la prolifération et la maturation des progéniteurs déjà engagés dans la différenciation. Le M-CSF et l'IL-5 sont spécifiques des lignées macrophage/monocyte et éosinophiles, respectivement. Le G-CSF régule la prolifération et la maturation des progéniteurs des neutrophiles.

III- L'éosinopoïèse

Elle se déroule selon le processus de l'hématopoïèse. Quatre stades de précurseurs éosinophiles ont été identifiés : les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes.

Trois cytokines possèdent un rôle majeur dans l'éosinopoïèse : l'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 sont les médiateurs de la différenciation et de la maturation des éosinophiles. Ces cytokines sont codées par des gènes étroitement liés sur le chromosome 5q31 et se lient à des récepteurs qui ont une chaîne β commune. Elles 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 and Moore 1988; Clutterbuck et al, 1990). Cependant, l'IL-5 est la cytokine la plus spécifique de la lignée éosinophile et est responsable de la différenciation sélective en éosinophile (Sonoda et al, 1989; Clutterbuck et al, 1989; Saito et al, 1989). L'IL-5 stimule également la libération des éosinophiles de la moelle osseuse dans la circulation périphérique. Après une période de maturation de quelques jours, l'éosinophile quitte la moelle osseuse pour un court séjour sanguin d'environ 24 heures et migre vers les tissus pour coloniser différents organes (tractus gastrointestinal, génito-urinaire, et respiratoire). La migration des éosinophiles dans les tissus est initiée par des molécules chimioattractantes. Ces molécules sont responsables à la fois de la domiciliation physiologique et du recrutement des éosinophiles aux sites inflammatoires. De nombreuses substances agissent sur les éosinophiles dont des dérivés de l'acide arachidonique tels que le leucotriène B₄, des médiateurs lipidiques tels que le PAF, des produits bactériens, des interleukines (ex l'IL-16) et plusieurs chimiokines. Toutefois, 2 seulement sont spécifiques des éosinophiles : l'éotaxine 1 et l'éotaxine 2 (Jose et al, 1994; Forssman et al, 1997) qui se lient aux éosinophiles via le récepteur CCR3. La migration des éosinophiles vers les tissus fait intervenir essentiellement deux couples de molécules d'adhérence : VLA-4 / VCAM-1 et Mac-1 (récepteur pour iC3b) / ICAM-1. La présence de VLA-4 sur les éosinophiles conduit à l'adressage spécifique des éosinophiles sur le site de l'inflammation car les neutrophiles ne l'expriment pas. La durée de vie des éosinophiles dans les tissus, estimée à au moins 6 jours, dépend de la libération locale d'IL-5 et de GM-CSF.

IV- Les cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon ombilical

Les cellules souches hématopoïétiques présentes dans le sang de cordon ombilical sont spécifiquement enrichies en progéniteurs immatures. Leur utilisation pour la transplantation est relativement récente et a stimulé les recherches sur ces cellules. Elles forment *in vitro* plus de colonies (Broxmeyer et al, 1991), ont une meilleure expansion (Mayani et al, 1993) et une meilleure survie (Migliaccio et al 1992) que les cellules souches du sang périphérique. Une des explications possibles serait que les cellules foetales et néonatales seraient programmées de façon préférentielle vers la prolifération, ce qui serait un avantage pour l'expansion. De plus, le sang collecté à partir d'un seul cordon ombilical lors d'un accouchement permet de repeupler la moelle d'un enfant. Les lymphocytes du sang de cordon sont, pour une large part, immatures. Même lors de transplantations non identiques dans le système HLA, très peu de réactions du transplant contre l'hôte ont été obtenues. On comprend donc que les propriétés des cellules de sang de cordon ombilical ont été étudiées de façon extensive. Les études ont porté sur 3 points :

- 1) quantifier les progéniteurs myéloïdes et en étudier les capacités d'expansion *in vitro*;
- 2) préciser les propriétés immunologiques des cellules du sang de cordon;
- 3) mettre au point le transfert de gènes dans les progéniteurs hématopoïétiques présents dans le sang de cordon ombilical.

Tableau I: Médiateurs préformés de l'éosinophile (protéines cationiques et enzymes)
D'après Dubucquoi et Capron, 1998

médiateurs de l'éosinophile	propriétés
<p>MBP Protéine basique majeure 14kDa</p>	<p>toxicité pour les helminthes, les cellules tumorales et les cellules de mammifères bactéricide activation des mastocytes neutralisation de l'héparine pas d'activité enzymatique</p>
<p>ECP Protéine cationique 18 à 21 kDa</p>	<p>diminution du temps de coagulation altération de la fibrinolyse cytotoxicité contre les parasites, les bactéries, les cellules de mammifères (neurotoxique) activité ribonucléasique</p>
<p>EDN ou EPX protéine neurotoxique 18,6 kDa</p>	<p>fortement neurotoxique inhibition de culture lymphocytaire activité ribonucléasique (50 à 100 fois plus importante que celle de l'ECP)</p>
<p>EPO Péroxydase 2 polypeptides de 15 et 55 kDa</p>	<p>formation de dérivés halogénés toxique pour les microorganismes et les cellules tumorales activation des mastocytes, des macrophages résistance au cyanure</p>
<p>Enzymes: aryl-sulfatase collagénase élastase β-glucuronase</p>	<p>catabolisme des protéoglycanes et des glycoaminoglycanes hydrolyse des collagènes de type I et II</p>

Tableau II: Libération sélective des protéines cationiques présentes dans la matrice des éosinophiles

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

3- Les médiateurs

Les éosinophiles synthétisent différents types de médiateurs cytolytiques, pro-inflammatoires, ainsi que des cytokines.

I- Les protéines basiques

Les éosinophiles peuvent libérer, à partir de leurs granules, différentes protéines basiques aux propriétés cytotoxiques, jouant un rôle majeur dans la défense anti-parasitaire et contribuant également aux lésions tissulaires dans de nombreux syndrômes hyperéosinophiliques dont l'allergie. Ces protéines sont la MBP, l'ECP, l'EDN et l'EPO. Les basophiles et les neutrophiles contiennent très peu de ces protéines dont la source principale est l'éosinophile.

Leurs principales fonctions sont résumées dans le tableau I.

L'activation des éosinophiles par différents isotypes d'anticorps (IgG, IgE, IgA) et l'analyse de la libération des protéines cationiques montrent un phénomène de dégranulation à la fois sélectif et dynamique (tableau II). En effet, le pontage des récepteurs membranaires permet une libération des médiateurs des éosinophiles. Ce mécanisme a été bien étudié dans le cas des mastocytes, après une activation médiée par le récepteur de forte affinité pour les IgE (Fc ϵ RI). L'activation a lieu après pontage direct du récepteur par des anticorps dirigés contre ce récepteur, ou, par l'addition d'un complexe ligand-Ac anti-ligand (IgE + 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, 1985a). Ainsi, les éosinophiles portant des IgE de surface et purifiés à partir de sang de patients atteints de filariose (Khalife et al, 1986a) ou allergiques (Tomassini et al, 1991) libèrent de l'EPO après incubation avec un antigène spécifique ou un anticorps monoclonal anti-IgE. Cependant, aucun relargage d'EPO n'a été observé après addition d'anticorps anti-IgG, ni par des éosinophiles de patients bilharziens, ni par des éosinophiles de patients allergiques (Khalife

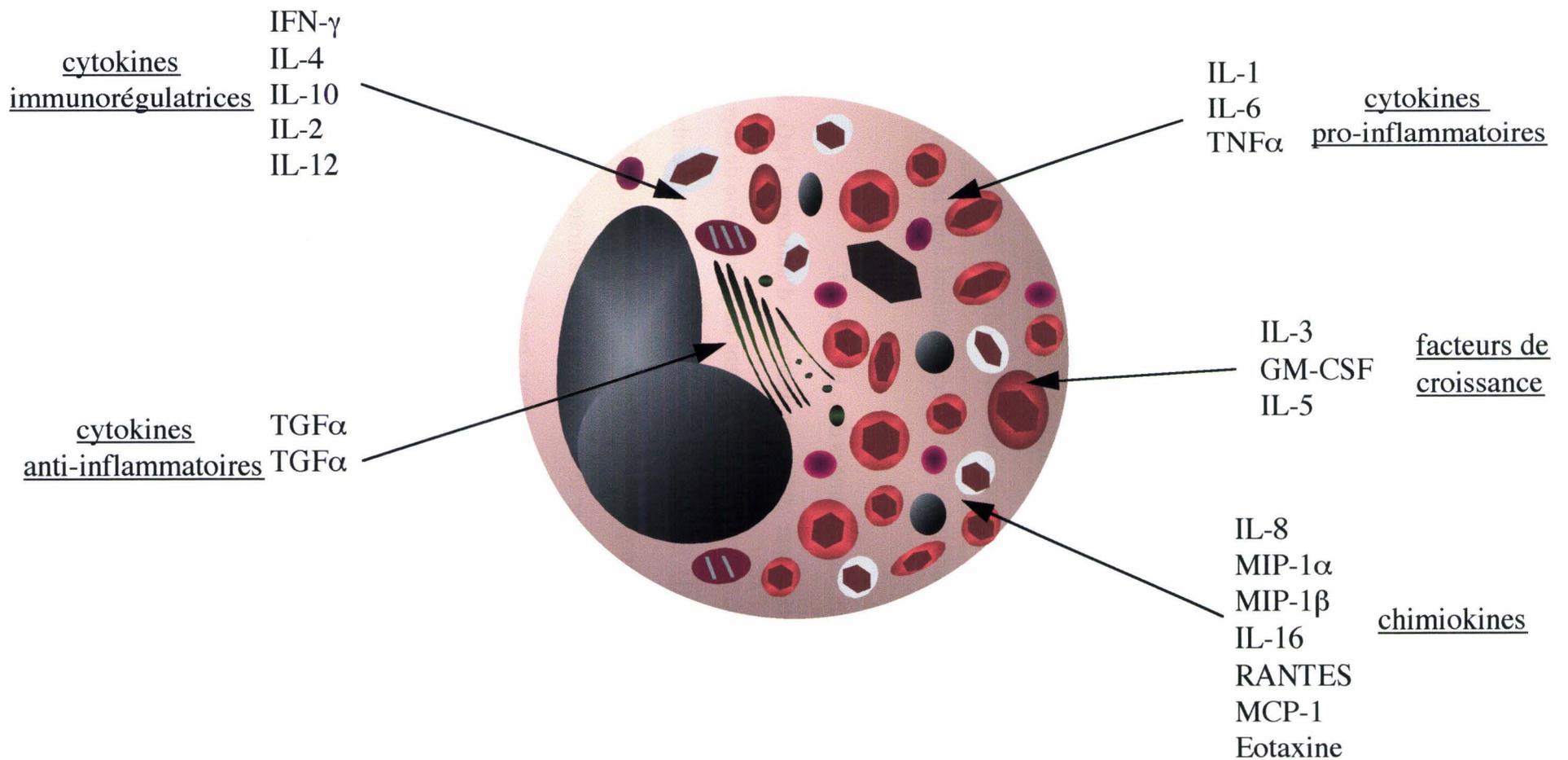


Figure 9: Médiateurs néoformés et cytokines de l'éosinophile (d'après Dubucquoi et Capron, 1998)

L'éosinophile est une source de cytokines immunorégulatrices, pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, de facteurs de croissance et de chimiokines

et al, 1986a; Tomassini et al, 1991). Dans les mêmes conditions expérimentales, la libération d'autres protéines cationiques de l'éosinophile (ECP et MBP) a été étudiée. La MBP est relarguée par les éosinophiles après addition d'un antigène spécifique ou d'un anti-IgE (Capron et al, 1987a). Aucune libération d'ECP, en revanche n'a pu être détectée après activation IgE-dépendante, alors que des quantités significatives d'ECP ont été mesurées après activation par des anticorps anti-IgG (Khalife et al, 1986a; Tomassini et al, 1991). Enfin, l'activation des éosinophiles par des anticorps anti-IgA permet le relargage simultané de l'EPO, de l'ECP (Tomassini et al, 1991) et de l'EDN (Abu Ghazaleh et al, 1989).

II- Les cytokines (Figure 9)

Au cours des dernières années, l'éosinophile a été reconnu comme étant la source de nombreuses cytokines (tableau III), modifiant ainsi le schéma classique d'interactions cellulaires. Les éosinophiles peuvent produire :

- leurs propres facteurs de croissance : IL-3 (Kita et al, 1991), GM-CSF (Moqbel et al, 1991), l'IL-5 (Desreumaux et al, 1992). Ces cytokines agissent aussi sur les éosinophiles matures, en régulant leur apoptose et en augmentant leurs fonctions effectrices.

- d'autres facteurs de croissance : TGF α (Wong et al, 1990), TGF β 1 (Wong et al, 1991), VGEF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Horiuchi and Weller, 1997), PDGF (Platelet Derived Growth Factor- β) (Ohno et al, 1995).

- des cytokines pro-inflammatoires (participant à la réaction inflammatoire aigüe et chronique) : IL-1 α (Weller et al, 1993), IL-6 (Hamid et al, 1992), IL-8 (Moqbel et al, 1994), TNF- α (Costa et al, 1993) et MIP-1 α (Costa et al, 1993) et des cytokines anti-inflammatoires : TGF α et β (Weller et al. 1994).

- des cytokines immunorégulatrices de type Th1 : IFN- γ (Lamkhioued et al, 1996), IL-2 (Levi-Schaffer et al, 1996), IL-12 (Grewe et al, 1998), et de type Th2 : IL-10 et IL-4 (Lamkhioued et al. 1996).

De plus, les éosinophiles sont la source de nombreuses chimiokines : IL-16 (Lim et al, 1996), MIP-1 α (Costa et al, 1993), MIP-1 β , RANTES (Ying et al, 1996), MCP-1 (Izumi et al, 1997), éotaxine (Kitaura et al, 1996).

Tableau III: Cytokines et chimiokines de l'éosinophile
D'après Dubucquoi et Capron, 1998

médiateurs de l'éosinophile	propriétés
	<u>pro-inflammatoires</u>
IL-1 IL-6 TNF- α	anorexie fièvre augmentation des protéines de la phase aigüe de l'inflammation
	<u>immuno-régulatrices</u>
IL-4 IL-10	activation des lymphocytes et des plasmocytes inhibition des cytokines de type 1
IFN- γ	activation des macrophages inhibition des cytokines de type 2
IL-2 IL-12	induction de la prolifération switch Th2 vers Th1 augmentation de l'activité cytolytique des cellules T, des cellules NK et des macrophages
	<u>anti-inflammatoires</u>
TGF α TGF β	contrôle de la réponse inflammatoire inhibition de la prolifération cicatrisation
	<u>facteurs de croissance</u>
IL-3, GM-CSF, IL-5	différenciation, survie et croissance des éosinophiles
	<u>chimiokines</u>
IL-8, IL-16, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, éotaxine	recrutement cellulaire

Plusieurs groupes ont mis en évidence une localisation préférentielle des cytokines au niveau des granules spécifiques des éosinophiles. C'est le cas des facteurs de croissance IL-3 et GM-CSF (Levi-Schaffer et al, 1995; Desreumaux et al, 1996), du TGF α (Egensten et al, 1996) et de l'IL-5 (Dubucquoi et al, 1994), ainsi que des cytokines immunorégulatrices comme l'IL-4 (Moqbel et al, 1995) et l'IL-2 (Levi-Schaffer et al, 1996). Le TNF- α est détecté au niveau des vésicules lipidiques (Beil et al, 1995). Le stockage de ces cytokines dans les granules fournit aux éosinophiles un pool de cytokines préformées. Il semblerait qu'il existe un mécanisme de dégranulation sélective des différentes cytokines exprimées par les éosinophiles (Woerly et al, en préparation).

III- Les radicaux oxygénés (Tableau IV)

Les éosinophiles répondent à la stimulation par une flambée respiratoire générant des radicaux oxygénés toxiques comme O₂⁻, H₂O₂ et probablement l'oxygène singulet.

IV- Les médiateurs lipidiques (Tableau IV)

Stimulés par différents agents activateurs, les éosinophiles ont la propriété de produire en grande quantité des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique. Il s'agit essentiellement du LTC₄ (alors que le neutrophile produit surtout du LTB₄), des prostaglandines PGE₂, PGF₁, PGD₂ et PGF_{2a}, ainsi que du thromboxane A₂ (TxA₂). Ils peuvent synthétiser également des quantités très importantes de PAF-acéther. Ces différents médiateurs ont des propriétés chimiotactiques, spasmogènes ou vasoactives et peuvent participer au développement des réactions inflammatoires au niveau bronchique (asthme) ou cutané (angioedème).

V- Les neuropeptides (Tableau IV)

Les neuropeptides ont été identifiés à l'origine dans le tissu neuronal. Il a été démontré récemment que certains de ces peptides pouvaient être libérés par certaines cellules du système immunitaire et moduler ainsi la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T régulateurs. Les éosinophiles peuvent synthétiser de la substance P (SP), du peptide vasointestinal (VIP), notamment dans les granulomes hépatiques ou intestinaux, et contribuer ainsi à la régulation de l'inflammation locale (Weller et al. 1994).

Tableau IV: Médiateurs néosynthétisés par l'éosinophile
D'après Dubucquoi et Capron, 1998

médiateurs de l'éosinophile	propriétés
<i>Lipidiques</i>	
PGE2	vasodilatation, fluidification des sécrétions
PGD2 PGF2a TxA2 LTC4	constriction bronchique et vasculaire augmentation de la perméabilité agrégation plaquettaire
PAF	constriction vasculaire et bronchique augmentation de la viscosité des sécrétions bronchiques agrégation plaquettaire activation des polynucléaires neutrophiles, mastocytes et éosinophiles
<i>métabolisme oxydatif</i>	
anions superoxydes peroxyde d'hydrogène oxygène singulet	cytotoxicité contre les parasites, les cellules tumorales et normales
<i>Neuropeptides</i>	
VIP	bronchoconstriction, vasodilatation
Substance P	vasoconstriction, vasodilatation, oedème vasculaire augmentation de la sécrétion du mucus dégranulation des mastocytes

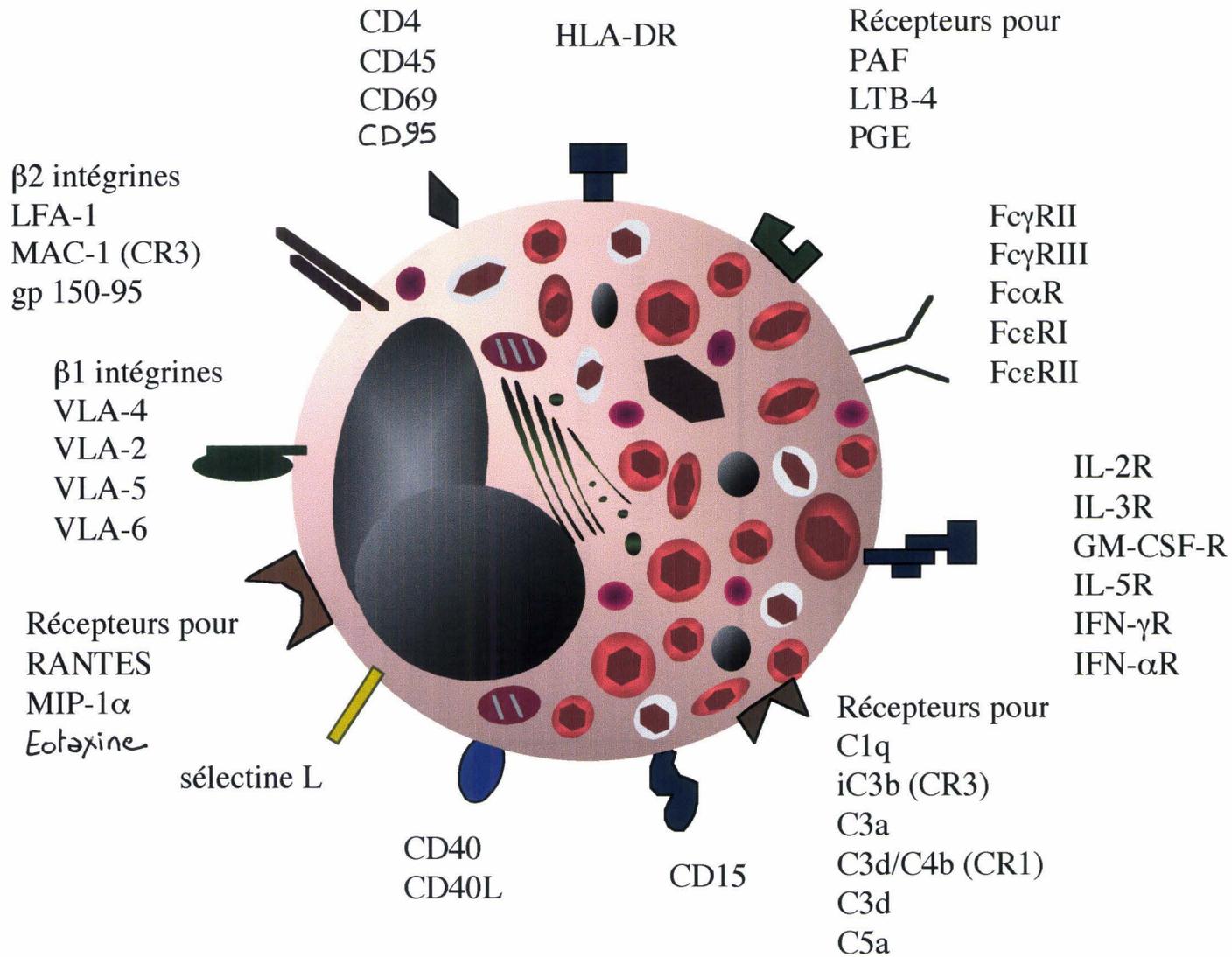


Figure 10: Molécules de surface de l'éosinophile (d'après Dubucquoi et Capron, 1998)

on distingue des récepteurs pour les immunoglobulines,
des récepteurs pour le complément, des récepteurs pour
les cytokines et les chimiokines, et des molécules d'adhérence

4- Récepteurs et marqueurs de surface (Figure 10)

De nombreux récepteurs et marqueurs de surface ont été identifiés sur les éosinophiles humains. On distingue les récepteurs pour les immunoglobulines, pour les protéines du complément, pour les cytokines et pour les facteurs chimiotactiques, ainsi que les molécules d'adhérence.

- Les précurseurs des éosinophiles expriment des protéines de classe II du système majeur d'histocompatibilité, alors que les éosinophiles matures circulants n'en expriment pas. Cependant l'expression de HLA-DR est induite lorsqu'ils sont cultivés en présence de fibroblastes murins et de GM-CSF.

- La molécule CD4 est une glycoprotéine de 55-60 kDa exprimée à la surface des lymphocytes T helper qui médie l'interaction de ces lymphocytes avec les cellules exprimant des molécules de classe II au cours de la réponse immunitaire. Lucey et al ont montré en 1989 qu'après activation par le GM-CSF ou en présence de fibroblastes murins, les éosinophiles exprimaient le CD4 à leur surface et étaient capables de le synthétiser. Le CD4 des éosinophiles, tout comme celui des lymphocytes et des monocytes, est capable de se lier à la protéine gp120 du VIH. Cela confère aux éosinophiles un rôle potentiel de cellule réservoir du VIH (Freddman et al. 1991).

- Les éosinophiles expriment des molécules costimulatrices telles que CD40 (Ohkawara et al, 1996) et CD40L (Gauchat et al, 1995), exprimées constitutivement par les éosinophiles de patients HES, ainsi que par des éosinophiles normaux activés. La fonctionnalité de ces deux molécules a été suggérée.

- Le marqueur d'activation CD69 a été détecté en quantité plus importante sur des éosinophiles provenant de patients atteints d'helminthiases que sur des éosinophiles d'individus sains (Mawhorter et al, 1996).

- Les éosinophiles expriment à leur surface plusieurs types de récepteurs aux immunoglobulines (FcR).

Le premier FcR décrit sur les éosinophiles est un récepteur pour les IgG. Les premiers récepteurs aux IgG apparaissent dans la moelle osseuse au stade promyélocyte. Ils ont une forte affinité et sont appelés Fc γ RI (CD64). Les cellules matures quant à elles ont perdu ce récepteur mais expriment un récepteur de faible affinité, le Fc γ RII (CD32), de 43 kDa. Jusqu'à présent, l'absence de Fc γ RIII (CD16) sur les éosinophiles a permis de les séparer des neutrophiles par une technique de sélection magnétique négative. Cependant, des travaux récents ont mis en évidence la présence d'un pool intracellulaire de CD16 dans les éosinophiles, associé à une expression membranaire faible et transitoire (Zhu et al, 1998). Le Fc γ RII est impliqué dans l'ingestion par les éosinophiles de petites particules, dans la cytotoxicité vis-à-vis des parasites et enfin dans l'activation du complément par les IgG complexées.

Les éosinophiles expriment également un récepteur pour les IgA (Fc α R, 70-100 kDa) (Capron et al, 1988; Monteiro et al, 1993). Son expression est très variable selon les patients (5 à 90 %) et suggère qu'il existe une modulation de ce récepteur. Plus récemment un récepteur pour le composant sécrétoire, se liant à l'IgA sécrétoire a été décrit (Lamkhioued et al, 1995).

Le premier récepteur aux IgE identifié sur les éosinophiles est un récepteur de faible affinité, Fc ϵ RII, de 45 kDa, homologue à une lectine de type C (Capron et al. 1989). Il a été montré, par des approches immunologiques puis moléculaires, que le Fc ϵ RII des éosinophiles était identique au CD23 des cellules B (Capron et al, 1991) et plus récemment, que les isoformes a et b étaient exprimées par les éosinophiles (Soussi Gounni et al, 1998). Il est préférentiellement exprimé sur les éosinophiles hypodenses et participe aux fonctions IgE-dépendante des éosinophiles. Un deuxième récepteur aux IgE a été découvert par des techniques de Northern-Blot, de cytométrie en flux et par analyse fonctionnelle (Truong et al. 1993). C'est une lectine d'environ 31 kDa appelée Mac-2/ ϵ BP ou encore galectine 3. Enfin, le Fc ϵ RI, récepteur de forte affinité pour l'IgE a été mis en évidence à la surface des éosinophiles (Soussi Gounni et al, 1994) et participe à la fois à la défense anti-parasitaire et à la libération des médiateurs granulaires. De manière intéressante, il a pu être montré que ce récepteur était absent des éosinophiles de souris (De Andres et al, 1997), mais que des souris rendues transgéniques

pour la chaîne α du récepteur humain l'exprimaient sur leurs éosinophiles (Dombrowicz et al, 1998).

- Des récepteurs pour les protéines du complément C1q, C3a, C3b/C4d (CR1), iC3b (CR3), C3d et C5a ont également été identifiés sur les éosinophiles (Capron et al, 1987b; Capron et al, 1993).

CR3 est impliqué dans la fixation de particules recouvertes de iC3b et également, en tant que membre de la famille des $\beta 2$ intégrines, dans la liaison à des ligands variés tels que ICAM et des facteurs de coagulation (Facteur X, fibrinogène).

- Différents récepteurs pour les cytokines ont été décrits sur les éosinophiles qui sont les seuls leucocytes à exprimer les 3 chaînes α spécifiques, respectivement de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF (Capron et al. 1993). L'éosinophile exprime également la chaîne de faible affinité du récepteur de l'IL-2 (Plumas et al. 1991), ainsi que les récepteurs pour l'IFN- γ et pour l'IFN- α (Aldebert et al. 1996). L'IL-1R, l'IL-4R, l'IL-16R (CD4), le TNFR ainsi que la chaîne β commune aux récepteurs pour l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF ont également été décrits.

L'augmentation de l'IL-2R soluble (sCD25) dans le sérum est utilisée comme marqueur de la gravité du syndrome HES (Plumas et al, 1991; Prin et al, 1991).

- Les éosinophiles expriment différents récepteurs de facteurs chimiotactiques dont le récepteur pour le Platelet Activating Factor (PAF), un des stimulants naturels les plus puissants des éosinophiles, induisant le chimiotactisme mais aussi l'activation cellulaire. Des récepteurs pour d'autres médiateurs lipidiques ont également été décrits tels que les récepteurs pour la prostaglandine (PG)E et pour le leucotriène (LT)B₄. Des récepteurs pour différentes substances chimioattractantes comme le fMLP ou les chimiokines, comme le CCR1 (RANTES et MIP-1 α), le CCR3 (éotaxine, RANTES, MCP3, 4 et 5), ainsi que l'IL-8R, ont également été identifiés (Rot et al. 1992).

- Un grand nombre de molécules intervenant dans l'adhérence à l'endothélium vasculaire, ainsi que dans les contacts intercellulaires, est détecté sur les éosinophiles. Ces molécules permettent aux éosinophiles de sortir du flux sanguin et de gagner les tissus présentant une inflammation. L'éosinophile peut en effet exprimer des β 1 intégrines, telles que le VLA-4 (CD49d/CD29), des β 2 intégrines, telles que LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CR3, CD11b/CD18) et CD11c/CD18, des membres de la superfamille des immunoglobulines (les éosinophiles du crachat de patients asthmatiques expriment ICAM-1) et la sélectine L (CD62-L). Enfin, les éosinophiles expriment un des ligands principaux des sélectines, le carbohydrate Lewis^X sous sa forme sialylée ou non ((s)CD15).

La présence de VLA-4 (absent de la surface des neutrophiles) leur permet de se lier à VCAM-1 et donc de migrer aux sites d'inflammation chez les patients présentant le syndrome LAD (Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrome) caractérisé par un déficit en β 2 intégrines.

La plupart de ces récepteurs sont inductibles et leur expression est exacerbée chez les patients atteints de divers syndromes hyperéosinophiliques ou *in vitro* après stimulation par différents agents activateurs notamment par l'IL-5 ou le fMLP.

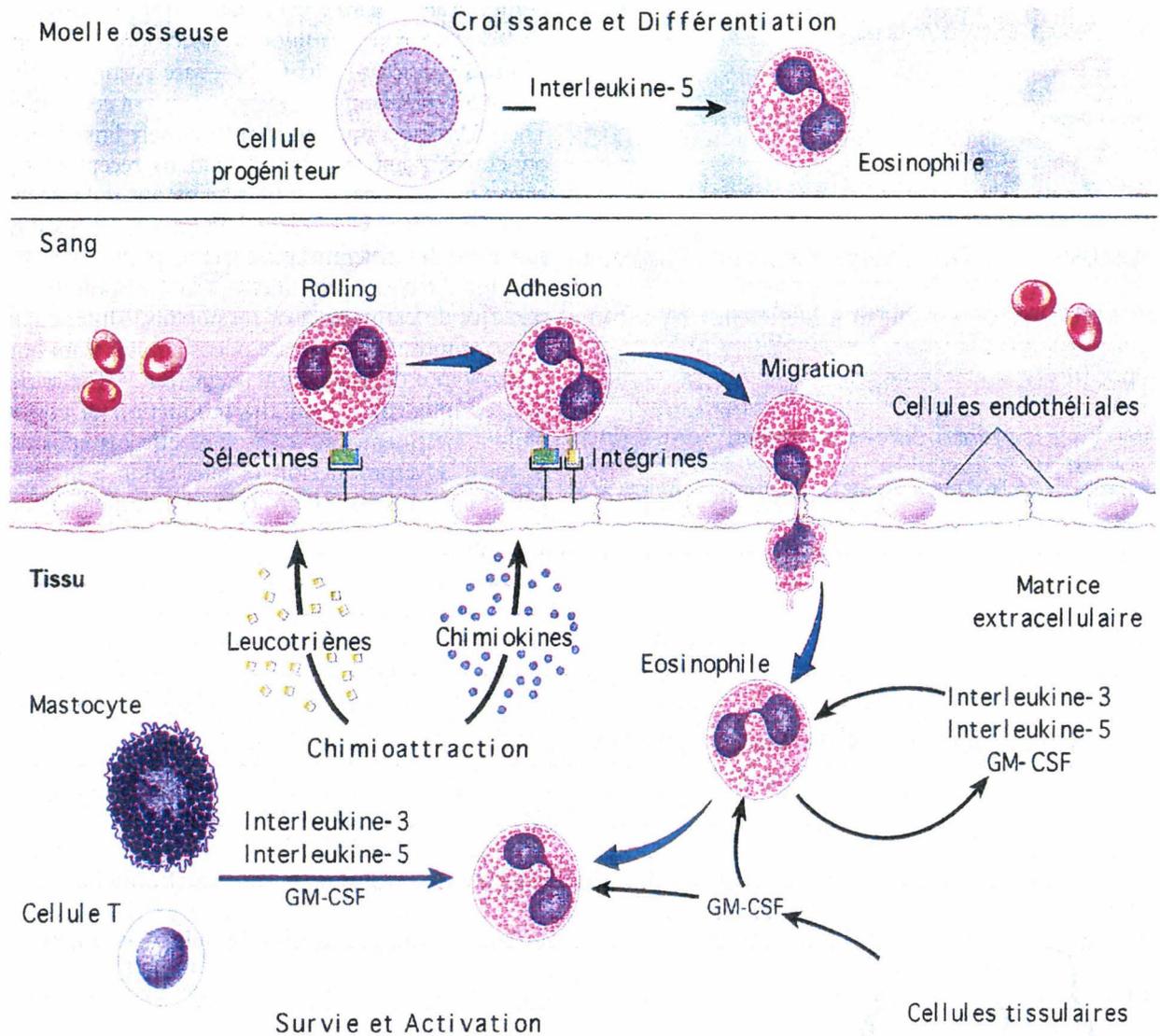
5- Hétérogénéité des éosinophiles

De nombreuses études ont révélé l'hétérogénéité cytologique et fonctionnelle des éosinophiles et ont établi leur rôle dans divers mécanismes immunopathologiques. Par rapport aux éosinophiles isolés du sang de donneur sain, les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques sont particulièrement cytotoxiques vis-à-vis des parasites, présentent une capacité accrue de phagocytose et un métabolisme oxydatif supérieur. Ces données suggèrent que les éosinophiles de patients ayant une éosinophilie sont dans un état d'activation ou de stimulation *in vivo*. Il existe 2 phénotypes d'éosinophiles :

- des éosinophiles de densité normale ou « normodenses » présents surtout chez les sujets normaux.

Figure 11 : Processus impliqués dans l'éosinophilie (d'après Rothenberg, 1998)

Les éosinophiles se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules progéniteurs et sous l'influence de l'IL-5. Les éosinophiles matures du sang périphérique adhèrent aux cellules endothéliales par l'intermédiaire des sélectines et des intégrines. En présence de médiateurs chimioattractants, les éosinophiles traversent les cellules endothéliales et migrent vers les tissus. L'accumulation des éosinophiles dépend de la production d'IL-3, d'IL-5, et GM-CSF produits par les cellules T, les éosinophiles eux-mêmes et probablement les mastocytes.



- des éosinophiles de basse densité ou « hypodenses » présents surtout chez les sujets ayant une hyperéosinophilie. Ils ont un cytoplasme très vacuolé, sont partiellement dégranulés et présentent une faible augmentation du nombre de corps lipidiques. Ils possèdent à leur surface un plus grand nombre de récepteurs pour le complément et pour les immunoglobulines que les éosinophiles normodenses. De plus, ils sont métaboliquement et fonctionnellement différents des éosinophiles normodenses. Ils semblent posséder un grand potentiel d'activité qui leur permet d'endommager les tissus qu'ils envahissent suite à une réponse chimiotactique et d'adhérer quasiment spontanément aux cellules endothéliales. De plus, la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* est restreinte à ces éosinophiles (Capron et al, 1984).

6- Fonctions

Longtemps considéré comme jouant un rôle passif dans la réaction immunitaire, l'éosinophile tient une place importante notamment dans les infections parasitaires, les manifestations allergiques et certaines réponses inflammatoires chroniques. Les principales pathologies auxquelles est associée une éosinophilie sont mentionnées dans le tableau V. On lui attribue un rôle protecteur donc bénéfique dans les manifestations parasitaires, mais il peut avoir un rôle délétère donc néfaste au cours des maladies allergiques ou de divers syndromes hyperéosinophiliques.

Les processus impliqués dans l'éosinophilie sont schématisés par la Figure 11.

C'est la découverte de l'expression par les éosinophiles de nombreux récepteurs membranaires, des molécules d'adhérence, du CD4 et des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, qui a permis d'envisager le rôle de cette cellule dans la réponse immune. Outre leur rôle de cellule présentant l'antigène et de réservoir pour le virus de l'immunodéficience humaine, nous allons détailler 2 phénomènes qui caractérisent le rôle

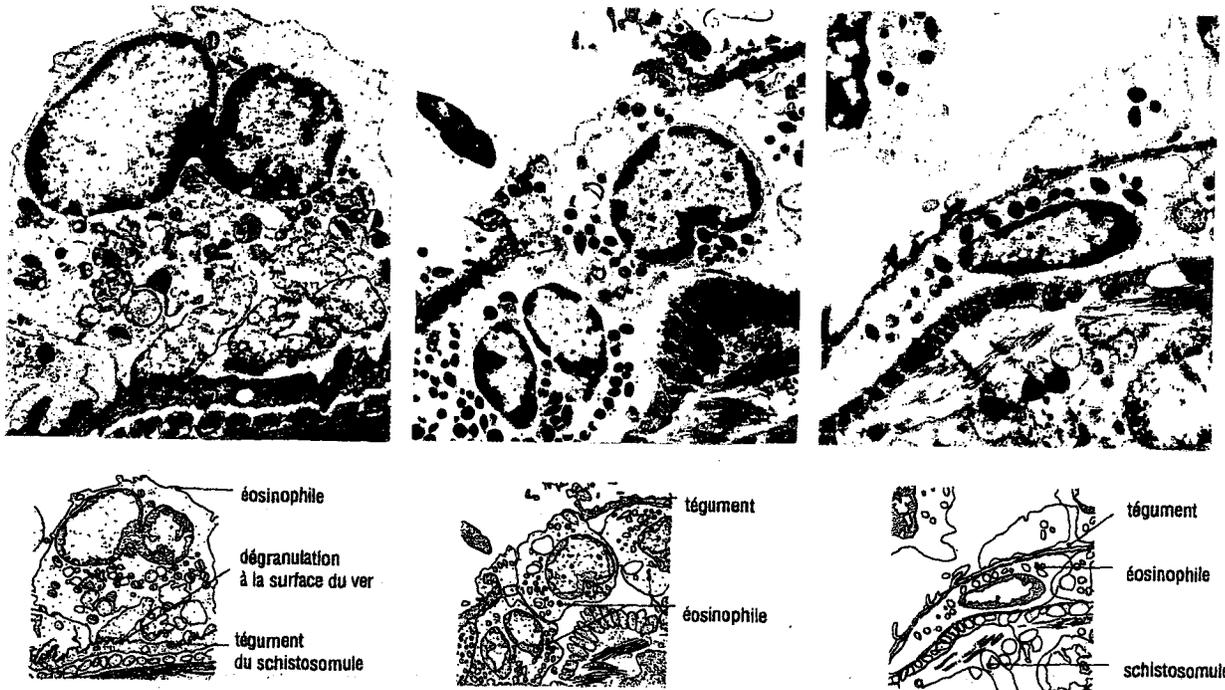
bénéfique et néfaste des éosinophiles: la cytotoxicité vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* et la réaction d'hypersensibilité immédiate.

Tableau V: Maladies associées à une éosinophilie
D'après Rothenberg et al,1998

Type de maladie	éosinophilie		causes (exemples)
	sang périphérique	tissus	
infectieuse	oui	oui/non	infestations par certains helminthes
respiratoire	oui/non	oui	pneumonie à éosinophiles asthme
gastrointestinale	oui/non	oui	maladies inflammatoires de l'intestin gastroentérite à éosinophiles colite allergique
allergique	oui/non	oui	conjonctivite et rhinite allergiques asthme eczéma
systémique	oui	oui	syndrome idiopathique hyperéosinophilique vasculite
iatrogène	oui	oui/non	réaction médicamenteuse réaction à certaines cytokines
maligne	oui/non	oui/non	lymphome carcinome

Figure 12 : L'attaque des parasites par les éosinophiles humains

Ces photos de microscopie électronique (document du Dr D. McLaren) montrent l'adhésion de l'éosinophile et sa dégranulation à la surface de la larve parasitaire (à gauche), la formation de lésions dans le tégument du parasite et la migration des éosinophiles à travers ces lésions (milieu et droite)



I- Cytotoxicité vis-à-vis des larves de schistosome

L'infection par les helminthes peut se caractériser par 3 évènements immunologiques, classiquement associés à l'hypersensibilité immédiate : l'éosinophilie, la mastocytose et l'augmentation de la synthèse d'IgE. L'éosinophilie dépend de l'IL-5 produite par les lymphocytes Th2.

La fonction cytotoxique des éosinophiles vis-à-vis de *S. mansoni* a été découverte en 1975 (Butterworth et al, 1975), puis confirmée dans différents modèles expérimentaux (Butterworth, 1984; Capron et al, 1986). La plupart des expériences ont d'abord été réalisées en utilisant des éosinophiles sanguins de donneurs sains et du sérum immun de patients infectés. Les anticorps spécifiques se lient sur des molécules de surface des parasites via leur fragment F(ab')₂, tandis que la portion Fc se lie aux récepteurs Fc présents à la surface des éosinophiles. Le mécanisme de cytotoxicité comporte 3 étapes. Le parasite est reconnu par les anticorps. Ces anticorps permettent aux éosinophiles de s'y attacher tout en s'activant. Finalement, les éosinophiles tuent les parasites grâce à différents produits sécrétés et à des métabolites oxygénés (Figure 12). Il faut souligner que ces FcR sont surexprimés sur une sous-population d'éosinophiles dont l'état d'activation gouverne la potentialité cytotoxique.

D'autres cellules effectrices (macrophages, plaquettes) participent également à la défense de l'hôte contre l'invasion parasitaire et permettent de contrôler la multiplication et la dissémination des parasites. Les lymphocytes jouent également un rôle dans ce phénomène en sécrétant 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.

A- ADCC dépendante des IgG

Les anticorps d'isotype IgG présents dans le sérum immun inactivé par la chaleur ont été les premiers incriminés dans ce mécanisme d'ADCC (Butterworth et al, 1977). Les FcγR des

éosinophiles sont clairement impliqués dans ce mécanisme, comme le montrent les effets inhibiteurs des complexes IgG. De plus, il a été montré que les 4 isotypes d'IgG n'induisaient pas la cytotoxicité avec la même efficacité (Khalife et al, 1989). En l'absence de facteurs activateurs exogènes, les IgG1 et les IgG3 purifiées à partir du sérum de patients infectés par *Schistosoma mansoni* sont les plus efficaces. L'IgG2 a une fonction double, elle est effectrice en présence d'éosinophiles activés et bloquant avec les éosinophiles normaux. Enfin, l'IgG4 n'induit pas la cytotoxicité mais, au contraire, bloque la cytotoxicité médiée par les IgG1.

B- ADCC dépendante des IgE

La découverte de la présence de récepteurs aux IgE sur les éosinophiles, l'association traditionnelle entre les éosinophiles et les complexes immuns IgE, ainsi que la détection d'IgE à la surface des éosinophiles, a conduit à étudier la fonction effectrice des éosinophiles humains en présence d'anticorps IgE. Lorsque des éosinophiles purifiés à partir de sang de patients présentant une hyperéosinophilie sont incubés en présence de sérum de patients infectés par *S. mansoni* et des schistosomules, on observe des taux importants de cytotoxicité, seulement si les sérums n'ont pas été chauffés (Capron et al, 1984). Différentes raisons ont suggéré la participation directe du FcεRII des éosinophiles humains dans la fonction effectrice contre les parasites. 1) la labilité à la chaleur du facteur sérique, 2) la corrélation entre la capacité cytotoxique des sérum immuns et la présence d'Ac IgE dirigés contre le stade larvaire du parasite, 3) l'inhibition de la cytotoxicité par des IgE agrégées, et enfin, 4) la forte inhibition de la cytotoxicité par des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre FcεRII (Capron et al, 1986b).

Ce mécanisme, contrairement à la cytotoxicité IgG-dépendante, est restreint aux éosinophiles hypodenses.

Cependant, cela n'exclut pas une synergie potentielle avec les facteurs chimiotactiques qui résultent de l'activation du complément. Alors que le rôle des récepteurs C3b (CR1) a été

exclu de ce mécanisme, l'association synergique entre FcεRII et une molécule d'adhérence présente à la surface des éosinophiles a été démontrée. Un anticorps dirigé contre la chaîne α du CR3 (CD11b) inhibe spécifiquement l'adhérence et la cytotoxicité d'éosinophiles hypodenses à des schistosomules recouverts d'IgE (Capron et al, 1987b). En revanche, des Ac anti-CD11a (chaîne α de LFA-1) ou des anti-CD18 (chaîne β commune à la famille des β2 intégrines) n'inhibent pas l'adhérence ni la cytotoxicité bien que ces antigènes soient exprimés par les éosinophiles. Ces résultats soulignent le rôle de la chaîne α de CR3 dans les fonctions effectrices des éosinophiles en synergie avec les récepteurs Fc. Les ligands de CR3 à la surface du parasite n'ont pas été déterminés. Cependant des anticorps dirigés contre la séquence RGD inhibent significativement l'ADCC dépendante des IgE (Grangette et al, 1989).

De plus, il a été montré que les récepteurs aux IgE de forte affinité (FcεRI) étaient impliqués dans la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* (Soussi-Gounni et al, 1994), ce qui constituait la première démonstration du rôle de ce récepteur dans un processus de cytotoxicité antiparasitaire et donc son rôle potentiellement bénéfique dans la réponse immunitaire (Nutten et al, 1997).

C- ADCC dépendante des IgA

La préincubation des éosinophiles humains avec des IgA monomériques, ou mieux, avec des IgA agrégées par la chaleur, induit une inhibition significative de la cytotoxicité induite par un sérum immun (Capron et al, 1988). Ces résultats suggèrent la participation des récepteurs aux IgA dans les mécanismes d'ADCC médiés par les éosinophiles. La confirmation de la capacité des IgA à induire une cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules par les éosinophiles a été confirmée chez le rat (Grezel et al, 1993).

II- Cytotoxicité contre d'autres cibles

Les éosinophiles sont capables de tuer des parasites tels que *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* (Kazura and Grove, 1978), les larves de filaires (Ackerman et al, 1990), les trypanosomes (Sanderson et al, 1977), *Plasmodium falciparum* (Waters et al, 1987), le toxoplasme (Erbe et al, 1991), les leishmanies (Pimenta et al, 1987). Cette cytotoxicité implique principalement des IgG et/ou le complément et parfois les IgE.

La cytotoxicité contre d'autres cibles cellulaires ou tissulaires a également été démontrée. Cela inclut les cellules épithéliales et les pneumocytes, les cellules cardiaques, les érythrocytes et confère à l'éosinophile un pouvoir cytotoxique important vis-à-vis de nombreux tissus (Gleich and Adolphson, 1986).

III- Réaction d'hypersensibilité immédiate

A- Généralités

A la notion initiale de limitation des réactions d'hypersensibilité immédiate par l'éosinophile se substitue peu à peu la notion inverse d'amplification de cette hypersensibilité par cette cellule. Certains de ses composants facilitent en effet l'histaminolibération des mastocytes et des basophiles (MBP, ECP, EPO), augmentent le processus inflammatoire (LTC₄, PAF-acéther,...) ou interviennent sur l'hyperréactivité bronchique de l'asthme allergique (ECP, EDN). La mise en évidence d'un récepteur pour l'IgE, notamment sur les éosinophiles tissulaires, suivie de la démonstration qu'une activation IgE-dépendante induit la libération sélective de médiateurs tels que l'EPO, la MBP ou le PAF-acéther (Khalife et al, 1986a; Capron et al, 1987a; Tomassini et al, 1991) a permis de conférer à l'éosinophile un rôle majeur dans les réactions d'hypersensibilité IgE-dépendante.

L'atopie a été définie comme l'aptitude du système immunitaire à sécréter des quantités excessives d'IgE en réponse à des stimulations allergéniques minimales. Actuellement on peut retenir les caractéristiques suivantes de l'atopie :

- syndrômes comprenant l'asthme allergique, la rhinite allergique et l'eczéma atopique;
- suspicion de transmission héréditaire;
- synthèse d'IgE accrue envers les allergènes de l'environnement;
- anomalies pharmacologiques primitives ou secondaires à l'interaction des IgE liées aux cellules avec les allergènes.

B- Les IgE

Découvertes en 1967 par Ishizaka et Johansson, les IgE représentent l'isotype essentiel des immunoglobulines responsables de la réaction d'hypersensibilité immédiate. Comme les autres Ig, elles sont synthétisées par les plasmocytes qui dérivent de l'activation spécifique des lymphocytes B. Il est probable que la synthèse des IgE se fasse non seulement au niveau des centres germinatifs des ganglions lymphatiques, mais aussi directement au niveau du site de rencontre avec l'allergène, notamment au niveau du poumon et de la peau. Elle résulte d'interactions complexes entre les lymphocytes B, les lymphocytes T, les mastocytes et les basophiles, faisant intervenir à la fois une série de molécules de surface, notamment le couple CD40/CD40L et le CD80, et des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-13.

C- Les récepteurs aux IgE

Il existe 2 types de récepteurs pour les IgE que l'on différencie selon leur affinité. Le récepteur de forte affinité (FcεRI) a été initialement décrit sur les mastocytes et les basophiles. Des travaux récents ont montré qu'il est aussi présent, dans des pathologies particulières comme le syndrome hyperéosinophilique ou l'asthme, sur les éosinophiles, les cellules de Langerhans,

les cellules épithéliales et les monocytes. Le récepteur de faible affinité (FcεRII) pour des IgE libres et surtout pour les IgE complexées ne semble pas être présent sur les mastocytes et les basophiles, mais se situe sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes B, les éosinophiles, les plaquettes, et les cellules épithéliales (Gordon, 1992).

D- Les cellules participant à l'inflammation allergique

Alors que pendant des décennies, l'inflammation allergique était limitée aux mastocytes et basophiles, on tend à attribuer à ces cellules un rôle initiateur et à proposer que d'autres cellules dont les éosinophiles et les lymphocytes T aient un rôle important à jouer dans cette réaction.

Le rôle initiateur des mastocytes et des basophiles est attribué aux conséquences fonctionnelles de l'activation des récepteurs des IgE. En effet, les IgE ont la capacité de se fixer sur les mastocytes tissulaires et les basophiles sanguins via le récepteur FcεRI. Lorsqu'un antigène ponté 2 molécules d'IgE fixées à la surface de ces cellules, une modification membranaire en résulte et permet la pénétration intracellulaire de calcium aboutissant à la dégranulation de la cellule (libération d'histamine notamment) et à une activation des phospholipides membranaires. Ces mécanismes induisent la libération de médiateurs chimiques dépendant soit de la membrane (néo-formés), soit du granule (préformés) et de cytokines. Ils ont une action vasoactive (responsable des phénomènes immédiats de la réaction allergique), chimiotactique (entraînant une cascade de réactions impliquant notamment les éosinophiles et aboutissant à une pérennisation de la réaction en un processus inflammatoire : réaction non immédiate) ou cytotoxique et constituent la conséquence, le signal et le système d'amplification de la réaction d'hypersensibilité immédiate.

Les éosinophiles expriment le FcεRI et le FcεRII. Il est vraisemblable que les éosinophiles soient attirés au foyer inflammatoire par des médiateurs chimiotactiques, cytokines (IL-5, GM-CSF), chimiokines (RANTES, éotaxine) et le PAF. Ils seraient activés soit par des médiateurs de l'inflammation allergique, soit par des mécanismes IgE- ou IgG-dépendants.

L'éosinophile participe également à la pathogénie par le biais de la libération de médiateurs granulaires cytotoxiques, de radicaux libres de l'oxygène et de LTC₄/D₄. Une fois activé, l'éosinophile libère une partie de son contenu en granules (MBP, ECP, EPO, EDN) et devient hypodense. La MBP et l'ECP, protéines non enzymatiques, peuvent être considérées comme de véritables médiateurs de l'allergie car elles ont des propriétés très puissantes : ciliotoxicité pour l'épithélium bronchique, destruction cellulaire, activation non spécifique des mastocytes. Elles sont responsables du rôle délétère de l'éosinophile dans l'asthme et l'eczéma atopique (Venge et al, 1987; Gleich et al, 1993)

Un déséquilibre entre les sous-populations de lymphocytes Th1 et Th2 au profit des Th2 serait responsable, au moins en partie, de la synthèse préférentielle des IgE chez le sujet allergique. En dehors de la régulation de la synthèse d'IgE (IL-4, IL-13), les lymphocytes Th2 ont des actions régulatrices de l'hématopoïèse et agiraient sur le recrutement, la maturation et la survie au sein de l'infiltrat inflammatoire des éosinophiles (IL-5, GM-CSF, IL-3), des basophiles et des mastocytes (GM-CSF, IL-3) et des cellules mononuclées (GM-CSF). On considère actuellement que les lymphocytes sont les chefs d'orchestre de la réaction inflammatoire allergique et de l'asthme (Kay, 1994).

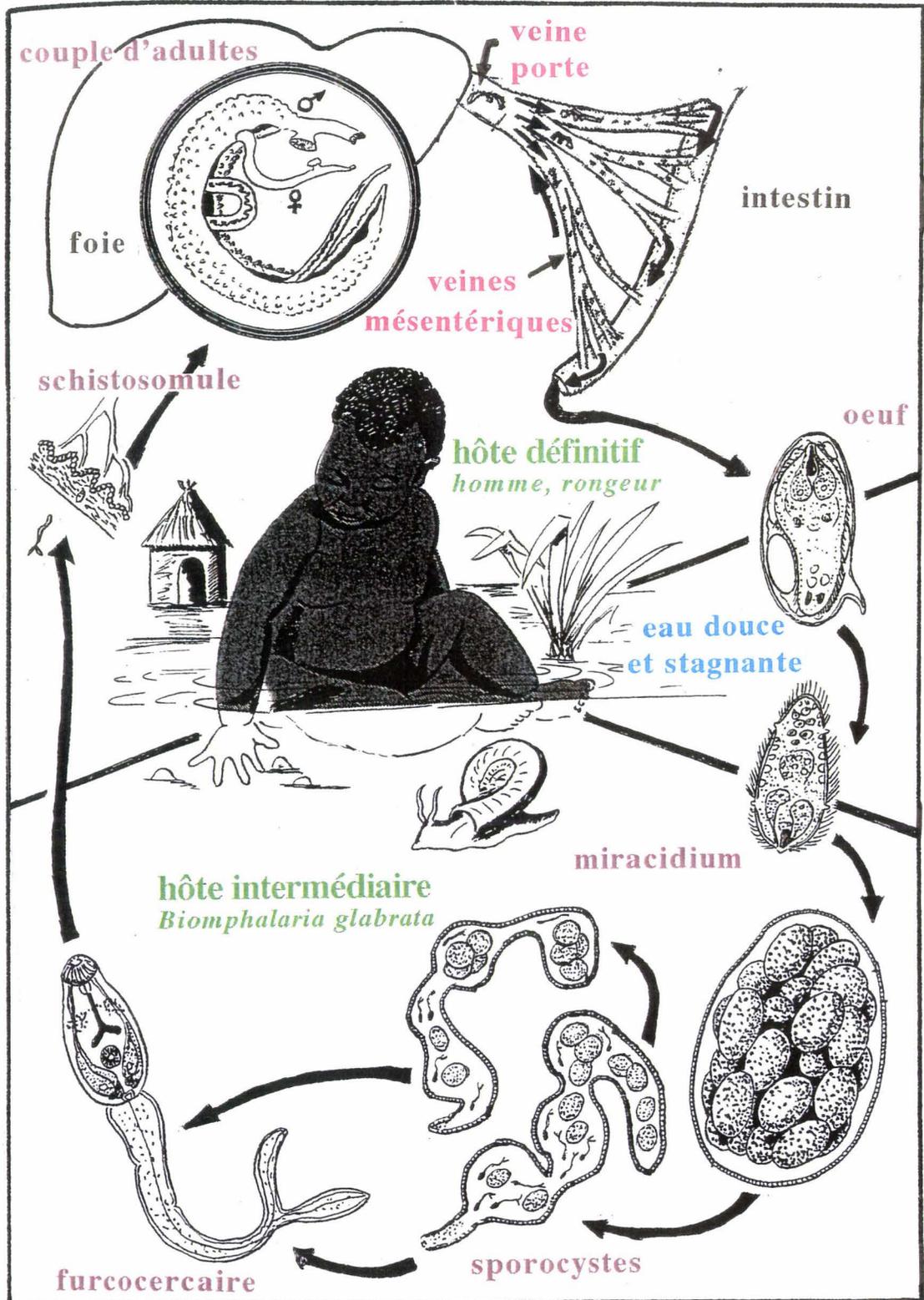
D'autres cellules, telles que les cellules présentant l'antigène, les monocytes et les macrophages, ainsi que les cellules de structure (cellules épithéliales, cellules endothéliales et fibroblastes), jouent également un rôle dans cette réaction inflammatoire.

Chapitre III

La schistosomiase

Les bilharzioses ou schistosomiasés sévissent sur un mode endémique dans les zones tropicales et subtropicales. Elles représentent la seconde endémie parasitaire à l'échelle mondiale après le paludisme et constituent un problème majeur de santé publique, lié au niveau socio-culturel des pays où elles sévissent. Depuis 1851, date à laquelle Théodor Bilharz découvre et décrit *Schistosoma haematobium*, agent responsable de la bilharziose urinaire, de nombreux travaux ont permis d'incriminer cinq espèces dans la pathologie humaine des bilharzioses : *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, et *Schistosoma mekongi*. Les manifestations pathologiques sont liées à la formation de granulomes autour des oeufs pondus par les vers femelles qui sont déposés dans les tissus et les muqueuses de l'hôte.

Figure 13: Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*



1- Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (Figure 13)

Le trématode *Schistosoma mansoni* est un parasite hétéroxène, présentant deux phases de multiplication, l'une sexuée chez l'hôte définitif mammifère et l'autre asexuée chez l'hôte intermédiaire, un mollusque gastéropode d'eau douce, *Biomphalaria glabrata*.

Les oeufs libérés dans les excréta ne peuvent poursuivre leur évolution que dans l'eau. Sous l'effet de la pression osmotique, l'oeuf éclate et libère le miracidium, organisme cilié d'environ 100 micromètres. Celui-ci nage, au moyen de ces cils, à la rencontre de l'hôte intermédiaire *Biomphalaria glabrata*. Le miracidium pénètre alors dans le mollusque par un processus actif au niveau des pieds ou des tentacules.

Une fois au sein de l'hôte intermédiaire, le parasite poursuit son développement évolutif et asexué. Ainsi, il passe par plusieurs stades qui sont les sporocystes primaires, puis secondaires et enfin les cercaires. Cela s'accompagne d'un processus de polyembryonie. Les furcocercaires sont libérées trois semaines à deux mois après la pénétration du gastéropode, sous la forme infestante pour l'hôte définitif.

La rencontre avec l'hôte définitif se fait dans un milieu aquatique. Les furcocercaires sont attirées par l'hôte définitif par un phénomène de chimiotactisme lié aux sécrétions cutanées de l'hôte. Les cercaires échappées du mollusque sont incapables de se nourrir dans le milieu aquatique et n'ont donc que 48 heures pour rencontrer un baigneur et pénétrer son revêtement cutané sous l'action combinée de la mobilité des cercaires et des sécrétions des glandes céphaliques. Cette pénétration s'accompagne de la perte de la partie postérieure de la cercaire, qui devient alors schistosomule.

Le schistosomule atteint les couches profondes du derme où il séjourne 2 à 5 jours, puis, emporté passivement par la circulation sanguine ou lymphatique, le parasite gagne tour à tour le coeur droit, les poumons, puis le coeur gauche. Aussi longtemps que le schistosomule n'est pas entraîné dans les artères menant à l'intestin (artères mésentériques), il continue à se laisser porter par le flot sanguin et peut faire des dizaines de tours de l'organisme. Lorsqu'un schistosomule est propulsé par hasard dans une artère mésentérique, il arrive aux capillaires qui entourent l'intestin, les franchit et se retrouve dans la veine porte qui mène au foie. C'est au niveau du foie

que se font la maturation et l'accouplement. Les couples entreprennent alors une dernière migration, à contre-courant sanguin cette fois, et s'engagent dans les veinules provenant de l'intestin. La femelle fécondée pond de nombreux oeufs (jusqu'à 300 par jour) le plus près possible de la lumière intestinale. La plupart de ces oeufs sont éliminés dans les excréta et doivent pour cela sortir des capillaires et traverser la paroi de l'intestin, par des moyens mécaniques et biochimiques. Cependant d'assez nombreux oeufs restent bloqués durant cette phase au niveau du mésenchyme. Ce sont ces oeufs qui induiront une réaction de défense de la part de l'hôte, faisant intervenir aussi bien des mécanismes d'immunité spécifique que non spécifique.

2- Défense de l'hôte contre le parasite

La schistosomiase est une maladie chronique du fait de l'adaptation du parasite à son hôte. Il en résulte un équilibre vital où se mêlent réponse inflammatoire et humorale, le rôle de chacun étant à la fois bénéfique et délétère selon le moment de l'infection.

I- Immunité naturelle

La résistance à l'infection par le schistosome est très variable selon les espèces animales étudiées. Le rat par exemple est un animal semi-permissif car les vers adultes n'atteignent pas leur maturité et sont rejetés avant la ponte des oeufs. L'homme et la souris en revanche, sont des hôtes permissifs puisqu'ils permettent aux parasites d'arriver à maturation et de pondre leurs oeufs.

De nombreux paramètres tels que les facteurs écologiques ou hormonaux jouent un rôle dans la susceptibilité d'une espèce aux parasites.

L'homme développe des infections pouvant durer plusieurs années. Sa résistance à l'infection augmente avec l'âge et atteint un maximum au moment de la puberté. Il existerait un gène co-dominant majeur contrôlant la susceptibilité ou la résistance à l'infection.

II- Immunité acquise

L'immunité contre l'infection par le schistosome est une immunité non stérilisante, efficace contre les formes larvaires, mais inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme, limitant ainsi la surinfestation. Le terme d'immunité concomitante est utilisé pour décrire cette immunité à la réinfection qui se développe en présence d'une infection active (Clegg et al, 1971).

De nombreux mécanismes effecteurs ont été caractérisés *in vitro* chez l'homme et dans les modèles expérimentaux. On décrit à la fois une réponse humorale et cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation des cellules inflammatoires (Capron et al, 1986).

A- Réponse humorale

Les études de Smithers et Terry (1969) ont clairement montré que l'hôte développe des anticorps contre les antigènes (glycoprotéines essentiellement) exprimés par le parasite lors de l'infection. Dans l'infection humaine, une corrélation positive entre l'acquisition de l'immunité vis-à-vis de la réinfection et la réponse IgE dirigée contre les antigènes du schistosome a été rapportée dans de nombreux travaux (Auriault et al, 1990; Dunne et al, 1992; Hagan et al, 1991; Rihet et al, 1991). Cette immunité est modulée par différents isotypes liés à la susceptibilité à la réinfection, tels que IgM, IgG2 et IgG4 (Khalife et al, 1986b; Butterworth et al, 1987; Hagan et al, 1991). Plus récemment une association positive entre le taux d'Ac IgA spécifiques de l'antigène Sm28 GST de *S. mansoni* et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été suggérée par Auriault et al (1990), puis démontrée par Grzych et al (1993).

Parallèlement, de nombreuses études *in vitro* ont permis de caractériser les mécanismes d'action de ces différents anticorps. La coopération entre les Ac et différents types de cellules effectrices (macrophages, éosinophiles, plaquettes) conduit à la lyse des larves parasitaires par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps appelé ADCC (décrit page 68) chez l'homme, le rat et le singe (Antibody-Dependent Cellular-mediated Cytotoxicity). Alors que l'ADCC médiée par les macrophages et par les éosinophiles nécessite un contact direct entre la cellule et sa cible parasitaire, les plaquettes n'ont pas besoin d'adhérer aux parasites pour les tuer selon ce mécanisme (Joseph et al, 1985).

Chez la souris, en revanche, il n'existe pas de mécanisme effecteur dépendant des IgE. Cela s'explique probablement par l'absence de FcεRI et de FcεRII sur les éosinophiles de souris (de Andres et al, 1997). Cette différence dans la distribution cellulaire des récepteurs aux IgE entre l'homme et la souris, récemment confirmée grâce à des souris transgéniques pour le FcεRI humain (Dombrowicz et al, 1998) met fin à une longue controverse sur le rôle de l'IgE et des éosinophiles dans les modèles murins et chez l'homme (Capron et al, en préparation). Il a été montré d'ailleurs que la déplétion des éosinophiles chez la souris grâce à des anticorps anti-IL-5 n'augmente pas forcément leur susceptibilité aux infections helminthiques (Sher et al, 1990).

B- Réponse cellulaire

L'arrivée des oeufs dans le foie provoque une réaction d'hypersensibilité retardée (inflammation à médiation cellulaire) responsable de la formation du granulome. Ce phénomène est induit par les sécrétions antigéniques du miracidium au travers des micropores de la coquille de l'oeuf. Les populations cellulaires recrutées sont les éosinophiles, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et les cellules géantes multinucléées. Ces cellules sont ensuite remplacées par des fibroblastes, qui sont responsables de la fibrose cicatricielle et de l'hépatosplénomégalie. La réponse inflammatoire est initiée par les cellules T helper CD4+, qui, après activation, produisent des cytokines permettant le recrutement cellulaire autour des oeufs (macrophages, éosinophiles, fibroblastes). Les éosinophiles et les macrophages des

granulomes, après activation par les Ac et les lymphocytes spécifiques, détruisent les embryons en sécrétant des médiateurs toxiques, conduisant à la lyse de l'oeuf (Olds and Mahmoud, 1980). Par ailleurs, les fibroblastes synthétisent des protéines matricielles et notamment du collagène, fortement impliqué dans la fibrose hépatique qui s'installe alors.

Des expériences chez la souris suggèrent qu'il existe un mécanisme de modulation de la réaction granulomateuse. En effet, l'intensité de cette réaction induite par les oeufs pondus tardivement au cours de l'infection (phase chronique) est inférieure à celle induite par les premiers oeufs (phase aiguë). Cette modulation de la réponse est assurée par des cellules T CD4+ et CD8+ (Boros, 1994).

Il existe deux sous-populations lymphocytaires T auxiliaires (T helper) CD4+, appelées Th1 et Th2 et caractérisées par leur production de cytokines. Les cellules Th1 produisent de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-12, alors que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Mosmann et al, 1989; Cherwinski et al, 1987; Fiorentino et al, 1989). Les 2 sous-populations produisent également de l'IL-3, du TNF- α et du GM-CSF. Des cellules Th0 ont été décrites par la suite comme cellules précurseurs des cellules Th1 et Th2; elles produisent de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-4.

Chez la souris, l'infection par les cercaires induit l'apparition d'une réponse cellulaire dominante de type 1. Cependant, lors de la ponte des oeufs par les femelles adultes, cette réponse est modifiée en faveur d'une réponse Th2 dominante (Grzych et al, 1991; Pearce et al, 1991). Cette commutation vers une réponse Th2 est liée aux oligosaccharides et plus précisément aux structures de type Lewis^x, présentes dans les antigènes d'oeufs, capables de stimuler la production d'IL-10, cytokine inhibitrice de la prolifération des cellules Th1 (Velupillai et al, 1994). Chez l'homme en revanche, il semblerait que l'immunité protectrice dans les schistosomiasis corrèle avec les taux d'IgE (Capron and Capron, 1994) et avec l'expression de cytokines de type Th2 ou Th0/Th2 (Coussinier and Dessein, 1995; Grzych, et al, 1993).

Différentes cytokines sont produites par les cellules du granulome, certaines amplifiant ou modulant la réaction inflammatoire, d'autres participant à la fibrose.

L'IFN- γ , sécrété essentiellement par les cellules NK, a une activité anti-fibrogénique pouvant moduler voire même réduire la pathologie associée à la réaction granulomateuse induite par les oeufs de schistosome (Czaja et al, 1989). L'IL-2 est nécessaire à l'expression de la réponse Th2 ou au moins de certaines de ses composantes. Elle est impliquée dans la formation du granulome. L'IL-4 est impliquée dans la phase précoce de la réponse inflammatoire (Boros, 1994). L'IL-4 joue un rôle majeur dans la fibrose hépatique et dans le développement d'une réponse Th2. La synthèse précoce d'IL-4 est accompagnée d'une éosinophilie dépendante des mastocytes et d'IL-5. L'IL-5 maintient le nombre d'éosinophiles dans la circulation et localement autour du granulome (Metwali et al, 1993). Le TNF- α participe au recrutement cellulaire et maintient la réponse granulomateuse (Chensue et al, 1989). Dans des modèles de granulomes synchronisés, l'IL-12 est capable d'orienter ou d'inverser la réponse cellulaire vers le profil Th1, induisant une augmentation de la production d'IFN- γ , d'où une diminution de la taille du granulome. Le TGF β est un inducteur de la fibrose.

La réaction granulomateuse suivie d'une fibrose peut entraîner des conséquences graves chez les sujets infectés. Cependant, le granulome peut également avoir un effet bénéfique pour l'hôte. En effet, en séquestrant les toxines miracidiales, il évite le développement de nécrose du parenchyme hépatique.

C- Mécanismes d'échappement

Pour échapper à la réponse immune de l'hôte, le parasite utilise au moins 3 mécanismes : le remaniement de ses antigènes de surface, la production d'anticorps bloquants et l'induction d'une immunosuppression chez l'hôte.

1- Le mimétisme moléculaire

De façon à éviter les attaques du système immunitaire, les schistosomes se couvrent d'antigènes présents chez l'hôte. Différents antigènes ont été identifiés chez *S. mansoni*, antigènes du système sanguin ABO, antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, alpha 2-macroglobuline, immunoglobulines, fibronectine. Le parasite est capable également de synthétiser des antigènes communs à ceux de l'hôte, tels que le SSEA (Stage Specific Embryonic Antigen) de l'embryon de souris. De plus, au cours de son développement, le schistosome modifie la structure de son tégument pour mieux résister aux attaques diverses.

2- Modulation de la réponse immune

Production d'Ac bloquants

Dans la schistosomiase humaine, la présence d'Ac dirigés contre des épitopes glycaniques de *S. mansoni* est corrélée avec la susceptibilité à la réinfection des enfants. Des anticorps dirigés contre des carbohydrates empêchent l'expression de l'immunité par les autres anticorps, ils sont appelés anticorps bloquants. Les anticorps bloquants IgM et IgG2 sont caractérisés chez les sujets susceptibles, mais en moins grande proportion chez les sujets résistants (Khalife et al, 1986b; Butterworth et al, 1987). Les Ac bloquants IgG4 sont également associés à la susceptibilité à la réinfection (Hagan et al, 1991, Rihet et al, 1991; Khalife et al, 1989).

Induction d'une immunosuppression

Les schistosomes adultes sont capables de libérer un facteur appelé SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor) qui inhibe la dégranulation mastocytaire et la réponse IgE chez le rat. Le SDIF inhibe également *in vitro* la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes parasitaires ou à la stimulation par l'IL-2 (Mazingue et al, 1983, 1986). Par ailleurs, les schistosomules peuvent lier les IgG à leur surface : ils sécrètent des protéases dont l'action sur les IgG donne un peptide inhibiteur de nombreuses fonctions macrophagiques et altèrent profondément les capacités cytotoxiques du macrophage sur le parasite (Auriault et al, 1981, 1983, 1985). La libération active de neuropeptides par le schistosome, comme

l'adrénocorticotropine (ACTH), l'hormone de stimulation des mélanocytes (α -MSH) et la β -endorphine a été montrée récemment et augmenterait la synthèse d'IL-4 tout en diminuant la synthèse d'IFN- γ . Leur rôle immunosuppresseur sur les immunocytes de l'hôte intermédiaire (mollusque), ainsi que sur les monocytes de l'hôte vertébré, a été suggéré (Duvaux-Miret et al, 1992).

Le parasite peut également utiliser des cytokines à son profit : le TNF- α , par exemple, induit la ponte des oeufs (Amiri et al, 1992).

3- Interactions schistosome et cellules endothéliales

Tout au long de leur cycle migratoire chez l'hôte définitif, les schistosomes sont en contact direct avec différents types d'endothélium vasculaire, notamment lors de leur séjour dans les poumons (Crabtree and Wilson, 1986a). En effet, arrivés dans les capillaires pulmonaires (7-8 μ m), des contraintes physiques bloquent la migration des schistosomules: leur diamètre (10 μ m) est trop grand pour leur permettre le passage. Ils entreprennent alors, en 3 à 4 jours, une métamorphose qui les transforme en organismes beaucoup plus fins, capables de franchir les capillaires.

Le schistosomule initie, dans les poumons, une réaction inflammatoire dont l'intensité varie en fonction du nombre et du mode d'infestation. La réaction observée chez la souris naïve (primo-infestation) est faible contrairement à celle observée chez une souris vaccinée par des cercaires irradiées, où elle se caractérise par un recrutement cellulaire intense (Mastin et al, 1985). Les cellules recrutées sont essentiellement des macrophages, des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, produisant de l'IFN- γ (Coulson and Wilson, 1997). L'arrivée massive de ces cellules est à l'origine de la formation de foyers inflammatoires entraînant la rétention puis l'élimination subséquente des larves parasitaires dans les poumons (Crabtree and Wilson, 1986b). Si les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à la genèse de la réaction inflammatoire, puis au recrutement des cellules immunes dans les poumons restent mal connus dans le modèle de la souris vaccinée par les cercaires

irradiées, de nombreux travaux soulignent l'importance de l'endothélium dans l'immunité, notamment dans le développement de la réaction inflammatoire et la migration leucocytaire (Carlos and Harlan, 1994). Les cellules endothéliales jouent en effet un rôle dans le recrutement des cellules immunes aux sites d'infection via la synthèse de cytokines / chimiokines et l'expression de molécules d'adhérence et dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T; elles ont également un rôle effecteur via la synthèse de NO.

I- Rôle effecteur des cellules endothéliales au cours de la schistosomiase

Des cellules endothéliales murines activées par des cytokines telles que IFN- γ , TNF- α , IL-1 α et IL-1 β sont capables de tuer les schistosomules via un mécanisme dépendant de l'arginine, impliquant la production de NO. Les cellules endothéliales tuent des formes plus âgées de schistosomules (18 heures) que les macrophages activés. Elles correspondent aux formes parasitaires éliminées dans les poumons des souris vaccinées avec des cercaires irradiées (Oswald et al, 1994).

II- Rôle des cellules endothéliales dans la néovascularisation

Une néovascularisation des tissus fibrotiques périportaux du foie est observée lors d'infestations chroniques par *S. mansoni*. Elle permettrait de préserver une fonction hépatique normale en maintenant un flux sanguin dans les zones d'obstruction des veinules portales causées par l'oviposition, assurant ainsi la survie de l'hôte parasité. Freedman et Ottesen (1988) ont montré que des antigènes solubles d'oeufs de *Schistosoma mansoni* (SEA) étaient capables, en l'absence de cellules inflammatoires, d'induire une prolifération des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. De même, Wyler et al ont montré en 1987 que des surnageants de granulome de foie de souris infectées ont une activité mitogénique sur une lignée de cellules

endothéliales, pouvant expliquer, au moins en partie, le processus de neovascularisation. Enfin, le schistosome induit la synthèse d'IL-6 par les cellules endothéliales, cytokine ayant un rôle dans la vasculogénèse (Trottein et al, en préparation).

III- Interactions entre les cellules endothéliales et les oeufs

Les relations entre les cellules endothéliales de l'hôte et le parasite ont été principalement étudiées au stade oeuf. En effet, le contact entre l'oeuf et l'endothélium vasculaire est la première étape de l'élimination des oeufs de l'organisme (ils quittent les vaisseaux pour gagner la lumière intestinale). De plus, lorsqu'ils ne sortent pas des vaisseaux, ils sont entraînés par le courant sanguin jusqu'au foie où ils restent bloqués dans les sinusoides, provoquant une réaction d'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire, qui se traduit par la formation d'un granulome périovulaire. Le contact entre l'oeuf et l'endothélium du sinusoides hépatique est le phénomène initial du déclenchement des mécanismes immunologiques responsables du développement de la réaction granulomateuse.

Dès 1981, il a été montré que l'oviposition dans les intestins de souris était associée à des changements de la vasculature intestinale et mésentérique (Nagy et al, 1981). Les veines mésentériques sont dilatées et tortueuses aux endroits où sont déposés les oeufs. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène : hypertension portale, activation de l'endothélium et également réponse de l'endothélium à la présence des oeufs.

L'interaction *in vitro* des oeufs de *S. mansoni* à des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) implique un phénomène actif : les oeufs ne s'attachent qu'à des cellules endothéliales vivantes, à 37°C, via l'extension de pseudopodes à la surface des oeufs. Il semblerait de plus que les oeufs situés dans les vaisseaux agrègeraient les plaquettes, qui relargueraient des produits favorisant l'attachement des oeufs aux cellules endothéliales (Ngaiza et al, 1993). Une étude ultrastructurale de l'interaction des oeufs de schistosome avec l'endothélium vasculaire a permis d'établir que le contact des oeufs avec la surface apicale de l'endothélium perturbe la polarité des cellules. Les cellules endothéliales se mobilisent, se

rétractent et migrent par dessus les oeufs (File, 1995). Il y a alors reformation d'une monocouche et transfert des oeufs de la lumière intestinale vers l'espace périvasculaire.

De plus, l'activation des cellules endothéliales par l'IL-1 augmente l'adhésion des oeufs, probablement via l'expression de molécules d'adhérence telles que VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine, exprimées par les cellules endothéliales activées, ainsi que le Lewis^x, présent sur les oeufs (Lejoly-Boisseau, communication personnelle).

4- Molécules d'adhérence et schistosome

L'adhérence des parasites aux cellules de l'hôte se fait, en général, via des adhésines, dont certaines sont proches des molécules d'adhérence des mammifères (Robson et al, 1988; Trottein et al, 1995). Les adhésines jouent un rôle non seulement dans l'attachement et/ou l'invasion des parasites aux cellules de l'hôte, mais également dans la communication entre les deux partenaires. Il résulte de cette interaction une stimulation des cellules eucaryotiques induisant une réponse, qui peut, soit aider le parasite à se développer dans l'hôte, soit participer à son élimination. Chez les schistosomes, des molécules d'adhérence ou des motifs adhésifs pourraient être impliqués dans les interactions avec les cellules de l'hôte et avoir un rôle dans la transmission du signal.

I- Lewis^x

Le déterminant Lewis^x ou CD15 est un triose présent à la surface des granulocytes. Il est impliqué dans le trafic cellulaire en tant que ligand des sélectines.

Dès 1986, Weiss et al ont détecté dans les sérums de patients infectés par *Schistosoma mansoni*, des anticorps dirigés contre des épitopes carbohydrates exprimés par les différents stades parasitaires présents chez l'hôte. Les carbohydrates exprimés par les larves sont des cibles de la réponse immunitaire mises en place lors des phases précoces de l'infection. Le

schistosome est notamment capable de synthétiser des glycoprotéines contenant l'antigène Lewis^x (Srivastan et al, 1992), abondant chez les vertébrés (antigène de groupe sanguin, également présent sur les éosinophiles et sur les neutrophiles). Une étude immunohistochimique montre que les schistosomes expriment le déterminant Lewis^x à leur surface dès la transformation des cercaires en schistosomules et cela tout au long de leur vie adulte (Köster and Strand, 1994). C'est au stade oeuf que cet antigène est le plus abondamment exprimé.

Une alpha 1-3 fucosyltransférase capable de synthétiser le déterminant Lewis^x a été caractérisée chez les schistosomes adultes (DeBose-Boyd et al, 1996). Elle présente de fortes homologues avec les fucosyltransférases des mammifères. Plus récemment, une fucosyltransférase de type VII a été caractérisée chez le schistosome (Marques et al, 1998). Enfin, Trottein et al ont caractérisé une autre fucosyltransférase chez le schistosome plus divergente de celle des mammifères mais présentant certains domaines fonctionnels conservés (Trottein et al, soumis). La capacité de *Schistosoma mansoni* à synthétiser des oligosaccharides présents chez les vertébrés pourrait avoir des implications à la fois dans les mécanismes d'interaction hôte/parasite et sur le développement de vaccins pour prévenir cette maladie chez les humains.

De façon très intéressante, plusieurs travaux montrent que ce déterminant carbohydrate Lewis^x a une incidence sur la réponse immunitaire liée à l'infection par *Schistosoma mansoni*. Les oeufs de schistosome libèrent une molécule contenant la structure Lewis^x (CD15) capable d'orienter la réponse immunitaire de l'hôte infecté (Velupillai et al, 1994). Le déterminant Lewis^x présent sur les antigènes d'oeufs solubles (SEA) induit la prolifération et la production d'IL-10, cytokine favorisant les réponses Th2, par les cellules B spléniques de souris infestées. Cela pourrait expliquer la modification de la réponse immunitaire d'un type Th1 vers un type Th2 chez des souris infestées par *Schistosoma mansoni* au moment de l'oviposition.

La cible prédominante de la réponse humorale de souris vaccinées avec des cercaires irradiées est le Lewis^x. Cette molécule ainsi que les IgM dirigés contre elle pourraient affecter profondément la résistance de l'hôte ainsi que la domiciliation du parasite (Richter et al, 1996). En effet, des anticorps d'isotype IgG et IgM dirigés contre Lewis^x ont été détectés dans les sérums de patients infectés par *Schistosoma mansoni*, alors qu'ils sont totalement absents dans

les sérums de sujets sains. Ces anticorps sont capables de médier, en présence du complément, la lyse de cellules HL-60 humaines (Nyame et al, 1996) et de granulocytes (Van Dam et al, 1996), qui expriment le déterminant Lewis^X. Les anticorps dirigés contre cet oligosaccharide pourraient ainsi avoir des effets importants sur les interactions hôte / parasite.

II- ICAM-1, LFA-1 et sélectine L

Les molécules d'adhérence jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires et immunologiques. Comme nous l'avons vu précédemment, la présence du schistosome chez son hôte vertébré induit des réactions inflammatoires, au niveau de la peau, des poumons et du foie, lors du dépôt des oeufs. L'étude des molécules d'adhérence dans la schistosomiase n'en est encore qu'à ses débuts, cependant quelques travaux indiquent qu'elles jouent un rôle à différents stades de l'infection.

L'inflammation précoce de la peau d'animaux sensibilisés est caractérisée par une augmentation importante du nombre de cellules et notamment des neutrophiles et des cellules mononucléées. Ramaswamy et al (1997) ont montré que cette infiltration massive de cellules (cellules mononucléées et neutrophiles) était accompagnée d'une augmentation de l'expression tissulaire de ICAM-1 dans la peau des animaux sensibilisés. L'expression de ICAM-1 est particulièrement augmentée sur les cellules endothéliales bordant les capillaires du derme, spécialement dans les zones proches de la migration du schistosomule et sur les cellules qui entourent le schistosomule dans le derme. Chez les animaux naïfs, il n'y a pas d'augmentation de cette molécule après une infestation similaire. Une accumulation précoce de cellules mononucléées dans la peau, médiée par ICAM-1, pourrait être importante pour l'initiation de la réponse immune inflammatoire cutanée lors de la migration des schistosomules chez les animaux vaccinés. En revanche, une diminution potentielle de ICAM-1, induite par le parasite, pourrait jouer un rôle important en réduisant la réaction cellulaire dans la peau, aidant ainsi le parasite à éviter cette réponse immune locale.

La formation du granulome dans le foie est médiée par l'expression de ICAM-1, induite par le TNF- α (Lukacs et al, 1994) et par les produits déposés par les oeufs (Ritter et al, 1994). L'expression de ICAM-1 a été localisée sur les cellules endothéliales, sur l'endothélium sinusoidal, sur les cellules de Kupfer, et sur les hépatocytes. LFA-1 a été visualisé sur les cellules de Kupfer essentiellement. L'expression de ces deux molécules n'est décelée que sur des granulomes jeunes, laissant suspecter leur rôle dans la genèse du granulome (Jacobs et al, 1997; Ritter and McKerrow, 1996).

De plus, le blocage de ICAM-1 et de LFA-1 par des Ac monoclonaux inhibe la production d'IL-2 et d'IL-4 (cytokines impliquées dans la formation du granulome) dans la rate et le granulome, ainsi que les réponses lymphoprolifératives (Langley and Boros, 1995). Des molécules d'adhérence solubles ont été décrites (sICAM-1) chez des individus infestés par *Schistosoma mansoni* et présentant des atteintes hépatospléniques (Secor et al, 1994; Esterre et al, 1998). Ces molécules ICAM-1 solubles sont capables de moduler la réponse antigénique, probablement en bloquant l'activité costimulatrice de ICAM-1 dans l'activation des cellules T, menant à une absence de réponse des cellules T spécifiques des antigènes solubles d'oeufs (SEA). L'expression de ICAM-1 et de LFA-1 est également fortement augmentée sur les cellules inflammatoires du granulome après le dépôt des oeufs de *Schistosoma mansoni* (Jacobs et al, 1997).

D'autre part, de la sélectine L de souris a été détectée sur des miracidium, laissant suggérer que cette molécule peut traverser la paroi de l'oeuf pour aller se fixer sur des ligands carbohydrates présents à la surface du miracidium (El Ridi et al, 1996). Cela pourrait entraver le relargage d'antigènes solubles d'oeuf et pourrait expliquer en partie la régulation négative de la pathologie granulomateuse observée après la phase aigüe de la maladie.

Matériel
et
méthodes

Tableau VI : Anticorps utilisés

Anticorps ⁽¹⁾	Clone	Isotype	Provenance
anti-LFA-1 (CD11a)	25-3	IgG1 de souris	Immunotech (France)
anti-Mac-1, chaîne α (CD11b)	ICRF44	IgG1 de souris	Immunotech (France)
anti-VLA-4, chaîne α (CD49d)	HP2-1	IgG1 de souris	Immunotech (France)
anti-sélectine E (CD62-E)	1.2 B6	IgG1 de souris	Immunotech (France)
anti-sélectine L (CD62-L)	DREG-56	IgG1 de souris	Pharmingen (USA)
anti-sélectine P (CD62-P)	LYP20	IgG1 de souris	Obtenu du Dr Mc Gregor (Lyon), Parmentier et al, 1991
anti-Le ^x (CD15)	80H5	IgM de souris	Immunotech (France)
anti-sLe ^x (sCD15)	CSLEX	IgM de souris	Becton Dickinson (USA)
anti-VCAM-1(CD106)(cytotoxicité)	1G11	IgG1 de souris	Immunotech (France)
anti-VCAM-1(CD106)(cell-ELISA)	B-K9	IgG1 de souris	Diaclone (France)
anti-ICAM-1 (CD54)	B-B15	IgG1 de souris	Diaclone (France)
anti-Fc α R (CD89)	A59	IgG1 de souris	Pharmingen (USA)
anti-Fc γ RII (CD32)	FLI8.26	IgG2b de souris	Pharmingen (USA)
anti-EPO humaine ⁽²⁾	AHE-1	IgG1 de souris	Pharmingen (USA)
anti-NIP ⁽³⁾		IgG humaine	Obtenu du Dr D. W. Dunne
anti-NIP ⁽³⁾		IgA humaine	(Cambridge)
anti-NIP ⁽³⁾		IgE humaine	
contrôle isotypique		IgG de souris	Laboratoire (Capron et al, 1987)
contrôle isotypique		IgM de souris	Laboratoire (Capron et al, 1987)
contrôle isotypique		IgG1 humaine	Sigma (USA)
anti-IgG de souris (Fab') ₂		chèvre	Sigma (USA)
anti-IgG de souris- Biotine		chèvre	Sigma (USA)
anti-IgM de souris- Biotine		chèvre	Sigma (USA)
anti-Igs de souris- peroxydase		chèvre	Sigma (USA)
anti-IgG (Fab') ₂ de souris- FITC		mouton	Sigma (USA)
anti-IgM de souris- FITC		chèvre	Sigma (USA)
anti-IgG1 humaine- FITC	8c/6-39	IgG2a de souris	Sigma (USA)
anti-IgG humaine- peroxydase		chèvre	Sigma (USA)

Matériel et méthodes

1- Matériel

A- Les réactifs

Les différentes cytokines utilisées sont: le rhTNF- α (Genzyme, Cambridge, UK), l'IL-5 (Diacclone, Besançon, France), l'IL-3 et le GM-CSF (Sandoz, Bâle, Suisse).

La paraformaldéhyde et la streptavidine-phosphatase alcaline proviennent de chez Sigma (St Louis, USA). Le RPMI 1640, la L-Glutamine, et le FCS sont commercialisés par Gibco-BRL (Praisley, UK).

Les autres réactifs utilisés sont : la BSA (Research Organics, Inc, Cleveland, USA), le Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suède), le sérum de chèvre (DAKO, Glostrup, Danemark) et la streptavidine-phycoerythrine (Molecular probes, Eugene, USA)

B- Les anticorps

Dans les tests de cytotoxicité, nous avons utilisé des sérums de patients bilharziens contenant des anticorps dirigés contre *Schistosoma mansoni* (SHI, Sérum Humain Immun).

Les différents anticorps utilisés dans les expériences d'immunomarquage, d'inhibition de cytotoxicité, de Cell-ELISA et de cytofluorométrie en flux sont indiqués dans le tableau VI.

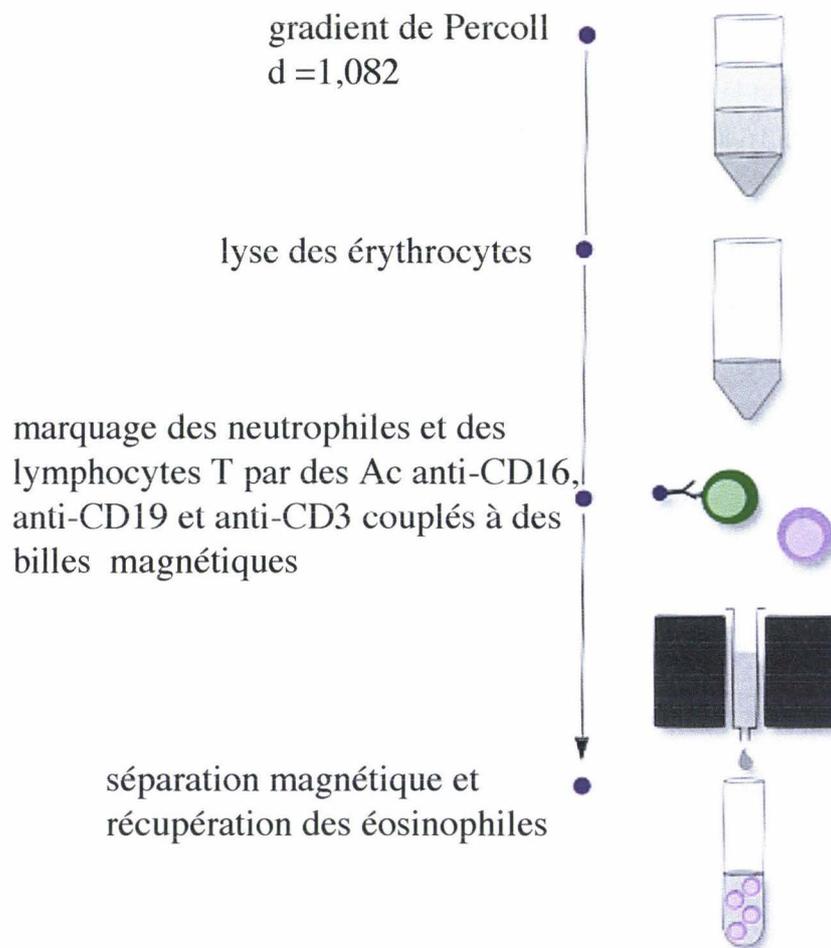
(1) Lorsque les anticorps contiennent de l'azide (NaN_3), on ajoute dans les tests de cytotoxicité, la même concentration d'azide aux contrôles isotypiques respectifs.

(2) L'anticorps anti-EPO humaine (IgG1 de souris) a été biotinylé au laboratoire. Il permet, après incubation avec la streptavidine-PE, de révéler le caractère éosinophilique des cellules lors de l'étude des antigènes membranaires par cytométrie en flux.

L'Ac anti-EPO (100 μg) est dialysé une nuit contre du PBS à pH 8,5. L'Ac est alors incubé 3 heures à température ambiante, sous agitation, avec 25 μg de biotine (Molecular probes). Le complexe Ac-biotine est ensuite bloqué par 20 μl de tampon Tris 1M. Enfin, l'Ac biotinylé est dialysé deux fois contre un tampon borate + 0,15 M NaCl, à pH 8.

(3) Les anticorps chimères dirigés contre l'haptène NIP (5-iodo-4-hydroxyl-3-nitrophenacetyl) nous ont été donnés par D. W. Dunne. Ce sont des anticorps chimères souris / homme, comprenant les régions V_H , V_L et C_L murines et les régions $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\alpha 2$ ou ϵC_H humaines (Dunne et al, 1993).

Figure 14: Purification des éosinophiles par la technique du MACS



C- Les oligosaccharides et les sélectines recombinantes

Les oligosaccharides Le^x, sLe^x et le N-Acetyl-Lactosamine (Ln) utilisés dans les tests d'inhibition de cytotoxicité proviennent de chez Oxford Glycosystems (Abington, UK). La fucoïdine provient de chez Sigma (USA). Les sélectines humaines recombinantes P, E et L, proviennent de chez R&D Systems (Abington, UK) et la lectine purifiée de *Tetragonolobus purpureas* (TPA), spécifique des résidus α -L-fucosyl provient de chez Sigma.

La protéine fusion sélectine P de souris / Ig (P-sel-Ig) nous a été donnée par D. Vestweber (Institut de Biologie Cellulaire, ZMBE, Université de Münster, Allemagne). Cette protéine comprend la région charnière et les domaines CH2 et CH3 de l'IgG1 humaine, fusionnés avec le domaine lectine, les séquences EGF et les deux premiers domaines de liaison au complément de la sélectine P de souris (Hahne et al, 1993b).

2- Méthodes

A- Les cellules

a- Purification des éosinophiles humains

Les éosinophiles de sang périphérique proviennent de sujets présentant une hyperéosinophilie d'étiologie variable. Le sang est prélevé sur 0,2 ml d'héparinate de calcium. Les éosinophiles sont isolés par sélection négative (MACS, Magnetic Antibody Cell Separation, Miltenyi Biotec, Allemagne).

La purification par sélection négative est basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre la molécule CD16 (Fc γ RIII), contre la molécule CD3 et contre la molécule CD19, couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Allemagne). L'expression importante du CD16 par les neutrophiles, du CD3 par les lymphocytes T et du CD19 par les lymphocytes B, permet leur rétention sur la colonne par l'intermédiaire d'un champ magnétique (Figure 14, Hansel et al, 1989).

Le sang périphérique dilué au 1/2 dans du PBS est déposé sur un coussin de Percoll ($d=1,082$ g/l) et centrifugé 20 min à 1800 rpm. Après lyse des globules rouges par un choc osmotique de 10 min sur la glace dans un tampon de lyse (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4), les granulocytes (contenus dans le culot) sont incubés avec les billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD16, anti-CD3 et anti-CD19, pendant 30 minutes à 4°C en PBS-BSA 0,5%. Les cellules sont alors déposées au sommet de la colonne du MACS. L'éluion est effectuée par une solution de PBS-BSA 0,5%. Les cellules sont identifiées, après cytocentrifugation et coloration au May Grünwald Giemsa (RAL 555, Rieux, France). On obtient généralement une pureté allant de 95 à 100%, les quelques cellules contaminantes étant principalement des lymphocytes.

b- Différenciation des éosinophiles à partir de sang de cordon ombilical

Le prélèvement est réalisé, après consentement des patientes, au terme d'une grossesse non pathologique, après l'expulsion et avant la délivrance, au bloc obstétrical de l'hôpital Jeanne de Flandre à Lille. Le sang de cordon ombilical (20 à 40 ml) est récupéré stérilement sur 0,2 ml d'héparinate de calcium, dilué au 1/2 dans du PBS et déposé sur Percoll ($d= 1,082$ g/l) à température ambiante. Après 20 min de centrifugation à 1800 rpm, l'anneau de cellules mononucléées (contenant les cellules souches hématopoïétiques CD34^+) est récupéré et lavé dans un volume de PBS. Le culot de cellules obtenu est débarrassé des globules rouges par un choc osmotique de 10 min sur la glace dans le tampon de lyse suivant : NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4. Après 2 lavages en PBS, le culot de cellules est repris dans le milieu de culture. Les macrophages sont alors éliminés par adhérence 2 heures à 37°C dans une étuve contenant 5% de CO_2 . Les cellules non adhérentes sont ensuite récupérées et centrifugées à 1300 rpm pendant 10 min. Après comptage, les cellules sont mises en culture à raison de 2×10^6 cellules / ml dans les conditions suivantes:

RPMI 1640
10 % de FCS
2 mM de L-glutamine
100 UI/ml de pénicilline
100 µg/ml de streptomycine
50 µM de β mercaptoéthanol

de 0 à 7 jours de culture : + 4 ng/ml de rhIL-3 (Sandoz)
+ 4 ng/ml de rhGM-CSF (Sandoz)
+ 2 ng/ml de rhIL-5 (Diacclone)

de 7 à 28 jours de culture : + 2 ng/ml de rhIL-5 uniquement, de façon à limiter le développement macrophagique

Tous les 7 jours, la croissance cellulaire et la viabilité de la culture sont estimées par numération au bleu trypan 0,4% (Sigma). La différenciation en éosinophiles est suivie par une réaction enzymatique, évaluée par numération leucocytaire après coloration au RAL d'une cytopréparation puis à la 3-3' diaminobenzidine tétrahydrochloryde (DAB) en présence de cyanure, spécifique de la peroxydase des éosinophiles (15 ml H₂O + 5,9 mg KCN+ une tablette de DAB (Sigma Fast D4418) + 3 µl H₂O₂ à 3 % par ml DAB). On obtient généralement une différenciation en éosinophiles de 15 % après 7 jours et d'environ 75 % à 28 jours. La culture est abandonnée après 28 jours car les éosinophiles différenciés meurent par apoptose (Druilhe et al, 1996).

c- Purification des plaquettes

L'isolation des plaquettes se fait entièrement à température ambiante. Du sang humain de volontaire adulte sain (6 volumes) est collecté sur ACD-A (acide citrique 38 mM, glucose 135 mM, citrate trisodique 60 mM) (1 volume) et centrifugé 15 min à 120 g en aliquots de 5 ml. Neuf volumes du plasma riche en plaquettes recueilli sont ajoutés à 1 volume d'ACD-A et centrifugés à 1500 g pendant 15 min. Seule la partie non contaminée par les globules rouges est récupérée et les plaquettes sont resuspendues et lavées trois fois en tampon de lavage (acide citrique 36 mM, glucose 5 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5) auquel on ajoute 0,35% BSA et 100 nM prostaglandine E₁ (PGE₁) puis reprises dans le milieu de culture.

d- Les cellules endothéliales

Les cellules primaires de cellules endothéliales microvasculaires de poumon humain (HMVEC-1) sont cultivées en milieu EBM-2 supplémenté par 10 µg/ml de hEGF (human

recombinant Epidermal Growth factor), 1 mg/ml d'hydrocortisone, 3 mg/ml de Bovine Brain Extract et 25 ml de FBS (Fetal Bovine Serum) (biowhittaker, USA. Les expériences avec les HMVEC-1 sont réalisées au sixième passage.

La lignée de cellules endothéliales de microvaisseaux de poumons de souris (MLE) est cultivée sur des plaques de culture (Nunc, Denmark) coatées avec 0,2 % de gélatine dans un milieu Ham's F12 et DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) (vol/vol), contenant 5 % de FCS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco, Grand Island, NY). Les cellules sont utilisées entre le 20ème et le 30ème passage.

e- Lignées cellulaires

La lignée de fibroblastes 3T3, la lignée de cellules épithéliales HeLa et la lignée promyélocytaire HL-60, proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de FCS et des antibiotiques.

B- Les parasites

a- Obtention des différents stades larvaires

La souche Porto Ricaine de *Schistosoma mansoni* est maintenue au laboratoire chez des mollusques *Biomphalaria glabrata* et des hamsters dorés.

Les *cercaires* sont obtenues à partir des mollusques infestés.

Les schistosomules sont préparés *in vitro* par passage des *cercaires* à travers la peau abdominale isolée d'une souris selon le protocole classique (*schistosomules peau*) (Capron et al, 1975) ou par traitement mécanique des *cercaires* (*schistosomules mécaniques*) selon le protocole suivant. Après concentration des *cercaires* sur la glace et à l'obscurité, leurs queues sont cassées par agitation au vortex pendant 2 minutes. Le corps des *cercaires* est alors séparé de la queue par centrifugation sur du Percoll (34% Percoll/NaCl 9‰) (Lazdins et al, 1982).

Les *schistosomules* extraits des *poumons* de souris infestées sont contaminés par des cellules de poumons de l'hôte. Nous avons donc procédé à la différenciation *in vitro* de schistosomules peau en schistosomules poumons en les mettant en culture 6 jours à 37°C dans le milieu de culture des cellules endothéliales.

Les *vers adultes* sont obtenus par perfusion de foies de hamsters infestés à J21.

La récupération des *oeufs* se fait sur la glace à partir de foies de hamsters infestés. Les foies sont rincés dans de l'eau physiologique pour éliminer au maximum les globules rouges. Après ablation de la vésicule biliaire, ils sont broyés dans l'eau physiologique jusqu'à obtention d'une solution homogène qui est alors filtrée sur blutex n°8. La solution obtenue est déposée dans un tube conique sur 10 ml de Percoll à 20 % dans du saccharose 0,5 M puis centrifugée 10 min à 500 g. Le surnageant est aspiré à la trompe à vide et les oeufs, en culot au fond du tube, sont repris puis lavés 3 fois dans de l'eau physiologique.

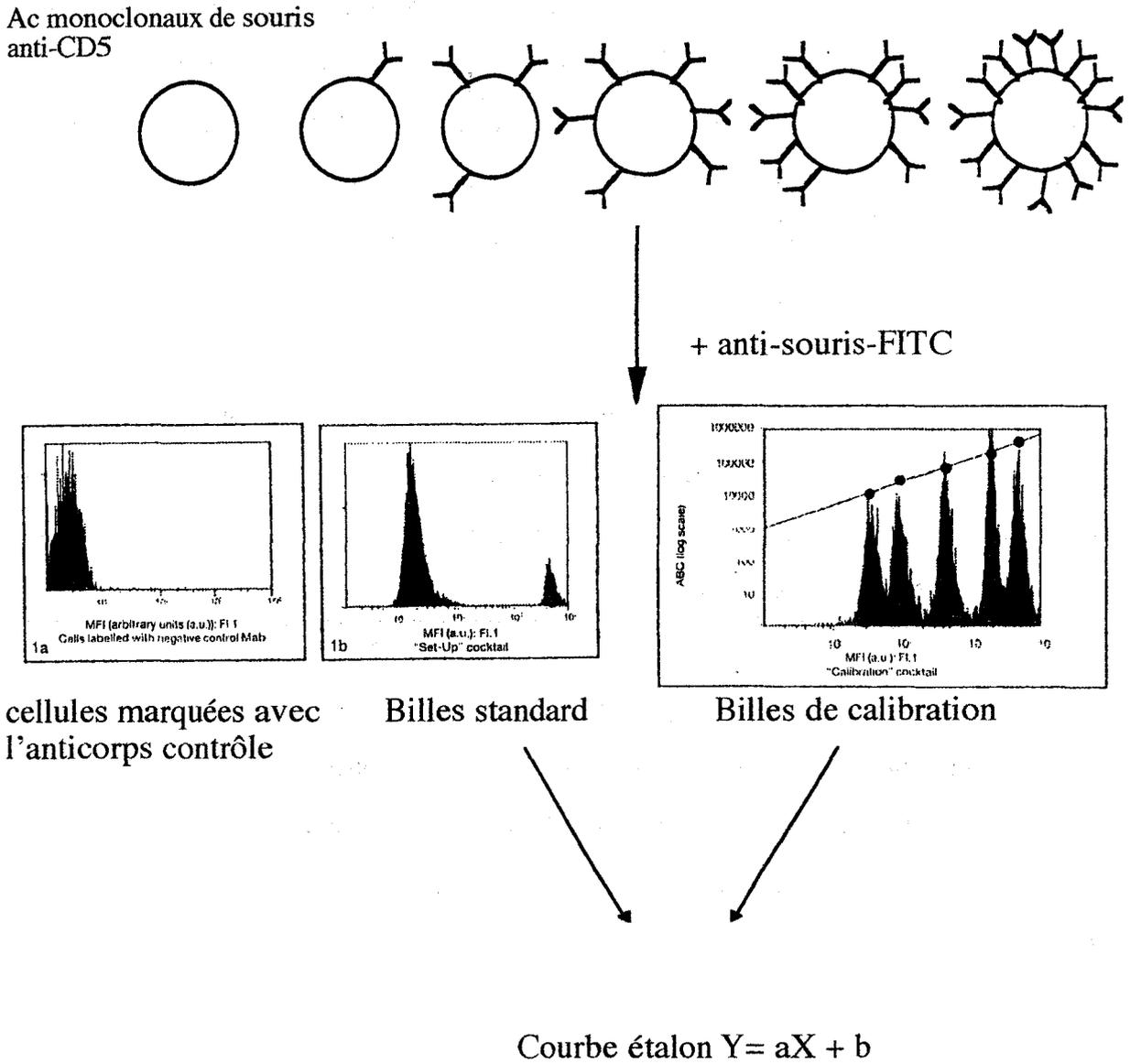
b- Préparation des fractions cytosoliques solubles de parasites

Les parasites sont soniqués dans du PBS froid contenant des inhibiteurs de protéases (leupeptine et pepstatine) et centrifugés à 10 000 rpm pendant 3 min à 4°C. Après filtration sur des filtres 0,22 µm, les fractions parasitaires sont stockées à -70°C jusqu'à utilisation.

c- Récupération des produits d'excrétion / sécrétion des parasites

Ils sont obtenus en incubant les parasites dans le milieu de culture des cellules endothéliales, 4 heures à 37°C. Le milieu de culture est alors récupéré, centrifugé à 2000 g pendant 5 minutes pour éliminer les parasites résiduels, filtré stérilement puis congelé à -70°C jusqu'à utilisation.

Figure 15: Quantification des sites antigéniques à la surface des cellules par la méthode du QIFIKIT.



C- Mise en évidence de l'expression des molécules d'adhérence

a- Sur les éosinophiles

L'expression des molécules d'adhérence sur les éosinophiles périphériques et l'étude de leur apparition et/ou de leur régulation au cours de la différenciation des éosinophiles *in vitro* a été réalisée par cytofluorométrie en flux en utilisant la technique QIFIKIT (Dako, Danemark).

Principe du QIFIKIT (Figure 15) :

Cette technique permet de déterminer le nombre de sites antigéniques à la surface des cellules par cytofluorométrie indirecte. La quantité d'antigènes est exprimée en unités ABC (Antibody Binding Capacity). DAKO QIFIKIT contient une série de billes (10 μm de diamètre) recouvertes de différentes quantités de molécules d'anticorps de souris anti-CD5 humain (clone ST1) d'isotype IgG2a. Ces billes miment les cellules présentant différentes densités d'antigènes marqués avec un anticorps de souris d'isotype IgG.

Deux séries de billes sont fournies :

Les billes standard : billes sans anti-CD5 et billes avec un nombre maximum d'anti-CD5. Elles permettent d'effectuer les réglages du cytofluoromètre.

Les billes de calibration : 5 populations de billes présentant à leur surface 4 000, 17 000, 59 000, 200 000 ou 490 000 molécules d'anti-CD5.

L'utilisation de l'anticorps primaire à concentration saturante permet de corréler le nombre de molécules d'anticorps primaire liées au nombre de sites antigéniques présents à la surface cellulaire. L'utilisation de l'anticorps secondaire à concentration saturante permet quant à lui de corréler la fluorescence obtenue au nombre de molécules de premier Ac fixé sur les cellules et sur les billes.

Quantification des molécules d'adhérence exprimées par les éosinophiles périphériques

Dans un premier temps, on incube 150 000 cellules avec un anticorps monoclonal de souris non fluorescent dirigé contre l'antigène d'intérêt ou avec un témoin isotypique à 10 $\mu\text{g/ml}$ (concentration saturante) en PBS-BSA 1%, 1 heure sur la glace. Après un lavage en PBS-BSA

et après saturation des sites non-spécifiques pendant 10 min par 10% de sérum de chèvre, la présence du 1^{er} anticorps est révélée par l'incubation avec un anticorps F(ab')₂ anti-souris-FITC, 45 min au 1/50^{ème} (concentration saturante) en PBS-BSA. Après 2 lavages au PBS-BSA, les cellules sont reprises dans du PBS puis analysées au cytofluoromètre (Excalibur, Becton Dickinson).

Afin de corrélérer la moyenne d'intensité de fluorescence mesurée (MFI) par cytofluorométrie à un nombre d'anticorps fixés (nombre de sites par cellule), les différentes préparations de billes portant des quantités croissantes et connues d'anticorps monoclonal ST1 (CD5, IgG2a), sont incubées avec l'anticorps secondaire marqué au FITC.

Les valeurs de moyennes de fluorescence (MFI) obtenues pour les billes de calibration permettent de construire une courbe d'étalonnage (MFI en fonction de ABC). Dans le cas des cellules marquées, il est alors possible à partir de la MFI et par interpolation de la courbe de déterminer le nombre d'anticorps fixés correspondant au nombre de sites antigéniques présents à la surface cellulaire (ABC).

Quantification des molécules d'adhérence exprimées par les éosinophiles en cours de différenciation

Un double marquage est effectué sur les cellules : un marquage intracellulaire avec un Ac anti-EPO (marqueur de la lignée éosinophilique), destiné à cibler spécifiquement les éosinophiles différenciés dans la culture, et un marquage membranaire des molécules d'adhérence, selon la technique du QIFIKIT.

La suspension cellulaire (3×10^5 cellules dans 50 μ l) est incubée 45 min sur la glace avec le premier anticorps à 10 μ g/ml en PBS-BSA 1%. Après un lavage en PBS-BSA 1% les sites non spécifiques sont bloqués par 10 μ l de sérum de chèvre pendant 10 min. Les cellules sont ensuite incubées 20 min sur la glace avec l'anti-souris-FITC (fourni avec le Kit) au 1/50^{ème} en PBS-BSA 1%. Après 2 lavages, les cellules sont fixées au PAF 2% pendant 10 min, lavées puis perméabilisées en PBS-BSA 1%-Saponine 0,5% pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont incubées 30 minutes avec l'anticorps anti-EPO-biotinylé à une concentration de 10 μ g/ml dans le tampon de perméabilisation. Après un lavage dans ce même tampon, les

cellules sont incubées 20 min avec la streptavidine-phycoérythrine à une dilution finale de 1/200ème en tampon de perméabilisation. Enfin, les cellules sont lavées 2 fois en tampon de perméabilisation, une fois en PBS afin d'éliminer la saponine, reprises dans du PBS-BSA 0,5% puis analysées au cytofluoromètre (Excalibur, Becton Dickinson) avec le logiciel Cellquest.

Les billes QIFIKIT sont saturées avec le sérum de chèvre et incubées avec l'anti-souris-FITC dans les mêmes conditions que les cellules.

b- Sur les cellules endothéliales

Cell-ELISA

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 96 puits (Nunc) et stimulées lorsqu'elles sont à confluence. Le milieu de culture est changé 2 heures avant la stimulation. Dans les premières expériences, les cellules sont stimulées à 37°C avec du TNF- α (100 U/ml) ou des « schistosomules poumons » (50 parasites par puit) pendant les temps indiqués. Dans les expériences où les schistosomules sont testés en tant qu'inhibiteurs de la synthèse de molécules d'adhérence, les parasites et les produits d'excrétion / sécrétion des schistosomules sont ajoutés 20 minutes avant l'addition du TNF- α (100 U/ml), l'incubation se poursuit ensuite pendant 2 heures pour la sélectine E ou pendant 4 heures pour VCAM-1 et ICAM-1.

Le Cell-ELISA est effectué comme suit. Après 2 lavages au HBSS froid (pour éliminer toute trace de milieu de culture), les cellules sont incubées pendant 1 heure sur la glace, avec le premier Ac à 5 μ g/ml dans du HBSS + 5% de FCS (HBSS-FCS). Les cellules sont alors lavées 3 fois au HBSS froid puis incubées une heure sur la glace avec le second anticorps couplé à la peroxydase (Sigma), dilué au 500ème dans du HBSS-FCS. Après 3 lavages en HBSS, les cellules sont fixées au PAF 2% pendant 10 minutes sur la glace puis lavées 3 fois au HBSS. La révélation de la réaction enzymatique est obtenue par l'adjonction du substrat ortho-phénylènediamine (OPD, Sigma). L'intensité de la coloration est donnée par lecture au spectromètre à 492 nm après arrêt de la réaction par l'acide chlorhydrique 3N.

Le pourcentage d'inhibition de l'expression de surface des molécules d'adhérence est calculé de la façon suivante :

% inhibition = (DO des puits traités avec les agents inhibiteurs et le TNF- α - DO des puits non traités) / (DO des puits traités avec le TNF- α seul - DO des puits non traités) x 100

Extraction d'ARNm et Northern Blot

L'ARN total des cellules HMVEC-1 est extrait en utilisant le réactif TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY) et est fractionné sur gel d'agarose-formaldéhyde à 1,2 %. Après transfert, les membranes de nylon (Amersham, Buckinghamshire, UK), sont hybridées avec les oligonucléotides anti-sens marqués à leur extrémité 5' au [γ - 32 P]dATP avec la polynucléotide kinase T4. Les oligonucléotides anti-sens utilisés sont :

pour la sélectine E humaine : 5'-CCACTGCCCTTGAGTGGTGCATTCAAC-3'

pour VCAM-1 humain : 5'-GATTTTAGTACTGTGTCTCCTGTCTCCGC-3'

pour ICAM-1 humain : 5'-GGCTCTAGGGTGGGCTTCACACTTCAC-3'

pour la GAPDH humaine : 5'-GGGTCATGAGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG-3'

L'autoradiographie est effectuée à -70°C avec des films Kodak AR X-OMAT (Eastman Kodak, Rochester, NY).

c- Sur les parasites

Immunofluorescence sur schistosomules entiers

Les schistosomules obtenus mécaniquement ou par passage à travers une peau de souris sont fixés une nuit dans du PAF 4 %. Ils sont ensuite lavés dans du milieu de Hank's puis incubés 1 heure à température ambiante avec le premier anticorps à une concentration finale de 10 μ g/ml pour l'anti-CD15 et de 30 μ g/ml pour les anti-sélectines. Un lavage en milieu de Hank's est effectué et le deuxième anticorps marqué au FITC (Sigma) , dilué au 1/40ème dans du milieu de Hank's est ajouté, pendant 30 minutes. Deux lavages dans du milieu de Hank's sont effectués et les schistosomules sont montés entre lame et lamelle à l'aide de Fluoprep (BioMérieux, France). Les lames sont observées à 525 nm (Microscope Axioscop, Zeiss).

Immunomarquage enzymatique sur coupes

Les schistosomules obtenus mécaniquement ou par passage à travers une peau de souris sont fixés une nuit dans du paraformaldéhyde 4 %. Après lavage en PBS puis en H₂O, ils sont déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante et inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont effectuées. Elles sont déparaffinées au toluène et réhydratées avant le marquage. Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par une solution de TBS (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,4) contenant 5 % de BSA. Les coupes sont ensuite incubées 2 heures avec le premier anticorps à 5 µg/ml final et dilué dans du TBS contenant 1 % de BSA (TBS-BSA). Après 3 lavages de 5 min dans le TBS, les lames sont incubées successivement 1 heure avec le second anticorps couplé à la biotine (Sigma) et dilué au 100^{ème} dans du TBS-BSA, puis après 3 lavages, avec la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline et diluée au 100^{ème} dans du TBS. Après 3 lavages au TBS, la révélation de la réaction enzymatique se fait à la New Fuchsin (Dako, Carpinteria, USA). La contre-coloration est réalisée à l'Héματοxyline de Harris (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les lames sont observées au microscope optique (Microscope Axioscop, Zeiss).

Méthode immunoenzymatique sur extraits parasitaires

Un extrait total de schistosomules peau ou mécaniques (5 µg/ml) est coaté une nuit à 4°C en PBS dans des plaques 96 puits Immunlon II (PolyLabo). Les sites non-spécifiques sont saturés par du PBS-BSA 3% (1h à 37°C). Après 5 lavages en PBS, le premier Ac est ajouté, à 10 µg/ml en PBS-BSA 1% - Tween 0,1% (PBS-BSA-T), 2 heures à 37°C. Après 7 lavages au PBS-Tween 0,1% (PBS-T), l'Ac anti-souris marqué à la peroxydase (Sigma) est ajouté à 1/2500 en PBS-BSA-T, 1h30 à 37°C. Après 7 lavages en PBS-T, la révélation de la réaction enzymatique se fait grâce au substrat OPD (ortho-phénylènediamine, Sigma). L'intensité de la coloration est donnée par lecture au spectromètre à 492 nm après arrêt de la réaction par l'acide chlorhydrique 3N.

D- Mise en évidence de la liaison de la sélectine P aux éosinophiles et aux schistosomules

a- Biotinylation des sélectines solubles

La sélectine recombinante soluble (1mg/ml) est incubée 30 min à température ambiante avec la NHC-LC-biotine (sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate, 1 mg/ml en DMSO) (Pierce, Rockford, IL) en tampon bicarbonate de sodium 1 M, pH 8,5, à raison de 250 µg de biotine par mg de protéine. Le produit obtenu est dilué 2 fois en tampon A (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM et MgCl₂ 2 mM), et centrifugé 2 fois 1 heure à 5000 g dans des microconcentrateurs Amicon (cut-off 10) (Amicon, Dancers, MA) pour éliminer la biotine libre. La sélectine biotinylée est ensuite stockée à 4°C en présence de 0,01 % d'azide (NaN₃).

b- Cytofluorométrie en flux

Pour tester la capacité des éosinophiles à lier la sélectine P, 1,5 x 10⁵ éosinophiles humains ont été incubés pendant 45 min sur la glace, avec 20 µg/ml de protéine fusion sélectine P / Ig (Psel-Ig) ou avec 20 µg/ml d'IgG1 humaine (Sigma), comme contrôle. Après 2 lavages, les cellules sont incubées avec 5 µl de sérum de souris normal, puis avec un anticorps de souris anti-IgG humain marqué au FITC (Sigma), 30 min sur la glace. Après 2 lavages, les cellules sont analysées au cytofluoromètre (Excalibur, Becton Dickinson) avec le logiciel Cellquest. Toutes les incubations ainsi que les lavages sont réalisés en HBSS contenant 3% de FCS et 1,25 mM de CaCl₂ et de MgCl₂. La vérification du caractère calcium-dépendant de la liaison a été effectuée en ajoutant 10 mM d'EGTA.

c- Immunomarquage

L'interaction des sélectines avec leurs ligands parasites a été étudiée en utilisant des sélectines solubles biotinylées. Dans ce cas, les coupes sont saturées dans le tampon A suivant : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM et MgCl₂ 2 mM, auquel on ajoute 3 % de BSA (Sigma Chemical Co.). Elles sont alors incubées pendant 2 heures à température

ambiante avec la sélectine biotinylée (5 µg/ml dans le tampon A + 0,5 % de BSA), lavées 2 fois 5 min dans le tampon A, puis incubées 45 min à température ambiante avec la streptavidine-phosphatase alcaline (1/100 en tampon A). La révélation se fait en présence de New Fuchsin et la contre-coloration est réalisée à l'hématoxyline de Harris. La spécificité du signal obtenu avec les sélectines marquées est démontrée par l'inhibition du marquage en présence d'EGTA à 10 mM, qui chélate les ions.

d- Méthode immunoenzymatique sur extraits parasitaires

Le tampon utilisé est du PBS + 1 mM de CaCl₂ et 1 mM de MgCl₂ (PBS-Ca-Mg). Cinq µg/ml d'extrait total de schistosomules peau ou mécaniques sont coatés une nuit à 4°C en PBS-Ca-Mg dans des plaques 96 puits Immunlon II (PolyLabo). Les sites non-spécifiques sont saturés par du PBS-Ca-Mg-BSA 3% (1h à 37°C). Après 5 lavages en PBS-Ca-Mg, on ajoute la Psel-Ig à 20 µg/ml en PBS-Ca-Mg + 1% BSA + 0,1% Tween, 2 heures à 37°C. Après 2 lavages en PBS-Ca-Mg + 0,1% Tween, un Ac anti-IgG humain marqué à la peroxydase (Sigma) est ajouté à 1/2500 en PBS-Ca-Mg + 0,1% Tween, 1h30 à 37°C. Après 3 lavages en PBS-Ca-Mg + 0,1% Tween, la révélation de la réaction enzymatique se fait grâce au substrat OPD (Sigma). L'intensité de la coloration est donnée par lecture au spectromètre à 492 nm après arrêt de la réaction à l'acide chlorhydrique 3N. On ajoute 10 mM d'EGTA dans certaines expériences pour inhiber la liaison sélectine / carbohydate.

E- Expériences de cytotoxicité

a- ADCC dépendante des éosinophiles

Les expériences de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles sont effectuées en présence d'éosinophiles humains isolés à partir de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques, et de « schistosomules peau ». Pour cela, les éosinophiles (2×10^5 par puit) sont mis en présence des schistosomules (70 par puit) dans une plaque de 96 puits (Nunc, Roskilde, Denmark), dans un milieu RPMI contenant 10% de FCS inactivé par la chaleur et du sérum de patient bilharzien

(SHI) (1/32), dans un volume total de 200 μ l. Un contrôle négatif est effectué en présence de sérum humain normal (SHN). Le pourcentage de cytotoxicité est évalué par examen microscopique après 48 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. La mort du schistosomule est estimée par son immobilité, sa couleur sombre et son apparence granuleuse. Chaque expérience est réalisée en duplicate et les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cytotoxicité (\pm SD).

b- ADCC dépendante des plaquettes

Les expériences de cytotoxicité dépendante des plaquettes ont été réalisées selon un protocole classique (Joseph et al, 1985). Les plaquettes d'individus normaux ($1,5 \times 10^8$ plaquettes) sont incubées avec 70 schistosomules, dans du MEM contenant 10% de sérum de patient bilharzien (SHI) dans un volume final de 200 μ l. Après 24 heures d'incubation, les larves mortes sont comptées au microscope optique. Chaque expérience est réalisée en duplicate et les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cytotoxicité (\pm SD).

c- ADCC dépendante d'un seul isotype d'anticorps

Certaines expériences de cytotoxicité ont été réalisées en utilisant des anticorps chimères anti-NIP(5-iodo-4-hydroxyl-3-nitrophenacetyl) d'isotype IgA, IgG1 ou IgE (30 μ g/ml) à la place du sérum polyclonal de patients bilharziens. Dans ce cas, les « schistosomules peau » sont préalablement incubés avec 1 mg/ml de NIP-phospholipide (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, UK) pendant 5 heures à 37°C dans du MEM contenant 10 % de FCS, puis lavés 2 fois dans le milieu de culture. Le recouvrement des schistosomules par l'haptène NIP est contrôlé par immunofluorescence avant l'expérience de cytotoxicité (l'haptène NIP est révélé par l'incubation des schistosomules avec un Ac anti-NIP d'isotype IgG, IgA ou IgE, puis avec un Ac anti-IgG, IgA ou IgE humain marqué au FITC).

d- Expériences d'inhibition de l'ADCC

Les expériences d'inhibition de cytotoxicité ont été réalisées :

- soit en ajoutant dans le milieu, (en même temps que les cellules effectrices et les cibles parasitaires) des anticorps monoclonaux dirigés contre les principales familles de molécules d'adhérence à une concentration finale de 10 µg/ml,

- soit en présensibilisant les schistosomules par ces mêmes anticorps, 2 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les schistosomules sont lavés 2 fois avant de les mettre en présence des éosinophiles.

Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cytotoxicité ± SD.

L'inhibition de la cytotoxicité est calculée comme suit :

$1 - ((\% \text{ de cytotoxicité en présence de SHI et de l'inhibiteur potentiel}) - (\% \text{ de cytotoxicité en présence de SHN}) / (\% \text{ de cytotoxicité en présence de SHI et du contrôle négatif correspondant}) - (\% \text{ de cytotoxicité en présence de SHN}))$.

Les statistiques sont calculées à partir du test t de Student's. Les résultats sont considérés comme significatifs quand $p < 0,005$ (**) et $p < 0,05$ (*).

F- Libération d'ECP par les éosinophiles

a- Activation des éosinophiles

Les expériences d'activation des éosinophiles sont réalisées en plaque 96 puits avec des anticorps anti-FcR immobilisés. Les puits sont tout d'abord coatés pendant 2 heures à 37°C avec 40 µg/ml de F(ab')₂ anti-IgG de souris. Les anticorps anti-FcR (anti-FcαR (CD89) ou FcγRII (CD32), à 10 µg/ml) sont ensuite incubés dans les puits pendant 2 heures à 37°C dans une atmosphère humide, en présence de 5% de CO₂. Les puits sont lavés puis les éosinophiles purifiés (2 x 10⁵ par puit, à 10⁶/ml) sont ajoutés et cultivés pendant 18 heures, à 37°C, dans du MEM contenant 10% de FCS. Les surnageants de culture sont ensuite récupérés et stockés à -20°C jusqu'au dosage de l'ECP. Pour les expériences d'inhibition de la libération d'ECP, 10 µg/ml d'anti-Le^x, anti-Mac-1 (chaîne α), anti-sélectine L ou contrôle isotypique sont ajoutés en même temps que les éosinophiles.

Le test t de Student's a été utilisé pour comparer les moyennes arithmétiques. Les résultats sont considérés comme significatifs quand $p < 0,05$ (*).

b-Dosage de l'ECP

La libération d'ECP (Eosinophil Cationic Protein) par les éosinophiles est mesuré grâce à un test radioimmunologique à double anticorps (Pharmacia, Uppsala, Suède). L'ECP présent dans les surnageants de culture entre en compétition avec une quantité déterminée d'ECP marquée à l'iode 125 pour la liaison à un Ac spécifique. L'ECP liée et l'ECP non liée sont séparées par l'addition d'un second immunoabsorbant. Après centrifugation et décantation, la radioactivité est mesurée dans le culot; elle est inversement proportionnelle à la quantité d'ECP présent dans l'échantillon. Les résultats sont obtenus en ng/ml par extrapolation d'une courbe standard réalisée à partir d'ECP purifiée. Les résultats sont exprimés en index d'ECP, calculé comme suit :

$$\text{Index} = \frac{\text{ECP (éosinophiles + stimulus + Ac potentiellement inhibiteur)}}{\text{ECP (éosinophiles + stimulus)}}$$

Un index < 1 correspond à un effet inhibiteur de l'Ac sur la libération d'ECP.

G- Test d'adhérence des schistosomules aux cellules endothéliales

Les cellules endothéliales de microvaisseaux de poumons de souris sont cultivées à confluence dans des boîtes de culture 24 puits coatées à la gélatine (Nunc). Deux cent schistosomules dans 10 μl sont ajoutés dans chaque puit contenant 250 μl de milieu de culture complet et incubés à 37°C pendant 4, 12 ou 18 heures. Après incubation, les cellules sont lavées 4 fois au PBS contenant 1mM de CaCl_2 et 1 mM de MgCl_2 , de façon à enlever les parasites non adhérents. Les parasites restants, car adhérents aux cellules, sont comptés au microscope optique.

Dans certains cas, les cellules endothéliales sont préalablement incubées avec le TNF- α ou avec des anticorps dirigés contre le déterminant Le^x ou contre les sélectines.

H- Détermination des concentrations en AMPc intracellulaire

Les cellules HMVEC-1 sont cultivées à confluence dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (soit environ 3×10^5 cellules) et le milieu est renouvelé 2 heures avant la stimulation avec 1 ml de DMEM + 0,5 % de FCS. Un inhibiteur des phosphodiésterases, l'IBMX, est ajouté à 500 μ M dans la culture, 10 min avant l'addition des stimulants potentiels. Les cellules sont ensuite stimulées par 100 U/ml de TNF- α pendant 10 min. Dans certains cas, 100 μ l de produits d'excrétion / sécrétion de schistosomules (obtenus à partir d'une culture de 10^4 parasites / ml) sont incubés avec les cellules 10 min avant l'incubation avec le TNF- α .

La concentration en AMPc intracellulaire est déterminée par un kit immunoenzymatique (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI).

I- Plasmides et transfection des cellules endothéliales

Le plasmide κ B-LUC dérive du vecteur luciférase pGL2 (Promega, Madison, WI). Il contient 3 éléments de réponse E-selectin- κ B, clonés en aval du promoteur minimal (Brostjan et al, 1997). Les HMVEC-1 sont cultivées en plaque 24 puits (Nunc) et sont transfectées avec le plasmide κ B-LUC (300 ng / puit) grâce au réactif TransFast™ (Promega) lorsqu'elles sont à 80 % de confluence. Pour corriger la variabilité de l'efficacité de la transfection, une co-transfection avec 100 ng d'ADN de plasmide β -Gal (pCMV- β Gal) est effectuée en parallèle. Les cellules transfectées sont cultivées dans 0,5 ml de milieu complet, pendant 12 heures avant incubation avec les produits d'excrétion / sécrétion de schistosomules (50 μ l d'une culture à 10^4 parasites / ml) pendant 20 min. Les cellules sont ensuite incubées en présence de TNF- α (100 U / ml) pendant 4 heures. Les lysats cellulaires sont testés pour leur activité luciférase grâce à un luminomètre (LB9501, Berthold, Schwarzwald, Germany). Les résultats sont corrigés en testant l'activité de la β -galactosidase présente dans les lysats cellulaires et mesurée par le système reporter Promega.

J- Test d'adhérence en conditions statiques

Les cellules HL-60 sont préparées de façon classique (Katagiri et al, 1996) et marquées à la calcéine (5 μ M en RPMI). Après lavage, les cellules marquées (5 x 10⁵ cellules / puit) sont ajoutées aux HMVEC-1 préincubées ou non avec les produits d'excrétion / sécrétion des schistosomules, puis stimulées avec le TNF- α (100 U/ml) dans des plaques de culture de 96 puits, pendant 30 min à 37°C. Dans certaines expériences, 20 μ g/ml d'Ac potentiellement inhibiteurs sont incubés avec les HMVEC-1 stimulées au TNF- α .

Les cellules non-adhérentes sont éliminées par lavage. Le nombre de cellules adhérentes est quantifié au spectrofluoromètre (Titertek Fluoroskan type 371, Life Science, Gaithersburg, MD).

Résultat 1

***Evolution cinétique des molécules d'adhérence au
cours de la différenciation des éosinophiles in
vitro***

Résultat 1

Evolution cinétique des molécules d'adhérence au cours de la différenciation des éosinophiles *in vitro*

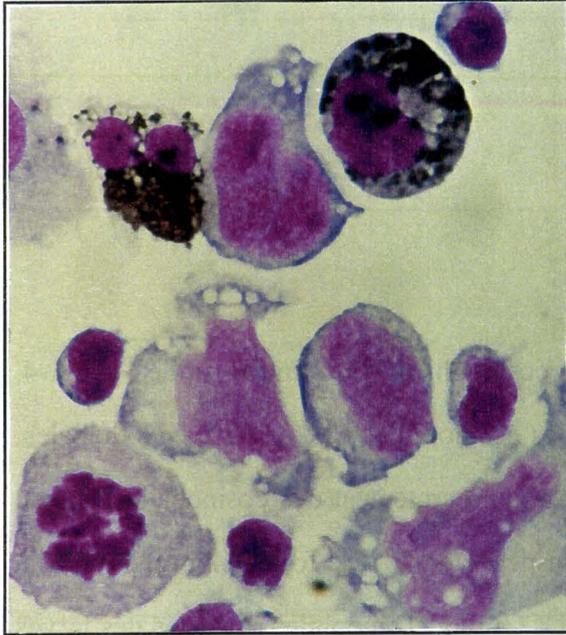
Introduction

Les molécules d'adhérence exprimées par les éosinophiles (sélectine L, (s)Le^x, VLA-4, LFA-1 et Mac-1) sont impliquées dans l'adhésion des éosinophiles aux cellules endothéliales, étape obligatoire dans la cascade d'événements menant au recrutement des éosinophiles lors de l'inflammation. Cependant, leur rôle a été aussi suspecté dans une fonction bénéfique : la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ou ADCC) des éosinophiles vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni*.

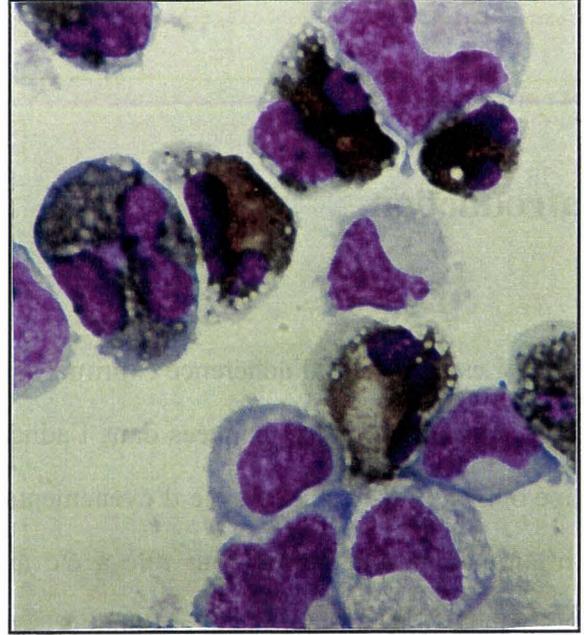
Alors que de nombreuses études ont comparé l'expression de molécules d'adhérence présentes sur les cellules CD34⁺ provenant de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse ou de sang périphérique (en raison de leur utilisation clinique en transplantation et dans les études de thérapie génique), aucune n'a suivi de façon quantitative l'évolution de l'expression de ces molécules sur les éosinophiles au cours de leur différenciation à partir de cellules précurseurs présentes dans le sang de cordon ombilical.

L'IL-3, le GM-CSF et l'IL-5 sont impliqués dans la prolifération des éosinophiles et dans leur différenciation à partir de cellules progéniteurs (Saito et al, 1988; Clutterbuck et al, 1990). Les cellules précurseurs de sang de cordon ombilical, cultivées en présence de rhIL-5, rhIL-3 et rhGM-CSF constituent un modèle de choix pour étudier la cinétique de différenciation des éosinophiles *in vitro*. Nous avons analysé la cinétique d'expression de certaines molécules d'adhérence au cours de la maturation des éosinophiles. Pour cela, les cellules de sang de cordon sont cultivées pendant 7 jours en présence d'IL-3, de GM-CSF et d'IL-5 puis en présence d'IL-5 seulement pendant 21 jours. Par cytométrie en flux, nous montrons une

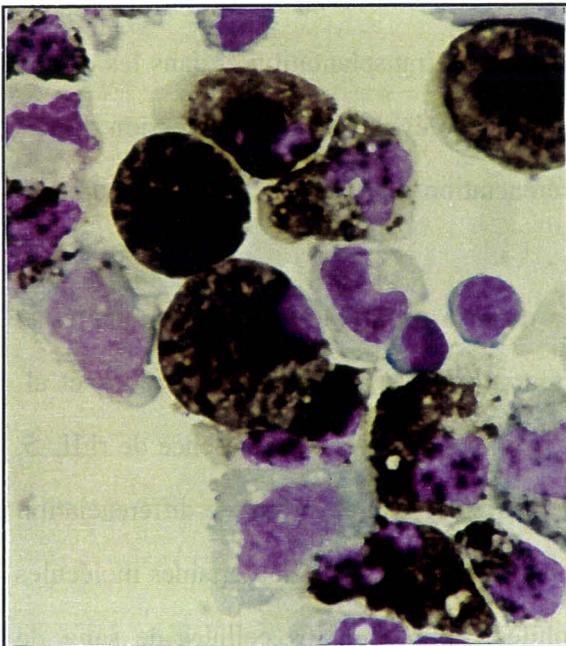
Figure 16 : Suivi de la différenciation des éosinophiles *in vitro* à partir de cellules de sang de cordon ombilical.
Les cytopspin sont colorés au RAL puis au DAB (visualisation de l'EPO)
agrandissement : x200



J7



J14



J21



J28

augmentation du pourcentage d'éosinophiles exprimant les molécules d'adhérence étudiées, au cours de la différenciation, en parallèle avec une diminution du nombre de sites par cellule. A J28, l'expression de LFA-1 et VLA-4 est similaire à celle des éosinophiles périphériques. En revanche, l'expression de Le^x et de CD11b est plus faible, et celle de sélectine L et de sLe^x, plus forte sur les éosinophiles différenciés *in vitro*, par rapport aux éosinophiles matures du sang périphérique.

Ces résultats suggèrent que les éosinophiles différenciés *in vitro* expriment très précocément les molécules d'adhérence nécessaires à la migration de ces cellules.

Résultats et discussion

1- Suivi de la différenciation *in vitro* des éosinophiles

La différenciation de cellules souches hématopoïétiques issues de sang de cordon ombilical vers la lignée éosinophilique est suivie de façon hebdomadaire. L'activité de l'EPO est détectée par la 3-3' diaminobenzidine (DAB) en présence de cyanure, au niveau de cytopréparations obtenues à partir de cellules fraîches. Ainsi, on peut mettre en évidence l'aspect morphologique de la différenciation éosinophilique *in vitro* (par la coloration spécifique de leurs granules), aux différents stades de croissance.

On voit de façon nette sur la Figure 16 que le nombre de cellules présentant une réaction positive au DAB est en augmentation régulière au cours de la différenciation. Nous avons obtenu, en moyenne, 12 % de cellules DAB⁺ à J7, 30 % à J 14, 50 % à J 21 et 80 % à J 28.

Les figures de mitose observées dans les cultures précoces attestent de la prolifération de la culture. Au cours de la maturation des éosinophiles, les cellules deviennent plus rondes et plus régulières avec un cytoplasme dont la coloration violette (caractéristique des cellules immatures) s'atténue progressivement. En revanche, l'acquisition du noyau bilobé de l'éosinophile n'est pas systématique sur tous les éosinophiles différenciés.

Menée parallèlement, l'analyse par cytométrie en flux de cellules perméabilisées permet de détecter l'EPO grâce à un Ac anti-EPO. On observe en cytométrie, une proportion de cellules exprimant l'EPO plus importante que celle détectée par la réaction enzymatique au DAB (Tableau VI), essentiellement aux stades précoces (15 premiers jours de culture) suggérant que l'Ac anti-EPO peut détecter une forme immature de la peroxydase, ne possédant pas encore les propriétés enzymatiques révélées par le DAB. Une forme immature de la MBP (eosinophil granule mature basic protein), proMBP a été montrée sur des éosinophiles en cours de différenciation (Popken-Harris et al, 1998), appuyant cette hypothèse.

A partir de ces données, l'ensemble de notre étude est basé sur l'analyse des cellules positives pour le DAB et l'EPO, appelées désormais éosinophiles.

Tableau VI : Pourcentage d'éosinophiles EPO⁺, détectés soit par réaction au DAB sur des cytopréparations, soit par un anticorps anti-EPO par cytométrie en flux intracellulaire (n=5).

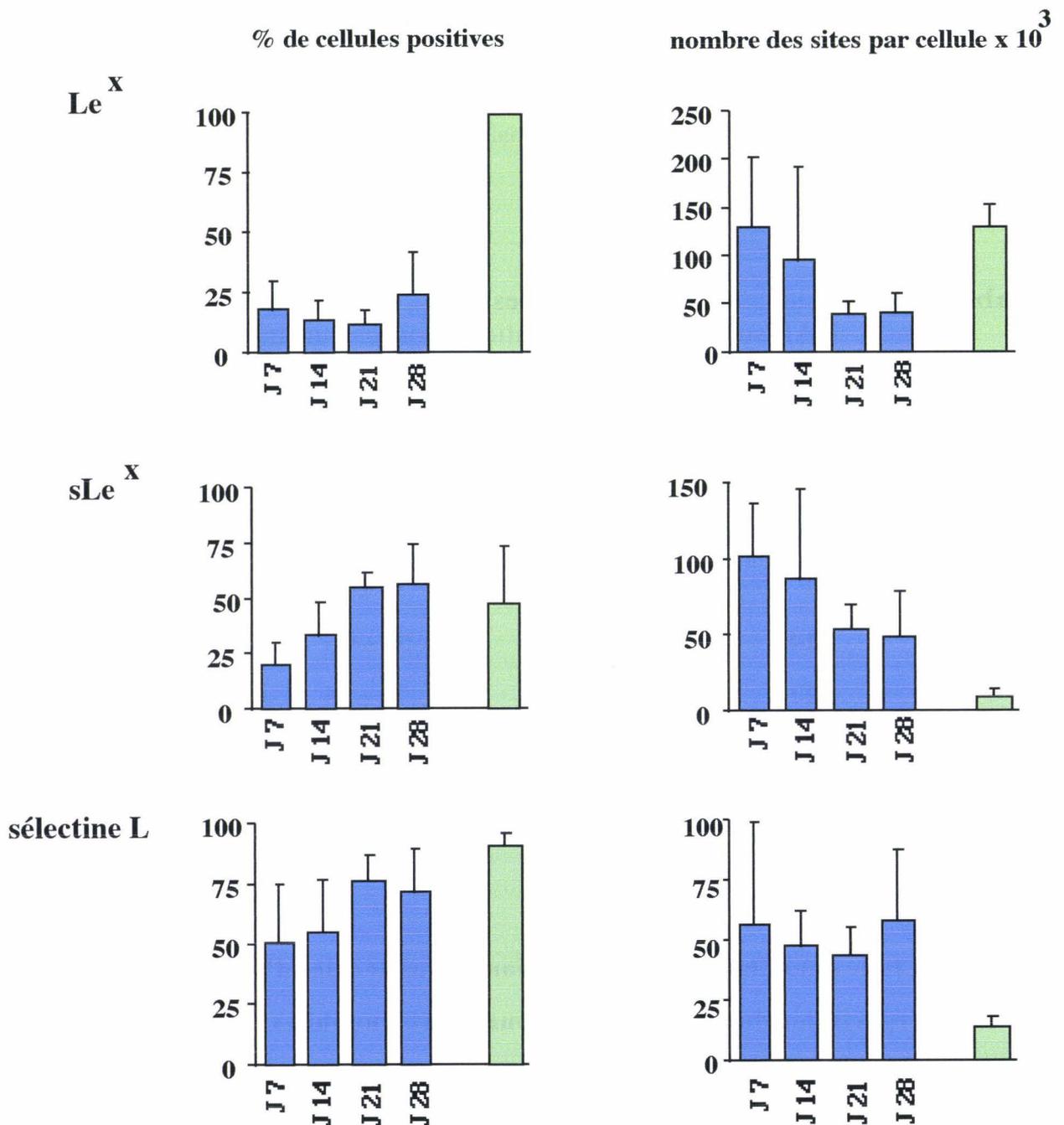
jours de culture	DAB	anti-EPO
J7	12 ± 1	35 ± 15
J14	30 ± 8,5	50 ± 6,1
J21	60 ± 10,2	70 ± 15
J28	80 ± 15	87 ± 6,5

2- Etude quantitative de l'expression des molécules d'adhérence au cours de la différenciation de cellules précurseurs en éosinophiles

Cette étude a été réalisée par cytométrie en flux, en double marquage. Le marquage membranaire des molécules d'adhérence est réalisée par la technique du QIFIKIT, permettant

Figure 17 : Expression des molécules d'adhérence sur les éosinophiles en cours de différenciation *in vitro*
 Comparaison avec des éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques
 Analyse par cytométrie en flux - n=5

■ éosinophiles de sang périphérique
■ éosinophiles en cours de différenciation



l'étude quantitative du nombre de sites antigénique exprimés par cellule. Ce premier marquage est donc réalisé sur des cellules fraîches avec les Ac anti-molécule d'adhérence; le deuxième marquage se fait après fixation et perméabilisation des cellules avec l'Ac anti-EPO.

Les résultats bruts obtenus correspondent au pourcentage de cellules doublement marquées par rapport à la population cellulaire totale. Ils sont rapportés, pour plus de clarté, au nombre de cellules EPO⁺ et sont exprimés en pourcentage de cellules doublement positives, par rapport au nombre total de cellules EPO⁺.

La Figure 17 indique, pour chaque molécule d'adhérence étudiée, le pourcentage de cellules positives ainsi que le nombre de sites antigéniques exprimés par cellules, 7, 14, 21 et 28 jours après le début de la culture de cellules de sang de cordon ombilical. En parallèle, on a indiqué les mêmes paramètres, obtenus pour des éosinophiles matures de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques.

En général, on remarque que l'évolution au cours de la différenciation consiste en une augmentation du pourcentage de cellules exprimant les molécules d'adhérence mais en une diminution de leur nombre par cellule.

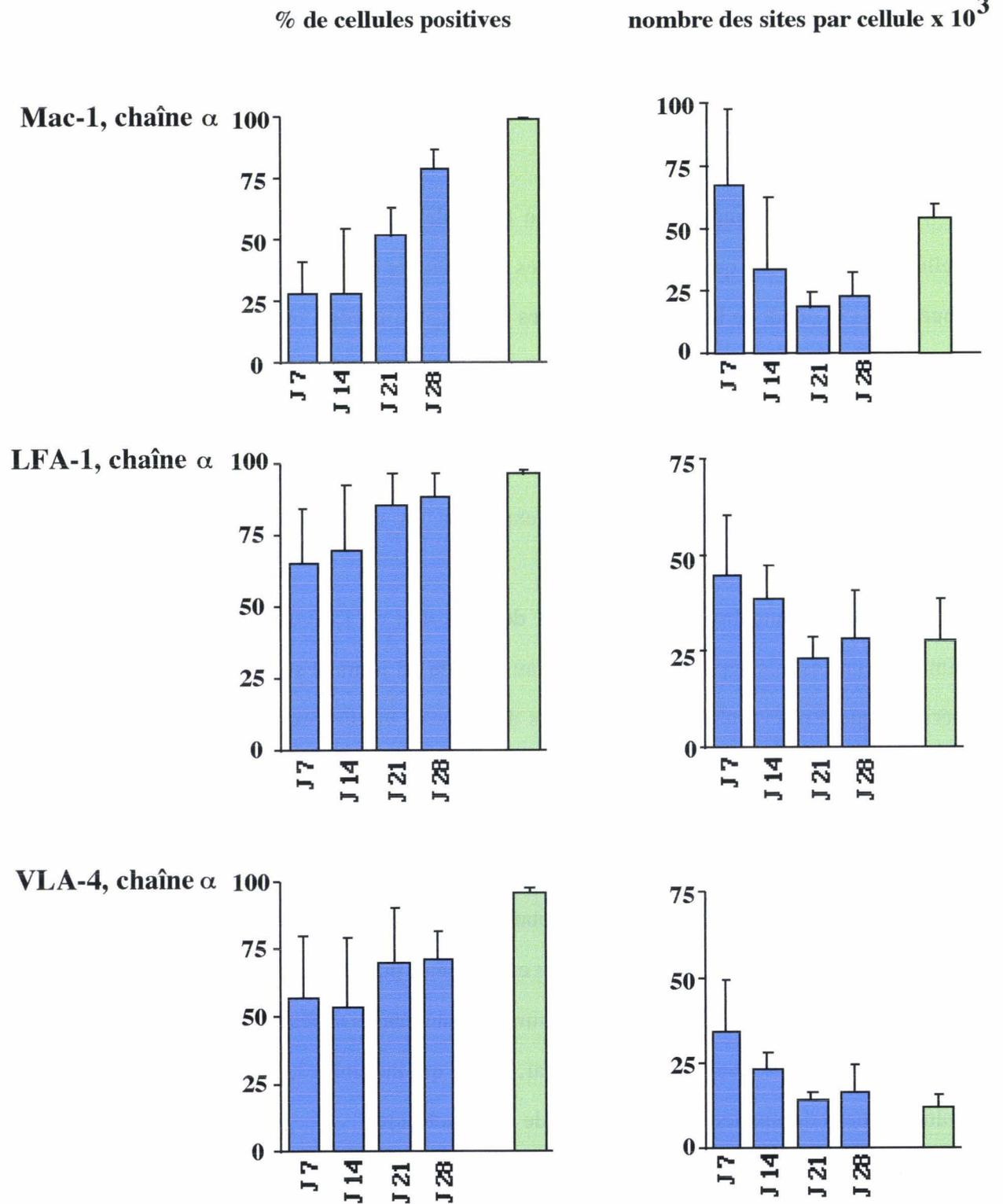
L'analyse montre que l'expression de VLA-4 et de LFA-1 est très précoce et quasi-similaire sur des éosinophiles différenciés au bout de 28 jours et sur des éosinophiles de sang périphérique. En revanche, les éosinophiles différenciés *in vitro* expriment beaucoup moins de Le^x que les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques tant en pourcentage de cellules positives qu'en nombre de sites antigéniques par cellule. On observe des résultats similaires pour Mac-1 mais en proportion plus faible. L'expression de sLe^x en revanche est plus forte sur les éosinophiles différenciés *in vitro*, notamment en ce qui concerne le nombre de sites antigéniques exprimés par les cellules. Il en est de même pour l'expression de la sélectine L.

L'expression plus faible de Mac-1 sur les éosinophiles différenciés *in vitro* est en accord avec les résultats de Hamann (Hamann et al, 1996) qui incrimine la présence de l'IL-5 dans la culture dans la diminution de l'expression de cette molécule.

Ces résultats indiquent donc que les molécules d'adhérence sont exprimées dès les premiers stades de différenciation *in vitro* des éosinophiles, à partir de précurseurs de sang de

Figure 17 : Suite

- éosinophiles de sang périphérique
- éosinophiles en cours de différenciation



cordons ombilicaux. De plus, on remarque que les éosinophiles différenciés *in vitro* sont capables d'exprimer certaines molécules d'adhérence de façon analogue aux éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques. Les différences d'expression de certaines molécules d'adhérence exprimées par les éosinophiles différenciés *in vitro* par rapport aux éosinophiles matures de sang périphérique de patients hyperéosinophiles pourraient être une conséquence, soit de la présence des cytokines recombinantes dans la culture (c'est le cas de Mac-1 notamment) soit de l'absence de certains facteurs présents *in vivo* (notamment les composants de la matrice extracellulaire) et impliqués dans l'expression de ces molécules. Il serait intéressant d'autre part de comparer les taux d'expression obtenus sur les éosinophiles à J28 avec ceux d'éosinophiles matures de donneurs sains.

3- Mise en évidence de la fonctionnalité des éosinophiles différenciés *in vitro*

Pour montrer que les éosinophiles différenciés *in vitro* sont fonctionnels, nous avons testé leur capacité cytotoxique vis-à-vis de larves parasitaires de *Schistosoma mansoni* en présence de sérum de patient bilharzien (ADCC). Nous avons obtenu une cytotoxicité de l'ordre de $35 \pm 2,6 \%$ avec les éosinophiles à J 28 de 3 cultures différentes en présence d'un sérum de patient bilharzien qui induit une cytotoxicité de $82 \pm 1,4 \%$ en présence d'éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques (Figure 18). L'activité cytotoxique des éosinophiles différenciés à partir de sang de cordon ombilical est donc significativement plus faible que celle d'éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques.

La cytotoxicité plus faible obtenue pourrait être expliquée par la différence d'expression des molécules d'adhérence que nous avons observé, mais aussi par une différence dans la quantité de protéines cytotoxiques synthétisées (Gruart et al, 1992), ou par une dégranulation plus faible des éosinophiles différenciés *in vitro*, éventuellement due à une plus faible expression des récepteurs aux Ig. Cette dernière hypothèse est actuellement en cours

Figure 18 : Comparaison de la cytotoxicité induite par des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques et des éosinophiles différenciés à partir de sang de cordon ombilical vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*

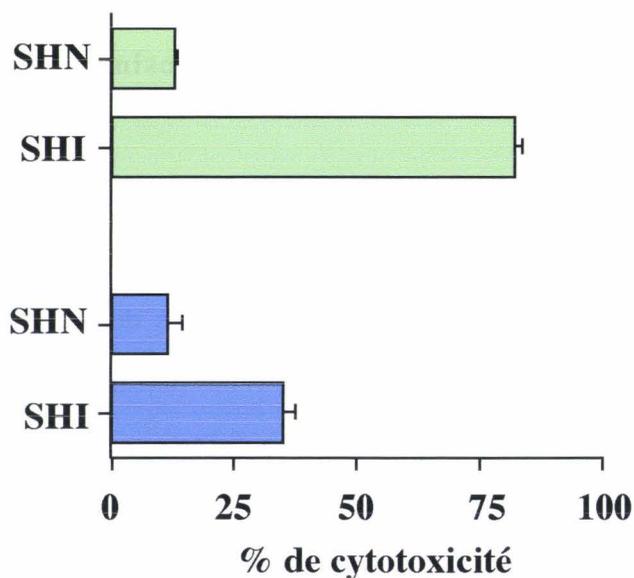
Les résultats correspondent aux moyennes des % de mortalité parasitaire \pm SD de 3 expériences indépendantes, réalisées en duplicate

SHN = sérum humain normal

SHI = sérum humain immun

■ éosinophiles de sang périphérique

■ éosinophiles différenciés *in vitro*



d'investigation. Des résultats préliminaires indiquent que les éosinophiles différenciés à partir de sang de cordon ombilical présentent à leur surface des quantités similaires de Fc α R et de Fc γ RII par rapport aux éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques (de l'ordre de 5% et de 80 %, respectivement). En revanche, les taux de Fc ϵ RI et Fc ϵ RII sont plus faibles pour les éosinophiles différenciés *in vitro*, ce qui pourrait expliquer en partie la différence de cytotoxicité observée.

Conclusion

L'établissement du modèle de différenciation éosinophilique *in vitro* nous a permis de suivre la cinétique d'expression de molécules d'adhérence à la surface des éosinophiles. Cette étude montre que l'on obtient en 28 jours des éosinophiles exprimant à leur surface des quantités similaires de LFA-1 et de VLA-4, mais plus de sLe^x et de sélectine L et moins de Le^x et de Mac-1, que chez les éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques.

L'évolution de l'expression des molécules d'adhérence au cours de la maturation des éosinophiles pourrait s'expliquer par la domiciliation différente des éosinophiles matures et des éosinophiles en cours de différenciation. De plus, ce modèle de différenciation des éosinophiles *in vitro* devrait permettre, en faisant varier la composition du milieu de culture, d'étudier les facteurs régulant l'expression de certaines molécules d'adhérence par les éosinophiles humains.

Les éosinophiles obtenus par différenciation *in vitro* sont capables de détruire des larves de schistosome en présence de sérum de patient bilharzien. Cependant, la cytotoxicité qu'ils induisent est plus faible que celle observée avec des éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques, suggérant peut-être l'implication des molécules d'adhérence dont l'expression sur les éosinophiles différenciés *in vitro* diffère de celle des éosinophiles de sang périphérique, dans les phénomènes de cytotoxicité.

Alors que les **éosinophiles différenciés *in vitro*** et les **éosinophiles de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques** ont des **caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes**, il existe donc des **différences quantitatives** qui pourraient être une conséquence de leur immaturité, de l'influence des cytokines utilisées dans la culture, et/ou de l'absence d'environnement cellulaire et tissulaire.

Résultat 2

***Les interactions sélectine/carbohydrate agissent
en tant que co-récepteurs dans l'ADCC des
éosinophiles humains vis-à-vis des schistosomules
de *Schistosoma mansoni****

Résultat 2

Les interactions sélectine/carbohydrate agissent en tant que co-récepteurs dans l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis des schistosomules de *Schistosoma mansoni*

Introduction

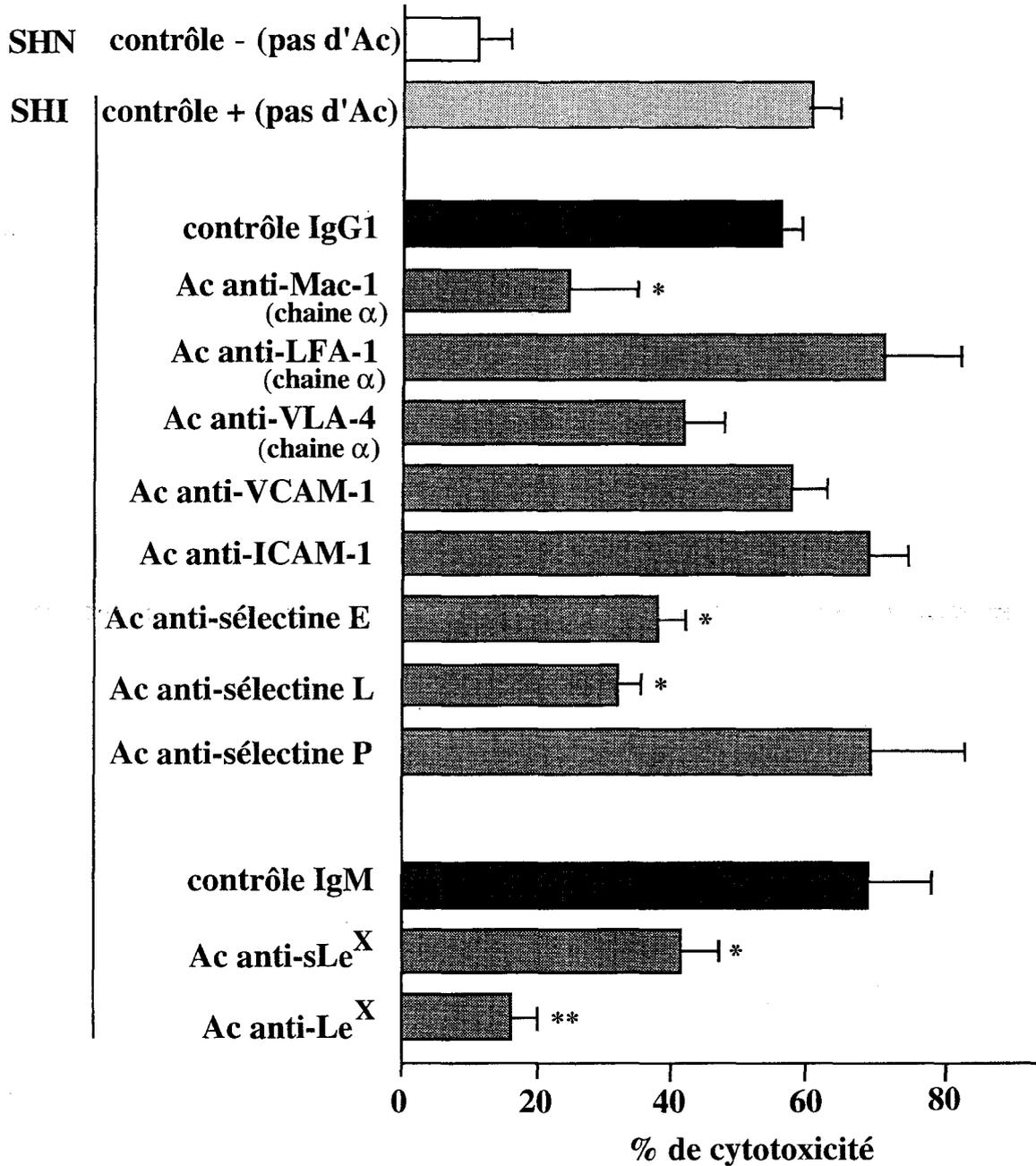
La réponse immunitaire dirigée contre *Schistosoma mansoni* fait intervenir différents mécanismes effecteurs aboutissant à la destruction des formes larvaires et donc à une réduction de la charge parasitaire. Dans la schistosomiase humaine, des cellules inflammatoires telles que les éosinophiles, les macrophages et les plaquettes participent à la destruction des parasites selon un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps, appelé ADCC. Des études ont montré que cette cytotoxicité dépendante des éosinophiles nécessitait des étapes d'adhérence, réversibles puis irréversibles, entre le schistosome et la cellule effectrice (Butterworth et al, 1979). La présence de molécules d'adhérence à la surface des éosinophiles et leur rôle dans les interactions éosinophile / cellule endothéliale nous ont suggéré leur implication dans le phénomène d'ADCC.

Les premières études concernant l'implication de molécules d'adhérence dans les processus d'ADCC ont révélé que des Ac anti-CD11b (Mac-1, chaîne α) pouvaient inhiber l'ADCC dépendante des éosinophiles mais pas des plaquettes (Capron et al, 1987).

Le but de l'étude présentée dans ce chapitre était de savoir si certaines molécules d'adhérence, présentes à la surface des éosinophiles, sont impliquées dans l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni*. Pour cela, des expériences d'inhibition de la cytotoxicité ont été effectuées en présence soit d'Ac monoclonaux dirigés

Figure 19 : Effet des Ac anti-molécules d'adhérence sur l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*

Les résultats correspondent aux moyennes des % de mortalité parasitaire \pm SD de 6 expériences indépendantes, effectuées en duplicate.
La significativité de l'inhibition, par rapport aux contrôles isotypiques, est indiquée: *, $p < 0,05$ et **, $p < 0,005$



contre ces molécules ou contre leurs contre-récepteurs, soit en présence de ligands solubles de ces molécules, agissant en tant que compétiteurs potentiels. Nous avons pu montrer que des interactions sélectine / carbohydrate jouent un rôle important dans l'expression de la fonction cytotoxique des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*.

Résultats et discussion

1- L'ADCC dépendante des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* est inhibée par des Ac dirigés contre la chaîne α de Mac-1, les sélectines E et L, et le déterminant (s)Lewis^x

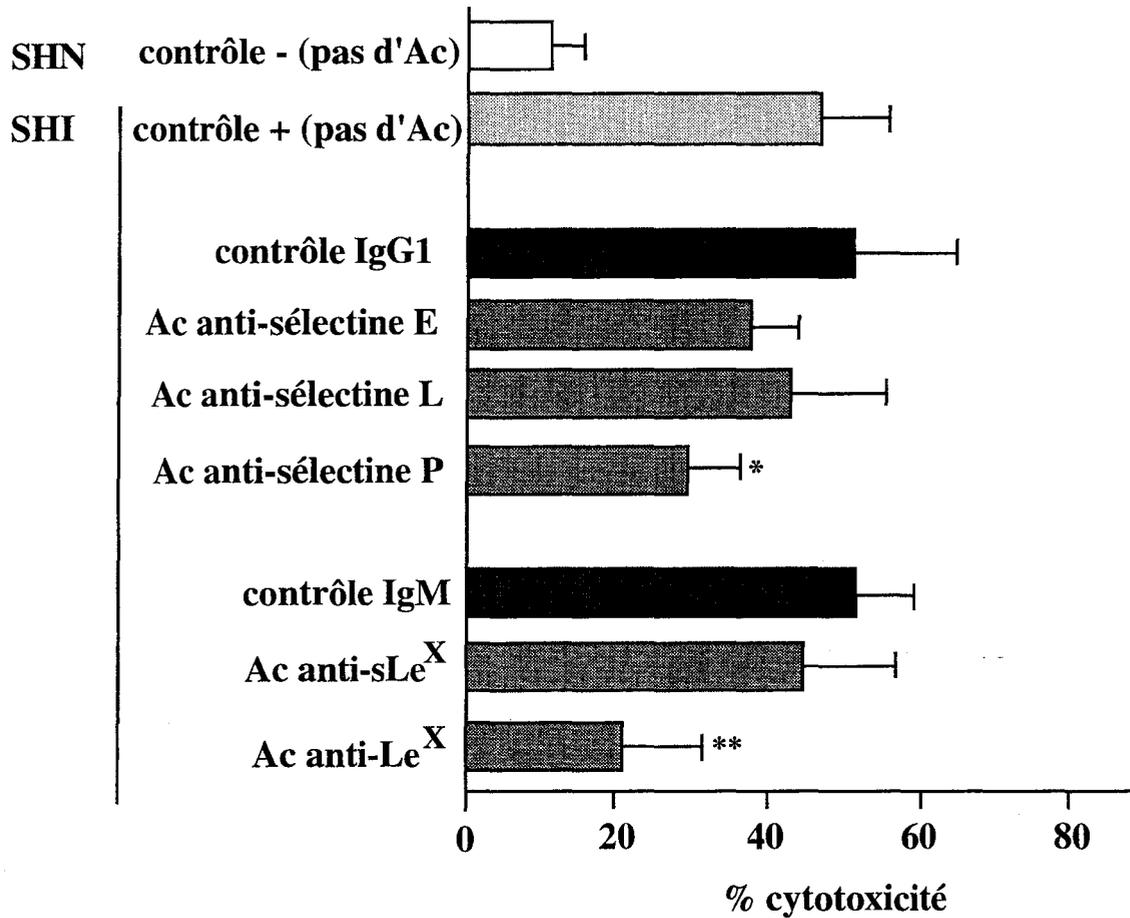
Les premières expériences ont été réalisées en incubant ensemble, les éosinophiles, les schistosomules et les différents Ac dirigés contre les molécules d'adhérence.

Nous avons, dans un premier temps, confirmé qu'un Ac dirigé contre la chaîne α de Mac-1 (CD11b) inhibe de façon significative la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des schistosomules de *Schistosoma mansoni* et ceci à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. En revanche, aucune inhibition de la cytotoxicité n'est obtenue en présence d'un Ac anti-chaîne α de LFA-1 (CD11a), alors que la chaîne β (CD18) de Mac-1 et LFA-1 est commune (Capron et al, 1987).

Dans le but d'identifier d'autres molécules d'adhérence potentiellement impliquées dans ce phénomène, des expériences d'inhibition de cytotoxicité ont été réalisées en présence de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'Ac dirigés contre les différentes molécules d'adhérence présentes à la surface des éosinophiles (VLA-4, sélectine L, Le^x et sLe^x) ou contre certains de leurs ligands (VCAM-1, Le^x et sLe^x, sélectines E, P et L, respectivement). Comme le montre la Figure 19, on observe une réduction significative de la cytotoxicité en présence des anticorps anti-Le^x (91 ± 5 % d'inhibition), anti-sLe^x (46 ± 5 % d'inhibition), anti-sélectine L (63 ± 7 % d'inhibition), et anti-sélectine E (40 ± 5 % d'inhibition). De façon intéressante, aucune diminution de l'adhérence des éosinophiles aux schistosomules n'a été observée en présence de ces différents Ac, suggérant

Figure 20 Effet du prétraitement des schistosomules avec les Ac anti-molécules d'adhérence sur l'ADCC.

Les barres correspondent aux moyennes des % de cytotoxicité \pm SD, obtenus pour 6 expériences indépendantes, réalisées en duplicate.
La significativité de l'inhibition, par rapport aux contrôles isotypiques respectifs est indiquée: *, $p < 0,05$ et **, $p < 0,005$



que, outre leur rôle primordial dans l'adhésion, ces molécules auraient un rôle dans l'expression de la fonction effectrice des éosinophiles. En revanche, nous n'observons pas de réduction de la mortalité parasitaire en présence des autres Ac testés (anti-VLA-4, anti-ICAM-1, anti-VCAM-1 et anti-sélectine P), ni en présence des contrôles isotypiques respectifs.

Ces premières expériences indiquent qu'en plus de la molécule Mac-1, les **sélectines et leurs ligands carbohydrates Le^x et sLe^x** joueraient un rôle important dans l'ADCC des éosinophiles vis-à-vis des schistosomules de *Schistosoma mansoni*.

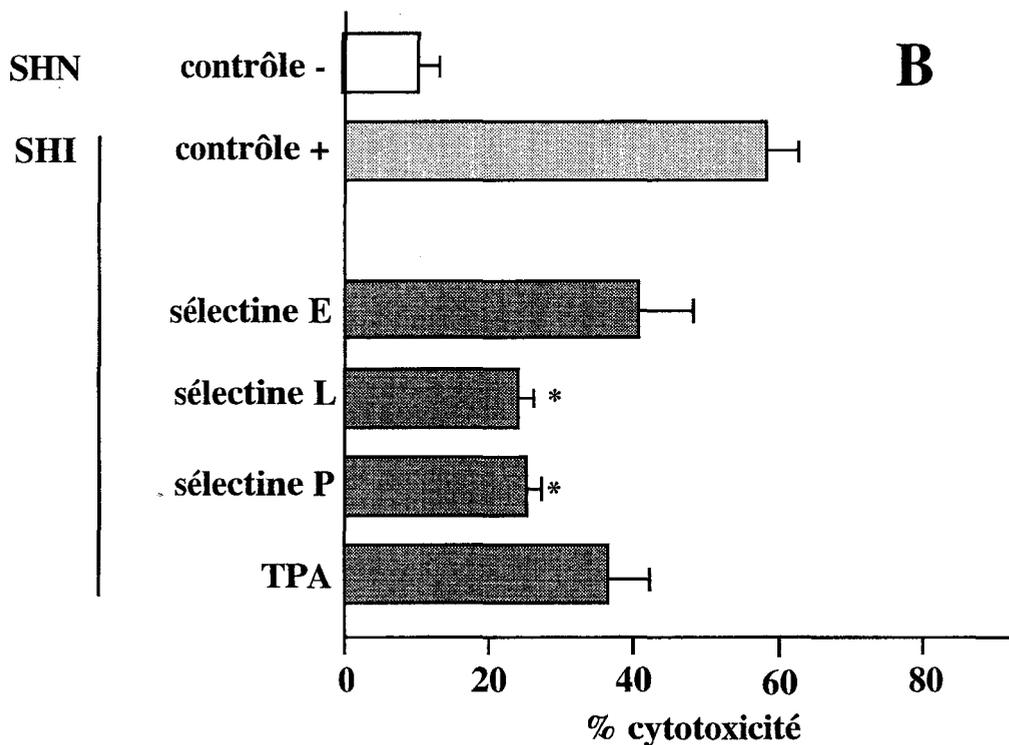
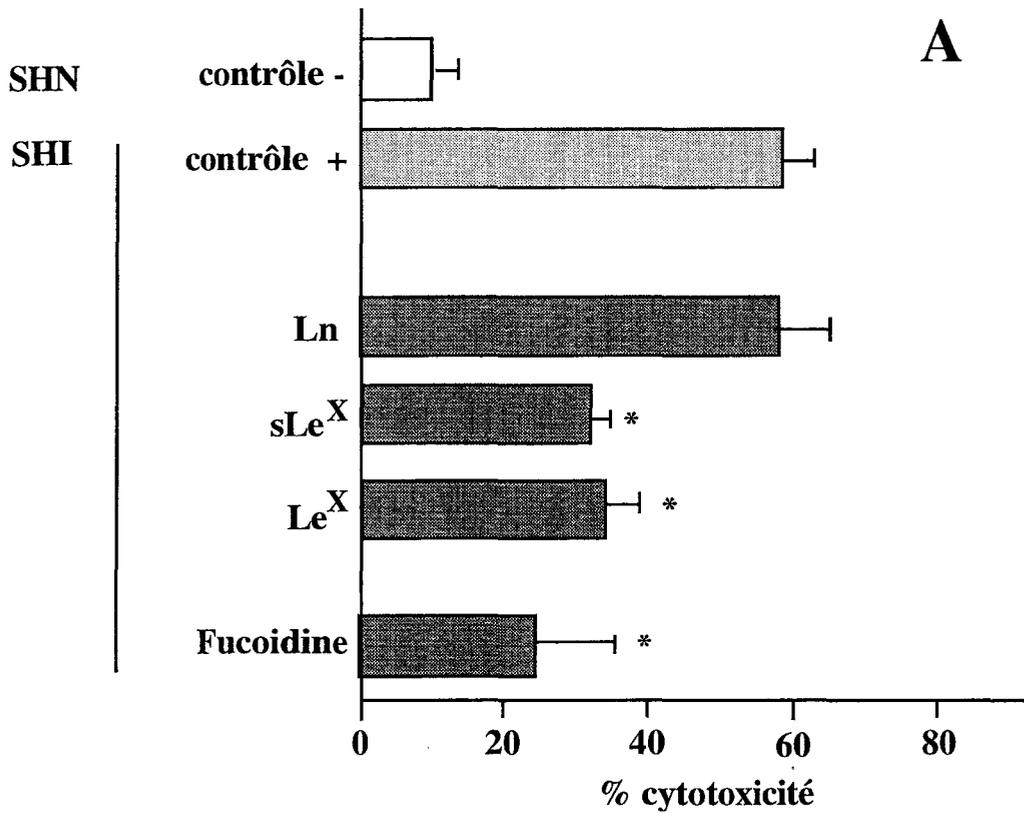
2- L'incubation des schistosomules avec des anticorps dirigés contre les sélectine E et P et contre le déterminant Le^x inhibent l'ADCC

L'implication des sélectines et de leurs ligands (s)Le^x dans l'ADCC dépendante des éosinophiles suggère la présence de molécules d'adhérence sur le schistosome, contre-récepteurs des molécules présentes sur les éosinophiles. Nous avons vérifié cette hypothèse en réalisant des expériences d'inhibition de la cytotoxicité par préincubation des schistosomules avec les anticorps dirigés contre les molécules d'adhérence impliquées dans la cytotoxicité. Dans ce cas, les schistosomules sont incubés avec les anticorps puis lavés avant d'être mis en contact avec les cellules effectrices et le sérum de patient bilharzien.

La Figure 20 montre que, par rapport aux témoins isotypiques respectifs, la mortalité des schistosomules est significativement réduite lorsque les parasites sont préincubés avec des anticorps dirigés contre le déterminant Le^x (60 ± 7 % d'inhibition) et de façon moindre contre la sélectine P (40 ± 4 % d'inhibition). Ce résultat suggère l'expression par le schistosome du déterminant Le^x ainsi que d'une molécule présentant des réactions croisées avec la sélectine P. L'anti-sLe^x, en revanche, n'a pas d'effet inhibiteur lorsqu'il est préincubé avec les parasites, confirmant l'absence d'acide sialique chez le schistosome (Nyame et al, 1988). L'absence d'inhibition observée avec l'Ac anti-sélectine L dans ces expériences de présensibilisation des parasites contraste avec le résultat obtenu lorsque ce même Ac est incubé avec les cellules et les

Figure 21 : Effet d'oligosaccharides monovalents et de mucines (A) ou de lectines (B) sur l'ADCC

Les résultats sont exprimés en % moyen de mortalité parasitaire \pm SD de 5 expériences indépendantes, effectuées en duplicate.
La significativité de l'inhibition, par rapport au contrôle SHI seul est indiquée: *, $p < 0,05$



parasites en même temps. Cela peut s'expliquer par le fait que le site de liaison de cet Ac anti-sélectine L n'est présent qu'à la surface des éosinophiles et n'est pas exprimé par les schistosomules.

Ces résultats suggèrent d'une part, de façon intéressante, la **présence de molécules d'adhérence** (Le^x et motif(s) reconnu(s) par des Ac anti-sélectine humaine) **sur le parasite**. D'autre part, ils permettent d'émettre l'hypothèse de la nécessité d'une double interaction sélectine / carbohydrate, en plus de la liaison cellule / parasite assurée par le complexe Ac/FcR, pour l'expression de la fonction cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni*.

3- L'ADCC dépendante des éosinophiles est inhibée par les sélectines L et P recombinantes et par des ligands solubles des sélectines

La participation des interactions sélectine / carbohydrate dans les mécanismes de cytotoxicité a ensuite été testée en utilisant des ligands solubles de ces molécules en tant que compétiteurs.

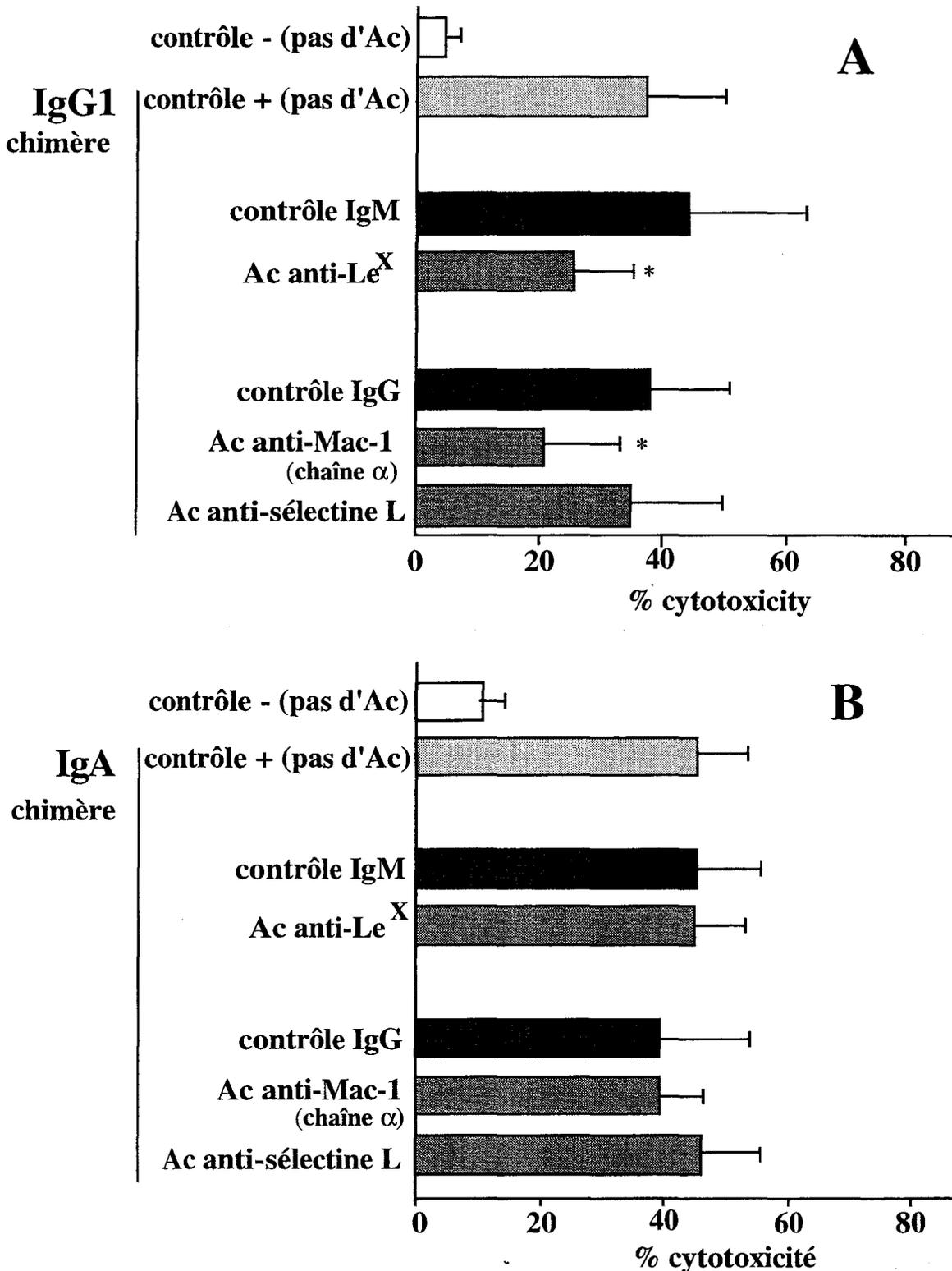
L'addition de Le^x et de sLe^x inhibe significativement la cytotoxicité de $57 \pm 2 \%$ et de $51 \pm 4 \%$, respectivement (Figure 21A) alors que le N-Acetyl-lactosamine (Ln) utilisé à la même concentration en tant que contrôle négatif ne modifie pas la mortalité des schistosomules de façon significative. De plus, la fucoïdine, puissant inhibiteur des interactions sélectine / carbohydrate (Nasu et al, 1997) diminue également fortement la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni* ($64 \pm 10\%$ d'inhibition).

De façon similaire, la Figure 21B montre une inhibition significative de la cytotoxicité en présence des sélectines L et P solubles ($63 \pm 5 \%$ et $58 \pm 5 \%$ d'inhibition, respectivement). En revanche, ni la sélectine E recombinante, ni la lectine TPA (qui interagit avec les résidus

Figure 22 : Effet des Ac anti-molécules d'adhérence sur l'ADCC IgG1(A) et IgA (B) - dépendante des éosinophiles humains vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*

Les résultats correspondent à la moyenne des % de cytotoxicité \pm SD de 4 expériences indépendantes, réalisées en duplicate.

La significativité de l'inhibition, par rapport aux contrôles isotypiques, est indiquée: *, $p < 0,05$



fucosyl), utilisée comme contrôle négatif, n'ont d'effet sur la fonction effectrice des éosinophiles contre les parasites.

4- Les interactions sélectine/carbohydate sont impliquées dans la cytotoxicité dépendante des IgG1 mais pas des IgA

L'ADCC dépendante des éosinophiles fait intervenir différents isotypes d'Ac : les IgA, les IgG et les IgE. Afin de comprendre plus précisément les voies d'activation impliquant différents récepteurs aux Ig (FcR) et menant au phénomène de cytotoxicité, nous avons entrepris l'étude des interactions sélectine / carbohydate dans un modèle d'ADCC ne faisant intervenir qu'un seul isotype d'anticorps (les expériences décrites précédemment étaient réalisées avec du sérum polyclonal de patient bilharzien).

Pour cela, nous avons utilisé des Ac chimères, portant différents isotypes de Fc humain et spécifiques de l'haptène NIP, que nous avons incubés avec les éosinophiles et les schistosomules artificiellement recouverts de NIP.

Alors qu'ils peuvent se lier aux parasites recouverts de NIP (vérifié par immunofluorescence), les IgE chimères n'induisent pas de mortalité des parasites. Ce résultat peut s'expliquer par une faible expression des récepteurs aux IgE à la surface des éosinophiles utilisés (non enrichis en éosinophiles hypodenses) et/ou par une affinité moindre de ces Ac chimères monoclonaux par rapport aux Ac polyclonaux utilisés classiquement dans les tests de cytotoxicité. De plus, une étude antérieure a montré que les Ac monoclonaux d'isotype IgE nécessitent la présence de facteurs additionnels tels que le complément pour induire la cytotoxicité en présence d'éosinophiles humains (Verwaerde et al, 1979).

En revanche, une cytotoxicité a été obtenue de façon dose-dépendante en présence des Ac chimères d'isotypes IgA et IgG1. Trente $\mu\text{g/ml}$ d' IgA chimère ou d'IgG1 chimère induisent une cytotoxicité significative de $46 \pm 9 \%$ et $37 \pm 14 \%$, respectivement (Figure 22).

De façon intéressante, on montre que les Ac anti-chaîne α de Mac-1 et anti-Le^x diminuent significativement la mortalité des larves parasitaires dans le cas de la cytotoxicité IgG1 dépendante ($46 \pm 5 \%$ et $51 \pm 8 \%$ d'inhibition, respectivement) (Figure 22A). En revanche, aucun des Ac testés n'inhibe la cytotoxicité dépendante des IgA (Figure 22B).

Ces expériences suggèrent que la **nécessité de molécules d'adhérence en tant que « co-récepteurs »** pour l'induction d'une ADCC dépendante des éosinophiles **varie selon le FcR engagé.**

5- Les Ac dirigés contre le déterminant Le^x et contre la chaîne α du CD11b inhibent la libération d'ECP par les éosinophiles

Les récepteurs aux Ig participent directement à la fonction effectrice des éosinophiles contre les larves parasitaires. L'hypothèse d'une libération sélective des protéines granulaires des éosinophiles selon le type de stimulation a déjà été rapportée (Khalife et al, 1986; Abu-Ghazaleh et al, 1989; Tomassini et al, 1991). On sait, de plus, que les éosinophiles stimulés via Fc α R ou Fc γ RII relarguent de l'ECP (eosinophil cationic protein), la protéine majeure impliquée dans la destruction des larves parasitaires (McLaren et al, 1981).

Dans le but d'expliquer les différences d'inhibition obtenues par les Ac anti-molécules d'adhérence sur l'ADCC IgA- et IgG1-dépendantes, nous avons testé l'effet de ces Ac sur la libération d'ECP par des éosinophiles stimulés via Fc α R ou via Fc γ RII. La libération d'ECP est évalué après pontage de l'un ou l'autre de ces récepteurs en présence ou non des Ac potentiellement inhibiteurs. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau VII. On voit que les Ac anti-Le^x et anti-chaîne α de Mac-1 inhibent de façon significative la libération d'ECP par les éosinophiles stimulés via Fc γ RII (33% et 42 % d'inhibition, respectivement). En revanche, aucun des Ac testés n'inhibe la libération d'ECP lorsque les éosinophiles sont

stimulés via Fc α R. L'utilisation de contrôles isotypiques n'a pas d'effet sur la libération d'ECP ni dans l'une ni dans l'autre des stimulations effectuées.

Tableau VII : Rôle inhibiteur des Ac dirigés contre Le^x et CD11b sur la libération d'ECP par des éosinophiles stimulés via Fc γ RII

stimulation ^{a)}	+ anti-Le ^x	+ anti-Mac-1 chaîne α	+ anti-sélectine L
anti-Fc γ RII	0.67 \pm 0.25 ^{b) *}	0.58 \pm 0.29 *	1.09 \pm 0.79
anti-Fc α R	1.06 \pm 0.119	0.97 \pm 0.33	1.06 \pm 0.30

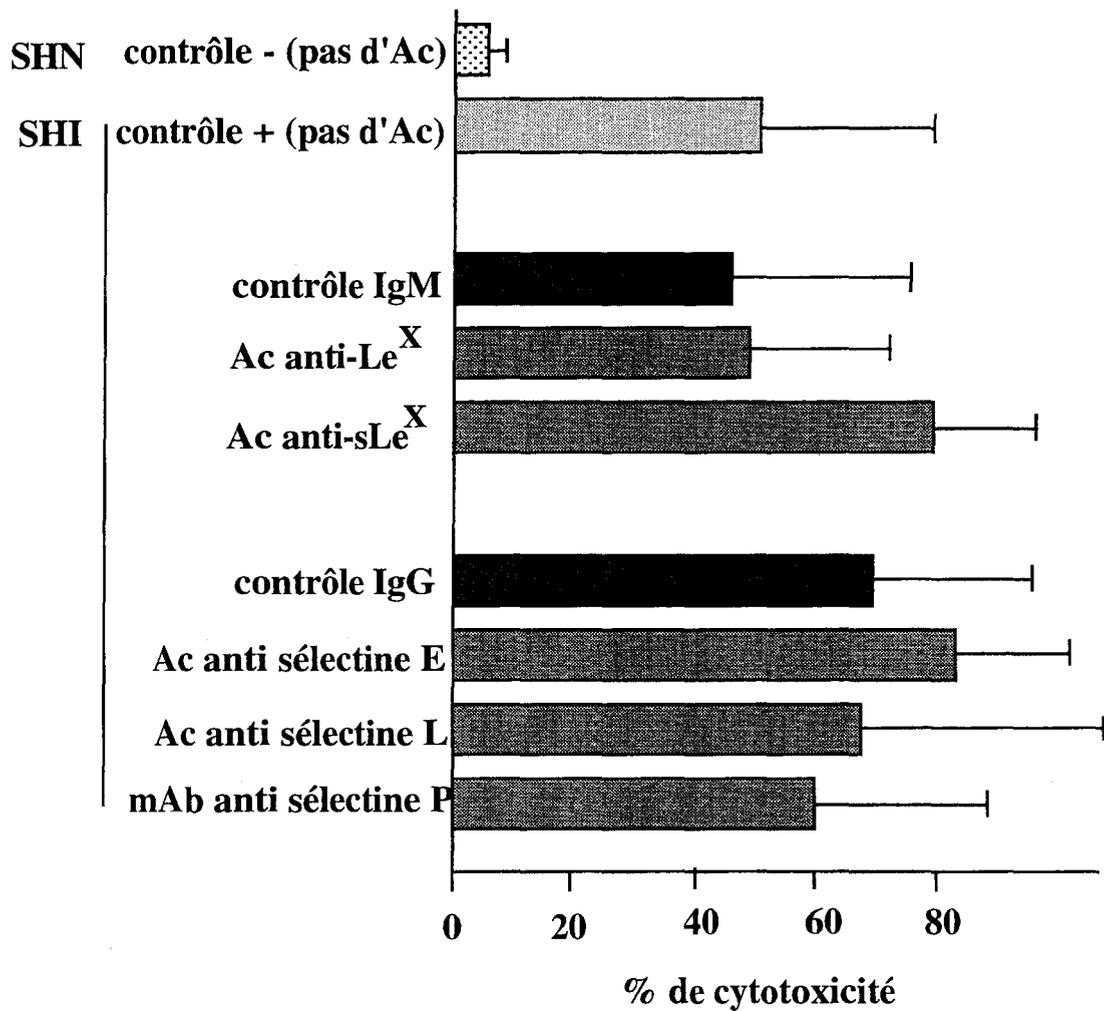
a) Par addition d'Ac anti-Fc γ RII ou anti-Fc α R pontés avec un Ac secondaire (F(ab')₂ anti- IgG de souris)

b) Les résultats sont exprimés en index d'ECP relargué, calculé par la formule suivante: index= ECP ng/ml (éosinophiles + stimulus + Ac) / ECP ng/ml (éosinophiles + stimulus). Un index <1 correspond à un effet inhibiteur de l'Ac sur le relargage d'ECP. Les chiffres correspondent à la moyenne des index \pm SD, calculés à partir de 3 expériences indépendantes. L'inhibition du relargage d'ECP est significative quand p<0.05 (*).

Ces résultats sont en accord avec le fait que les Ac d'isotype IgA semblent être le stimulus le plus puissant pour la dégranulation des éosinophiles et ne semblent pas nécessiter de molécules stimulatrices additionnelles, contrairement à la stimulation via Fc γ RII (Tomassini et al, 1991). Cela pourrait expliquer, au moins en partie la différence d'inhibition par les Ac dirigés contre les molécules d'adhérence de l'ADCC IgG1-dépendante par rapport à l'ADCC IgA-dépendante.

Figure 23 : Les Ac dirigés contre les sélectines et contre leurs ligands (s)Le^X n'inhibent pas la cytotoxicité dépendante des plaquettes humaines vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*

Les résultats correspondent aux moyennes des % de mortalité parasitaire ± SD de 6 expériences indépendantes, effectuées en duplicate.



6- Les interactions sélectine/carbohydate ne sont pas impliquées dans la cytotoxicité dépendante des plaquettes

Une des particularités de la cytotoxicité dépendante des plaquettes est que ces dernières n'ont pas besoin d'adhérer aux parasites pour exercer leur fonction cytotoxique (Joseph et al, 1985). De plus, les plaquettes ne sont cytotoxiques qu'en présence d'IgE. Aucun des Ac testés, particulièrement ceux qui inhibaient l'ADCC dépendante des éosinophiles, n'est capable de réduire la mortalité des parasites en présence de plaquettes et de sérum immun (Figure 23). Il a cependant été montré que des Ac dirigés contre une glycoprotéine de membrane des plaquettes, GP IIb-IIIa, inhibaient la liaison des IgE aux plaquettes et par conséquent la cytotoxicité induite (Ameisen et al, 1986).

Les mécanismes d'activation cellulaire permettant la fonction cytotoxique des éosinophiles et des plaquettes semblent donc différents. Les interactions sélectine/Le^x, ainsi que la molécule Mac-1, joueraient un rôle crucial dans l'activation et la libération de médiateurs cytotoxiques qui en résultent par les éosinophiles. Les plaquettes semblent en revanche nécessiter l'expression de la molécule GP IIb-IIIa pour exprimer leur fonction cytotoxique.

Conclusion

Nous avons montré qu'en plus des récepteurs aux Igs, des molécules d'adhérence, appartenant aux familles des sélectines et des carbohydates, participent à l'ADCC médiée par les éosinophiles humains, mais pas par les plaquettes, vis-à-vis des schistosomules de *Schistosoma mansoni*. Comme le montre la Figure 24, une double interaction sélectine / (s)Le^x renforcerait le pontage entre la cellule effectrice et sa cible parasitaire, impliquant la présence de telles molécules à la surface du parasite. Dans ce modèle d'étude, les molécules d'adhérence

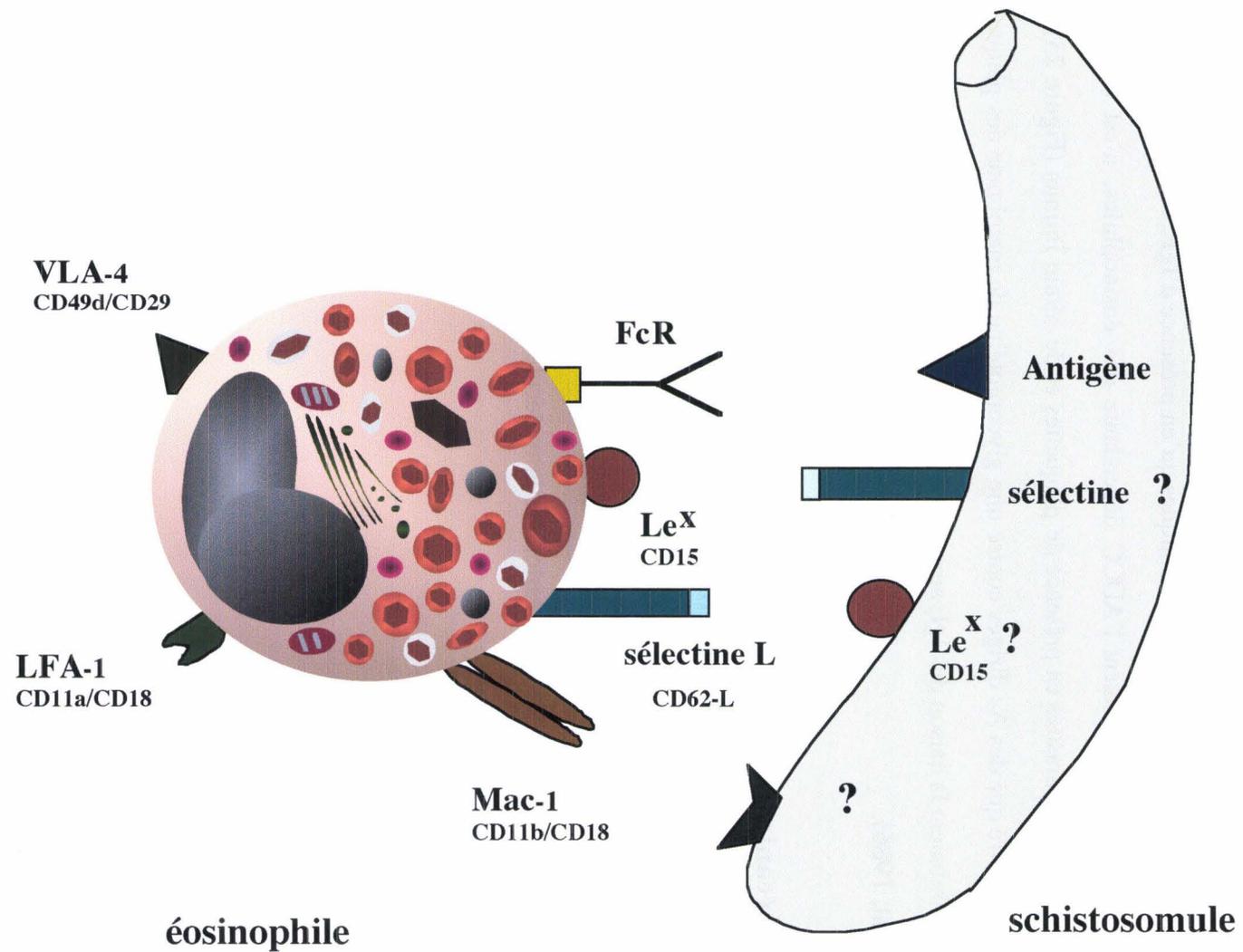


Figure 24 : Schéma hypothétique de l'interaction éosinophile / schistosome au cours de l'ADCC

semblent donc jouer un rôle, en plus de leur fonction adhésive, dans l'activation des éosinophiles. Quelques travaux indiquent en effet, que des structures présentant du (s)Le^x et la sélectine L des leucocytes pourraient agir au niveau de la transduction du signal (Waddel et al, 1995; Putz and Männel, 1996; Lo et al, 1997).

Les sélectines, qui reconnaissent des dérivés sulfatés ou sialylés des tétrasaccharides Le^x et Le^a jouent un rôle essentiel dans le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire, première étape du recrutement des monocytes du sang vers les sites inflammatoires ou vers les organes lymphoïdes secondaires (Carlos and Harlan, 1994). Nos travaux suggèrent donc une nouvelle fonction des interactions sélectine / Le^x : leur implication dans la phase effectrice de la réponse immune. De plus, les éosinophiles étant également impliqués dans l'induction des lésions des tissus lors de certains états pathologiques tels que l'allergie ou l'inflammation, il serait intéressant d'étudier la contribution de ces interactions dans ces phénomènes.

Résultat 3

***Expression du déterminant Le^x et de molécule(s)
de la famille des sélectines par le schistosome***

Résultat 3

Expression du déterminant Le^X et de molécule(s) de la famille des sélectines par le schistosome

Introduction

La présence de molécules d'adhérence à la surface des éosinophiles ainsi que l'inhibition de la cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* par des Ac dirigés contre certaines molécules d'adhérence, laissent supposer la présence de contre-récepteurs sur les schistosomules.

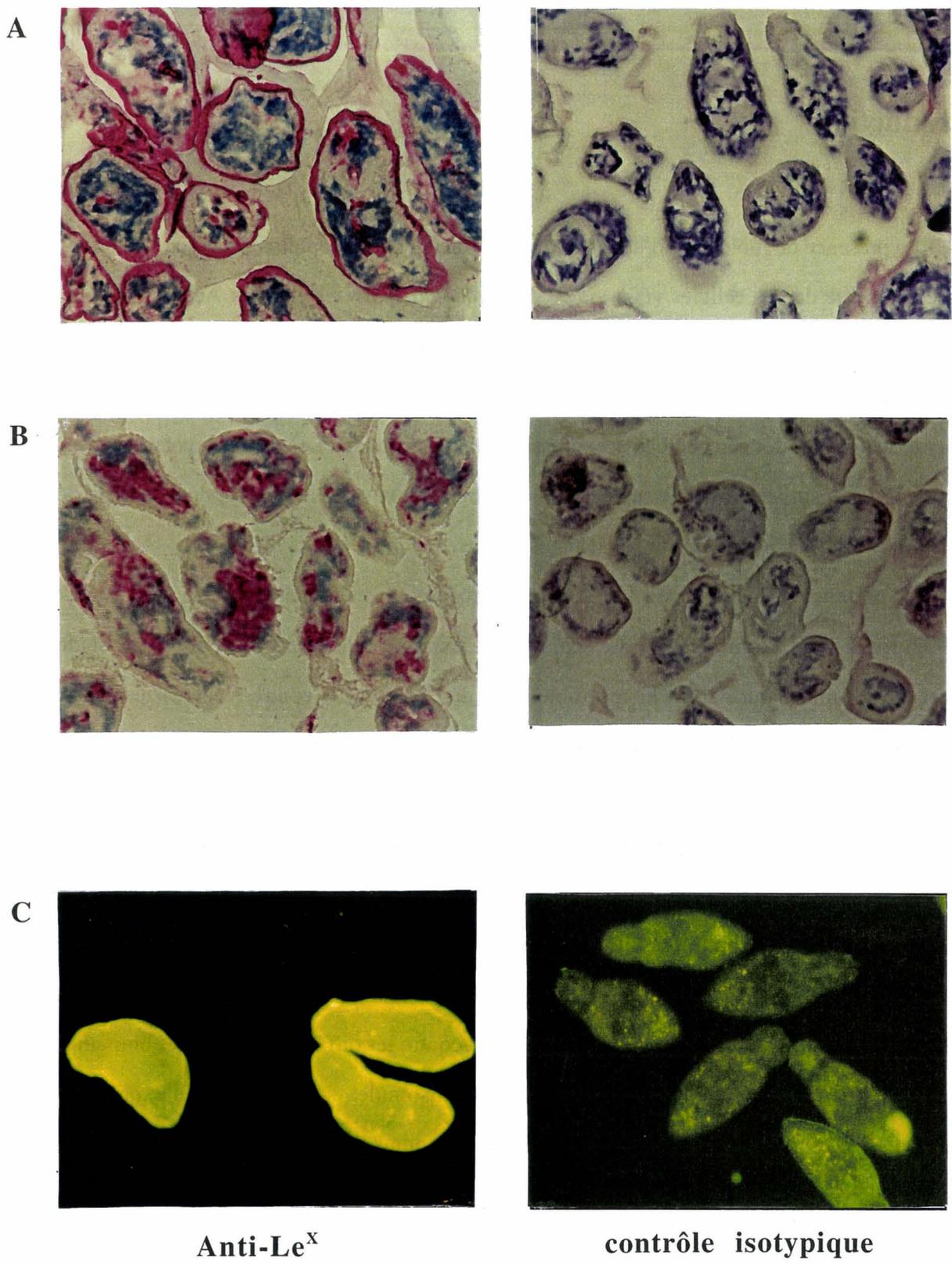
Nous avons donc recherché l'expression du déterminant Le^X (ligand potentiel de la sélectine L des éosinophiles) et de molécules homologues aux sélectines (ligands potentiels des motifs (s)Le^X des éosinophiles) sur les schistosomules.

La présence du déterminant Le^X sur le schistosome avait déjà été montrée (Srivastan et al, 1992; Köster and Strand, 1994). Le schistosome exprime cette molécule à différents stades larvaires et notamment au stade schistosomule, cible de l'ADCC. Le contre-récepteur parasitaire du déterminant s(Le^X) de l'éosinophile n'a en revanche pas été identifié.

De façon à étudier la présence de telles molécules sur le schistosome, nous avons entrepris des expériences d'immunomarquage enzymatique sur des coupes de schistosomules peau et mécaniques et d'immunofluorescence sur des schistosomules peau et mécaniques entiers. Nous avons également utilisé une méthode immunoenzymatique sur des extraits parasitaires avec des anticorps dirigés contre le Le^X et contre les différentes sélectines humaines.

Les résultats obtenus montrent que les schistosomules sont capables d'exprimer le déterminant Le^X ainsi qu'une ou plusieurs molécules reconnue(s) par un anticorps anti-sélectine E humaine.

Figure 25 : Marquage des schistosomules avec l'Ac anti-Le^x.
A- Immunomarquage enzymatique sur coupes de schistosomules peau
B- Immunomarquage enzymatique sur coupes de schistosomules mécaniques
C- Immunofluorescence sur schistosomules entiers
agrandissement: x 200



Résultats et discussion

De façon à visualiser les molécules parasitaires reconnues par les Ac inhibant l'ADCC, des expériences de marquage des schistosomules ont été réalisées soit sur des coupes de schistosomules (Figures 25 et 26, A et B) soit sur des schistosomules entiers (Figures 25 et 26, C).

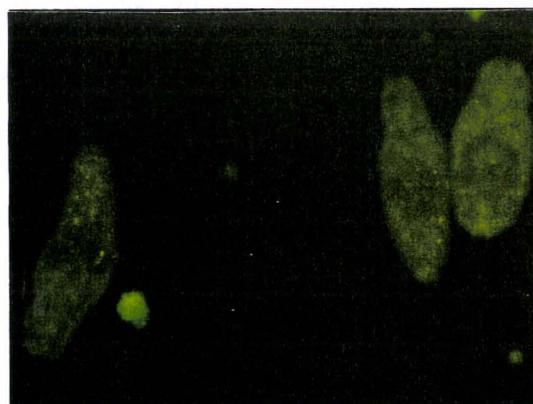
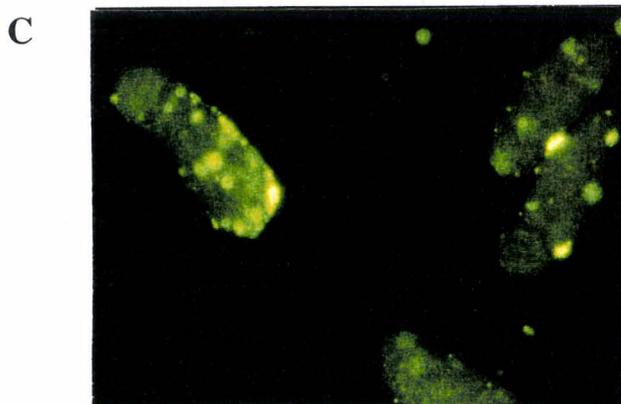
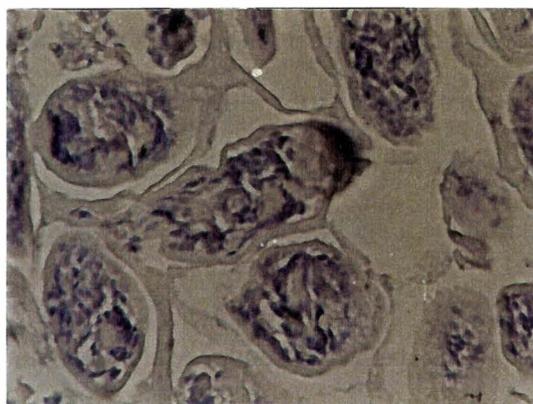
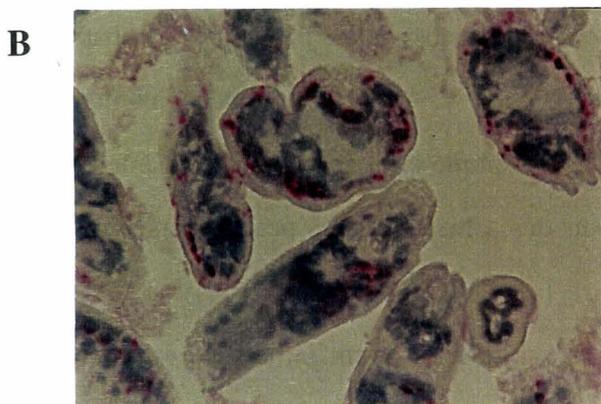
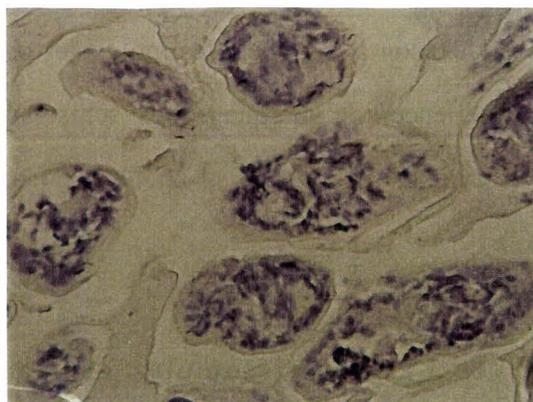
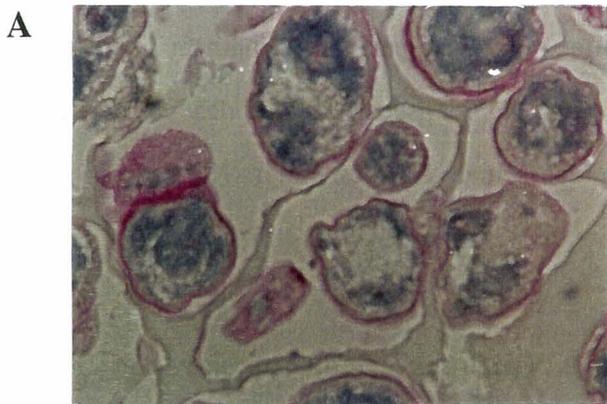
1- Les schistosomules expriment des épitopes reconnus par des Ac anti-Le^x

Un marquage intense a été observé à la surface des schistosomules peau après incubation des coupes de schistosomules avec des Ac anti-Le^x (Figure 25A), alors qu'aucun marquage n'est obtenu avec des Ac anti-sLe^x, ni avec le contrôle isotypique correspondant. Le même type de marquage a été obtenu en immunofluorescence sur des schistosomules peau entiers (Figure 25C).

L'incubation de coupes de schistosomules mécaniques (n'ayant jamais été en contact avec l'hôte) avec les Ac anti-Le^x révèle également un marquage (Figure 25B), excluant l'hypothèse d'une capture des antigènes de l'hôte par le schistosome mais suggérant au contraire la synthèse du déterminant Le^x par le parasite. De plus, la localisation du marquage obtenu sur les schistosomules mécaniques est différente de celle obtenue sur les schistosomules peau. Les molécules reconnues par cet Ac sont en effet localisées préférentiellement en « patch » (Figure 25B) sous la membrane et non pas en surface. Il semble donc que l'induction de l'expression du déterminant Le^x à la membrane des schistosomules peau ait lieu lors du passage transcutané des cercaires.

L'expression du déterminant Le^x a également été montrée en utilisant une autre technique de marquage: la technique ELISA. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau VIII.

Figure 26 : Marquage des schistosomules avec l'Ac anti-sélectine E.
 A- Immunomarquage enzymatique sur coupes de schistosomules peau
 B- Immunomarquage enzymatique sur coupes de schistosomules mécaniques
 C- Immunofluorescence sur schistosomules entiers
 agrandissement : x 200



Anti-sélectine E

contrôle isotypique

Ces résultats confirment la **présence du déterminant Le^X sur les schistosomules** de *Schistosoma manoni*, et suggèrent un **mécanisme d'induction membranaire de son expression lors du passage transcutané**.

2- Les schistosomules expriment des épitopes reconnus par des Ac anti-sélectines humaines

Comme le montre la Figure 26A, les schistosomules peau présentent un marquage membranaire avec un Ac anti-sélectine E. Alors qu'un marquage plus faible est obtenu avec un Ac anti-sélectine P, aucun marquage n'a été obtenu lorsque les coupes sont incubées avec des Ac anti-sélectine L ou avec le contrôle isotypique correspondant. Ces résultats ont été confirmés par la technique d'immunofluorescence sur des schistosomules peau entiers (Figure 26C). L'expression des molécules reconnues par l'Ac anti-sélectine E est localisée sous la membrane des schistosomules mécaniques (Figure 26B), suggérant le synthèse de telles molécules par le parasite.

La technique ELISA nous a permis de confirmer la présence de molécules reconnues par l'Ac anti-sélectine E chez les schistosomules (Tableau VIII).

L'ensemble de ces résultats indiquent la **présence sur les schistosomules d'une ou plusieurs molécule(s) présentant des réactions croisées avec les sélectines humaines**, que l'on appellera « selectine-like ».

Figure 27 : Liaison de la sélectine P aux schistosomules (A) et aux éosinophiles humains (B)
agrandissement : x 200

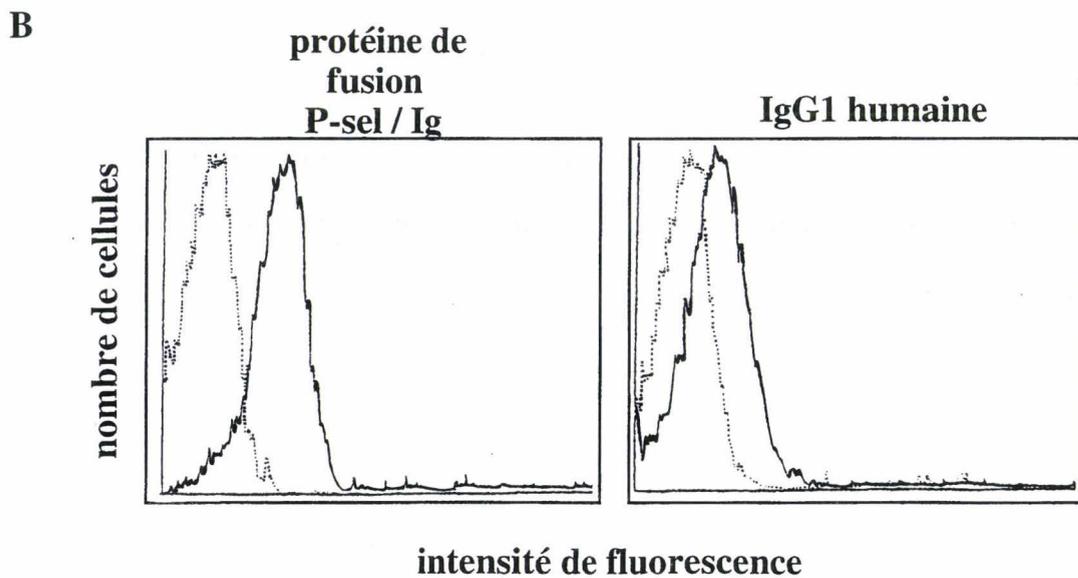
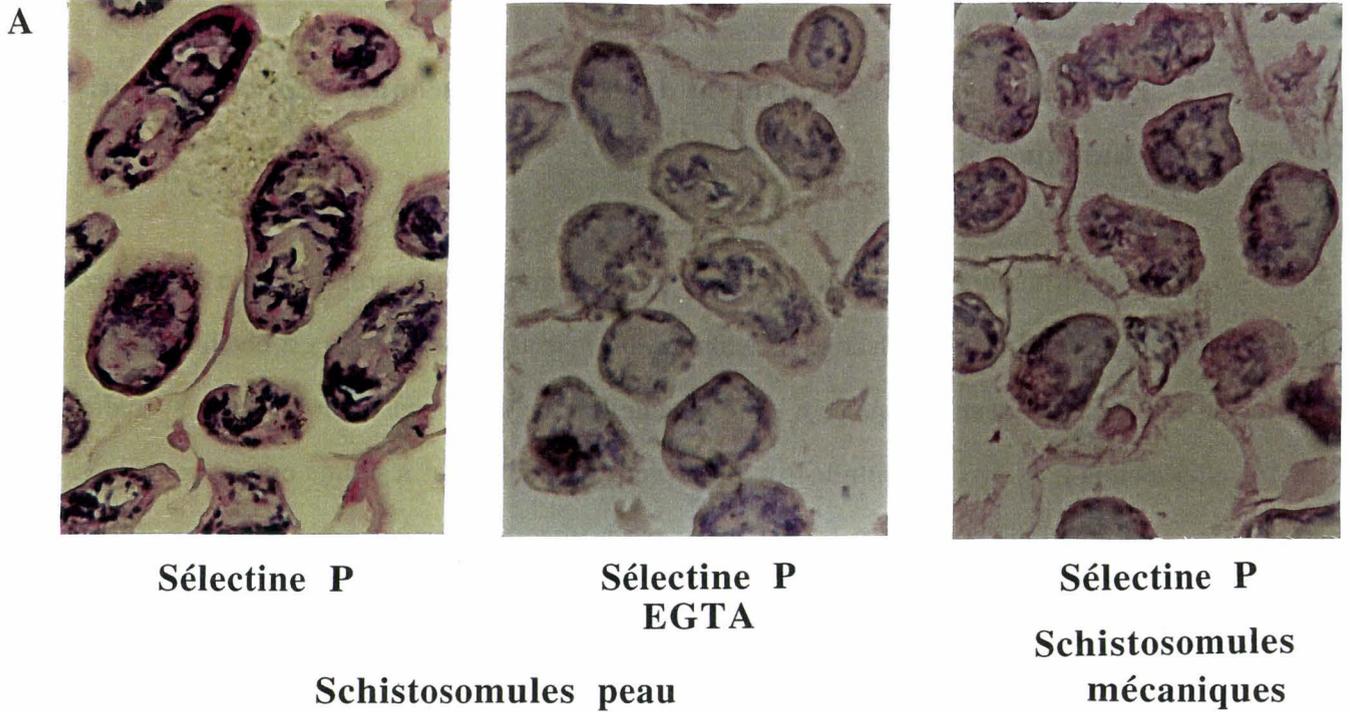


Tableau VIII : Expression par les schistosomules de Le^X et de « selectine-like » - Liaison à la sélectine P

Les valeurs indiquées correspondent à la densité optique obtenue.

	schistosomules peau	schistosomules mécaniques
Ac anti-Le^X	0,569 ± 0,03	0,792 ± 0,025
Témoin isotypique (IgM)	0,232 ± 0,02	0,253 ± 0,02
Ac anti-sélectine E	0,711 ± 0,007	0,482 ± 0,05
Témoin isotypique IgG	0,07 ± 0,02	0,074 ± 0,01
sélectine P	0,851 ± 0,14	0,757 ± 0,3
Témoin : IgG1 humaine	0,15 ± 0,06	0,076 ± 0,03
sélectine P + EGTA	0,424 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Témoin : IgG1 humaine + EGTA	0,1 ± 0,02	0,09 ± 0,05

3- La sélectine P se lie aux éosinophiles et aux schistosomules

Dans le but de valider l'hypothèse selon laquelle une double interaction sélectine / carbohydrate se fait entre le schistosomule et l'éosinophile, nous avons testé la liaison d'un membre de la famille des sélectines, au schistosome d'une part et à l'éosinophile d'autre part.

a- La liaison de la sélectine P au schistosome a été montrée par immunomarquage. Un marquage des schistosomules peau a été obtenu en incubant les coupes de parasites avec de la sélectine P biotinylée (Figure 27A), alors que les sélectines E et L ne marquent le schistosomule que faiblement.

Afin de tester le caractère cation-dépendant de la liaison de la sélectine au parasite, les expériences ont été réalisées en présence de 10 mM d'EGTA. Dans ces conditions, nous observons une perte quasi-totale du marquage des schistosomules avec la sélectine, caractéristique des interactions sélectine/carbohydate (Bevilacqua and Nelson, 1993).

Le marquage obtenu avec la sélectine P biotinylée est plus faible et plus diffus que celui obtenu avec l'Ac anti-Le^x. Cela pourrait s'expliquer par une différence d'affinité de ces deux sondes utilisées vis-à-vis du schistosomule. De plus, la sélectine P pourrait se lier de façon préférentielle à un autre motif carbohydate exprimé de façon plus diffuse sur le schistosomule que motif Le^x.

La capacité de certaines molécules du schistosomule à se lier à la sélectine P a également été confirmée par la technique ELISA (Tableau VIII).

Un travail récent confirme cette hypothèse de la liaison d'une sélectine au schistosome. Il a été montré, dans un modèle murin, que la sélectine L de l'hôte pouvait traverser la paroi de l'oeuf pour aller se fixer sur des ligands carbohydrates exprimés par le miracidium, suggérant de nouveaux mécanismes immunologiques qui pourraient éventuellement expliquer la régulation négative de la réponse granulomateuse observée durant la phase aiguë de cette parasitose (El Ridi et al, 1996).

b- La liaison de la sélectine P aux éosinophiles a été montrée par cytométrie en flux. Une liaison significative de la sélectine P chimère (Psel-Ig) aux éosinophiles a été obtenue, comparativement à la liaison d'une IgG1 humaine utilisée comme contrôle (Figure 27B). Cette liaison est fortement inhibée en présence de 10 mM d'EGTA, suggérant son caractère calcium-dépendant, caractéristique des interactions médiées par les sélectines.

Ces résultats suggèrent que la « selectine-like » du parasite peut se lier aux éosinophiles et permettre l'interaction parasite/éosinophile.

Conclusion

Ces résultats indiquent que les schistosomes peuvent exprimer les molécules de surface qui sont capables d'interagir et de jouer un rôle dans l'activation des cellules effectrices de l'hôte.

Nous avons pu confirmer la présence du déterminant **Le^x** à la surface des schistosomules peau. La mise en évidence de l'expression de cette molécule sur les schistosomules mécaniques nous a permis d'avancer l'hypothèse de la **synthèse de cette molécule par le schistosome**. Le clonage d'une fucosyltransférase (Sm FUT-1) a été réalisé récemment dans le laboratoire (Trottein et al, en préparation), et confirme cette hypothèse.

D'autre part, le schistosome est capable d'exprimer à sa surface une ou plusieurs molécules « **selectin-like** » présentant des réactions croisées avec les sélectines de mammifères. Les tentatives de caractérisations moléculaire et biochimiques de cette molécule n'ont malheureusement pas encore donné de résultats convaincants.

De plus, des membres de la famille des sélectines, et en particulier la sélectine P, peut se lier à la surface du parasite et à la surface des éosinophiles, renforçant la **notion d'interactions sélectine / carbohydrate entre le parasite et les cellules de l'hôte** et l'hypothèse d'une double interaction éosinophile/schistosome au cours de l'ADCC.

Résultat 4

Régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les cellules endothéliales par Schistosoma mansoni

Résultat 4

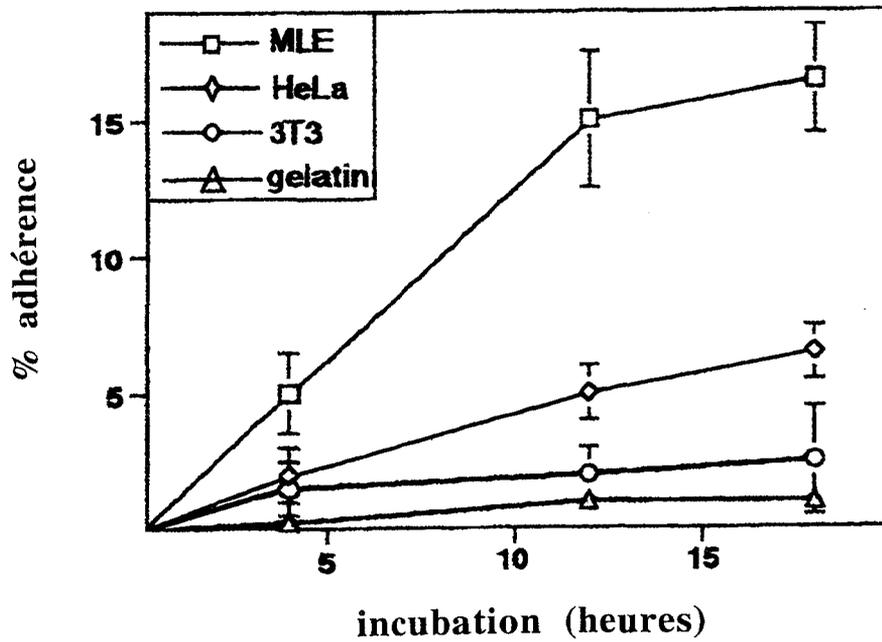
Régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les cellules endothéliales par *Schistosoma mansoni*

Introduction

Au cours de sa migration chez l'hôte définitif, le schistosome est en contact étroit avec l'endothélium vasculaire, particulièrement avec les cellules endothéliales des microvaisseaux de poumons (Mastin et al, 1985; Crabtree and Wilson, 1986a). En effet, suite aux étapes cutanées, la larve parasitaire emprunte le réseau vasculaire et atteint les poumons. Dans cet organe, le schistosomule séjourne plusieurs jours dans les capillaires pulmonaires et y déclenche une réponse inflammatoire dont l'intensité varie selon le mode et le nombre d'infestations. Chez la souris naïve (primo-infestée), la réaction inflammatoire est faible ce qui permet au parasite de migrer des poumons jusqu'au foie puis aux intestins où il termine sa maturation. Cette situation est différente chez les souris vaccinées par des cercaires irradiées (Mastin et al, 1985). Dans ce modèle, un recrutement cellulaire intense (macrophages, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes T CD4⁺ mémoire) a lieu au niveau des poumons (Coulson and Wilson, 1997). L'arrivée massive de ces cellules est à l'origine de la formation de foyers inflammatoires entraînant la rétention puis l'élimination des larves parasitaires dans les poumons (Crabtree and Wilson, 1986b). Compte-tenu de leur rôle crucial dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire, les cellules endothéliales jouent probablement un rôle important dans ces mécanismes. Activées par des cytokines inflammatoires, notamment le TNF- α , les cellules endothéliales expriment à leur surface différentes molécules d'adhérence dont la sélectine E, VCAM-1 et ICAM-1. Ces molécules interagissent avec des contre-récepteurs présents sur les cellules immunes circulantes, permettant l'adhésion et la migration des leucocytes vers les sites inflammatoires.

Figure 28 : Adhésion des schistosomules aux cellules endothéliales MLE

Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentage de schistosomules adhérents \pm SD. Cinq expériences indépendantes ont été réalisées en triplicate.



La mise en évidence de l'expression de molécules d'adhérence (« selectine-like » et Le^x) par le schistosome nous a suggéré la participation de ces molécules dans les interactions schistosome/cellule endothéliale activée. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces interactions participeraient à la rétention des parasites dans les capillaires.

D'autre part, nous avons étudié le rôle du schistosome dans l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales. Généralement, les pathogènes intravasculaires induisent une augmentation de l'expression de ces molécules sur les cellules endothéliales, participant ainsi au recrutement des leucocytes au site de l'infection (Boggemeyer et al, 1994; Schofield et al, 1996). Afin de tester cette hypothèse, des expériences de co-culture de schistosome et de cellules endothéliales de poumon ont été réalisées. Contrairement à notre hypothèse de départ, nous montrons que les schistosomules n'induisent pas l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales mais à l'inverse, ils diminuent l'expression du VCAM-1 et de la sélectine E à la surface des cellules endothéliales activées par le TNF- α . Ce stratagème pourrait représenter un nouveau mécanisme d'échappement du parasite à la réponse immune.

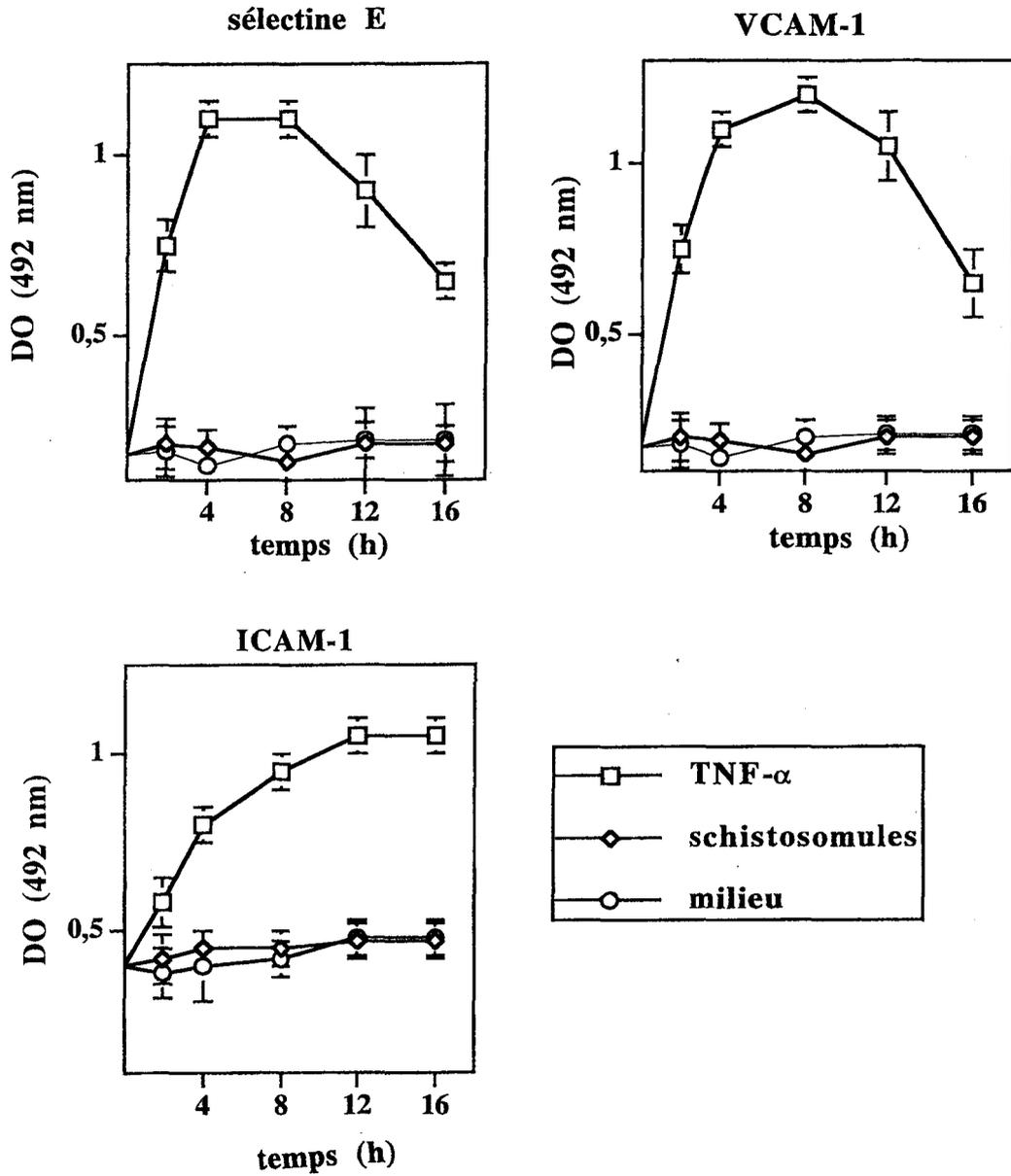
Résultats et discussion

1- Les schistosomules adhèrent aux cellules endothéliales

Dans un premier temps, nous avons testé la capacité des schistosomules à adhérer à des cellules endothéliales microvasculaires de poumons de souris (MLE). Nous avons mis en évidence que les schistosomules adhéraient spécifiquement aux cellules endothéliales. Même après 18 heures d'incubation, le pourcentage de parasites adhérant aux cellules MLE est significativement plus important que le pourcentage de parasites adhérant aux cellules contrôles 3T3 et HeLa ou au puit sans cellule (gélatine) (Figure 28).

Figure 29 : Expression de la sélectine E, de VCAM-1 et de ICAM-1 à la surface des HMVEC-1 stimulées par le TNF- α ou par des schistosomules. Analyse par Cell-ELISA.

Les barres représentent les moyennes de DO \pm SD de 5 expériences indépendantes réalisées en triplicate.



L'adhérence des schistosomes aux cellules endothéliales est accrue en conditions inflammatoires (TNF- α), suggérant la participation des molécules d'adhérence dans ce phénomène. Afin de tester l'implication des molécules d'adhérence exprimées par le parasite dans ce phénomène, des expériences d'inhibition de l'adhérence des parasites aux cellules endothéliales activées ont été réalisées en présence d'anticorps dirigés contre le déterminant Le^x et contre les sélectines. Aucune inhibition n'a été observée avec ces anticorps suggérant que l'adhérence du schistosome aux cellules endothéliales n'est pas médiée par des interactions sélectine/Le^x.

2- Les schistosomules n'induisent pas l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales non stimulées *in vitro*

Les cellules endothéliales des microvaisseaux ont un rôle important dans l'inflammation. Le contact schistosome/cellule endothéliale pourrait donc participer à l'induction de l'inflammation observée lors de l'infection. Nous avons donc testé la capacité des schistosomules à moduler l'expression des molécules d'adhérence sur des cellules endothéliales isolées à partir de microvaisseaux de poumon humain (HMVEC-1). Le TNF- α , cytokine pro-inflammatoire détectée dans les poumons de souris infestées par *Schistosoma mansoni* (Wilson et al, 1996), a été choisi comme contrôle positif d'induction de l'expression de ces molécules.

Chaque type d'endothélium ayant des propriétés particulières, nous avons dans un premier temps quantifié l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1, ICAM-1 et sélectine E, par la technique de Cell-ELISA, sur les cellules HMVEC-1 en fonction de la quantité de TNF- α utilisée pour la stimulation, ainsi qu'en fonction de la durée de la stimulation.

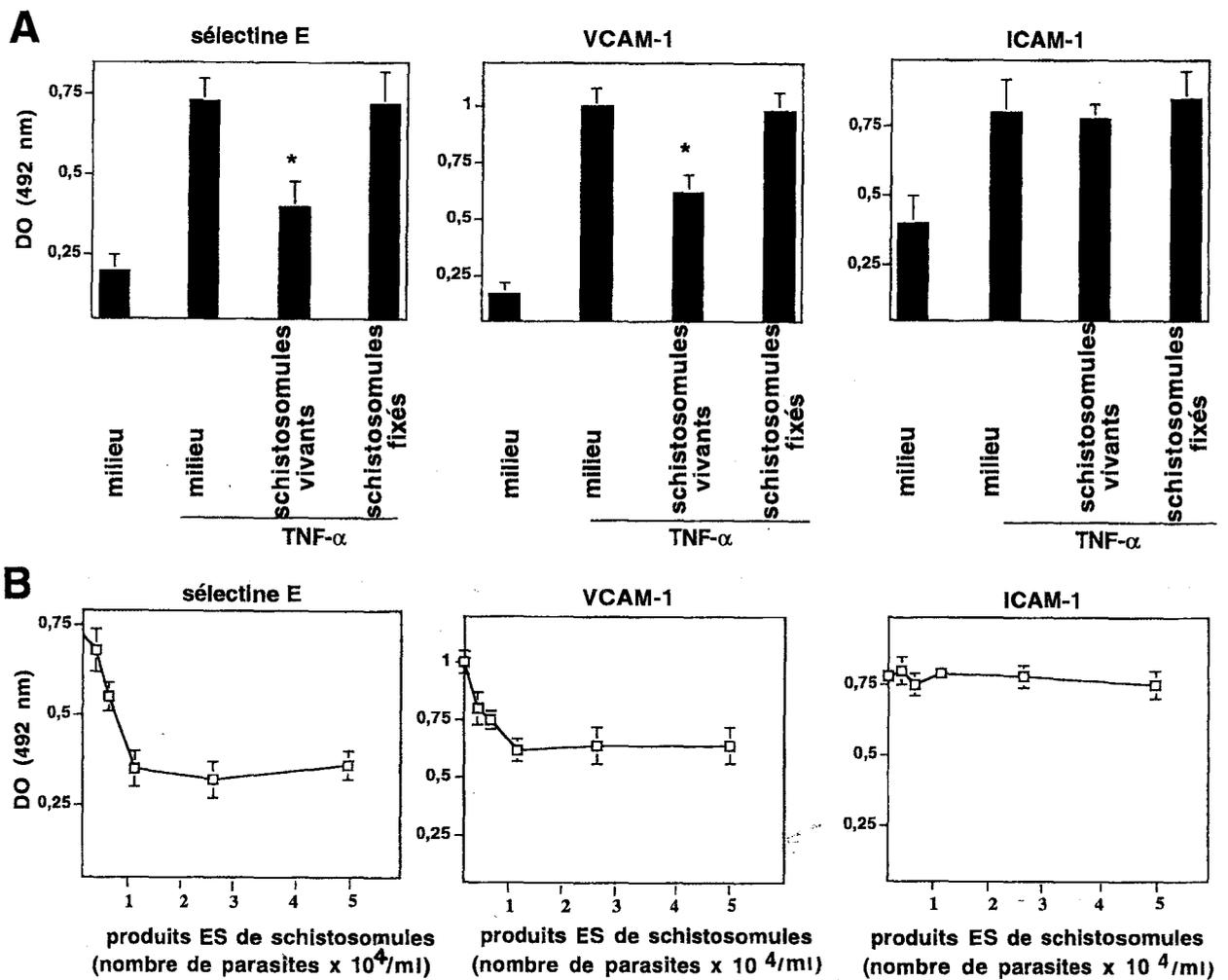
L'expression de la sélectine E augmente lorsque les HMVEC-1 sont stimulées 2 heures avec 100 U/ml de TNF- α et atteint un plateau après 4 heures de stimulation (l'expression est alors environ 5 fois supérieure à l'expression basale sur les cellules non stimulées) (Figure 29). L'expression de ICAM-1 et VCAM-1 est maximale entre 4 et 12 heures après la stimulation au

Figure 30 : Effets des schistosomes sur l'expression de la sélectine E, de VCAM-1 et de ICAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α

A- Les cellules sont prétraitées avec les schistosomes vivants ou fixés

B- Les cellules sont préincubées avec des produits ES de schistosomes

L'analyse est faite par Cell-ELISA - Les barres indiquent les valeurs moyennes de DO \pm SD de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate. *, p<0,05



TNF- α . Elle est alors 3 et 6 fois supérieure à l'expression observée sur les cellules non stimulées, respectivement (Figure 29).

En revanche, l'addition de schistosomules vivants aux HMVEC-1 n'induit l'augmentation d'aucune des 3 molécules citées précédemment (Figure 29), et ceci même après 72 heures de stimulation. Ces expériences indiquent que les schistosomules n'ont pas d'effet inflammatoire direct sur l'endothélium pulmonaire, du moins au niveau l'expression des molécules d'adhérence.

3- Les produits d'excrétion / sécrétion des schistosomules induisent une diminution de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α

Après avoir vérifié que les schistosomules n'induisaient pas l'expression de molécules d'adhérence sur les HMVEC-1, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pourraient, au contraire, exercer un contrôle négatif sur leur expression.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons préincubé les HMVEC-1 avec des schistosomules avant de les stimuler au TNF- α (100 U / ml). La Figure 30 montre que la préincubation des HMVEC-1 avec les schistosomules induit une diminution de l'expression de la sélectine E (64 ± 5 % d'inhibition) et de VCAM-1 (45 ± 4 % d'inhibition) sur les HMVEC-1 stimulées au TNF- α . Cet effet inhibiteur n'est vraisemblablement pas dû à une dégradation du TNF- α par des protéases parasitaires puisque l'induction de l'expression de ICAM-1 est maintenue dans les mêmes conditions.

Nous avons ensuite testé l'effet inhibiteur de schistosomules fixés à la glutaraldéhyde sur l'expression des molécules d'adhérence par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α . Comme on le voit sur la Figure 30, les parasites métaboliquement inactifs n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'expression de la sélectine E ni de VCAM-1, suggérant que le contact parasite/cellule endothéliale n'est pas suffisant pour induire la diminution de l'expression de ces molécules.

L'effet inhibiteur observé est donc vraisemblablement dû à la présence de molécules relarguées par le parasite.

Nous avons effectivement observé que les produits d'excrétion/sécrétion (produits ES) des schistosomules réduisaient de façon dose-dépendante l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α (Figure 30). L'hypothèse de la dégradation du TNF- α par des protéases du parasite a pu être définitivement écartée car l'effet inhibiteur est observé même lorsque les cellules sont lavées intensivement après leur incubation avec les produits ES des schistosomules et avant leur stimulation par le TNF- α .

Ces résultats ont été confirmés par une technique de cytométrie en flux quantitative (QIFIKIT). Cette technique nous permet de montrer que l'effet inhibiteur des schistosomules sur l'expression du VCAM-1 et de la sélectine E résulte à la fois d'une diminution du pourcentage de cellules positives et d'une diminution du nombre de sites antigéniques par cellule (Figure 31).

Figure 31 : Effet inhibiteur des produits ES des schistosomules sur l'expression du VCAM-1 et de sélectine E

Le tableau représente les résultats obtenus d'une expérience représentative réalisée en cytométrie en flux par la technique du QIFIKIT

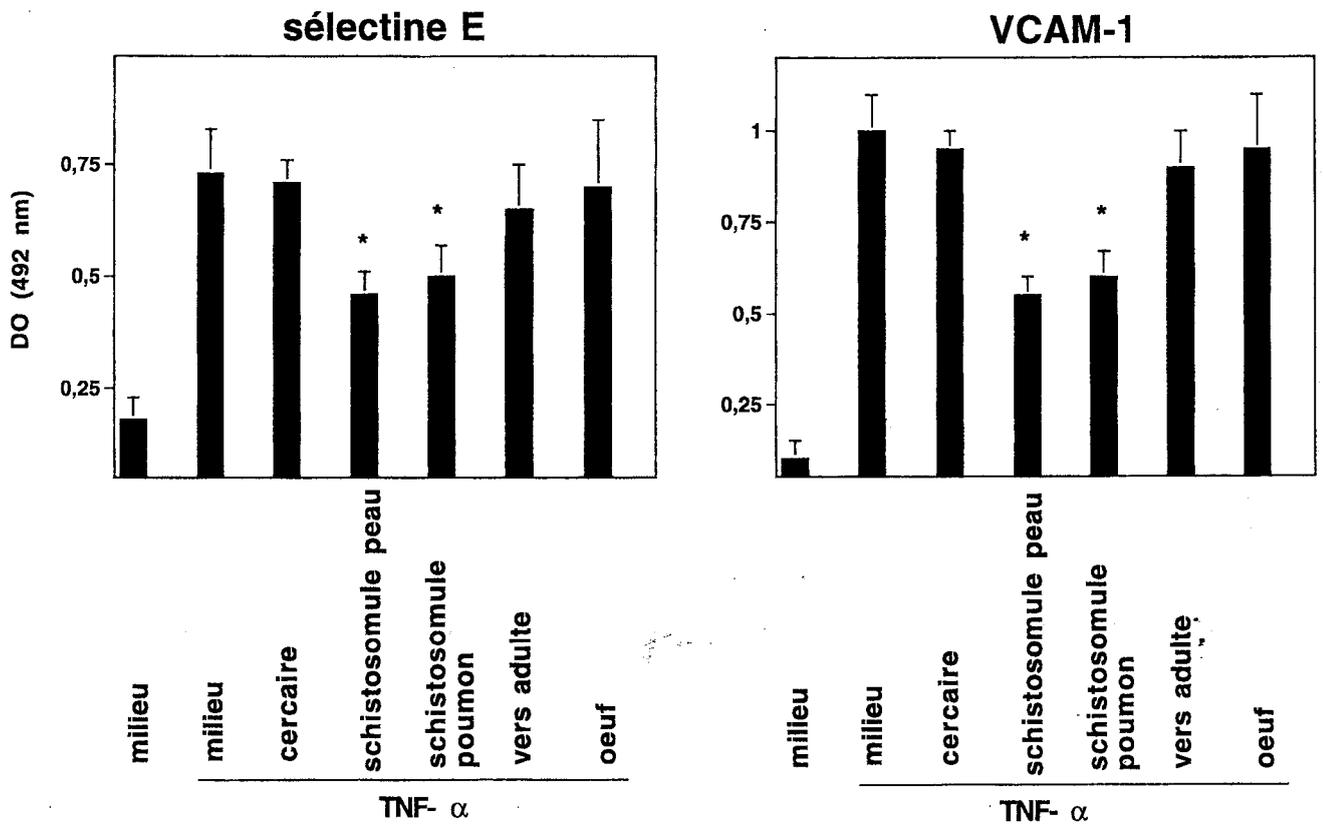
Sélectine E	non stimulé	TNF- α	ES / TNF- α	% inhibition
% cellules positives	18,3	86,7	72	16,7
nb sites / cellule	40,01	133,1	92,5	30,5

VCAM-1	non stimulé	TNF- α	ES / TNF- α	% inhibition
% cellules positives	27,8	56,8	40,5	28,7
nb sites / cellule	29,4	32,5	20,1	38,1

ICAM-1	non stimulé	TNF- α	ES / TNF- α	% inhibition
% cellules positives	83,8	93,5	91	2,4
nb sites / cellule	139,6	225,1	210,7	6,4

Figure 32 : Effet des fractions cytosoliques des différents stades parasitaires sur l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α

L'analyse est faite par Cell-ELISA - Les barres indiquent les valeurs moyennes de DO \pm SD de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate. *, p<0,05



4- La régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les HMVEC-1 stimulées au TNF- α est spécifique du stade larvaire

Il nous a semblé intéressant de tester la spécificité du stade pulmonaire pour l'induction de cette régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 sur les HMVEC-1 stimulées au TNF- α . Pour cela, des quantités similaires (en terme de concentration protéique) de fractions solubles de différents stades parasites ont été ajoutées au HMVEC-1 avant la stimulation par le TNF- α . Nous avons obtenu une diminution significative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 en présence de 100 ng/ml de fractions solubles de schistosomules poumon et peau (Figure 32). Cependant, aucune différence d'expression n'est observée en présence de fractions solubles de cercaires, de vers adultes ou d'oeufs, même à des concentrations plus élevées. Ces résultats indiquent que les effets observés sont restreints aux stades peau et poumon du cycle de vie du parasite.

5- Les produits ES des schistosomules inhibent l'adhésion VLA-4/VCAM-1 dépendante des cellules HL-60 aux HMVEC-1 stimulées par le TNF- α

De façon à tester l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de l'expression de certaines molécules d'adhérence pourrait mener à une altération de la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales *in vitro*, nous avons développé un test d'adhésion statique leucocyte/cellule endothéliale en utilisant la lignée cellulaire HL-60, qui exprime fortement les molécules LFA-1 et VLA-4 (ligands de ICAM-1 et VCAM-1, respectivement). Nous avons montré dans un premier temps que le nombre de leucocytes qui adhèrent aux HMVEC-1 est fortement augmenté lorsque les cellules endothéliales ont été stimulées 4 heures au TNF- α (Figure 33), suggérant que la liaison entre les deux partenaires est due, au moins en partie, aux molécules d'adhérence surexprimées par les HMVEC-1 après stimulation au TNF- α . Cette observation a été confirmée par l'inhibition de l'adhérence HL60 / HMVEC-1 après préincubation des HMVEC-1 stimulées après le TNF- α , par des Ac anti-VCAM-1 (65 ± 5 % d'inhibition). Les autres Ac testés n'ont pas d'effet.

Figure 33 : Effet des Ac bloquants ou des produits ES de schistosomules sur l'adhérence des HL-60 aux HMVEC-1 stimulées au TNF- α , en conditions statiques

Le pourcentage d'adhérence est calculé comme suit:

$\% \text{ adhérence} = (\text{unités de fluorescence des cellules adhérentes}) / (\text{unités de fluorescence des cellules totales}) \times 100$

Le pourcentage d'inhibition d'adhérence est calculé comme suit:

$\% \text{ inhibition} = (\% \text{ des cellules adhérent aux puits traités avec l'agent potentiellement inhibiteur et le TNF-}\alpha - \% \text{ de cellules adhérent aux puits non stimulés}) / (\% \text{ de cellules adhérent aux puits traités avec le TNF-}\alpha \text{ seulement} - \% \text{ de cellules adhérent aux puits non stimulés}) \times 100$.

Les résultats représentent le pourcentage moyen d'adhérence \pm SD de 3 expériences réalisées en triplicate. *, $p < 0,05$

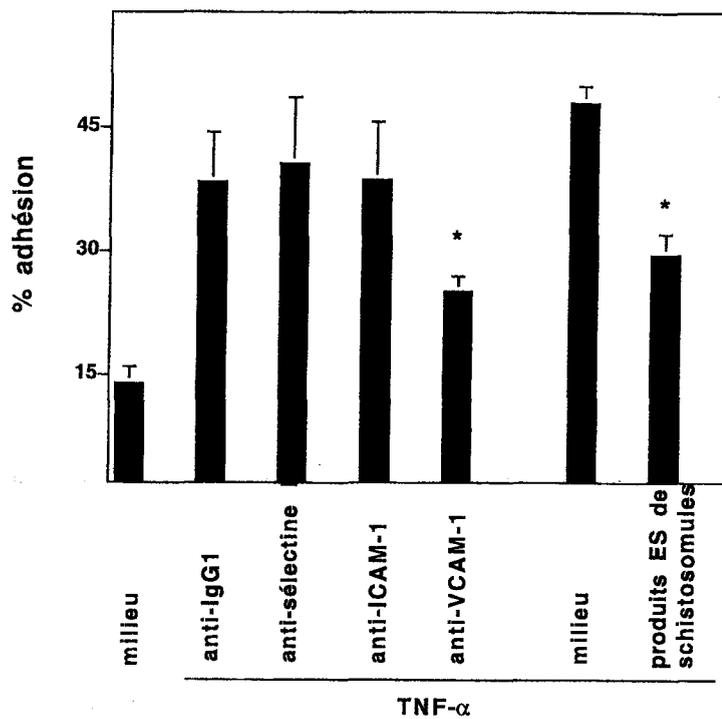
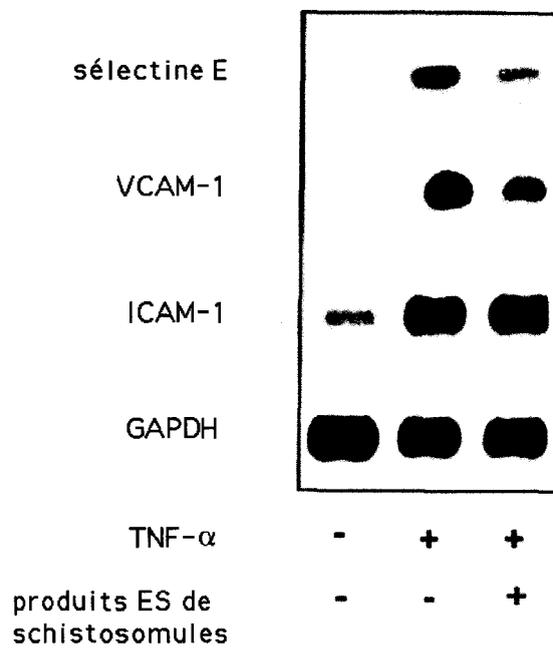


Figure 34 : Détection des ARNm de la sélectine E, de VCAM-1, de ICAM-1 et de la GAPDH des HMVEC-1 par Northern Blot



De façon similaire, le prétraitement des HMVEC-1 par des produits ES de schistosomules avant la stimulation par le TNF- α induit une diminution de l'adhérence des HL-60 aux HMVEC-1 (66 ± 2 % d'inhibition) en conditions statiques (Figure 33).

Ces expériences ont mis en évidence la relevance de l'inhibition de l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales. En effet, la migration des certains leucocytes (monocytes, lymphocytes T, éosinophiles) à travers les tissus périvasculaires (Luscinskas et al, 1995; Wakita and Takigawa, 1994) implique la molécule VCAM-1, et il est donc probable que les schistosomules aient un rôle dans le contrôle du recrutement cellulaire observé lors de l'infection au niveau des capillaires pulmonaires.

6- Les produits ES des schistosomules diminuent les taux d'ARNm de la sélectine E et de VCAM-1 des HMVEC-1 stimulés au TNF- α

Dans le but de savoir si la modulation de l'expression des molécules de surface se fait au niveau transcriptionnel, nous avons analysé la synthèse de l'ARNm codant pour la sélectine E, pour VCAM-1 et pour ICAM-1 par les HMVEC-1 stimulées au TNF- α avec ou sans préincubation avec les produits ES des schistosomules.

Les expériences de Northern Blot indiquent une forte augmentation de la quantité d'ARNm codant pour la sélectine E, VCAM-1 et ICAM-1 suite à la stimulation des HMVEC-1 par le TNF- α , en comparaison avec les cellules non stimulées ou traitées avec les produits ES des schistosomules uniquement (Figure 34). Le prétraitement des HMVEC-1 avec les produits ES des schistosomules avant la stimulation au TNF- α induit en revanche une diminution significative de la quantité d'ARNm codant pour la sélectine E et pour VCAM-1 mais pas pour ICAM-1 (Figure 34).

Ces résultats indiquent que les effets inhibiteurs, observés dans un premier temps au niveau protéique, des schistosomules sur l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 s'expliquent par une régulation transcriptionnelle plutôt que par clivage des molécules présentes à la surface des cellules.

Figure 35 : Effet des produits ES de schistosomes sur l'AMPc intracellulaire des HMVEC-1 stimulées au TNF- α

Les valeurs sont exprimées en pmoles d'AMPc pour 10^5 cellules. On a représenté la moyenne obtenue \pm SEM pour 3 expériences indépendantes réalisées en duplicate.

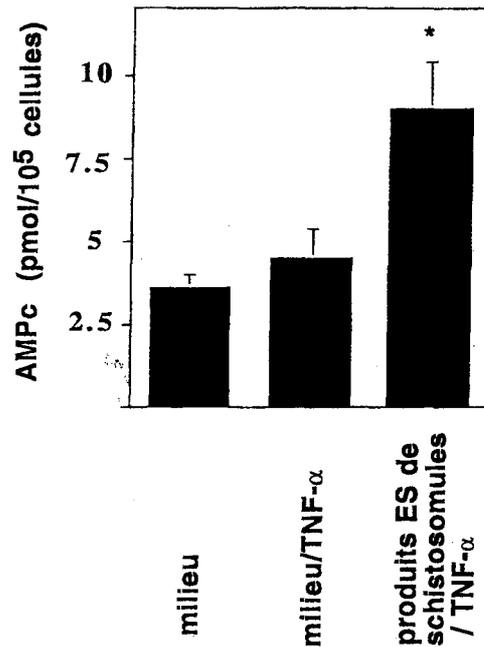
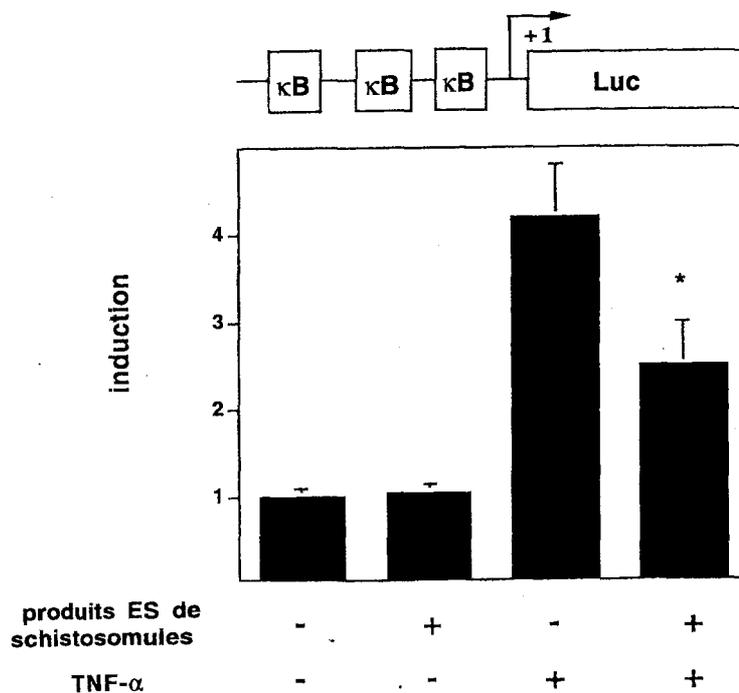


Figure 36 : Effet des produits ES de schistosomes sur l'activation transcriptionnelle d'un gène reporter κ B induit par le TNF- α

L'expérience a été réalisée 3 fois et la Figure montre une expérience représentative. Les résultats correspondent à l'induction moyenne de l'activité luciférase (comparée aux cellules transfectées non traitées) \pm SEM. *, $p < 0,05$



7- L'inhibition de l'expression des molécules d'adhérence résulte d'un mécanisme dépendant de l'AMPc

Il a été récemment montré, dans un modèle impliquant des cellules endothéliales macrovasculaires (HUVEC), que des agents capables d'augmenter la concentration intracellulaire en AMPc (Forskolin, IBMX (isobutyl methylxanthine)) aboutissait à des effets similaires à ceux que nous avons observés dans notre modèle d'étude, à savoir, une régulation négative de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1 par des cellules endothéliales stimulées par le TNF- α (Poher et al, 1993). De façon à tester si, dans notre modèle d'étude (cellules endothéliales microvasculaires), le mécanisme de régulation de l'expression de ces molécules implique également l'AMPc, nous avons quantifié les taux d'AMPc intracellulaire des HMVEC-1 incubés ou non avec les produits ES des schistosomules et le TNF- α . Comme le montre la Figure 35, l'incubation des HMVEC-1 avec les produits ES de schistosomules avant la stimulation par le TNF- α augmente le taux d'AMPc d'environ 2,5 fois par rapport à des cellules non stimulées ou stimulées uniquement par le TNF- α . Ce résultat suggère que les schistosomules sont capables de transmettre un signal aux HMVEC-1 en augmentant leur concentration en AMPc.

Il a été montré que des agents induisant une augmentation de l'AMPc réduisaient l'expression de la sélectine E par les HUVEC en interférant de façon négative avec la voie de signalisation faisant intervenir le facteur de transcription NF- κ B (Ollivier et al, 1996). Dans le but de tester si un mécanisme similaire est impliqué dans notre modèle d'étude, nous avons transfecté les HMVEC-1 avec un plasmide reporter luciférase placé sous le contrôle de l'élément de réponse κ B (κ B-LUC) et testé les effets des produits ES des schistosomules sur l'expression de la luciférase après stimulation ou non au TNF- α .

La Figure 36 montre que le traitement avec le TNF- α seul résulte en une induction de l'activité du promoteur dirigé par l'élément de réponse κ B alors que les produits ES des schistosomules n'affectent pas l'activité basale des promoteurs. Le traitement des cellules avec les produits ES des schistosomules avant la stimulation au TNF- α induit une diminution de l'activité du promoteur dirigé par κ B ($45 \pm 5 \%$). Ces résultats indiquent que les produits ES

des schistosomules régulent probablement l'expression de la sélectine E et de VCAM-1, au moins en partie, en interagissant de façon négative avec la voie NF- κ B induite par le TNF- α .

Conclusion

Nous avons pu montrer que les schistosomules étaient incapables d'induire l'expression de molécules d'adhérence sur les HMVEC-1. En revanche, des produits ES de schistosomules poumon induisent une diminution de la synthèse de la sélectine E et de VCAM-1, mais pas de ICAM-1, sur les HMVEC-1 stimulées par le TNF- α .

La capacité des produits ES à inhiber la liaison de cellules HL-60 aux cellules endothéliales suggère qu'un pathogène pourrait lui-même activer l'endothélium pour moduler la réponse inflammatoire de l'hôte et / ou orienter la réponse immune, en intervenant dans le recrutement sélectif de populations cellulaires.

Parmi les molécules libérées par le schistosome et susceptibles d'induire les effets inhibiteurs observés, les éicosanoïdes représentent des candidats potentiels. En effet, contrairement aux facteurs anti-inflammatoires exprimés par les schistosomes et découverts récemment (Ramaswamy et al, 1996), des expériences préliminaires indiquent que le ou les facteur(s) responsables de l'inhibition de l'expression de la sélectine E et de VCAM-1, ont des propriétés lipophiliques thermostables. Le schistosome sécrète des quantités substantielles d'éicosanoïdes inflammatoires et anti-inflammatoires dont les prostaglandines, les leucotriènes et des dérivés de l'acide hydroxyéicosatetraenoïque (Salafsky and Fusco, 1987; Baset et al, 1995). Cependant aucun éicosanoïde connu n'est responsable de l'inhibition spécifique observée de la sélectine E et de VCAM-1. La recherche d'un tel facteur semble donc revêtir un intérêt dans le cadre l'immunothérapie anti-adhésive.

Discussion

Discussion

La différenciation des éosinophiles se déroule dans la moelle osseuse à partir de cellules progéniteurs et est médiée par trois cytokines essentielles : l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF. Après un court séjour dans le flux sanguin, les éosinophiles matures du sang périphérique migrent vers les tissus. Cette migration est initiée par des facteurs chimioattractants et est médiée par des molécules d'adhérence qui leur permettent d'adhérer aux cellules endothéliales, étape indispensable à leur migration transendothéliale. Ces molécules d'adhérence sont responsables à la fois de la domiciliation physiologique et du recrutement des éosinophiles aux sites inflammatoires. Leur rôle peut alors être bénéfique ou néfaste. En effet, le recrutement des éosinophiles peut entraîner des altérations ou des lésions tissulaires dans certaines pathologies allergiques. Parallèlement, lors de l'invasion par des pathogènes, les molécules d'adhérence peuvent participer à la fonction effectrice des éosinophiles.

La mobilisation des éosinophiles de la moelle osseuse étant une étape importante au cours des réactions inflammatoires, nous avons étudié dans un premier temps, la cinétique d'expression de ces molécules dans un modèle de différenciation éosinophilique *in vitro*.

Cette étude a été réalisée grâce au modèle de différenciation des éosinophiles à partir de cellules précurseurs contenues dans le sang de cordon ombilical, en présence de rhIL-3, de rhIL-5, et de rhGM-CSF. Ce modèle permet d'obtenir, après 28 jours de culture, une population cellulaire contenant en moyenne 80 % d'éosinophiles.

Alors que l'expression de VLA-4 et de LFA-1 est similaire sur les éosinophiles différenciés *in vitro* et *in vivo*, on observe des variations dans l'expression de Le^x, de sLe^x, de Mac-1 et de sélectine L. En effet, la sélectine L et le déterminant Le^x sont plus faiblement exprimés, alors que l'intégrine Mac-1 et le sLe^x sont plus fortement exprimés sur les éosinophiles différenciés *in vitro* que sur les éosinophiles matures de sang périphérique de patients hyperéosinophiliques.

Cependant, au vu de ces résultats, il semble intéressant de quantifier les molécules d'adhérence présentes sur les éosinophiles de sujets sains et de les comparer aux éosinophiles

différenciés *in vitro*. En effet, les éosinophiles de sujets sains sont en grande majorité normodenses, alors que la majorité des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques sont hypodenses. Les éosinophiles hypodenses présentent une expression accrue de récepteurs aux IgE et aux protéines du complément et ont, dans leur ensemble, un phénotype de cellules activées.

Malgré la présence de cytokines (IL-5 et GM-CSF et IL-3 la première semaine) dans la culture, les éosinophiles en cours de différenciation *in vitro* ne sont pas dans un microenvironnement susceptible de les activer, suggérant que leur profil d'expression en molécules d'adhérence se rapproche peut-être plus d'éosinophiles de sujets sains. Des travaux ont mis en évidence le rôle de l'IL-5 sur l'expression des molécules d'adhérence par les éosinophiles. La présence d'IL-5 dans le milieu de culture régule de façon négative l'expression de Mac-1 au cours de l'éosinopoïèse (Hamann et al, 1996). En revanche, cette cytokine augmente l'expression de Mac-1 et diminue l'expression de la sélectine L sur des éosinophiles matures, sans affecter l'expression de VLA-4 (Neeley et al, 1993). Nos résultats coïncident avec ces données et il serait intéressant de tester l'influence de l'IL-5 sur les éosinophiles différenciés obtenus à J28.

De plus, les éosinophiles hypodenses exprimeraient plus de sLe^x mais moins de Le^x que les éosinophiles normodenses (Sato et al, 1994). Il serait donc intéressant d'étudier, sur les éosinophiles obtenus par différenciation *in vitro*, les propriétés qui différencient les deux sous-populations d'éosinophiles (densité, libération de molécules cytotoxiques,...). Cette étude nous permettrait de savoir si les éosinophiles différenciés *in vitro* présentent dans leur ensemble un phénotype d'éosinophiles hypodenses ou normodenses.

Le modèle de différenciation des éosinophiles à partir de cellules précurseurs de sang de cordon ombilical pourrait de plus être utilisé pour étudier l'implication de différents facteurs dans la cinétique d'expression des molécules d'adhérence au cours de l'éosinopoïèse.

La présence de molécules d'adhérence à la surface des éosinophiles humains nous a incité à étudier leur implication dans le phénomène d'ADCC vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*.

Des expériences d'inhibition de cytotoxicité en présence de ligands solubles ou d'anticorps dirigés contre des molécules d'adhérence montrent que la sélectine L et le déterminant (s)Le^x agissent en tant que co-récepteurs dans l'ADCC des éosinophiles humains vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni*. Une première étude avait déjà montré que la chaîne α de l'intégrine Mac-1, mais pas la chaîne α de LFA-1, était impliquée dans ce phénomène (Capron et al, 1987). Nous avons confirmé cette observation et montré que d'autres molécules d'adhérence étaient nécessaires à la fonction effectrice des éosinophiles humains dans ce modèle.

En effet, les interactions éosinophile/schistosome au cours de l'ADCC sont plus complexes que ce que l'on croyait jusqu'alors et nécessitent, en plus de l'interaction via les complexes FcR/Ig, d'autres molécules, telles que les sélectines et les carbohydrates.

Quelque soit l'agent inhibiteur utilisé, aucune inhibition significative de l'adhésion éosinophile/schistosome n'a été observée, suggérant que les molécules impliquées dans l'adhésion participeraient aussi à l'activation cellulaire.

De façon à mieux comprendre la coopération entre les molécules d'adhérence et les récepteurs Fc présents sur les éosinophiles dans l'induction de l'activation de ces cellules menant à la libération de médiateurs cytotoxiques, nous avons entrepris des expériences de cytotoxicité n'impliquant qu'un seul isotype d'anticorps et donc un seul type de récepteurs aux Ig. Ces expériences ont montré que la cytotoxicité IgG- mais pas IgA-dépendante nécessitait la présence de certaines molécules d'adhérence en tant que co-récepteurs. Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par l'inhibition de la libération d'ECP (une des molécules cytotoxiques majeures de l'éosinophile, impliquée dans la destruction des larves parasitaires) en présence d'anticorps anti-Le^x et anti-Mac-1, lorsque les éosinophiles sont stimulés via leur récepteur Fc γ RII mais pas Fc α R. L'activation des éosinophiles semble donc différente selon le FcR engagé et nos travaux indiquent une nouvelle voie d'activation des éosinophiles conduisant à l'ADCC parallèlement à l'implication des récepteurs aux Ig.

Alors que le rôle des IgE dans la cytotoxicité des éosinophiles humains vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* a été montré (Capron et al, 1984), nous n'avons pas obtenu de

cytotoxicité significative en présence de cet isotype d'anticorps. Cela peut s'expliquer par le fait que les éosinophiles utilisés dans les expériences de cytotoxicité n'étaient pas enrichis en éosinophiles hypodenses, qui expriment plus fortement le FcεR que les éosinophiles normodenses. D'autre part, il est possible que les IgE chimères homme/souris que nous avons utilisées dans ces expériences aient une affinité moindre pour leurs récepteurs que des IgE issues de sérum polyisotypique de patient bilharzien. De plus, les anticorps monoclonaux d'isotype IgE semblent nécessiter la présence de facteurs additionnels, tels que le complément, pour induire la cytotoxicité des éosinophiles (Verwaerde et al, 1979). Au vu de ces différents résultats, il serait intéressant de mettre au point un système d'étude de la cytotoxicité médiée par les IgE (en isolant les IgE de sérum de patients bilharziens par exemple). Cela permettrait d'une part de déterminer la nécessité de co-récepteurs dans la cytotoxicité IgE-dépendante, et plus particulièrement dans la libération de la MBP (major basic protein), protéine cytotoxique très puissante vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*, par les éosinophiles stimulés via leurs récepteurs aux IgE.

Les résultats obtenus suggèrent donc que les déterminants (s)Le^x sont impliqués dans l'activation cellulaire, probablement en interagissant avec une ou plusieurs « selectine-like » sur le parasite. Une étude a montré que des anticorps dirigés contre les déterminants (s)Le^x pouvaient agir en tant que signal de costimulation pour la dégranulation, induite par C3b, de l'ECP mais pas de l'EPO, par les éosinophiles de patients présentant un syndrome d'hyperéosinophilie idiopathique (Sato et al, 1994).

D'autre part, le déterminant Le^x peut s'associer avec la protéine CD11/CD18 (Skubitz and Snook, 1987) et avec la sélectine L (Picker et al, 1991). L'implication des intégrines dans la transduction de signal a été clairement établie (Hynes, 1992; Sastry et al, 1993; Clark and Brugge, 1995), et le rôle des sélectines dans la signalisation a été mis en évidence récemment (Brenner et al, 1997; Lorenzon et al, 1998). Puisque Mac-1 et la sélectine L sont nécessaires à l'expression de la fonction cytotoxique des éosinophiles humains, les effets inhibiteurs des anticorps dirigés contre le déterminant (s)Le^x pourraient être dus à leur interaction avec ces molécules. Bien que les mécanismes moléculaires menant à la cascade d'événements liés à la

cytotoxicité soient encore inconnus, il est probable que l'activation des éosinophiles par le parasite via les déterminants (s)Le^x soit liée aux effets de transduction via les molécules Mac-1 et/ou sélectine L. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'inhibition de cytotoxicité obtenue avec des anticorps dirigés contre la chaîne α de Mac-1, alors que le récepteur de cette molécule n'a pas été trouvé sur le schistosome. En effet, les anticorps dirigés contre la chaîne α de Mac-1 inhibent la cytotoxicité, mais les anticorps dirigés contre son ligand, ICAM-1, n'ont pas d'effet. Nos résultats confirment donc l'implication des sélectines et des carbohydrates dans l'activation des éosinophiles et dans leur fonction effectrice vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*, déjà observé dans le cas de la cytotoxicité des macrophages de rat contre ce même parasite (Trottein et al, 1997). Il semblerait donc, que, dans les phénomènes d'ADCC, le complexe FcR-Ig médie une adhésion spécifique et ferme des éosinophiles aux parasites et agisse en synergie avec d'autres récepteurs cellulaires pour permettre l'activation de la cellule effectrice.

Puisque les éosinophiles sont impliqués dans l'induction de lésions tissulaires lors de certaines pathologies telles que l'asthme allergique, il serait intéressant d'étudier le rôle de ces interactions sélectine/carbohydate dans de tels phénomènes. L'éosinophile possède en effet, par sa participation à la réaction inflammatoire, notamment allergique et dépendante d'IgE, un rôle délétère. Il est responsable de la libération de facteurs cytotoxiques au niveau des tissus, au sein desquels il migre par chimioattraction. L'étude du rôle des molécules d'adhérence dans ce phénomène d'activation des éosinophiles IgE-dépendant est intéressant et permettrait d'étudier, dans un autre modèle que l'ADCC, l'implication de ces molécules dans l'activation des éosinophiles via leurs récepteurs aux IgE.

Les expériences d'inhibition de cytotoxicité effectuées par présensibilisation des schistosomules nous ont suggéré l'expression par le parasite de molécules d'adhérence (« selectine-like » et Le^x) et la participation d'une double interaction sélectine/carbohydate entre les éosinophiles et les schistosomes au cours de l'ADCC. L'interaction

éosinophile/schistosomule mimerait donc l'interaction leucocyte/cellule endothéliale. Dans les deux systèmes, des ligands présentant le déterminant (s)Le^X et des membres de la famille des sélectines sont impliqués dans les contacts cellule/cellule.

Les lectines permettent aux différents pathogènes d'interagir avec les cellules de l'hôte. Certaines sont importantes dans l'adhésion cellulaire, dans l'invasion et dans la transmission de signaux (Jacobson and Doyle, 1996). De façon intéressante, certains ligands adhésifs de pathogènes pourraient « imiter » les sélectines des cellules eucaryotes et activer les cellules de mammifères (Sandros et al, 1994).

Notre étude montre qu'une ou plusieurs molécule(s) « selectine like », reconnue(s) par des anticorps anti-sélectine humaine, sont exprimées par le schistosome et peuvent interagir et transmettre un signal aux cellules immunes.

Nos tentatives de caractérisation biochimique et moléculaire de la « selectine-like » n'ont pas donné les résultats escomptés. Nous avons cependant cloné une partie du gène codant pour la « selectine-like », par PCR à partir d'oligonucléotides dégénérés correspondant aux domaines lectiniques des sélectines (résultats non publiés). L'ADNc obtenu n'est pas complet mais présente des homologies avec les lectines de mammifères. Par ailleurs, une molécule de type lectine a été cloné chez l'hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni* (*Biomphalaria glabrata*) par cette stratégie. Elle a été appelée Bgsel (Duclermortier et al, soumis) et pourrait interagir avec le déterminant Le^X présent sur les hémocytes, cellules immunes de ce mollusque.

La présence de Le^X sur le schistosome a déjà été démontrée. Chez *Schistosoma mansoni*, le déterminant Le^X est présent à différents stades du développement (Weiss and Strand, 1985; Ko et al, 1990), sur des séquences glycoprotéiques de tailles différentes (Weiss and Strand 1985, Srivastan et al, 1992) et sur des glycolipides (Weiss et al, 1986). Cependant, la mise en évidence de ce carbohydrate sur des schistosomules obtenus de manière mécanique, n'ayant ainsi jamais été en contact avec l'hôte, suggère sa synthèse par le parasite plutôt que l'adsorption passive de cette molécule à partir de cellules de l'hôte. La présence de Le^X a été montrée chez d'autres pathogènes comme *Helicobacter pylori* qui exprime également des adhésines ayant une

affinité élevée pour les dérivés du lactose sialylé et les structures Le^x (Sherburne and Taylor, 1995; Boren et al, 1993).

Puisque les structures comportant le déterminant Le^x sont importantes pour les interactions cellule/cellule (Carlos and Harlan, 1994; Rosen and Bertozzi, 1994), nous pouvons penser que le Le^x du schistosome soit impliqué dans les interactions hôte/parasite (Srivastan et al, 1992; Köster and Strand, 1994). Alors que son rôle dans la migration cellulaire a été établi (domiciliation des leucocytes, formation des métastases), son implication dans la modulation de la réponse immune a également été rapportée. Lors de l'infection chronique à *Schistosoma mansoni*, le Le^x synthétisé par les oeufs stimule les cellules B de type B220, induisant leur prolifération et la libération de facteurs diminuant la réponse Th1 (Velupillai and Harn, 1994). Bien que la relevance de ces résultats doive être confirmée *in vivo*, nos travaux suggèrent une autre fonction pour ce motif carbohydate, en tant que co-facteur dans la cytotoxicité des éosinophiles humains.

L'expression de nombreuses molécules d'adhérence est inductible, notamment par des cytokines produites au cours des phases précoces de la réponse immunitaire. De plus, elles peuvent être libérées sous forme soluble et interférer avec les contre-récepteurs membranaires. Des structures Le^x clivées (détectées dans les produits d'excrétion/sécrétion des schistosomules) ou des anticorps anti-Le^x (trouvés dans les sérums de patients infectés (Nyame et al, 1996)) pourraient exercer un effet inhibiteur sur l'ADCC. Bien que cela n'ait pas encore été démontré, le Le^x du schistosome pourrait interagir avec des récepteurs fucose-dépendants de différentes cellules de l'hôte. D'autre part, ces carbohydrates solubles pourraient moduler l'adhésion cellulaire. Grinnell et al (1994) ont rapporté qu'un oligosaccharide fucosylé inhibait l'adhésion cellulaire médiée par la sélectine E.

Dans le cas du schistosome, il semble peu probable que le parasite exprime à sa surface des molécules d'adhérence favorisant sa propre destruction. La libération de ces molécules sous forme soluble et leur interaction compétitive avec les molécules membranaires, aboutissant à l'inhibition des mécanismes de cytotoxicité est à envisager. Récemment des travaux ont montré

la présence de molécules d'adhérence solubles dans la schistosomiase humaine (Secor et al, 1994; Esterre et al, 1998). De plus, cette observation est corrélée avec la sévérité de la maladie et la diminution de la réponse vis-à-vis des antigènes parasitaires. La libération de molécules sous forme soluble pourrait également permettre l'inhibition de l'adhérence du parasite aux cellules de l'hôte lors des processus migratoires.

Nous avons montré que la sélectine P pouvait se lier au schistosome. Le déterminant Le^x étant un ligand faible des sélectines (Larsen et al, 1990), la multivalence du motif Le^x sur le schistosome (Srivastan and al, 1992) pourrait faciliter la liaison des sélectines sur le parasite. Des travaux récents ont montré, dans un modèle murin, que la sélectine L de l'hôte pouvait traverser la paroi de l'oeuf et se fixer sur le miracidium (El Ridi et al, 1996). La sélectine L se lierait à des antigènes carbohydrates immunogènes et cette interaction pourrait expliquer la régulation négative de la pathologie granulomateuse observée lors de la phase aigüe de la pathologie. Les carbohydrates représenteraient ainsi des cibles potentielles pour le développement d'agents thérapeutiques contre la schistosomiase.

Le schistosome et/ou ses produits d'excrétion/sécrétion pourraient donc se lier et activer les cellules de l'hôte exprimant des sélectines comme les cellules effectrices et les cellules endothéliales activées. Ce type d'interaction schistosome/cellule pourrait être impliqué à différents stades du cycle du schistosome chez son hôte vertébré, et particulièrement pendant les étapes de migration, d'invasion, de domiciliation du parasite ou lors de ses interactions avec le système immunitaire.

Des enzymes glandulaires ont été incriminées dans la pénétration de la cercaire chez son hôte définitif. Cependant, la phase précoce de reconnaissance et d'adhérence aux différentes cellules constituant le revêtement cutané n'a pas encore été élucidée. Il est donc possible que des molécules d'adhérence, sélectine, Le^x ou autres molécules non encore identifiées, permettent la fixation spécifique de la cercaire aux cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte. De plus, on sait que la réussite de cette étape de pénétration cutanée varie selon les hôtes définitifs. Les molécules d'adhérence exprimées par les larves du schistosome pourraient donc, en permettant

une spécificité d'interaction moléculaire entre le parasite et ses hôtes, participer aux mécanismes sous-tendant un effet de permissivité ou de résistance.

Après le passage cutané, le parasite interagit avec les cellules endothéliales pour effectuer sa migration. L'interaction entre les molécules d'adhérence et leurs ligands au niveau des cellules endothéliales pourrait participer à ce cycle. Des expériences préliminaires montrent que l'adhérence du schistosome aux cellules endothéliales augmente significativement en présence de cytokines inflammatoires, laissant suggérer l'implication de molécules d'adhérence dans ce phénomène. Les molécules impliquées n'ont cependant pas encore été caractérisées. Les différentes espèces de schistosome ayant un tropisme tissulaire préférentiel, l'expression différentielle de molécules d'adhérence selon les espèces de schistosome pourrait expliquer leur domiciliation tissulaire spécifique. La relevance *in vivo* de l'intervention des molécules d'adhérence dans les mécanismes de migration et de domiciliation du parasite pourrait être vérifiée par transfert passif d'anticorps monoclonaux chez des animaux (souris, rat) infectés par *Schistosoma mansoni*.

Durant les dernières années, de nombreux rapports ont décrit l'administration systémique d'anticorps monoclonaux pour inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium dans des modèles d'inflammation ou de réactions immunes (Canella et al, 1993; Comejo et al, 1997). D'autres approches potentielles visant à une thérapie "anti-adhérence" pourraient être testées dans des modèles *in vivo*, dont l'utilisation de peptides bloquants, de récepteurs d'intégrines solubles, d'oligonucléotides antisens et de drogues qui bloquent sélectivement les voies de signalisation impliquées dans l'induction de protéines d'adhésion endothéliales.

D'autre part, il serait intéressant d'analyser la régulation de l'expression des molécules d'adhérence du schistosome. A l'instar de ce qui est connu chez les mammifères, le schistosome pourrait utiliser les cytokines de l'hôte pour moduler les niveaux d'expression de ses molécules d'adhérence. L'absence de marquage avec l'anticorps anti-sélectine E sur les cercaires (résultats non publiés) indique effectivement que la molécule « selectine-like » est régulée au cours du

développement du parasite, pendant la transformation de la larve ou pendant la pénétration cutanée.

Inversement, des facteurs parasitaires pourraient induire la surexpression des molécules d'adhérence des cellules de l'hôte et ainsi participer aux phénomènes de migration du schistosome ou lors d'évènements pathologiques.

En général, les microorganismes qui vivent au contact de l'endothélium de l'hôte activent en effet les cellules endothéliales et induisent une réponse inflammatoire (Filler et al, 1996; Schofield et al, 1996). Ces cellules synthétisent alors des cytokines et des chimiokines et expriment des molécules d'adhérence qui permettent la diapédèse des cellules immunes.

Nous montrons ici qu'à l'inverse, des molécules sécrétées par les schistosomules peuvent réguler négativement l'expression de molécules d'adhérence sur des cellules endothéliales de microvaisseaux de poumon. Des expériences complémentaires montrent que le schistosome est capable de diminuer la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales, apportant un argument supplémentaire en faveur d'un effet « anti-inflammatoire » des schistosomes (Trottein et al, soumis).

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que, pendant son séjour prolongé dans les poumons, le schistosome participerait à une modulation de la réponse inflammatoire. Alors que l'on pensait que la liaison du parasite aux cellules endothéliales pouvait être médiée par les molécules d'adhérence du parasite, capables de transmettre des signaux, des expériences ont montré que ce n'était pas le cas. Cependant, les schistosomules sont capables d'inhiber spécifiquement l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et sélectine E à la surface des cellules endothéliales. Cette modulation résulte d'une diminution de la transcription des gènes de la sélectine E et de VCAM-1. Nous montrons que ce phénomène résulte de l'activation de la PKA, inhibant la transcription médiée par NF κ B.

Les molécules parasitaires responsables de ce phénomène n'ont pas encore été caractérisées, mais des expériences préliminaires indiquent que des fractions solubles de faible poids moléculaire seraient impliquées. Les éicosanoïdes présentent ces caractéristiques et leur

implication dans ce phénomène est actuellement étudiée. Il serait intéressant de tester si les schistosomules poumons de souris vaccinées par cercaires irradiées ont un métabolisme des éicosanoïdes altéré. Cela pourrait peut-être expliquer les différences observées dans l'expression de molécules d'adhérence et dans l'infiltrat cellulaire des poumons de souris vaccinées par rapport aux poumons des souris naïves (Trottein et al, soumis).

Enfin, il serait intéressant d'étudier si d'autres gènes impliqués dans l'inflammation sont régulés négativement par les schistosomules. Nous avons montré récemment que les schistosomules sont capables d'induire la synthèse d'IL-6 par les cellules endothéliales (Trottein et al, en préparation).

Les molécules d'adhérence du schistosome sont donc nécessaires à l'interaction hôte/parasite. Si elles semblent occuper une place importante dans les différentes phases du développement du parasite, elles sont également essentielles aux mécanismes de défense de l'hôte. L'étude approfondie de ces molécules devrait permettre de mieux comprendre le développement de ce parasite chez ses hôtes et de mieux appréhender les mécanismes adaptatifs mis en place par l'hôte au cours de l'infection.

D'autre part, des substances parasitaires douées de propriétés anti-inflammatoires semblent pouvoir contrôler le recrutement de certaines populations cellulaires lors de l'inflammation pulmonaire, en exerçant un contrôle négatif sur l'expression des molécules d'adhérence endothéliales. Ces résultats suggèrent le rôle du schistosome dans la modulation de la réponse inflammatoire et mettent probablement en évidence un nouveau mécanisme d'échappement du parasite à la réponse immune de l'hôte.

Conclusion générale

Conclusion

Les interactions entre le schistosome et son hôte impliquent des contacts directs entre le parasite et différentes cellules de l'hôte. Alors que les molécules d'adhérence de mammifère sont bien connues, la connaissance de telles molécules sur le schistosome est beaucoup plus restreinte.

Nous avons montré que le parasite *Schistosoma mansoni* était capable d'exprimer à sa surface des molécules d'adhérence présentant des homologies avec les molécules d'adhérence de mammifère et plus particulièrement avec des carbohydrates tels que Le^x ou des sélectines.

Ces molécules semblent, par un mécanisme d'action non encore élucidé, indispensables à l'expression des capacités cytotoxiques des éosinophiles humains vis-à-vis du schistosome. Elles serviraient, en effet, de co-facteurs dans l'induction de la fonction cytotoxique des éosinophiles humains stimulés via leurs FcγR.

Le parasite est en contact direct avec les cellules endothéliales au cours de sa migration, et notamment au niveau du poumon où il séjourne plusieurs jours dans les microvaisseaux. L'adhésion du schistosome aux cellules endothéliales ne semble cependant pas impliquer d'interactions sélectine/Le^x. Le schistosome peut moduler l'expression de certaines molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales activées, suggérant sa capacité à moduler la réponse inflammatoire qu'il induit, notamment au niveau des poumons.

Dans leur ensemble, ces résultats mettent en évidence la place des molécules d'adhérence dans le langage moléculaire d'un parasite extracellulaire, le schistosome.

L'élucidation des interactions moléculaires entre le schistosome et les cellules de l'hôte devrait par ailleurs permettre d'appréhender les phénomènes biologiques intervenant dans le développement du parasite et dans les mécanismes immunitaires et pathologiques liés à l'infection par le schistosome.

Bibliographie

Bibliographie

Abu-Ghazaleh, R. I., Kujisawa, R. I., Mestecky, J., Kyle, R. A. and Gleich, G. J. 1989. IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* 142: 2393.

Ackerman, S. J., Kephart, G. M., Francis, H., Awadzi, K., Gleich, G. J. and Ottesen, E. A. 1990. Eosinophil degranulation. An immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *J. Immunol.* 144: 3961.

Ager, A. 1987. Isolation of high endothelial cells from rat endothelial cells from lymph nodes. *J. Cell. Sci.* 87: 133.

Albelda, S. M. and Buck, C. A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868.

Aldebert, D., Lamkhioued, B., Dessaint, C., Soussi Gouni, A., Goldman, M., Capron, A., Capron, M. and Prin, L. 1996. Eosinophils express a functional receptor for interferon α (IFN α R): inhibitory role of IFN α on the release of mediators. *Blood.* 87: 1.

Ameisen, J-C., Joseph, M., Caen, J. P., Kusnierz, J-P., Capron, M., Boizard, B., Wautier, J-L., Levy-Toledano, S., Vorng, H. and Capron, A. 1986. A role for glycoprotein IIb-IIIa complex in the binding of IgE to human platelets and platelet-dependent cytotoxic functions. *British J. Haematol.* 64: 21.

Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H. 1992. Tumor necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature.* 356: 604.

Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J-P. and Capron, A. 1981. Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62: 15.

Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A. and Capron, A. 1983. Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of IgG. *FEBS Lett.* 153: 11.

Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A. B. and Capron, A. 1985. Regulatory role of tripeptide (TKP) from the constant domain of immunoglobulin G. *Int. J. Immunopharmacol.* 7: 73.

Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R. J., Butterworth, A. E., Wolowczuck, I., Capron, M., Ouma, J. H., Balloul, J. M., Khalife, J., Neyrinck, J. L., Tartar, A., Koech, D. and Capron, A. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1918.

Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W. and Ohashi, P. S. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells : adhesion versus costimulation. *Immunity.* 7: 549.

Baumhueter, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S. D. and Lasky, L. A. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin, CD34. *Science.* 262: 436.

Baset, H. A., O'Neil, G. P. and Ford-Hutchinson, A. W. 1995. Characterization of arachidonic-acid-metabolizing enzymes in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 31.

Beil, W. J., Weller, P. F., Peppercorn, M. A., Galli, S. J. and Dvorak, A. M. 1995. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF- α in colonic Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 58: 284.

Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I. and Marsh, K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 341: 57.

Berg, E. L., Robinson, M. K., Mansson, O., Butcher, E. C. and Magnani, J. L. 1991. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266: 14869.

Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F. and Butcher, E. C. 1993. L-

selectin-mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1. *Nature*. 366: 695.

Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A. and Seed, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 243: 1160.

Bevilacqua, M. P. and Nelson, R. M. 1993. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379.

Boggemeyer, E., Stehle, T., Schaible, U. E., Hahne, M., Vestweber, D. and Simon, M. M. 1994. *Borrelia burgdorferi* upregulates the adhesion molecules E-selectin, P-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on mouse endothelioma cells *in vitro*. *Cell. Adhes. Commun.* 2: 145.

Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G. and Normark, S. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 262: 1892.

Borges, E., Tietz, W., Steegmaier, M., Moll, T., Hallmann, R., Hamann, A. and Vestweber, D. 1997. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med.* 185: 573.

Boros, D. L. 1994. The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiol.* 191: 441.

Brenner, B., Weinmann, S., Grassme, H., Lang, F., Linderkamp, O. and Gulbins, E. 1997. L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac. *Immunology*. 92: 214.

Brostjan, C., Anrather, J., Csizmadia, V., Natarajan, G. and Winkler, H. 1997. Glucocorticoids inhibits E-selectin expression by targeting NF- κ B and not ATF/c-Jun. *J. Immunol.* 158: 3836.

Broxmeyer, H. E., Carow, C., Hangoc, G., Hendrie, P. C. and Cooper, S. 1991. Hematopoietic stem cells and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Hum. Gene Transfer*. 219: 95.

Brustein, M., Kraal, G., Mebius, R. E. and Watson, S. R. 1992. Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J. Exp. Med.* 176: 1415.

Butcher, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 67: 1033.

Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, V. and Rees, P. M. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*. 256: 727.

Butterworth, A. E., Remold, H. G., Houba, V., David, J. R., Franks, D., David, P. H. and Sturrock, R. F. 1977. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *S. mansoni* and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118: 2230.

Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Wassom, D. L., Dessein, A., Hogan, M., Sherry, B., Gleich, G. J. and David, J. R. 1979. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible adherence. *J. Exp. Med.* 150: 1456.

Butterworth, A. E. 1984. Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Immunol.* 27: 339.

Butterworth, A. E., Bensted-Smith, R., Capron, A., Capron, M., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Grzych, J.-M., Kariuki, H. C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Siogok, T. K. and Sturrock, R. F. 1987. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*. 94: 269.

Cannella, B., Cross, A. H. and Raine, C. S. 1993. Anti-adhesion molecule therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 46: 43.

Canon, P. 1892. Über Eosinophile Zellen und Mastzellen in Blut Gesunder und Kranker. *Deutsch. Med. Wochenschr.* 10: 206.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. and Bazin, H. 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature*. 253:274.

Capron, M., Spiegelberg, H. L., Prin, L., Bennich, H. L., Butterworth, A. E., Pierce, R. J., Ouaisi, M. A. and Capron, A. 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 232: 462.

- Capron, M., Kusnierz, J. P., Prin, L., Spiegelberg, H. L., Ovlaque, G., Gosset, P., Tonnel, A. B. and Capron, A. 1985.** Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils: detection by flow microfluorometry. *J. Immunol.* 134: 3013.
- Capron, M. and Capron, A. 1986a.** Rats, mice and men; models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today.* 2: 69.
- Capron, M., Jouault, T., Prin, L., Joseph, M., Ameisen, J.-C., Butterworth, A. E., Papin, J.-P., Kusnierz, J.-P. and Capron, A. 1986b.** Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc epsilon R2) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J. Exp. Med.* 164: 72.
- Capron, M. and Capron, A. 1987a.** The IgE receptor of human eosinophils. In : Allergy and Inflammation. Kay, AB, Eds Academic Press, London: 151.
- Capron, M., Kazatchkine, M. D., Fischer, E., Joseph, M., Butterworth, A. E., Kusnierz, J.-P., Prin, L., Papin, J.-P. and Capron, A. 1987b.** Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J. Immunol.* 139: 2059.
- Capron, M., Tomassini, M., Van der Vorst, E., Kusnierz, J.-P., Papin, J.-P. and Capron, A. 1988.** Existence et fonctions d'un récepteur pour l'immunoglobuline A sur les éosinophiles humains. *C. R. Acad. Sci. Immunol.* 307: 397.
- Capron, M., Grangette, C., Torpier, G. and Capron, A. 1989.** The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.* 47: 128.
- Capron, M., Truong, M.-J., Aldebert, D., Gruart, V., Suemura, M., Delespesse, G., Tourvieille, B. and Capron, A. 1991.** Heterogenous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur. J. Immunol.* 21: 2423.
- Capron, M. and Plumas, J. 1993.** Eosinophil membrane receptors. In: Makino ES, Fukuda, T, eds. Eosinophils: biological and clinical aspects. CRC Press. p 95.
- Capron, M. and Capron, A. 1994.** Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science.* 264: 1876.
- Capron, A., Dombrowicz, D. and Capron, M. 1985.** Regulation of immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. En préparation.
- Carlos, T. M. and Harlan, J. M. 1994.** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84: 2068.
- Chensue, S. W., Otterness, I. G., Higashi, G. I., Forsch, C. S. and Kunkel, S. L. 1989.** Cytokine production by hypersensitivity (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign antibody (sephadex beads) type granuloma macrophages. Evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 142: 1281.
- Cherwinski, H. M., Schumacher, J. H., Brown, K. D. and Mosmann, T. R. 1987.** Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 166: 1229.
- Clark, E. A. and Brugge, J. S. 1995.** Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science.* 268: 233.
- Clegg, J. A., Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1971.** Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 1: 43.
- Clutterbuck, E. J. and Sanderson, C. J. 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 rhGranulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood.* 75: 1774.
- Cornejo, C. J., Winn, R. K. and Harlan, J. M. 1997.** Anti-adhesion therapy. *Adv. Pharmacol.* 39: 99.
- Costa, J. J., Matossian, K., Resnick, M. B., Beil, W. J., Wong, D. T. W., Gordon, J. R., Dvorak, A. M., Weller, P. F. and Galli, S. J. 1993.** Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J. Clin. Invest.* 91: 2673.
- Coulson, P. S. and Wilson, R. A. 1993.** Pulmonary T helper lymphocytes are CD44^{hi}, CD45RB⁺ effector cells in mice vaccinated with attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 151: 3663.

- Coulson, P. S. and Wilson, R. A. 1997.** Recruitment of lymphocytes to the lungs through vaccination enhances the immunity of mice exposed to irradiated schistosomes. *Infect. Immun.* 65: 42.
- Coussinier, P. and Dessein, A. J. 1995.** *Schistosoma*-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *Eur. J. Immunol.* 25: 2295.
- Crabtree, J. E. and Wilson, R. A. 1986a.** *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural examination of pulmonary migration. *Parasitology.* 92: 343.
- Crabtree, J. E. and Wilson, R. A. 1986b.** The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 8: 265.
- Croft, M. and Dubey, C. 1997.** Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* 17: 89.
- Crosby, W. H. 1890.** The hematology of hookworm disease: contribution of Bailey K. Ashford. P.R. *Health Sci. J.* 4: 113.
- Czaja, M. J., Weiner, F. R., Takahashi, S., Giambrone, M. A., Van Der Meide, P. H., Shellekens, H., Biempica, L. and Zern, M. A. 1989.** γ -interferon inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* 10: 795.
- De Andres, B., Rakasz, E., Hagen, M., McCormik, M. L., Mueller, A. L., Elliot, D., Metwali, A., Sandor, M., Britigan, B. E., Weinstock, J. V. and Lynch, R. G. 1997.** Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood.* 89: 3826.
- DeBose-Boyd, R., Nyame, A. K. and Cummings, R. D. 1996.** *Schistosoma mansoni*: characterization of an alpha 1-3 fucosyltransferase in adult parasites. *Exp. Parasitol.* 82: 1.
- de Fougerolles, A. R., Quin, X. and Springer, T. A. 1994.** Characterization of the function of intercellular adhesion molecules (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J. Exp. Med.* 179: 619.
- Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J-F., 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., Bloget, F., Seguy, D., Capron, M., Cortot, A., Colombel, J-F. and Janin, A. 1996.** Interleukin-3, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interleukin-5 in Eosinophilic Gastroenteritis. *Gastroenterology.* 110: 768.
- Dombrowicz, D., Lin, S., Flamand, V., Brini, A. T., Koller, B. H. and Kinet, J-P. 1998.** Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. *Immunity.* 8: 517.
- Druilhe, A., Cai, Z., Hailé, S., Chouaib, S. and Pretolani, M. 1996.** Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils. *Blood.* 87: 2822.
- Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A. and Capron, M. 1994.** Synthesis of interleukin-5 by eosinophils: association with granules and immunoglobulin - dependent secretion. *J. Exp. Med.* 179: 703.
- Dubucquoi, S. and Capron, M. 1998.** « L'éosinophile: une cellule à deux visages dans la réponse inflammatoire ». *Inflammation. J. Libbey.* pp 55.
- Dunne, D. W., Butterworth, A. E., Fulford, A. J., Kariuki, H. C., Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. J. and Sturrock, R. F. 1992.** Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22: 1383.
- Dunne, D. W., Richardson, B. A., Jones, F. M., Clark, M., Thorne, K. J. I. and Butterworth, A. E. 1993.** The use of mouse/human chimeric antibodies to investigate the roles of different isotypes including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils. *Parasite Immunol.* 15: 181.
- Dunon, D., Mackay, C. R. and Imhof, B. A. 1993.** "Adhesion in Leukocyte Homing and Differentiation", pp. 260. Springer Verlag. New York.
- Duvaux-Miret, O., Stefano, G. B., Smith, E. M., Dissous, C. and Capron, A. 1992.** Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite

Schistosoma mansoni by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 778.

Egensten, A., Calafat, J., Knol, E. F., Janssen, H., Waltz, T. M. 1996. Subcellular localization of Transforming Growth Factor- α in human eosinophil granulocytes. *Blood.* 87: 3910.

Ehrlich, P. 1879. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch. Anat. Physiol.* p 166.

El Ridi, R., Velupillai, P. and Harn, D. A. 1996. Regulation of schistosome egg granuloma formation: host-soluble L-selectin enters tissue-trapped eggs and binds to carbohydrate antigens on surface membranes of miracidia. *Infect. Immun.* 64: 4700.

Erbe, D. V., Pfefferkorn, E. R. and Fanger, M. W. 1991. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 146: 3145.

Esterre, P., Raobelison, A., Ramarokoto, C. E., Ravaoalimalala, V. E., Boisier, P. and Roux, J. 1998. Serum concentrations of sICAM-1, sE-, sP-, sL-selectins in patients with *Schistosoma mansoni* infection and association with disease severity. *Parasite Immunol.* 20: 369.

Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, L., Paulson, J. C. and Gershoni-Baruch, R. 1992. Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *New Engl. J. Med.* 327: 1789.

File, S. 1995. Interaction of schistosome eggs with vascular endothelium. *J. Parasitol.* 81: 234.

Filler, S. G., Pfunder, A. S., Spellberg, B. J., Spellberg, J. P. and Edwards, J. E. 1996. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect. Immun.* 64: 2609.

Fiorentino, D. F., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. 1989. Two types of mouse T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 518.

Forssman, U., Uguccioni, M., Loetscher, P., Dahinden, C. A., Langen, H., Thelen, M. and Baggiolini, M. 1997. Eotaxin-2, a novel CC

chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J. Exp. Med.* 185: 2171.

Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D. and Brandley, B. K. 1992. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl lewis^x oligosaccharide. *J. Cell. Biol.* 117: 895.

Freedman, D. O. and Ottesen, E. A. 1988. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation *in vitro*. *J. Infect. Disease.* 158: 556.

Freedman, A. R., Gibson, F. M., Fleming, S. C., Spry, C. J. F. and Griffin, G. E. 1991. Human immunodeficiency virus infection of eosinophils in bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 174: 1661.

Gauchat, J-F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J-P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., Aldebert, D., Capron, M., Dahinden, C. and Bonnefoy, J-Y. 1995. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 25: 863.

Gearing, J. H. and Newman, W. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today.* 14: 506.

Gleich, G. J. and Adolphson, C. R. 1986. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv. Immunol.* 39: 177.

Gleich, G. J., Adolphson, C. R. and Leiferman, K. M. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu. Rev. Med.* 44: 85.

Gollash, G. 1889. Zur Kenntniss der Asthmatischen Sputums. *Forschr. Med.* 7: 361.

Gordon, J. 1992. Evidence for a CD23 counterstructure other than IgE. *Res. Immunol.* 143: 428.

Granette, C., Gruart, V., Ouaissi, M. A., Rizvi, F., Delespesse, G., Capron, A. and Capron, M. 1989. IgE receptor on human eosinophils (Fc ϵ R2). Comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.* 143: 3580.

- Gray, D. 1992.** The dynamics of immunological memory. *Sem. Immunol.* 4: 29.
- Grewe, M., Czech, W., Morita, A., Werfel, T., Klammer, M., Kapp, A., Ruzicka, T., Schöpf, E. and Krutmann, J. 1998.** Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J. Immunol.* 161: 415.
- Grezel, D., Capron, M., Grzych, J-M., Fontaine, J., Lecocq, J-P. 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.* 129: 2739.
- Grinnell, B. W., Hermann, R. B. and Yan, S. B. 1994.** Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion : role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology.* 4: 221.
- Gruart, V., Truong, M. J., Plumas, J., Zandecki, M., Kusnierz, J-P., Prin, L., Vinatier, D., Capron, A. and Capron, M. 1992.** Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood.* 79: 2592.
- Grzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F. and Sher, A. 1991.** Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146: 1322.
- Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. and Capron, A. 1993.** IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 150: 527.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. and Herrlich, P. 1991.** A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell.* 65: 13.
- Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunne, D., Simpson, A. J. G. and Wilkins, H. A. 1991.** Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* 349: 243.
- Hahne, M., Lenter, M., Jäger, U. and Vestweber, D. 1993a.** A novel soluble form of mouse VCAM-1 is generated from a glycolipid-anchored splicing variant. *Eur. J. Immunol.* 24: 421.
- Hahne, M., Jäger, U., Isenmann, S., Hallmann, R. and Vestweber, D. 1993b.** Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J. Cell. Biol.* 121: 655.
- Hall, J. G. and Morris, B. 1965.** The origin of cells in the efferent lymph node. *J. Exp. Med.* 121, 901.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jallonski-Westrich, D., Holzmann, B. and Butcher, E. C. 1994.** Role of α 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues *in vivo*. *J. Immunol.* 152: 3282.
- Hamann, K. J., Neeley, S. P., Dowling, T. L., Grant, J. A. and Leff, A. R. 1996.** Effect of interleukin-5 exposure during *in vitro* eosinophilopoiesis on MAC-1 adhesion molecule expression and function on cultured human eosinophils. *Blood.* 88: 3575.
- Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Ying, S., Abrams, J. S., Kay, A. B. and Moqbel, R. 1992.** Human eosinophils synthesize and secrete Interleukin-6 *in vitro*. *Blood.* 80: 1496.
- Hansel, T., Pound, D., Pilling, D., Kitas, G., Salmon, M., Gentle, S. and Thompson, R. 1989.** Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J. Immunol.* 122: 97.
- Horiuchi, T. and Weller, P. F. 1997.** Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17: 70.
- Hynes, R. O. 1992.** Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11.
- Imai, Y., Lasky, L. A. and Rosen, S. D. 1993.** Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature.* 361: 555.
- Imhof, B. A. and Dunon, D. 1995.** Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.* 58: 345.

Izumi, S., Hirai, K., Miyamasu, M., Takahashi, Y., Misaki, Y., Takaishi, T., Morita, Y., Matsushima, K., Ida, N., Nakamura, H., Kasahara, H. and Ito, K. 1997. Expression and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 27: 816.

Jacobs, W., Bogers, J., Deelder, A. and Van Marck, E. 1997. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in experimental *Schistosoma mansoni* infection and in synchronous periparticular hepatic granulomas in mice: immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and immunoelectron microscopy. *Parasitol. Res.* 83: 405.

Jacobson, R. L. and Doyle, R. J. 1996. Lectin-parasite interaction. *Parasitol. Today.* 12: 55.

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

Jose, P. J., Griffiths-Johnson, D. A., Collins, P. D., Walsh, D. T., Moqbel, R., Totty, N. F., Truong, O., Hsuan, J. J. and Williams, T. J. 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* 179: 881.

Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Ameisen, J. C., Pancre, V., Torpier, G., Kusnierz, J. P., Ovlaque, G. and Capron, A. 1985. IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminth. *Adv. Exp. Med. Biol.* 184: 23.

Kansas, G. S. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 88: 3259.

Katagiri, K., Kinashi, T., Irie, S. K. and Katagiri, T. 1996. Differential regulation of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1-dependent adhesion and aggregation in HL-60. *Blood.* 87: 4276.

Kay, A. B. 1979. The role of eosinophil. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64: 90.

Kay, A. B. 1994. T cells, cytokines and asthma. *J. R. Coll. Physicians Lond.* 28: 325.

Kazura, J. W. and Grove, D. I. 1978. Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of *Trichinella spiralis*. *Nature.* 274: 588.

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

Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. W. and Ouma, J. H. 1986b. Immunity in human schistosomiasis. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 166: 1626.

Khalife, J., Dunne, D. W., Richardson, B. A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A. and Butterworth, A. E. 1989. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosome of *S. mansoni*. *J. Immunol.* 142: 4422.

Kishimoto, T. K., Julita, M. A., Berg, E. L. and Butcher, E. C. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science.* 245: 1238.

Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J. S. and Gleich, G. J. 1991. GM-CSF and Interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.* 174: 743.

Kitaura, M., Nakajima, T., Imai, T., Harada, S., Combadiere, C., Tiffany, H. L., Murphy, P. M. and Yoshie, O. 1996. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271: 7725.

Ko, A. I., Dräger, U. C. and Harn, D. A. 1990. A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4159.

Koch, P. J. and Franke, W. W. 1994. Desmosal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 682.

Köster, B. and Strand, M. 1994. *Schistosoma mansoni*: immunolocalisation of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology.* 108: 433.

- Lamkhioued, B., Soussi Gouni, A., Gruart, V., Pierce, A. and Capron, M. 1995.** Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25: 117.
- Lamkhioued, B., Soussi Gouni, A., Aldebert, D., Delaporte, E., Prin, L., Capron, A. and Capron, M. 1996.** Synthesis of type 1 (IFN- γ) and type 2 (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann. NY Acad. Sci.* 796: 203.
- Langley, J. G. and Boros, D. L. 1995.** T-lymphocyte responsiveness in murine schistosomiasis mansoni is dependent upon the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, lymphocyte function-associated antigen-1, and very late antigen-4. *Infect. Immun.* 63: 3980.
- Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, E., Wagner, D., Furie, B. C. and Furie, B. 1990.** PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell.* 63: 467.
- Larson, R. S. and Springer, T. A. 1990.** Structure and function of leucocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114: 171.
- Lasky, L. E., Singer, M. S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W. J., Gimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S. R., and Rosen, S. D. 1992.** An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell.* 69: 927.
- Lazdins, J. K., Stein, M. G., David, J. R. and Sher, A. 1982.** *Schistosoma mansoni*: rapid isolation and purification of schistosomula of different development stages by centrifugation on discontinuous gradients of Percoll. *Exp. Parasitol.* 53:39.
- Levi-Schaffer, F., Lacy, P., Severs, N. J., Newman, T. M., North, J., Gomperts, B., Kay, B. and Moqbel, R. 1995.** Association of Granulocyte-Macrophage Colony - Stimulating Factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood.* 85: 2579.
- Levi-Schaffer, F., Barkans, J., Newman, T. M., Ying, S., Wakelin, M., Hohenstein, R., Barak, V., Lacy, P., Kay, A. B. and Moqbel, R. 1996.** Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology.* 87: 155.
- Lim, K. G., Wan, H-C., Bozza, P. T., Resnick, M. B., Wong, D. T. W., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., Center, D. M. and Weller, P. F. 1996.** Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (Lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol.* 156: 2566.
- Lo, S. K., Golenbock, D. T., Sass, P. M., Maskati, A., Xu, H. and Silverstein, R. L. 1997.** Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood.* 89: 307.
- Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J. M., Tedesco, F. and Dobrina, A. 1998.** Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signalling receptors. *J. Cell. Biol.* 142: 1381.
- Lucey, D. R., Dorsky, D. I., Nicholson-Weller, A. and Weller, P. F. 1989.** Human eosinophils express CD4 protein and bind Human Immunodeficiency Virus 1 gp120. *J. Exp. Med.* 169: 327.
- Lukacs, N. W., Chensue, S. W., Strieter, R. M., Warmington, K. and Kunkel, S. L. 1994.** Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -inducible intercellular adhesion molecule-1. 152: 5883.
- Luscinskas, F. W., Ding, H. and Lichtman, A. H. 1995.** P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4⁺ T lymphocytes on tumor necrosis factor α -activated vascular endothelium under flow. *J. Exp. Med.* 181: 1179.
- Mackay, C. R. 1993.** Immunological memory. *Adv. Immunol.* 53: 217.
- Mackay, C. R., Marston, W. L. and Dudler, L. 1990.** Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171: 801.
- Mackay, C. R., Marston, W. L. and Dudler, L. 1992a.** Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur. J. Immunol.* 22: 2205.
- Mackay, C. R., Marston, W. L., Dudler, L., Spertini, O., Tedder, T. F. and Hein, W. R. 1992b.** Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 887.
- Marques, E. T., Weiss, J. B. and Strand, M. 1998.** Molecular characterization of a

fucosyltransferase encoded by *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93: 237.

Mastin, A., Bickle, Q. B. and Wilson, R. A. 1985. An ultrastructural examination of irradiated, immunizing schistosomula of *Schistosoma mansoni* during extended stay in the lungs. *Parasitology.* 91: 101.

Mawhorter, S. D., Stephany, D. A., Ottesen, E. A. and Nutman, T. B. 1996. Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. *J. Immunol.* 156: 4851.

Mayani, H., Dragowska, W. and Lansdorp, P. M. V. 1993. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood.* 81: 3252.

Mazingue, C., Stadler, B., Quatannens, B., Capron, A. and De Wack, A. 1986. Schistosome-derived inhibitory factor: an immunosuppressive agent preferentially active on T-lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 80: 347.

Mazingue, C., Dessaint, J. P., Schmitt-Verhulst, A. M., Cerottini, J. C. and Capron, A. 1983. Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome derived inhibitory factor is dependent of an inhibition of the production of interleukin-2. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 72: 22.

McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A. B. 1981. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite Immunol.* 3: 359.

Mebius, R. E. and Watson, S. R. 1993. L- and E- selectin can recognize the same naturally occurring ligands on high endothelial venules. *J. Immunol.* 151: 3252.

Metwali, A., Elliott, D., Mathew, R., Blum, A. and Weistock, J. V. 1993. IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *S. mansoni*. *J. Immunol.* 150: 536.

Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Druzin, M. L., Giardino, P. J. V., Zsebo, K. M. and Adamson, J. W. 1992. Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34+ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. *Blood.* 79: 2620.

Monteiro, R. C., Hostoffer, R. W., Cooper, M. D., Bonner, J. R., Gartland, G. L. and Kubagawa, H. 1993. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J. Clin. Invest.* 92: 1681.

Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. C., Varki, A. and McEver, R. P. 1992. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 118: 445.

Moqbel, R., Hamid, Q., Ying, S., Barkans, J., Hartnell, A., Tsicopoulos, A., Warlaw, A. J. and Kay, A. B. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte / macrophage-colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J. Exp. Med.* 174: 749.

Moqbel, R., Levi-Schaffer, F. and Kay, A. B. 1994. Cytokine generation by eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 1183.

Moqbel, R., Ying, S., Barkans, J., Newman, T. M., Kimmitt, P., Wakelin, M., Taborda-Barata, L., Meng, Q., Corrigan, C. J., Durham, S. R. and Kay, A. B. 1995. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J. Immunol.* 155: 4939.

Mosmann, T. R. and Coffman, L. R. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46: 111.

Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X. and Philips, D. M. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178: 449.

Nagy, B. A., File, S. K. and Smith, J. H. 1981. Changes in the enteric vasculature of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 999.

Nasu, T., Fukuda, Y., Nagahira, K., Kawashima, H., Noguchi, C. and Nakanishi, T. 1997. Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. *Immunol. Lett.* 59: 47.

Neeley, S. P., Hamann, K. J., White, S. R., Baranowsky, S. L., Burch, R. A. and Leff, A. R. 1993. Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VLA-4 on human eosinophils

and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 633.

Neusser, E. 1892. Klinische-haematologische Mittheilungen. *Wien. Klin. Wochenschr.* 5: 41.

Ngaiza, J. R. and Doenhoff, M. J. 1993. *Schistosoma mansoni* egg attachment to cultured human umbilical vein endothelial cells: an *in vitro* model of an early step of parasite egg excretion. *J. Infect. Disease.* 168: 1576.

Norgard, K. E., Moore, K. L., Diaz, S., Stults, N. L., Ushiyama, S., McEver, R. P., Cummings, R. D. and Varki, A. 1993. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 268: 12764.

Nutten, S., Trottein, F., Soussi Gounni, A., Papin, J-P., Capron, A. and Capron, M. 1997. From allergy to schistosomes: Role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92: 9.

Nyame, K., Cummings, R. D. and Damian, R. T. 1988. Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in glycoprotein synthesis by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.* 74: 562.

Nyame, A. K., Pilcher, J. B., Tsang, V. C. and Cummings, R. D. 1996. *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells. *Exp. Parasitol.* 82: 191.

Ogawa, M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 81: 2844.

Ohkawara, Y., Lim, K. G., Xing, Z., Glibetic, M., Nakano, K., Dolovich, J., Croitoru, K., Weller, P. F. and Jordana, M. 1996. CD40 expression by human blood eosinophils. *J. Clin. Invest.* 97: 1761.

Ohno, I., Nitta, Y., Yamauchi, K., Hoshi, H., Homma, M., Woolley, K., O'Byrne, P., Dolovich, J., Jordana, M. and Tamura, G. 1995. Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13: 639.

Olds, G. R. and Mahmoud, A. A. F. 1980. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni. Eosinophil mediated destruction of eggs. *J. Clin. Invest.* 66: 1191.

Ollivier, V., Parry, G. C., Cobb, R. R., de Prost, D. and Mackman, N. 1996. Elevated cyclic AMP inhibits NF- κ B-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 20828.

Oswald, I. P., Eltoun, I., Wynn, T. A., Schwartz, B., Caspar, P., Paulin, L., Sher, A. and James, S. 1994. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 999.

Parmentier, S., McGregor, L., Catimel, B., Leung, L. L. and McGregor, J. L. 1991. Inhibition of platelet functions by a monoclonal antibody (LYP20) directed against a granule membrane protein (GMP-140/PADGEM). *Blood* 77: 1734.

Paul, W. E. 1993. « Fundamental Immunology », 3rd ed. Raven Press, New York.

Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173: 159.

Pimenta, P. F., Dos Santos, M. A. and De Souza, W. 1987. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J. Submicrosc. Cytol.* 19: 387.

Picker, L. J., Michie, S. A., Rott, L. S. and Butcher, E. C. 1990. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am. J. Pathol.* 136: 101.

Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. A., Doerscuck, C. M., Berge, E. L. and Butcher, E. C. 1991. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell.* 66: 921.

Plumas, J., Gruart, V., Aldebert, D., Truong, M. J., 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.

Pober, J. S., Slowik, M. R., De Luca, L. G. and Ritchie, A. J. 1993. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF α -induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 150: 5114.

Popken-Harris, P., Checkel, J., Loegering, D., Madden, B., Springett, M., Kephart, G. and Gleich, G. J. 1998. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood.* 92: 623.

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

Putz, E. F. and Männel, D. N. 1996. A role for L-selectin in monocyte activation by Jurkat tumor cells. *Scand. J. Immunol.* 44: 556.

Ramaswamy, K., Salafsky, B., Potluri, S., He, Y. X., Li, J. W. and Shibuya, T. 1996. Secretion of an anti-inflammatory, immunomodulatory factor by schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Infl.* 46: 13.

Ramaswamy, K., He, Y. X. and Salafsky, B. 1997. ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 86: 118.

Reinbach, G. 1893. Über des Verhalten der Leukocyten bei malignen Tumoren. *Arch. Klin. Chir.* 46: 486.

Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukkonen, K. and Wright, S. D. 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 61: 1375.

Rice, G. E. and Bevilacqua, M. P. 1989. An inducible endothelial cell surface

glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 246: 1303.

Richter, D., Incani, R. N. and Harn, D. A. 1996. Lacto-N-fucopentaose (Lewis^x), a target of the antibody response in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64: 1826.

Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgeois, A., Prata, A. and Dessein, A. J. 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21: 2679.

Ritter, D. M., Rosen, S. and McKerrow, J. H. 1994. Induction of ICAM-1 expression by products of the deposited egg of *Schistosoma mansoni* (abstract 1342). *Abstr. Exp. Biol.* 94: A232.

Ritter, D. M. and McKerrow, J. H. 1996. Intercellular adhesion molecule-1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. *Infect. Immun.* 64: 4706.

Robson, K. J., Hall, J. R., Jennings, M. W., Harris, T. J., Marsh, K., Newbold, C. I., Tate, V. E. and Weatherall, D. J. 1988. A highly conserved amino acid sequence in thrombospondin, properdin, and in proteins from sporozoites and blood stage of human malaria parasite. *Nature.* 335: 79.

Rosen, S. D. and Bertozzi, C. R. 1994. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 663.

Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S. C., Schall, T. J. and Dahinden, C. A. 1992. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 α induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* 176: 1489.

Rothenberg, M. E. 1998. Eosinophilia. Mechanisms of disease. *New England J. Med.* 338: 1592.

Rothlein, R., Mainolfi, E. A., Czajkowski, M. and Martin, S. D. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J. Immunol.* 147: 3788.

Ruiz, P., Dunon, D., Sonnenberg, A. and Imhof, B. A. 1993. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins. *Cell Adhesion Commun.* 1: 67.

- Satoh, T., Knowles, A., Li, M. S., Sun, L., Tooze, J. A., Zabucchi, G. and Spry, C. J. 1994.** Expression of lacto-N-fucopentaose III (CD15)- and sialyl-Lewis X-bearing molecules and their functional properties in eosinophils from patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Immunology*. 83: 313.
- Saito, H., Hatake, K., Dvorak, A. M., Leiferman, K. M., Donnenberg, A. D., Arai, N. and Ishizaka, T. 1988.** Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc. Natl. Sci. USA*. 85: 2288.
- Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shaw, G., Veldman, G. M., Bean, K. M., Ahern, T. J., Furie, B., Cummings, D. A. and Larsen, G. R. 1993.** Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*. 75: 1179.
- Salafsky, B. and Fusco, A. C. 1987.** *Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults. *Exp. Parasitol.* 64: 361.
- Sanderson, C. J., Lopez, A. F. and Moreno, M. M. 1977.** Eosinophils and not lymphoid NK cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*. 268: 340.
- Sandros, J., Rozdzinski, E., Zheng, J., Cowburn, D. and Tuomanen, E. 1994.** Lectin domains in the toxin of *Bordetella pertussis*: selectin mimicry linked to microbial pathogenesis. *Glycoconj. J.* 11: 501.
- Sastry, S. K. and Horwitz, A. F. 1993.** Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 819.
- Satoh, T., Knowles, A., Li, M. S., Sun, L., Tooze, J. A., Zabucchi, G. and Spry, C. J. 1994.** Expression of lacto-N-fucopentaose III (CD15)- and sialyl-Lewis X-bearing molecules and their functional properties in eosinophils from patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Immunology*. 83: 313.
- Schlecht, H. and Schwenker, G. 1912.** Über lokale Eosinophilie in den Bronchien und in der Lunge anaphylaktischer Meerschweinchen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 68: 163.
- Schleiffenbaum, B., Spertini, O. and Tedder, T. F. 1992.** Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J. Cell. Biol.* 119: 229.
- Schofield, L., Novakovic, S., Gerold, P., Schwarz, R. T., McConville, M. J. and Tachado, S. D. 1996.** Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J. Immunol.* 156: 1886.
- Secor, W. E., Reis, M. G., Ramos, E. A. G., Matos, E. P., Reis, E. A. G., Carmo, T. M. A. and Harn, D. A. 1994.** Soluble intercellular adhesion molecules in human schistosomiasis: correlation with disease severity and decreased responsiveness to egg antigens. *Infect. Immun.* 62: 2695.
- Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S. and Cheever, A. W. 1990.** Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.* 145: 3911.
- Sherburne, R. and Taylor, D. E. 1995.** *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate, Lewis X. *Infect. Immun.* 63: 4564.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. and Shaw, S. 1992.** Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today*. 13: 102.
- Silberstein, D. S. and David, J. R. 1987.** The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunol. Today*. 8: 380.
- Skubitz, K. M. and Snook, R. W. 1987.** Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion promoting glycoprotein family (LFA-1/HMAC-1/GP 150, 95) and CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.* 139: 1631.
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1969.** The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 7: 41.
- Sonnenberg, A. 1993.** Integrins and their ligands. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 184: 7.
- Sonoda, Y., Arai, 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.
- Soussi-Gouni, A., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J. P. and Capron, M. 1994.** High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*. 367: 183.
- Soussi-Gouni, A., Lamkhioued, B., Morita, M., Aldebert, D., Sarfati, M., Capron, A. and Capron, M. 1998.** Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor FcεRII/CD23 expressed by human eosinophils. *Int. Immunol.* 10: 395.
- Springer, T. A. 1990.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346: 425.
- Springer, T. A. 1994.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76: 301.
- Spry, C. J. F. 1988.** Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. *Oxford University Press*: 484.
- Srivastan, J., Smith, D. F. and Cummings, R. D. 1992.** The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis^x antigen. *J. Biol. Chem.* 267: 20196.
- Staunton, D. E., Merluzzi, V. J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S. D. and Springer, T. A. 1989.** A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*. 56: 849.
- Tanaka, Y., Adams, D. H. and Shaw, S. 1993.** Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today*. 14: 111.
- Terry, R. W., Kwee, L., Levine, J. F. and Labow, M. A. 1993.** Cytokine induction of an alternatively spliced murine vascular cell adhesion molecule (VCAM) mRNA encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored VCAM protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 5919.
- Tomassini, M., Tsiopoulos, A., Tai, P. C., Gruart, V., Tonnel, A. B., 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.
- Trottein, F., Triglia, T. and Cowman, A. F. 1995.** Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74: 129.
- Trottein, F., Nutten, S., Papin, J-P., Leportier, C., Poulain-Godefroy, O., Capron A. and Capron, M. 1997.** Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J. Immunol* 159: 804.
- Truong, M. J., Gruart, V., Kusnierz, J. P., Liu, F. T., Prin, L., Capron, A. and Capron, M. 1993.** IgE-binding molecules (Mac2/εBP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 23: 3230.
- Tyrrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J. and Brandley, B. K. 1991.** Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 10372.
- Van Dam, G. J., Claas, F. H., Yazdanbakhsh, M., Kruize, Y. C., van Keulen, A. C., Ferreira, S. T., Rotmans, J. P. and Deelder, A. M. 1996.** *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis^x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood*. 88: 4246.
- Varki, A. 1994.** Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 7390.
- Velupillai, P. and Harn, D. A. 1994.** Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 18.
- Venge, P., Hakansson, L. and Peterson, C. G. 1987.** Eosinophil activation in allergic disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 82: 333.
- Verwaerde, C., Grzych, J-M., Bazin, H., Capron, M. and Capron, A. 1979.** Production of monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. Preliminary study of their biological activities. *CR Acad. Sci.* 289: 725.

Vestweber, D. 1996. Ligand-specificity of the selectins. *J. Cell. Biochem.* 61: 585.

Waddell, T. K., Fialkow, L., Chan, C. K., Kishimoto, T. K. and Downey, G. P. 1995. Signalling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 15403.

Wakita, H. and Takigawa, M. 1994. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are critical for initial trafficking of helper-inducer/memory T cells in psoriasis plaques. *Arch. Dermatol.* 130: 457.

Warren, D. J. and Moore, M. A. S. 1988. Synergism among interleukin-1, interleukin-3, and interleukin-5 in the production of eosinophils from primitive hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 140: 94.

Waters, L. S., Taverner, J., Tai, P. C., Spry, C. J., Targett, G. A. and Playfair, J. H. 1987. Killing of *Plasmodium falciparum* by eosinophil secretory products. *Infect. Immun.* 55: 877.

Weiss, J. B. and Strand, M. 1985. Characterization of developmentally regulated epitopes of *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein antigens. *J. Immunol.* 135: 1421.

Weiss, J. B., Magnani, J. L. and Strand, M. 1986. Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *J. Immunol.* 136: 4275.

Weissman, I. L. and Cooper, M. D. 1993. How the immune system develops. *Sci. Am.* 239: 33.

Weller, P. F. and Goetzl, E. J. 1979. The regulatory and effector roles of eosinophils. *Adv. Immunol.* 27: 339.

Weller, P. F. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* 324: 1110.

Weller, P. F., Rand, T. H., Barret, T., Elovic, A., Wong, D. T. W. and Finberg, R. W. 1993. Accessory cell function of human eosinophils: HLA-DR dependent, MHC-restricted antigen presentation and IL-1 α expression. *J. Immunol.* 150: 2554.

Weller, P. F. 1994. Eosinophils: structure and functions. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 85.

Wilson, R. A., Coulson, P. S., Betts, C., Dowling, M. A. and Smythies, L. E. 1996. Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon- γ receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology.* 87: 275.

Wong, D. T. W., Weller, P., Galli, S. J., Elovic, A., Rand, T. H., Gallagher, G. T., Chiang, T., Chou, M. Y., Matossian, K., McBride, J. and Todd, R. 1990. Human eosinophils express Transforming Growth Factor α . *J. Exp. Med.* 172: 673.

Wong, D. T., Elovic, A., Matossian, K., Nagura, N., McBride, J., Chou, M. Y., Gordon, J. R., Rand, T. H., Galli, S. J. and Weller, P. F. 1991. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. *Blood.* 78: 2702.

Wyler, D. J., Prakash, S. and Libby, P. 1987. Mesenchymal target cells specificity of egg granuloma-derived fibroblast growth factor in schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* 155: 728.

Ying, S., Meng, Q., Taborda-Barata, L., Corrigan, C. J., Barkans, J., Assoufi, B., Moqbel, R., Durham, S. R. and Kay, A. B. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur. J. Immunol.* 26: 70.

Zhu, X., Hamann, K. J., Munoz, N. M., Rubio, N., Mayer, D., Herrreiter, A. and Leff, A. R. 1998. Intracellular expression of Fc γ RIII (CD16) and its mobilization by chemoattractants in human eosinophils. *J. Immunol.* 161: 2574.

Publications

Publications

S. Nutten, F. Trottein, A. Soussi Gouni, J.P. Papin, A. Capron, and M. Capron.
From allergy to schistosomes: role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. *Memorias da Oswaldo Cruz*. 1997, 92 (suppl. II): 9-14.

F. Trottein, **S. Nutten**, J-P. Papin, C. Leportier, O. Poulain-Godefroy, A. Capron and M. Capron.

Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J. Immunol*. 1997, 159: 804-811.

O. Roye, N. Delhem, F. Trottein, F. Remoué, **S. Nutten**, J-P. Decavel, M. Delacre, V. Martinot, J.Y., Cesbron, C. Auriault, and I. Wolowczuk.

Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 *in vivo* after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection. *J. Immunol*. 1998, 161(8): 4161-4168.

S. Nutten, J-P. Papin, G. Woerly, D. Dunne, J. MacGregor, F. Trottein and M. Capron.
Selectin and Lewis^x interactions are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur. J. Immunol*. Sous presse.

F. Trottein, **S. Nutten**, V. Angeli, P. Delerive, B. Staels, and M. Capron.

The intravascular parasite *Schistosoma mansoni* reduces E-selectin and VCAM-1 expression in TNF- α stimulated lung microvascular endothelial cell through a cAMP/PKA pathway. Soumis pour publication.

I. Wolowczuk, **S. Nutten**, O. Roye, M. Delacre, M. Capron, R. Murray, F. Trottein, and C. Auriault.

Infection of mice lacking Interleukin (IL)-7 reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. Soumis pour publication.

F. Trottein, L. Descamps, **S. Nutten**, M-P. Dehouk, V. Angeli, A. Capron, R. Ceccheli, and M. Capron.

Schistosoma mansoni activates host microvascular endothelial cells to acquire an anti-inflammatory phenotype. Soumis pour publication.

I. Wolowczuk, O. Roye, **S. Nutten**, M. Delacre, F. Trottein, and C. Auriault.

Role of Interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host. Soumis pour publication.

S. Nutten, G. Woerly and M. Capron.

Expression of adhesion molecules during the development of eosinophils *in vitro* from cord blood cells. En préparation.

Communications orales

M. Capron, **S. Nutten**, J.P. Papin, F. Trottein and A. Capron. From allergy to schistosomes: role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Eosinophil Meeting, Rio de Janeiro, Brésil. Juin 1996.

F. Trottein, **S. Nutten**, J-P. Papin and M. Capron.

Membrane and soluble molecules in the dialogue of schistosoma and their hosts. Conférence Jacques Monod. Aussois, France. Septembre 1996.

S. Nutten, G. Woerly, M. Capron et F. Trottein.

Rôle des interactions sélectine-carbohydate dans l'ADCC des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. Société Française d'Immunologie. Marseille, France. Novembre 1997.

S. Nutten, F. Trottein et M. Capron.

Rôle des molécules d'adhérence dans les interactions hôte-parasite au cours de la schistosomiase. Séminaires Doctoraux, Société Française de Parasitologie / Société Française de Mycologie médicale. Ottrott, France. Mai 1998.

S. Nutten, J-P. Papin, F. Trottein et M. Capron.

Des interactions sélectine/Lewis^x ont un rôle de co-récepteurs dans la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps des éosinophiles vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni*. Réunion inaugurale de la Formation Doctorale en Immunologie. Bruxelles, Belgique. Novembre 1998.

I. Wolowczuk, O. Roye, F. Trottein, **S. Nutten** and **C. Auriault**.

Mécanismes précoces de la réponse immunitaire au cours de l'infection par schistosome : rôle de l'interleukine 7. 2ème réunion biennale de parasitologie. Montpellier, France. Février 1999.

Posters

F. Trottein, **S. Nutten**, J-P. Papin, C. Leportier, and M. Capron.

Lectin-carbohydrate interactions are required for antibody-dependent cytotoxicity of macrophages towards schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the Molecular Parasitology Meeting, VII. pp 232. Marine Biological Laboratory. Woods Hole, MA, USA. Septembre 1996.

I. Wolowczuck, O. Roye, **S. Nutten**, M. Delacre, R. Neveu, F. Trottein, F. Murray, and C. Auriault.

Infection of IL-7 KO mice with the parasite *Schistosoma mansoni*. Société Française d'Immunologie. Paris. Juin 1997.

S. Nutten, F. Trottein, J-P. Papin and M. Capron.

Rôle des interactions sélectine-carbohydate dans la fonction cytotoxique des éosinophiles vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. Société Française d'Immunologie. Marseille, France. Novembre 1997.

S. Nutten, K. Mention, G. Woerly, D. Dombrowicz et M. Capron.

Evolution cinétique des récepteurs Fc et des molécules d'adhérence au cours de la différenciation des éosinophiles *in vitro*. Société Française d'Immunologie, Paris. Novembre 1998.

F. Trottein, **S. Nutten**, V. Angeli, A. Capron and M. Capron.

The role of the adhesion molecules in the cross-talk between schistosomes and its mammalian hosts. Keystone symposia. Th2 cytokines in allergy and helminth infections. Lake Tahoe, Nevada. Janvier 1999.

F. Trottein, **S. Nutten**, V. Angeli, P. Delerive, A. Capron, B. Staels and M. Capron.

The intravascular parasite *Schistosoma mansoni* reduces E-selectin and VCAM-1 expression in TNF- α -stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with NF-kB pathway. Keystone symposia. Inflammatory paradigms and the vasculature. Santa Fe. Février 1999.

Abstract

The role of adhesion molecules has been studied in the host/parasite interactions during schistosomiasis, a parasitic disease that affects 200 millions of people in the world.

In schistosomes, adhesion molecules appear to be important in the development of the parasite as well as in the host defence mechanisms. Among them, the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) necessitates a close contact between the parasitic targets and the effector cells, such as eosinophils. We initially analyzed the evolution of the expression of adhesion molecules on eosinophils in an *in vitro* differentiation model. Then, we investigated the role of adhesion molecules, expressed by human eosinophils, in the ADCC mechanisms. Interestingly, results indicate that, in synergy with Fc receptors, selectins and Lewis^x-related structures can function as important signalling molecules to potentiate cytotoxic reactions between surface receptors. To further elucidate the nature of the interactions between surface receptors, ADCC were performed with chimeric cytotoxic antibodies of different classes. We found that, mAbs directed against Lewis^x and Mac-1 α chain inhibit IgG1-dependent cytotoxicity but not IgA-dependent cytotoxicity. This might be explained, at least in part, by the inhibitory effect of these mAbs on the release by IgG-stimulated eosinophils of Eosinophil Cationic Protein, one of the major mediators involved in parasite target killing. Taken together, these results suggest novel interactions between FcR and selectins and Lewis^x-related structures which might act as co-receptors for eosinophil-mediated cytotoxicity.

The implication of selectin/carbohydrate interactions in eosinophil-dependent ADCC suggests the expression of adhesion molecules on the parasite which could act as counter-receptors of the molecules expressed by eosinophils. We could show by immunostaining that schistosomes could express Le^x and at least one molecule recognized by antibodies directed against human selectins.

The expression of adhesion molecules on schistosome larvae and their functional importance in ADCC prompted us to investigate their role in endothelial cell/parasite interactions. In fact, schistosomes are in close contact with endothelial cells during their life cycle and the accumulation of leukocyte infiltrates in the lung perivascular tissues is a key step in protection against the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*.

Since adhesion molecules expressed on endothelial cells play an important role in immune cell recruitment, it was interesting to test the hypothesis that *Schistosoma mansoni* could regulate the expression of adhesion molecules on endothelial cells *in vitro*. We found that schistosomula, or its excreted/secreted products, selectively down-modulate the TNF- α induced synthesis of E-selectin and VCAM-1 mRNAs and proteins by pulmonary endothelial cells without affecting ICAM-1. Adhesion assays indicated that schistosomula also reduce the VLA-4/VCAM-1 dependent adherence of leukocytes to TNF- α stimulated endothelial cells. This inhibitory effect is transcriptionally regulated and is mediated by a cAMP/protein kinase A pathway that probably interferes with the TNF- α induced NF- κ B pathway.

This could be a novel stratagem for parasites to escape the immune system by controlling leukocyte recruitment to the lungs.

