

Rôle du CD23 dans la production de monoxyde d'azote par les monocytes humains

Nathalie Paul-
Eugène/Dugas
Fateh Ouaz
Djavad M. Mossalayi
Jean-Yves Follézou
Patrice Debré
Jean-Pierre Kolb
Bernard Dugas

L'activation de CD23 (FcεRII) à la surface de monocytes/macrophages humains déclenchée par la liaison de certains anticorps monoclonaux spécifiques, ou d'IgE sous forme complexée multivalente conduit, finalement, à la production de médiateurs pro-inflammatoires. La stimulation du métabolisme de la L-arginine entraîne la formation de L-citrulline et de NO ; ce dernier active une guanylyl cyclase soluble (GCs) qui induit la production de GMPc puis, indirectement, celle d'AMPc. Ces phénomènes sont inhibés par des analogues compétitifs de la L-arginine. L'engagement de la molécule CD23 à la surface des monocytes stimule une *nitric oxide synthase* de type inductible (NOSi), conduisant à la production de TNFα qui agit alors comme facteur autocrine d'amplification. Cette voie, exacerbée dans certaines maladies inflammatoires, semble jouer un rôle important dans la différenciation des cellules du lignage monocyttaire, leur capacité de produire des médiateurs pro-inflammatoires et sur leurs fonctions cytotoxiques, notamment vis-à-vis de micro-organismes à réplication intracellulaire.

ADRESSE

N. Paul-Eugène/Dugas : *chercheur post-doctoral*. Laboratoire neurone-virus et immunité, UFR Kremlin-Bicêtre, 63, rue Gabriel-Péri, 94276 Kremlin-Bicêtre, France. F. Ouaz : *chercheur post-doctoral*. D.M. Mossalayi : *directeur de recherche au Cnrs*. P. Debré : *professeur d'immunologie, directeur de l'Ura Cnrs 625*. B. Dugas : *chercheur*. Ura Cnrs 625, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. J.Y. Follézou : *professeur*. Service de radiothérapie, CHU Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. J.P. Kolb : *directeur de recherche au Cnrs*. Inserm U. 365, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

Le CD23 a été défini à l'origine comme un marqueur d'activation des lymphocytes B [1]. Il a ensuite été identifié au récepteur dit de basse affinité pour les IgE/FcεRII [2], par opposition au récepteur de forte affinité (FcεRI) des mastocytes et basophiles responsable de l'hypersensibilité immédiate [3], qui serait également présent sur les éosinophiles et monocytes de certains patients. La molécule CD23, qui appartient à la famille des lectines de

type C, est une protéine transmembranaire de type II de 45 kDa [4]. Elle existe sous deux isoformes, CD23a et b, résultats d'une différence d'épissage et de l'utilisation alternative d'un exon. Chez l'homme, l'isoforme CD23a est présente de manière constitutive sur les lymphocytes B mûrs avant la phase de commutation isotypique, alors que l'isoforme CD23b est inductible par différentes cytokines, notamment l'interleukine 4 (IL4), sur un certain nombre de cellules comme les lym-

RÉFÉRENCES

1. Kinter C, Sugden B. Identification of antigenic determinants unique to the surfaces of cells transformed by Epstein-Barr virus. *Nature* 1981 ; 294 : 458-61.
 2. Capron A, Dessaint JP, Capron M, Joseph M, Ameisen JC, Tonnel AB. From parasites to allergy : a second receptor for IgE. *Immunol Today* 1986 ; 7 : 15-8.
 3. Adamczewski M, Kinet JP. The high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Chem Immunol* 1994 ; 59 : 173-90.
 4. Kikutani H, Inui S, Sato R, Barsumian E, Owaki H, Yamasaki K, Kaisho T, Uchiyama N, Hardy RR, Hirano T, Tsunasawa S, Sakiyama F, Suemura M, Kishimoto T. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* 1986 ; 47 : 657-65.
 5. Delespesse G, Suter U, Mossalayi D, Bettler B, Sarfati M, Hofstetter H, Kilchherr E, Debré P, Dalloul A. Expression, structure and function of the CD23 antigen. *Adv Immunol* 1991 ; 49 : 149-91.
 6. Kolb J, Génot E, Lagente V, Dugas B. CD23, une molécule plurifonctionnelle. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 486-95.
 7. Sarfati M, Delespesse G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the *in vitro* synthesis of human IgE. *J Immunol* 1988 ; 141 : 2195-9.
 8. Borish L, Mascali JJ, Rosenwasser LJ. IgE-dependent cytokine production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1991 ; 146 : 63-7.
 9. Paul-Eugène N, Kolb JP, Abadie A, Gordon J, Delespesse G, Sarfati M, Mencia-Huerta JM, Braquet P, Dugas B. Ligation of CD23 triggers cAMP generation and release of inflammatory mediators in human monocytes. *J Immunol* 1992 ; 149 : 3066-71.
 10. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992 ; 358 : 505-7.
 11. Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Aubry JP, Graber P, Life P, Paul-Eugène N, Ferrua B, Corbi AL, Dugas B, Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* 1995 ; 3 : 119-25.
- phocytes T, B, monocytes, éosinophiles, plaquettes, cellules de Langerhans de la peau, kératinocytes, etc. [5, 6].
- La fonction biologique du CD23 dépend de la nature de la cellule qui l'exprime. Le CD23 participe à la mise en route et au développement des réactions immunes et inflammatoires. Sous forme membranaire ou soluble, le CD23 contribue en effet, avec l'IL4, à la production d'IgE par les lymphocytes B [7]. Au niveau des monocytes et macrophages, la fixation sur le CD23 d'IgE complexées provoque la libération de médiateurs pro-inflammatoires et contribue au développement des réactions inflammatoires dépendantes des IgE [8, 9]. C'est une molécule d'adhérence intercellulaire qui interagit avec des contre-structures membranaires identifiées récemment, à côté de l'IgE, comme des ligands supplémentaires du CD23. Le CD21 (récepteur du virus d'Epstein-Barr et du C3d), exprimé à la surface des lymphocytes B, des basophiles, des éosinophiles hypodenses et de certaines sous-populations de lymphocytes T, est ainsi reconnu par le CD23, notamment par l'intermédiaire d'un épitope portant un motif fucose [10]. L'existence d'un domaine d'homologie du CD23 avec la famille des lectines de type C laisse supposer que le CD23 pourrait interagir avec d'autres structures glycosylées, en particulier les résidus galactose de certaines glycoprotéines. La présence dans la région C-terminale d'un motif consensus RGD d'adhérence de la fibronectine en configuration inversée présage également des capacités d'adhérence par cette structure. Les molécules CD11b et CD11c constituent, en association avec la chaîne commune CD18 des intégrines β_2 , respectivement, les antigènes CR3 (Mac-1) et CR4 (p150,95). Ces molécules, exprimées à la surface des cellules monocytaires, ont été identifiées récemment comme des récepteurs des fragments solubles du CD23 ou sCD23 [11]. Ces fragments solubles, en particulier la forme stable de 25 kDa, sont des facteurs d'activation et de différenciation pour divers progéniteurs hématopoïétiques [12, 13]. Ces différentes propriétés du CD23 placent cette molécule à l'interface
- de l'immunité non spécifique et spécifique et nous ont conduits à étudier les mécanismes de signalisation *via* le CD23 dans les cellules hématopoïétiques, en particulier les monocytes et les lymphocytes B, et à analyser les conséquences de l'engagement du CD23 sur les activités de ces cellules.

Arguments pour un rôle fonctionnel du CD23 dans l'activation de la NO synthase dans les monocytes humains

Dans des monocytes préalablement incubés pendant 48 heures avec de l'IL4 en vue d'induire l'expression membranaire du CD23, l'engagement de celui-ci, soit par des IgE agrégées, soit au moyen de certains anticorps spécifiques dirigés contre le site de liaison de l'IgE, provoque une montée lente d'AMPc avec un pic à 20 minutes [9], sans activation préalable d'une phospholipase C, à la différence des lymphocytes B [14]. Après avoir éliminé la possibilité que l'augmentation d'AMPc serait due à la stimulation, *via* une protéine Gs hétérotrimérique, d'un récepteur serpentin à sept domaines transmembranaires associé au CD23, nous avons recherché les autres mécanismes qui pourraient rendre compte de cette augmentation d'AMPc. Nous avons établi que dans les monocytes préincubés avec de l'IL4 (CD23⁺), mais pas dans les monocytes quiescents (CD23⁻), la stimulation du CD23 au moyen d'anticorps spécifiques ou d'IgE complexée provoquait une production précoce de GMPc. Celle-ci était inhibée par des inhibiteurs compétitifs de la L-arginine pour la *nitric oxide synthase* (NOS), tels que la nitro L-arginine ou la N^G-monométhyl L-arginine [15]. Rappelons que les NO synthases sont une famille d'enzymes capables, en présence d'oxygène moléculaire, de NADPH et de différents cofacteurs (flavines FMN et FAD, tétrahydrobioptéine BH4) de convertir l'arginine en citrulline avec libération de monoxyde d'azote, NO [16, 17]. Signalons que le groupe de Capron avait déjà observé, dès 1980, une augmentation du taux de GMPc lors de l'activation des macrophages par des IgE myélomateuses agrégées [18].

Cette montée de GMPc s'explique par le fait que l'engagement du CD23 stimule la voie de la NOS, conduisant à la libération de NO; ce dernier, en se fixant sur le groupe prosthétique héminique des guanylyl cyclases solubles provoque leur activation et donc une conversion de GTP en GMPc. Cette accumulation de GMPc est plus précoce que celle d'AMPc, avec un pic à 10 minutes puis un retour au niveau basal après 15 à 20 minutes. Ces événements sont liés fonctionnellement puisqu'ils sont tous deux inhibés, à des degrés divers, par des inhibiteurs de la NO synthase. Cela suggère que l'accumulation d'AMPc découle, en partie du moins, de celle du GMPc, probablement par l'intermédiaire du réseau des phosphodiésterases des nucléotides cycliques.

Le problème de l'existence de la voie NO dans les monocytes humains

Depuis plusieurs années, la production de NO par les monocytes humains a fait l'objet de vives controverses. Du fait de l'impossibilité de stimuler la production de NO par les monocytes humains avec les *stimuli* classiques utilisés pour les macrophages de rongeurs, certains auteurs ont conclu qu'il était impossible d'activer la voie du NO dans ces cellules et différents arguments ont été avancés pour tenter de comprendre les raisons de cette différence interspèces. Des rapports en nombre croissant suggéraient toutefois qu'il était effectivement possible de stimuler cette voie dans les monocytes humains au moyen d'extraits bactériens ou viraux, de cellules tumorales ou de combinaisons particulières de cytokines [19]. Certains de ces résultats n'apportant que des preuves indirectes ou s'avérant difficiles à reproduire du fait d'une grande variabilité dans les réponses individuelles des monocytes de différents donneurs – les êtres humains ne sont pas des lignées pures... – le scepticisme a subsisté. La détection par RT-PCR d'ARNm extraits de cellules monocytaires humaines et codant pour des isoformes présentant 99 %

d'analogie avec les NOS de type II (inductible, NOSi) et III (constitutive, de type endothélial) a commencé à ébranler ce dogme [20]. La détection des protéines NOS par différentes techniques immunochimiques et la mesure directe des activités catalytiques de conversion de l'arginine en citrulline, notamment sur des monocytes mais aussi sur des lignées monocytaires, a maintenant établi définitivement l'existence de cette voie dans les cellules monocytaires humaines [21]. Il reste vrai que la régulation de cette activité est encore mal connue, même si elle fait l'objet actuellement de recherches intensives. On sait maintenant que la région promotrice du gène codant pour la NOSi humaine ne contient pas les mêmes éléments de réponse que celui codant pour la NOSi murine [22] et, dès lors, il n'est pas surprenant que son expression soit réglée par des *stimuli* ou des combinaisons de *stimuli* différents de ceux des rongeurs. Malgré la présence d'une boîte TATA dans la région promotrice, de multiples sites de départ de la transcription ont été observés. L'existence d'épissage alternatif dans la région 5' non traduite de l'ARNm de la NOSi humaine est source également de diversité. Les transcrits formés indépendamment de la boîte TATA sont augmentés par diverses cytokines, indiquant une particulière complexité de la régulation de la synthèse de cette enzyme [23], ce qui explique les difficultés de sa mise en évidence. En outre, la mesure de nitrite/nitrate comme critère de production de NO n'est peut-être pas très adaptée dans le cas des macrophages, le NO produit pouvant être complexé rapidement sous forme de dérivés nitrosothiols ou nitrotyrosine au détriment de la formation de nitrite/nitrate.

Si la possibilité de stimuler la voie NO dans les monocytes/macrophages humains est maintenant établie avec certitude, il subsiste encore de grandes incertitudes quant aux mécanismes moléculaires gouvernant la synthèse des NOS (ARNm et protéine) dans ces cellules et la régulation de leur activité catalytique. La notion selon laquelle l'activité des NOSi serait exclusivement réglée au niveau transcriptionnel est probablement une vue simplifiée de la réalité.

Caractéristiques de la stimulation de la voie NO par ligation du CD23 dans les cellules monocytaires humaines

La stimulation, par engagement du CD23, de l'accumulation de GMPc dans les cellules monocytaires humaines induites à produire cette molécule s'effectue en quelques minutes. Cela indique qu'une NOS est déjà présente dans ces cellules et que le pontage du CD23 déclenche des événements qui vont augmenter son activité catalytique. Cependant, la ligation du CD23 ne provoque pas de montée de calcium (au moins dans les monocytes normaux) et l'augmentation observée de GMPc est (relativement) résistante à la chélation du calcium et aux inhibiteurs de calcium/calmoduline, excluant la possibilité de stimulation d'une NOS constitutive *via* une augmentation transitoire de la concentration de calcium libre ionisé. Cela suggère donc que le CD23 stimule l'activité catalytique d'une NOSi, co-induite par le traitement destiné à favoriser l'expression du CD23. De fait, nous avons montré que l'IL-4, utilisée pour induire la synthèse du CD23 sur les monocytes, est elle-même capable de stimuler une activité NOS dans les monocytes humains, surtout en costimulation avec l'IFN- γ [24]. Dans le cas particulier de l'IL4, il faut noter que cette cytokine, seule et surtout après action de l'IFN γ [19], stimule précocement la voie de la NOS. Nous avons observé que l'IL4 provoquait effectivement une faible induction de la NOSi; par ailleurs, en induisant la production du CD23 membranaire, l'IL4 permet à celui-ci, par interaction avec l'IgE et probablement avec ses autres ligands, d'augmenter l'activation de cette voie de la NO synthase. Nous avons montré que les effets inducteurs de l'IL4 sont inhibés en présence de fragments Fab d'anticorps monoclonaux anti-CD23, confirmant ainsi l'implication du CD23 dans la production de NO par les monocytes circulants.

La ligation du CD23 induit également une augmentation, tardive, de nitrite/nitrate dans les surnageants des monocytes ainsi activés. Nous avons observé, par RT-PCR quantita-

RÉFÉRENCES

12. Mossalayi MD, Lecron JC, Dalloul AH, Sarfati M, Bertho JM, Hofstetter H, Delespesse G, Debré P. Soluble CD23 (FcεRII) and IL1 synergistically induce early human thymocytes maturation. *J Exp Med* 1990; 171 : 959-64.
13. Mossalayi MD, Arock M, Bertho JM, Blanc C, Dalloul AH, Sarfati M, Hofstetter H, Delespesse G, Debré P. Proliferation of human myeloid precursors induced by interleukin1 and recombinant soluble CD23. *Blood* 1990 ; 75 : 1924-9.
14. Kolb JP, Abadie A, Paul-Eugène N, Sarfati M, Capron M, Dugas B, Delespesse G. Ligation of CD23 triggers cyclic AMP generation in human B lymphocytes. *J Immunol* 1993 ; 150 : 4798-809.
15. Paul-Eugène N, Kolb JP, Sarfati M, Arock M, Ouaz F, Debré P, Mossalayi MD, Dugas B. Ligation of CD23 activates soluble guanylyl cyclase in human monocytes via an L-arginine-dependent mechanism. *J Leuk Biol* 1995 ; 57 : 160-7.
16. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43 : 109-42.
17. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992 ; 6 : 3051-64.
18. Dessaint JP, Waksman BH, Metzger H, Capron A. Cytophilic binding of IgE to the macrophage. III. Involvement of cyclic GMP and calcium in macrophage activation by dimeric or aggregated rat myeloma IgE. *Cell Immunol* 1980 ; 51 : 280-92.
19. Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leuk Biol* 1994; 55: 682-4.
20. Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernst M, Flad HD, Hauschildt S. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol* 1994 ; 24 : 1941-4.
21. Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi MD. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of FcεRII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 (sous presse).

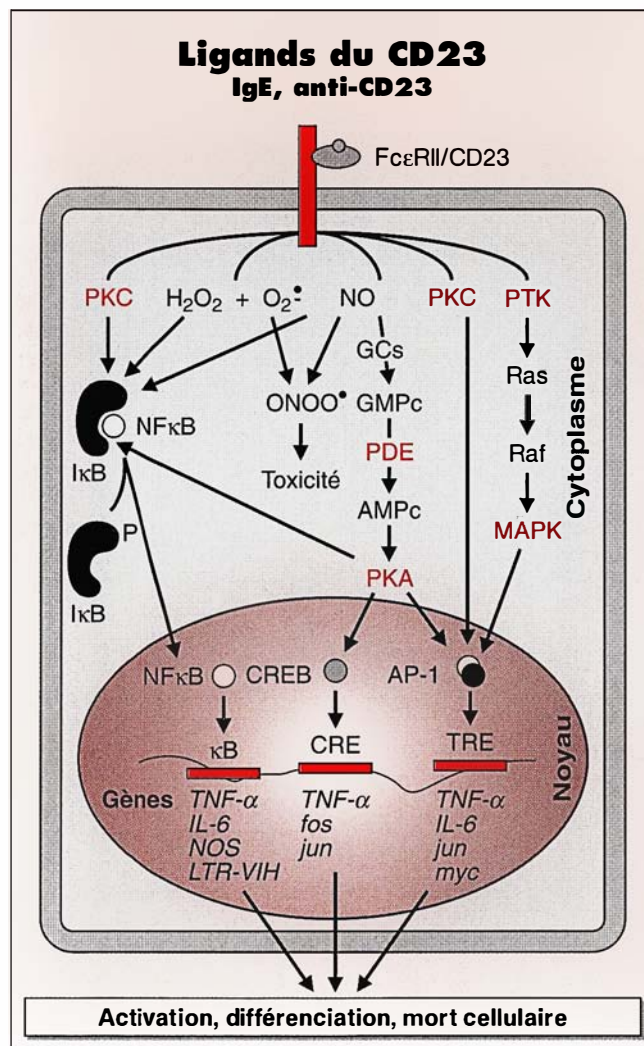


Figure 1. Mécanismes de transmission associés à la stimulation du CD23 à la surface des monocytes/macrophages humains. La stimulation du CD23 induit simultanément plusieurs voies de transmission: (1) l'activation des protéine kinases C (PKC); (2) le système NADPH oxydase qui permet la production de dérivés nitrés et de peroxy-nitrites $ONOO^{\cdot}$ et conduit à une phase toxique; (3) la voie des tyrosine kinases (PTK); et (4) la voie du monoxyde d'azote (NO). La stimulation de ces différentes voies règle l'activation de différents gènes et/ou d'enzymes conduisant à l'activité biologique. $NF\kappa B$: facteur de transcription retenu dans le cytoplasme par $I\kappa B$ à l'état quiescent; $ONOO^{\cdot}$: peroxy-nitrite; GCs: guanylate cyclases solubles; PDE: phosphodiesterases; PKA: protéine kinase stimulée par l'AMPc; CRE: cyclic AMP response element; CREBP: CRE binding protein; TRE: TPA response element, site de liaison du facteur AP-1 qui est un hétérodimère Jun/Fos; LTR-VIH: long terminal repeat du VIH, contenant les séquences régulatrices du virus.

tive, que l'engagement du CD23 déclençait une augmentation marquée de la synthèse de l'ARNm de la NOSi, ainsi que de celle de la protéine, décelée par immunohistochimie ou Western blot. Cette amplification est relayée en fait par le $TNF\alpha$, dont nous avons déjà montré qu'il était produit par les monocytes stimulés

par la ligation du CD23. Par ailleurs, des résultats récents de notre groupe indiquent que la ligation du CD23, outre l'activation de la NOS, engendre la production de différentes cytokines exerçant des rétroactions négatives sur la synthèse de la NOSi. Nous proposons donc le schéma de la figure 1, résumant ces événements.

La stimulation du métabolisme des nucléotides cycliques précède l'activation du facteur nucléaire de transcription NFκB [25] qui, seul ou en association avec l'AMPc, induit la transcription du gène codant pour le TNFα et la production de cette cytokine [25, 26]. Cette production de TNFα, provoquée par l'engagement du CD23 membranaire, amplifie la réponse initiale en augmentant l'expression de la NOSi et en potentialisant la production de NO. Cela peut conduire, après réaction avec l'oxygène moléculaire ou avec l'anion superoxyde produit de façon concomitante par la stimulation d'une NADPH oxydase, à la formation de dérivés nitrés et/ou de peroxy-nitrite (ONOO⁻) et à une phase toxique, induisant notamment la mort cellulaire par apoptose. Le peroxy-nitrite est un puissant agent d'oxydation qui peut conduire, comme l'a montré le groupe de Beckman, à la formation du radical hydroxyl OH[•], extrêmement toxique, et donc à des dommages importants dans les constituants cellulaires. L'existence d'un système enzymatique de peroxydases capables de désactiver le peroxy-nitrite a été suggérée. Il a été démontré que la myéloperoxydase (MPO), la peroxydase de raifort, la lactoperoxydase et la catalase pouvaient réagir rapidement avec le peroxy-nitrite pour former, dans le cas de la MPO, un complexe appelé MPO-II. La MPO pourrait ainsi protéger du peroxy-nitrite et augmenter la durée de vie du NO. D'autres systèmes de régulation négative de la génération de NO ou de peroxy-nitrite, tels que la lactoferrine, ont également été suggérés. De plus, un certain nombre de cytokines telles que l'IL4, l'IL10, l'IL13 et le TGFβ peuvent conduire à l'inactivation de la voie de la NO-synthase, bloquant ainsi sa toxicité.

Cependant, et conformément à ce qui a été déjà décrit dans le modèle murin, l'IL4 exerce aussi une activité suppressive sur les monocytes déjà préactivés *in vitro* ou *in vivo*. En effet, l'IL4, ajoutée après la phase d'induction du CD23 membranaire, inhibe les effets ultérieurs provoqués par la ligation de cette molécule, et notamment la stimulation de la voie NO.

Outre l'activation de la voie NO, la fixation de l'IgE sur le CD23 stimule

la production de médiateurs pro-inflammatoires par les monocytes, les éosinophiles et les plaquettes [2]. L'engagement du CD23 à la surface des monocytes conduit, non seulement à la production de NO et de TNFα [18], mais également à celle d'autres cytokines telles que l'IL1β, l'IL6 et au relâchement de médiateurs lipidiques comme le thromboxane B₂ (TxB₂) ou le leucotriène B₄ (LTB₄) [9]. Signalons aussi que des inducteurs d'AMPc, tels que les agonistes β-adrénergiques, potentialisent la sécrétion d'IL6 et de TxB₂ induite par l'engagement du CD23. Cette régulation par les agents β-adrénergiques n'est vraisemblablement pas fortuite, car il existe une innervation adrénergique au niveau de la plupart des tissus lymphoïdes. Ces événements sont corrélés à une augmentation d'AMPc et liés à la production de NO, car supprimés en présence d'inhibiteurs compétitifs de la voie du NO. Des analogues permanents de l'AMPc reproduisent en partie les mêmes phénomènes.

Un modèle hypothétique d'activation de diverses voies de signalisation après interaction du CD23 avec l'un ou l'autre de ses ligands est présenté sur la *figure 1*. Pour l'instant, cela n'a été démontré formellement que pour la liaison avec des anticorps monoclonaux ou avec des IgE complexées, mais il est vraisemblable que l'interaction de CD23 avec d'autres contre-structures (CD21, CD11b, CD11c) soit capable de déclencher des phénomènes similaires. Bien qu'il s'agisse d'un résultat controversé, il semblerait que NO soit capable d'activer NFκB, par inactivation de l'inhibiteur IκB, soit directement, soit *via* l'activation de sérine/thréonine kinase, PKC ou PKA [20]. Par ailleurs, en se fixant sur leur groupe prosthétique hémique, NO stimule l'activité des guanlyl cyclases solubles (GCs), conduisant à la formation de GMPc et, secondairement, par le réseau des phosphodiesterases des nucléotides cycliques, à celle d'AMPc. Ce dernier est capable ensuite de stimuler une PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc), aboutissant à l'activation de CREB (*cAMP responsive element binding factor*) et du complexe AP-1 (Jun/Fos) (*m/s n° 4, vol. 7, p. 506*). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de l'expression de diffé-

rents gènes dont celui codant pour le TNF-α ainsi que celui codant pour la NOSi qui comporte des éléments de réponse à ces facteurs dans son site promoteur [21]. La production auto-crine de TNF-α ainsi déclenchée contribuerait à amplifier la voie de la NO synthase. La voie de stimulation des protéine tyrosine kinases pourrait être également impliquée, le groupe de Yodoï ayant montré par des expériences de transfection l'association de l'isoforme CD23a avec Fyn, un membre de la famille Src. Une possible association, sur les monocytes, de l'isoforme CD23b à des membres de la famille Src est donc envisageable.

Nous avons montré, en outre, que le traitement séquentiel de cellules promonocytaires et monocytaires par l'IL4 pour induire le CD23, suivi de l'engagement du CD23, entraîne une maturation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules. Dans la lignée promonocytaire U937, on observe ainsi l'acquisition du marqueur monocytaire CD14 et l'augmentation des chaînes α (CD11a) et β₂ (CD18) de la molécule d'adhérence LFA-1 (*leucocyte functional antigen-1*). Des cellules leucémiques d'un patient atteint de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) ont répondu *in vitro* à ce traitement séquentiel par une différenciation vers un stade monocyte/macrophage, avec perte du marqueur promonocytaire CD33, induction de CD14 et de LFA-1, acquisition de la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène et des médiateurs de l'inflammation, ces événements dépendant absolument de la production de NO et d'AMPc [22]. Ce processus présente donc des implications thérapeutiques potentielles pour la reprise de la différenciation des cellules de LAM.

Nos résultats ont été confirmés par le groupe de Moncada, qui a observé que l'activité NO synthase déclenchée dans les monocytes humains par ligation du CD23 était strictement corrélée à la quantité de CD23 membranaire de ces cellules (S. Moncada et V. Riveros-Moreno, communication personnelle). Signalons aussi que la stimulation de la voie NO par ligation du CD23 a été retrouvée dans les macrophages de rat [27], ainsi que dans les éosinophiles et les kératinocytes humains.

Conséquences physiopathologiques de la production de NO par les monocytes humains après stimulation du CD23

L'augmentation de la synthèse et/ou de la libération du CD23 dans certaines maladies (allergies, parasitoses, polyarthrite rhumatoïde, etc.) laisse entrevoir dans ces affections un rôle fonctionnel de ce récepteur et, plus particulièrement, du NO ainsi produit.

NO joue un rôle fonctionnel dans l'établissement des réponses cellulaires dépendant des IgE. Tout d'abord, il a été démontré que NO influençait la production d'IgE, au moins *in vitro*. Cette implication de la voie du NO fut suggérée par le fait que des inhibiteurs compétitifs de l'arginine pour les NOS inhibaient significativement la production d'IgE induite dans les cellules mononucléées humaines par une dose optimale d'IL4. Par ailleurs, la petite production d'IgE observée en présence d'une faible concentration d'IL4 (dose sous-optimale) était potentialisée en présence d'agents stimulant le métabolisme de l'AMPc (agonistes β -adrénergiques, inhibiteurs de phosphodiésterases de l'AMPc) ou celui du GMPc (donneur chimique de NO, tel que le Sin-1 ou le nitroprusiate de sodium). En revanche, ces agents inhibaient la production d'IgE par les cellules mononucléées humaines normales lorsque celles-ci étaient stimulées par une concentration optimale d'IL4. Ces observations suggéraient un rôle biphasique de NO sur la production d'IgE, stimulant à faible concentration et éventuellement inhibiteur à plus forte concentration. La « suractivation » de la voie NO pourrait donc conduire à un effet toxique de celui-ci, notamment en induisant la génération de peroxy-nitrite. Cette notion de zone d'activité du NO est importante et illustrée dans la *figure 2*. En effet : (1) en dessous d'un certain seuil de concentration, l'effet du NO engendré resterait limité aux cellules productrices et à une action de second messager, indispensable au bon fonctionnement de certaines voies biologiques; (2) au-dessus de ce seuil, le NO produit diffusant en dehors des

cellules productrices pourrait interagir avec les cellules environnantes et contrôler ainsi un certain nombre de fonctions immunes et inflammatoires et (3) lorsque cette production augmente encore, on entre dans une phase de toxicité du NO, notamment par production de peroxy-nitrite, pouvant conduire à la perte de certaines fonctions biologiques et à la mort cellulaire.

Dans certaines maladies inflammatoires chroniques, telles que l'allergie ou la polyarthrite rhumatoïde, la modification du niveau de ces seuils d'activité du NO pourrait conduire au développement de poussées inflammatoires plus ou moins importantes. Du fait d'une augmentation du CD23 à leur surface, les cellules inflammatoires peuvent accroître leur production de seconds messagers et/ou médiateurs qui vont régler les fonctions immunologiques des tissus concernés. C'est plus particulièrement le cas dans le cadre de l'hypersensibilité de type IV ou retardée. En effet, la production massive de ces seconds messagers et/ou médiateurs consécutive à la mise en contact de l'agent inducteur peut et va conduire à une réponse immune et à la production de cytokines pro-inflammatoires, soit du type Th₁ (IL2, IFN γ ...) ou Th₂ (IL4, IL5...), sur lesquelles le NO joue, par ailleurs, un rôle régulateur [28]. Cette production de seconds messagers, de médiateurs et/ou de cytokines peut aller jusqu'à la formation retardée d'œdème et à l'infiltration de cellules inflammatoires et immunocompétentes dans les tissus inflammatoires. Lorsqu'ils sont de forte amplitude, ces phénomènes peuvent altérer gravement les tissus. Tous ces événements démontrent que, dans le cas de l'hypersensibilité de type IV, l'étude préalable du « statut » inflammatoire d'un tissu considéré pourra permettre d'évaluer l'impact de cet environnement sur l'orientation du système immunitaire à produire tel ou tel type de cytokine et/ou d'immunoglobuline. Dans le cas de la peau, on peut envisager la participation des kératinocytes ou des cellules de Langerhans, qui peuvent synthétiser le CD23 après stimulation par l'IL4 ou l'IFN γ , dans le déterminisme de la réponse immunitaire locale

RÉFÉRENCES

- Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nüssler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 6765-72.
- Chu SC, Wu HP, Banks TC, Eissa NY, Moss J. Structural diversity in the 5'-untranslated region of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase mRNA. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 10625-30.
- Kolb JP, Paul-Eugène N, Abadie A, Yamaoka KA, Drapier JC, Dugas B. IL4-stimulates cGMP production in normal IFN γ -activated human monocytes. Involvement of the NO-synthase pathway. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 9811-6.
- Ouazz F, Sola B, Issaly F, Kolb JP, Davi F, Mentz F, Arock M, Paul-Eugène N, Körner M, Dugas B, Debré P, Mossalayi MD. Growth arrest and terminal differentiation of leukemic myelomonocytic cells induced by interleukin 4 and CD23-MoAb. *Blood* 1994 ; 84 : 3095-104.
- Mossalayi MD, Paul-Eugène N, Ouazz F, Arock M, Kolb JP, Kilchherr E, Debré P, Dugas B. Involvement of Fc ϵ R2/CD23 and L-arginine-dependent pathway in IgE-mediated stimulation of human monocyte functions. *Int Immunol* 1994 ; 6 : 931-4.
- Alonso A, Carvalho J, Alonso-Torre SR, Nunez L, Bosca L, Sanchez Crespo M. Nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages is induced by IgE/DNP complexes and cyclic AMP analogues. Evidence in favour of a common signaling mechanism. *J Immunol* 1995 ; 154 : 6475-83.
- Liew FY, Li Y, Severn A, Millot S, Schmidt J, Salter M, Moncada S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th₂) of a Th₁ cell activity via the modulation of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 1991 ; 21 : 2489-94.
- Dugas B, Mossalayi DM, Damais C, Kolb JP. Nitric oxide production by human monocytes. Evidence for a role of CD23. *Immunol Today* 1996 (sous presse).
- Vouldoukis I, Issaly F, Fourcade C, Paul-Eugène N, Arock M, Kolb JP, Alves da Silva O, Monjour L, Poinot H, Tselentis Y, Debré P, Dugas B, Mossalayi MD. CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. *Res Immunol* 1994 ; 145 : 17-27.

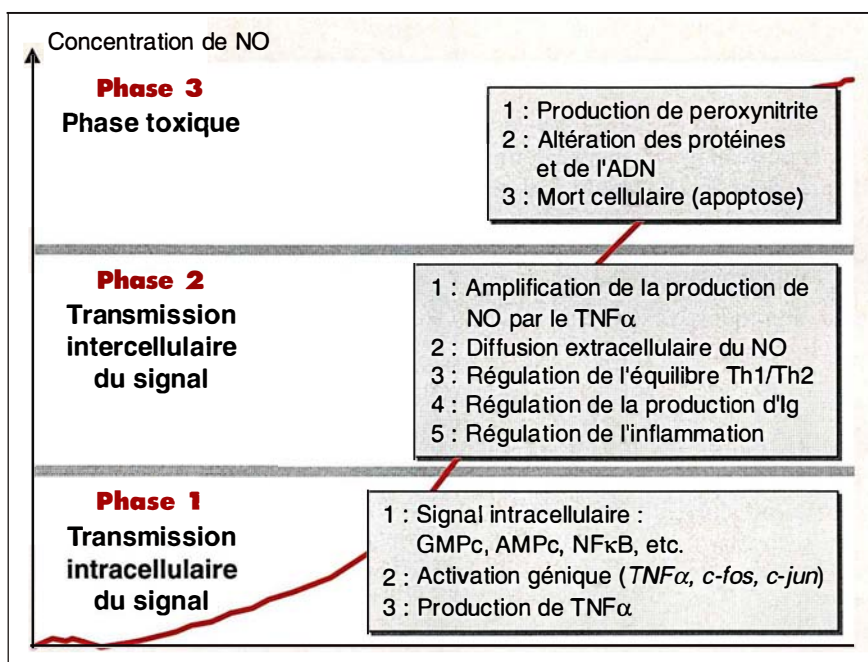


Figure 2. Les fonctions biologiques du NO produit par les monocytes/macrophages humains se décomposent en 3 phases, correspondant à des quantités croissantes de NO. (1) transmission intracellulaire du signal; (2) transmission intercellulaire du signal; (3) phase toxique.

(figure 2). Ce type de raisonnement peut être étendu à d'autres tissus dans lesquels la production de CD23 se trouverait augmentée dans le cadre de syndromes inflammatoires.

Pour d'autres affections, telles que la leishmaniose cutanée, il est aussi possible de montrer que la quantité de CD23 est augmentée à la surface des monocytes et que l'engagement de cette molécule conduit à la production de TNF α selon un mécanisme dépendant de la génération du NO et que, par ce mécanisme, on élimine la réplication intracellulaire des parasites ([29, 30] et résultats non publiés).

La production de NO par les cellules de type phagocytaire peut donc conduire au développement de maladies inflammatoires mais pourrait aussi contribuer à l'élimination de certains parasites selon des mécanismes impliquant le CD23.

Conclusion

Le CD23, par fixation des IgE engendrées au cours d'une réponse immunitaire, ou par son interaction avec ses autres ligands et contre-structures

putatifs, se pose fortement en candidat à la régulation de la production de NO par différents types cellulaires (monocytes, éosinophiles, kératinocytes, etc.). L'activation d'une telle voie métabolique au travers du CD23 laisse entrevoir un rôle nouveau de ce type de récepteur dans le déclenchement et le développement de diverses réponses biologiques, physiologiques (différenciation) ou

pathologiques (production de cytokines, de médiateurs ou induction d'une toxicité moléculaire et/ou cellulaire). Des études sont en cours pour définir l'importance de cette voie dans le développement de certaines affections ■

TIRÉS À PART

N. Paul-Eugène/Dugas.

Summary

Functional role of the CD23 molecule in the generation of nitric oxide by human monocytes

The binding of specific anti-CD23 mAbs or IgE immune complexes to the CD23 molecule, expressed at the membrane of human monocytes/macrophages, was found to trigger intracellular signalling which ultimately leads to the production of pro-inflammatory mediators. An activation of L-arginine metabolism was observed resulting in nitric oxide (NO) and citrulline generation. The NO produced activated the soluble guanylyl cyclase and the formation of cGMP (5-10 min), followed by an increase in cAMP (15-20 min). These events were largely inhibited in the presence of L-arginine analogues, such as L-NMMA. The engagement of the CD23 molecule was found by immunochemical methods to stimulate the expression of an inducible nitric oxide synthase. TNF α , which is induced by CD23 ligation, contributes to the increased iNOS expression through an autocrine loop of amplification. This pathway, which is exacerbated in some inflammatory diseases, seems to play an important role in the control of the differentiation of cells of the monocytic lineage, in their capacity to release pro-inflammatory mediators and in their cytotoxic functions.