



**HAL**  
open science

# LES EOSINOPHILES : EFFECTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTI-MYCOBACTERIENNE

Virginie Driss

► **To cite this version:**

Virginie Driss. LES EOSINOPHILES : EFFECTEURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTI-MYCOBACTERIENNE. Immunologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00370300

**HAL Id: tel-00370300**

**<https://theses.hal.science/tel-00370300>**

Submitted on 24 Mar 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université du Droit et de la Santé**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2**

Discipline Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**DRISS Virginie**

Le 18 décembre 2008

**LES EOSINOPHILES : EFFECTEURS DE LA REponse  
IMMUNITAIRE INNEE ANTI-MYCOBACTERIENNE**

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Isabelle Maridonneau-Parini	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Luc Imler	Rapporteur
Madame le Docteur Valérie Quesniaux	Examinateur
Monsieur le Professeur Lionel Prin	Examinateur
Madame le Professeur Monique Capron	Directeur de thèse

INSERM U547

« Schistosomiase, Paludisme et Inflammation »

Université Lille 2

Institut Pasteur de Lille



**Université du Droit et de la Santé**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2**

Discipline Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**DRISS Virginie**

Le 18 décembre 2008

**LES EOSINOPHILES : EFFECTEURS DE LA REPONSE  
IMMUNITAIRE INNEE ANTI-MYCOBACTERIENNE**

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Isabelle Maridonneau-Parini	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Luc Imler	Rapporteur
Madame le Docteur Valérie Quesniaux	Examineur
Monsieur le Professeur Lionel Prin	Examineur
Madame le Professeur Monique Capron	Directeur de thèse

INSERM U547

« Schistosomiase, Paludisme et Inflammation »

Université Lille 2

Institut Pasteur de Lille





## REMERCIEMENTS

### *Aux membres du jury*

Je remercie très sincèrement le Docteur Isabelle Maridonneau-Parini (Toulouse) et le Professeur Jean-Luc Imler (Strasbourg) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également le Docteur Valérie Quesniaux (Orléans) et le Professeur Lionel Prin (Lille) d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

### *A madame le Professeur Monique Capron*

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche et de m'avoir offert votre confiance et les collaborations nécessaires qui m'ont permis de mener ce travail très librement. Cette thèse répond à certaines questions et en suscite naturellement d'autres. Ce travail contribue à renforcer l'idée que les éosinophiles, dont la fonction a été très longtemps restreinte à une activité effectrice participant à l'immunité adaptative au cours des infections parasitaires, puissent jouer un rôle primordial dans la défense innée. Enfin, merci pour toutes nos discussions très enrichissantes à la fois d'un point de vue professionnel mais aussi personnel.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'ensemble des membres de l'équipe « mécanismes effecteurs » et de l'unité Inserm U547 pour sa bonne humeur. Ces quatre années auront décidément passé très vite !

## TABLE DES MATIERES

CURRICULUM VITAE .....	IX
ABREVIATIONS .....	XIII
CADRE DU TRAVAIL .....	XIV
RESUME.....	XV
SUMMARY .....	XVI
INTRODUCTION.....	1
I. Le polynucléaire éosinophile .....	1
I.1. Découverte .....	1
I.2. Description des éosinophiles.....	1
I.2.1. Morphologie.....	1
I.2.2. Ontogénie et localisation.....	3
I.2.3. Recrutement des éosinophiles.....	5
I.2.3.1. Molécules d'adhérence .....	5
I.2.3.2. Recrutement au cours de l'homéostasie.....	6
I.2.3.3. Recrutement dans les conditions inflammatoires .....	6
I.3. L'éosinophile : une cellule à potentialités multiples.....	7
I.3.1. L'éosinophile : un lien entre la réponse innée et la réponse adaptative.....	7
I.3.2. Récepteurs et sécrétion de cytokines .....	10
I.3.3. Interactions avec d'autres types cellulaires : fonctions immunorégulatrices des éosinophiles.....	11
I.3.4. Cytotoxicité.....	13
I.3.4.1. Protéines de granules .....	13
I.3.4.1.1. Description .....	13
I.3.4.1.2. Mécanismes de dégranulation.....	15
I.3.4.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	16
I.3.5. Activation et modulation des éosinophiles .....	16
I.3.5.1. Modifications phénotypiques.....	16
I.3.5.2. Les récepteurs inhibiteurs/activateurs.....	17
I.3.5.3. Plasticité fonctionnelle des éosinophiles .....	17
I.4. Rôles des éosinophiles en pathologies .....	18
I.4.1. Eosinophiles et Syndrome HyperEosinophile (SHE) .....	18
I.4.2. Eosinophiles et réponses inflammatoires et allergiques .....	19
I.4.3. Eosinophiles et immunité anti-tumorale .....	20
I.4.4. Eosinophiles et infections .....	20
I.4.4.1. Infections parasitaires .....	21
I.4.4.2. Infections virales.....	22



II.4.3.1.5.2. Les lymphocytes CD8 <sup>+</sup> .....	54
II.4.4. Les mécanismes moléculaires .....	55
II.4.4.1. Les récepteurs Toll-Like (TLRs) .....	55
II.4.4.1.1. Les ligands .....	56
II.4.4.1.2. Les voies de signalisation .....	58
II.4.4.1.3. Rôles dans les infections mycobactériennes .....	59
II.4.4.1.4. Cross-talk entre TLRs et autres PRRs .....	60
II.4.4.2. L'enveloppe mycobactérienne, un immunomodulateur .....	61
II.4.4.2.1. Les ligands mycobactériens activateurs .....	62
II.4.4.2.2. Les ligands mycobactériens régulateurs .....	62
II.4.4.2.2.1. Les protéines .....	62
II.4.4.2.2.2. Les glycolipides .....	63
II.4.5. Mécanismes potentiels d'échappement des mycobactéries .....	65
II.4.5.1. Inhibition de la fusion du phagolysosome .....	66
II.4.5.2. Neutralisation des mécanismes antimicrobiens .....	66
II.4.5.3. Modulation de la présentation antigénique .....	67
II.4.6. Réponse de type Th2 et tuberculose .....	67
OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	70
RESULTATS .....	73
<b>Article n°1</b> : « Interaction entre les éosinophiles et les mycobactéries, dépendante de TLR2 : rôle des $\alpha$ -défensines » .....	73
<b>Article n°2</b> : « Les éosinophiles humains expriment le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ » .....	75
<b>Résultats complémentaires</b> : « Rôle du récepteur au complément CR3 dans l'activation des éosinophiles en réponse à différentes espèces mycobactériennes .....	81
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	90
CONCLUSION .....	110
BIBLIOGRAPHIE .....	113
ANNEXES .....	139

## CURRICULUM VITAE

### Virginie DELTOMBE-DRISS

44 rue des Martyrs  
Appt. 102, 1<sup>er</sup> étage  
59113 Seclin France  
Tél : 06.89.52.69.66  
[virginie.driss@free.fr](mailto:virginie.driss@free.fr)

Née le 12 février, 1980  
Nationalité française  
Mariée, 1 enfant

### PARCOURS PROFESSIONNEL

- 2004-2008 : Institut Pasteur de Lille, France  
U547, Inserm-Université Lille2  
Pr. M. CAPRON  
**Projet de recherche** : Etude des nouvelles fonctions des éosinophiles dans l'immunité innée : - rôle de TLR2 et du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  dans les interactions éosinophiles/*M. bovis* BCG.  
- implication des défensines dans l'activité anti mycobactérienne des éosinophiles
- 2004 (5 mois) : Institut de Biologie de Lille, France  
U629 Inserm  
Dr. F. JACOB-DUBUISSON  
**Projet de recherche** : Expression de l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis* en vue de sa cristallisation

### FORMATION

- 2005-2008 : Thèse de Doctorat d'immunologie, Lille 2
- 2004-2005 : Master 2 recherche Biologie-Santé, Lille 2 (mention très bien)
- 2003-2004 : Maîtrise de Génétique et Microbiologie, Lille 1 (mention assez bien)
- 2002-2003 : Licence de biologie cellulaire et physiologie, Lille 1 (mention bien)

### ACTIVITES DE RECHERCHE CLINIQUE ET D'ENSEIGNEMENT

- 2008 : Encadrement d'une étudiante en Master professionnel  
Stage de 6 mois
- 2007-2008 : Encadrement d'étudiants en Licence 3 et Master 1 de Pharmacie  
Stage d'initiation à la recherche de 1 mois
- 2005-2008 : -Réseau national Eosinophile dirigé par le Pr. L. Prin  
Inclusion de patients diagnostiqués HES « *Hyper Eosinophilic Syndrome* »  
Activité de recherche sur les éosinophiles des patients inclus dans ce protocole

-Laboratoire Associé Européen en partenariat avec le Pr. M. Goldman et le Dr. F. Roufosse  
-Membre de la Société Française d'Immunologie et du Club Francophone des Cellules Dendritiques

## TECHNIQUES

**Biologie cellulaire** : culture de lignées cellulaires et de cellules primaires, différenciation à partir de cellules primaires ou de cellules du sang de cordon, utilisation de la cytométrie en flux (Becton Dickinson FACSCalibur), purification de cellules (gradients de densité, sélection magnétique), chimiotactisme par système Transwell, chimioluminescence (Perkin Elmer Victor)

**Microbiologie** : culture de bactéries

**Biologie moléculaire** : Extraction d'ARN, d'ADN, de protéines, PCR classique, reverse-transcription PCR, real-time PCR, PCR single cell, Southern blot, Northern blot, Western blot, immunoprécipitation

**Biochimie**: Kits ELISA

**Microscopie** : immunofluorescence, microscopie photonique, à épifluorescence (LEITZ DMRB, Leica)

## ARTICLES ET REVUES PUBLIES

« **TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria : role of  $\alpha$ -defensins** »  
Driss V\*, Legrand F\*, Hermann E, Loiseau S, Guerardel Y, Kremer L, Adam E, Woerly G, Dombrowicz D and Capron M, *Blood, sous presse*

\*:V.D. and F.L. contributed equally to this work.

« **Innate immune function of eosinophils: from anti-parasite to anti-tumor cells** »

Legrand, F., Woerly, G., Driss, V. & Capron, M.  
Methods in Molecular Biology, volume 415, Humana Press  
Chapitre sur invitation.

## ARTICLES EN COURS

« **Eosinophils express a  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex mediating reactivity towards mycobacteria and cytotoxicity against tumor cells** »

Legrand F\*, Driss V\*, Woerly G, Loiseau S, Hermann E, Fournié JJ, Bertout J, Mattot V, Soncin F, Dombrowicz D§ and Capron M§, *soumis pour publication*

§ DD and MC equally contributed to this manuscript

\*:V.D and F.L. contributed equally to this work.

« **Eosinophils : new effectors in innate immunity**»

Driss V., Legrand F. and Capron M, *soumis pour publication*

« **Human eosinophils exert potent cytotoxic activity towards a colorectal carcinoma cell line** »

Legrand F\*, Driss V\*, Loiseau S, Hermann E, Dombrowicz D and Capron M, *en préparation*

\*:V.D and F.L. contributed equally to this work

« **Eosinophils induce lung inflammation in the absence of lymphocytes through IFN- $\gamma$  production** »

Kanda A., Driss V., Abdallah M., Roumier T., Abboud G., Legrand F., Staumont-Sallé D., Quéant S., Fleury S., Rémy P., Papin J-P., Julia V., Capron M., and Dombrowicz D., *soumis pour publication*

CONGRES & SEMINAIRES

- Mai 2008 : “Role of eosinophils in innate immunity”, communication orale  
Capron, M., Driss, V., Legrand, F., Dombrowicz, D.  
*Collegium Internationale Allergologicum 27<sup>th</sup> Symposium, Curaçao, NETHERLANDS*
- Décembre 2007 : “Eosinophils and innate immunity against mycobacteria : role of Toll-like receptors”, communication orale  
*Ve journée formation doctorale en immunologie, LEA, Lille, FRANCE*
- Septembre 2007 : “Implication of eosinophils in innate immunity to mycobacteria : role of Toll-like receptors”, communication orale  
Driss, V., Legrand, F., Hermann, E., Loiseau, S., Guerardel, Y., Kremer, L., Dombrowicz, D. and Capron, M.  
*Journée André Verbert, Lille, FRANCE*
- Juillet 2007 : “Direct *Mycobacterium bovis*-BCG recognition by human eosinophils involves Toll-like receptor 2 and triggers alpha-defensin production”, poster  
Driss, V., Legrand, F., Hermann, E., Loiseau, S., Guerardel, Y., Kremer, L., Dombrowicz, D. and Capron, M.  
*International Eosinophil Society, 5th biennial Symposium, Snowboard, UTAH, USA*
- Mars 2007 : “Tumoricidal activity of human eosinophils: new effective players in tumor immunity ?”, poster  
Legrand, F., Driss, V., Woerly, G., Loiseau, S., Dombrowicz, D., Prin, L., Capron, M.  
*International meeting ‘Death, Danger and Immunity’, Paris, FRANCE*
- Septembre 2006 : “Eosinophils: new effectors in antitumor immunity”, poster  
Legrand, F., Woerly, G., Hermann, E., Driss, V., Loiseau, S., Prin, L. & Capron, M.  
“Implication of eosinophils in innate immunity to mycobacteria : role of Toll-like receptors”, poster  
Driss, V., Hermann, E., Woerly, G., Legrand, F., Guerardel, Y., Kremer, L., Loiseau, S. & Capron, M.  
*16<sup>th</sup> European Congress of Immunology Under the auspices of EFIS, Paris, FRANCE.*
- Mars 2006: “Implication of eosinophils in innate immunity to mycobacteria”, oral communication  
*National network of eosinophil, Department of immunology, Eurasante Park, Lille, FRANCE*



- Février 2006 : “Gamma delta T cells and *Listeria monocytogenes*”, communication orale  
*Institut Pasteur de Lille, FRANCE*
- Septembre 2005: “Interactions eosinophil/BCG”, communication orale  
*IVe journées formation doctorale en immunologie, LEA, Gosselies, BELGIQUE*
- Juillet 2005 : “Eosinophil activation by danger signals” , communication orale  
Driss, V., Legrand, F., Woerly, G., Dombrowicz, D. & Capron, M.  
*The XXIVth Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), The XIXth World Allergy Organization Congress (WAO), Munich, GERMANY*
- Juin 2005 : “Eosinophils in innate immunity : interactions with mycobacteria”, communication orale  
Woerly, G., Driss, V., Legrand, F., Dombrowicz, D. & Capron, M.  
*4<sup>th</sup> Biennial Congress of the International Eosinophil Society, Bern, SWITZERLAND*
- Mars 2005 : “Role of eosinophils in innate immunity to mycobacteria”, poster  
Driss, V., Woerly, G., Legrand, F., Loiseau, S., Hermann, E. & Capron, M.  
*Institut Pasteur de Lille, FRANCE*

## ABREVIATIONS

<b>ADCC</b>	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante d'Anticorps
<b>BCG</b>	Bacille Calmette et Guérin
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigène
<b>CR</b>	Récepteur au Complément
<b>DC</b>	Cellule Dendritique
<b>ECP</b>	Protéine Cationique de l'Eosinophile
<b>EDN</b>	Neurotoxine Dérivée de l'Eosinophile
<b>EPO</b>	PerOxydase de l'Eosinophile
<b>IL-</b>	InterLeukine
<b>IFN-</b>	InterFéroN
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>LAM</b>	LipoArabinoMannane
<b>LM</b>	LipoMannane
<b>MAP</b>	Protéine kinase Activée par les Mitogènes
<b>MBP</b>	Protéine Basique Majeure
<b>MR</b>	Récepteurs au Mannose
<b>NF</b>	Facteur Nucléaire
<b>NK</b>	Natural Killer (tueur naturel)
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern (Motifs moléculaires associés aux pathogènes)
<b>PAR</b>	Récepteur Activé par des Protéases
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>RNI</b>	Reactive Nitrogen Species (espèces réactives de l'azote)
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
<b>SHE</b>	Syndrome HypErosinophilique
<b>TCR</b>	Récepteur des Cellules T
<b>TLR</b>	Récepteur Toll-Like
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor

## **CADRE DU TRAVAIL**

Notre travail s'intègre dans la thématique de recherche de l'unité U547 Inserm-Université Lille 2, Institut Pasteur de Lille « Schistosomiase, Paludisme et Inflammation » dirigée par Madame le Professeur Monique Capron, où ont été extensivement étudiés les mécanismes effecteurs du polynucléaire éosinophile.

Grâce à l'étude des infections parasitaires, l'activité cytotoxique des éosinophiles a pu être démontrée au laboratoire vis-à-vis des larves de schistosomes ou schistosomules. Le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) anti-schistosomule dépend de l'activation des éosinophiles par des IgE et des IgA. Ces travaux sur la fonction effectrice des éosinophiles en présence d'anticorps ont permis d'identifier de nouveaux récepteurs de membrane exprimés sur les éosinophiles, comme les récepteurs pour l'IgE et pour l'IgA ainsi que la nécessité de co-récepteurs telles les molécules d'adhérence. La démonstration que les éosinophiles pouvaient être activés par des immunocomplexes à IgE ou à IgA et libérer, de manière sélective, des médiateurs hautement cytotoxiques a conduit à considérer les fonctions potentielles de l'éosinophile au cours de la réaction allergique et plus généralement dans les réponses inflammatoires. C'est au cours de ces travaux, notamment sur la maladie coeliaque et la maladie de Crohn, que nous avons démontré que les éosinophiles pouvaient sécréter différentes cytokines, participant ainsi à la régulation de la réponse immune, qu'elle soit de type Th2 ou Th1. Parallèlement, il devait être démontré que les éosinophiles possédaient à leur surface des récepteurs partagés avec les cellules présentatrices d'antigènes (CD86, CMHII), ou avec les lymphocytes T (CD4, CD25, CD28).

Une analyse de la littérature révèle que les éosinophiles, cellules de très ancien lignage, sont présents dans certains tissus à l'état physiologique et sont capables d'intégrer des « signaux de danger » délivrés par des cellules stressées ou des pathogènes comme les bactéries, suggérant ainsi que les éosinophiles puissent participer à des processus fondamentaux de défense innée. Il est intéressant de souligner que si une hyperéosinophilie est souvent observée au cours des helminthiases ou dans un contexte allergique, les éosinophiles peuvent également être présents en grand nombre dans le sang périphérique et/ou dans les tissus au cours d'infections mycobactériennes. La découverte récente, dans notre laboratoire, que les éosinophiles humains pouvaient exprimer le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ , dont un des ligands est représenté par des phosphoantigènes exprimés par les mycobactéries, nous

a ainsi conduits à étudier les interactions entre les éosinophiles et les mycobactéries, notamment en caractérisant les mécanismes impliqués dans les processus de défense innée.

Notre travail s'inscrit donc au cœur de l'évolution des concepts concernant le polynucléaire éosinophile, autrefois considéré uniquement comme cellule effectrice dans l'immunité adaptative au cours des parasitoses et des allergies, rejoignant maintenant les différentes cellules participant à l'immunité innée, vis-à-vis de pathogènes comme les bactéries ainsi que dans les processus antitumoraux.

### **Collaborations :**

Les éosinophiles purifiés à partir du sang prélevé chez des patients atteints du syndrome hyperéosinophilique (SHE) ont été obtenus dans le cadre d'un Réseau National « Réséopil » en étroite collaboration avec le Professeur Lionel Prin (EA2686, Département d'Immunologie, CHRU Lille, France).

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec le Docteur Laurent Kremer (CNRS UMR 5235, Université Montpellier II, France), notamment pour l'identification des ligands mycobactériens reconnus par les éosinophiles. La purification de ces composants a été réalisée en collaboration avec le Docteur Yann Guerardel (CNRS UMR 8576, Villeneuve d'Ascq, France).

Le Docteur Camille Locht (U629 Inserm-IPL) a fourni la souche initiale de *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 utilisée dans cette étude. *M. smegmatis* a été donnée par le Docteur Pablo Bifani (U629 Inserm-IPL) et *M. chelonae* par le Docteur Laurent Kremer (UMR 5235, CNRS).

### **Financements :**

Ces trois années de thèse ont été financées grâce à une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et ont bénéficié de divers financements de fonctionnement : Institut Universitaire de France, fonds FEDER (Syndromes Hyperéosinophiles), Unité 547 Inserm-Université Lille2.

# RESUME

Les éosinophiles sont des cellules à fonctionnalités multiples, impliquées dans de nombreux processus effecteurs et inflammatoires. Ils expriment à leur surface de nombreux récepteurs participant à l'immunité adaptative, mais aussi à l'immunité innée et libèrent, après activation, différents médiateurs, dont des protéines hautement cytotoxiques et des cytokines. Leur fonction exacte dans la réponse immunitaire innée reste encore inconnue. Outre leur présence au cours de certains processus granulomateux retrouvés lors de la schistosomiase ou dans la maladie de Crohn, une accumulation d'éosinophiles a été observée au sein de granulomes pulmonaires dans différents modèles d'infections mycobactériennes.

L'objectif de notre travail a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans les interactions entre les éosinophiles humains et *Mycobacterium bovis* BCG, choisi comme modèle de mycobactéries.

Après avoir démontré l'activité chimiotactique du BCG vis-à-vis des éosinophiles nous avons ensuite montré que les éosinophiles pouvaient, après activation en présence de BCG, produire des espèces réactives de l'oxygène et libérer la peroxydase de l'éosinophile par dégranulation. La mise en évidence de l'expression membranaire des récepteurs Toll-like (TLR) 2 et 4 sur les éosinophiles nous a permis de démontrer l'implication majoritaire de TLR2 dans l'interaction éosinophiles/BCG ainsi que l'activation des voies MAP kinases et de la voie NF- $\kappa$ B. Enfin, nous démontrons que les éosinophiles sont capables d'exercer une fonction cytotoxique vis-à-vis du BCG, mécanisme faisant intervenir à la fois des défensines et la protéine cationique de l'éosinophile (ECP).

Dans la continuité de la démonstration de l'expression par les éosinophiles de molécules partagées avec les lymphocytes T, nous nous sommes intéressés à d'autres molécules pouvant être impliquées dans les interactions éosinophiles/BCG, et plus particulièrement celles participant à l'immunité innée. C'est ainsi que, grâce à différentes approches de cytométrie en flux, de biochimie et de biologie moléculaire, nous avons mis en évidence l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  à la surface d'une sous-population d'éosinophiles, puis nous avons montré la fonctionnalité de ce récepteur, après activation par des anticorps monoclonaux spécifiques ou des ligands physiologiques. Enfin, nous avons démontré, en utilisant des anticorps neutralisants ou un inhibiteur spécifique que CD3/TCR $\gamma\delta$  participe à l'activation des éosinophiles induite par le BCG.

Ce travail représente la première étude extensive des mécanismes intervenant dans les interactions entre éosinophiles humains et *M. bovis* BCG. Il ouvre des perspectives nouvelles quant à la fonction des éosinophiles dans l'immunité innée, impliquant de manière originale deux récepteurs différents : TLR2 et CD3/TCR $\gamma\delta$ . Nos résultats suggèrent également que les éosinophiles expriment des molécules de la famille des défensines, qui vient s'ajouter à leur arsenal cytotoxique et qui agirait en synergie avec l'ECP. En conclusion, ces résultats suggèrent que les éosinophiles puissent reconnaître directement des signaux de danger, incluant les mycobactéries, et, comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ , représenter un nouveau lien entre immunité innée et immunité adaptative.

## SUMMARY

Eosinophils are multifunctional leukocytes involved in various inflammatory processes. Recent studies provide evidence that eosinophils exert multiple functions due to the expression of a wide range of receptors and to produce both Th1- and Th2-type cytokines upon stimulation. Eosinophil accumulation within granuloma was reported in schistosomiasis and Crohn disease, or different models of mycobacterial infections. The role of eosinophils in mycobacterial pathogenesis remains poorly defined. The aims of this study were to demonstrate a direct interaction of human eosinophils with mycobacteria and to analyse the mechanisms involved.

We demonstrate that *M. bovis* BCG attracts and activates eosinophils *in vitro*. Indeed, eosinophils produce Reactive Oxygen Species (ROS) and EPO release in the presence of BCG. We report here that only TLR2, but not TLR4 is involved in eosinophil/ BCG interactions through activation of MAP kinase and NF- $\kappa$ B signalling pathways. Finally, we show that eosinophils can exert cytotoxic functions against BCG through production of defensins. Because eosinophils express various surface receptors shared with Tcells such as CD25, CD4, CD28 and several members of the CD2 family, including 2B4, we have studied other receptors could involved in eosinophil/*M. bovis* BCG interactions. Here we show, by flow cytometry, immunofluorescence and confocal microscopy that a variable proportion of human eosinophils express CD3 and  $\gamma\delta$  T Cell Receptor (TCR). Moreover,  $\gamma\delta$ TCR/CD3 is involved in activation of eosinophils with *Mycobacterium*.

This work represents the first demonstration of a direct interaction between human eosinophils and *M. bovis*-BCG and suggests a novel role for eosinophils in TLR2-and CD3/ $\gamma\delta$ TCR mediated innate immunity. Furthermore, defensins act as a novel cytotoxic pathway for eosinophils. In conclusion, these results suggest that eosinophils interact with danger signals including mycobacteria, and are a link between innate and adaptive immunity.

## *Introduction*

# INTRODUCTION

## I. Le polynucléaire éosinophile

### I.1. Découverte

L'éosinophile a été décrit et identifié par Paul Ehrlich (1854-1915) qui, pour la première fois en 1866, a documenté les caractéristiques physiques de cette cellule après avoir mis au point leur coloration par l'éosine. L'éosine, colorant acide rouge-orangé (du grec *Eos* signifiant « aurore »), se fixe aux protéines fortement basiques des éosinophiles. Durant les dix années qui suivirent cette découverte, les éosinophiles ont été mis en évidence chez des patients atteints de diverses maladies : asthme (1889), ankylostomiase (1891), maladies de la peau (1892), processus malins (1893) et trichinose (1893). Jusqu'en 1914, pas moins de 2758 articles ont mentionné le terme « éosinophiles ». Cependant, pendant plus de 50 ans, les connaissances sur les maladies associées à une éosinophilie sanguine ou tissulaire, ou sur la fonction des éosinophiles n'ont guère évolué. En effet, il était difficile à l'époque d'obtenir une quantité suffisante d'éosinophiles humains sauf dans les cas d'éosinophilie majeure. Différentes stratégies furent employées par les laboratoires notamment l'utilisation de modèles animaux (cheval, cobaye, rat, souris) pour tenter d'étudier les éosinophiles. Les programmes d'études concernant les patients atteints d'éosinophilie ne commencèrent réellement que dans les années 70. De plus, depuis la découverte des éosinophiles, des outils de plus en plus performants ainsi que plusieurs méthodes permettant d'isoler et d'étudier leurs propriétés ont été développées et ont permis de mieux caractériser ces cellules.



### I.2. Description des éosinophiles

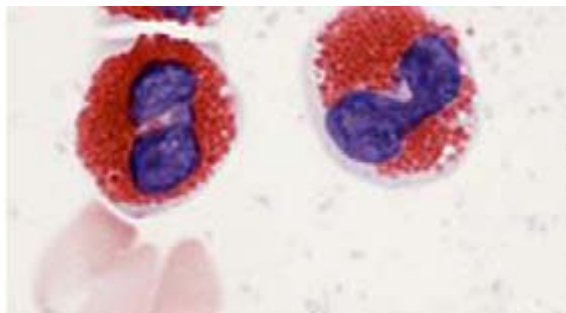
#### I.2.1. Morphologie

L'éosinophile, leucocyte faisant partie de la famille des granulocytes comprenant également les neutrophiles et les basophiles, mesure entre 8 et 12  $\mu\text{m}$ . Il se distingue des

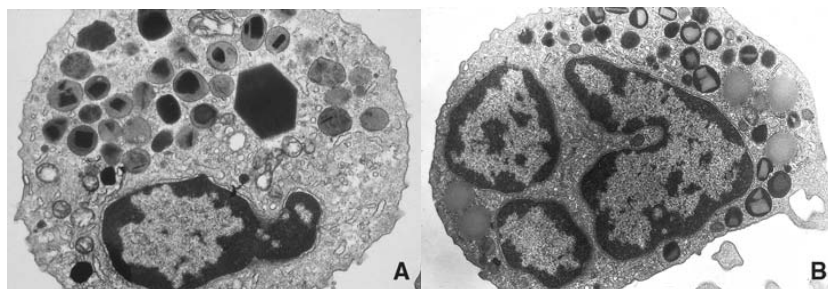


autres granulocytes par son noyau bilobé et ses nombreux granules, dont certains possèdent des corps cristalloïdes, mis en évidence en rouge-orangé par une coloration classique au May Grünwald Giemsa (**Figure 1 A**). Toutefois, dans certaines conditions, selon l'état de maturation et d'activation, des éosinophiles hypodenses, très peu granuleux et vacuolés peuvent être observés (**Figure 1 B**). L'utilisation d'une réaction enzymatique spécifique à la peroxydase est utilisée pour identifier et déterminer l'état de maturation des éosinophiles. Le précipité foncé formé en présence de peroxydase mature résistante au cyanure peut permettre notamment d'apprécier la maturation des éosinophiles. Quatre types de granules ont été identifiés dans les éosinophiles : les granules primaires, les granules secondaires (ou spécifiques), les petits granules et les micro-granules (Gleich *et al.* 1986; Kroegel *et al.* 1994; Kroegel *et al.* 1994; Streck 1997)

A.



B.



**Figure 1** : (A) Polynucléaires éosinophiles humains colorés au May Grünwald Giemsa en microscopie optique. (B) Hétérogénéité des éosinophiles en microscopie électronique. A gauche figure un éosinophile normodense et à droite un éosinophile hypodense caractérisé par l'apparition de vacuoles liées à la libération des granules dans le milieu extracellulaire et à l'augmentation du nombre des corps lipidiques. (Rosenberg *et al.* 2007)

Les granules primaires, ronds et denses au microscope électronique, sont formés à un stade précoce de la différenciation dans la moëlle osseuse. Ces granules, contenant la lysophospholipase, ne comportent pas de noyau cristalloïde mais peuvent se condenser pour former les cristaux de Charcot-Leyden.

Les granules secondaires ou spécifiques se distinguent au microscope électronique par un noyau cristalloïde dense et une matrice elliptique moins dense. Les granules spécifiques se retrouvent chez l'éosinophile mature et sont responsables de la coloration à l'éosine qui permet l'identification de cette cellule au microscope optique. Ces granules morphologiquement caractéristiques de l'éosinophile comportent des protéines cationiques réparties dans la matrice : la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et la peroxydase de l'éosinophile (EPO) ; et dans le core : la protéine basique majeure (MBP).

Les petits granules sont invisibles en microscopie optique, ils dérivent de l'appareil de Golgi et contiennent des complexes enzymatiques incluant l'aryl sulfatase et la phosphatase acide.

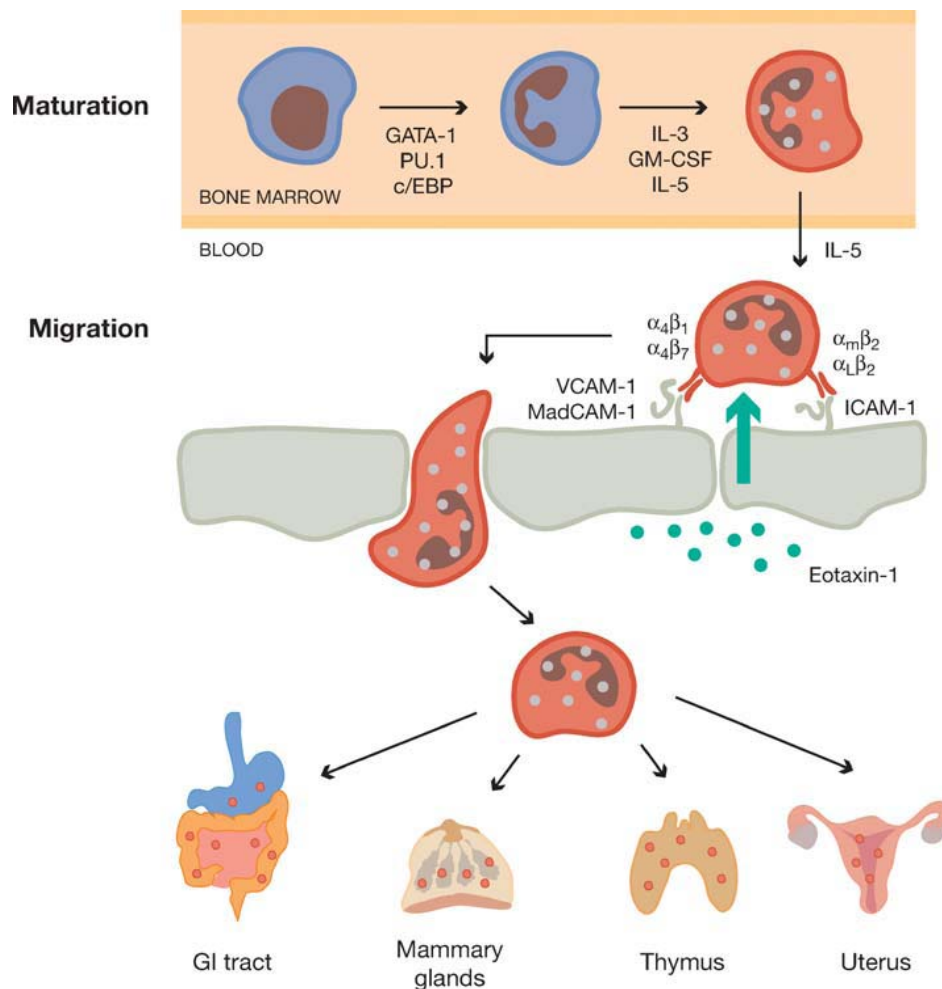
Les micro-granules sont un constituant du système de transport tubulo-vésiculaire.

### **I.2.2. Ontogénie et localisation**

Les polynucléaires éosinophiles se développent et mûrissent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur hématopoïétique exprimant CD34 (**Figure 2**). Sous l'influence de cytokines telles le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5, ce précurseur totipotent va donner naissance à un précurseur multipotent puis à un précurseur hybride à l'origine des lignées basophiles et éosinophiles (Rothenberg *et al.* 2006). Chez l'homme, quatre jours sont nécessaires pour la différenciation et le stockage médullaire de l'éosinophile mature. Trois facteurs de transcription interviennent dans le développement des éosinophiles : GATA-1 (famille des facteurs à doigt de Zinc), PU.1 (membre de la famille ETS) et C/EBP  $\alpha$  et  $\epsilon$  (CCAAT/enhancer-binding protein family). GATA-1 possède une activité unique et spécifique au sein des éosinophiles puisqu'il agit en synergie avec PU.1 alors que dans les autres lignées GATA-1 antagonise les effets de PU.1. La délétion du site palindromique de fixation de GATA-1 à son propre promoteur chez la souris abolit spécifiquement la lignée éosinophile (Yu *et al.* 2002). De plus, ce site de fixation est également présent dans les régions régulatrices des gènes codant CCR3, la MBP et la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-5. Ces facteurs de transcription semblent donc importants pour la différenciation vers la lignée éosinophile mais aussi pour l'expression des protéines de granules.

Les éosinophiles ne représentent que 1 à 3 % des cellules sanguines chez un individu sain. Leur demi-vie dans le sang est brève et ne dépasse pas 18 heures, ce qui explique les

difficultés d'obtention et de purification d'éosinophiles de sujets sains. Les éosinophiles matures sont principalement localisés dans les tissus à l'état physiologique, notamment à l'interface avec l'environnement tels que le tractus gastro-intestinal, uro-génital ou pulmonaire mais aussi au sein des organes lymphatiques et hématopoïétiques, y compris le thymus. Ces tissus constituent des endroits de renouvellement tissulaire important. Les éosinophiles, une fois dans les tissus, peuvent survivre plusieurs semaines (Rothenberg *et al.* 1987). Il pourrait alors exister un lien entre la présence d'éosinophiles dans les tissus lésés et la réparation au cours d'infections. En cas de réaction inflammatoire, les éosinophiles sont redistribués et quittent leurs sites primaires pour atteindre les foyers inflammatoires.



**Figure 2 : Recrutement tissulaire des éosinophiles.** Les éosinophiles se développent dans la moëlle osseuse où ils se différencient à partir d'un progéniteur hématopoïétique sous le contrôle de différents facteurs de transcription, GATA-1, PU.1 et c/EBP et sous l'influence des trois éosinopoïétines GM-CSF, IL-3 et IL-5. Les éosinophiles matures passent dans le sang et sont recrutés au site de l'inflammation par des sélectines et des intégrines. Ils migrent ensuite vers les tissus sous l'influence de chimiokines et de leucotriènes. Dans des conditions homéostatiques, les éosinophiles rejoignent le thymus, les glandes mammaires, l'utérus et le tractus gastro-intestinal (Rothenberg and Hogan 2006).

### I.2.3. Recrutement des éosinophiles

#### I.2.3.1. Molécules d'adhérence

L'éosinophile exprime à sa surface des molécules d'adhérence importantes pour sa migration du sang vers les tissus. Elles peuvent être regroupées en deux familles principales: les sélectines et les intégrines.

Les sélectines sont impliquées dans l'étape de roulement de l'éosinophile à la surface de l'endothélium vasculaire. La L-sélectine est exprimée constitutivement par l'éosinophile et lui permet d'interagir avec les molécules Glycam-1, MadCAM-1 et CD34 présentes à la surface des cellules endothéliales (Baumhueter *et al.* 1994). L'éosinophile interagit également avec la P-sélectine de l'endothélium via la glycoprotéine sialylée PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ou CD162) (Edwards *et al.* 2000). Une autre molécule peut également jouer un rôle dans l'étape de roulement sur l'endothélium : CD15 (ou sialyl-Lewis x), un lacto-fucopentaose III surtout exprimé sur les éosinophiles normodenses, permet aux éosinophiles de reconnaître les sélectines de l'endothélium (Sato *et al.* 1994).

Les intégrines sont des hétérodimères formés de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ayant pour ligands des récepteurs de la famille des immunoglobulines. La liaison intégrine-récepteur résultante est de plus forte affinité que la liaison sélectine-ligand et renforce l'adhérence de la cellule à l'endothélium. Les éosinophiles expriment des intégrines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 7$ . Les intégrines  $\beta 1$  sont principalement VLA-2 (CD49b), -4 (CD49d), -5 (CD49e) et -6 (CD49f). VLA-6 et VLA-4 sont les mieux connues. VLA-6 a pour ligand la laminine. VLA-4 a pour ligand VCAM-1 et la fibronectine (Bochner *et al.* 1991). Certains chimioattractants comme RANTES (Regulated upon Activation in Normal T cells Expressed and Secreted) et MCP-3 renforcent les interactions entre VLA-4 et ses ligands. Parmi les intégrines  $\beta 2$ , les éosinophiles expriment surtout CD11a, b et c associés au CD18. Ces intégrines ont pour ligand ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule) principalement pour CD11a/CD18 et CD11b/CD18 tandis que CD11c/CD18 a pour ligand le fibrinogène (Hartnell *et al.* 1990). Les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  seraient surtout impliquées dans le recrutement des éosinophiles au sein des poumons et de la peau (Mishra *et al.* 2002). L'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , co-exprimée par les lymphocytes et les éosinophiles, est la principale intégrine qui permet le recrutement de ces cellules au niveau du tractus gastro-intestinal. Cette intégrine se fixe à MadCAM-1, molécule d'adhérence exprimée sur les cellules endothéliales des capillaires des ganglions lymphatiques, de la lamina propria ou des plaques de Peyer.

L'ensemble de ces molécules d'adhérence permet donc le roulement et l'attachement de l'éosinophile à l'endothélium et facilite également le passage à travers celui-ci.

### **I.2.3.2. Recrutement au cours de l'homéostasie**

A l'état physiologique, les éosinophiles sont recrutés au niveau tissulaire, après un bref séjour dans le sang, grâce à la chimiokine CCL11 (ou éotaxine-1) exprimée principalement par les cellules épithéliales. D'autres cellules peuvent aussi produire cette chimiokine : les mastocytes, les macrophages alvéolaires, les éosinophiles eux-mêmes, les fibres musculaires lisses bronchiques et l'endothélium vasculaire. L'éotaxine agit en activant son récepteur, le CCR3, exprimé par les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les lymphocytes Th2. Ainsi, le recrutement des éosinophiles dans le thymus est régulé par l'éotaxine-1 qui est constitutivement exprimée dans cet organe (Jia *et al.* 1996).

Le recrutement des éosinophiles dans l'utérus est régulé par l'IL-5 cependant, chez des souris déplétées en IL-5, une population résiduelle d'éosinophiles persiste suggérant l'existence de mécanismes indépendants de l'IL-5 (Robertson *et al.* 2000). En effet, l'expression d'éotaxine-2, RANTES et MIP1- $\alpha$  est augmentée parallèlement à l'infiltration des éosinophiles dans l'utérus (Zhang *et al.* 2000; Gouon-Evans *et al.* 2001).

### **I.2.3.3. Recrutement dans les conditions inflammatoires**

L'infiltration des éosinophiles est un phénomène très précoce. Elle précède celle de nombreuses autres cellules. Ceci peut s'expliquer par l'infiltration tissulaire physiologique (200 fois plus d'éosinophiles tissulaires que d'éosinophiles sanguins) et par leur spécificité de réponse à des facteurs précoces de l'inflammation. Le recrutement tissulaire des éosinophiles au niveau du site de l'inflammation s'effectue sous la dépendance de cytokines et de chimiokines. Les principaux récepteurs de chimiokines exprimés par les éosinophiles sont CCR3, CCR1, CCR2 et CXCR3. L'expression de CCR3 induit la migration des éosinophiles sous l'action de l'éotaxine (CCL11), MCP-4 (Monocyte Chemotactic Protein) (CCL13) et RANTES (CCL5) (Daugherty *et al.* 1996). CCR1 lie également RANTES et peut lier MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MCP-3 (CCL7). CCR2 est le récepteur de MCP-1 (CCL2). Il a été retrouvé sous forme d'ARN messager et de protéine transmembranaire sur ces cellules (Dunzendorfer *et al.* 2001). CXCR3 est préférentiellement exprimé par les lymphocytes activés ou mémoire mais existe aussi sur les éosinophiles et a pour ligand  $\gamma$  IP-10 (IFN- $\gamma$ -inductible Protein-10) et

l'IFN- $\gamma$ . Son expression à la surface est diminuée par l'IL-10 et augmentée par l'IL-2. Après une stimulation par l'IL-5, les éosinophiles expriment d'autres récepteurs de chimiokines, le CXCR4, CCR5, CCR6, et CCR8 (Hogan *et al.* 2008). De plus, les éosinophiles sont par eux-mêmes capables de libérer des chimiokines comme CCL11 (éotaxine), CCL5 (RANTES), IL-8, MCP-1 et MIP1- $\alpha$ , et de participer ainsi à leur propre recrutement. Ces polynucléaires expriment des récepteurs pour le Facteur Activateur des Plaquettes (PAF), la prostaglandine D2 (CRTH2), les leucotriènes B4, D4 et E4, l'histamine et les protéines du complément, notamment les anaphylatoxines C3a et C5a, qui jouent également un rôle chimiotactique pour les éosinophiles (Decot *et al.* 2006).

### **I.3. L'éosinophile : une cellule à potentialités multiples**

L'éosinophile exprime en surface de multiples récepteurs qui lui confèrent un rôle important au sein de la réponse immunitaire. L'éosinophile pré-activé et recruté a ainsi la possibilité d'exprimer localement de nouveaux récepteurs de surface et d'augmenter le nombre ou l'affinité de récepteurs pré-existants. En fonction des signaux de l'environnement, les éosinophiles acquièrent la capacité d'infiltrer les tissus par diapédèse, avant d'interagir avec l'environnement inflammatoire et tissulaire.

#### **I.3.1. L'éosinophile : un lien entre la réponse innée et la réponse adaptative**

A l'instar des cellules dendritiques, qui constituent un lien entre l'immunité innée et adaptative, les éosinophiles expriment des récepteurs considérés soit comme innés, soit comme adaptatifs (**Figure 3**).

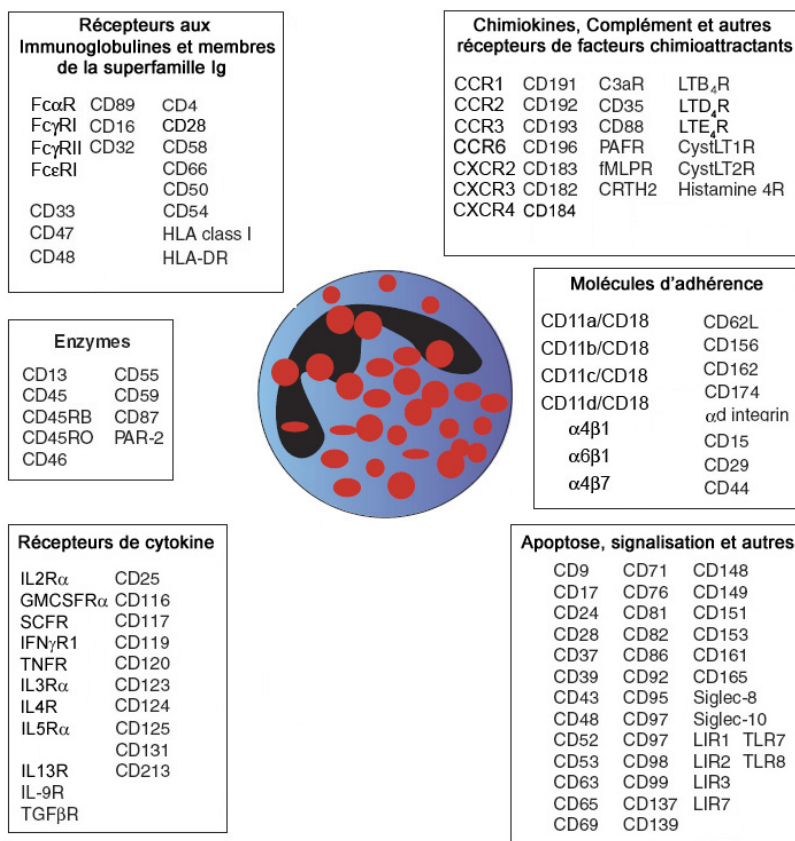


Figure 3 : Les récepteurs exprimés par les éosinophiles. Figure adaptée de (Hogan *et al.* 2008).

Plusieurs récepteurs récemment identifiés permettent aux éosinophiles d'être stimulés directement par des composés environnementaux ou encore par des motifs moléculaires communs à plusieurs pathogènes. Certaines protéases d'acariens, de champignons ou de pollens sont capables d'activer directement les éosinophiles par clivage de la partie N terminale des récepteurs PAR (Protease Activated Receptors) couplés à des protéines G. Les éosinophiles expriment PAR-1 à leur surface, et PAR-2 dans le cytoplasme (Bolton *et al.* 2003; Miike *et al.* 2003). Sous l'action de ces protéases, l'éosinophile libère des radicaux libres et des leucotriènes proinflammatoires. PAR-2 est impliqué dans l'activation de l'éosinophile par un champignon de l'air ambiant (genre *Alternaria*) (Inoue *et al.* 2005). Les éosinophiles expriment également des récepteurs pour les chimiokines et les médiateurs lipidiques mais aussi des récepteurs pour le complément (CR1 et CR3) dont l'activation provoque la dégranulation (Fischer *et al.*, 1986). Les éosinophiles expriment une molécule capable de lier les IgE : la galectine 3 encore appelée MAC2 / εBP. Cette lectine de type S, médie une cytotoxicité dépendante des IgE efficace envers des cibles parasitaires (Truong *et al.* 1993). Elle pourrait aussi intervenir dans l'immunité innée en reconnaissant des pathogènes. En effet, sur les macrophages, la galectine-3, en coopération avec TLR2, se lie à

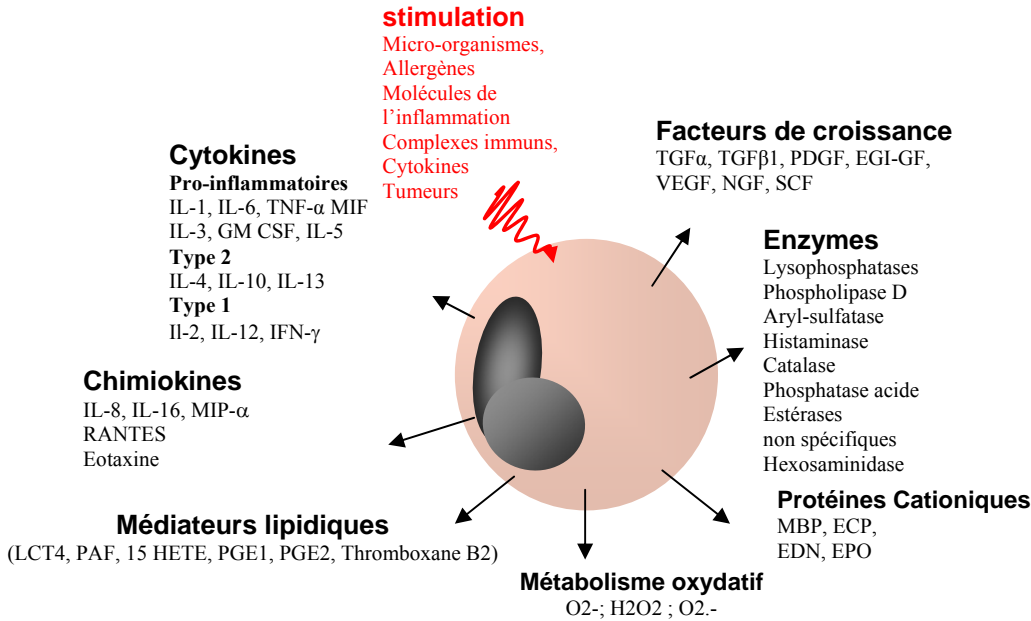
*C. albicans* (Jouault *et al.* 2006). Les éosinophiles expriment le Formyl Peptide Receptor (FPR) qui lie un signal de danger représenté par le fMLF libéré par les bactéries (*N*-formyl-Met-Leu-Phe) (Svensson *et al.* 2005) mais aussi certains allergènes (Svensson *et al.* 2007).

Malgré le fait que les récepteurs Toll-like (TLR) 1, 2, 4, 5, 6, 7 et 9 aient récemment été détectés sous forme protéique dans les éosinophiles humains (Wong *et al.* 2007), la présence et la fonction des TLRs sur les éosinophiles restent encore imprécises. Concernant l'activation des éosinophiles par différents ligands de TLRs. Nagase et ses collaborateurs ont montré que seul un ligand du TLR7 et 8 (R-848) active les éosinophiles humains en induisant la production d'ions superoxydes (Nagase *et al.* 2003). Pourtant, une autre étude montre que les ligands des TLR 2, 5 et 7 activent différenciellement les éosinophiles aboutissant à l'augmentation de l'expression de certaines molécules membranaires et/ou à la libération différentielle de cytokines/chimiokines, superoxydes, protéines de granule en fonction du ligand utilisé (Wong *et al.* 2007). Les ligands de TLR 3, 4, 8 et 9 semblent moins actifs ou inactifs. Une activation possible par TLR4, grâce à une voie dépendante du CD14, reste également controversée (Meerschaert *et al.* 2000; Plotz *et al.* 2001). Chez la souris, une seule étude s'est consacrée à l'expression des TLRs sur les éosinophiles murins et a mis en évidence TLR 3, 4, 5 et 7 (Phipps *et al.* 2007).

Les éosinophiles expriment également des récepteurs de l'immunité adaptative comme les récepteurs à le fragment Fc des immunoglobulines IgG, IgE et IgA. Ces récepteurs permettent l'endocytose, l'activation des cellules et leur dégranulation. Ces cellules participent également à l'élaboration de la réponse immunitaire spécifique par leurs capacités de présentation antigénique. En effet, ces polynucléaires expriment, à leur surface, des molécules leur permettant d'interagir avec les lymphocytes T, telles que le CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) en particulier HLA (Human Leucocyte Antigen)-DR (Shi 2004). Des molécules de co-stimulation présentes sur les populations lymphocytaires ou les cellules présentant l'antigène comme CD25 (Plumas *et al.* 1991), CD4 (Lucey *et al.* 1989), CD28 et CD86 (Woerly *et al.* 1999b) sont aussi exprimées par les éosinophiles.

Grâce à l'expression de nombreux récepteurs, les éosinophiles vont être capables de répondre à différents stimuli et de libérer rapidement et sélectivement divers médiateurs dont des cytokines (**Figure 4**).





**Figure 4 : Médiateurs libérés par les éosinophiles activés par divers stimuli.**(Staumont-Salle *et al.* 2007)

### I.3.2. Récepteurs et sécrétion de cytokines

L'éosinophile est susceptible de fixer de nombreuses cytokines. Ainsi, des récepteurs pour l'IL-2, -3, -4, -5, -7, -9, -10, -15 et le GM-CSF sont présents à la surface de ces cellules. Les éosinophiles expriment des récepteurs de la superfamille des interférons (IFN-) dont ceux pour l'IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . De même, des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et au TGF (Transforming Growth Factor) ont été identifiés à leur surface (Hogan *et al.* 2008).

Contrairement aux lymphocytes, la plupart des cytokines sont stockées dans les granules et/ou les vésicules de l'éosinophile et donc sont libérées très rapidement après l'activation de ces cellules (**Figure 4**). Cette capacité de stockage est liée à une activité transcriptionnelle de base très faible comparée à d'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes. L'IL-2 (Woerly *et al.* 1999a, 1999b), -4 (Bandeira-Melo *et al.* 2001) et -13 (Woerly *et al.* 2002) sont stockées dans le core central des granules cristalloïdes tandis que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont localisés dans la bicouche lipidique de ces granules (Lacy *et al.* 1998). Leur sécrétion confère aux éosinophiles un rôle effecteur et régulateur, en particulier dans l'orientation de la réponse immune grâce à sa capacité à produire de nombreuses cytokines de type 1 comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2 et l'IL-12 ou de type 2 comme l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 (Dubucquoi *et al.* 1994; Woerly *et al.* 1999a; Woerly *et al.* 2002). Ces cellules synthétisent aussi des facteurs de

croissance et d'activation, tels que le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-5 qui peuvent intervenir dans le maintien de la réponse inflammatoire, ou encore, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  qui peuvent participer à l'inflammation conférant ainsi aux éosinophiles des fonctions pro-inflammatoires.

Si un grand nombre de cytokines sont produites par l'éosinophile, il est par contre assez difficile d'induire leur libération et de doser les cytokines produites par l'éosinophile *in vitro*. Cette caractéristique suggère que la production de cytokines par l'éosinophile joue non pas un rôle systémique mais une activité immunorégulatrice locale dans les tissus, hypothèse qui reste à vérifier.

Les éosinophiles sont ainsi capables de libérer sélectivement des cytokines de type Th1, Th2 ou immunorégulatrice en fonction de l'environnement, procurant à ces cellules la faculté de participer à la régulation de la réponse immune.

### **I.3.3. Interactions avec d'autres types cellulaires : fonctions immunorégulatrices des éosinophiles**

Les éosinophiles ont toujours été considérés avant tout pour leur potentiel cytotoxique et pro-inflammatoire. Cependant, de plus en plus d'éléments sur leur biologie permettent aujourd'hui de considérer le versant immunorégulateur de ces cellules. Très schématiquement, les fonctions immunorégulatrices résultent de deux mécanismes indépendants: la production de cytokines qui polarisent la réponse immune (cf. I.3.2) et la modulation locale des activités lymphocytaires.

Les éosinophiles sont capables, notamment par leur production de médiateurs, d'exercer une activité autocrine mais aussi d'activer de nombreux types cellulaires (**Figure 5**) (Jacobsen *et al.* 2007). Ainsi ils peuvent moduler leur recrutement et leurs fonctions effectrices grâce à la libération de nombreux médiateurs comme l'IL-5, l'éotaxine ou encore le GM-CSF.

Les éosinophiles participent au recrutement des lymphocytes par l'expression de chimiokines (Gutierrez-Ramos *et al.* 2000). De plus, un modèle de souris exposées à l'ovalbumine et déficientes en éosinophiles montre un défaut du recrutement des cellules T (Jacobsen *et al.* 2008). Comme nous l'avons vu précédemment, les éosinophiles expriment le CMH de classe II chez l'homme (Shi 2004) mais aussi des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80, CD86 et CD28. De ce fait, ils peuvent induire *in vitro* la prolifération de

cellules T restreintes par le CMH II (Jacobsen *et al.* 2007). Plusieurs études *in vivo* ont confirmé cette capacité des éosinophiles à stimuler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes alors que d'autres travaux contredisent ces observations (van Rijt *et al.* 2003). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par les différentes méthodes d'isolement cellulaire utilisées dans ces études, susceptibles de modifier l'expression de certaines molécules de surface comme CMHII sur les éosinophiles. Récemment, une série de travaux utilisant des modèles d'infection par le parasite *S. stercoralis* a confirmé la capacité des éosinophiles à présenter l'antigène à des cellules T naïves (Padigel *et al.* 2007). Le rôle des éosinophiles en tant que cellules présentatrices d'antigène (CPA) peut donc être considéré. Enfin, les éosinophiles sont également susceptibles de moduler la réponse immunitaire adaptative par la production de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui polarise la réponse immune en favorisant la prolifération des lymphocytes T Th2 (Odemuyiwa *et al.* 2004).

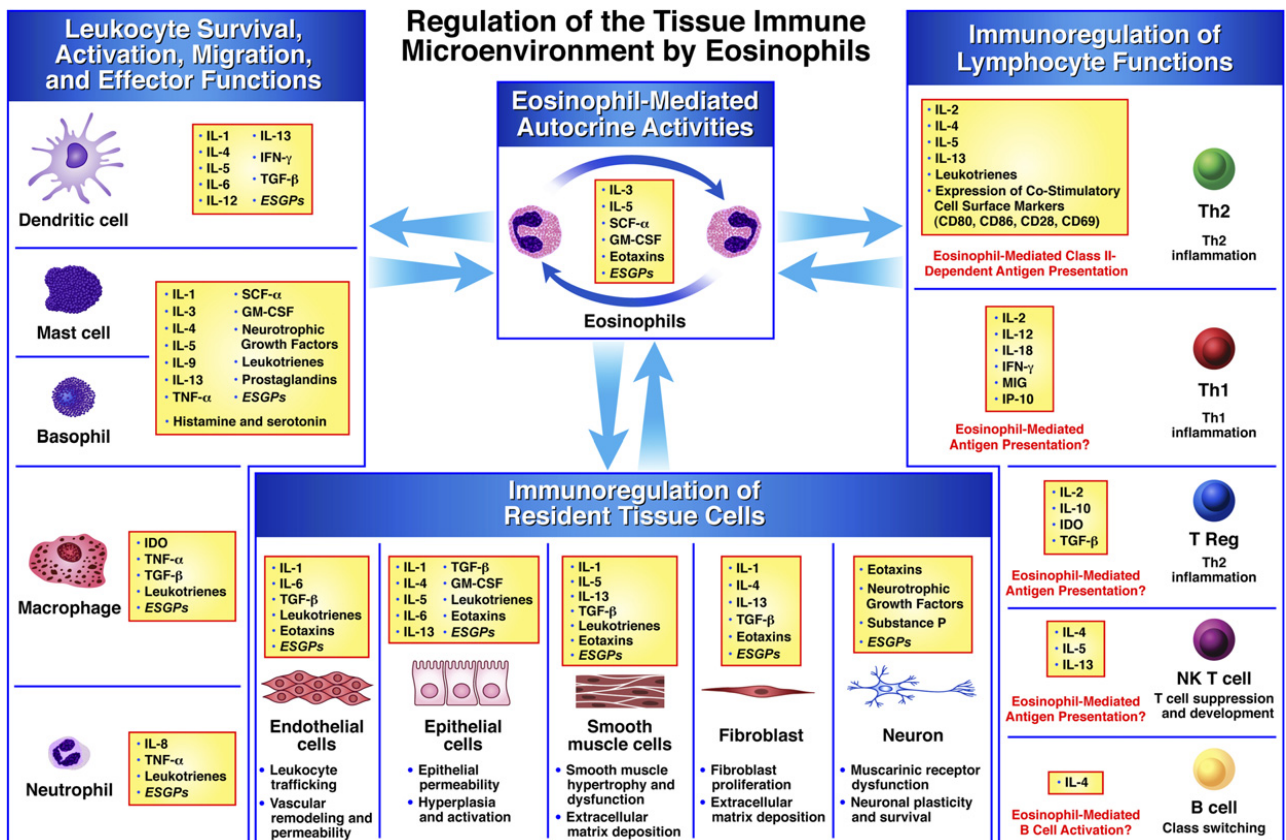


Figure 5 : Mécanismes moléculaires et cellulaires utilisés par les éosinophiles pour moduler localement la réponse immunitaire (Jacobsen *et al.* 2007).

Un dialogue potentiellement très important existe entre les éosinophiles et les autres leucocytes tels les mastocytes, neutrophiles, basophiles, cellules dendritiques et macrophages

mais aussi les autres types cellulaires comme les cellules épithéliales, musculaires, l'endothélium, les neurones et les fibroblastes. Les éosinophiles, en contribuant à leur survie, leur recrutement et/ou leur activation, pourraient moduler le microenvironnement tissulaire et immunitaire dans lequel ils se trouvent, à l'état normal ou dans des conditions inflammatoires.

### **I.3.4. Cytotoxicité**

#### **I.3.4.1. Protéines de granules**

##### **I.3.4.1.1. Description**

La présence de protéines basiques dans les granules des éosinophiles est une caractéristique qui distingue les éosinophiles des autres granulocytes. Les protéines MBP, EPO, ECP et EDN exercent une activité cytotoxique vis-à-vis de larves parasitaires mais aussi de nombreuses autres cibles cellulaires, essentiellement démontrée *in vitro* mais étayée *in vivo* par des arguments expérimentaux (souris déficientes), cliniques (détection de la MBP dans des biopsies de peau et de poumon chez des patients allergiques ou asthmatiques) et même épidémiologiques (gravité du « poumon éosinophilique tropical » associé à la présence d'EDN). L'activité cytotoxique des éosinophiles est principalement attribuée à la libération de ces protéines basiques libérées très rapidement en grande quantité suite à une stimulation des éosinophiles (**Table 1**).

- ❖ La MBP est une protéine relativement petite de 13,8 kDa composée de 117 acides aminés et représente 50% des protéines des granules. La MBP n'est pas totalement spécifique des éosinophiles puisqu'elle est retrouvée, mais en moindre quantité dans les basophiles. Récemment, une autre forme, la MBP2, a été mise en évidence (Plager *et al.* 2006). Bien que la MBP1 partage les mêmes propriétés fonctionnelles que la MBP2, elle semble beaucoup plus puissante que cette dernière. Néanmoins la MBP2, non exprimée par les basophiles, constitue un marqueur plus spécifique des éosinophiles que la MBP1. Il existe une association entre la déposition de MBP au niveau des bronches, l'éosinophilie ainsi que l'activité de l'asthme ce qui suggère un rôle de ces protéines basiques dans la physiopathologie de cette maladie (Gleich *et al.* 1993). La MBP possède une activité cytotoxique contre les bactéries mais aussi les helminthes. Cette activité cytotoxique s'exerce par la capacité de la MBP à perturber

l'intégrité cellulaire en modifiant l'équilibre électrostatique de la bi-couche de phospholipides de la membrane cellulaire en augmentant sa perméabilité. A côté de son activité cytotoxique, d'autres rôles sont attribués à la MBP. La MBP induit la libération d'héparine par différentes cellules, d'EDN par les éosinophiles eux-mêmes et joue un rôle dans la fibrose (Rothenberg and Hogan 2006). Elle participe aussi au recrutement des CPA comme les neutrophiles et augmente l'expression de CR3 et stimule la libération d'IL-8 par ces cellules (Moy *et al.* 1993; Page *et al.* 1999).

- ❖ L'EPO est une protéine constituée de deux sous-unités de 12,7 et 53 kDa qui catalyse la formation de radicaux libres d'oxygène (O<sup>-</sup>) ou de bromure (Br<sup>-</sup>). Ces radicaux libres sont extrêmement instables et oxydants ce qui explique l'activité bactéricide et cytotoxique attribuée à l'EPO. De plus, l'activité cytotoxique des autres protéines cationiques serait dépendante de la nitration des tyrosines médiée par l'EPO elle-même (Ulrich *et al.* 2008).
- ❖ L'ECP est une protéine qui varie de 16 à 21,4 kDa dont une des caractéristiques est de posséder une très forte activité ARNase. De ce fait, près de 80% de l'activité ARNase des leucocytes sanguins provient des éosinophiles et ce malgré leur faible nombre. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés sur le gène codant pour l'ECP influençant le potentiel cytotoxique de la protéine (Jonsson *et al.* 2006). L'ECP est produite sous plusieurs formes glycosylées, le degré de glycosylation déterminant le niveau de cytotoxicité de la protéine (Eriksson *et al.* 2007). Elle possède également, comme la MBP, une toxicité envers les helminthes, les bactéries et certains types cellulaires (Carreras *et al.* 2003) dûe à son effet déstabilisant sur les lipides membranaires. Récemment, Monteserein et ses collaborateurs ont décrit les neutrophiles comme une source potentielle d'ECP en réponse à une activation dépendante de l'IgE (Monteseirin *et al.* 2007).
- ❖ L'EDN (18,5 kDa) tout comme l'ECP possède une forte activité ribonucléase. Ces deux protéines font partie de la famille des ARNases et partagent une homologie de séquence de 88%. L'EDN n'est pas uniquement produite par les éosinophiles mais peut être exprimée dans les macrophages activés par le TNF- $\alpha$  et le LPS (Yang *et al.* 2004). L'EDN possède une activité neurotoxique, délétère pour l'hôte mais aussi une activité antivirale, bénéfique pour l'hôte. L'EDN est également considérée comme une alarmine, au même titre que les défensines ou les cathélicidines qui sont des médiateurs représentant des signaux de danger chargés d'alerter le système immunitaire en cas de dommages cellulaires et d'infections (Yang *et al.* 2008). En

effet, l'EDN attire et active les cellules dendritiques via TLR2 et augmente ainsi la réponse immune principalement de type Th2.

<i>Protéine</i>	<i>Localisation</i>	<i>Effets bénéfiques</i>	<i>Effets délétères</i>	<i>Contenu cellulaire</i>
MBP	core	helminthotoxine bactéricide	cytotoxine histaminolibératrice accroît l'hyperréactivité bronchique agoniste plaquettaire	9 µg/10 <sup>6</sup>
ECP	matrice	helminthotoxine bactéricide antivirale	neurotoxine histaminolibératrice activité neutralisante de l'héparine altère la fibrinolyse	5 µg/10 <sup>6</sup>
EDN	matrice	antivirale maturation des CD active TLR2	neurotoxine	3 µg/10 <sup>6</sup>
EPO	matrice	helminthotoxine bactéricide tumoricide	détruit l'épithélium respiratoire histaminolibératrice	12 µg/10 <sup>6</sup>

**Table 1 :** *Les protéines cationiques de l'éosinophile.*

#### I.3.4.1.2. Mécanismes de dégranulation

Trois mécanismes pour la libération de protéines cationiques ont été décrits dans les éosinophiles :

- 1) La « piecemeal degranulation » ou « transport vésiculaire » permettant la libération des protéines de granule par bourgeonnement de petites vésicules à partir des granules secondaires et expliquant le phénomène de libération sélective du contenu granulaire (Tomassini *et al.* 1991; Dvorak *et al.* 2000).
- 2) La cytololyse non apoptotique avec extrusion dans le milieu extracellulaire de l'ensemble des granules et secondairement de leur contenu.
- 3) L'exocytose par fusion directe de la membrane des granules avec la membrane plasmique, libérant les protéines de la matrice et du core granulaire.

La régulation de l'exocytose est possible grâce à la formation de complexes protéiques composés de v-SNARES (récepteurs SNAP présents sur la vésicule de sécrétion), et de t-

SNARES (protéines exprimées sur la membrane de l'organe cible). Ainsi, les éosinophiles expriment VAMP-2 sur la membrane de la vésicule sécrétoire, et SNAP-23 et la syntaxin-4 au niveau de la membrane plasmique (Lacy *et al.* 1999).

#### **I.3.4.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des médiateurs précoces de l'éosinophile libérés après son activation. Ils sont produits sous l'action de différents agents et de façon beaucoup plus importante que dans le cas du neutrophile. La NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en superoxyde. Celui-ci est ensuite transformé par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de brome et sous l'action de la peroxydase des éosinophiles peut être transformé en oxygène singulet (Thomas *et al.* 1995). L'ensemble de ces espèces activées de l'oxygène confère à l'éosinophile un rôle pro-inflammatoire et cytotoxique.

#### **I.3.5. Activation et modulation des éosinophiles**

##### **I.3.5.1. Modifications phénotypiques**

L'activation des éosinophiles peut se caractériser par l'augmentation de l'expression basale de certains récepteurs. Ainsi, CD63/LAMP-3 est considéré comme un marqueur de dégranulation (Mahmudi-Azer *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2005). L'expression de CD44, CD122, CD69 et CD4 est augmentée sur des éosinophiles hypodenses, caractéristiques d'une activation (Conesa *et al.* 2002).

Il existe également des modifications phénotypiques liées à l'acquisition de nouveaux récepteurs de surface, modulées par certaines cytokines. Ainsi, des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , sont capables d'induire l'expression des récepteurs aux IgG (CD64 et CD16) à la surface des éosinophiles (Hartnell *et al.* 1992). CD69/Activation Inducer Molecule apparaît à la surface des éosinophiles de patients hyperéosinophiliques après une stimulation par le PAF ou l'IL-5 (Urasaki *et al.* 2001). Certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF associées au TNF- $\alpha$  provoquent l'induction d'ICAM-1 tandis qu'une synergie entre l'IL-3 et l'IFN- $\gamma$  entraînent l'expression d'HLA-DR sur les éosinophiles circulants (Hansel *et al.* 1992). L'IL-3, TNF- $\alpha$  et GM-CSF sont également capables d'induire l'expression de CD4 sur les éosinophiles (Hossain *et al.* 1996).

### I.3.5.2. Les récepteurs inhibiteurs/activateurs

Plusieurs récepteurs inhibiteurs ont été montrés sur les éosinophiles comme IRp60/CD300a, p140, Siglec-8, Siglec-10, ILT5/LIR3, CD33, et p75/adhesion inhibitory receptor molecules (Munitz *et al.* 2007). Par exemple, la stimulation de l'IRp60 abolit l'activation des éosinophiles (Munitz *et al.* 2005). L'activation des « leukocyte immunoglobulin-like receptors » ou LIRs conduit à la libération de l'IL-12 (Tedla *et al.* 2003). Les LIRs comprennent à la fois des récepteurs inhibiteurs (LIR 1, 3, 5 et 8) et activateurs (LIR 6, 7, 8 et 11). Les éosinophiles expriment LIR 1, 2, 3 et 7. Il est également possible qu'un même récepteur possède une dualité fonctionnelle. Ainsi, Munitz et ses collaborateurs ont montré, sur les éosinophiles murins, l'expression de « paired immunoglobulin-like receptor » B (PIR-B), capable d'initier à la fois un signal inhibiteur et/ou activateur en diminuant la migration éosinophilique dépendante de l'éotaxine et/ou augmentant celle dépendante de LTB<sub>4</sub> (Munitz *et al.* 2008). Cet effet paradoxal est également observé dans d'autres types cellulaires et pour d'autres récepteurs comme 2B4, exprimé par les éosinophiles, régulant positivement ou négativement les fonctions des cellules NK (Parolini *et al.* 2000; Munitz *et al.* 2005).

### I.3.5.3. Plasticité fonctionnelle des éosinophiles

Une stimulation par des complexes à IgG ou à IgE entraîne une libération sélective soit d'ECP et d'EDN (IgG) soit d'EPO et d'EDN (IgE) alors que des complexes IgA induisent une libération des 3 protéines matricielles (Tomassini *et al.* 1991). Autre exemple de libération sélective du contenu granulaire, la ligation du CD28 cause la libération d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  tandis que les IgA et IgE provoquent la libération d'IL-10 par les éosinophiles (Woerly *et al.* 1999b). Cette dernière étude est particulièrement intéressante puisqu'elle met en évidence une régulation différentielle de cytokines Th1 et Th2 par l'éosinophile. Il a été démontré que les éosinophiles libèrent également de l'IL-13 après une stimulation du CD28 et qu'une combinaison d'activation CD28-complexes IgA induit une diminution de la sécrétion d'IL-13 (Woerly *et al.* 2002). L'hypothèse de l'existence de deux sous populations distinctes d'éosinophiles (« Eo1/Eo2 ») produisant des cytokines de type 1 ou 2 est infirmée aujourd'hui par des expériences de double marquage qui ont indiqué que les cytokines de type 1 ou 2 coexistaient dans les mêmes éosinophiles (Spencer *et al.* 2008). C'est donc un stimulus



induisant l'activation qui semble en cause dans ce processus, sans que les mécanismes moléculaires n'aient été encore spécifiquement abordés.

#### **I.4. Rôles des éosinophiles en pathologie**

Une éosinophilie sanguine est évoquée lorsque le nombre absolu d'éosinophiles circulants est supérieur à 500 éosinophiles/ $\mu$ l de sang. Les éosinophilies les plus fréquentes regroupent les allergies et les parasitoses en particulier les helminthiases. Les éosinophiles ont longtemps été considérés comme des intervenants secondaires de la réponse immunitaire, attirés passivement sur les sites inflammatoires. Comme nous venons de le voir dans les chapitres précédents, il apparaît aujourd'hui que les éosinophiles soient plutôt des cellules multifonctionnelles capables de répondre à différents stimuli. Par leurs propriétés fonctionnelles, notamment l'expression de récepteurs à l'interface entre immunité innée et adaptative, la production de médiateurs variés, de cytokines de types Th1 et/ou Th2, les éosinophiles jouent un rôle majeur dans le développement et le contrôle de nombreuses réponses immunes. Des études ont mis en évidence leur implication dans les syndromes hyperéosinophiles, au cours de pathologies infectieuses, inflammatoires ou allergiques ainsi que dans l'immunité antitumorale.

Ce qui suit ne constitue en aucune manière une liste exhaustive de toutes les pathologies dans lesquelles un rôle des éosinophiles a été décrit, tant la littérature est abondante sur le sujet. Cette partie de ce manuscrit propose un résumé des exemples de pathologies les plus marquants, les plus établis ou à l'inverse les plus controversés, dans lesquels les éosinophiles jouent un rôle fondamental.

##### **I.4.1. Eosinophiles et Syndrome HyperEosinophile (SHE)**

A côté des éosinophilies dites réactionnelles, dont la cause et/ou l'origine moléculaire est clairement identifiée, diverses pathologies associées à une éosinophilie sont regroupées au sein des syndromes hyperéosinophiles ou SHE (Chusid *et al.* 1975) qui sont caractérisés par une éosinophilie sanguine persistante (supérieure à 1500 éosinophiles/ $\mu$ l de sang, d'une durée supérieure à 6 mois) conduisant à des dommages systémiques, avec ou sans atteinte viscérale. C'est une maladie rare (environ 5000 à 6000 personnes dans le monde en sont atteintes) qui touche particulièrement les hommes. Une classification récente distingue deux groupes

étiologiques, selon que l'anomalie touche soit les lignées lymphocytaires qui présentent des phénotypes aberrants et/ou une production anormale de cytokines éosinophilopoïétiques suite à la prolifération d'un clone T, soit la lignée éosinophilique (Gleich *et al.* 2005; Gotlib 2005). Il s'agit respectivement des variants « lymphoprolifératif » et « myéloprolifératif » (Roufosse *et al.* 2003; Roche-Lestienne *et al.* 2005). La protéine de fusion FIP1L1-PDGFR $\alpha$  serait retrouvée environ dans 50% des SHE « myéloïdes ». Chez ces patients, une rémission clinique et hématologique spectaculaire est observée sous Imatinib mesylate (Glyvec®), un inhibiteur de tyrosine kinase dont PDGFR $\alpha$ . Dans le cas du variant lymphoprolifératif, l'éosinophilie est liée à la prolifération souvent clonale de lymphocytes Th2, produisant des quantités anormalement élevées d'IL-5 mais aussi d'IL-4 et d'IL-13. Actuellement, seul un traitement « symptomatique » par anti-IL-5 (anticorps monoclonaux humanisés en cours d'essai clinique) pourra être proposé. Cependant la majorité des SHE reste de nature idiopathique ce qui rend difficile l'application d'une thérapeutique ciblée.

#### **I.4.2. Eosinophiles et réponses inflammatoires et allergiques**

Les éosinophiles exercent un rôle délétère en causant de nombreux dommages tissulaires dans des pathologies comme l'asthme et l'allergie. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des poumons, causée à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux, comme certaines infections ou l'exposition à des allergènes. L'asthme se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une éosinophilie associée à une réponse Th2 et la synthèse d'IgE. Au cours de l'asthme, le nombre d'éosinophiles, qui augmente dans les tissus, le sang et la moëlle osseuse, est corrélé, dans certains cas, avec la sévérité de la maladie. Leur capacité à libérer des médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines, thromboxane), la MBP et des espèces réactives de l'oxygène, peut entraîner une bronchoconstriction et une hyper-sécrétion de mucus, des altérations au niveau des nerfs et des cellules épithéliales et enfin, une lyse des cellules mucosales (Kay 2005). De plus, les cellules T et les éosinophiles coopèrent dans l'induction de la nécrose des cellules épithéliales bronchiques (Trautmann *et al.* 2002). Dans un modèle d'asthme murin, le déficit en IL-5 abolit quasi totalement l'éosinophilie, l'hyperréactivité et les dommages pulmonaires (Foster *et al.* 1996).

Les éosinophiles sont impliqués dans de nombreuses pathologies gastrointestinales (Rothenberg 2004). D'une part, des études cliniques ont montré la présence de MBP et d'ECP dans l'intestin grêle de patients présentant une gastroentérite éosinophilique. D'autre part,

chez la souris, une surexpression de l'IL-5 induit une oesophagite éosinophilique associée à une réponse Th2 chronique.

### **I.4.3. Eosinophiles et immunité anti-tumorale**

Les polynucléaires éosinophiles ont été observés dans les infiltrats de plusieurs types de cancers, qu'ils s'agissent de tumeurs hématopoïétiques ou de tumeurs solides. Ils sont principalement retrouvés au niveau des zones tumorales nécrosées (Cormier *et al.* 2006). Le recrutement des éosinophiles peut être corrélé à la présence d'éotaxine (Teruya-Feldstein *et al.* 1999), d'IL-5 et/ou d'IL-3 et de TARC (Thielen *et al.* 2008). L'existence d'une éosinophilie tissulaire associée à la tumeur (TATE) est, dans la plupart des cas, un facteur pronostique favorable pour la survie. Par contre, dans la maladie de Hodgkin, il est probable que le caractère défavorable de l'infiltration à éosinophiles soit dû à la délivrance par les éosinophiles d'un signal anti-apoptotique. Le rôle des éosinophiles dans le développement tumoral reste donc encore très controversé. Dans divers modèles expérimentaux, les éosinophiles murins, activés par l'IL-5 et l'éotaxine, participent à la suppression de la croissance de cellules tumorales hépatocellulaires (Kataoka *et al.* 2004). De plus, l'activation des éosinophiles humains du sang périphérique, via 2B4 (CD244), induit leur cytotoxicité vis-à-vis de deux lignées tumorales (Munitz *et al.* 2005). L'éosinophile possède un arsenal de molécules cytotoxiques lui permettant de détruire des cellules tumorales et leur recrutement au sein de la tumeur est le plus souvent associé à un bon facteur pronostique. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives quant à leur manipulation dans le cadre d'une immunothérapie selon le type de cancer ciblé.

### **I.4.4. Eosinophiles et infections**

Les éosinophiles participent à l'immunité anti-infectieuse dirigée contre certains virus, bactéries, champignons ou encore parasites helminthes, bien que certains résultats soient parfois controversés. En effet, si dans la plupart des cas les éosinophiles jouent un rôle protecteur lors d'infections, un rôle délétère a également été décrit. Si ces controverses ont différentes origines, les différences homme/souris semblent jouer un rôle prépondérant. A titre d'exemple, les éosinophiles murins possèdent moins de granules que les éosinophiles humains. Une étude sur les récepteurs aux IgA sur les éosinophiles a récemment montré que leur nature et leur distribution étaient différentes chez l'homme et la souris (Decot *et al.*

2005). De même, les éosinophiles murins n'expriment pas les récepteurs de forte affinité et de faible affinité pour l'IgE (de Andres *et al.* 1997).

Les mécanismes d'activation et d'action des éosinophiles restent souvent méconnus. Toutefois ils semblent exercer leurs effets anti-infectieux par leur activité cytolytique et notamment grâce à leurs protéines de granules.

#### **I.4.4.1. Infections parasitaires**

Les éosinophiles contrôlent l'infection de deux manières : d'une part, ces polynucléaires peuvent libérer des médiateurs précoces comme les ROS, mais aussi leurs protéines de granule. Ces molécules donnent à l'éosinophile son rôle de cellule pro-inflammatoire et cytotoxique. D'autre part, ils se placent au centre de la défense antiparasitaire notamment par leur capacité d'ADCC (Gounni *et al.* 1994; Dombrowicz *et al.* 2001). La réponse immunitaire contre les helminthes se caractérise par le développement d'une réponse chronique Th2. L'ECP mesurée dans le sérum et l'urine lors d'infections par les helminthes est un indicateur de dégranulation des éosinophiles (Tischendorf *et al.* 2000) démontrant le rôle potentiel des éosinophiles. De nombreuses évidences suggèrent que les éosinophiles seraient susceptibles de jouer un rôle plutôt bénéfique lors des infections parasitaires (Klion *et al.* 2004). *In vitro*, les éosinophiles humains sont capables de tuer le stade larvaire de *Schistosoma mansoni*, en présence d'anticorps d'isotypes IgG1, IgA (Nutten *et al.* 1999) et IgE (Gounni *et al.* 1994). Une éosinophilie élevée est associée à une protection contre les réinfections (Klion and Nutman 2004). Ceci semble en accord avec des travaux de Ganley-Leal qui montrent une susceptibilité accrue aux réinfections par *S. mansoni* observée chez des patients séropositifs pour le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) présentant une diminution de lymphocytes T CD4 et d'éosinophiles (Ganley-Leal *et al.* 2006). Néanmoins des études récentes, utilisant des souris déficientes en IL-5 (Brunet *et al.* 1999), en GATA-1 ou encore transgéniques (Tg\_PHIL dans lesquelles une toxine bactérienne provoque la mort des cellules différenciées vers la lignée éosinophile) (Lee *et al.* 2004) donc dépourvues en éosinophiles et infectées par des Helminthes, ne mettent en évidence aucune différence avec les souris sauvages infectées. Dans des modèles expérimentaux, la libération de médiateurs cytotoxiques par les éosinophiles (ECP, EDN et EPO) mais aussi les ROS ou les leucotriènes causeraient la destruction des tissus mettant en avant les contributions néfastes des éosinophiles dans les pathologies associées aux helminthiases. Si l'implication des éosinophiles dans la physiopathologie des helminthiases a été clairement établie chez

l'homme et dans de nombreux modèles animaux, les fonctions précises de ces cellules dans les infections parasitaires sont encore imprécises, probablement en raison de leurs potentialités multiples, mais aussi de la complexité des infections parasitaires et de leur chronicité.

#### **I.4.4.2. Infections virales**

Tout comme les infections parasitaires, les éosinophiles semblent jouer un rôle au cours des infections virales mais leur fonction exacte ainsi que les mécanismes impliqués sont peu connus. Une éosinophilie pulmonaire est observée, *in vivo*, après infection par le PVM (Pneumonia Virus Mice). En réponse à l'infection, les éosinophiles s'activent et dégranulent en libérant l'ECP et l'EDN. *In vitro*, le même phénomène est observé pour le RSV (Respiratory Syncytial Virus). L'activité antivirale de l'EDN est supérieure à celle de l'ECP (Domachowske *et al.* 1998). Les éosinophiles contribuent donc à l'immunité antivirale (Rosenberg *et al.* 2001). La libération d'ECP par les éosinophiles, toxique pour les cellules épithéliales (Young *et al.* 1986), peut expliquer les dommages causés aux muqueuses au cours de l'infection par le RSV. Récemment, Phipps et ses collaborateurs ont montré que les éosinophiles améliorent l'élimination du virus de manière dépendante de TLR7 et de MyD88 (Phipps *et al.* 2007). Lors d'une infection à VIH, l'éosinophile peut constituer à la fois un réservoir de virus, puisque infectable via le CD4, mais aussi participer à l'activité antivirale grâce à la libération d'EPO et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> illustrant parfaitement le concept de dualité fonctionnelle de l'éosinophile (Klebanoff *et al.* 1996).

#### **I.4.4.3. Infections fongiques**

L'infiltration et la dégranulation des éosinophiles dans les lésions ont été observées chez des patients atteints de paracoccidioidomycose (Wagner *et al.* 1998). L'administration intranasale de chitine, un polymère de carbohydrates retrouvé dans l'enveloppe des champignons, dans l'exosquelette d'arthropodes mais aussi dans les œufs d'Helminthes, chez la souris induit une réponse immune de type Th2 et une éosinophilie (Reese *et al.* 2007). Plusieurs études épidémiologiques ont montré l'implication d'*Alternaria alternata* dans le développement et l'exacerbation de l'asthme (Bush *et al.* 2004; Cantani *et al.* 2004; Salo *et al.* 2006). Les éosinophiles sont capables d'exercer une forte réponse inflammatoire et de tuer *Alternaria* (Yoon *et al.* 2008). Ainsi, CD11b exprimé par les éosinophiles est capable de se

fixer aux  $\beta$ -glucanes se trouvant sur le champignon. *Alternaria* augmente l'expression de certains marqueurs de surface des éosinophiles comme CD63, CD11b et induit la libération d'IL-8 indépendamment de TLR2 et TLR4 mais dépendant de PAR-2 (Inoue, Matsuwaki et al. 2005). Ainsi, il a été suggéré que l'inflammation chronique et certaines pathologies respiratoires, telles l'allergie et l'asthme, seraient liées à une dysrégulation de la réponse immune des éosinophiles vis-à-vis des champignons.

#### I.4.4.4. Infections bactériennes

##### I.4.4.4.1. Eosinophiles et bactéries

Contrairement aux nombreuses études sur l'implication des éosinophiles au cours des infections parasitaires, très peu se sont intéressées au rôle joué par les éosinophiles dans les infections bactériennes, qui ne sont pas associées classiquement à une éosinophilie périphérique. Cependant une augmentation d'éosinophiles peut être observée lors d'une infection par *Shigella* (Raqib *et al.* 2003). Les éosinophiles ont des propriétés bactéricides puisqu'ils participent à la défense de l'hôte contre *Escherichia coli*, bactérie Gram négatif, par un mécanisme dépendant de l'oxygène et probablement grâce à l'EPO (Persson *et al.* 2001). Svensson et ses collaborateurs ont comparé les effets de bactéries à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> sur les éosinophiles humains (Svensson and Wenneras 2005). Contrairement aux monocytes qui libèrent un « panel » de cytokines en fonction du type de bactéries, les éosinophiles ne semblent pas capables de discriminer ces deux types bactériens. La majorité des bactéries à Gram<sup>-</sup> induisent la libération d'ECP alors que la libération d'EPO et de MBP est causée à la fois par les bactéries à Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. *H. influenzae*, se lie aux éosinophiles grâce aux récepteurs au  $\beta$ -glucane (Ahren *et al.* 2003). Une protéine microbicide pour les bactéries et les levures a été identifiée chez le bovin ; il s'agit de la bOBP (bovine Oligosaccharide-Binding Protein), retrouvée dans les polynucléaires éosinophiles (Tydell *et al.* 2002). De ce fait, les éosinophiles pourraient donc représenter des effecteurs cellulaires importants et méconnus dans l'immunité antibactérienne. Le potentiel bactéricide des éosinophiles résulte principalement de son métabolisme oxydatif (synthèse de ROS) et de la libération des protéines cytotoxiques contenues dans leurs granules. Très récemment un nouveau mécanisme potentiellement impliqué dans la défense innée anti-bactérienne a été décrit (Yousefi *et al.* 2008). Il s'agit d'une libération d'ADN très rapide : telle une catapulte, l'ADN est projeté dans le milieu environnant en moins d'une seconde. Ces filaments sont uniquement constitués

d'ADN mitochondrial et de protéines granulaires (ECP, MBP) et forment, une fois libérés dans le milieu extracellulaire, des réseaux entrelacés capables de piéger et de tuer des bactéries, comme cela est démontré pour des spirochètes. Ainsi les éosinophiles préstimulés par l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-5, libèrent leur ADN suite à une activation par le lipopolysaccharide (LPS).

#### **I.4.4.4.2. Eosinophiles et mycobactéries**

Une accumulation d'éosinophiles dans les poumons est généralement associée aux pathologies de type Th2 comme les allergies ou les infections par les helminthes. Paradoxalement, au cours de réponse de type Th1, les éosinophiles ont été identifiés dans les lésions et les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients atteints de tuberculose (Flores *et al.* 1983; Matsuzawa *et al.* 1992; Vijayan *et al.* 1992). Dans un modèle d'hypersensibilité retardée chez l'homme, une augmentation du nombre d'éosinophiles est observée au site d'injection de la tuberculine (Tsicopoulos *et al.* 1994). Nous ne disposons pas de beaucoup d'éléments sur la présence des éosinophiles au niveau des granulomes de patients tuberculeux mais plusieurs modèles animaux ont montré un recrutement de ces cellules lors d'infection mycobactérienne.

En 1991, une équipe s'est intéressée chez la souris au pouvoir chimioattractant des mycobactéries vivantes ou mortes (*M. avium* et *M. smegmatis*) vis-à-vis des leucocytes (Castro *et al.* 1991). L'éosinophilotaxie induite uniquement par les mycobactéries vivantes sur au site inflammatoire est un phénomène rapide. Les bactéries contiennent un composant, ou sécrètent un facteur non identifié qui exercerait directement ou indirectement son effet sur les éosinophiles. De même, des cobayes infectés par *M. tuberculosis* montrent une accumulation rapide d'éosinophiles au sein des lésions pulmonaires (Lasco *et al.* 2004). Une altération de *M. tuberculosis* est observée après 45 minutes d'incubation avec de l'EPO purifiée, et une lyse totale est obtenue au bout de deux heures (Borelli *et al.* 2003). Par ailleurs, un rôle délétère des éosinophiles pour l'hôte a été montré par des travaux précédents puisque la forte sensibilité aux mycobactéries de souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  est attribuée à un niveau élevé d'IL-5 et à l'influx des éosinophiles au site de l'infection (Kirman *et al.* 2000). De ce fait, les auteurs suggèrent que les éosinophiles pourraient soit interférer avec l'activation des macrophages, soit fournir un environnement intracellulaire adéquat à la croissance des bactéries. Récemment, des souris infectées par du BCG montrent une infiltration tissulaire d'éosinophiles. Cet infiltrat diminue lorsque les souris sont déficientes en TLR2 (D'Avila *et*

*al.* 2007). Enfin, Ordway et ses collaborateurs ont rapporté l'accumulation d'éosinophiles dans un modèle de cobaye infecté par *M. tuberculosis* (Ordway *et al.* 2007).

L'ensemble de ces travaux, en confirmant une fois encore la dualité fonctionnelle de l'éosinophile, souligne que cette cellule n'est pas restreinte aux réponses de type Th2 mais est également présente lors de réponses de type Th1, ce qui avait d'ailleurs été proposé pour la première fois dans notre laboratoire lors de la démonstration de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Woerly *et al.*, 1999b).

Au-delà du rôle possible des éosinophiles dans la pathogenèse au cours d'infections, il apparaît maintenant tout aussi important de considérer les éosinophiles comme cellules régulatrices de la réponse développée contre les mycobactéries.



## II. Les mycobactéries

### II.1. Le genre *Mycobacterium*

Le nom générique *Mycobacterium* a été donné par Lehmann et Neumann en 1896, incluant alors les bacilles responsables de la tuberculose et de la lèpre. Depuis, le genre n'a cessé de s'enrichir et compte actuellement plus de 150 espèces différentes. Le genre *Mycobacterium* appartient à la Famille des Mycobacteriaceae, à l'Ordre des Actinomycetales et la Classe des Actinomycètes.

Les membres du genre *Mycobacterium* sont aérobies ou microaérophiles ayant la forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés de 1 à 10µm de long et de 0,2 à 0,6 µm de large. En 1882, Paul Ehrlich découvre une méthode de coloration des bacilles utilisant la fuschine. Ce colorant est retrouvé aujourd'hui dans la coloration de Ziehl-Neelsen, permettant de caractériser les bactéries acido-alcool-résistantes que sont les mycobactéries. Cette propriété est liée à la composition particulière de la paroi mycobactérienne (cf II.2.1). Les espèces appartenant à ce genre sont également caractérisées par un génome particulièrement riche en Guanine-Cytosine, avec un pourcentage GC compris entre 61 et 71%.

Parmi les différentes espèces, certaines présentent entre elles une identité de séquence en ADN supérieure à 95%. Elles sont regroupées au sein de complexes. Par exemple, le complexe de *M. tuberculosis* comprend *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* et *M. microti*. Une classification précise des différentes espèces mycobactériennes, basée sur les vitesses de croissance et les caractéristiques pigmentaires, a été établie par Runyon (**Table 2**) (Runyon 1981). Cependant la mise en évidence de ces caractères ne suffit pas pour identifier les espèces. Des tests complémentaires, biochimiques ou de sensibilité aux antibiotiques, sont alors nécessaires. La construction d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences des ARN 16S de ces différentes espèces a corroboré la classification basée sur les vitesses de croissance. La plupart des mycobactéries sont des bactéries saprophytes du sol ou de l'eau. On distingue des espèces opportunistes et des espèces pathogènes strictes, comprenant les espèces du complexe *M. tuberculosis* et *M. leprae*.

Groupe de Runyon	Espèces	Type d'infection			
		pulmonaire	ganglionnaire	cutanée, ostéoarticulaire	généralisée
Non pigmentée Croissance lente	<i>Complexe</i> <i>M. tuberculosis</i>	+++	+	+	++
Photochromogène Croissance lente Pigmentation à la lumière	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>	+++  ++	  	 +++ +	++
Scotochromogène Croissance lente Pigmentation à l'obscurité	<i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. scrofulaceum</i>	+++ +++  	  +++	 +  	  +
Non photochromogène Croissance lente Non pigmentée	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. ulcerans</i>	+++ +++ +++  	++ ++  	   +++	+++ ++
Croissance rapide (colonies visibles < 7jours)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	 +	 	++ ++	 +

**Table 2: Classification des mycobactéries selon Runyon (Runyon 1981).**

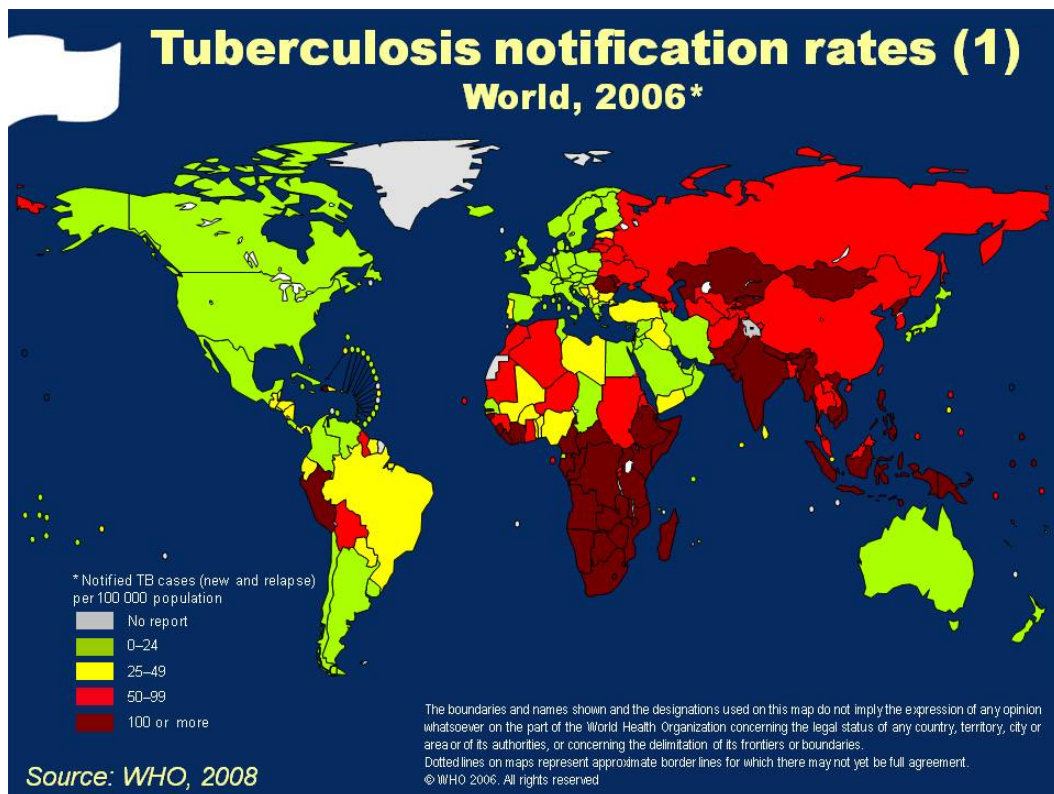
## II.2. Les mycobactérioses

### II.2.1. La tuberculose

#### II.2.1.1. Epidémiologie

*M. tuberculosis* est l'agent étiologique de la tuberculose, maladie largement répandue sur l'ensemble du globe qui représente une des principales causes de mortalité mondiale due à une maladie infectieuse avec le paludisme et le SIDA (environ 2 millions de morts par an). L'OMS estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par *M. tuberculosis*, et à 8 millions le nombre de nouveaux cas par an. Cependant, la répartition de l'infection est inégale au niveau planétaire, puisque l'Afrique, l'Asie du Sud-Est et le Pacifique Ouest regroupent environ 82% des cas (**Figure 6**). En ce qui concerne l'Europe Occidentale, la tuberculose se développe au sein de populations particulières sous forme de foyers où prédominent souvent les grands

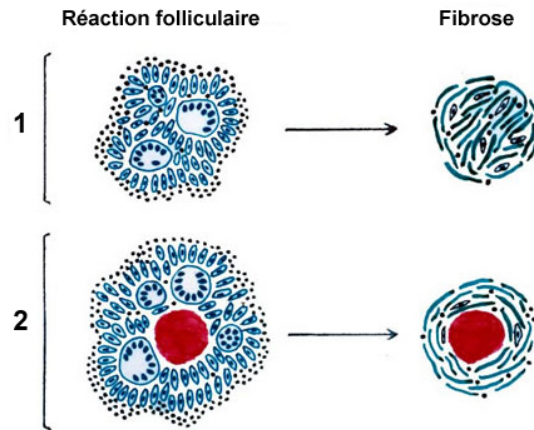
facteurs de risque favorisant la dissémination du bacille tuberculeux (immunodépression, nationalité, mauvaises conditions sanitaires et sociales, collectivités). Ainsi, on a pu observer ces dernières années, une augmentation de l'incidence de la tuberculose dans les grandes capitales d'Europe Occidentale : Londres, Paris, Madrid, Rome. Depuis 1985, on constate une recrudescence de la maladie qui découle à la fois de la dégradation des conditions sanitaires, de l'augmentation de la pandémie de SIDA et l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques.



**Figure 6 : Incidence de la tuberculose dans le monde** (World Health Organization, 2006).

### II.2.1.2. Cycle infectieux ou pathogénèse

L'infection de l'homme débute généralement par l'émission dans l'air, par la toux ou l'éternuement d'une personne contagieuse, de fines gouttelettes contenant des bacilles en suspension. A ce stade plus de 90% des personnes infectées développent une réponse immunitaire efficace qui leur permet de contrôler l'infection. Le pathogène est circonscrit au site de primo-infection. Il s'y forme un granulome, témoin de la mise en jeu de l'immunité cellulaire, composé ou non d'un noyau caséum (cf II.4.2) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Evolution, au cours de la tuberculose, des lésions granulomateuses avec (lésion caséo-folliculaire 2) ou sans nécrose (lésion folliculaire simple 1) vers la fibrose.** La tuberculose est l'exemple type d'une inflammation granulomateuse. *M. tuberculosis* déclenche une réaction inflammatoire avec ses étapes habituelles: phase exsudative, phase cellulaire et phase de réparation avec fibrose.

Le caséum est un milieu peu favorable à la multiplication bactérienne : anoxie, pH acide et présence d'acides gras. Suivant l'évolution de la maladie, la nécrose caséuse peut soit se dessécher et se calcifier, soit être encapsulée dans un réseau de fibres, laissant subsister des bacilles se répliquant peu ou à l'état « dormant ». Si la formation du granulome et la fibrose qui l'accompagne peuvent être considérées comme une barrière empêchant la diffusion des mycobactéries à l'ensemble des tissus, cette réaction n'en est pas moins néfaste pour l'hôte par la formation de zones de destruction tissulaire.

L'évolution du granulome dépend principalement de la mise en place et du contrôle de la réaction inflammatoire dirigée contre les mycobactéries piégées dans les tissus. Les individus qui ont été infectés par *M. tuberculosis*, mais n'ont pas développé la maladie dans les mois suivant l'infection, conservent 5-10% de risque de développer la tuberculose au cours de leur vie. Cette susceptibilité résiduelle s'explique par la capacité de *M. tuberculosis* à persister dans l'hôte sans créer de pathologie. Cette aptitude, appelée latence, permet à la bactérie de persister pendant plusieurs années et de se réactiver lors d'un déficit immunitaire de l'hôte infecté (facteurs génétiques, maladie, vieillesse, alcoolisme, malnutrition...) (Manabe *et al.* 2000). Cette phase est mal connue. Néanmoins, durant celle-ci, les bactéries latentes ont probablement une activité métabolique réduite, car elles ne sont pas sensibles aux drogues efficaces contre les mycobactéries en phase de réplication (Miyazaki *et al.* 1999).

Chez les personnes susceptibles, les bacilles présents dans la lymphe et la circulation sanguine échappent aux défenses immunitaires et colonisent des sites extrapulmonaires, tels que les méninges, l'extrémité des os longs et le tractus urogénital, provoquant des pathologies parfois graves. Cette évolution ne représente que 10% des cas, la zone d'implantation préférentielle de *M. tuberculosis* restant la zone apicale du poumon, où il provoque des lésions cavitaires caractéristiques de la tuberculose pulmonaire. Ces lésions cavitaires sont la résultante d'une réponse inflammatoire visant à stopper la multiplication mycobactérienne. Cette destruction tissulaire massive engendre des quintes de toux qui participent à la dissémination du bacille au sein de la population.

### **II.2.1.3. Lutte antituberculeuse**

#### **II.2.1.3.1. Les antituberculeux**

La découverte des antibiotiques a permis de croire en l'éradication rapide de la tuberculose, les plus optimistes annonçant sa disparition pour le début du XXI<sup>e</sup> siècle (Bloom *et al.* 1992). Mais c'était sans compter la résurgence de la maladie au cours des années 1980, liée à l'augmentation du nombre de personnes vivant dans des conditions sanitaires insuffisantes et à la dissémination de l'épidémie de SIDA. A cela s'ajoute l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques (MDR), qui nécessite le développement de nouvelles drogues.

Malgré tout, la chimiothérapie reste le moyen le plus efficace pour guérir les malades souffrant de tuberculose active. Les traitements classiques sont basés sur l'administration régulière d'au moins trois antibiotiques différents pendant au moins six mois. En France, le traitement comprend la prise simultanée d'éthambutol, isionazide, pyrazinamide et rifampicine pendant deux mois, suivie de la prise d'isionazide et de rifampicine pendant quatre mois supplémentaires. Ces traitements sont réajustés après détermination du profil de résistance aux antibiotiques de la souche infectante.

Si certains antibiotiques, tels la rifampicine ou la streptomycine inhibent la transcription ou la synthèse protéique en se liant respectivement à une sous-unité de l'ARN polymérase ou du ribosome (Honore *et al.* 1993), la plupart des drogues anti-mycobactériennes sont dirigées contre la synthèse de la paroi (Scior *et al.* 2002).

#### **II.2.1.3.2. Le vaccin BCG**

Le seul vaccin actuellement disponible pour la prévention des infections mycobactériennes est le BCG. *M. bovis* BCG provient de l'atténuation d'une souche de *M. bovis* virulente responsable de la tuberculose bovine.

## **II.2.2. *Mycobacterium bovis* BCG : le Bacille de Calmette et Guérin**

### **II.2.2.1. Un peu d'histoire...**

En 1920, à l'Institut Pasteur de Lille, Albert Calmette et Camille Guérin s'intéressent aux mécanismes de l'infection tuberculeuse par voie orale. Ils cultivent une souche *M. bovis* isolée du lait d'une génisse présentant une infection mammaire tuberculeuse. Après plusieurs passages sur un milieu de culture composé de pomme de terre recouvert de milieu Sauton, ils observent un changement morphologique des colonies. Ces changements sont associés à une diminution graduelle de la virulence chez le jeune bovin. Après 230 passages, aucun retour à la virulence n'est observé. Le Bacille de Calmette et Guérin ou BCG est né. L'injection de fortes doses de cette culture à des bovins n'entraîne pas de tuberculose et protège les animaux contre des inoculations avec des bacilles virulents. Des essais de vaccination sont effectués chez de nombreuses espèces. En 1921, La première vaccination par voie orale d'un nourrisson dont la mère est décédée de tuberculose est effectuée. Bien qu'en contact avec la maladie, aucune lésion tuberculeuse n'est observée chez cet enfant. Après 6 mois, la vaccination est largement étendue. En 1927, la mortalité tuberculeuse passe de 24% à 3,9% chez les enfants vaccinés par le BCG. En 1929, une catastrophe se déroule en Allemagne : sur 252 enfants vaccinés avec le BCG, 72 meurent de tuberculose. Cet accident discrédite le BCG. Pourtant, en 1932, une enquête prouva que le BCG utilisé était contaminé par une souche virulente de *M. tuberculosis* cultivée dans le même laboratoire. En 1948, l'innocuité du vaccin est reconnue et de vastes campagnes de vaccination sont décidées.

### **II.2.2.2. Les différentes souches de BCG**

Aujourd'hui plusieurs souches du BCG dérivées de la souche obtenue par Calmette et Guérin sont utilisées en vaccination humaine contre la tuberculose : BCG Glaxo, BCG Pasteur et BCG Tokyo représentent 90% de celles-ci.

Les récents progrès de la génétique mycobactérienne ont permis d'établir les différences moléculaires existant entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG (Pasteur) et entre les différentes souches de BCG. Les séquences des génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont aujourd'hui disponibles. *M. bovis* BCG présente 99% d'identité de séquence ADN avec les autres mycobactéries du complexe « tuberculosis » (Brosch *et al.* 2000). Les différentes souches de BCG n'ont présenté aucun retour à la virulence chez l'animal suggérant que les mutations qui les ont atténuées sont des délétions stables ou de multiples mutations qui ne peuvent s'inverser. Trois régions de délétion RD1, RD2 et RD3 ont été caractérisées dans *M. bovis* BCG Connaught en comparaison avec *M. bovis* (Mahairas *et al.* 1996). Seize régions sont délétées dans le génome de *M. bovis* BCG Pasteur (Brosch *et al.* 2000). Seules les régions RD1 et RD3 sont absentes de toutes les souches de BCG et présentes dans *M. bovis*. Néanmoins, récemment, une étude comparative de 13 souches de BCG a révélé de nouvelles régions de délétion ou de duplication de ces souches (Leung *et al.* 2008). Ces polymorphismes incluent des gènes codant principalement des facteurs de virulence comme le système de sécrétion ESX ou encore les PGLs (glycolipides phénoliques). De manière intéressante, les différences génétiques observées entre les nombreuses souches de BCG pourraient corrélérer avec l'efficacité du vaccin antituberculeux (Brosch *et al.* 2007; Chen *et al.* 2007). Les différentes souches du BCG peuvent être divisées en 2 classes selon leur date d'obtention : les souches précoces obtenues dans les années 20, et les souches tardives distribuées plus récemment. La variabilité génétique de ces dernières est plus élevée que celle observée chez les souches précoces. Ainsi, les souches précoces de BCG devraient conférer une meilleure protection que les souches tardives. Ces observations pourraient expliquer les divergences observées dans l'efficacité du vaccin BCG contre *M. tuberculosis*. En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, le vaccin BCG est efficace pour prévenir les formes graves de la tuberculose chez l'enfant, mais la protection chez l'adulte varie de 0 à 80% selon le pays.

### II.2.2.3. La vaccination BCG dans le monde

Depuis la première vaccination en 1921, plus de 3 milliards de doses de BCG ont été administrées à l'Homme. Le BCG appartient aux six vaccins du Programme Elargi de Vaccination (PEV) de l'OMS depuis 1974. Il est aujourd'hui le vaccin bactérien vivant le plus utilisé avec 100 millions d'enfants vaccinés chaque année conformément au PEV. Les

politiques de vaccination anti-tuberculeuse par le BCG peuvent être classées en deux catégories :

- les pays qui vaccinent par le BCG. Le PEV recommande de vacciner une seule fois à la naissance si le sujet est immunocompétent. C'est la politique suivie par la plupart des pays notamment les pays en voie de développement. L'OMS appuie cette idée sur l'observation que le BCG protège à 80% contre les formes graves de tuberculose de l'enfant.
- les pays qui ne vaccinent pas systématiquement. Ces pays basent leur politique anti-tuberculeuse sur le dépistage précoce de la maladie par l'intradermo réaction : la vaccination par le BCG est réservée aux populations à risque.

Ce vaccin utilisé à travers le monde a contribué au net recul de la tuberculose en Europe durant la première moitié du XXe siècle. Cependant, son utilisation est aujourd'hui fortement controversée, et ceci pour deux raisons. D'une part, son efficacité est remise en question. De nombreuses études contrôlées ou prospectives ont été effectuées pour quantifier l'efficacité antituberculeuse du BCG. Des différences très importantes ont été rapportées selon les pays étudiés et les formes de la maladie. Les taux de protection varient de 0 à 80% selon les études : le BCG protège à 78% contre les formes pulmonaires et disséminées, à 64% contre les méningites tuberculeuses et à 71% contre la mort due à la tuberculose (Colditz *et al.* 1994). Les résultats les plus hétérogènes concernent la forme pulmonaire de l'adulte, forme la plus fréquente de la maladie. Le BCG protège de 20 à 80% contre la lèpre (Fine 1996). Ces observations semblent notamment liées à l'incidence d'infections induites par des mycobactéries environnementales (cf II.3.3). On notera également que la protection par le vaccin BCG semble être beaucoup moins efficace lors d'une réactivation du bacille que lors d'une primo-infection. D'autre part, les individus vaccinés par le BCG deviennent positifs à la tuberculine. Il devient alors difficile de différencier les personnes vaccinées des personnes contaminées par une souche virulente de *M. tuberculosis*. C'est cette raison qui a poussé certains pays, tels que les Etats-Unis, la Belgique ou encore la France (depuis juillet 2007) à suspendre la vaccination par le BCG et soumettre à un traitement anti-tuberculeux les personnes devenant réactives à la tuberculine. En France, le vaccin reste obligatoire pour les enfants à risque. La vaccination, si elle a lieu, n'est réalisée qu'une seule fois. Ces observations ont relancé la recherche visant au développement de nouveaux vaccins.

#### **II.2.2.4. Infections sévères liées à la vaccination par le BCG**



Des cas d'infections disséminées par le BCG ont pu être observés. Différentes pathologies peuvent être à l'origine d'une infection grave après vaccination par le BCG. La majorité des cas concernent des enfants porteurs de déficits immunitaires connus ou inconnus (Casanova *et al.* 1995). Il a été récemment établi que des anomalies immunologiques (l'absence de lymphocytes T fonctionnels et le défaut de destruction des bactéries) expliquent certaines BCGites disséminées et sont associées à une susceptibilité particulière aux infections par des mycobactéries environnementales (Casanova *et al.* 2002). Il s'agit principalement de déficits immunitaires combinés sévères aboutissant à l'absence de lymphocytes T, B ou cellules NK fonctionnels due à l'absence de recombinaison au sein des gènes des récepteurs caractéristiques de ces cellules. D'autres déficits comme le défaut de destruction des bactéries ou encore la présence d'un déficit touchant l'axe IL-12/IFN- peuvent être à l'origine d'une BCGite disséminée. Un cas de BCGite a été observé chez un sujet atteint d'hyperimmunoglobulinémie E (Pasic *et al.* 1998).

Le BCG peut se comporter comme un germe opportuniste, suite à une infection qui entraîne à terme une immunodéficience, comme le VIH, ou dans le cas de greffes d'organes qui nécessitent de réduire la réponse immunitaire chez les receveurs. Plusieurs cas d'infection par le BCG, chez des patients en phase terminale de SIDA ont été rapportés (Weltman *et al.* 1993).

En raison de la faible efficacité protectrice du BCG dans certaines conditions, des études moléculaires et génétiques des relations hôte-BCG se sont développées afin de proposer de nouveaux vaccins. Ces approches visent à mieux comprendre les mécanismes qui peuvent permettre, d'une part, à l'hôte de se défendre vis-à-vis du BCG et de *M. tuberculosis* et, d'autre part, de mieux caractériser des antigènes produits par les mycobactéries.

### **II.2.3. Les mycobactérioses atypiques**

Les mycobactéries dites « atypiques » appartiennent aux espèces autres que celles du complexe de *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Le terme de mycobactérie « atypique » a été initialement appliqué en 1935, lorsque M. Pinner identifia des « micro-organismes acido-alcool-résistants ayant des caractéristiques atypiques » responsables de maladies chez l'homme. Actuellement ces espèces sont dites « mycobactéries non tuberculeuses » ou « mycobactéries environnementales potentiellement pathogènes ».

Les mycobactéries sont non pathogènes pour l'individu immunocompétent et sont présentes dans l'environnement. Ainsi, à la différence de *M. leprae* et *M. tuberculosis* qui ont un pouvoir pathogène naturel bien établi, les espèces atypiques sont très peu contagieuses et sont considérées comme opportunistes. On les retrouve dans l'environnement, aussi bien dans le sol, dans l'air, dans l'eau ainsi que chez diverses espèces animales.

Parmi les pathogènes opportunistes, la plupart sont des espèces à croissance lente. Ainsi, près de 80% des infections à mycobactéries atypiques sont dues à *M. avium*, *M. kansasii* et *M. xenopi*. La majorité des infections provoquées par des espèces à croissance rapide sont causées par le complexe de *M. fortuitum*.

Du fait de leur rareté, les infections à mycobactéries atypiques sont difficiles à identifier et à caractériser. Ainsi, de nouvelles espèces mycobactériennes continuent à être isolées à partir de lésions chez des patients. En fonction du statut immunitaire du patient et du type de mycobactéries, différentes expressions de la maladie sont possibles (affections pulmonaires, atteintes digestives, infections cutanées, infections disséminées...) (**Table 2**).

Les infections par des bactéries de l'environnement posent des problèmes de traitement car ces espèces sont habituellement résistantes à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. C'est le cas en particulier du complexe MAIS, *M. xenopi* et *M. malmoense*. Des études sont nécessaires afin de déterminer le seuil de résistance de ces mycobactéries. On ignore si cette résistance est intrinsèque à ces espèces mycobactériennes ou bien si elle est apportée par transfert de gènes à partir d'autres bactéries de l'environnement avec lesquelles elles sont en contact.

### **II.3. Caractéristiques des mycobactéries**

Les mycobactéries possèdent des caractéristiques particulières, concernant la paroi et les molécules associées ainsi que les protéines exportées, qui les distinguent des autres bactéries.

Plusieurs raisons existent pour expliquer l'intérêt à étudier la structure de la paroi et les substances produites et exportées par les mycobactéries. La paroi joue un rôle essentiel dans la virulence et la pathogénicité des mycobactéries. En effet, certains composants constituent des antigènes majeurs reconnus par différents récepteurs à la surface des cellules immunitaires et induisant ainsi une variété de réponses immunes selon l'espèce mycobactérienne. De plus, par sa faible perméabilité liée à la nature hydrophobe des ses

constituants, la paroi mycobactérienne est impliquée dans la résistance à certains antibiotiques, aux acides, alcools et radicaux libres produits par l'hôte.

De la même manière, les protéines exportées pourraient également participer à la virulence et à la résistance des mycobactéries vis-à-vis du système immunitaire. Les premières recherches avaient pour but d'identifier les substances susceptibles de prémunir ou de soigner les infections à mycobactéries. En effet, nous verrons plus loin que certaines substances sont immunogènes et stimulent les défenses immunitaires. Les recherches actuelles ont pour objectifs d'isoler des composés les plus immunogènes afin de tester leur capacité vaccinale. Une autre démarche a consisté à rechercher les molécules qui permettent la survie de la bactérie dans les cellules immunitaires. Outre la protection passive conférée par leur paroi, de nombreuses hypothèses sont avancées pour expliquer la non destruction des mycobactéries internalisées dans des vacuoles. Les bacilles produisent vraisemblablement des substances capables soit de neutraliser les composés toxiques libérés par la cellule immunitaire soit de bloquer la maturation des phagosomes en phagolysosomes. De telles molécules sont probablement produites *in vivo* et sont exportées, c'est-à-dire sécrétées ou ancrées à la surface de la bactérie. Grâce à la caractérisation de ces « facteurs de virulence » il sera peut-être possible de mieux contrôler l'infection mycobactérienne ou de développer de nouvelles souches de mycobactéries atténuées, ayant de meilleures propriétés vaccinales que le BCG actuel.

Enfin, l'identification de molécules de la paroi ou exportées, produites exclusivement par certaines espèces de mycobactéries permet une identification plus aisée que les méthodes actuelles. Des tests faciles à mettre en œuvre sont nécessaires afin d'identifier rapidement l'agent responsable de l'infection et d'adapter la thérapie.

C'est pourquoi, nous nous intéresserons, dans ce chapitre, principalement à la structure particulière de la paroi mais aussi aux protéines sécrétées ou membranaires qui, comme nous le verrons plus tard, jouent un rôle essentiel dans la virulence, la pathogénicité ainsi que l'immunogénicité des mycobactéries.

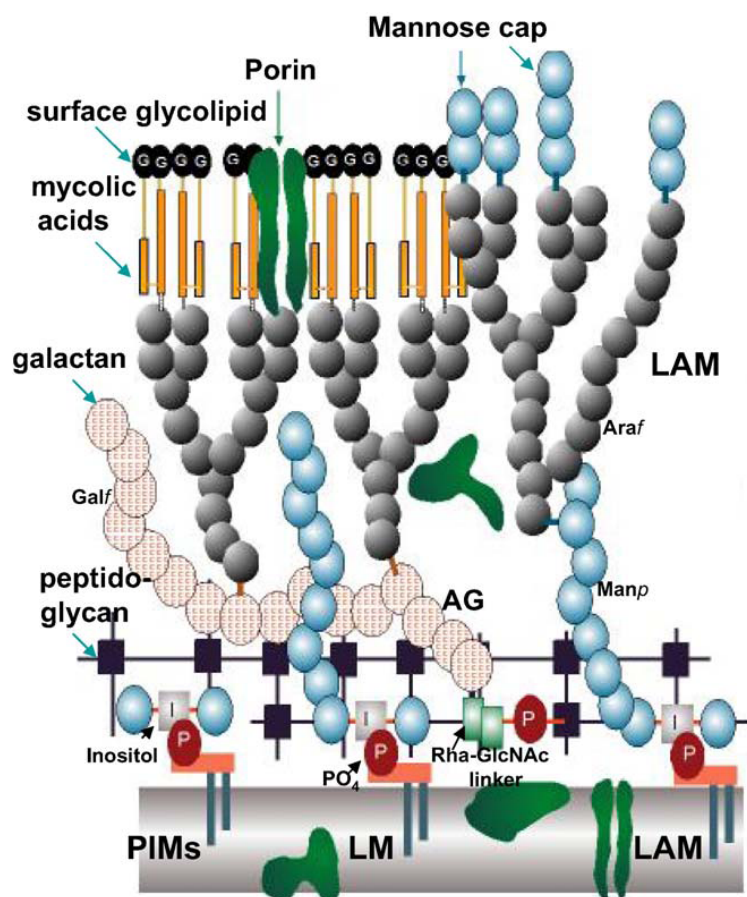
### **II.3.1. La paroi**

#### **II.3.1.1. La structure**

La structure de la paroi constitue un des caractères les plus marquants des mycobactéries. La paroi mycobactérienne n'est pas seulement constituée de peptidoglycane mais contient également des glycolipides.

La structure exacte de la paroi mycobactérienne n'est pas complètement connue. Ainsi, de nombreux modèles d'organisation architecturale sont proposés dans la littérature (Rastogi *et al.* 1991; Chatterjee 1997; Brennan 2003; Quesniaux *et al.* 2004; Alderwick *et al.* 2007; Goude *et al.* 2008). Ces différents modèles tiennent compte des données biochimiques et des données de microscopie électronique et de cryofracture (**Figure 8**).

La membrane plasmique présente une structure asymétrique : alors que la face interne de la bicouche lipidique de la membrane plasmique est semblable à celle des autres bactéries, la face externe est tout à fait particulière. Elle contient, en plus des phospholipides classiques, des phospholipides contenant du mannose (Phosphatidyl Inositol Mannoside ou PIM) sur lesquels s'ancre le squelette de la paroi. Cette dernière est formée par le peptidoglycane et l'arabinogalactane. Le peptidoglycane, de structure réticulée analogue à celui des autres bactéries, confère sa rigidité à la paroi mycobactérienne. Le peptidoglycane est relié par liaison phosphodiester à des chaînes polysaccharidiques d'arabinogalactane dont les extrémités sont estérifiées par des acides gras de haut poids moléculaire, les acides mycoliques. La localisation précise des acides mycoliques sur l'arabinogalactane n'a été établie qu'en 1991 par McNeil et ses collaborateurs (McNeil *et al.* 1991). Les acides mycoliques sont des acides gras à très longues chaînes, 60 à 90 atomes de carbone, spécifique du genre *Mycobacterium*. Les acides mycoliques interagissent également, grâce à des interactions lipophiles, avec les éléments de la couche externe.



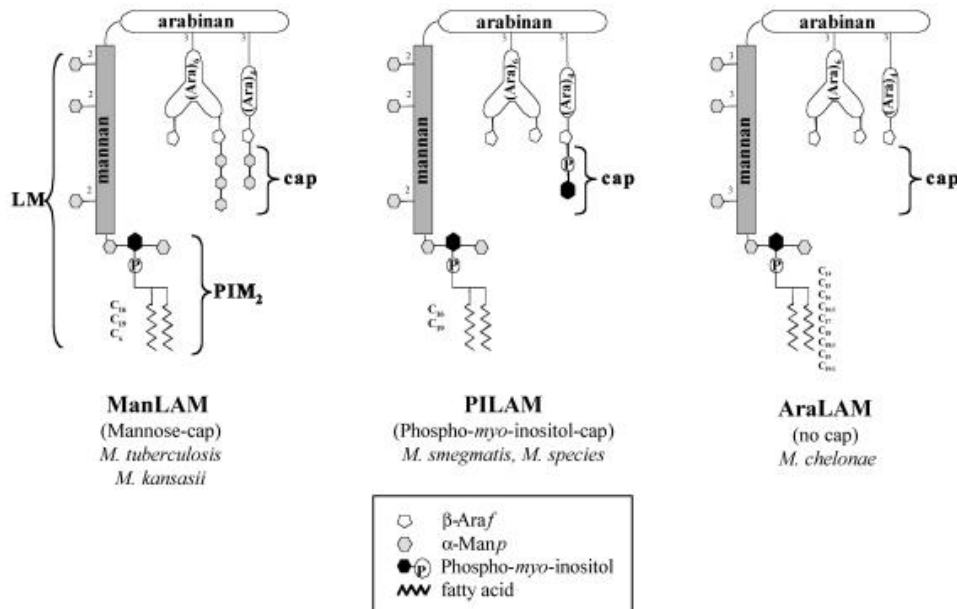
**Figure 8 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne et de ses principaux constituants.** Bien que l'enveloppe de la plupart des mycobactéries s'aligne sur ce modèle, la structure tridimensionnelle et l'arrangement relatif des constituants majeurs de leur paroi restent encore à élucider. *LAM* : lipoarabinomannane ; *LM* : lipomannane ; *PIM* : phosphatidylinositolmannoside (Quesniaux *et al.* 2004).

### II.3.1.2. Molécules associées à la paroi

Les molécules associées à la paroi sont entre autre des glycolipides et des protéines (cf. II.3.2).

Le lipoarabinomannane (LAM) et son précurseur biosynthétique, le lipomannane (LM), sont des lipoglycanes de la paroi mycobactérienne. Le LAM est considéré comme le « lipopolysaccharide mycobactérien » (Kremer *et al.* 1999). Les chaînes latérales arabinanes constituent les déterminants antigéniques des LAM. Les données actuelles sur la structure des LAM révèlent l'existence de trois types de LAM. Une étude a révélé que le LAM de *M. bovis* BCG et *M. kansasii* ont en commun des caractéristiques structurales avec le LAM de la souche virulente de *M. tuberculosis*, notamment par la présence d'unités mannose à l'extrémité des chaînes latérales d'arabinanes, qui sont ainsi appelés ManLAM. *M. smegmatis*

possède une coiffe de résidus phosphoinositides (PILAM) contrairement à *M. chelonae*, dépourvu de coiffe (AraLAM) (Dao *et al.* 2004) (**Figure 9**). Les travaux de Chatterjee et ses collaborateurs ont ouvert la voie quant à l'existence de corrélations entre des différences structurales et des différences fonctionnelles des différents LAM (Chatterjee *et al.* 1992).



**Figure 9:** Structures des molécules de LAM isolées de différentes espèces mycobactériennes (Dao *et al.* 2004).

D'autres composants sont présents dans la paroi mycobactérienne : les phénol glycolipides (PGLs), les lipo-oligosaccharides à tréhalose et les glycopeptidolipides (GPLs). Le tréhalose 6,6'-dimycolate (TDM, cord factor) est un glycolipide composant le squelette de la membrane mycobactérienne. Les GPLs sont caractérisés par une très grande variabilité dans leurs motifs de glycosylation. Il a récemment été démontré que les GPLs étaient responsables de la pathogénicité des mycobactéries (Schorey *et al.* 2008). L'étude de ces différents composés montre des structures qui peuvent être différentes suivant les espèces mycobactériennes.

La paroi mycobactérienne contient également des protéines (cf. II.3.2). Certaines de ces protéines sont destinées à être sécrétées. D'autres sont impliquées dans la synthèse des polymères de la paroi. Enfin, des porines ont été décrites chez *M. chelonae*, présentes en faible quantité ce qui est en accord avec la faible perméabilité de la paroi vis-à-vis des molécules hydrophiles (Trias *et al.* 1992).

## II.3.2. Protéines et antigènes mycobactériens

### II.3.2.1. Protéines cytoplasmiques

Parmi les protéines cytoplasmiques se trouvent des enzymes impliquées dans la synthèse protéique. Ces dernières années ont vu naître un regain d'intérêt pour les voies métaboliques des mycobactéries qui se révèlent être des cibles intéressantes pour de nouvelles substances pharmacologiques. Par exemple, l'alanine déshydrogénase de *M. tuberculosis*, absente chez le BCG, et responsable de la conversion du pyruvate en L-alanine, a été identifiée et pourrait aussi être impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne.

Les protéines du cytosol peuvent également être antigéniques. Nous avons choisi de prendre les protéines de stress ou de choc thermique (Hsp) en exemple. Les Hsp étaient parmi les premières protéines identifiées chez les mycobactéries. Elles représentent, à l'heure actuelle les protéines mycobactériennes les mieux caractérisées et remplissent de multiples fonctions. Elles jouent un rôle important dans l'adaptation des micro-organismes aux modifications environnementales. Ces protéines de choc thermique ont été identifiées comme cibles potentielles du système immunitaire. En effet, elles peuvent être reconnues par des récepteurs spécifiques, comme les TLRs, exprimés par les cellules du système immunitaire, pouvant ainsi participer à la réponse inflammatoire (cf. II.4.4.1) (Stewart *et al.* 2002).

### II.3.2.2. Les protéines exportées

Les protéines synthétisées dans le cytoplasme peuvent être exportées soit en association avec la membrane cytoplasmique ou la paroi cellulaire, soit sécrétées dans le milieu environnant.

#### II.3.2.2.1. Les protéines membranaires

Deux lipoprotéines de 19kDa et 38kDa ont été isolées à partir de fractions membranaires de *M. tuberculosis* (Lee *et al.* 1992). Les réactions croisées de reconnaissance par des anticorps de la lipoprotéine de 19kDa suggèrent la présence de protéines homologues chez les autres espèces mycobactériennes. La lipoprotéine de 38 kDa, appelée PhoS, se retrouve également chez le BCG bien que présente en plus faible quantité. Toutes deux sont très

immunogènes et semblent impliquées également dans le transport de phosphate (Chang *et al.* 1994).

#### II.3.2.2.2. Les protéines sécrétées

Les antigènes du complexe 85 (A, B et C), appelés aussi antigènes  $\alpha$ , sont une famille d'au moins 3 protéines d'un poids moléculaire de 30 à 32 kDa. Ces protéines possèdent une affinité pour la fibronectine et pourraient jouer un rôle lors du processus d'entrée de la bactérie dans les macrophages. Cette famille de protéines, présente chez *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. kansasii* et *M. leprae*, possède un peptide signal similaire à celui retrouvé chez d'autres bactéries. L'antigène 85B induit une immunité protectrice contre la tuberculose et pourrait donc constituer un antigène protecteur potentiel pour la construction d'un vaccin. Un vaccin BCG recombinant sécrétant de l'IL-15 et l'Ag85B est en cours d'étude (Tang *et al.* 2008).

A côté des protéines citées ci-dessus qui ont des fonctions caractérisées, d'autres gènes ont été clonés et séquencés, mais aucune fonction n'a pu être attribuée à leur produit. ESAT-6 (early secreted antigenic target-6) et CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein) sont des antigènes présents chez *M. tuberculosis* mais absents chez le BCG. Une caractéristique de ces protéines est qu'elles ne possèdent pas de peptide signal reconnu par le système GSP (general secretory pathway) et semblent être exportées par un nouveau mécanisme, le ESX system 1 (ESX-1), restreint aux mycobactéries (Brodin *et al.* 2004). Aucun rôle n'a encore été attribué à ces deux protéines mais elles sont capables d'influencer la réponse immune de deux manières totalement opposées selon son mécanisme de sécrétion.

La paroi mycobactérienne et les antigènes associés sont impliqués dans la stimulation du système immunitaire, la survie intracellulaire de ces bactéries, ainsi que dans l'immunopathologie des infections mycobactériennes.

#### II.4. Relations mycobactérie/hôte

L'histoire naturelle des infections par mycobactéries étant différente s'il s'agit de mycobactéries pathogènes ou opportunistes, nous nous intéresserons ici uniquement à la relation des mycobactéries pathogènes avec l'hôte.



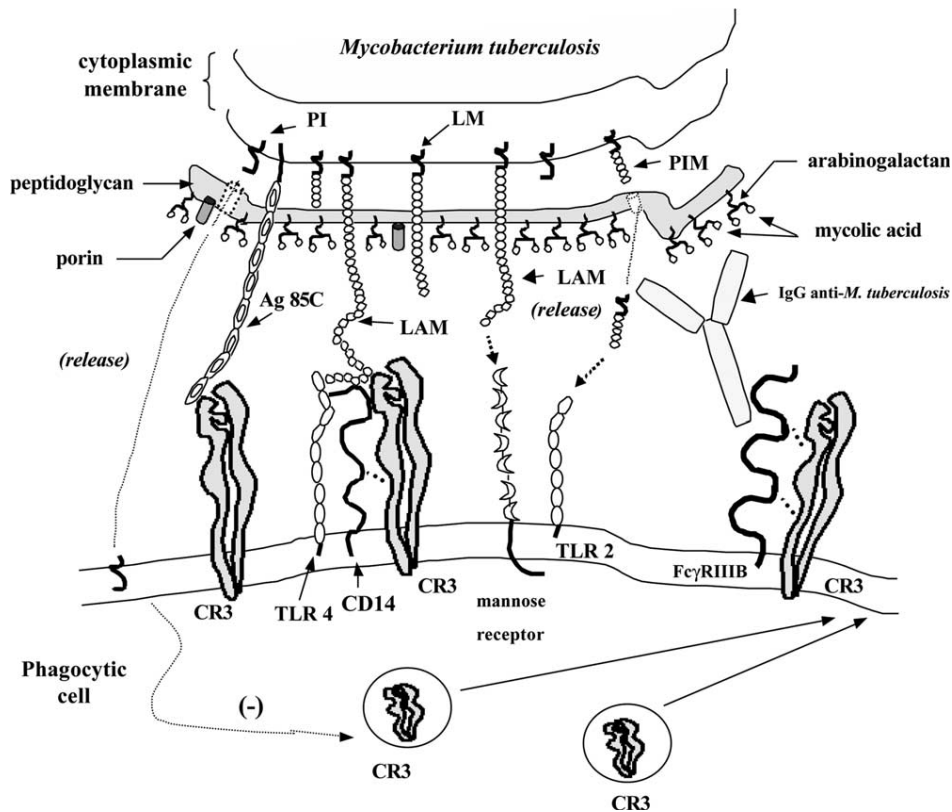
#### II.4.1. L'entrée des mycobactéries dans les cellules cibles

Les mycobactéries peuvent infecter les cellules phagocytaires par de nombreuses voies en conditions opsonisantes ou non. Les bacilles opsonisés peuvent être phagocytés via les récepteurs au complément CR1, CR3 et CR4. Cependant, cette voie paraît peu propice à l'établissement d'une niche pour les mycobactéries puisqu'elle induit la libération de composés bactéricides par le macrophage.

De façon surprenante, l'interaction des mycobactéries non opsonisées avec la molécule CR3 du récepteur au complément permet leur entrée dans les macrophages (Cywes *et al.* 1997) (**Figure 10**). Les résidus mannose présents dans la paroi des mycobactéries notamment sur le LAM peuvent interagir avec le récepteur au mannose (MR) présent sur les cellules et favoriser la phagocytose des mycobactéries (Schlesinger *et al.* 1994). Ainsi, la troncation des molécules de ManLAM et la réduction de la quantité de PIM dans la membrane mycobactérienne de *M. tuberculosis* sont corrélées avec un défaut de phagocytose par les macrophages lié à une faible association des mycobactéries avec le MR (Torrelles *et al.* 2008). D'autres ligands mycobactériens sont reconnus par CR3 et/ou MR. Ainsi, PIM2 est reconnu par CR3 et les GPLs à la fois par CR3 et MR (Villeneuve *et al.* 2003). Cependant, il semblerait que le MR ne soit pas un récepteur « professionnel » lié à la phagocytose mais dépendrait d'une autre molécule pour induire la phagocytose (Le Cabec *et al.* 2005). Enfin, CR3 ou MR, récepteurs majoritaires pour les mycobactéries sur les macrophages, semblent ne jouer qu'un rôle mineur dans les interactions mycobactéries/DC (Tailleux *et al.* 2003).

Le Surfactant A (Gaynor *et al.* 1995), les récepteurs scavenger (Zimmerli *et al.* 1996) et le récepteur à la transferrine (Bermudez *et al.* 1997) semblent aussi intervenir dans la phagocytose des mycobactéries.

Enfin, Geijtenbeek et ses collaborateurs ont démontré que DC-SIGN participe à la phagocytose des mycobactéries par la reconnaissance du ManLAM (Geijtenbeek *et al.* 2003). Récemment, une étude a montré que des cellules transfectées par DC-SIGN peuvent internaliser des billes recouvertes de ManLAM de *M. tuberculosis* (Azad *et al.* 2008). De plus, dans cette étude, des mutants de DC-SIGN montrent un défaut de l'internalisation du ManLAM, confirmant le rôle de DC-SIGN dans la phagocytose des mycobactéries.



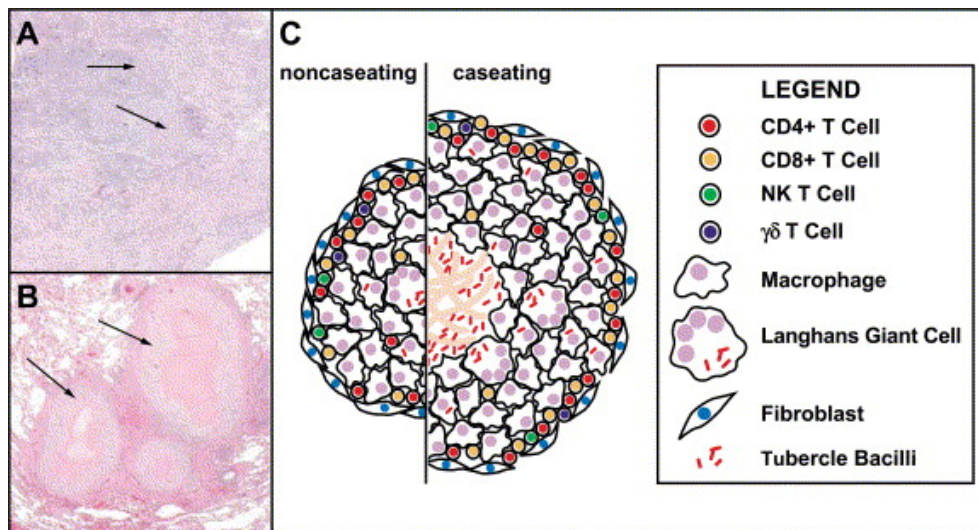
**Figure 10 : Coopération de CR3 avec d'autres récepteurs au cours de l'interaction mycobactéries/cellules phagocytaires.** Les molécules impliquées dans les interactions entre les mycobactéries non opsonisées et les cellules phagocytaires incluent le lipoarabinomannane (LAM) qui peut se lier au mannose récepteur (MR) ou au CD14 via sa portion glycosylée. Le récepteur au complément (CR3) peut interagir avec l'antigène 85C indépendamment de la présence de complément. CR3 peut s'associer au récepteur FcγRIIIB qui fixe les IgG anti-mycobactériens. TLR2 interagit avec le lipomannane (LM) et le phosphatidylinositolmannoside (PIM). Enfin, le phosphatidylinositol (PI) libéré par la mycobactérie semble diminuer l'expression de CR3 (Velasco-Velazquez *et al.* 2003).

#### II.4.2. Formation du granulome

Chez 90% des individus infectés par des mycobactéries, l'infection est contrôlée et la maladie reste latente. Durant cette phase de latence, la multiplication bactérienne est contrôlée et les bactéries sont confinées dans les granulomes (Co *et al.* 2004) (**Figure 11**). Bien que la formation du granulome ne soit que partiellement comprise, il s'apparente à un écosystème unique où la croissance bactérienne reste en équilibre avec les mécanismes effecteurs antibactériens de l'hôte. C'est une structure dynamique, où les cellules immunitaires sont constamment renouvelées (Soler *et al.* 1993).

Les macrophages alvéolaires des voies respiratoires, après avoir internalisé les mycobactéries inhalées, sont stimulés et envahissent l'épithélium pulmonaire (Ulrichs *et al.* 2006). Des études montrent que CCR2 est nécessaire au recrutement des macrophages et des

DC dans les poumons (Peters *et al.* 2004). La production de différentes cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , et de chimiokines inflammatoires par les macrophages infectés conduit au recrutement successif des neutrophiles, cellules NK, lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, DC, cellules T  $\gamma\delta$  qui produisent leurs propres chimiokines et cytokines aboutissant à l'amplification du recrutement cellulaire et au remodelage tissulaire aux sites de l'infection (Russell 2007). Les macrophages activés entourent une zone centrale de nécrose caséuse. Histologiquement, l'activation cellulaire se manifeste par la présence d'un cytoplasme granuleux, volumineux, pâle pourvu d'un réticulum endoplasmique abondant et d'un appareil de Golgi important. La ressemblance de ces cellules avec des cellules épithéliales lui a donné le nom de cellules épithélioïdes. La fusion de plusieurs macrophages activés donne naissance à de grandes cellules multinucléées dont les noyaux sont disposés à la périphérie cellulaire. Les macrophages géants rencontrés dans la tuberculose sont appelés cellules de Langhans. Les macrophages bordent la zone nécrosée, et sont eux-mêmes entourés d'une couronne de lymphocytes. La sécrétion de cytokines par les macrophages activés favorise la prolifération des fibroblastes dans la couronne lymphocytaire et en périphérie de celle-ci.



**Figure 11 : Structure du granulome mycobactérien.** Images microscopiques (A-B) et diagramme (C) de granulomes non caséux humains (A et C) et de granulomes caséux humains (B). (Co, Hogan *et al.* 2004).

### II.4.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire

#### II.4.3.1. Les acteurs cellulaires

La réponse immune vis-à-vis des mycobactéries est principalement cellulaire. La contribution de la réponse humorale est moins bien établie. Néanmoins, les malades souffrant de tuberculose possédaient des anticorps spécifiques de composants bactériens. Aussi, diverses investigations, ont été entreprises pour évaluer l'intérêt des antigènes pour le "sérodagnostic" de la tuberculose. La réponse humorale est très hétérogène et dépend du stade de la maladie (Demkow *et al.* 2007). Un titre élevé en anticorps, principalement des IgG, a pu être observé chez les malades tuberculeux à un stade avancé de la maladie.

#### II.4.3.1.1. Les cellules présentatrices d'antigènes

##### II.4.3.1.1.1. Les macrophages/monocytes

Les monocytes/macrophages, cellules phagocytaires, semblent jouer un rôle clef dans l'initiation et l'orientation de la réponse adaptative dirigée contre les mycobactéries, grâce à leur capacité à présenter l'antigène, leur activité co-stimulatrice et leur production de cytokines et chimiokines (**Figure 12**). Les macrophages alvéolaires représentent le premier type cellulaire en contact avec les mycobactéries. Durant les premiers stades de l'infection, le contrôle de la survie intracellulaire des mycobactéries et leur multiplication dépendent des médiateurs libérés suite à l'activation des macrophages. Plusieurs effecteurs antimicrobiens produits par les macrophages ont été décrits : les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) (Flesch *et al.* 1987) (Selvaraj *et al.* 1988), les intermédiaires réactifs de l'azote (RNI) (Nicholson *et al.* 1996; Bonecini-Almeida *et al.* 1998), les mécanismes dépendant de cytokines comme l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Denis 1991) ou encore de peptides anti-microbiens comme les cathélicidines (Liu *et al.* 2006).

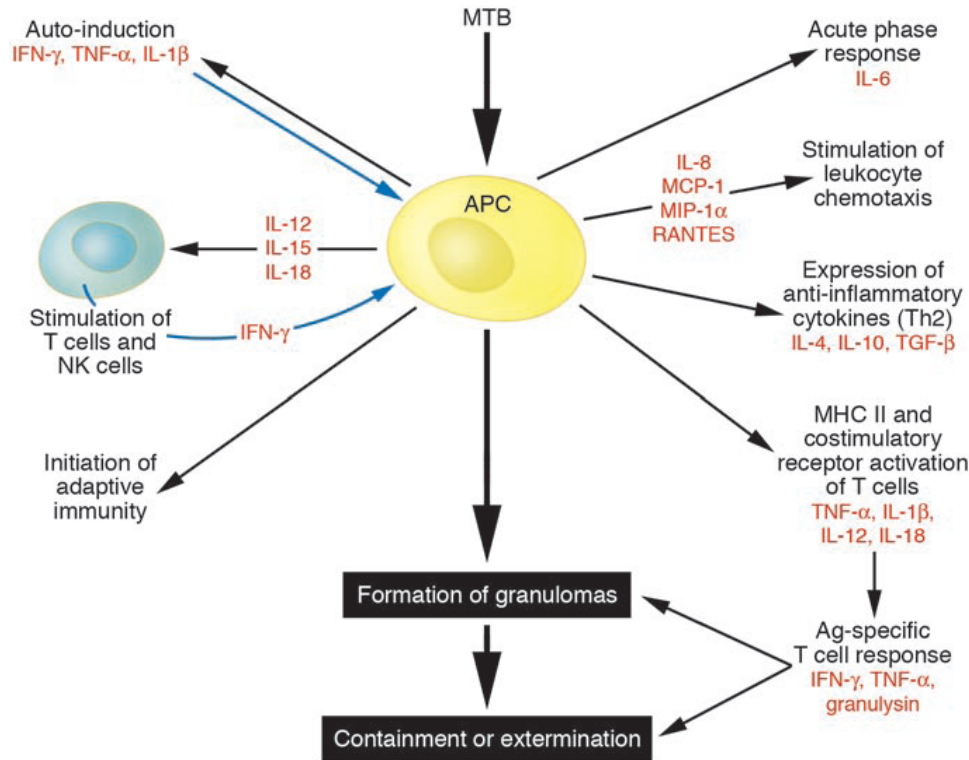
Un autre mécanisme de défense potentiel des macrophages, contre les mycobactéries, est l'apoptose ou mort programmée. Cette mort médiée par les voies Fas ou TNF- $\alpha$  semble toutefois controversée : des études montrent une réduction du nombre de bactéries dans les macrophages après apoptose (Condos *et al.* 1998) et d'autres indiquent que ce mécanisme a peu d'effet anti-mycobactérien (Tan *et al.* 1997).

Après phagocytose *in vitro* de *M. tuberculosis*, les macrophages produisent différentes cytokines dont l'IL-12 (Ladel *et al.* 1997). Cette production d'IL-12 polarise la réponse immunitaire vers le type Th1 nécessaire pour contrôler l'infection mycobactérienne (cf. II.4.6). Des souris dont le gène codant l'IL-12 est muté sont plus sensibles à l'infection par le

BCG (Wakeham *et al.* 1998). De plus des sujets présentant des mutations dans le gène codant l'IL-12 ou son récepteur développent des BCGites disséminées après vaccination (Altare *et al.* 1998).

#### II.4.3.1.1.2. Les cellules dendritiques (DC)

Les cellules dendritiques (DC) occupent une position charnière entre l'immunité innée et adaptative. Elles exercent leur fonction de sentinelle du système immunitaire en capturant, apprêtant et présentant les antigènes aux lymphocytes T. Les DC matures se trouvent très rapidement disposées en couronne à la périphérie du granulome, en contact avec les sous-populations de lymphocytes T. Les DC sont extrêmement plastiques et l'environnement dans lequel elles se trouvent joue un rôle primordial dans leur aptitude à induire et orienter la réponse immune. De nombreuses études *in vitro* ont montré la capacité de mycobactéries à moduler les fonctions et le phénotype des DC. Ainsi, l'interaction de DC humaines avec *M. tuberculosis* induit une maturation et une activation cellulaire (Henderson *et al.* 1997). En plus de cytokines pro-inflammatoires, les DC sensibilisées par des mycobactéries produisent de l'IL-10, inhibant ainsi la réponse cellulaire vis-à-vis des bactéries par diminution de la production d'IL-12 (Gagliardi *et al.* 2005). Les DC peuvent contrôler la croissance intracellulaire de la mycobactérie suite à un stimulus de l'IFN- $\gamma$  mais, à la différence des macrophages, ne peut l'éliminer. Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que les mycobactéries dans les DC ne suivent pas la voie classique de phagocytose et demeurent dans une vacuole isolée (Bodnar *et al.* 2001).



**Figure 12 : Réponse immunitaire vis-à-vis de *M. tuberculosis*.** Les APC professionnelles comme les DC et les macrophages vont initier différentes réponses contre l'invasion du pathogène qui le plus souvent contiennent ou éliminent *M. tuberculosis* (Doherty *et al.* 2004).

#### II.4.3.1.2. Les neutrophiles

Une accumulation précoce de neutrophiles dans le granulome suggère qu'ils puissent jouer un rôle au cours de l'infection mycobactérienne. Si un modèle d'injection de neutrophiles pré-activés chez des rats prévient l'infection par *M. tuberculosis* et montre un rôle plutôt protecteur des neutrophiles contre les infections mycobactériennes (Sugawara *et al.* 2004), une autre étude, employant un modèle de souris déplétées en neutrophiles, suggère un rôle mineur des neutrophiles (Seiler *et al.* 2000). Une étude comparant des souris résistantes ou susceptibles à l'infection par *M. tuberculosis* montre que les neutrophiles contribuent à la pathologie plutôt qu'à la protection vis-à-vis de *M. tuberculosis* (Eruslanov *et al.* 2005) alors que la déplétion précoce des neutrophiles nuit à la défense développée contre les mycobactéries (Pedrosa *et al.* 2000). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par les souches différentes de souris utilisées ainsi que l'origine de *M. tuberculosis* mais aussi par les différents stades étudiés. Seule la comparaison de plusieurs études pourra déterminer le rôle bénéfique et/ou néfaste des neutrophiles au cours des infections mycobactériennes.

Les neutrophiles sont capables de libérer un certain nombre de molécules effectrices anti-mycobactériennes, comme les défensines et les protéases, nécessaires pour tuer les macrophages infectés par des mycobactéries (Sharma *et al.* 2000). Tan et ses collaborateurs suggèrent que les macrophages pourraient internaliser les granules neutrophiliques contenant différents médiateurs, toxiques pour les mycobactéries (Tan *et al.* 2006). En plus de leur rôle microbicide direct, les neutrophiles synthétisent des chimiokines (IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha\beta$ ) et des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) en réponse aux bactéries.

#### **II.4.3.1.3. Les cellules Natural Killer (NK)**

Les cellules NK sont des cellules effectrices de la réponse innée contre les mycobactéries. Elles lysent directement les pathogènes ou les monocytes infectés par des mycobactéries par divers mécanismes dépendant des perforines, granzymes, granulysines ou encore de FasL. Des cultures réalisées *in vitro* montrent l'expansion des cellules NK en présence de *M. tuberculosis*, ce qui suggère que les cellules NK puissent participer à l'infection *in vivo*. Une étude récente montre que le BCG peut être reconnu par les cellules NK qui libèrent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  et qui sont ainsi capables de tuer différentes cibles dont des DC dérivées de monocytes (Marcenaro *et al.* 2008). Tout comme pour les macrophages, l'apoptose est également un mécanisme de toxicité impliquant les cellules NK. Certaines études montrent que l'activité des cellules NK observée au cours de l'infection est probablement un effet et non une cause de la maladie (Nirmala *et al.* 2001). Comme pour d'autres cellules, le rôle *in vivo* des cellules NK reste encore énigmatique.

#### **II.4.3.1.4. Les lymphocytes T non conventionnels**

##### **II.4.3.1.4.1. Les lymphocytes restreints aux molécules CD1**

CD1 est une famille de glycoprotéines de surface qui appréhendent et présentent les antigènes glycolipidiques principalement à des cellules NKT (Natural Like T cells) indépendamment des molécules du CMH. Elles se trouvent sur les CPA majoritairement sur les DC et les monocytes/macrophages. Une caractéristique des molécules CD1 réside dans leur capacité à fixer les glycolipides mycobactériens, en particulier les acides mycoliques, le glucose monomycolate, les PIM et les LAM (cf II.3.1.1). Les mécanismes intervenant dans le processus de présentation des antigènes mycobactériens par CD1 ne sont cependant que

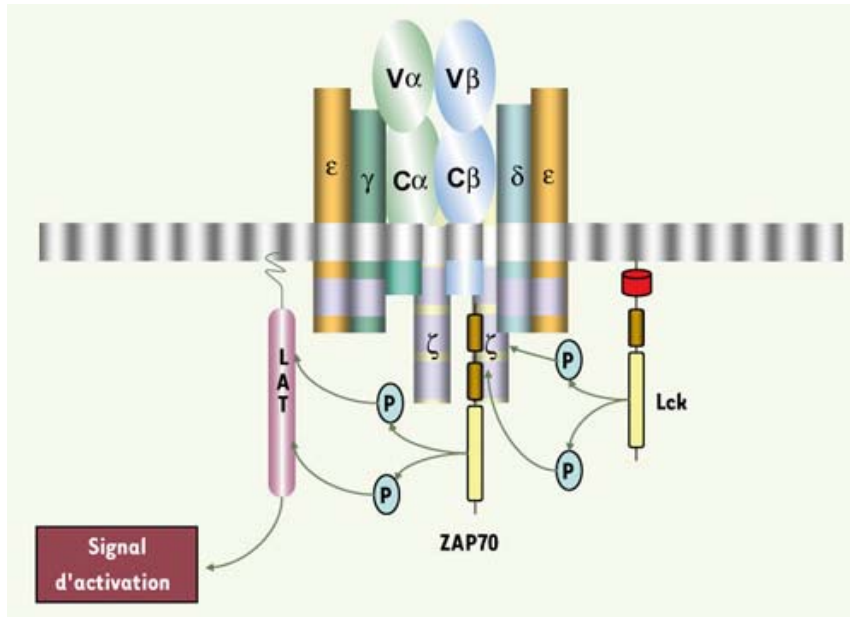
partiellement connus. En effet, comment l'antigène peut-il être présenté bien que le CD1b soit localisé au niveau des phagosomes tardifs que peu de mycobactéries atteignent et que les macrophages soient dépourvus de molécules CD1 à leur surface ? Récemment, Winau et ses collaborateurs ont montré que la saposine C permet le chargement des glycolipides mycobactériens sur les molécules de CD1b (Winau *et al.* 2004).

Cependant, le rôle des lymphocytes NKT dans la tuberculose est encore peu connu. Il a été observé que le PIM associé à CD1d active les cellules NKT (Fischer *et al.* 2004). La reconnaissance de l'alpha galactosylcéramide, ligand synthétique de CD1d, par les cellules NKT stimule la sécrétion de granulysine par les NKT et favorise la lyse de cellules infectées par *M. tuberculosis* (Gansert *et al.* 2003). Le rôle des lymphocytes T restreints par CD1 reste encore peu connu, toutefois, il semble raisonnable de supposer qu'ils puissent participer au contrôle de l'infection.

#### II.4.3.1.4.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

En 1984, Tonegawa et ses collaborateurs ont identifié une population lymphocytaire T caractérisée par un récepteur pour l'antigène (TCR, T cell receptor) formé de l'association des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  définissant les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (**Figure 13**). Ces lymphocytes représentent moins de 10 % de ceux du sang périphérique, sont principalement localisés au sein des épithéliums et constituent, à côté des lymphocytes T  $\alpha\beta$ , une population lymphocytaire T possédant des propriétés structurales et fonctionnelles propres.





**Figure 13 : Le complexe TCR/CD3.** Le récepteur T de l'antigène est constitué d'un hétérodimère ( $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ ) associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$ . Les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  et CD3 $\zeta$  forment des modules dimériques  $\delta\epsilon$ ,  $\gamma\epsilon$  et  $\zeta\zeta$ . Chaque chaîne  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$  présente dans sa partie intracytoplasmique des motifs ITAM (en violet) qui sont phosphorylés sur les résidus tyrosine par la tyrosine kinase Lck. La phosphorylation des ITAM de  $\zeta$  permet l'association de ZAP70 à cette chaîne par l'intermédiaire des 2 domaines SH2 (en marron) portés par cette kinase et secondairement sa phosphorylation par Lck. ZAP70 ainsi activée phosphoryle à son tour l'adaptateur LAT. (Le Deist *et al.*2007)

Chez l'homme, nous distinguons trois sous populations de lymphocytes T  $\gamma\delta$ :

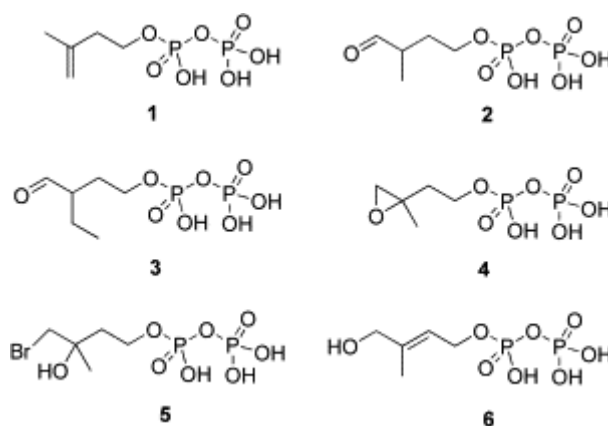
- 1) Les LT V $\delta$ 1 : sous population majoritaire dans le thymus et la rate, la chaîne  $\delta$ 1 s'associe à un répertoire divers en V $\gamma$ . Ces lymphocytes reconnaissent directement des molécules apparentées au CMH I (CD1c et MIC).
- 2) Les LT V $\delta$ 3 : sous population majoritaire de la muqueuse digestive, la chaîne  $\delta$ 3 s'associe à un répertoire divers en V $\gamma$  mais utilise préférentiellement la chaîne V $\gamma$ 8.
- 3) Les LT V $\delta$ 2 : sous population majoritaire du sang périphérique, ils représentent plus de 60 % des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . La chaîne  $\delta$ 2 s'associe avec un répertoire restreint en V $\gamma$ , le V $\gamma$ 9. Ils reconnaissent trois classes d'antigènes non peptidiques, de faible masse moléculaire et non apprêtés : les pyrophosphomonoesters, ou communément appelés phosphoantigènes (**Figure 14**), alkylamines et aminobiphosphonates. Les molécules de phosphomonoesters sont synthétisées par la voie métabolique du mévalonate (MVA) et du 1-deoxy-d-xylulose-5phosphate (DOXP). Bien que les phosphomonoesters sont directement reconnus par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ 2 suite à l'engagement du TCR, les autres classes de molécules stimulatrices, comme les

biphosphonates ou les alkylamines, sont reconnues et activent indirectement les lymphocytes T  $\gamma\delta$  en bloquant la voie du MVA, provoquant ainsi l'accumulation de phosphoantigènes à l'intérieur de la cellule (Gober *et al.* 2003).

Plusieurs sous-populations de lymphocytes  $\gamma\delta$  peuvent être impliquées dans la réponse immune dirigée contre des mycobactéries. Il a été montré, notamment dans des modèles murins, que les LT  $\gamma\delta$  ( $V\gamma 1$  et  $V\gamma 2$ ) sont rapidement recrutés et amplifiés dans les poumons après infection mycobactérienne (Dieli *et al.* 2003) et participent à l'établissement d'une réponse immune conventionnelle dirigée contre *M. tuberculosis* (Caccamo *et al.* 2006). Des travaux récents montrent que des LT  $V\delta 1$  sont activés par des fractions lipidiques de *M. tuberculosis* en présence de DC (Das *et al.* 2004). Mais ce sont bien les lymphocytes T  $\gamma\delta$  qui ont été principalement décrits comme population s'activant contre les mycobactéries.

La première description d'une réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$  vis-à-vis des mycobactéries date de 1989 (Janis *et al.* 1989). Plus tard, plusieurs études montrent une expansion de ces lymphocytes dans le sang de patients atteints de tuberculose mais également chez des patients présentant une infection par *M. leprae* ou vaccinés par le BCG (Boom 1999; Lee *et al.* 2004).

Des études, utilisant des modèles murins pour caractériser les antigènes de *M. tuberculosis*, ont mis en évidence Hsp 65 et ses peptides dérivés comme antigènes majeurs (O'Brien *et al.* 1992; Fu *et al.* 1993). On a alors recherché la même réactivité chez l'homme mais seuls de très rares clones réactifs à Hsp 65 ont pu être isolés (Haregewoin *et al.* 1989). Afin d'élucider la nature des ligands mycobactériens pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , un isolement des antigènes par chromatographies successives à partir d'extraits mycobactériens fût entrepris. Après séparation, la bioactivité était maintenue et se concentrait dans 4 fractions appelées TUBag 1 à 4 (tuberculosis antigens 1-4).



**Figure 14 : Structures de phosphoantigènes.** 1 = isopentenyl pyrophosphate (IPP), 2 = 3-formyl-1-butyl pyrophosphate (3-FBPP), 3 = 3-formyl-1-pentyl pyrophosphate, 4 = epoxide of 1, 5 = bromohydrin pyrophosphate (Phosphostim ou BrHPP), 6 = (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP)(Zhang *et al.* 2006).

En présence de phosphoantigènes mycobactériens et d'IL-2, les lymphocytes  $\gamma\delta 2$  prolifèrent, expriment des récepteurs pour des chimiokines, sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines de type Th1 et tuent les cellules infectées par *M. tuberculosis* (Hayday 2000). L'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourrait être médiée par les DC. En effet, des co-cultures de DC infectées par le BCG et des lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés ou non par des phosphoantigènes montrent une augmentation du stade de maturation des lymphocytes et une augmentation de la production de cytokines comme le TNF- $\alpha$ , traduisant une plus forte capacité à induire une réponse immune inflammatoire locale (Martino *et al.* 2007).

L'activité cytotoxique des LT  $\gamma\delta 2$  est liée à leur phénotype. Par exemple, il existe des lymphocytes T  $\gamma\delta 2$  exprimant un niveau élevé de perforine associée à une forte activité cytotoxique vis-à-vis de monocytes infectés par des mycobactéries. Les lymphocytes T  $\gamma\delta 2$  sont capables de lyser les cellules infectées mais ont aussi un pouvoir bactéricide direct grâce à la granulysine (Dieli *et al.* 2001). Malgré le fait qu'aucun ligand microbien n'ait été identifié pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins, ces cellules prolifèrent durant la phase précoce d'une l'infection mycobactérienne. Le pic de prolifération est généralement atteint une semaine après l'infection (Dieli, Ivanyi et al. 2003). Il a ainsi été montré chez la souris que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  jouent un rôle important dans la lutte contre de nombreuses infections bactériennes. Toutefois, la nature et le mode de reconnaissance des antigènes étant différents chez l'homme, des conclusions analogues quant aux rôles des lymphocytes T  $\gamma\delta 2$  ne peuvent

être tirées. Chez l'homme, le rôle joué par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les infections où leur amplification a été constatée n'est pas bien défini.

Le rôle des lymphocytes T  $\gamma\delta$  au cours des infections mycobactériennes ne semble pas restreint à une fonction cytotoxique lors d'une réponse innée ou inflammatoire suite à l'infection mycobactérienne. En effet, une réponse adaptative se traduisant par une mémoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  a été démontrée. L'implication des LT  $\gamma\delta$  dans la réponse immunitaire adaptative a d'abord été démontrée pendant des infections mycobactériennes chez des individus vaccinés par le BCG (Hoft *et al.* 1998). En effet, 7 jours après stimulation des lymphocytes sanguins des individus par des antigènes mycobactériens, les auteurs ont observé une expansion spectaculaire des LT  $\gamma\delta$  chez les sujets vaccinés par rapport aux sujets « naïfs ». De plus les LT  $\gamma\delta$  qui ont proliféré sont essentiellement des LT  $\gamma\delta$  spécifiques du phosphoantigène isopentenyl pyrophosphate (IPP). Chez le macaque, une première infection par le BCG s'accompagne d'une expansion clonale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  spécifiques de phosphoantigènes. Ces cellules semblent posséder une mémoire immunitaire puisqu'une réinfection induit une réponse rapide, prolongée et plus efficace (Shen *et al.* 2002). La stimulation par un phosphoantigène induit une prolifération des LT  $\gamma\delta$  mais ces cellules ne protègent pas de la réplication intracellulaire des mycobactéries (Spencer *et al.* 2008).

#### II.4.3.1.5. Les lymphocytes T conventionnels

Bien que les fonctions effectrices soient assurées pour la plupart par les macrophages, les cellules T sont les principaux médiateurs de la protection contre les infections mycobactériennes.

##### II.4.3.1.5.1. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les mycobactéries résidant majoritairement au sein de vacuoles dans les macrophages, les antigènes mycobactériens sont ainsi présentés aux cellules T CD4<sup>+</sup> par le CMH de classe II. Différents modèles de souris déplétées en cellules T CD4<sup>+</sup> (Caruso *et al.* 1999) ainsi que des transferts adoptifs (Orme *et al.* 1984) ont montré l'importance de ces cellules dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*. Chez l'homme, la physiopathologie de l'infection par le VIH met en évidence que la perte de cellules T CD4<sup>+</sup> augmente la susceptibilité à une

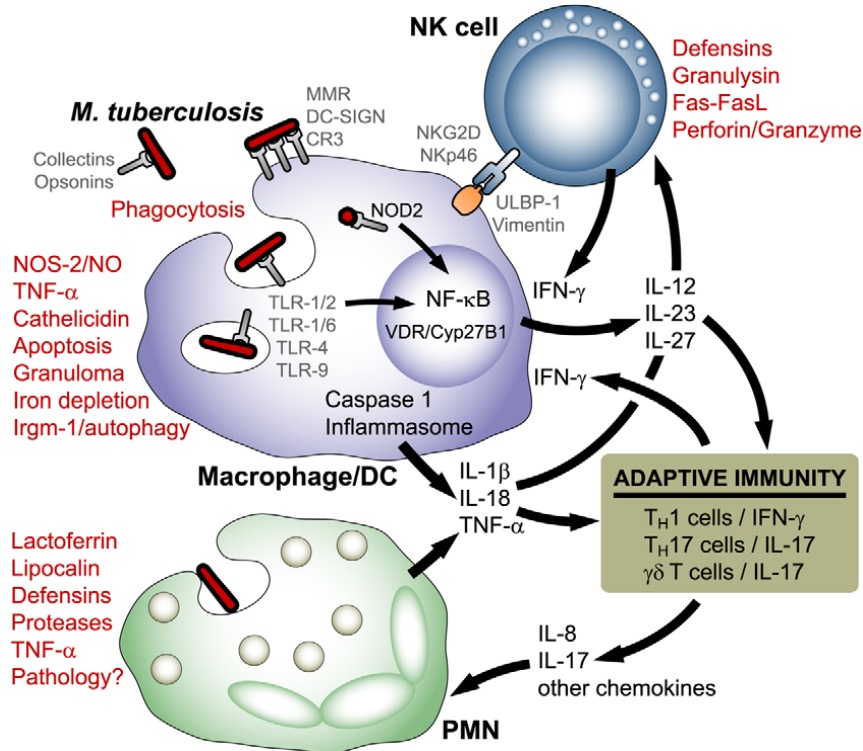
infection mycobactérienne. La fonction effectrice majeure des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est la production d'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines, capables d'activer les macrophages. En effet, dans des souris CMHII<sup>-/-</sup> ou CD4<sup>-/-</sup>, les niveaux d'IFN- $\gamma$  sont sévèrement diminués au début de l'infection mais retrouvent par la suite un niveau comparable à celui des souris sauvages (Caruso *et al.* 1999). L'IFN- $\gamma$  détecté proviendrait en particulier des cellules T CD8<sup>+</sup>. A noter également que l'expression de NOS2 est diminuée dans les macrophages de ces mêmes souris et corrèle avec l'expression d'IFN- $\gamma$ . Dans un modèle murin de persistance de *M. tuberculosis*, la déplétion en cellules T CD4 cause une réactivation rapide de l'infection malgré des niveaux d'expression d'IFN- $\gamma$  et de NOS2 comparables aux souris sauvages (Scanga *et al.* 2000).

#### II.4.3.1.5.2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les cellules CD8<sup>+</sup> sont également capables de synthétiser différentes cytokines dont l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4, et peuvent participer ainsi à la régulation de la balance Th1 et Th2. Tout comme l'association des molécules CD1 avec les antigènes mycobactériens, les mécanismes intervenant dans la liaison du CMHI avec les protéines mycobactériennes n'est pas bien connue (Teitelbaum *et al.* 1999). La lyse par certaines sous-populations de cellules T CD8<sup>+</sup> restreintes par CD1 ou CMHI et spécifiques de *M. tuberculosis* de macrophages humains infectés réduit la croissance intracellulaire des mycobactéries (Stenger *et al.* 1997). La mort intracellulaire des mycobactéries est dépendante de perforine/granulysine (Stenger *et al.* 1998) et de Fas/Fas L (Brookes *et al.* 2003). Les cellules T CD8<sup>+</sup> semblent donc participer à la réponse protectrice contre les mycobactéries. Des modèles animaux déplétés en CD4, CD8 ou les deux ont permis de comparer le rôle de chaque population de cellules T. Les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont des fonctions redondantes et complémentaires puisqu'en l'absence de CD4<sup>+</sup>, une protection partielle par les CD8<sup>+</sup> est observée.

Néanmoins, une analyse des populations CD4 et CD8 chez les patients présentant une régression de la pathologie montre qu'une faible régression est associée à une augmentation des cellules CD8<sup>+</sup> et à une diminution du rapport CD4/CD8 (Yu *et al.* 1995). Le nombre des lymphocytes CD4<sup>+</sup> ou le rapport CD4/CD8 sont des marqueurs d'évolutivité de l'infection et comporteraient un intérêt pronostique. D'une manière générale, il existe une diminution du rapport CD4/CD8 au cours de l'évolution de la maladie. Ainsi, le rapport CD4/CD8 corrèle fortement et inversement avec la susceptibilité aux infections mycobactériennes.

En conclusion, les relations entre les mycobactéries et le système immunitaire déterminent le devenir de l'infection (**Figure 15**). Les réponses immunes innée et adaptative impliquent des mécanismes différents mais coopératifs.



**Figure 15 : Réponse immunitaire au cours de la tuberculose.** Les mycobactéries sont reconnues par des récepteurs membranaires ou solubles et sont phagocytées par les macrophages, les DC et les neutrophiles. TLRs et NOD2 reconnaissent les ligands mycobactériens, ce qui aboutit à l'activation de NF-κB et la libération de molécules pro-inflammatoires mais également de molécules microbicides comme les défensines ou les cathélicidines dont l'expression est régulée par VDR. IL-12 et IL-18 favorise l'activité toxique des cellules NK. L'activation des macrophages par l'IFN-γ augmente les mécanismes effecteurs microbicides (NO), la maturation du phagosome et l'autophagie médiée par Irgm-1/IRG47. Le TNF-α contribue à l'activation des macrophages, la mort des cellules infectées et la formation du granulome. Enfin, les membres de la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-18, IL-23 et IL-27) favorisent la réponse adaptative dirigée par les cellules T. Les cellules Th1 contrôlent l'infection mycobactérienne par la production d'IFN-γ. Les cellules Th17 et les cellules T γδ sécrètent l'IL17 qui attire et active les neutrophiles contribuant à la pathologie de la maladie.

CR3, complement receptor 3; DC-SIGN, DC-specific intercellular-adhesion-molecule-3-grabbing non-integrin; MMR, macrophage mannose receptor; TLR, Toll-like receptors; ULBP-1, UL16-binding protein 1; VDR, vitamin D receptor; Cyp27B1, vitamin D-1 hydrolase Cyp27B1 (Korbel *et al.* 2008).

#### II.4.4. Les mécanismes moléculaires

##### II.4.4.1. Les récepteurs Toll-like (TLRs)

Au cours de la réponse immunitaire innée, les microorganismes sont reconnus via un nombre restreint de récepteurs de reconnaissance de motifs appelés Pathogen Recognition Receptors

(PRRs). Les motifs reconnus sont des composés microbiens, motifs moléculaires associés à la pathogénicité appelés PAMPs caractérisés par trois propriétés :

- 1) ils sont communs à de nombreux micro-organismes
- 2) ils sont essentiels à la survie des micro-organismes
- 3) ils sont absents des cellules de l'hôte.

Les récepteurs Toll-like (TLRs) sont une famille de PRRs. Le nom de TLR vient de l'homologie avec une famille de molécules retrouvée chez la drosophile, dont le principal membre est Toll (Imler *et al.* 2004). Les TLRs sont principalement exprimés par les cellules de l'immunité même si d'autres types cellulaires, comme les cellules épithéliales, expriment ces récepteurs. Les TLRs sont exprimés à la fois sur les acteurs de l'immunité innée comme les macrophages, les DC, les cellules NK, les neutrophiles mais aussi de l'immunité adaptative tels les lymphocytes B et T (Kabelitz 2007).

#### **II.4.4.1.1. Les ligands**

De nombreuses études ont montré que des mycobactéries entières ou leurs composants sont des ligands des TLRs (Quesniaux *et al.* 2004) (**Table 3**). Une combinaison de TLRs peut ainsi être utilisée par les cellules immunitaires pour augmenter la spécificité de leur réponse mais aussi utilisée par les mycobactéries afin de moduler la réponse immune en favorisant l'expression de certains ligands.

Des mycobactéries vivantes ou mortes activent des cellules CHO et les macrophages murins qui expriment TLR2 et TLR4 (Means *et al.* 1999). Différentes protéines mycobactériennes sont reconnues par les TLRs. La lipoprotéine de 19kDa est reconnue par TLR2 et induit une activation cellulaire, l'apoptose et la mort des mycobactéries (Noss *et al.* 2001). D'autres ligands de TLR2 ont été décrits : la lipoprotéine G et la lipoprotéine A (Gehring *et al.* 2004; Pecora *et al.* 2006). Une glycoprotéine de 38kDa est un ligand de TLR2 et TLR4 induisant une réponse pro-inflammatoire (Jung *et al.* 2006). Les mycobactéries possèdent à leur surface des protéines contenant des séquences polymorphiques riches en GC (PGRS), comme la PE\_PGRS33, qui induisent la synthèse de TNF- $\alpha$  par les macrophages via TLR2 (Basu *et al.* 2007). De même, Hsp 70 active à la fois TLR2 et TLR4 alors que Hsp 65 ne semble pas être reconnue par TLR4 et toutes deux engendrent l'activation de la voie MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM et NF- $\kappa$ B (Bulut *et al.* 2005).

L'enveloppe mycobactérienne contient de nombreux lipides et glycolipides reconnus par les TLRs. Les macrophages et les DC sont activés par TLR2 qui fixe le LAM des mycobactéries à croissance rapide (PILAM) (Wieland *et al.* 2004), le LM de *M. tuberculosis* et BCG (Quesniaux *et al.* 2004) mais aussi le PIM2 et le PIM6 (Gilleron *et al.* 2003). Récemment, il a été montré que TLR2 peut également reconnaître le ManLAM en présence de LPS-binding protein (LBP) et CD14 (Elass *et al.* 2007). La LBP est une protéine sérique qui transfère les glycolipides bactériens au CD14. A côté de TLR2 et TLR4, TLR9 joue un rôle dans la défense de l'hôte en reconnaissant l'ADN mycobactérien (Bafica *et al.* 2005; von Meyenn *et al.* 2006).

Enfin, l'interaction des GPLs avec TLR2 dépend du degré d'acétylation et de méthylation des GPLs, suggérant une capacité des mycobactéries à modifier la structure de leurs composants et donc leur reconnaissance par TLR2 (Sweet *et al.* 2008).

Composants mycobactériens	TLR	Espèces mycobactérienne	Références
Lipoprotéine de 19kDa	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>	Brightbill <i>et al.</i> 1999 Noss <i>et al.</i> 2001
Lipoprotéine de 27kDa	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Hovav <i>et al.</i> 2004
Lipoprotéine de 33kDa	TLR2	<i>M. leprae</i>	Krutzik <i>et al.</i> 2003
Lipoprotéines de 38kDa	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Jung <i>et al.</i> 2006
AraLAM	TLR2	<i>M. chelonae</i>	Vignal <i>et al.</i> 2003
PILAM	TLR2	<i>M. smegmatis</i>	Wieland <i>et al.</i> 2004
ManLAM	-	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. kansasii</i>	Quesniaux <i>et al.</i> 2004
ManLAM	TLR2/CD14/LBP	<i>M. kansasii</i>	Elass <i>et al.</i> 2007
GPL	TLR2	<i>M. avium</i>	Sweet <i>et al.</i> 2006
Hsp 65	TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut <i>et al.</i> 2005
Hsp 70	TLR2, TLR4	<i>M. tuberculosis</i>	Bulut <i>et al.</i> 2005
LM	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Quesniaux <i>et al.</i> 2004
Lipoprotéine LprA	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Pecora <i>et al.</i> 2006
Lipoprotéine LprG	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Gehring <i>et al.</i> 2006
PE_PGRS33	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Basu <i>et al.</i> 2007
PIM2, PIM6	TLR2	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. smegmatis</i>	Gilleron <i>et al.</i> 2003
STF	TLR2	<i>M. tuberculosis</i>	Means <i>et al.</i> 1999

**Table 3 : Composants mycobactériens reconnus par les TLRs.**



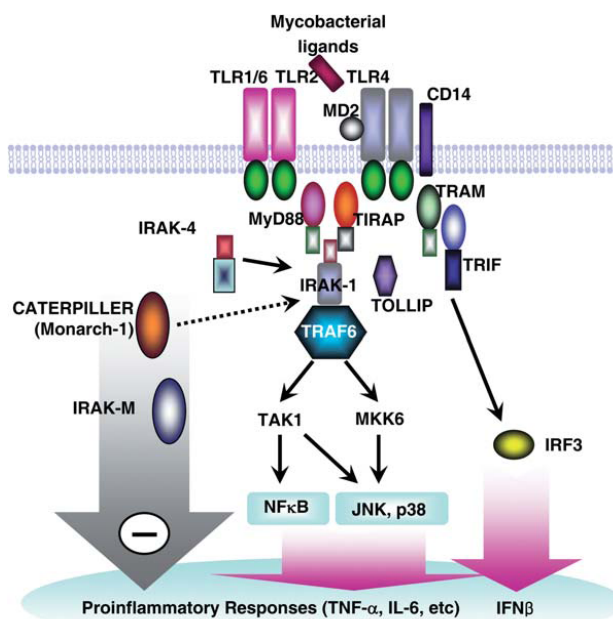
#### II.4.4.1.2. Les voies de signalisation

Selon les ligands, un même TLR peut utiliser des cascades de signalisation différentes aboutissant à l'activation de différents facteurs de transcription, donnant lieu à des réponses appropriées et efficaces contre les mycobactéries (**Figure 16**).

MyD88 semble essentiel pour initier la production de cytokines inflammatoires par les TLRs, à l'exception du TLR3 et de la voie indépendante de MyD88 du TLR4, qui requièrent l'adaptateur TRIF (Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor-inducing interferon  $\beta$ ) (Takeda *et al.* 2004). En effet, des souris déficientes en MyD88 ne produisent plus de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-12 en réponse à des ligands des TLRs (Akira *et al.* 2000).

De plus, la reconnaissance de PAMPs par les TLRs implique le recrutement d'une série de molécules contenant un domaine TIR et permettant des interactions TIR/TIR (O'Neill *et al.* 2007). Ces molécules, outre MyD88 et TRIF, sont la protéine adaptatrice contenant un domaine TIR (TIRAP, connu également sous le nom de Mal) et la molécule adaptatrice relative à TRIF (TRAM). Enfin, une molécule adaptatrice SARM peut inhiber TRIF et agit donc comme un régulateur inhibiteur de la voie de signalisation d'IRF3 (Carty *et al.* 2006). Un mécanisme d'échappement par les bactéries a récemment été découvert. En effet certaines bactéries virulentes expriment des protéines possédant un domaine TIR et interfèrent ainsi avec les voies de signalisation des TLRs (Cirl *et al.* 2008).

En présence de ligands mycobactériens, le recrutement de l'adaptateur MyD88 conduit à l'activation de kinases, qui phosphorylent les protéines activées par un mitogène (MAPKs), et de NF- $\kappa$ B afin de contrôler l'expression de gènes des cytokines inflammatoires. Concernant la voie indépendante de MyD88, le recrutement de TRIF permet essentiellement l'activation de la protéine régulatrice de l'IFN-3 (IRF3) qui joue un rôle important dans l'induction des interférons de type I comme l'IFN- $\beta$ .



**Figure 16 : Activation des MAP kinases après stimulation des TLRs par des agonistes mycobactériens.** Cette stimulation aboutit au recrutement des différents adaptateurs : MyD88 et TIRAP permettant la formation du complexe IRAK-1/TRAF6. TRAF6 active le complexe TAK1 aboutissant à la phosphorylation de NEMO et à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui initie l'expression de gènes codant des cytokines proinflammatoires. TAK1 peut aussi activer la cascade des MAP kinases aboutissant à l'activation de facteurs de transcription comme AP-1 régulant également l'induction de gènes proinflammatoires. Bien que TLR2 utilise uniquement une voie dépendante de MyD88, TLR4 utilise soit une voie dépendante de MyD88 soit une voie indépendante de MyD88 mais dépendante de TRIF. Cette voie dépendante de TRIF induit des gènes proinflammatoires et des IFN de type I. IRAK-M et CATERPILLAR interfèrent avec les voies d'activation des TLRs, plus précisément au niveau d'IRAK-1. MD, myeloid differentiation protein-2; TRAF6, TNF receptor-associated factor 6; TOLLIP, Toll interacting protein; IRF, interferon regulatory factor; TAK, TGF- $\beta$ -activated kinase; CATERPILLAR, CARD, transcription enhancer, R[purine]-binding, pyrin, lots of leucine regions (Jo *et al.* 2007).

#### II.4.4.1.3. Rôles dans les infections mycobactériennes

Grâce aux liaisons à leurs différents ligands, les TLRs peuvent jouer des rôles variés dans les infections mycobactériennes. Les TLRs modulent la maturation des cellules immunitaires et polarisent la réponse. Certains PAMPs mycobactériens favorisent la maturation des DC médiée par TLR2 ou TLR4, comme la lipoprotéine de 19kDa ou d'autres composants de l'enveloppe mycobactérienne (Tsuji *et al.* 2000; Hertz *et al.* 2001). D'ailleurs, TLR2 semble être l'inducteur principal du signal pro-inflammatoire induit par *M. tuberculosis* se traduisant par une libération de TNF- $\alpha$  (Underhill *et al.* 1999). Différentes études ont rapporté le rôle protecteur de TLR2 au cours des infections mycobactériennes. Ainsi, en réponse à une souche virulente de *M. avium*, des souris déficientes en TLR2 présentent une résistance à l'infection et une réponse des neutrophiles réduites par rapport à celles des souris sauvages (Feng *et al.*

2003). Une étude récente a montré que les souris déficientes en TLR2 sont plus susceptibles à l'infection mycobactérienne que des souris déficientes en TLR4 ou des souris sauvages (Tjarnlund *et al.* 2006). De plus, un défaut de toxicité intracellulaire du à l'incapacité des macrophages, provenant de souris déficientes en TLR2, de produire du TNF- $\alpha$  est observé. Enfin, Liu et ses collaborateurs ont montré que la signalisation TLR2/TLR1 médiée par *M. tuberculosis* augmente l'expression du récepteur pour la vitamine D (VDR) aboutissant à l'augmentation de l'expression de peptides anti-microbiens (Liu *et al.* 2007).

La contribution de TLR4 à la résistance aux infections mycobactériennes n'est pas encore clairement établie. Un modèle murin d'infection intranasale par *M. tuberculosis* montre que TLR4 joue un rôle dans la défense contre *M. tuberculosis in vivo*. Ainsi, une augmentation de la mortalité et de la charge bactérienne dans les poumons est observée chez des souris possédant un TLR4 non fonctionnel (Abel *et al.* 2002; Branger *et al.* 2004). Au contraire, aucune différence n'est observée entre des souris déficientes en TLR4 et des souris sauvages, en réponse à une infection par *M. avium* (Feng *et al.* 2003).

TLR9 joue également un rôle dans la réponse développée vis-à-vis des mycobactéries. Des souris déficientes à la fois pour TLR2 et TLR9 sont beaucoup plus sensibles à *M. tuberculosis* que les souris déficientes pour un seul des deux gènes, indiquant qu'une coopération existe entre ces deux TLRs (Bafica *et al.* 2005). De plus, la production d'IL-12 et l'expression de CD86 par les DC infectées par BCG ne sont pas seulement dépendantes de TLR2, mais semblent aussi dépendre de TLR4 et TLR9 (von Meyenn *et al.* 2006).

Une étude a montré une association entre des polymorphismes du gène codant TLR8 avec la susceptibilité à la tuberculose (D'Avila *et al.* 2008). De plus, une augmentation de l'expression protéique de TLR8 est observée dans les macrophages différenciés *in vitro* et activés par *M. bovis* BCG. Un polymorphisme concernant TLR1 diminue l'incidence de la lèpre suggérant la reconnaissance de *M. leprae* par TLR1 (Johnson *et al.* 2007). Ceci reste cependant à confirmer.

Alors que les composants purifiés de mycobactéries semblent préférentiellement interagir avec TLR2 (**Table 3**), l'infection par des mycobactéries entières est beaucoup plus complexe, et implique différentes combinaisons de TLRs et conduisant à une activation différentielle des voies effectrices anti-mycobactériennes.

#### II.4.4.1.4. Cross-talk entre TLRs et autres PRRs

Des récepteurs autres que les TLRs contribuent à la réponse de l'hôte vis-à-vis des mycobactéries en reconnaissant d'une part des ligands activateurs et d'autre part des ligands régulateurs.

L'expression de CD40, une molécule de co-stimulation est augmentée par les mycobactéries. Une étude a montré l'Hsp 70 en tant que ligand de CD40 (Lazarevic *et al.* 2003). En effet, l'Hsp 70 induit la libération d'IL-12 par les DC issues de souris sauvages mais pas chez les DC de souris déficientes pour CD40. Le CD44 soluble, une molécule d'adhérence, fixe *M. tuberculosis* et semble donc être un récepteur pour les mycobactéries (Leemans *et al.* 2003). Si la famille des TLRs constitue l'essentiel des récepteurs de l'immunité innée, il existe aussi 2 autres familles : les CLR (C-type lectin receptors) membranaires ; les NLRs (NOD-like receptors) et les RLRs (Rig-like receptors) qui ont une localisation intracellulaire (O'Neill 2008). L'activation de Dectin-1, un CLR, en coopération avec TLR2 induit une synthèse de TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES et G-CSF par les macrophages infectés par des mycobactéries (Yadav *et al.* 2006). Ainsi Dectin-1 amplifierait la réponse pro-inflammatoire médiée par TLR2 mais ce rôle doit être confirmé *in vivo*. Les molécules Syk et MyD88 semblent nécessaires pour cette synergie (Dennehy *et al.* 2008). Les interactions TLRs/NLRs sont très étudiées (Creagh *et al.* 2006). Récemment, une étude a montré que les TLRs et NOD2, une protéine intracellulaire riche en répétitions leucine similaires à celles des TLRs, sont nécessaires pour une activation efficace et synergique de la production de cytokines pro-inflammatoires au cours d'une infection par *M. tuberculosis* (Ferwerda *et al.* 2005). Cependant, la réponse de NOD2 à différents antigènes mycobactériens, comme le muramyl dipeptide (MDP), inhibe les voies de signalisation des TLRs notamment en impliquant IRF4 (Watanabe *et al.* 2008).

Contrairement au PILAM et au LM, seul le ManLAM a été identifié comme ligand de DC-SIGN et du MR (Maeda *et al.* 2003). Le ManLAM a des effets majoritairement anti-inflammatoires lorsqu'il se lie au récepteur au mannose (MR) et à DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) (Nigou *et al.* 2001; Geijtenbeek *et al.* 2003). La liaison de *M. tuberculosis* au MR est dépendante des résidus mannose retrouvés sur le LAM. La production d'IL-12 par les DC induite par le LPS, ligand de TLR4, est inhibée par le ManLAM suggérant un dialogue entre MR et TLR4 (Nigou *et al.* 2001).

#### II.4.4.2. L'enveloppe mycobactérienne, un immunomodulateur

La nature de la réponse immune dépend donc de la nature des récepteurs engagés mais aussi de la nature des ligands reconnus. Ainsi nous nous intéresserons dans un premier temps aux ligands activateurs des cellules immunitaires puis dans un second temps aux ligands régulateurs de la réponse immune.

#### **II.4.4.2.1. Les ligands mycobactériens activateurs**

Le processus de cross-présentation d'antigènes par les cellules dendritiques serait augmenté en présence d'Hsp65 mycobactérienne (Chen *et al.* 2004) suggérant que les Hsp pourraient être un lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative. L'immunité dirigée contre la protéine Hsp 65 des mycobactéries est associée, entre autre, à de l'arthrite auto-immune chez le rat et l'homme (Cohen 1991). Récemment, une étude a montré que l'Hsp 60 peut moduler la réponse des macrophages au PPD en augmentant l'expression de TLR2 sur ces cellules (Khan *et al.* 2008).

Parmi les glycolipides de l'enveloppe mycobactérienne, le tréhalose-6,6' dimycolate (TDM) et le PIM induisent une cascade pro-inflammatoire et modulent la formation de granulomes chez la souris (Gilleron *et al.* 2001; Geisel *et al.* 2005). De plus, le TDM joue également un rôle dans les réponses innée et adaptative, cellulaire et humorale, et dans l'angiogenèse (Ryll *et al.* 2001). Le PILAM induit une réponse pro-inflammatoire par les macrophages et les DC (Briken *et al.* 2004).

Des souches de *M. tuberculosis* mutées dans la production d'acides mycoliques montrent une atténuation de la virulence chez la souris (Dubnau *et al.* 2000). Les acides mycoliques pourraient se lier à la galectine-3 (Barboni *et al.* 2005).

#### **II.4.4.2.2. Les ligands mycobactériens régulateurs**

##### **II.4.4.2.2.1. Les protéines**

Une étude récente a montré que l'ESAT-6 se fixe à TLR2 et inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B et IRF grâce à l'action de la kinase Akt (Pathak *et al.* 2007). La forme extracellulaire d'ESAT-6 est reconnue par les cellules du système immunitaire et engendre une réponse immune protectrice contre l'infection (Pym *et al.* 2003). En effet, ESAT-6 se révèle être un inducteur puissant de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T de patients tuberculeux (Abd

El-Maged *et al.* 2006). Par contre, la forme intracellulaire d'ESAT-6 et CFP-10 est impliquée dans l'augmentation de la virulence des mycobactéries pathogènes puisque la transfection d'une lignée de macrophages avec CFP-10 affecte la production de NO et de TNF- $\alpha$  (Singh *et al.* 2003).

La fonction de la lipoprotéine 19kDa n'est pas claire. Cependant, ses propriétés antigéniques ont été décrites par Vordermeier et ses collaborateurs (Vordermeier *et al.* 1997). Il a été montré que cette lipoprotéine est responsable de l'apoptose des macrophages liée à une activation de TLR2 (Lopez *et al.* 2003). De plus, le défaut de la lipoprotéine de 19kDa chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG diminue la mort des macrophages (~70% de réduction), en comparaison avec l'apoptose induite par les souches sauvages (Ciaramella *et al.* 2004). Quand *M. smegmatis*, qui à l'état sauvage est incapable d'induire une apoptose, exprime la lipoprotéine, une mort cellulaire a lieu dans les macrophages infectés. Ces résultats prouvent que la lipoprotéine de 19kDa représente le signal apoptotique majeur durant la phase précoce de l'infection. Cependant, la lipoprotéine de 19kDa inhibe l'apprêtement et la présentation des antigènes par les macrophages et constitue aussi un mécanisme d'échappement des mycobactéries (cf II.4.5.3).

#### II.4.4.2.2. Les glycolipides

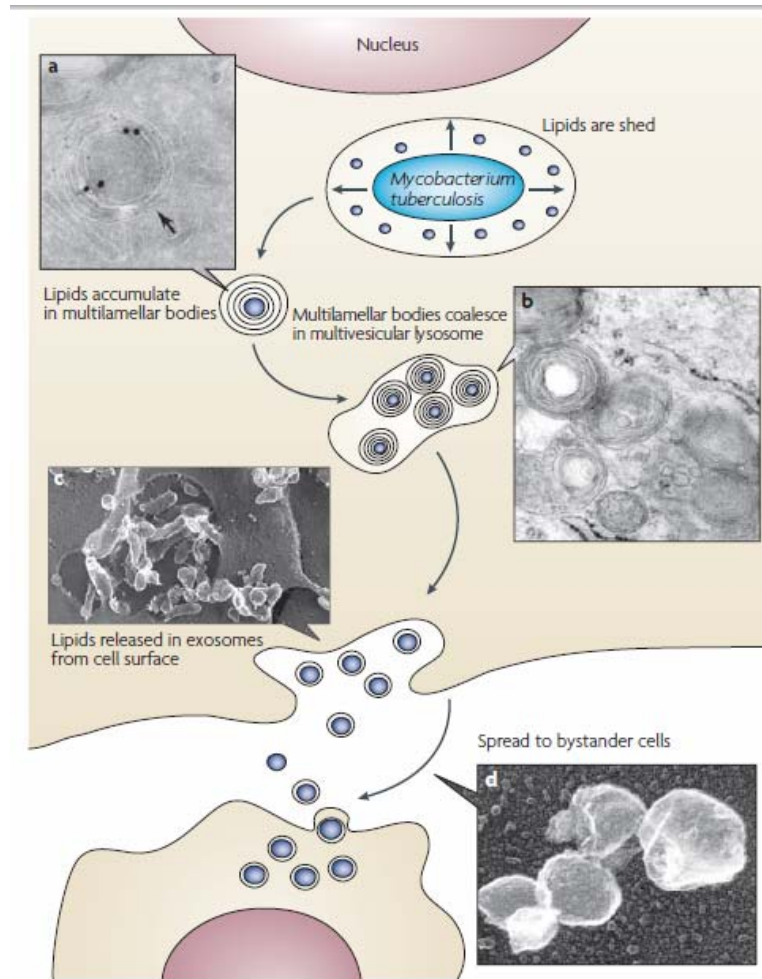
Un mécanisme de liaison du LAM aux cellules, indépendant de récepteur, a été mis en évidence par Ilangumaran et ses collaborateurs (Ilangumaran *et al.* 1995). De ce fait, le LAM peut se lier aux cellules T et aux macrophages directement par son incorporation dans la membrane plasmique grâce au glycosylphosphatidylinositol (GPI). La prostaglandine E2 et le ManLAM semble participer à la prolifération des lymphocytes T régulateurs observée chez les patients tuberculeux (Garg *et al.* 2008). Les molécules de LAM et LM permettent la différenciation de lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes de type Th1 (Ito *et al.* 2008). La structure du LAM joue donc un rôle majeur dans les propriétés immunomodulatrices des mycobactéries. Il est admis aujourd'hui que la coiffe de mannose joue un rôle important dans la virulence des mycobactéries. Cependant, une étude récente suggère que cette coiffe de mannose sur le LAM n'est pas essentielle aux interactions s'établissant entre l'hôte et *M. tuberculosis* (Appelmelk *et al.* 2008). Néanmoins, les études concernant les relations structure/fonctions sont limitées en raison de difficultés techniques comme celles à enlever spécifiquement la coiffe de mannose du ManLAM de *M. tuberculosis* et le nombre limité de variants structuraux de LAM.

Le LM, le précurseur biosynthétique du LAM, possède une dualité fonctionnelle et peut ainsi moduler la réponse inflammatoire. Au contraire du LAM, le LM provenant de différentes espèces mycobactériennes (*M. kansasii*, *M. chelonae*, BCG) active les macrophages provenant de souris sauvages mais pas de souris déficientes pour TLR2 confirmant l'implication de TLR2 dans la reconnaissance du LM (Quesniaux *et al.* 2004). Dans cette même étude, à la fois le LAM et le LM inhibent la libération d'IL-12 par les macrophages activés par du LPS. De plus, cette inhibition est observée aussi bien pour les macrophages de souris sauvages et que ceux de souris déficientes pour TLR2. Ainsi, dans certaines conditions, le LM est capable de stimuler ou d'inhiber la réponse pro-inflammatoire en interagissant avec des PPRs ayant des effets anti-inflammatoires. Cette dualité fonctionnelle du LM est liée au degré d'acylation de la molécule (Doz *et al.* 2007).

Plus récemment, le rôle des PGL dans l'inhibition de la maturation du phagosome et de la production de cytokines pro-inflammatoires induite par *M. bovis* BCG a été démontré (Robinson *et al.* 2008).

Ces composants mycobactériens jouent donc un rôle important, tant dans la physiologie des mycobactéries que dans leurs interactions avec l'hôte. Le rapport LM/LAM varie selon l'espèce mycobactérienne : *M. bovis* BCG (1/1) (mol/mol) et *M. chelonae* (9/1). Néanmoins, le rôle de la balance LM/LAM dans l'établissement et la persistance de la réponse immune reste à définir. Cette propriété de certains composants mycobactériens à moduler la réponse immune pourrait donc constituer un mécanisme d'adaptation des mycobactéries pathogènes visant à minimiser la réponse immune de l'hôte.

Les mycobactéries peuvent donc influencer l'environnement cytokinique en favorisant la synthèse, l'expression membranaire de certains composants mais aussi leur trafic intra-vésiculaire, en dehors de la vacuole, permettant ainsi le transfert des lipides à d'autres cellules (**Figure 17**) (Beatty *et al.* 2000).



**Figure 17 : Libération et transfert des lipides mycobactériens.** *M. tuberculosis* libère des composants membranaires dans les vacuoles. Ces lipides s'accumulent dans des corps multilamellaires (a) associant à la fois des composants de l'hôte et des composants dérivés des pathogènes. Les corps multilamellaires fusionnent avec un lysosome, enrichi en molécules de CMH de classe II (b). Ces vésicules sortent du macrophage infecté par exocytose et se retrouvent dans le milieu externe (c). Ces exosomes, contenant les lipides et les protéines du pathogène, sont internalisés par les cellules avoisinantes (d) (Russell 2007).

#### II.4.5. Mécanismes potentiels d'échappement des mycobactéries

Les mycobactéries sont remarquablement bien adaptées à leur hôte. Comment ces bactéries parviennent-elles à survivre si longtemps, perpétuellement soumises à la pression du système immunitaire de l'hôte ? Malgré la forte toxicité des médiateurs générés suite à l'activation des macrophages, les mycobactéries peuvent persister au sein de cet environnement. D'une part, les mycobactéries sont capables d'échapper à deux mécanismes antimicrobiens majeurs : la fusion du phagolysosome et la production de composés bactéricides comme les ROI et les RNI. D'autre part, les mycobactéries modulent la réponse



immunitaire induite au cours de l'infection grâce aux composants de leur enveloppe (cf II.4.4.2).

#### **II.4.5.1. Inhibition de la fusion du phagolysosome**

La survie et la multiplication des mycobactéries au sein des macrophages semble associées à l'absence de fusion entre les vacuoles contenant les mycobactéries et les lysosomes. Après phagocytose par les cellules de l'hôte, les bactéries sont internalisées dans une structure membranaire, le phagosome. Après fusion avec différentes vésicules, celui-ci mature et acquiert les marqueurs membranaires des endosomes précoces puis tardifs et enfin des lysosomes. Le pH du phagosome évolue pour se stabiliser à 5.5, optimal pour l'activité des protéases et enzymes hydrolytiques du lysosome. Les mycobactéries persistent à l'intérieur du phagosome en bloquant la maturation du phagolysosome. Cette inhibition serait due à la non acidification du phagosome qui reste à pH6.5 (Sturgill-Koszycki *et al.* 1994). Ce maintien du pH permettrait également d'inhiber la maturation des enzymes hydrolytiques du macrophage. Ce phénomène semble lié à l'absence ou à une faible expression sur la membrane de la vésicule de l'ATPase (de la famille Ras, notamment rab5 et rab7) à protons responsable de l'acidification de la vacuole (Kelley *et al.* 2003; Sun *et al.* 2007). D'autres enzymes mycobactériennes contribueraient au maintien du pH neutre via la production d'ions ammonium (Harth *et al.* 1994). Chez la souris, le BCG retient la protéine TACO (tryptophane aspartate-containing coat), marqueur cellulaire des endosomes précoces, à la surface de la vacuole ce qui inhiberait la fusion phagolysosomale et permettrait ainsi au BCG d'échapper aux défenses de l'hôte (Ferrari *et al.* 1999). Un nouveau mécanisme d'inhibition de la fusion du phagolysosome faisant intervenir l'incorporation de LAM dans la membrane des macrophages a été décrit (Welin *et al.* 2008).

#### **II.4.5.2. Neutralisation des mécanismes antimicrobiens**

La résistance mycobactérienne vis-à-vis des ROI et RNI est basée sur de multiples stratégies que le bacille a développées. Le LAM et les acides mycoliques spécifiques de la paroi mycobactérienne rendent les bactéries résistantes au stress oxydatif causé par les ROI (Chan *et al.* 1989; Yuan *et al.* 1995). Le LAM est capable de neutraliser les radicaux oxydants cytotoxiques produits par le macrophage et destinés à détruire les bactéries (Chan *et al.* 1991). De plus, *M. tuberculosis* possède plusieurs enzymes, dont la superoxyde dismutase, catalase,

alcool hydroperoxydase, produit du gène *noxRI*, capables d'inactiver les formes réactives de l'oxygène (Flynn *et al.* 2001). De même, les mycobactéries produisent KatG, une peroxydase-catalase, qui inactive les ROI à l'intérieur des phagosomes (Li *et al.* 1998). Ensuite, des sous-unités du protéasome mycobactérien semblent nécessaires pour la résistance aux RNI par exemple en remodelant ou en éliminant les protéines mycobactériennes endommagées par les RNI (Darwin *et al.* 2003; Pieters *et al.* 2003).

#### II.4.5.3. Modulation de la présentation antigénique

Les DC pourraient constituer un réservoir contenant les mycobactéries *in vivo*, particulièrement au niveau des ganglions lymphatiques dans lesquels elles migrent afin d'initier la réponse spécifique à l'infection. En effet, les DC seraient un environnement propice à la survie et la réplication des mycobactéries (Bodnar *et al.* 2001). *In vitro*, les mycobactéries peuvent moduler les fonctions et le phénotype des DC après leur internalisation. Des monocytes infectés par *M. tuberculosis* se différencient en DC qui n'expriment pas CD1 à leur surface et produisent non pas de l'IL-12 mais de l'IL-10, aboutissant à la différenciation de cellules T CD4 naïves incapables de produire de l'IFN- $\gamma$  ou de l'IL-4 (Mariotti *et al.* 2002). Des résultats similaires sont observés avec le BCG (Martino *et al.* 2004). *M. tuberculosis* et BCG interfèrent ainsi avec la différenciation des DC. Ce mécanisme n'est pas observé chez les mycobactéries non pathogènes comme *M. smegmatis*. Ces résultats suggèrent une corrélation possible entre la virulence de la mycobactérie et leur capacité à subvertir la différenciation des DC.

La lipoprotéine de 19kDa inhibe la présentation d'antigène par les macrophages murins en diminuant l'expression des molécules du CMHII de manière dépendante de TLR2 (Noss *et al.* 2001) mais aussi les molécules du CMHI (Tobian *et al.* 2003). De ce fait, les mycobactéries sont capables d'échapper à la reconnaissance par les cellules T CD4 et CD8.

La membrane du phagosome contenant le BCG est perméable aux molécules de taille inférieure à 70kDa (Teitelbaum *et al.* 1999; Beatty *et al.* 2000). Ainsi, le BCG a accès aux nutriments présents dans le cytoplasme de la cellule infectée. Le BCG est donc capable d'aménager le compartiment phagosomal pour créer un environnement favorable à sa persistance chez l'hôte.

#### II.4.6. Réponse de type Th2 et tuberculose

En termes d'immunité adaptative anti-mycobactérienne, la plupart des études se sont focalisées sur la production de cytokines de type Th1, nécessaire au contrôle de l'infection mycobactérienne. L'implication de la réponse Th2 dans les réponses aux mycobactéries demeure peu étudiée.

Certains modèles animaux ne montrent pas de réelle dichotomie de la survie en fonction des profils Th1-Th2 dans la réponse immune au cours de la tuberculose (Jung *et al.* 2002). Des souris déficientes en IL-4 infectées par *M. tuberculosis* montrent une charge bactérienne comparable à celle des souris sauvages infectées (North 1998). Cependant, une autre étude chez la souris montre qu'au cours de la réactivation des bacilles, une évolution du profil Th1 vers un profil Th2 est observée (Howard *et al.* 1999). Plusieurs études chez la souris indiquent que l'étape précoce de la réponse vis-à-vis des mycobactéries est caractérisée par une réponse Th1 suivie par l'augmentation de cellules produisant des cytokines Th2 (Orme *et al.* 1993; Hernandez-Pando *et al.* 1996). L'IL-4 et d'autres marqueurs de l'activité Th2 comme les IgE et IgG sont fréquemment retrouvés chez des patients présentant une tuberculose avancée (Lienhardt *et al.* 2002). Le changement de profil de sécrétion (cytokines Th1 vers cytokines Th2) serait associé à la maladie tuberculeuse à un stade tardif. Au cours de la latence, le contrôle de la croissance bactérienne nécessiterait la production de cytokines Th1 par les cellules T CD8. Ainsi, les cellules T purifiées de patients lépreux mais conservant une certaine résistance à la maladie produisent essentiellement des cytokines Th1 contrairement aux cellules T de patients présentant une lèpre lépromateuse produisent une réponse majoritairement avec des cytokines Th2 avec production d'IL-4 (Sieling *et al.* 1994). Torres et ses collaborateurs ont montré que des patients ayant une tuberculose active présentaient un profil de type Th2 (Torres *et al.* 1998).

La présence d'IL-4 est-elle donc une conséquence **(1)** ou une cause **(2)** au cours de la tuberculose humaine ?

**(1)** D'une part, une suppression ou une faible réponse Th1 plutôt qu'une forte réponse Th2 ont été suggérées pour expliquer l'inefficacité à contrôler le développement de l'infection. Dans ce contexte, nous pouvons citer l'exemple de l'IL-27, connue pour induire une réponse Th1 précoce mais qui, dans un modèle de tuberculose murine, inhibe la réponse Th1 tardive, contrôle une inflammation excessive et empêche une réponse Th1 optimale pour l'élimination du pathogène (Holscher *et al.* 2005).

**(2)** D'autre part, le développement de la réponse Th1 semble être nécessaire à une réponse immune efficace contre les mycobactéries alors qu'une réponse Th2 semble favoriser la

réactivation de la maladie. En présence de TNF- $\alpha$ , l'IL-4 induit une apoptose exagérée des lymphocytes qui expliquerait l'anergie des lymphocytes T observée chez des patients tuberculeux (Seah *et al.* 2001).

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les éosinophiles jouent un rôle important dans la physiopathologie de nombreuses manifestations allergiques et dans les mécanismes immunitaires associés à certaines parasitoses, comme les helminthiases. Il apparaît maintenant que leurs fonctions ne soient pas uniquement liées à la libération de médiateurs cytotoxiques, néfastes dans l'allergie ou bénéfiques contre certains parasites. Ces cellules sont en effet capables de produire de multiples cytokines de type Th1 ou Th2 en fonction de l'environnement. Cependant, hormis leur rôle protecteur contre les helminthes via l'ADCC, la possibilité que les éosinophiles participent directement à la réponse immune contre les pathogènes comme les bactéries a été peu envisagée jusqu'ici. Pourtant, leur capacité importante de stockage de médiateurs, leur localisation tissulaire préférentielle à l'interface avec le milieu extérieur, le potentiel cytotoxique remarquable qu'ils peuvent utiliser rapidement et sélectivement grâce à des mécanismes de dégranulation finement régulés, sont autant d'arguments en faveur du rôle potentiel que pourraient jouer les éosinophiles dans l'immunité innée. De plus, les éosinophiles expriment un grand nombre de récepteurs comme les TLRs, qui reconnaissent des motifs conservés sur les pathogènes, mais aussi des récepteurs communs à la lignée lymphoïde, comme CD28, CD40/CD40L, CD25 et CD4 suggérant des fonctions effectrices autres que celles médiées par les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines dont la ligation induit la libération de médiateurs cytotoxiques et/ou cytokines. Les éosinophiles ne seraient donc pas uniquement des cellules « témoins » attirées passivement sur les sites inflammatoires, mais participeraient en tant qu'« acteurs » à la régulation de la réponse immunitaire.

Dans ce contexte, notre projet de recherche a consisté à étudier le rôle des éosinophiles dans l'immunité innée, en tant qu'intervenants précoces de la réponse immunitaire. A cette fin, nous avons étudié la capacité des éosinophiles à s'activer directement en réponse à des mycobactéries en choisissant dans un premier temps *M. bovis* BCG comme modèle d'étude (**Article n°1**).

Cette approche présentait de multiples intérêts :

1) de récentes découvertes, même controversées, ont montré l'expression de certains TLRs sur les éosinophiles. Les mycobactéries exprimant des PAMPs agonistes des TLRs, l'étude de ces voies d'activation dans les éosinophiles, en particulier au contact de ces pathogènes

s'avérait tout à fait adéquate. Au cours de ce travail, nous avons voulu confirmer la présence de ces récepteurs sur l'éosinophile et comprendre leur rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire innée.

2) les éosinophiles sont recrutés au cours de diverses infections mycobactériennes. De plus, une étude a montré le pouvoir lytique de l'EPO sur *M. tuberculosis in vitro* ouvrant de nouvelles perspectives quant au rôle des autres protéines granulaires ou autres médiateurs hautement cytotoxiques.

3) les mycobactéries sont des pathogènes dont les réponses immunes protectrices nécessitent le développement d'une réponse immune de type Th1. Les éosinophiles produisant non seulement des cytokines de type Th2 mais aussi Th1 ou régulatrices, et étant autrefois considérés comme des cellules de type Th2, il nous est apparu intéressant d'examiner les réponses des éosinophiles vis-à-vis de ce pathogène.

Dans la continuité des découvertes faites au sein de notre laboratoire concernant la présence de marqueurs de lymphocytes T sur les éosinophiles et connaissant l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les infections mycobactériennes, toujours dans le contexte de l'immunité innée, le second objectif de ce travail a été de mettre en évidence le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  à la surface des éosinophiles. Afin de confirmer la fonctionnalité de ce récepteur nous avons utilisé des ligands naturels exprimés par les mycobactéries et les cellules cancéreuses (**Article n°2**).

Enfin, il s'avérait important de déterminer si différentes espèces mycobactériennes étaient capables de moduler de manière différentielle l'activité des éosinophiles. Nous nous sommes intéressés à d'autres mycobactéries, atypiques, comme *M. chelonae* et *M. smegmatis*. Notre choix se justifie par la présence de différences structurales des molécules de LAM. Des résultats complémentaires nous ont permis de mettre en évidence l'implication de CR3 dans la reconnaissance du ManLAM purifié de *M. bovis* BCG mais pas des autres espèces mycobactériennes. Cette reconnaissance semble moduler négativement l'activation des éosinophiles. (**Résultats complémentaires**).

*Résultats*

## RESULTATS

### **« Interaction entre les éosinophiles et les mycobactéries, dépendante de TLR2 : rôle des $\alpha$ -défensines » (ARTICLE n°1).**

Suite à une infection mycobactérienne, un recrutement d'éosinophiles est observé dans les granulomes pulmonaires. Cependant, le rôle des éosinophiles reste méconnu. Afin d'étudier l'implication des éosinophiles au cours de la réponse immune innée vis-à-vis des mycobactéries, nous avons choisi de démontrer les interactions entre éosinophiles et *M. bovis* BCG et d'étudier les mécanismes impliqués.

Nous avons dans un premier temps étudié l'activation des éosinophiles en réponse au BCG. Après avoir montré le pouvoir chimioattractant du BCG et plus particulièrement des lipoglycanes LAM et LM purifiés de BCG, nous nous sommes intéressés à la libération de différents médiateurs par les éosinophiles vis-à-vis du BCG. Nous avons observé une activation des éosinophiles en présence de BCG qui se traduit par une synthèse de ROS ainsi qu'une libération de protéines de granules comme l'EPO et l'ECP, et de cytokines/chimiokines (TNF- $\alpha$ , IL-8, Migration Inhibition Factor (MIF), Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-13 and IL-16).

Afin de préciser les mécanismes impliqués, l'utilisation d'anticorps bloquants a permis de mettre en évidence l'implication du TLR2 et de MyD88 mais aussi les voies de la MAP kinase p38 et NF- $\kappa$ B dans les interactions éosinophiles/BCG. Nous avons également identifié deux des ligands mycobactériens potentiellement reconnus par le TLR2 des éosinophiles, le LM et le LAM. Cependant, l'activation éosinophilique observée étant beaucoup plus importante avec le LM que le LAM, nous nous sommes focalisés sur ce composant.

Par microscopie de fluorescence nous avons montré une phagocytose des mycobactéries par les éosinophiles. Nous avons également constaté que les éosinophiles sont capables d'inhiber la croissance mycobactérienne. Nous avons identifié différents médiateurs impliqués dans cette inhibition. Nous avons démontré pour la première fois l'expression, la synthèse et la libération d' $\alpha$ -défensines par les éosinophiles humains en présence de mycobactéries. Ces dernières seraient impliquées dans l'inhibition de croissance des



mycobactéries intracellulaires. Enfin, une synergie entre les  $\alpha$ -défensines et l'ECP a été mise en évidence dans la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis du BCG.

**En conclusion, les éosinophiles sont directement activés en réponse à *M. bovis* BCG. Cette activation est médiée par TLR2 reconnaissant le lipomannane purifié à partir du BCG et induisant la libération d' $\alpha$ -défensines et d'ECP, cytotoxiques pour les mycobactéries.**

## TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of $\alpha$ -defensins

\*Virginie Driss,<sup>1</sup> \*Fanny Legrand,<sup>1</sup> Emmanuel Hermann,<sup>1</sup> Sylvie Loiseau,<sup>1</sup> Yann Guerardel,<sup>2</sup> Laurent Kremer,<sup>3,4</sup> Estelle Adam,<sup>1</sup> Gaëtane Woerly, David Dombrowicz,<sup>1</sup> and Monique Capron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm U547, Lille, France; Université Lille 2, Lille, France; IFR142; Institut Pasteur de Lille, Lille, France; <sup>2</sup>CNRS UMR 8576, Lille, France; IFR 147; Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier II et I, CNRS; UMR 5235, Montpellier, France; and <sup>4</sup>INSERM, DIMNP, Montpellier, France

**Peripheral blood and tissue eosinophilia are a prominent feature in allergic diseases and during helminth infections. Eosinophil recruitment also frequently occurs upon mycobacterial infections, particularly in lung granuloma. However, the mechanism by which eosinophils interact with mycobacteria remains largely unknown. Because eosinophils recently have been shown to be involved in innate immune responses, we have investigated the direct interactions of eosinophils with *Mycobacterium bovis* BCG as a study model. In the present work, we show that**

**live BCG attracts human eosinophils and induces reactive oxygen species (ROS) synthesis, granule protein release, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  secretion. By using anti-TLR2 neutralizing antibodies before exposure of eosinophils to BCG, we showed a critical role of TLR2 signaling in ROS and eosinophil peroxidase release. BCG-induced eosinophil activation is mediated through the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathways. In addition, a mycobacterial wall component, lipomannan, induced a TLR2-dependent**

**eosinophil activation. In addition, we showed that eosinophils express and produce  $\alpha$ -defensins upon stimulation with BCG and lipomannan and that  $\alpha$ -defensins could inhibit mycobacterial growth in synergy with eosinophil cationic protein. These results suggest a role for human eosinophils as direct effectors in TLR2-mediated innate immunity against mycobacteria and confer to these cells potent cytotoxic functions through defensin and eosinophil cationic protein production.**(Blood. 2009;113:000-000)

AQ: 3

AQ: 4

AQ: 5

AQ: 6

### Introduction

Tuberculosis is the most prevalent infectious disease worldwide, accounting for 3 million deaths annually. Control of *Mycobacterium tuberculosis* bacillus (MTB) infection requires the development of a Th1-type CD4 T-cell response and activation of alveolar macrophages, leading to the formation of lung granuloma.<sup>1</sup> Initial recognition of mycobacteria by the innate immune system through pathogen recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs) contributes to triggering this adaptive immune response.<sup>2</sup> Indeed, cooperation between TLR2, TLR4, and TLR9 may contribute to resistance against mycobacteria,<sup>3</sup> and the authors of several studies have shown that mycobacterial components act as TLR agonists. Indeed, lipomannans (LM) and lipoarabinomannans (LAM), lipoglycans that ubiquitously are found in the wall of mycobacteria, are involved in the release of proinflammatory or anti-inflammatory cytokines.<sup>4</sup>

Whereas mycobacterial infections are rather associated to Th1 responses, the occurrence of Th2 cytokine responses also has been reported in human tuberculosis. It is suggested that these Th2 responses might depress macrophage immunity and lead to increased susceptibility to tuberculosis.<sup>5</sup> Th2-driven immunity is associated with cell types that seldom are studied during mycobacterial infections. Among them, eosinophils, which are now considered as multifunctional leukocytes, are involved in inflammatory processes as well as in modulation of innate and adaptive immunity.<sup>6</sup> Indeed, besides the well-known involvement of eosinophils in helminth infections, evidence is scant of their role in defenses against other pathogens, such as virus, fungi, or bacteria.<sup>7,8</sup>

Eosinophilia has been associated with pulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)<sup>9</sup> and in patients with concomitant intestinal helminth infections.<sup>10</sup> Moreover, tissue eosinophilia also has been observed after the *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccination at the site of tuberculin injection.<sup>11</sup> Eosinophil recruitment within mycobacterial granuloma has been found in different animal models.<sup>12-18</sup>

Eosinophils are potent effector cells as the result of the release of several cytotoxic mediators upon activation. Cytoplasmic-specific granules contain high amounts of cytotoxic proteins, in particular cationic proteins (major basic protein [MBP], eosinophil cationic protein [ECP], eosinophil peroxidase [EPO], and eosinophil-derived neurotoxin [EDN]).<sup>19</sup> Cytotoxic potential of eosinophils also arises from their ability to mount a respiratory burst, including superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, which in turn initiates production of more potent oxidants.<sup>20,21</sup> Beside cytotoxic mediators, eosinophils not only express and secrete Th2 cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 but also Th1 and proinflammatory cytokines such as interferon (IFN)- $\gamma$ <sup>22</sup> and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , which typically are released after MTB infection.

Although eosinophils accumulate at sites of mycobacterial infection, their activation and their involvement in the regulation of bacterial growth have not been investigated. In the present study, we used, the BCG strain derived from *Mycobacterium bovis* as a model to delineate the potential interactions between eosinophils and mycobacteria.

AQ: 7

AQ: 8

AQ: 11

Submitted July 9, 2008; accepted October 22, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 31, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-07-166595.

\*V.D. and F.L. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

## Methods

### Eosinophil and neutrophil purification

In accordance with French law for studies involving human biologic samples, blood from healthy and eosinophilic donors was collected after informed consent from volunteers, in accordance with the Declaration of Helsinki, and approval from the Comité Consultatif des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille (Consultative Committee for Persons in Biomedical Research from Lille; CCPPRB). Eosinophils were isolated from peripheral blood of healthy, allergic, and hypereosinophilic donors.<sup>23</sup> Eosinophils were separated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Percoll (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) centrifugation then purified by magnetic selection using immunomagnetic anti-CD16 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Eosinophil purity was checked by cytocentrifuged preparations after RAL555 coloration and was found to be greater than 98%. Neutrophils were collected in the positive fraction (purity was >99%).

### *M bovis* BCG

The *M bovis* BCG Pasteur strain was obtained from Dr C. Loch (Inserm U629, Institut Pasteur de Lille, France) and maintained at 37°C in Sauton liquid medium. Viable mycobacteria *M bovis* BCG in logarithmic growth phase were used at concentrations indicated in the figure legends. One absorbance unit at 600 nm for the BCG culture was calculated as  $2 \times 10^7$  colony-forming units (CFUs). Heat-killing was conducted by the culture of BCG at 70°C for 1 hour.

Lipomannan and lipoarabinomannan from *M bovis* BCG were purified as previously described.<sup>24</sup> Endotoxin contamination of each preparation was determined by the chromogenic Limulus lysate assay (QCL1000; Cambrex Biosciences, Walkersville, MD) and were less than 1 pg/mL in all experiments.

### Migration assays

The ability of BCG to induce cell migration was measured by Transwell assay (Costar, High Wycombe, United Kingdom). Eosinophils were first labeled with 10  $\mu$ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR) and suspended at  $3 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 1% fetal bovine serum (FBS). BCG, LAM, or LM were placed in various concentrations in the lower wells and separated from eosinophils by a polycarbonate filter (pore size 5  $\mu$ m; Corning, Corning, NY). Migration toward IL-5 (10 ng/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ) was used as positive control. Migration was conducted for 3 hours at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. The number of migrated eosinophils was determined on a FACSCalibur flow cytometer with the cellquest software (Becton Dickinson).

### Release of reactive oxygen species and eosinophil degranulation

A luminol-dependent chemiluminescence system was used to determine eosinophilic production of reactive oxygen species (ROS). In brief,  $3 \times 10^5$  eosinophils resuspended in RPMI 1640 medium without phenol red (Invitrogen) were activated with stimulus such as BCG, Pam3CSK4, or ultrapure LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 (Invivogen, San Diego, CA). Luminol (25  $\mu$ g/mL in Tris-HCl 0.01 mol/L, pH 7.4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added, and chemiluminescence was immediately measured with a luminometer (Victor Wallac, PerkinElmer, Waltham, MA). Kinetic measurement was performed at 37°C during the course of 2 hours and chemiluminescence was counted for 5 seconds.

To detect EPO, eosinophils ( $2 \times 10^5$  cells in 100  $\mu$ L) were incubated for 2 hours in RPMI 1640 without phenol red, with stimuli at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. EPO activity in eosinophil supernatants (50  $\mu$ L) was measured by the oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by luminol (200  $\mu$ g/mL in Tris-HCl 0.01 mol/L, pH 6). The reaction was amplified by the addition of D-luciferin (160  $\mu$ M in Tris-HCl 0.01 mol/L, pH 6; Sigma-Aldrich) before chemiluminescence was measure.

For inhibition experiments, eosinophils were preincubated with blocking anti-TLR2 monoclonal antibody (mAb; TL2.1, Alexis, Lausen, Switzerland); blocking anti-TLR4 mAb (HTA125; eBioscience, San Diego, CA); total antimouse (mIgG) isotype control (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA); MyD88 homodimerization inhibitory peptide (DRQIKIWFQNRRMKWKKRDVLP) or peptide control (DRQIKIWFQNRMMKWKK; Imgenex Corp., San Diego, CA); SP 600125, c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (Alexis); PD 98 059, ERK kinase inhibitor (Alexis), SB 203580, p38 MAP kinase (Invitrogen); or BAY 11-7082, NF- $\kappa$ B inhibitor (Calbiochem, San Diego, CA) for 30 minutes at 37°C before the addition of stimulus.

### ECP, TNF- $\alpha$ , and $\alpha$ -defensin release

Eosinophils ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were activated with the same stimuli as for ROS production. After 18 hours of culture, supernatants were collected. ECP, TNF $\alpha$ , and  $\alpha$ -defensin were measured by specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits from MBL International Corp (Woburn, MA), Diaclone (Wythenshawe, Manchester, United Kingdom), and HyCult Biotechnology (Uden, The Netherlands), respectively. The lower detection limit was 0.125 ng/mL for ECP, 8 pg/mL for TNF- $\alpha$ , and 50 pg/mL for human  $\alpha$ -defensins.

### Flow cytometric analysis

Human eosinophils ( $2 \times 10^6$ /mL) were stimulated for 2 hours in RPMI 1640 with or without BCG as indicated in the figure legends. Cell surface staining was performed with PE-TLR2 (TL2.1) or PE-TLR4 (HTA125) mAb (eBioscience) or the matched isotype control mPE-IgG<sub>2a</sub> (Immunotech, Praha, Czech Republic). For intracellular staining, purified eosinophils or neutrophils were first fixed with 2% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.01% saponin in phosphate-buffered saline (PBS). Nonspecific binding was blocked with mouse serum for 10 minutes, and the cells were incubated with a mouse anti-HNP1-3 (D21; HyCult Biotechnology) or IgG<sub>1</sub> isotype control (Diaclone) for 30 minutes in 0.01% saponin buffer. After washing, cells were incubated with a goat fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse IgG1 secondary antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL) for 20 minutes. Cells were then immediately analyzed on a FACSCalibur.

### Immunofluorescence labeling

Eosinophil-cyocentrifuged preparations were performed, and the cells were fixed in 4% paraformaldehyde and rehydrated in 0.05 mol/L PBS, pH 7.4. Cytospins were washed 3 times in PBS-0.1% bovine serum albumin (BSA). Eosinophils were permeabilized in PBS-1% BSA-0.2% Triton X-100 for 5 minutes on ice. Endogenous fluorescence was blocked by 50mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7.4, for 15 minutes. Cells were then incubated with PBS-3% BSA for 30 minutes to prevent nonspecific binding. Cytospins were then incubated overnight at 4°C with mouse anti-HNP1-3 (D21; HyCult Biotechnology, Uden, The Netherlands) or a mouse IgG1 isotype control (Diaclone) in PBS-3% BSA-5% HSA. Cytospins were blocked using goat serum (30 minutes) and Alexa Fluor 555 goat anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen) was added in PBS-3% BSA-5% HSA for 2 hours. Slides were then incubated with biotinylated mouse anti-EPO or anti-MBP (BD Pharmingen, San Diego, CA) for 2 hours. We detected immunoreactivity against EPO or MBP by staining slides with Alexa Fluor 488 streptavidin (Invitrogen) for 2 hours. Cytocentrifuged preparations were mounted with Fluoromount G (SouthernBiotech) and were examined by the use of a Zeiss Axiolmager Z1 microscope and AxioVision software (Zeiss, Thornwood, NY). Fast iterative algorithm was used for deconvolution. Image editing and overlays were performed on Adobe Photoshop version 7.0 (Adobe, San Jose, CA).

For confocal microscopy, we acquired images by using a DM-IRE2 inverted microscope with SP2-AOBS scan-head (Leica, Wetzlar, Germany) at the Imaging Facility of Institut Pasteur de Lille. Acquisitions were performed using a 100 $\times$ /1.4 NA oil immersion objective. Three-dimensional pretreatment, analysis, and addition were performed with Leica Confocal Software.

### RNA isolation and RT-PCR amplification

**AQ: 44** Total RNA was isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) from  $10^7$  purified cells following the protocol recommended by the manufacturer. Reverse transcription (RT) was performed with SuperScript-Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L) as described in the manufacturer's protocol (Invitrogen). cDNA were then amplified with the use of specific primers (Proligo; 20 pmoles/ $\mu$ L). MyD88: (5'-GACTTTGAGTACTTG-GAGATCCGG-3' and 5'-GATGGTGGTGGTTGTCTCTGATGA-3'), annealing temperature 56°C; Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP; 5'-CTGGCTCTCGGCCTAAGAA-3' and 5'-CATCGTGGAGGTGCTTTC-3'), annealing temperature 60°C; TRAF6 (5'-GGTCCGGAATTTCCAGGAAA-3' and 5'-CATTTTAGCAGT-CAGCTCCCG-3'), annealing temperature 62°C;  $\alpha$ -defensins (5'-CACTCCAGGCAAGAGCTGATGAGGT-3' and 5'-CATCTACCAGG-GAAGACTCTGGGCATT-3'), annealing temperature 64°C. Polymerase chain reaction assays (PCRs) were run for 40 cycles (1 minute at 95°C, 1 minute annealing, and 1 minute at 72°C) with the use of Taq polymerase (Biorprobe, Farmington, CT).

### Western blot

**AQ: 47** Cell lysates were prepared from freshly isolated eosinophils or neutrophils ( $10 \times 10^6$  cells) in lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 120 mol/L NaCl; 1% Triton X-100; 10 mmol/L ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA); 0.05% 2-mercaptoethanol; 1X protease inhibitors). Samples were analyzed on 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions. The proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% milk in Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 for 1 hour at room temperature and probed with primary rabbit antihuman MyD88 antibody (Cell Signaling) at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with secondary antirabbit antibody coupled to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch) for 1 hour at room temperature, followed by ECL Plus detection (Amersham Biosciences).

**AQ: 48** In assays determining phosphorylated forms of p38, eosinophils were incubated ( $2 \times 10^6$  cells in PBS) with different BCG/eosinophil ratios for 5, 15, and 30 minutes (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). After stimulation, cells were lysed, and equal amounts of proteins were analyzed with monoclonal rabbit antihuman p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) or antiphosphorylated p38 MAPK antibodies (Cell Signaling) as described in the section "XXX." For  $\alpha$ -defensin detection, proteins were subjected to SDS-10% PAGE before blotting onto a nitrocellulose membrane, as described previously.

### Phagocytosis

**AQ: 49** Eosinophils were labeled with 10  $\mu$ M CFSE at  $4 \times 10^6$  cells/mL in PBS. BCG were labeled with 10  $\mu$ M PKH26 (Sigma-Aldrich) at a concentration of  $10^8$  bacteria/mL. On the day of each experiment, CFSE-labeled eosinophils are incubated with PKH26-labeled BCG at different BCG/eosinophil ratios (5:1, 10:1, 20:1) in RPMI 1640 without phenol red and without serum at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After selected incubation times, eosinophils were washed in RPMI to remove nonadherent mycobacteria and fixed in slide after cytospin for analyze. Cells containing fluorescent red mycobacteria were counted by fluorescence microscopy (Leica).

### Bactericidal activity of eosinophils

**AQ: 52** Eosinophils were washed with RPMI without phenol red and diluted to 2.10<sup>6</sup> mL. Next, a bacterial suspension was diluted from the frozen aliquots in RPMI without phenol red to the appropriate concentration for use in experiments. BCG suspension was placed with the eosinophil suspension at 37°C for different times. Numbers of CFU were determined as follow: dilutions of each sample were plated in duplicates on 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates enriched with oleic acid albumin dextrose complex (OADC) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 21 days, the number of CFUs was determined on the plates and expressed in percentage of CFU control ([CFU with eosinophils/CFU with medium]  $\times$  100).

For bactericidal activity against intracellular mycobacteria, BCG-infected eosinophils were washed 3 times with antibiotic-free medium. The low-speed centrifugation (300g) selectively pellets cells whereas extracellular bacteria remain in the supernatant. To measure intracellular mycobacterial growth, cells were lysed with 0.3% saponin (Sigma-Aldrich) to release intracellular bacteria. At all time points, an aliquot of unlysed infected cells was harvested and counted. This step allowed an exact quantification of cells as well as the determination of cellular viability by trypan blue exclusion. Recovery of cells was 80% in all experiments, with cell viability regularly exceeding 90% of total cells. Lysates of infected cells containing intracellular mycobacteria were resuspended vigorously, transferred into screw-cap tubes, and sonicated in a preheated (37°C) water bath sonicator for 5 minutes. Aliquots were diluted in Sauton's medium and plated on Middlebrook 7H11 (Difco) agar. CFU were counted after 21 days' incubation at 37°C.

The bactericidal activity of purified  $\alpha$ -defensins (Hycult Biotechnology) and ECP (Diagnostics Development) against BCG was determined by measuring the effect on bacterial colony-forming activity as described previously in "XXX."

For inhibition experiments, eosinophils were preincubated with a blocking anti- $\alpha$ -defensin (NP-1) antibody (MBL), anti-ECP (BD Pharmingen), or isotype control for 30 minutes at 37°C, before the addition of BCG.

### Eosinophil granules

Purified eosinophils were lysed in ice-cold buffer (0.25 mol/L sucrose, 200 U/mL heparin). The residual cells and debris were separated from the granules by centrifugation at 300g for 10 minutes. The eosinophil granules were isolated from the supernatant by centrifugation at 10 000g for 15 minutes.

For detection of  $\alpha$ -defensins by flow cytometer, eosinophil crystalloid granules were subjected to the same procedure described previously for purified eosinophils. Eosinophil granules were identified by incubation with biotinylated anti-EPO or isotype control for 30 minutes and, after a washing step, with streptavidin-APC (Molecular Probes) for 20 minutes in the presence of saponin.

### Statistical analysis

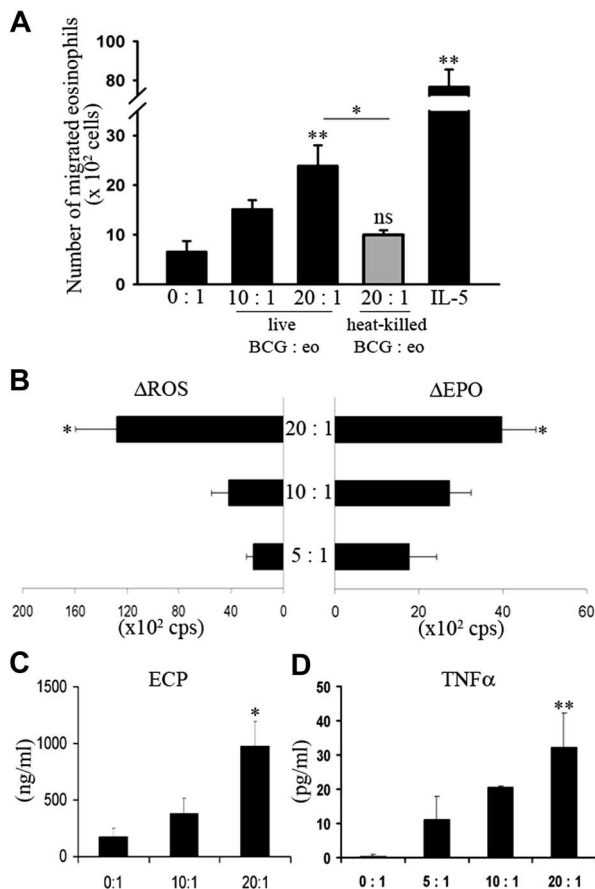
All data were expressed as mean plus or minus SEM. All statistical analyses were performed with the use of SPSS software (SPSS Institute, Chicago, IL). Normality of data samples was assessed with the normality test of Shapiro and Wilk. Parametric Student *t* test for paired experiments was used to compare 2 variables. Analysis of variance (ANOVA) together with Dunnett posttest were used for comparisons of more than 2 datasets. A *P* value of less than .05 was used to indicate statistical significance.

## Results

### *M bovis* BCG attracts and activates human eosinophils

In various models of mycobacterial infections, eosinophils are recruited into developing lesions.<sup>17,18</sup> We first tested the ability of BCG to induce the migration of purified eosinophils. Chemotactic activity of BCG for eosinophils was assayed with the use of eosinophils alone (0:1) as negative control and recombinant human (rh) IL-5 as positive control. Compared with spontaneous migration, we found that eosinophils migrated significantly more toward live but not heat-killed BCG (Figure 1A). Eosinophil migration was dependent upon increasing BCG/eosinophil ratios. In addition, we observed that LAM and LM purified from *M bovis* BCG, known as major cell wall lipoglycans, induced a migratory response in human eosinophils in a dose-dependent manner in the range of concentrations from 0.01 to 10  $\mu$ g/mL (Figure S1, available on the Blood website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).





**Figure 1. Eosinophil chemotaxis and activation mediated by *M bovis* BCG.** (A) Eosinophil migration in response to different BCG/eosinophil ratios. Error bars represent plus or minus SEM from 5 independent experiments. (B) ROS generation and EPO release by eosinophils in cell supernatants. Results are expressed as  $\Delta$ ROS or  $\Delta$ EPO cps (counts per second) values (values from medium stimulation are subtracted from values obtained with each ratio). (C) After 18 hours of incubation, ECP concentrations in the cell-free supernatants were measured. Data are expressed as means plus or minus SEM from the 3 independent experiments with different eosinophil donors. (D) Eosinophils were stimulated for 18 hours at different BCG/eosinophil ratios. TNF- $\alpha$  levels were quantified in the culture supernatants by ELISA. Results are represented as the mean of 3 independent experiments plus or minus SEM. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ .

In response to activation, eosinophils are able to synthesize ROS and to mobilize preformed proteins stored within cytoplasmic-specific granules and to produce cytokines.<sup>6</sup> We have examined ability of BCG to induce ROS generation by eosinophils. The peak of eosinophil respiratory burst was reached approximately 30 minutes after BCG addition for eosinophilic patients and 60 minutes for normal donors (Figure S2A). At this time-point, ROS production by eosinophils was proportional to BCG number (Figure 1B). BCG-induced eosinophilic degranulation also was evaluated by EPO release in supernatants. Dose-dependent EPO release was observed when eosinophils were incubated with increasing BCG/eosinophil ratios (Figure 1B). In addition, weak ROS and EPO release was observed when heat-killed BCG was added (data not shown). Similar results were found for ECP, confirming that BCG triggers eosinophilic degranulation in a dose-dependent manner (Figure 1C).

Because several cytokines also are stored in eosinophil granules, we evaluated the capacity of BCG to induce TNF- $\alpha$  release, a key cytokine participating in the control of mycobacterial infection as well as in granuloma formation.<sup>25,26</sup> TNF- $\alpha$  was detected in supernatants from eosinophils incubated for 18 hours with different

numbers of BCG (Figure 1D). Furthermore, several chemokines and cytokines, including IL-8, migration inhibition factor (MIF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-13, and IL-16, were detected by protein microarray in cell-free supernatants of eosinophils after incubation with BCG (Figure S2B). Taken together, these results indicate that eosinophils can directly respond to BCG by degranulation and cytokine release.

#### Eosinophil expression of TLR2 and TLR4 is inducible

As reported for macrophages and dendritic cells, TLR2 and TLR4 have been identified as potential receptors for mycobacterial components.<sup>2</sup> Expression of TLRs by eosinophils has been recently described recently<sup>27</sup> but their precise expression profiles and functions still remain unclear. Herein, we have compared TLR expression by eosinophils from normal donors (NDs) and eosinophilic donors (EDs). Surprisingly, TLR2 and TLR4 were not detected on the surface of eosinophils from normal donors, in contrast to eosinophils from eosinophilic donors, which spontaneously expressed surface TLR2 and TLR4 (Figure 2A). Because TLR expression is known to be up-regulated in human monocytes treated with TLR agonists,<sup>28</sup> we investigated whether BCG could also modulate surface expression of TLRs on eosinophils. For 16 healthy donors and eosinophilic donors studied (Table S1), BCG significantly increased TLR2 and TLR4 expression on freshly isolated human eosinophils from most donors (Figure 2A,B). These results show heterogeneous basal expression levels of TLR2 and TLR4 on human eosinophils and induction in vitro in the presence of BCG.

#### TLR2, but not TLR4, is essential in eosinophil activation by BCG

To further evaluate the functionality of TLRs on eosinophils, these latter were stimulated with either Pam3CSK4 (PAM) or lipopolysaccharide (LPS), respectively TLR2- and TLR4-specific ligands. As shown in Figure S3A, eosinophils from normal and eosinophilic donors released ROS and EPO in response to PAM and LPS and this release was inhibited by blocking anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies, confirming that TLR2 and TLR4 expressed by human eosinophils are functional.

Several reports have described TLR2- and TLR4-dependent activation of macrophages by mycobacterial ligands.<sup>29</sup> To investigate the potential involvement of TLRs in eosinophil/BCG interactions, eosinophils were incubated with blocking anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies, and their response to BCG was evaluated by ROS release. Production of ROS in response to BCG was reduced in a dose-dependent manner when eosinophils were preincubated with a blocking anti-TLR2 antibody (with a maximum of  $47.3\% \pm 11.9\%$  inhibition; Figure 3A), whereas no significant inhibition of ROS release was observed with a blocking anti-TLR4 antibody or an isotype control (Figure 3B). Similar levels of inhibition of EPO release was obtained with blocking anti-TLR2 antibody but not with anti-TLR4 antibody (Figure 3C). These data indicate that TLR2, but not TLR4, is involved in eosinophil activation by BCG.

LAM and LM have been widely described as key factors able to modulate the host immune response.<sup>30</sup> No ROS production by eosinophils was observed after incubation with LM or LAM purified from BCG (data not shown). However, both molecules induced release of EPO by eosinophils, with LM being a more potent EPO inducer than LAM (Figure S3B). This prompted us to investigate the ability of LM to activate eosinophils. As shown in

**Figure 2. Expression of TLR2 and TLR4 by human eosinophils.** (A) Surface expression of TLR2 and TLR4 on human eosinophils incubated with or without BCG (10:1). Results correspond to one representative normal donor (ND, no. 13 of Table S1) and eosinophilic donor (ED, no. 5 of Table S1). Gray histogram and black line represent staining with specific and isotype control antibodies, respectively. The data are displayed by using a logarithmic scale and the change in mean fluorescence intensity ( $\Delta$ MFI: values from isotype control antibodies are subtracted from values obtained with each condition) are indicated in the plot. (B) Cell surface TLR2 and TLR4 expressions on purified eosinophils from 16 individual eosinophil donors stimulated with or without BCG (10:1). Group average expression for the indicated markers is represented (–). \* $P < .05$ .

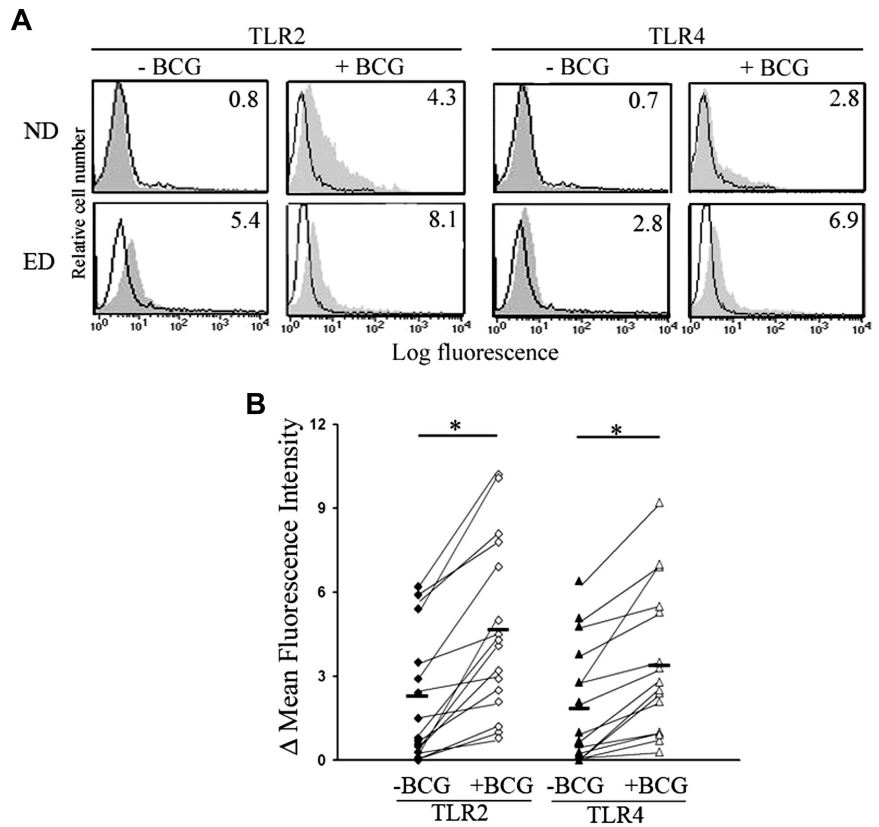
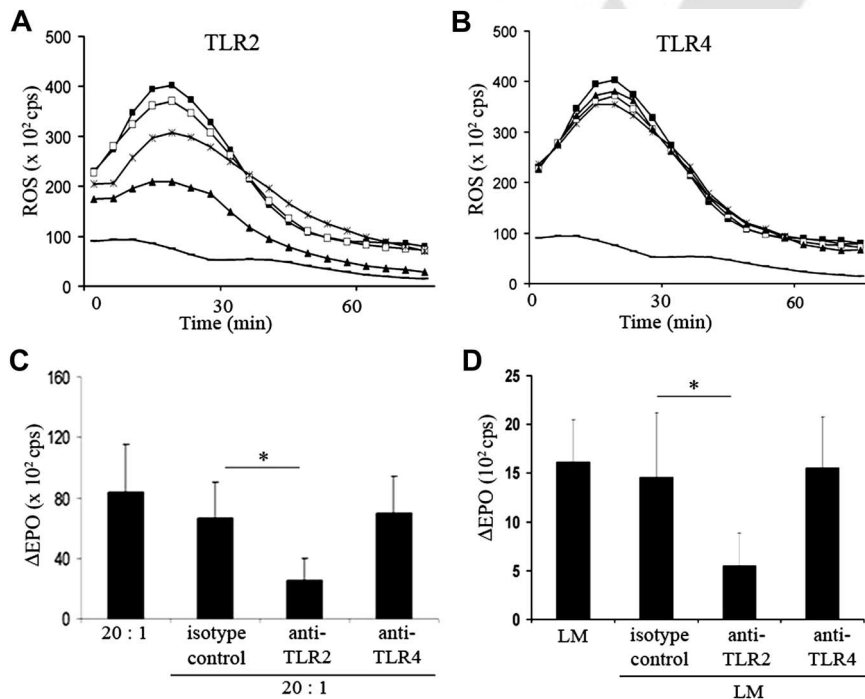


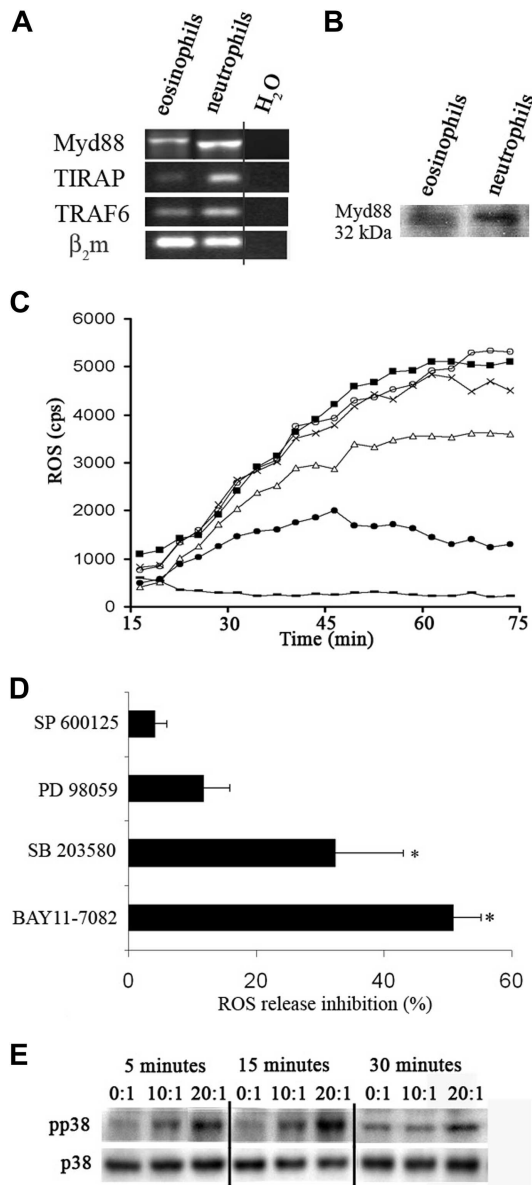
Figure 3D, EPO release by eosinophils in the presence of 1  $\mu$ g/mL LM (an optimal concentration determined after dose–response preliminary experiments) was significantly reduced by 66.1% ( $\pm 20\%$ ) when eosinophils were pretreated with a blocking anti-TLR2 antibody but not with a blocking anti-TLR4 antibody or an isotype control. These results suggest that LM, a purified component of BCG, can induce eosinophil degranulation mainly in a TLR2-dependent manner.

**BCG-induced eosinophil activation is dependent on MyD88, p38, and NF- $\kappa$ B**

Activation of TLR2 signaling pathway involved recruitment of the intracellular adaptor protein MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (Toll/IL-1R domain-containing Adaptor Protein), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), and leads to the phosphorylation of MAPK or NF- $\kappa$ B.<sup>31</sup> We first detected, by



**Figure 3. Involvement of TLR2 in the activation of eosinophils by *M bovis* BCG.** (A) Kinetics of BCG-induced ROS release (ratio 10:1, ■) inhibited by an anti-TLR2 blocking antibody 20  $\mu$ g/mL (▲), 10  $\mu$ g/mL (\*), or an isotype control antibody 20  $\mu$ g/mL (□). Spontaneous ROS release by eosinophils is indicated (–). Results correspond to 1 representative of 3 experiments and are expressed in counts per second (cps). (B) BCG-induced ROS production (ratio 10:1, ■) inhibited by an anti-TLR4 blocking antibody 20  $\mu$ g/mL (▲), 10  $\mu$ g/mL (\*), or an isotype control antibody 20  $\mu$ g/mL (□). Spontaneous ROS release of eosinophils is indicated (–). Results are expressed as ROS cps values and one representative of 3 experiments was shown. (C) Inhibition of BCG-induced EPO release by anti-TLR2 and anti-TLR4 blocking antibodies (20  $\mu$ g/mL) or an isotype control antibody.  $\Delta$ EPO cps values (values from medium stimulation are subtracted from values obtained with each antibody). Results are expressed as mean plus or minus SEM (n = 5–6). (D) LM (1  $\mu$ g/mL)-induced EPO release inhibited by anti-TLR2 or anti-TLR4 blocking antibodies (20  $\mu$ g/mL) or an isotype control antibody. Results are expressed as  $\Delta$ EPO cps values and as mean plus or minus SEM (n = 5). \* $P < .05$ .



**Figure 4. MyD88, p38 MAP kinase and NF-κB pathway activation after stimulation of eosinophils with *M bovis* BCG.** (A) MyD88, TIRAP, and TRAF6 expression on eosinophils was analyzed with RT-PCR. (B) Total proteins were extracted from eosinophils and neutrophils and equal protein amounts were analyzed with the use of Western blot for MyD88. The gel from one of 2 similar experiments is shown. (C) Measurement of ROS release by eosinophils preincubated with serially diluted MyD88 inhibitor 1 μmol/L (×), 10 μmol/L (Δ), or 100 μmol/L (●) or with peptide control (100 μmol/L) (○) at 37°C for 30 minutes, further activated with BCG (10:1). ROS release by BCG (1:10 ■)-activated eosinophils without MyD88 inhibitor and by unstimulated eosinophils (–) were determined. Results are expressed as ROS cps values and one representative of 3 experiments was shown. (D) Purified eosinophils were pre-treated with inhibitors to JNK1/2 (SP 600125, 0.1 μmol/L), ERK1/2 (PD 98 059, 0.1 μmol/L), p38 MAP kinase (SB 203580, 0.1 μmol/L), or NF-κB inhibitors (BAY 11-7082, 1 μmol/L) for 30 minutes at 37°C, before the addition of BCG (10:1). ROS release by eosinophils was analyzed by chemiluminescence. Bar graph represents the percentage ROS release inhibition. Results are expressed as mean plus or minus SEM (n = 3-4). (E) Purified eosinophils were stimulated with different numbers of BCG for the times indicated, and total cell extracts were analyzed by Western blotting using Abs against phosphorylated or nonphosphorylated forms of p38 MAP kinase. The results are representative of 2 independent experiments. \*P < .05.

RT-PCR, MyD88, TRAF6, and TIRAP mRNA in human eosinophils (Figure 4A). Western blot analysis of cell lysates confirmed the presence of the MyD88 protein in human eosinophils, similarly to neutrophils that were used as positive control (Figure 4B). To

elucidate the signaling pathway underlying BCG-induced eosinophil activation, we demonstrated that a MyD88 inhibitory peptide, but not a control peptide, reduced ROS production in BCG-stimulated eosinophils, in a dose-dependent manner (Figure 4C).

We have then further assessed the role of MAPK and NF-κB by using various selective inhibitors of MAPK pathways, including SB 203580 (p38 MAPK inhibitor), PD 98 059 (ERK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), and BAY 11-7082. Whereas SB 203580 was able to significantly inhibit BCG-induced ROS release by eosinophils, PD 98 059 and SP 600125 had only a marginal effect (Figure 4D). In addition, we obtained 51% (±4.3%) inhibition of ROS release by BCG-activated eosinophils with BAY 11-7082. Overall, these results suggest that p38 MAP kinase and NF-κB signaling pathways play a prominent role in BCG-induced ROS release by eosinophils. To confirm that intracellular signaling pathway of eosinophils was activated by BCG, we next investigated the p38 MAPK phosphorylation profile. As shown in Figure 4E, stimulation of eosinophils with BCG resulted in p38 phosphorylation after a 5-minute stimulation. This p38 MAPK phosphorylation decreased after 30 minutes of BCG stimulation. In addition, LM-induced eosinophil activation involved a MyD88 and p38 MAPK pathways, because LM-induced EPO release was inhibited by a MyD88 inhibitor (maximal inhibition 72.8% ± 6.2%) and SB 203580 (maximal inhibition 49.6% ± 16.1%; Figure S4). Of note LY294002, a phosphoinositide kinase-3 (PI3K) inhibitor, had no effect on ROS release by BCG-activated eosinophils (data not shown). Taken together, these findings indicate that BCG can activate eosinophils through MyD88-, p38 MAPK-, and NF-κB-dependent pathways.

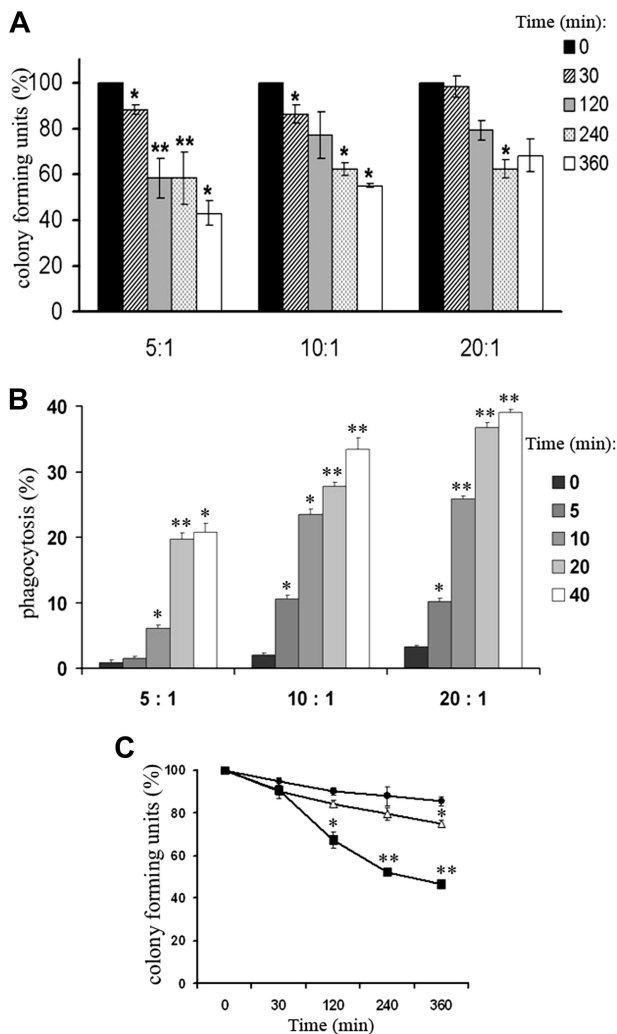
**Eosinophils control BCG growth**

Because of the release of cytotoxic mediators by eosinophils, we next addressed whether eosinophils may displayed phagocytic and antimycobacterial activity. Survival of BCG in the presence of human eosinophils was thus tested. A decrease in mycobacterial survival was observed for all BCG/eosinophil ratios (Figure 5A). Eosinophils were able to restrict BCG growth by 31.8% and 56.9% within 6 hours after the addition of BCG. Because BCG is an intracellular attenuated pathogen, we tested the ability of eosinophils to phagocytose PKH26-BCG by fluorescence microscopy (Figure 5B). Dose-dependent internalization was observed when eosinophils were incubated with increasing BCG/eosinophil ratios. Extracellular mycobacteria were removed by washing, and only remaining eosinophils were lysed and plated at increasing intervals for assessment of viable bacilli. As shown in Figure 5C, for 5:1 ratio, the number of CFUs by intracellular BCG significantly decreased with incubation time, suggesting that eosinophil cytotoxicity could be due in part to release of cytotoxic mediators.

**Human eosinophils express α-defensins**

To investigate which mediators could contribute to eosinophil cytotoxicity toward BCG, we investigated the expression of defensins, major effector molecules in innate immunity against microbes.<sup>32</sup> We did not detect any expression of mRNA β-defensins in unstimulated and BCG-stimulated eosinophils in contrast to neutrophils (data not shown). However, both neutrophils and eosinophils, but not Jurkat T cells, expressed α-defensin (HNP1-3) mRNA (Figure 6A). As shown in Figure 6B-C, α-defensins also were detected in eosinophils by flow cytometry and in cell lysates. The association of α-defensins immunoreactivity with crystalloid granules was shown by flow cytometry analysis on purified EPO<sup>+</sup>





**Figure 5. BCG growth inhibition by eosinophils.** (A) BCG growth in the presence of eosinophils for the indicated times. Data are shown as the mean of 3 independent experiments plus or minus SEM, expressed in percentage of CFU control (CFU with eosinophils/CFU with medium)  $\times$  100. (B) Quantitative detection of internalized PKH26-BCG by fluorescence microscopy. Eosinophils were incubated with or without BCG for 40 minutes at 37°C. (C) Intracellular BCG growth inhibition with different BCG/eosinophil ratios (5:1, ■; 10:1, ▲; 20:1, ●). Results are expressed as mean plus or minus SEM (n = 3). Significant differences between conditions studied and controls are indicated as followed: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ .

eosinophil granules (Figure 6D). To determine the intracellular localization site of  $\alpha$ -defensins, we conducted a double immunofluorescence staining with antibodies specific for MBP (localized in the granule crystalloid core) and EPO (localized in the granule matrix region; Figure 6E).<sup>33</sup> Immunoreactivity against MBP and  $\alpha$ -defensins were mostly colocalized, whereas immunoreactivity against EPO and  $\alpha$ -defensins only displayed minor colocalization. Taken together, our results showed a constitutive expression of  $\alpha$ -defensins in eosinophils. These observations led us to hypothesize that eosinophils may respond to BCG by rapid release of  $\alpha$ -defensins.

#### BCG-induced $\alpha$ -defensin and ECP release contributes to eosinophil cytotoxicity

$\alpha$ -defensins immunoreactivity was further increased upon activation by BCG and eosinophil pretreatment with Brefeldin A (1  $\mu$ g/mL; Figure 7A). In addition, our results suggest that BCG-activated eosinophils also released  $\alpha$ -defensins in a dose-

dependent manner (Figure 7B). After stimulation with PAM or LM, but not LPS,  $\alpha$ -defensins were detected in culture supernatants. Production of  $\alpha$ -defensins in response to PAM or LM was significantly abolished when eosinophils were preincubated with a blocking anti-TLR2 antibody, whereas no inhibition of  $\alpha$ -defensin release was observed with an isotype control, indicating a TLR2-dependent  $\alpha$ -defensin release (Figure 7C). Furthermore, preincubation with a blocking anti- $\alpha$ -defensin antibodies partially but significantly increased the BCG growth at the 5:1 ratio, suggesting that  $\alpha$ -defensins indeed contribute to eosinophil cytotoxicity toward mycobacteria (Figure 7D). In addition,  $\alpha$ -defensin killing activity against BCG was maximal in the presence of purified ECP (Figure S5A). Accordingly, we evaluated effect of a blocking anti-ECP antibody on BCG growth and showed increased survival upon inhibition of ECP release (Figure S5B). However, the presence of resorcinol and diphenyleiodonium, the corresponding EPO and ROS inhibitors, did not significantly influence BCG growth (data not shown). These results thus suggest that LM is a BCG component accounting for the  $\alpha$ -defensin release and that a killing mechanism used by eosinophils to inhibit intracellular BCG growth is  $\alpha$ -defensin and ECP-dependent.

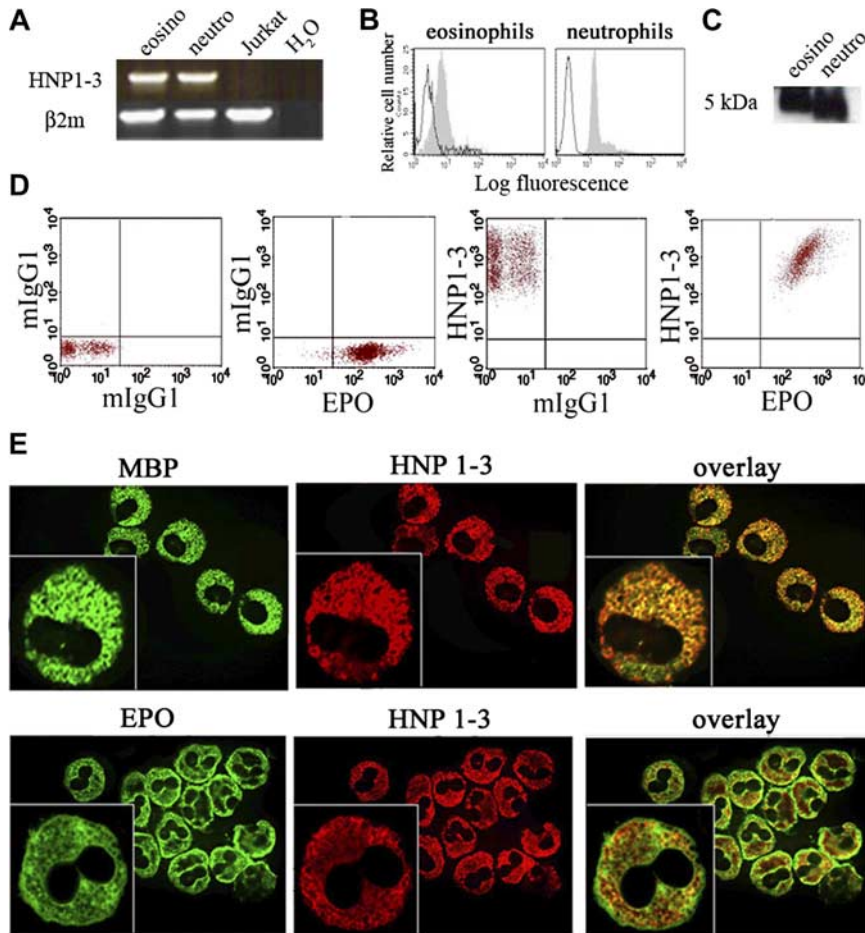
## Discussion

Besides helminth infections, peripheral blood and tissue eosinophilia have been associated with mycobacterial infections.<sup>8</sup> Here, we investigated the mechanism of eosinophil–mycobacteria interactions to provide a molecular basis to this observation. The present results indicate that BCG has the propensity to activate eosinophils and that TLR2 plays a major role in the activation process. Contradictory results have been reported regarding TLR expression by human eosinophils. The absence of TLR2 and TLR4 expression was reported in one study,<sup>34</sup> whereas other reports evidenced TLR2 and TLR4 mRNA expression<sup>35</sup> as well as protein expression of TLR1, 2, 4, 5, 6, and 9 on human eosinophils.<sup>27</sup> We have shown an heterogeneous donor/patient-dependent TLR2 and TLR4 expression by human eosinophils. Eosinophils from eosinophilic donors but not from healthy donors spontaneously expressed TLR2 and TLR4 at their surface. These observations might explain why eosinophils from eosinophilic donors display a quicker response to BCG than eosinophils from normal donors.

Other receptors, such as CD14, complement receptors and Fc $\gamma$  receptor expressed by eosinophils,<sup>6</sup> could participate to BCG recognition<sup>36</sup> and induce TLR expression on eosinophils purified from normal donors after incubation with BCG. Alternatively, it is also possible that TLR expression levels in normal donors are below the detection threshold of flow cytometry and that this low expression is up-regulated upon ligand binding, as it is the case in allergic patients. Spontaneous TLR expression on eosinophils from eosinophilic donors could be explained by in vivo eosinophil priming. Such heterogeneity between eosinophil donors, already evidenced for other membrane receptors including IgE receptors,<sup>37</sup> may account for discrepancies in earlier results, which did not discriminate between different clinical status of patients.<sup>27,34,35,38,39</sup>

Live, but not heat-killed, mycobacteria were able to attract eosinophils in vivo,<sup>12</sup> indicating that metabolically active mycobacteria are required. We have shown that live BCG, but not heat-killed BCG, attracted human eosinophils. Our study also identified LM and LAM, 2 heat-stable cell wall-associated lipoglycans, as potent eosinophil migration-inducing factors. However, LAM secretion does require live bacteria to create a gradient



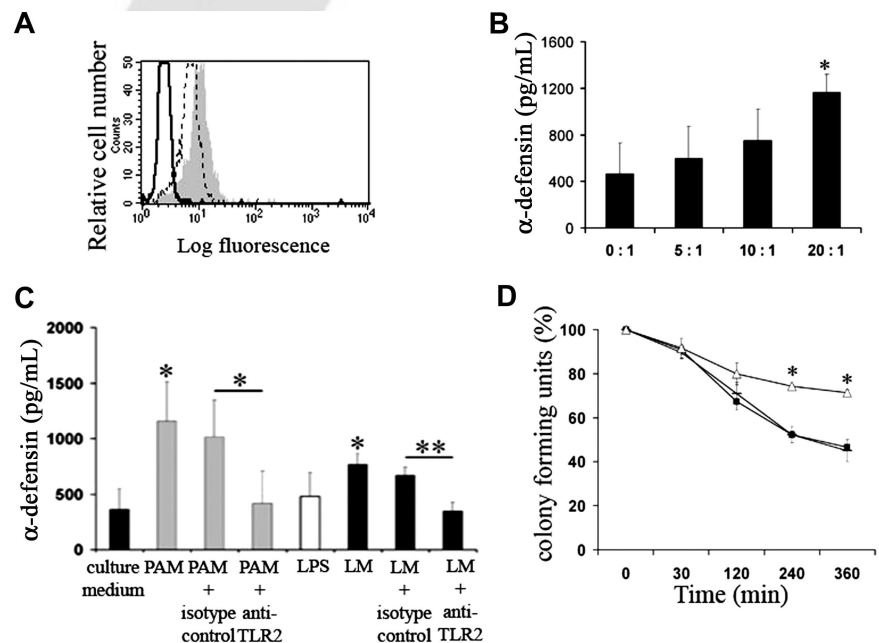


**Figure 6. Expression of  $\alpha$ -defensins by human eosinophils.** Intracellular  $\alpha$ -defensin (HNP1-3) expression on eosinophils (eosino) and neutrophils (neutro) was analyzed with RT-PCR (A), flow cytometry (B), and Western blot (C). (D)  $\alpha$ -defensins expression on EPO<sup>+</sup> crystalloid granules purified from human eosinophils. Staining with control isotype antibodies is represented. Results correspond to one representative eosinophil donor. (E) Immunofluorescence and confocal (insets) analysis of human eosinophils with the use of Alexa Fluor 555 goat anti-mouse secondary antibody (red) to detect the HNP1-3 immunoreactivity or Alexa Fluor 488 streptavidin (green) to detect immunoreactivity against MBP or EPO.

allowing for eosinophil-chemotaxis. Furthermore, we cannot exclude that other heat-sensitive secreted compounds are required for optimal chemotaxis. Nevertheless, whether eosinophils recognize and are subsequently activated by mycobacteria remains unclear. Our experiments reveal an important immunostimulatory activity

of LM on eosinophils, unlike LAM. These 2 lipoglycans have been reported to exhibit antagonistic activities, and recent studies have suggested that that LM displays stronger proinflammatory responses compared with LAM.<sup>4</sup> In addition, we demonstrated a TLR2-dependent eosinophil activation effect by LM. In a murine

**Figure 7.  $\alpha$ -defensins synthesis and release by human eosinophils in the presence of BCG.** (A)  $\alpha$ -defensin expression after 2 hours of eosinophil stimulation (gray histogram) or unstimulation (dotted line) with BCG (10:1) in the presence of brefeldin A. Black line represents staining with isotype control. (B)  $\alpha$ -defensin levels released by eosinophils activated by BCG were quantified by ELISA in cell culture supernatants. Results are expressed as mean plus or minus SEM (n = 3). (C) After incubation of eosinophils, pretreated by blocking anti-TLR2 antibody or isotype control, with PAM (0.5  $\mu$ g/mL), LPS (0.1  $\mu$ g/mL), or LM (1  $\mu$ g/mL),  $\alpha$ -defensin levels were quantified in the culture supernatants by ELISA. Results are represented as the mean of 3 independent experiments plus or minus SEM (D) Intracellular BCG growth inhibition. Eosinophils were treated or not treated with a blocking anti- $\alpha$ -defensin antibody ( $\Delta$ ) or an isotype control (—) and were infected with BCG (5:1,  $\blacksquare$ ). Values are mean plus or minus SEM of 3 independent experiments. Significant differences between conditions studied and controls are indicated; \*P < .05; \*\*P < .01.



model of BCG-induced pleurisy, eosinophil recruitment was enhanced by TLR2.<sup>18</sup>

Both TLR2 and TLR4 are essential to innate immunity against mycobacteria species and were the likeliest PRRs that would have endowed eosinophils with the capacity to be activated by mycobacteria. In the current work, only TLR2 appeared to play a functional role in eosinophil–mycobacteria interactions, because a blocking anti-TLR2 antibody partially suppressed BCG- or LM-induced eosinophils activation. This also suggests that other PRRs could be involved in mycobacteria-induced eosinophil activation such as TLR9<sup>40</sup> or  $\beta$ -glucan receptor dectin-1.<sup>41</sup> However, we cannot rule out the possibility that other mycobacterial cell wall bioactive components, such as trehalose dimycolate (TDM), participate in this process.

To date, a single study has examined the TLR signal transduction.<sup>27</sup> Various TLR ligands differentially induced the release of cytokines, chemokines, superoxides, or granular protein. Indeed, TLR7 ligand R837 and TLR2 ligand peptidoglycan activations were dependent on the p38 or ERK MAPK pathway, respectively, and induced IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and growth-related oncogene (GRO)- $\alpha$  release by eosinophils. Surprisingly, expression and recruitment of MyD88, the central adapter shared by several TLRs, was never investigated in these studies. We have extended these observations by reporting that TLR-dependent activation of eosinophils through BCG activation required both MyD88, p38 MAPK, and NF- $\kappa$ B molecules.

Although eosinophilia has been evidenced in different mycobacteria–infection models, their contribution in controlling BCG growth is unknown. Our results show that human eosinophils expressed  $\alpha$ -defensins, localized within the eosinophil crystalloid granules. Eosinophils are among the few inflammatory cells capable of storing proteins, cytokines, and chemokines in their secretory granules. These stored products may be rapidly mobilized from intracellular sites of storage and released locally during inflammation. In addition, eosinophils could release  $\alpha$ -defensins in response to BCG or LM through TLR2 ligation. Interestingly,  $\alpha$ -defensins can directly kill BCG in vitro, and  $\alpha$ -defensin-producing eosinophils play a key role in BCG growth inhibition. These results are quite surprising because human  $\beta$ -defensin-1 and 2 genes usually are considered to display strong antimycobacterial properties.<sup>42,43</sup> Activity of  $\alpha$ -defensins toward mycobacterial species seems strain-dependent.<sup>44</sup> The potent bactericidal activity of  $\alpha$ -defensins against virulent mycobacteria<sup>45</sup> is consistent with our data when BCG is used as a model. Because  $\alpha$ -defensin release is rapid, it is conceivable that when recruited to infection sites, eosinophils may directly contribute to bacterial killing. Other cytotoxic mediators might also be released by eosinophils because the blocking of  $\alpha$ -defensin activity only partially prevented BCG growth. Indeed, it is worth pointing out that when eosinophils were activated with BCG release of both EPO, which has a lytic activity against *M tuberculosis*,<sup>46</sup> and ECP, a ribonuclease that possesses antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive strains,<sup>47</sup> was observed. Our results indicate that  $\alpha$ -defensins and ECP have to be considered as important components of the mechanisms by which eosinophils kill BCG. These results provide evidence that eosinophils harbor a diverse arsenal of cytotoxic components against mycobacteria.

The ability of eosinophils to interact and kill BCG challenges the concept that vaccination with BCG and resistance against acute tuberculosis is dependent on host ability to generate Th1 immunity. Although eosinophils often are intimately linked with Th2-driven

immunity, they have been shown to express Th1 cytokines, such as IFN- $\gamma$ , upon stimulation by CD28.<sup>22</sup> However, we failed to detect IFN- $\gamma$  release by eosinophils in the presence of BCG (data not shown), whereas BCG induced TNF- $\alpha$ , IL-8, MIF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-13, and IL-16 release. Inflammatory granuloma responses usually are associated with angiogenesis, involving IL-8, and with chemokines, such as MIP, which facilitate the recruitment of inflammatory cells to the site of infection.<sup>48</sup> It is noteworthy that LM, but not LAM, has been reported to be strong IL-8 and TNF- $\alpha$ -inducing factor.<sup>30</sup>

TNF- $\alpha$  is a key macrophage-activating cytokine for intracellular killing of *M tuberculosis*.<sup>49</sup> Both beneficial and deleterious effects of TNF- $\alpha$  have been observed in tuberculosis patients.<sup>50</sup> These dual effects have also been attributed to tumor-associated eosinophils.<sup>51</sup> However, an increased Th2 immunity has been associated with active tuberculosis.<sup>5</sup> In many developing countries, patients infected with *M tuberculosis* face helminth infection, often associated with eosinophilia and Th2 response.<sup>10</sup> Therefore, the Th2-driven immunity could increase susceptibility to tuberculosis and could play a role in a persistent form of the disease. Extensive analysis of tuberculosis-associated eosinophilia and correlation with disease outcome would represent a further goal to better understand the role of eosinophils during tuberculosis infection and progression of the disease.

In conclusion, our results represent the first evidence of the involvement of  $\alpha$ -defensins, released by human eosinophils upon TLR2 stimulation in immunity against an intracellular pathogen. This study highlights a mechanism of direct pathogen recognition by human eosinophils, thereby broadening their functional importance as early direct sensors and effectors against bacteria.

## Acknowledgments

We thank Dr R. Paumelle, C. Cudejko, and N. Dupont for their assistance.

This study was supported by a grant from the “Biologie-santé” program (Fonctions des éosinophiles et pathologies à éosinophiles). L.K. was supported by a grant from the Center National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France (Action Thématique Incitative sur Program “Microbiologie Fondamentale”). Y.G. was supported by ANR005N/FEDER028F. We thank Dr C. Loch and C. Rouanet (Inserm U629, Institut de Biologie de Lille, Lille, France) for providing *M bovis* BCG.

## Authorship

V.D. performed research and wrote the paper; F.L. performed research and statistical analysis; E.H. analyzed data and reviewed the drafts of the paper; S.L. was essential for helping with patient sample purifications; Y.G. and L.K. provided purified mycobacterial components; E.A. and G.W. critically reviewed the manuscript; D.D. provided intellectual input and reviewed drafts of the paper; and M.C. designed and interpreted the experiments.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Monique Capron, Inserm U547, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Prof Calmette BP245, 59019 Lille Cedex, France; e-mail: Monique.capron@pasteur-lille.fr.

## References

- Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:374-380.
- Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.* 2004;6:946-959.
- Ryffel B, Fremont C, Jacobs M, et al. Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis (Edinb).* 2005;85:395-405.
- Briken V, Porcella SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.* 2004;53:391-403.
- Rook GA. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med.* 2007;7:327-337.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-174.
- Flores M, Merino-Angulo J, Tanago JG, Aquirre C. Late generalized tuberculosis and eosinophilia. *Arch Intern Med.* 1983;143:182.
- Vijayan VK, Reetha AM, Jawahar MS, Sankaran K, Prabhakar R. Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1992;101:1708-1709.
- Elliott AM, Kyosiimire J, Quigley MA, et al. Eosinophilia and progression to active tuberculosis in HIV-1-infected Ugandans. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:477-480.
- Resende Co T, Hirsch CS, Toossi Z, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:45-52.
- Tsicopoulos A, Hamid Q, Haczku A, et al. Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:764-772.
- Castro AG, Esaguy N, Macedo PM, Aguas AP, Silva MT. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect Immun.* 1991;59:3009-3014.
- Menezes-de-Lima-Juni O, Werneck-Barroso E, Cordeiro RS, Henriques MG. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 1997;62:778-785.
- Kirman J, Zakaria Z, McCoy K, Delahunt B, Le Gros G. Role of eosinophils in the pathogenesis of Mycobacterium bovis BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68:2976-2978.
- Turner OC, Basaraba RJ, Orme IM. Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2003;71:864-871.
- Lasco TM, Turner OC, Cassone L, et al. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2004;72:1147-1149.
- Basaraba RJ, Smith EE, Shanley CA, Orme IM. Pulmonary lymphatics are primary sites of Mycobacterium tuberculosis infection in guinea pigs infected by aerosol. *Infect Immun.* 2006;74:5397-5401.
- D'Avila H, Almeida PE, Roque NR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy. *Infect Immun.* 2007;75:1507-1511.
- Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol.* 1986;39:177-253.
- Svensson L, Wenneras C. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect.* 2005;7:720-728.
- Yazdanbakhsh M, Tai PC, Spry CJ, Gleich GJ, Roos D. Synergism between eosinophil cationic protein and oxygen metabolites in killing of schistosoma of Schistosoma mansoni. *J Immunol.* 1987;138:3443-3447.
- Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J Exp Med.* 1999;190:487-495.
- Legrand F, Woerly G, Driss V, Capron M. Innate immune function of eosinophils: from antiparasite to antitumor cells. *Methods Mol Biol.* 2008;415:215-240.
- Guerardel Y, Maes E, Elass E, et al. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from Mycobacterium chelonae. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. *J Biol Chem.* 2002;277:30635-30648.
- Jacobs M, Togbe D, Fremont C, et al. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect.* 2007;9:623-628.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguat PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* 1989;56:731-740.
- Wong CK, Cheung PF, Ip WK, Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37:85-96.
- Johnson CM, Tapping RI. Microbial products stimulate human Toll-like receptor 2 expression through histone modification surrounding a proximal NF-kappaB-binding site. *J Biol Chem.* 2007;282:31197-31205.
- Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol.* 2007;9:1087-1098.
- Vignal C, Guerardel Y, Kremer L, et al. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from Mycobacterium chelonae and Mycobacterium kansasii induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003;171:2014-2023.
- O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:3-9.
- Menendez A, Brett Finlay B. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:385-391.
- Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother.* 2007;30:16-28.
- Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* 2002;168:4701-4710.
- Plötz SG, Lentschat A, Behrendt H, et al. The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood.* 2001;97:235-241.
- Velasco-Velázquez MA, Barrera D, Gonzalez-Arenas A, Rosales C, Agramonte-Hevia J. Macrophage-Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog.* 2003;35:125-131.
- Dombrowicz D, Woerly G, Capron M. IgE receptors on human eosinophils. *Chem Immunol.* 2000;76:63-76.
- Meerschaert J, Busse WW, Bertics PJ, Mosher DF. CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:780-787.
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol.* 2003;171:3977-3982.
- von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, et al. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology.* 2006;211:557-565.
- Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood.* 2006;108:3168-3175.
- Méndez-Samperio P, Miranda E, Trejo A. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) stimulates human beta-defensin-2 gene transcription in human epithelial cells. *Cell Immunol.* 2006;239:61-66.
- Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang BY. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:907-912.
- Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70:4591-4599.
- Sharma S, Verma I, Khuller GK. Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against Mycobacterium tuberculosis H37Rv: in vitro and ex vivo study. *Eur Respir J.* 2000;16:112-117.
- Borelli V, Vita F, Shankar S, et al. Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2003;71:605-613.
- Torrent M, Navarro S, Moussaoui M, Noguez MV, Boix E. Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans. *Biochemistry.* 2008;47:3544-3555.
- Kobayashi K, Yoshida T. The Immunopathogenesis of Granulomatous Inflammation Induced by Mycobacterium tuberculosis. *Methods.* 1996;9:204-214.
- Bermudez LE, Young LS. Tumor necrosis factor alpha stimulates mycobactericidal/mycobacteriostatic activity in human macrophages by a protein kinase C-independent pathway. *Cell Immunol.* 1992;144:258-268.
- Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun.* 2000;68:6954-6961.
- Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens.* 2007;70:1-11.

---

**« LES EOSINOPHILES HUMAINS EXPERIMENTENT LE COMPLEXE CD3/TCR $\gamma\delta$  » (ARTICLE 2).**

Nous avons précédemment montré que les éosinophiles peuvent s'activer directement en réponse au BCG grâce à la reconnaissance du LM par TLR2. Il est possible que d'autres composants mycobactériens soient reconnus par les éosinophiles via d'autres récepteurs. Nous avons pu montrer que la présence du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  contribuait aux interactions éosinophiles/BCG. En effet, tout comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les éosinophiles sont des cellules principalement tissulaires qui peuvent constituer une ligne de défense contre les mycobactéries à ne pas négliger, étant donné leurs importantes capacités cytotoxiques et immunomodulatrices.

Par différentes approches expérimentales, nous avons mis en évidence l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  sur les éosinophiles humains. Afin de montrer la spécificité d'expression, nous avons effectué des doubles marquages en cytométrie en flux avec des marqueurs spécifiques des éosinophiles comme l'EPO et la MBP2. Des expériences de microscopie confocale et de coimmunoprécipitation de surface ont permis de localiser le marquage des différentes chaînes du CD3 et du TCR à la surface des éosinophiles, identifiables par leur noyau bilobé.

Nous avons ensuite déterminé les réarrangements de gènes qui ont eu lieu au sein des éosinophiles. Nous avons démontré le réarrangement des gènes V $\delta$ 2 et V $\gamma$ I par PCR et par hybridation *in situ*. Curieusement, seul le réarrangement V $\delta$ 2 a été confirmé par une étude par immunoscope. Un manque de matériel dans l'échantillon, la quantité insuffisante de copie des gènes-cibles étudiés sont les raisons les plus probables de cette absence de détection.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la fonctionnalité du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  exprimé sur les éosinophiles. Nous avons utilisé des ligands synthétiques spécifiques de ce TCR, le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP) ainsi que des anticorps spécifiques. Différents paramètres d'activation des éosinophiles ont ensuite été étudiés comme la libération de ROS, de protéines de granules mais aussi des cytokines. Enfin, des ligands naturels exprimés par les mycobactéries et les cellules d'une lignée de lymphome T, les Jurkat et d'une lignée de carcinome colorectal, les Colo-205 activent les éosinophiles.

**En conclusion, les éosinophiles humains expriment un complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  fonctionnel, similaire mais pas identique à celui des lymphocytes T, leur permettant de s'activer en réponse à des mycobactéries mais aussi d'exercer une activité cytotoxique vis-à-vis d'une lignée de cellules tumorales.**

# **Human eosinophils express a $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex mediating reactivity towards mycobacteria and cytotoxicity against tumor cells**

Fanny Legrand<sup>1,2,3,4#</sup>, Virginie Driss<sup>1,2,3,4#</sup>, Gaëtane Woerly<sup>1,2,3,4</sup>, Sylvie Loiseau<sup>1,2,3,4</sup>, Emmanuel Hermann<sup>1,2,3,4</sup>, Jean-Jacques Fournié<sup>5</sup>, Laurent Héliot<sup>3,4</sup>, Julie Bertout<sup>3,4</sup>, Virginie Mattot<sup>3,4,6</sup>, Fabrice Soncin<sup>3,4,6,7</sup>, David Dombrowicz<sup>1,2,3,4</sup> § and Monique Capron<sup>1,2,3,4</sup> §

<sup>1</sup> Inserm U547, Lille, France. <sup>2</sup> Université Lille 2, Lille, France. <sup>3</sup> IFR142, Lille, France.

<sup>4</sup> Institut Pasteur de Lille, Lille, France. <sup>5</sup> Inserm U 563, Toulouse, France.

<sup>6</sup> CNRS UMR8161, Lille, France. <sup>7</sup> Université Lille 1, Lille, France.

Running title:  $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression by eosinophils

Keywords: eosinophils, human, CD3,  $\gamma\delta$ TCR, *Mycobacterium*, tumor cell killing

#FL and VD; §DD and MC equally contributed to this manuscript

Correspondence to : Monique Capron. Inserm U547. Université Lille 2. Institut Pasteur de Lille. 1, r. Prof. Calmette BP245. 59019 Lille Cedex. France. Phone : +33 320 87 78 89. Fax : +33 320 87 78 88. e-mail: monique.capron@pasteur-lille.fr.



## **Abstract**

Although eosinophils are involved in the effector phase of adaptive immunity during parasitic infections and allergic responses, their contribution to innate immunity has been only recently unravelled. Here we show, by flow cytometry, immunofluorescence and confocal microscopy that a variable proportion of human eosinophils express CD3 and  $\gamma\delta$  T Cell Receptor (TCR) but not  $\alpha\beta$  TCR. Immunoprecipitation revealed surface expression of  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex. Real-time PCR amplification for CD3,  $\gamma$  and  $\delta$  TCR constant regions transcripts showed a significantly lower expression in eosinophils than in  $\gamma\delta$ T cells. TCR rearrangements occur in eosinophils as shown by *in situ* hybridization and spectratyping analysis of CDR3 length profiles. Release by eosinophils of Reactive Oxygen Species, granule proteins (EPO and EDN) and cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) was observed following activation by  $\gamma\delta$ TCR-specific antibodies and ligands as well as by mycobacteria. These effects were inhibited by anti- $\gamma\delta$ TCR blocking antibodies and antagonists. Moreover,  $\gamma\delta$ TCR/CD3 was involved in eosinophil cytotoxicity against tumor cells inducing both apoptosis and necrosis. Human eosinophils thus express a functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 with similar, but not identical, characteristics with  $\gamma\delta$ TCR from  $\gamma\delta$ T cells. This receptor might contribute to eosinophil innate responses against mycobacteria and to their anti tumor activity.

## **Introduction**

Eosinophils are polymorphonuclear granulocytes mainly found in increased numbers during helminth parasitic infections and allergic reactions (1). They are classically considered as mediator-releasing cells during effector phase of adaptive immunity, under the influence of T cell dependent cytokines or chemokines and antibodies (1), whereas eosinophil-derived chemokines have been recently shown to locally attract Th2 lymphocytes at lung inflammatory sites (2). Nevertheless, their precise function as beneficial or deleterious to the host still remains ambiguous, since highly toxic proteins present in eosinophil granules exert potent cytotoxic effects against non self targets such as parasites (3) but also against stressed or necrotic host cells (4) and in asthma (5). Eosinophil-tumor cell interactions and tumoricidal activity of eosinophils have been reported (6). Eosinophils are foremost present in mucosal tissues in contact with the environment such as in gastro-intestinal tract and skin (1) and are characterized by their wide morphological and functional heterogeneity (7).

In addition to these effector functions, eosinophils produce several Th2, Th1 and regulatory cytokines, such as IL-10 (8), which, in contrast to T cells, are stored within granules and promptly released upon activation (9). Eosinophils also express MHCII and CD86 (8) and act as antigen-presenting cells (1). Furthermore, eosinophils share with T cells expression of various receptors such as CD25 (10), CD4 (11), CD28 (8) and several members of the CD2 family, including 2B4 (12). This wide array of molecules endows eosinophils with the ability to induce and regulate adaptive immunity.

However, the early appearance of amoeboid granulocytes in invertebrates (13) and eosinophil granule cells in jawed fishes, the requirement of eosinophils for full development of mammary gland and the expression by eosinophils of several receptors involved in innate immunity, such as formyl peptide receptor, protease-activated receptors and TLR (14) further



points toward a role of eosinophils in innate immunity. Eosinophils contribute to TLR-mediated immunity against virus and mycobacteria (14), are found associated with mycobacterial granuloma (15) and a recently discovered catapult-like mechanism of non-apoptotic expulsion of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to innate immune defences against bacteria (16). Thus eosinophils appear functionally located at the interface between innate and adaptive immunity.

Strikingly, like eosinophils,  $\gamma\delta$ T cells are ancestral to other lymphoid populations such as  $\alpha\beta$ T cells and B cells, they participate to both innate and adaptive immune responses, have a preferential mucosal localisation (17) and might act as professional antigen-presenting cells (18) recognizing non-peptide antigens found on several pathogens, including mycobacteria, necrotic and tumor cells. These surprising similarities prompted us to investigate the expression and function of  $\gamma\delta$ T cell Receptor (TCR) in human eosinophils.

We here report that a variable proportion of human blood eosinophils express, at low levels, a functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex which contributes to their cytotoxic potential towards bacteria and tumors,

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Human eosinophils express CD3 and $\gamma\delta$ TCR but not $\alpha\beta$ TCR.**

Investigating expression by human blood eosinophils of T cell associated co-stimulatory molecules, we found that highly purified eosinophils (Fig. S1) expressed CD3, but not CD8, following double staining with antibodies against two specific granule proteins either eosinophil peroxidase (EPO) (Fig. 1A) or major basic protein 2 (MBP-2) (Fig. 1B). In T cells, CD3 associates with either  $\alpha\beta$ TCR or  $\gamma\delta$ TCR. We did not detect  $\alpha\beta$ TCR on eosinophils but  $\gamma\delta$ TCR expression was evidenced (Fig. 1 A-B). In human blood,  $\gamma\delta$ T cells express either V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 or V $\delta$ 1 variable regions. We also found that EPO<sup>+</sup> or MBP2<sup>+</sup> eosinophils expressed V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 and/or V $\delta$ 1 at their surface (Fig. 1 A-B and S2 E), as well as another  $\gamma\delta$ T cell marker, NKG2D in a lower proportion of cells (Fig. 1 A-B). A wide range of expression of  $\gamma\delta$ TCR/CD3 and NKG2D was found among 23 healthy volunteers or donors with various pathologies, but no correlation was observed between receptor expression levels and either eosinophilia, or a specific pathology (Fig. 1 C and Table S1). Neutrophils, containing myeloperoxidase (MPO) but no EPO, neither expressed CD3 nor the full  $\alpha\beta$ TCR complex at their surface in contrast to an earlier report (19)(Fig. S1 and S2 D). Likewise, monocytes did not express  $\gamma\delta$ TCR (Fig. S2 C), while total PBMC from the same eosinophil donors expressed expected levels of CD3,  $\alpha\beta$ TCR and, following *in vitro* differentiation,  $\gamma\delta$ TCR since  $\gamma\delta$ T cells represent a very minor population in blood (Fig. S2 A-B).

### **Eosinophils express all the subunits from $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex at their surface**

To further demonstrate expression of the components from  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex by eosinophils, immunofluorescence (Fig. 2 A) and high magnification by confocal microscopy (Fig. 2 A insets) analysis were performed and show that only a fraction of blood eosinophils,

identified by their typical binucleated morphology, expressed the four chains of CD3 and  $\gamma\delta$ TCR. No signal was detected with anti- $\alpha$ TCR, anti- $\beta$ TCR antibodies or control IgG. To characterize the structure of the  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex expressed at the surface of eosinophils, surface biotinylation followed by immunoprecipitation by an anti- $\gamma\delta$ TCR antibody and detection of biotinylated proteins was performed. Bands corresponding to the complete set of receptor subunits were detected at the expected molecular weight both on  $\gamma\delta$ T cells and eosinophils (Fig. 2 B). Taken together, these results confirm that a fraction of eosinophils, unambiguously identified by their morphology and the presence of specific eosinophil markers, express the  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex.

#### **$\gamma\delta$ TCR/CD3 is less abundant and less variable in eosinophils than in $\gamma\delta$ T cells**

Transcripts specific for the four chains ( $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) of CD3 complex,  $\gamma$ TCR and  $\delta$ TCR constant regions and CD8 were amplified and quantified by real-time PCR in highly purified eosinophils and  $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets and Colo-205 colon carcinoma cells as positive and negative controls respectively. Expression of the various chains was 300 to 4000 fold lower in eosinophil population than in  $\gamma\delta$ T lymphocyte population, while CD8 expression was absent in eosinophils but present in  $\gamma\delta$ T lymphocyte (Fig. 3 A). Amplification of V $\delta$ 1-J $\delta$ 3, V $\delta$ 2-C $\delta$  and V $\gamma$ I-J $\gamma$ P rearranged transcripts but not V $\delta$ 1-C $\delta$ 4 were also detected in eosinophils. These rearrangements were all found in  $\gamma\delta$ T lymphocytes but neither in  $\alpha\beta$ T lymphocytes nor Colo-205 cells (Fig. 3 B). Spectratyping analysis of CDR3 length profiles for V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1/2, V $\gamma$ 9-J $\gamma$ P and V $\delta$ 2-C $\delta$  evidenced a limited V $\delta$ 2-C $\delta$  diversity (1 and 2 peaks on 2 different eosinophil samples respectively) on eosinophils compared to  $\gamma\delta$ T cells (Fig. 3 C), while no signal was detected on eosinophils for the 2 other rearrangements, in contrast to  $\gamma\delta$ T cells (data not shown). Finally, DNA sequencing of V $\delta$ 1J $\delta$ 3 V $\delta$ 2-C $\delta$  regions from eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells

show that V and J regions were virtually identical to the IMGT sequence, while significant differences between eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells from the same donor were found in D regions and in junctional regions (Fig. S3). This further confirms that  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex expressed by some eosinophils and  $\gamma\delta$ T lymphocytes displays similar but not identical characteristics. To unambiguously demonstrate that TCR rearrangements occur in eosinophils, at single cell level, we performed *in situ* hybridization using sequences from rearranged TCR genes as RNA probes. Hybridization with anti-sense probes corresponding to V $\delta$ 2-C $\delta$  and V $\gamma$ I-J $\gamma$ P gave a positive signal on nuclei from eosinophils at times clearly bilobed. In keeping with RT-PCR results, a significantly stronger signal was detected on  $\gamma\delta$  T lymphocytes, while corresponding sense probes only gave background amplification on both cell types (Fig. 3 C). Finally, V $\delta$ 1-C $\delta$ 4 anti-sense probe gave positive signal on  $\gamma\delta$  T lymphocytes but not on eosinophils.

### **$\gamma\delta$ TCR/CD3-mediated eosinophil activation induces ROS, granule proteins and cytokine production**

As other myeloid cells, upon activation, eosinophils very rapidly produce Reactive Oxygen Species (ROS) and release, by selective degranulation, eosinophil-specific granule proteins, including highly cytotoxic cationic proteins such as EPO and eosinophil cationic protein (ECP). In purified blood eosinophils,  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex activation by immobilized antibodies to CD3,  $\gamma\delta$ TCR or V $\delta$ 1 led to a similar kinetics of ROS production (Fig. 4 A) and to a significant EPO and eosinophil-derived neurotoxin (EDN) release (Fig. 4 D and G), while stimulation with bromohydrin pyrophosphate (BrHPP), a phosphoantigen agonist selective for human  $\gamma\delta$ 2<sup>+</sup> T lymphocytes (20), induced dose-dependent ROS production as well as EPO release (Fig. 4 B and E). Furthermore, eosinophil activation by sec-butylamine (SBA), an inducer of endogenous phosphoantigens, yielded to a sustained dose-dependent ROS and EPO

production (Fig. 4 C and F), comparable to values obtained following activation with IgA/anti-IgA immune complexes, one potent physiological eosinophil activator. Since eosinophils also release several immuno-regulatory and proinflammatory cytokines (8), we further show that activation with anti-CD3,  $\gamma\delta$ TCR or V $\delta$ 1 antibodies efficiently induced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production by eosinophils (Fig. 4 H and I). Thus,  $\gamma\delta$ TCR/CD3-expressing eosinophils are fully functional and respond to selective agonists similarly to human  $\gamma\delta$ T lymphocytes.

### ***Mycobacterium bovis* and tumor cells induce $\gamma\delta$ TCR/CD3-dependent eosinophil activation and cytotoxicity**

Human  $\gamma\delta$ T cells respond to non-peptide antigens including mycobacterial and tumor-derived ligands. Patients with mycobacterial infections may exhibit blood and tissue eosinophilia and mycobacteria-induced eosinophil-associated experimental acute inflammation (15) as well as rapid eosinophil chemotaxis *in vivo*. Mycobacteria-eosinophil interactions might thus reflect the reactivity conferred by  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex. Accordingly, incubation of blood eosinophils with increasing ratios of *Mycobacterium bovis*-BCG induced dose-dependent ROS production and EPO release (Fig. 5 A-B), that could be inhibited, in a dose-dependent manner, by an anti- $\gamma\delta$ TCR antibody (Fig. 5 C-D) or bromohydrin methylene diphosphonate (BrHPcP) (21), a phosphoantigen antagonist selective for human TCR  $\gamma 9\delta 2^+$  T lymphocytes (Fig. S4). In addition, both  $\gamma\delta$  T cells (22) and eosinophils (12) exert potent cytotoxic activity towards many tumor cells. Killing of Jurkat or Colo-205, tumor cell lines, by purified blood eosinophils, was significantly inhibited following addition of neutralizing anti- $\gamma\delta$ TCR Ab (Fig. 5 E-F). Eosinophil-induced Jurkat cell apoptosis correlated with eosinophil CD3,  $\gamma\delta$ TCR and NKG2D expression levels ( $R^2 = 0.83$ ; 0.92 and 0.97 respectively (n=7)). Furthermore, in the presence of eosinophils, Jurkat and Colo205 not only displayed increased apoptosis but an

enhanced necrosis (Fig. 5 G-H). Altogether, these data demonstrate that the  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex expressed by eosinophils is involved in their functional responses to both mycobacteria and tumors.

We here provide evidence that highly purified human blood eosinophils, unambiguously identified by their morphology and their expression of specific eosinophil granule proteins express a functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex, so far almost exclusively associated to T lymphocytes, but lack  $\alpha\beta$ TCR complex, whose  $\alpha$  chain has recently been identified on a neutrophil subpopulation (19). Among granulocytes,  $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression represents an additional difference between eosinophils and neutrophils. As previously observed for other receptors such as CD25 (23), CD4 (11), Fc $\epsilon$ RI, CD89 and CD28 (8),  $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression on eosinophils is heterogeneous. CD3 $\epsilon$  expression (both at mRNA and protein level) was consistently lower than  $\gamma\delta$ TCR. However, a strong correlation ( $R^2$  : 0.92) was found between expression of these 2 receptor components. The very low CD3 $\epsilon$  expression probably accounts for the low surface expression of the whole complex on eosinophils. We were unable to detect  $\gamma\delta$ TCR/CD3 on mouse eosinophils, which is not surprising since mouse eosinophils are strikingly different from human eosinophils regarding their granular content (13) and membrane expression of various immune receptors, in particular IgE receptors (24) and IgA receptors (25). Furthermore,  $\gamma\delta$ T cells display significant differences between mouse and humans. A high proportion of cutaneous lymphocytes express  $\gamma\delta$ TCR in mouse but not in human (26), while only human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 are responsive to phosphoantigens (27)

Eosinophils display a rearranged  $\gamma\delta$ TCR with a more restricted diversity compared to  $\gamma\delta$ T cells further excluding the possibility of lymphocyte contaminants in eosinophil

preparations. Besides T lymphocytes,  $\delta$ TCR rearrangements have only been reported in malignant B lymphoblasts (28), NK cells (29) and in mixed-type leukaemia retaining both T-lymphoid and myeloid characteristics. Furthermore, presence of  $V\delta 1^+V\delta 2^+$  eosinophils suggests incomplete allelic exclusion as found in some instances in  $\gamma\delta$ T cells (30).

Eosinophils expressing lymphoid markers might represent an hitherto unattended  $\gamma\delta$ TCR-expressing subset of myeloid cells. Our results would support the recently proposed myeloid-based model of haematopoiesis, in which T- or B-committed progenitors would each keep a myeloid-differentiation potential (31). Along these lines, myeloid-derived plasmacytoid DC are able to express a “lymphoid” program (RAG1, rearranged IgH genes) (32) and genetic reprogramming from differentiated B cells to macrophages has been reported (33). Our results show that such “bridges” might also exist between T cells and eosinophils, in particular since eosinophils are found in human thymus (5). Furthermore, as found for gut intraepithelial  $\gamma\delta$ T cells, eosinophils are able to undergo peripheral differentiation in lungs (34).

Direct  $\gamma\delta$ TCR activation of eosinophils by  $\gamma\delta$ TCR/CD3-specific antibodies and selective agonists induced eosinophil-specific responses, while direct  $\alpha\beta$ TCR activation by specific ligands has not been reported for neutrophils, which release, broadly expressed, IL-8 following anti-CD3 activation (19). Our findings indicate that eosinophils might also contribute, by  $\gamma\delta$ TCR-dependent mechanisms, to immune defences in tissues, where 99% eosinophils are located. One might speculate that  $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression is higher in tissue than in blood eosinophils as previously reported for Fc $\epsilon$ RI (7). Eosinophils have been associated to granulomatous diseases: schistosomiasis, Crohn’s disease and mycobacterial infections (15). Eosinophils can damage cell wall and lyse *Mycobacterium tuberculosis* (35).  $V\gamma 9\delta 2$  and  $V\delta 1$  expression, rapid response to phosphoantigen ligands, as well as BCG-induced activation so far represented hallmarks of  $\gamma\delta$ T lymphocyte-mediated cytotoxicity

towards phosphoantigen-expressing mycobacteria (36). Since tumors produce phosphoantigens and are targeted by  $\gamma\delta$ T lymphocytes (36),  $\gamma\delta$ TCR-mediated activation might thus contribute to the potent anti-tumoral activity of eosinophils (6). Indeed, while  $\gamma\delta$ T lymphocytes and NK cells display granzyme B/perforin-mediated cytotoxicity, eosinophils possess unique cationic proteins with a strong cytotoxic potential (13). Furthermore, tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) is considered by some authors as a marker of good prognosis (37). Current development of innovative cancer immunotherapies, based on synthetic phosphoantigens, might also involve the very potent antitumoral activity of this new eosinophil subset.



## Material and Methods

**Eosinophil purification and culture.** Peripheral venous blood was obtained from healthy donors or eosinophilic patients after informed consent. Eosinophils were isolated as described (38) on Percoll followed by negative selection using anti-CD16-coated microbeads. Purity determined after cyto-spin and RAL555 staining was above 98 % (Fig. S1 A). Purified eosinophils were cultured overnight at 37°C in complete RPMI without phenol red. For immunofluorescence, medium was supplemented with 1 ng/ml rhIL-5.

**ROS production and EPO release.** ROS production and EPO were measured as described (38). Wells were coated with 10 µg/ml anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> (Sigma) for 2 h at 37°C, followed by incubation with 10 µg/ml anti-CD3, anti-γδTCR, anti-Vδ1 or isotype control mouse IgG<sub>1</sub> for 2 h at 37°C. Eosinophils (2x10<sup>6</sup>/ml) were added in the presence of luminol (8.3 µg/ml). Alternatively, eosinophils were stimulated with 50-200 nM bromohydrin pyrophosphate (BrHPP), 5-50 µM sec-butylamine (SBA) (Sigma) or IgA/anti-IgA immune complexes (incubation with 7.5 µg/ml secretory IgA for 1 hr then by addition of 10 µg/ml anti-IgA). Chemiluminescence was measured at 37°C for 5 sec/timepoint with a luminometer (Victor<sup>2</sup>™ Wallac). For EPO release, supernatants (50 µl) were transferred into a microtiterplate and luminol (50 µg/ml), D-luciferin (4x10<sup>-5</sup>M) (Roche Diagnostics) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were injected.

**Activation with Mycobacteria.** *Mycobacterium bovis*-BCG was grown in Sauton medium at 37°C. Eosinophils were incubated with various BCG numbers (Eosinophil/BCG: 20/1, 10/1 and 5/1). ROS and EPO release were determined as described above. For inhibition

experiments, eosinophils (20/1 ratio) were incubated with 50-100  $\mu\text{M}$  BrHPcP, a blocking anti- $\gamma\delta\text{TCR}$  mAb (10 $\mu\text{g/ml}$ ) or isotype control for 30 min at 37°C, before BCG addition.

**Tumor cell apoptosis.** Eosinophil-mediated cytotoxicity against PKH-26-labelled Jurkat or Colo-205 (10  $\mu\text{M}$ ) was measured in complete medium at  $1.6 \times 10^4$  targets/well into U-bottom plates containing eosinophils (25:1 Effector:Target ratio). After 6 h (Jurkat) or 30 min (Colo-205), apoptosis was measured by flow cytometry after annexinV-FITC staining (Pharmingen) for 15 min at RT. For inhibition experiments, blocking antibodies against  $\gamma\delta\text{TCR}$  or isotype-matched control (10  $\mu\text{g/ml}$ ) were added to eosinophils immediately prior to the incubation in the presence of targets. In some experiments, discrimination between apoptosis and necrosis was achieved by additional staining with 5  $\mu\text{g/ml}$  7-amino-actinomycin D (7-AAD) (Sigma).

**Statistical analysis.** Individual data or mean  $\pm$  S.E.M values were presented. All statistical analyses were performed using SPSS software. Normality of data samples was assessed with the Normality test of Shapiro and Wilk. Then parametric paired-samples Student's t-test was used to compare variables and the one-tailed statistical significance level was as represented on figures.

**Online material.** Table S1: characteristics of eosinophil donors and eosinophil membrane phenotype. Table S2: antibodies used in flow cytometry and stimulation experiments. Table S3: primers used for Real time PCR analysis of  $\gamma\delta\text{TCR/CD3}$  chains expression and for RT-PCR analysis of  $\gamma\delta\text{TCR}$  rearrangements. Fig. S1: eosinophil gating strategy and specific identification of purified eosinophils. Fig. S2: analysis of surface expression of CD3,  $\gamma\delta\text{TCR}$ , V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2, V $\delta$ 1,  $\alpha\beta\text{TCR}$ , CD8 and NKG2D on  $\gamma\delta\text{TCR}^+$  lymphocytes, scatter-gated lymphocytes and monocytes from PBMC and neutrophils as analysis of V $\delta$ 2, V $\delta$ 1 expression

by eosinophils. Fig. S3: sequence variability between eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells in V $\delta$ 1-J $\delta$ 3 and V $\delta$ 2-C $\delta$  TCR regions. Fig S4: Inhibition of BCG-induced eosinophil activation by BrHPcP. Supplementary methods and references for cell culture, flow cytometry, immunofluorescence and confocal microscopy, surface immunoprecipitation, RT- and real time-PCR, TCR repertoire and junctional sequences analysis, *in situ* hybridisation, EDN and cytokine release.

## **Acknowledgment**

The authors wish to thank M. Bonneville (Inserm, Nantes, France) M. Goldman (ULB, Brussels, Belgium), M.-L. Gougeon (Institut Pasteur, Paris, France), B. Malissen (Inserm, Marseille, France), J. Khalife (Inserm, Lille) for helpful advices. They are grateful to L. Prin (CHRU, Lille France) and the National Network on Hypereosinophilia for access to eosinophilic patients, C. Rouanet and C. Locht (Inserm, Lille, France) for providing BCG and technical suggestions, V Decot (CHRU, Nancy, France) for help in the experimental procedures, M. Loyens for technical assistance and Dr D. Plager (Mayo Clinic, Rochester) for anti-MBP2 antibody.

FL, VD, GW, SL, EH, JB, VM performed the experiments. GW, J-JF, FS, DD, MC, designed and interpreted the experiments. DD, MC wrote the paper.

The authors declare no competing financial interest

## References

1. Rothenberg, M.E., and S.P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174.
2. Jacobsen, E.A., S.I. Ochkur, R.S. Pero, A.G. Taranova, C.A. Protheroe, D.C. Colbert, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2008. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205:699-710.
3. Gounni, A.S., B. Lamkhioed, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J.P. Kinet, and M. Capron. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367:183-186.
4. Stenfeldt, A.L., and C. Wenneras. 2004. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. *Immunology* 112:605-614.
5. Jacobsen, E.A., A.G. Taranova, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2007. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 119:1313-1320.
6. Tepper, R.I., R.L. Coffman, and P. Leder. 1992. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257:548-551.
7. Kayaba, H., D. Dombrowicz, G. Woerly, J.P. Papin, S. Loiseau, and M. Capron. 2001. Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon receptor activation. *J Immunol* 167:995-1003.
8. Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron, and M. Capron. 1999. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 190:487-495.

9. Melo, R.C., L.A. Spencer, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 2008. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol* 83:229-236.
10. Plumas, J., V. Gruart, D. Aldebert, M.J. Truong, M. Capron, A. Capron, and L. Prin. 1991. Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit. *Eur J Immunol* 21:1265-1270.
11. Lucey, D.R., D.I. Dorsky, A. Nicholson-Weller, and P.F. Weller. 1989. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120. *J Exp Med* 169:327-332.
12. Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H.U. Simon, L. Moretta, M. Colonna, and F. Levi-Schaffer. 2005. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* 174:110-118.
13. Lee, J.J., and N.A. Lee. 2005. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin Exp Allergy* 35:986-994.
14. Driss, V., F. Legrand, E. Hermann, S. Loiseau, Y. Guerardel, L. Kremer, E. Adam, G. Woerly, D. Dombrowicz, and M. Capron. 2008. TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria : role of alpha-defensins. *Blood* in press:
15. Lasco, T.M., O.C. Turner, L. Cassone, I. Sugawara, H. Yamada, D.N. McMurray, and I.M. Orme. 2004. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 72:1147-1149.
16. Yousefi, S., J.A. Gold, N. Andina, J.J. Lee, A.M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G.J. Gleich, and H.U. Simon. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14:949-953.

17. Carding, S.R., and P.J. Egan. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2:336-345.
18. Brandes, M., K. Willmann, and B. Moser. 2005. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 309:264-268.
19. Puellmann, K., W.E. Kaminski, M. Vogel, C.T. Nebe, J. Schroeder, H. Wolf, and A.W. Beham. 2006. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14441-14446.
20. Espinosa, E., C. Belmant, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagne, H. Brailly, M. Bonneville, and J.J. Fournie. 2001. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem* 276:18337-18344.
21. Belmant, C., E. Espinosa, F. Halary, Y. Tang, M.A. Peyrat, H. Sicard, A. Kozikowski, R. Buelow, R. Poupot, M. Bonneville, and J.J. Fournie. 2000. A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human delta T cells. *Faseb J* 14:1669-1670.
22. Hayday, A., and R. Tigelaar. 2003. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 3:233-242.
23. Rand, T.H., D.S. Silberstein, H. Kornfeld, and P.F. Weller. 1991. Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. *J Clin Invest* 88:825-832.
24. de Andres, B., E. Rakasz, M. Hagen, M.L. McCormik, A.L. Mueller, D. Elliot, A. Metwali, M. Sandor, B.E. Britigan, J.V. Weinstock, and R.G. Lynch. 1997. Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood* 89:3826-3836.

25. Decot, V., G. Woerly, M. Loyens, S. Loiseau, B. Quatannens, M. Capron, and D. Dombrowicz. 2005. Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat eosinophils. *J Immunol* 174:628-635.
26. Jameson, J., and W.L. Havran. 2007. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 215:114-122.
27. O'Brien, R.L., C.L. Roark, N. Jin, M.K. Aydintug, J.D. French, J.L. Chain, J.M. Wands, M. Johnston, and W.K. Born. 2007. gammadelta T-cell receptors: functional correlations. *Immunol Rev* 215:77-88.
28. Krejci, O., Z. Prouzova, O. Horvath, J. Trka, and O. Hrusak. 2003. Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J Immunol* 171:524-527.
29. Fronkova, E., O. Krejci, T. Kalina, O. Horvath, J. Trka, and O. Hrusak. 2005. Lymphoid Differentiation Pathways Can Be Traced by TCR {delta} Rearrangements. *J Immunol* 175:2495-2500.
30. Couedel, C., E. Lippert, K. Bernardeau, M. Bonneville, and F. Davodeau. 2004. Allelic exclusion at the TCR delta locus and commitment to gamma delta lineage: different modalities apply to distinct human gamma delta subsets. *J Immunol* 172:5544-5552.
31. Kawamoto, H. 2006. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* 27:169-175.
32. Shigematsu, H., B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, and K. Akashi. 2004. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21:43-53.
33. Xie, H., M. Ye, R. Feng, and T. Graf. 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117:663-676.



34. Sehmi, R., and J.A. Denburg. 2000. Differentiation of human eosinophils. Role in allergic inflammation. *Chem Immunol* 76:29-44.
35. Borelli, V., F. Vita, S. Shankar, M.R. Soranzo, E. Banfi, G. Scialino, C. Brochetta, and G. Zabucchi. 2003. Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71:605-613.
36. Thedrez, A., C. Sabourin, J. Gertner, M.C. Devilder, S. Allain-Maillet, J.J. Fournie, E. Scotet, and M. Bonneville. 2007. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 215:123-135.
37. Fernandez-Acenero, M.J., M. Galindo-Gallego, J. Sanz, and A. Aljama. 2000. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 88:1544-1548.
38. Legrand, F., G. Woerly, V. Driss, and M. Capron. 2007. Innate immune functions of eosinophils. From antiparasite to antitumor cells. In *Methods in molecular Biology*. J. Ewbank, and E. Vivier, editors. Humana Press, Totowa, NJ. 215-240.

## Figure legends

**Fig. 1. Surface expression of  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex by human eosinophils.** (A-B) CD3,  $\gamma\delta$ TCR, V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2, V $\delta$ 1,  $\alpha\beta$ TCR, CD8 and NKG2D surface expression on EPO<sup>+</sup> (A) and MBP2<sup>+</sup> (B) purified peripheral blood eosinophils analysed after 18 h culture and gated as described in Fig. S1. Results in (A) and (B) represent to 2 distinct representative donors. Staining with control isotype antibodies is represented. (C) Cell surface marker expression on EPO<sup>+</sup> gated peripheral blood eosinophils from 23 individual eosinophil donors. Group average expression for the indicated markers is represented (-). Individual data and patient status are presented in Table S1.

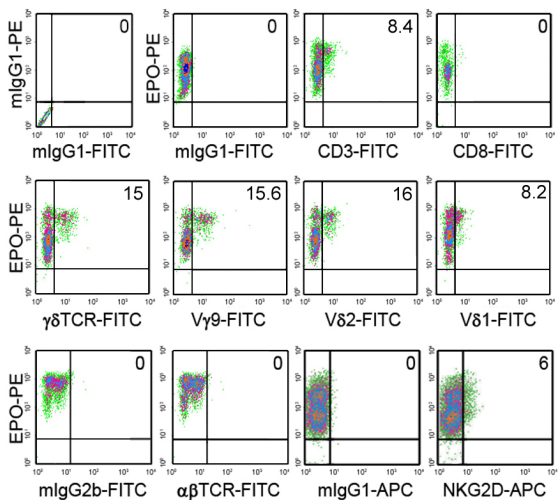
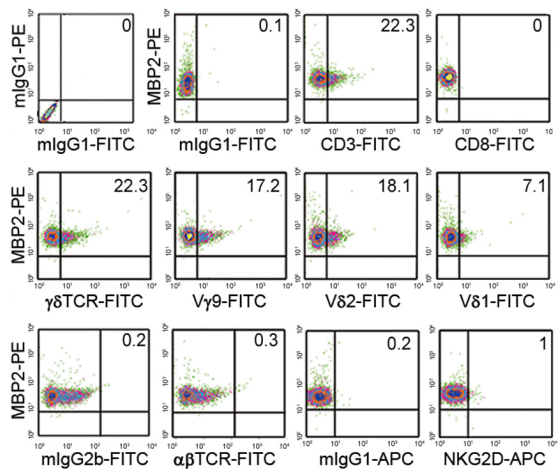
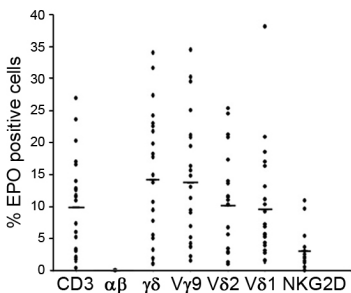
**Fig. 2. Subunit composition of  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex in human eosinophils.** (A) Immunofluorescence and confocal microscopy (insets) analysis of  $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression using chain-specific antibodies on cytopsin eosinophil preparations after 18h culture. Staining with anti- $\alpha$ TCR, anti- $\beta$ TCR antibodies and control goat IgG are represented as negative controls. Arrowheads indicate some positive cells. (B) Subunit composition of surface-expressed  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complexes. Eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells were biotin-labelled and complexes were immunoprecipitated, using anti- $\gamma\delta$ TCR antibody or isotype control antibody. Immunoprecipitated proteins were resolved on a reducing 14% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Biotinylated proteins were revealed using ABC-HRP and chemiluminescence. Positions of the TCR and CD3 subunits are marked. Material corresponding to the total and to 1/10<sup>th</sup> of the material was loaded for eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells respectively. Dashed lines indicate that non adjacent lanes of the same gel have been joined on the figure.

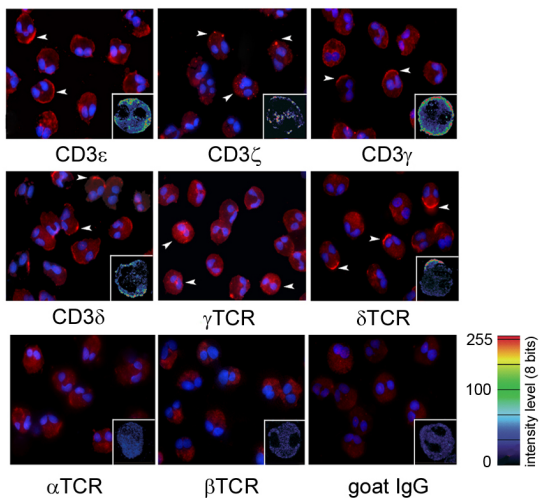
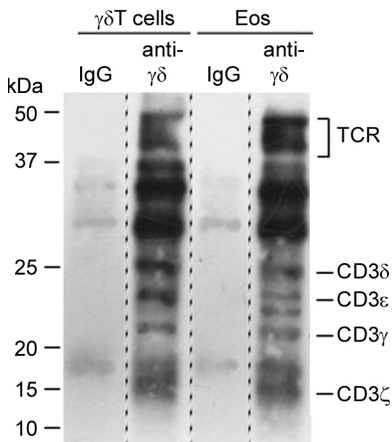
**Fig. 3.  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex expression and rearrangements in human peripheral blood eosinophils.** (A) Real time PCR analysis of expression of individual chains from  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex in eosinophils,  $\gamma\delta$  T cells and Colo-205 cells. Average expression in Colo-205 cells is chosen as reference (samples were analysed in triplicate using primers listed in Table S2). (B) TCR $\gamma$  and  $\delta$  rearrangements in peripheral blood eosinophils analysed by RT-PCR using primers listed in Table S2. CD8 amplification is performed to exclude lymphocyte contamination. Colo-205 are chosen as negative control (C) Spectratyping analysis of CDR3 length profiles for V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1/2 ; V $\gamma$ 9-J $\gamma$ P and V $\delta$ 2-C $\delta$  families in eosinophils from 2 different donors and in  $\gamma\delta$  T cells. (D). Expression of rearranged  $\gamma$  and  $\delta$ TCR at the single cell level in peripheral blood eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells detected by *in situ* hybridization using anti-sense and control sense probes specific for V $\delta$ 2-C $\delta$ , V $\gamma$ I-J $\gamma$ P and for V $\delta$ 1-C $\delta$ 4 used as negative control

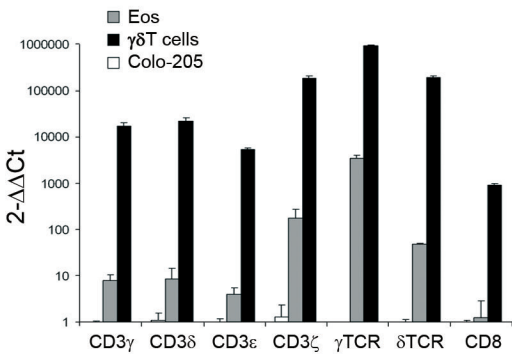
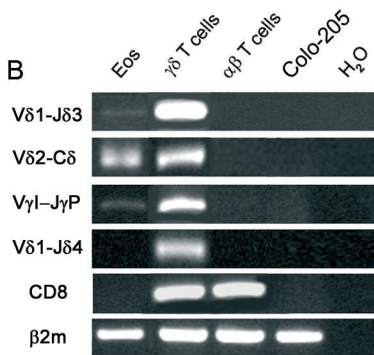
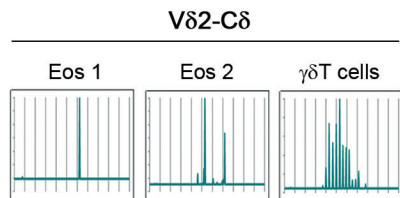
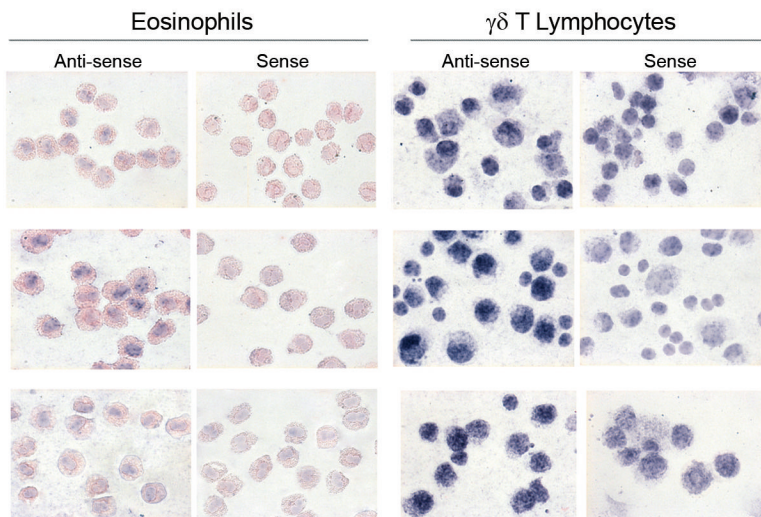
**Fig. 4. Specific mediator release upon CD3- or  $\gamma\delta$ TCR-induced eosinophil activation.** (A-C) Representative time course of ROS production following eosinophil activation by specific antibodies (A), BrHPP (B) or SBA stimulation (C). (A) Stimulation with anti-CD3 (■), anti- $\gamma\delta$ TCR (X) or anti-V $\delta$ 1 (▲) mAbs or control IgG<sub>1</sub> (◆). (B) Stimulation by BrHPP 200 nM (○) 100 nM (■) and 50 nM (◇) or culture medium (◆). (C) Stimulation by SBA 500  $\mu$ M (□) 50  $\mu$ M (▲) and 5  $\mu$ M (X), culture medium (◆) or IgA/anti-IgA immune complexes (●). (D-F) EPO release by eosinophils upon CD3 or  $\gamma\delta$ TCR activation by specific antibodies (D) (n=6), BrHPP (E) (n=3) or SBA stimulation (F) (n=3). Results are expressed in count per second (cps). (G) EDN release by eosinophils upon CD3 or  $\gamma\delta$ TCR activation by specific antibodies (n=6). (H-I) Cytokine production by eosinophils upon CD3 or  $\gamma\delta$ TCR activation by specific

antibodies or IgA/anti-IgA immune complexes. IFN- $\gamma$  production (H) (n=5-7) and TNF- $\alpha$  production (I) (n=4-8). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01.

**Fig. 5. *Mycobacterium bovis*-BCG- and tumor-cell induced eosinophil activation.** (A) Dose-dependent ROS production by BCG-activated eosinophils. BCG/eosinophil ratio: 20/1 (●), 10/1 (◇), 5/1 (+) and 0/1 (-). (B) Dose-dependent EPO release by eosinophils activated by different BCG/eosinophil ratios (n=3). (C) Inhibition of BCG-induced ROS production (ratio 20/1 ●) by an anti- $\gamma\delta$ TCR blocking antibody 5 $\mu$ g/ml (x) and 10 $\mu$ g/ml (○) or an isotype control antibody ( $\Delta$ ). (D) Inhibition of BCG-induced EPO production by an anti- $\gamma\delta$ TCR blocking antibody (5 and 10 $\mu$ g/ml) or an isotype control antibody. Results are expressed as  $\Delta$ EPO cps values (values from medium stimulation are subtracted from values obtained with BCG stimulation for each antibody) (n=3). (E-H) Induction of Jurkat cells (E, G), Colo205 (F, H) killing by eosinophils and inhibition by an anti- $\gamma\delta$ TCR blocking antibody. (E-F) Percentage of AnnexinV<sup>+</sup> tumor cells in the presence or absence of eosinophils and blocking anti- $\gamma\delta$ TCR or isotype control antibodies (n=5-7). (G-H) Evaluation of eosinophil-induced apoptosis and necrosis of tumor cells by AnnexinV-7AAD-PKH26 staining. Figure shows a representative experiment. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01.

**A****B****C***Figure 1*

**A****B****Figure 2**

**A****B****C****D****Figure 3**

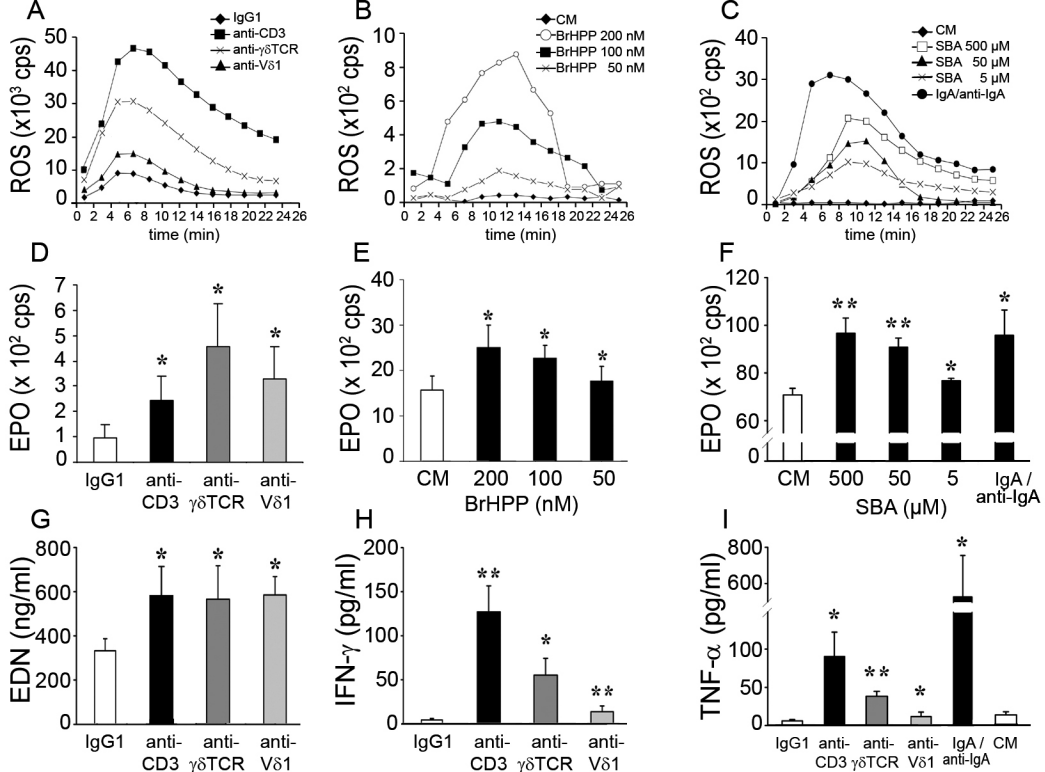


Figure 4



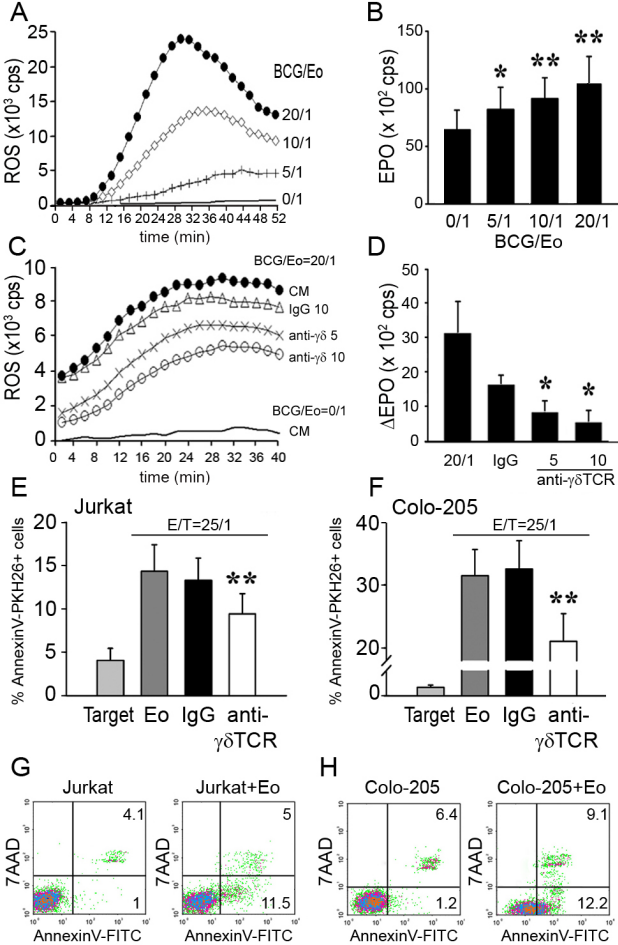


Figure 5

Donors	Diagnosis	CD3 (%)	$\gamma\delta$ TCR (%)	V $\gamma$ 9 (%)	V $\delta$ 2 (%)	V $\delta$ 1 (%)	NKG2 D (%)	Eosino. (nbr/mm <sup>3</sup> )
1	ND	10.9	22.5	13.0	11	11.1	1.5	265
2	ND	6	7.7	9.4	5.6	4.3	3	340
3	ND	3.1	9.4	6.9	3.4	3.1	2	148
4	ND	12.6	13.7	21.1	14.0	nd	nd	120
5	ND	20.3	27.3	34.5	24.5	20.9	nd	150
6	ND	2.1	5.5	5.1	2.7	2.7	nd	325
7	Allergic rhinitis	12.6	24.2	19.4	10.3	6.8	5.4	600
8	Allergic rhinitis	13.9	23	29.5	21.2	16.3	nd	940
9	Allergic rhinitis	23.7	31.7	34.9	32.1	25.5	6	750
10	Papuloerythroderma (SK)	11.5	19.8	14.8	11.6	10.3	2.1	2455
11	Sezary (SK)	3	3.2	3.7	2.9	3.9	2.5	26800
12	Pemphigus (SK)	16.5	21.7	20.8	17.3	17	9.6	9600
13	T Lymphoma (SK)	3.3	5	4.2	2.9	5.6	1.2	7200
14	Eczema (SK)	1.4	1.7	2.3	1.1	1.2	nd	1045
15	HES	7.3	10.7	9	6.7	7.2	0	7050
16	HES	26.9	34	30.2	25.3	18.5	1.9	3910
17	HES	23.6	31.6	25.0	20.8	38.1	10.9	1100
18	HES	17.0	17.7	16.3	11.5	9.2	3.6	1430
19	HES	11.7	14.9	11.3	10.2	5.7	1.3	5260
20	HES	2	1	2.2	1.3	5.5	0	1970
21	HES	12.8	18.2	nd	13.6	13.1	2.5	2900
22	HES	0.4	1	3.6	1	1.5	nd	42600
23	HES	5.18	9.44	15.6	11.44	5.21	nd	1490

**Table S1:** Characteristics of eosinophil donors and eosinophil membrane phenotype presented in Fig. 1B. ND, normal donors ; SK, skin diseases; HES, hypereosinophilic syndromes.

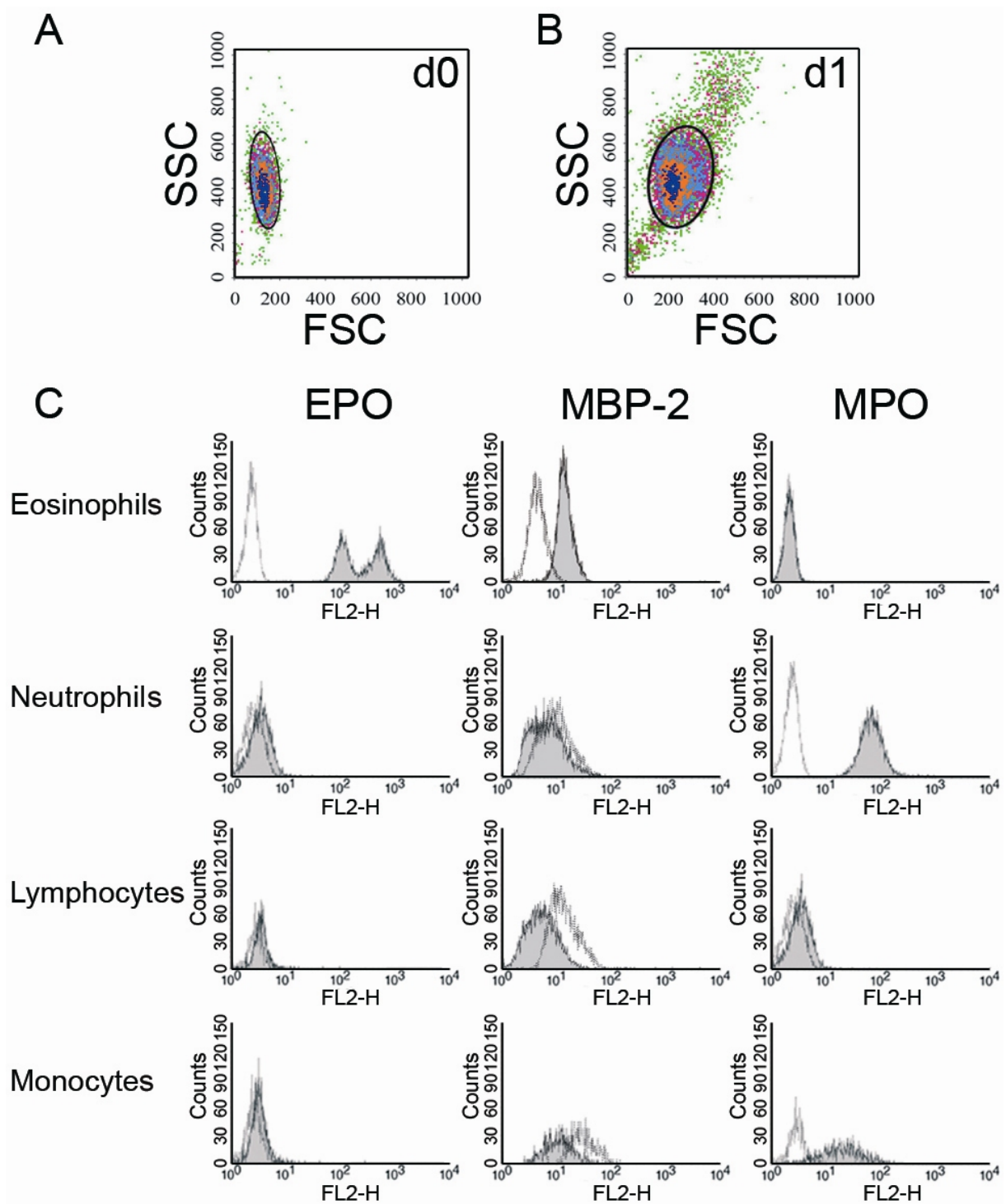
<b>Flow cytometry</b>			
<b>Antibody</b>	<b>Clone</b>	<b>Supplier</b>	<b>Dilution</b>
Anti-CD3-FITC	SK7	BD	1:25
$\gamma\delta$ TCR-FITC	B1	Pharmingen	1:100
$\gamma\delta$ TCR-PE	B1	Pharmingen	1:10
V $\gamma$ 9-FITC	B3	Pharmingen	1:100
V $\delta$ 2-FITC	Immu389	Immunotech	1:25
V $\delta$ 2-PE	B6	Pharmingen	1:50
V $\delta$ 1-FITC	TS82	Endogen	1:50
$\alpha\beta$ TCR-FITC	MCA990F	Serotec	1:25
$\alpha\beta$ TCR-PE	BMA031	Immunotech	1:25
NKG2D-APC	1D11	Pharmingen	1:25
CD8-FITC	B911	Pharmingen	1:50
CD14-PE	M5E2	Pharmingen	1:50
MBP	AHE-3	Pharmingen	1:50
MPO-PE	5B8	Pharmingen	1:50
IgG <sub>1</sub> -FITC	MOPC-21	Pharmingen	
IgG <sub>1</sub> -APC	MOPC-21	Pharmingen	
IgG <sub>1</sub> -PE	DAK-G01	Dako	
IgG <sub>1</sub> -biotin	4E3	Beckman Coulter	
IgG <sub>1</sub>	MOPC-21	Pharmingen	
IgG2 <sub>b</sub> -FITC	MCA691F	Serotec	
IgG2 <sub>b</sub> -PE	27-35	Pharmingen	

<b>Stimulation</b>			
<b>Antibody</b>	<b>Clone</b>	<b>Supplier</b>	<b>Concentration</b>
anti-CD3	UCHT1	Biologend	10 $\mu$ g/ml
anti- $\gamma\delta$ TCR	5A6.E9	Endogen	10 $\mu$ g/ml
anti-V $\delta$ 1	R9.12	Immunotech	10 $\mu$ g/ml
mouse IgG <sub>1</sub>	B-Z1	Diaclone	10 $\mu$ g/ml
anti-mouse IgG F(ab') <sub>2</sub>		Sigma	10 $\mu$ g/ml
secretory IgA		Sigma	7.5 $\mu$ g/ml
anti-IgA		Immunotech	10 $\mu$ g/ml

**Table S2:** List of antibodies with origin, clone, and working dilution.

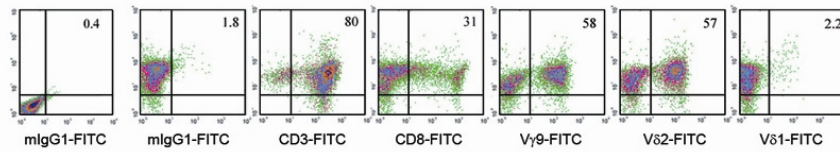
Primer	Sequence (5'-3')	Annealing
V $\delta$ 1 J $\delta$ 3	TCCAGCCTGCTGTGTGTATTTGTG AAAAACATCTGTCGGGTGTCCCAG	60°C
V $\delta$ 1 J $\delta$ 4	TCCAGCCTGCTGTGTGTATTTGTG TCCTTTGCCAAACATCAGGGGTCT	60°C
V $\delta$ 2 C $\delta$	TCAACTGGTACAGGAAGACCCAAG TGACAGCATTGTACTIONTCCCCTGG	57°C
V $\gamma$ I J $\gamma$ P	GYTKTTCCTCAAYTGCAGCCAGTCAG CTTTGTTCCGGGACCAAATACC	58°C
CD8	CTATACCTCTCCCAAACAAGCCC CCCAGATGTAGATATCACAGGCGA	56°C
$\beta_2m$ (30 cycles)	CAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT TGGAGACAGCACTCAAAGTAGAA	52°C
CD3 $\gamma$	ATTTTCGTCCTTGCTGTTGG 5'GTTTCCTTGAAGGTGGCTGT	60°C
CD3 $\delta$	CGTTTCTCTCTGGCCTGGTA CCATGTGATGCTGGTATTGC	60°C
CD3 $\epsilon$	GGGGCAAGATGGTAATGAAG CCAGGATACTGAGGGCATGT	60°C
CD3 $\zeta$	GCTGGATGGAATCCTCTTCA GCCACGTCTCTTGTCCAAA	60°C
CD8 $\alpha$	ACTTGTGGGGTCCTTCTCCT GTCTCCCGATTTGACCACAG	60°C
TCR $\gamma$	5'AACGGTGCCAGAAAAGTCAC TGTCTTTGGGATCCATTGTG	60°C
TCR $\delta$	CTGTGCACTCCACTGACTTTG GGGTTTATGGCAGCTCTTTG	60°C
GAPDH	CGTCCCGTAGACAAAATGGT AGGTCAATGAAGGGGTCGTT	60°C

**Table S3:** Primer sequences and annealing temperatures.

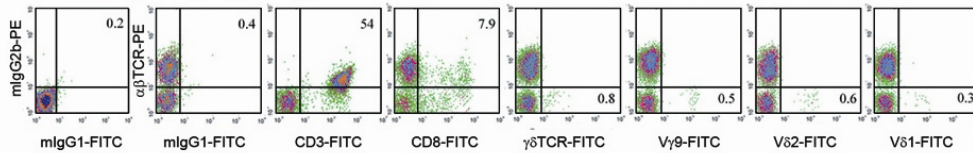


**Figure S1: Gating strategy and specific identification of purified peripheral blood eosinophils in flow cytometry analysis.** (A-B) Gating of purified peripheral blood eosinophils on forward and side scatter parameters immediately after purification (A) and after 18 h culture (B). Ellipsoids circle the analyzed population. (C). Specificity of eosinophil and neutrophil identification by intracellular detection of EPO, MBP-2 or MPO using PE- or biotin-conjugated specific antibodies (grey shaded histograms). Staining with control isotype matched antibodies is represented in white histograms.

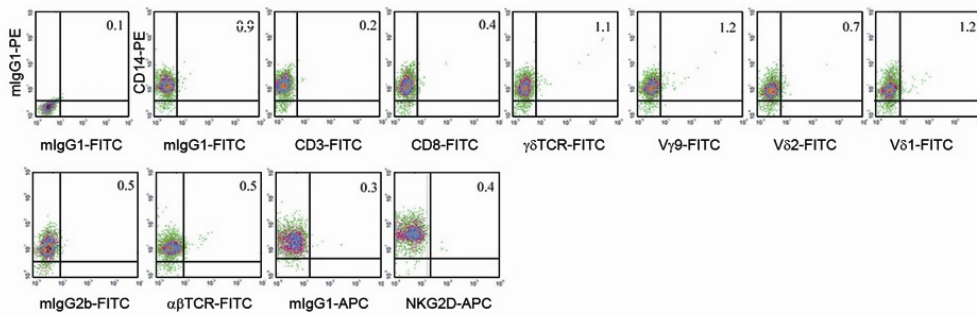
### A $\gamma\delta$ T Lymphocytes



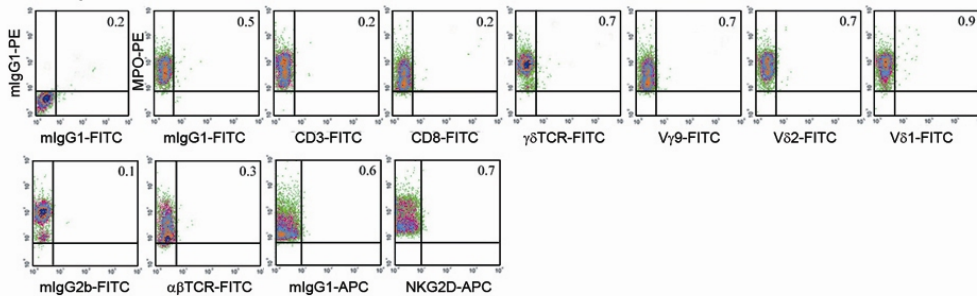
### B PBMC (lymphocyte gating)



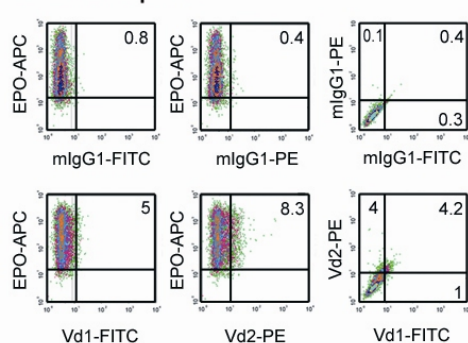
### C PBMC (Monocyte gating)



### D Neutrophils

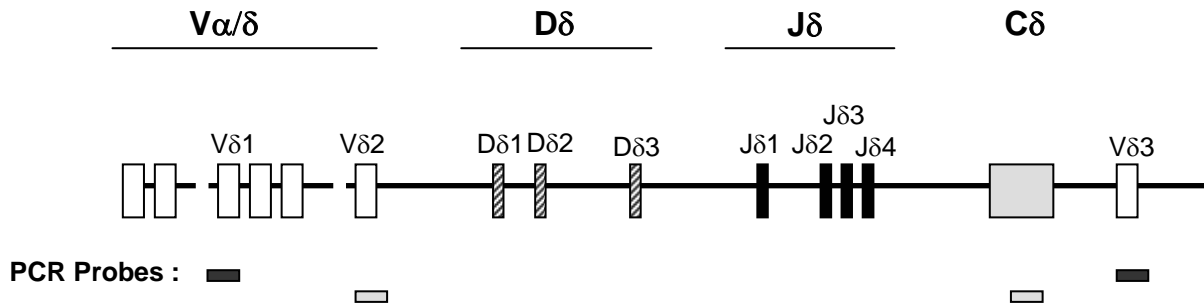


### E Eosinophils



**Figure S2 : Surface expression of CD3,  $\gamma\delta$ TCR, V $\gamma$ 9, V $\delta$ 2, V $\delta$ 1,  $\alpha\beta$ TCR, CD8 and NKG2D detected by flow cytometry in double staining on immune cell populations. (A) *In vitro*-generated BrHPP-induced  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> lymphocytes. (B) Scatter-gated lymphocytes from PBMC. (C) Scatter-gated monocytes from PBMC. (D) CD16<sup>+</sup>-purified blood neutrophils. Staining with control isotype matched antibodies is represented. (E) Presence of V $\delta$ 1<sup>+</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup> EPO<sup>+</sup> eosinophils identified by triple staining. Staining with control isotype matched antibodies is represented.**

### A. TCR $\delta$ locus organisation



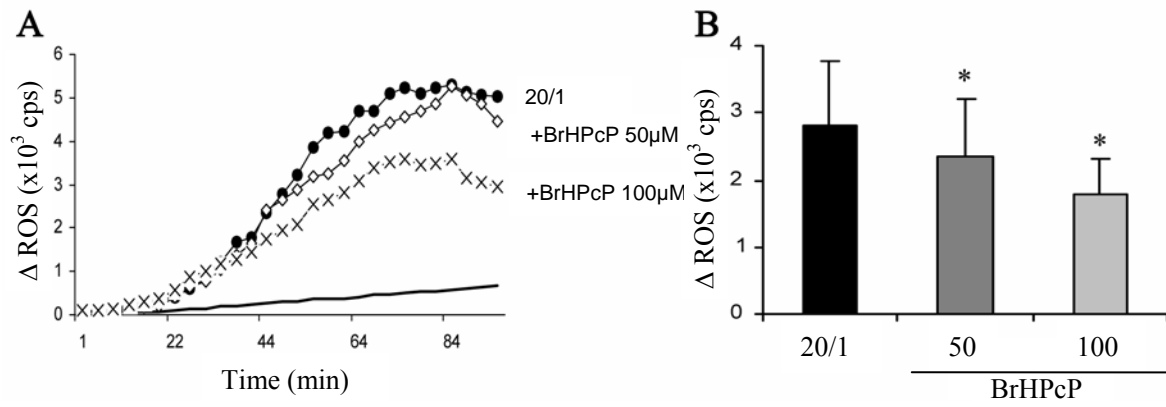
### B. V $\delta$ 1-J $\delta$ 3 rearrangement

	← V-region	D-region →
IMGT sequence	CAAAGTACTTTTGTGCTCTTGGGGAAAG - - - - - ACTGG	
$\gamma\delta$ T cells (355 bp)	1 CAAAGTACTTTTGTGCTCTTGGGGAAAGACCCTACGCTGG	
Eosinophils (349 bp)	1 CAAAGTACTTTTGTGCTCTTGGAGTA - - - - - CGG	
	← J-region	
IMGT sequence	GGGATACG - - - - - CTCCTGGGACACCCGACAGATGTTT	
$\gamma\delta$ T cells	42 GGGATACG - - - - - CTCCTGGGACACCCAACAGATGTTT	
Eosinophils	30 GGGATACGCTCAGGCTCCTGGGACACCCGACAGATGTTT	

### C. V $\delta$ 2-C $\delta$ rearrangement

	V-region
IMGT sequence	TTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTG $\gamma\delta$ T cells
(421 bp)	221 TTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTG
Eosinophils (415 bp)	221 TTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTG
	D-region ← J-region
IMGT sequence	TG - - - - - TCCTAC - - - - - - - - - - ACACCGATAAACTC
$\gamma\delta$ T cells	265 TGATCCGATTTCCTATGGGGATGAGACCGTACACCGATAAACTC
Eosinophils	265 TGACCCGGTCC - - - GGGGGATAAAA - - - GACACCGATAAACTC

**Figure S3: Intraindividual variability between eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells in rearranged V $\delta$ 1-J $\delta$ 3 and V $\delta$ 2-C $\delta$  TCR sequences.** A. TCR locus organization with positions of the PCR probes used for sequence amplification. (B-C). Sequence alignment of V $\delta$ 1-J $\delta$ 3 (B) and V $\delta$ 2-C $\delta$  (C) regions analyzed from IMGT database, differentiated  $\gamma\delta$ T cells and peripheral blood eosinophils obtained from the same allergic donors for. Grey boxes indicate mismatch.



**Figure S4:** (A) Representative time course experiment of inhibition of BCG-induced ROS production (ratio 20/1 ●) by BrHPcP 50  $\mu$ M ( $\diamond$ ) and 100  $\mu$ M (x). (B) Inhibition of BCG-induced ROS production by BrHPcP. Results are expressed as mean cps values at the maximal ROS production  $\pm$  SEM (n=3).



## Supplementary methods

### Cell purification and culture

Neutrophils were obtained by positive selection with anti-CD16 coated microbeads. Purity was 99 %. For RNA extraction,  $\alpha\beta$ TCR lymphocytes from PBMC from normal donors were sorted after staining with anti- $\alpha\beta$ TCR-PE (BMA 031) (Immunotech) using FACS Aria<sup>TM</sup> cell sorter and Diva<sup>TM</sup> software (BD). Purity was 99 %.  $\gamma\delta$ TCR lymphocytes were generated from PBMC ( $0.5 \times 10^6$ /ml) by culture in complete RPMI 1640 medium with 200 nM BrHPP and 20 ng/ml rhIL-2 for 7 days. At that time, 50-70% cells were  $\gamma\delta 2$ TCR<sup>+</sup> cells. For RT-PCR and *in situ* hybridization,  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> cells were further purified using anti- $\gamma\delta$ TCR microbeads (Miltenyi). Colo-205 and Jurkat were obtained from ATCC. Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 10 mM L-Glutamine and 10  $\mu$ g/ml Gentamycin.

### Flow cytometry

Antibodies and isotype controls used for flow cytometry (origin, clone, working dilution or concentration) are listed in Table S2. Anti-EPO (AHE) and anti-MBP-2 (1) (a kind gift from Dr. D Plager, Mayo Clinic, Rochester) were biotinylated using biotin-sulfosuccinimidyl ester (Molecular Probes) according to manufacturer's instructions and used at a 1:100 dilution.

Samples were analysed on a FACSCalibur<sup>TM</sup> using CellQuest<sup>TM</sup> software (BD). Double staining experiments are represented as color density plots (2) with linear scales used for both forward (FSC) and side scatter (SSC) and logarithmic scales used for fluorescence parameters (Log density: 50%). After overnight culture, purified blood eosinophils were gated prior to the analysis, on the basis of their FSC and SSC characteristics in order to exclude dead cells (Fig. S1B). Within PBMC fraction, monocytes and lymphocytes were gated on the basis of their FSC and SSC characteristics prior to the analysis. Quadrants were set on samples after

double staining with FITC- or APC- and PE- or biotin-conjugated control isotype antibodies. At least  $10^4$  events were acquired per sample.

For double and triple staining, cultured peripheral eosinophils were preincubated with 5% human serum albumin (HSA) for 30 min at 4°C and labelled for membrane receptor with the relevant fluorochrome-conjugated antibodies. After washing, cells were fixed 10 min with 2% paraformaldehyde at 4°C and permeabilized for 10 min at room temperature (RT) with 0.01% saponin in PBS-1% BSA. Non-specific binding was blocked with 5  $\mu$ l mouse serum for 10 min. Purified peripheral blood eosinophils were further identified by incubation with biotinylated anti-EPO or anti-MBP-2 or isotype control for 30 min and streptavidin-PE (Molecular Probes) (1:200) for 20 min in the presence of saponin. Neutrophils were identified by intracellular staining with anti-MPO-PE following an identical procedure. Monocytes and T lymphocytes were identified by staining with anti-CD14-PE, anti- $\alpha\beta$ TCR or anti- $\gamma\delta$ TCR respectively.

### **Immunofluorescence and confocal microscopy**

Following overnight culture, eosinophils were cytocentrifuged, fixed in 4% paraformaldehyde, washed in 0.05 M PBS. Fixation was stopped with 0.1 M glycine for 4 min and 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 7.4 for 15 min. After each incubation step, cytopspins were washed for 10 min in PBS. Cells were incubated with PBS-3 % BSA-5 % HSA for 30 min and, after one PBS wash, with 10 % de complemented donkey serum (Jackson ImmunoResearch). Cytopspins were then incubated overnight at 4°C in a humid chamber with goat antibodies specific for CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ ,  $\alpha$ TCR,  $\beta$ TCR,  $\gamma$ TCR and  $\delta$ TCR (Santa Cruz) or with goat IgG (Jackson ImmunoResearch) in PBS-BSA-HSA (40  $\mu$ g/ml). After washing in PBS-0.1% BSA, cells were incubated with biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch) (1:200) in PBS-BSA-HSA for 2 hours, followed by streptavidin-Texas Red

(Molecular Probes) (1:500) in PBS-3% BSA for 1 hour. Final washes were with PBS-0.1% BSA- 0.02% Tween 20 for 2x10 min and with PBS for 10 min. For immunofluorescence, DNA was stained with Hoechst 33342 (Invitrogen) (1:1000), immediately prior to cytospin mounting in Fluoromount G (Southern Biotechnologies).

Samples were analysed by confocal microscopy using a DM-IRE2 inverted microscope with SP2-AOBS scan-head (Leica) at the Imaging Facility of Institut Pasteur de Lille. Excitation was performed at 543 nm for Texas Red. Fluorescence emission wavelengths pass bands were selected between 581 and 621 nm in accordance with the emission spectral analysis. Excitation power was between 100 and 400  $\mu$ W. Acquisitions were performed using a 100x 1.4 NA oil immersion objective. 3D pre-treatment, analysis and edition were performed with Edit3D (free software, Y. Usson, GDR2588, CNRS, France). For conventional immunofluorescence a Leica DM-RB microscope equipped for epifluorescence with a 100W mercury lamp was used. Filter and dichroic mirror sets were TX2 for Texas Red and A for Hoechst 33342. Images were acquired with a 100x 1.32 NA oil immersion objective, a Photometrics Cool SNAP<sup>TM</sup> camera using RSIImage<sup>TM</sup> software (Roper Scientific). Analysis and editing was performed on Photoshop (Adobe).

### **Surface immunoprecipitation**

Surface labelling and immunoprecipitation was performed as previously described (3). Purified human eosinophils or differentiated  $\gamma\delta$ T cells were washed and then resuspended in PBS (pH 8.0) at  $3.10^7$  cells/ml at room temperature. Surface biotinylation was performed for 30 min at room temperature using 2mM Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnology). Cells were washed three times with PBS containing 100 nM glycine and once in PBS.

Labelled cells were lysed in a buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitors and 1% Brij 97 (Sigma-Aldrich). Lysates were cleared by

centrifugation for 15 min at 12,000 *g* and sequentially incubated at 4°C in the presence of Protein-G Sepharose (Gamma bind Plus Sepharose, Pharmacia), Protein G Sepharose-bound normal mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) and Protein G Sepharose-bound anti- $\gamma\delta$ TCR. Immunoprecipitated samples were washed three times with lysis buffer then boiled in reducing sample buffer (30 mM Tris, pH 6.8, 5% glycerol, 2% SDS, 2.5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue). Material was run on 14% polyacrylamide gels. Material corresponding to the total and to 1/10<sup>th</sup> of the material was loaded for eosinophils and  $\gamma\delta$ T cells respectively. Following separation, proteins were transferred to PVDF membrane (Biorad). Blots were developed using ABC-HRP (Vector Laboratories) and the enhanced chemiluminescence (ECL) plus Western blot detection system (Amersham).

### **PCR analysis**

Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen) from 10<sup>7</sup> purified cells and reverse transcription was performed using SuperScript<sup>TM</sup> RT (MMLV 200U/ $\mu$ l) (Invitrogen). cDNA was amplified using primers (Proligo) (20 pmoles/ $\mu$ l) listed in Table S3. PCR were run for 40 cycles (1 min at 95°C, 1 min annealing and 1 min at 72°C) using Taq polymerase (Bioprobe).

### **Real time PCR**

Total RNA was prepared from eosinophils cells by guanidium/CsCl centrifugation method. Briefly, purified eosinophils were pelleted by centrifugation and then lysed in 4 M guanidium isothiocyanate, 1 mM EDTA, 25 mM sodium acetate, 4.9 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 68 mM N-lauryl sarcosine. Lysate was drawn through a 20G needle. RNA was obtained by ultracentrifugation (28000 rpm, 20h, and 20°C) through a CsCl gradient. RNA pellet was washed twice and dissolved in water and precipitated overnight at -20°C with ethanol 70%

and sodium acetate 0.08 M. After centrifugation (10000 rpm, 45 minutes at 4°C), RNA was washed twice in ethanol 70%, resuspended in water and store at -80°C until use. RNA from  $\gamma\delta$  T cells and Colo205 cells was prepared using RNeasy mini-spin columns (Qiagen, UK) according to the manufacturer's instructions. All samples were quantified by absorbance measurement at 260nm on a spectrophotometer (Biorad), and RNA quality was checked by running samples on 1.5 % agarose gel in RNA loading buffer (Sigma).

Total RNA was first submitted to DNase I (Invitrogen) treatment (15 min at room temperature), and cDNA was generated using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. Samples were analyzed by quantitative real-time PCR, performed according to manufacturer's protocol, using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers were designed using the Primer3 Website and are listed on Table S3.

Samples were run in triplicate in a reaction volume of 25  $\mu$ l. Amplification was carried out for 40 cycles, with denaturation at 95 °C for 10 min during the first cycle and subsequently for 15 seconds, annealing and extension for 1 minute at 60°C. A dissociation temperature gradient was included at the end of the run. Gene expression was normalized according to GAPDH expression. Relative gene expression was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (4).

### **TCR repertoire analysis**

Qualitative analysis of CDR3 length for V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1/2, V $\gamma$ 9-J $\gamma$ P and V $\delta$ 2-C $\delta$  families was performed in triplicate on eosinophils from 2 different donors and in  $\gamma\delta$  T cells (TcLand, Nantes, France) (5). Briefly, cDNA was amplified by PCR using a C $\gamma$  or C $\delta$  reverse primer and V $\gamma$ 9 or V $\delta$ 2-specific forward primers, respectively. The amplifications were performed in a 384-Well GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Briefly, each amplification product was used for an elongation reaction using a dye-labeled J $\gamma$

specific-labelled primer for the rearrangement analysis and C $\delta$  labeled primer for the d chain analysis, then heat denatured, loaded at least in duplicate onto a sequencing analyzer (48-capillary 3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Then, GeneMapper software (Applied Biosystems) was used to display the distribution profiles of CDR3 lengths, in amino acids, of the amplified and elongated products.

### **Junctional sequences analysis**

V $\delta$ 1-J $\delta$ 3 and V $\delta$ 2-C $\delta$  amplification products (400 bp) were cloned into a TA vector (pCR-TOPO, Invitrogen) using standard protocols. For each rearrangement, sequencing was performed on 5 randomly picked clones. TCR sequences were obtained from the IMGT website ([imgt.cines.fr](http://imgt.cines.fr)). Sequence alignments were performed using DNASTar software.

### ***In situ* hybridisation**

PCR products, amplified from purified  $\gamma\delta$ TCR lymphocyte RNA, and corresponding to V $\gamma$ I-J $\gamma$ P, V $\delta$ 2-C $\delta$  and V $\delta$ 1-C $\delta$ 4 rearrangements were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen). Clones were isolated and sequenced on both strands. Clones corresponding to the published sequence were used to generate hybridization probes. Sense and anti-sense probes were synthesised from linearised plasmids using 350 $\mu$ M digoxigenin-UTP (Roche) and SP6 or T7 polymerases as described (6). *In situ* hybridisation was performed using a Discovery automat and corresponding kits (Ventana Medical Systems). Slides were incubated in EZprep buffer before processing with a standard RiboMap Kit. Slides were pre-treated 30 min with CC2 buffer, then 20 min with protease 3, followed by 6 h hybridization with sense or anti-sense probes (100 ng/slide). Slides were then washed twice 10 min in 2X SSC at 60°C, twice 10 min in 0.1X SSC at 60°C. Slides were incubated for 30min with a mouse anti-digoxigenin antibody (Jackson ImmunoResearch) and then for 30min with a rabbit anti-

mouse antibody before treatment with UltraMap kit. Labelling was detected after a 150 min (V $\delta$ 2-C $\delta$ ), 110 min (V $\gamma$ I-J $\gamma$ P) or 90 min (V $\delta$ 1-C $\delta$ 4) incubation in the presence of NBT/BCIP substrate. Slides were counterstained for 1h with Nuclear Fast Red and mounted in permanent mounting medium (Vector).

### **EDN and cytokine release**

Eosinophils ( $2 \times 10^6$ /ml) were activated with the same stimuli as for ROS production. After 18 h culture, supernatants were collected. EDN were measured by specific ELISA (MBL). The lower detection limit was 0.62 ng/ml. IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  cytokines were measured by specific ELISA (Diaclone). Detection limit was 5 pg/ml for IFN $\gamma$  and 8 pg/ml for TNF $\alpha$ .

## Supplementary references

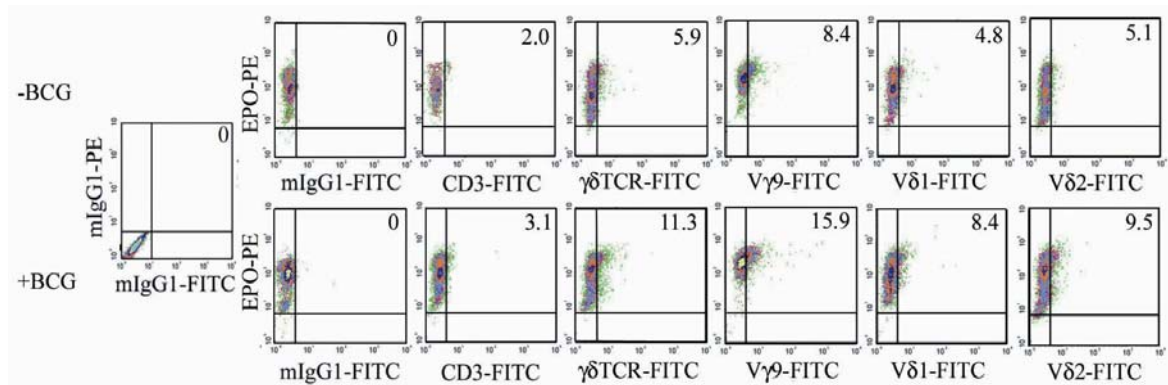
1. Plager, D.A., D.A. Loegering, J.L. Checkel, J. Tang, G.M. Kephart, P.L. Caffes, C.R. Adolphson, L.E. Ohnuki, and G.J. Gleich. 2006. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *J Immunol* 177:7340-7345.
2. Herzenberg, L.A., J. Tung, W.A. Moore, L.A. Herzenberg, and D.R. Parks. 2006. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7:681-685.
3. Hayes, S.M., and P.E. Love. 2002. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity* 16:827-838.
4. Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
5. Douillard, P., R. Josien, C. Pannetier, M. Bonneville, J.P. Soulillou, and M.C. Cuturi. 1998. Selection of T cell clones with restricted TCR-CDR3 lengths during in vitro and in vivo alloresponses. *Int Immunol* 10:71-83.
6. Wilkinson, D.G., and M.A. Nieto. 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225:361-373.



## Résultats complémentaires :

### 1. Le BCG augmente l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$

Dans cet article, nous montrons l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  sur les éosinophiles. Plusieurs modèles expérimentaux ont démontré l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$  au cours des infections mycobactériennes. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la capacité du BCG à moduler l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ . Ainsi l'expression du CD3 et du TCR $\gamma\delta$  par les éosinophiles est augmentée en présence de BCG (**Figure 1**).

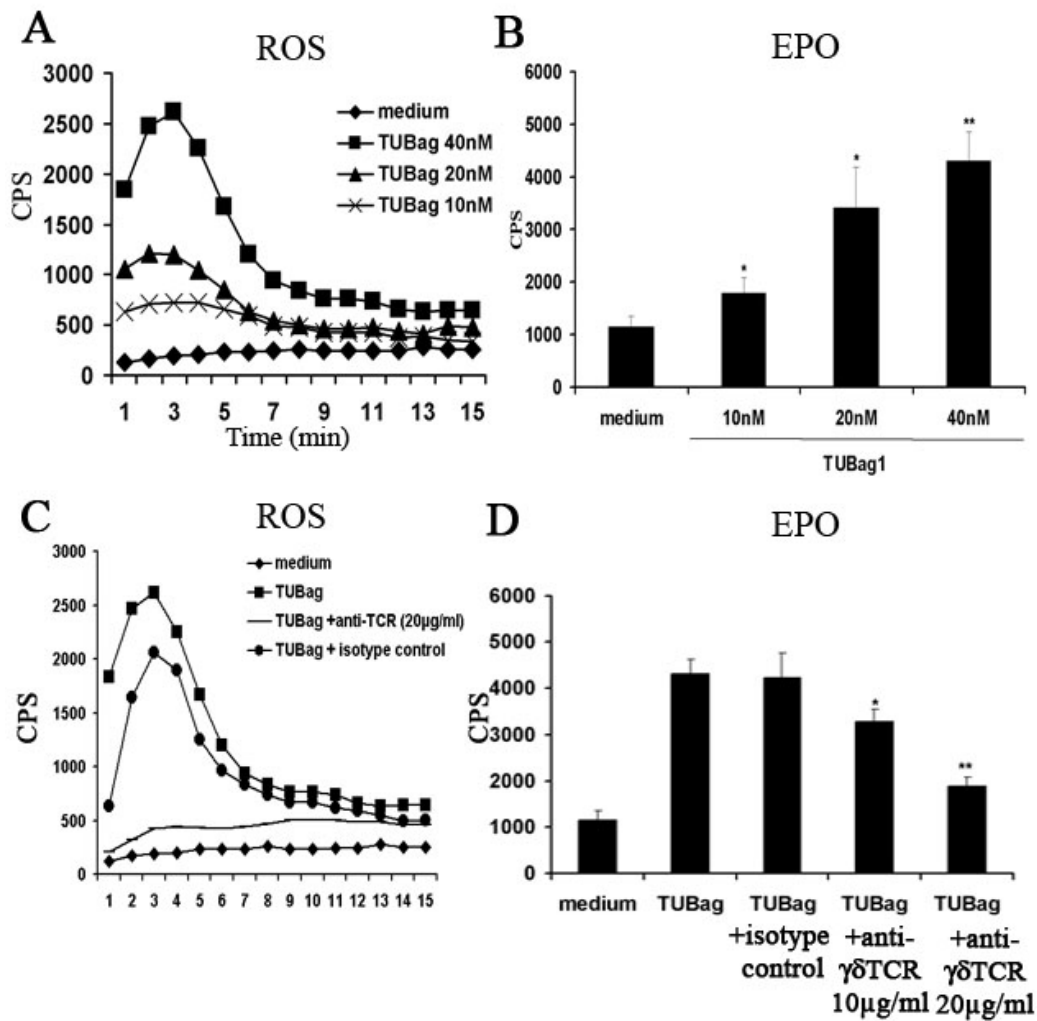


**Figure 1 : CD3 and  $\gamma\delta$ TCR expression on EPO<sup>+</sup> eosinophils stimulated by *M. bovis* BCG.** Flow cytometry was used to determine the level of CD3 and  $\gamma\delta$ TCR expression. Eosinophils isolated from the blood of human donors were incubated with (black line) or without (grey histogram) BCG (10:1) for 2 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> compared to isotype control (pointed line). One representative experiment of three independent experiments.

### 2. Le 3 formyl 1 butyl pyrophosphate (3fBPP ou TUBag 1) active les éosinophiles via le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$

L'aptitude des mycobactéries à activer les éosinophiles via le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  semble liée à leur capacité à exprimer des phosphoantigènes. En effet, il a été démontré que les lymphocytes T $\gamma\delta$  humains réagissent dans le cas d'une infection mycobactérienne à quatre molécules naturelles non peptidiques de structure phosphatée, désignées phosphoantigènes, qui présentent une activité de stimulation pour une concentration de l'ordre de 1 à 5 nM (nanomolaire) (Constant *et al.*, 1994). Il s'agit des TUBag 1 à 4. Nous avons pu

tester un de ces phosphoantigènes naturels : le 3 formyl 1 butyl pyrophosphate (3fbPP) ou TUBag 1. La **figure 2** montre une libération de ROS et d'EPO par les éosinophiles proportionnelle aux concentrations de TUBag1 (10 nM à 40 nM). De plus, cette activation est inhibée par un anticorps bloquant anti-TCR $\gamma\delta$  confirmant la reconnaissance du TUBag 1 par le TCR $\gamma\delta$  exprimé sur les éosinophiles.

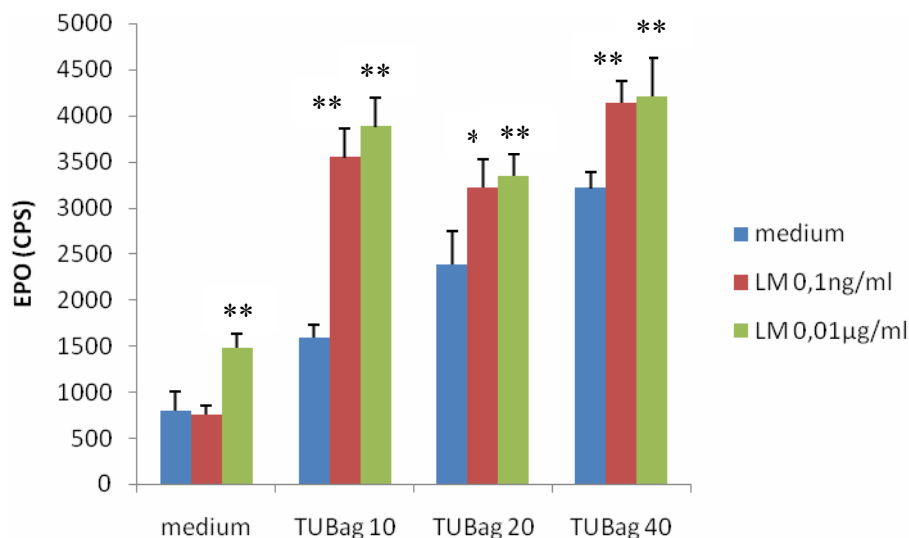


**Figure 2: Activation of eosinophils by phosphoantigens.** Eosinophils were stimulated with or without TUBag at different concentrations (10-40 nM). ROS (A) and EPO (B) releases were measured by chemiluminescence. Results are expressed as count per seconds (CPS) values. Eosinophils were treated with increasing concentrations of blocking anti- $\gamma\delta$ TCR or isotype control (20  $\mu$ g/ml) for 30 minutes following by stimulation with TUBag (40nM). ROS (C) and EPO (D) production was measured by chemiluminescence. One representative experiment of three independent experiments was shown for ROS release and results are

represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM for EPO release. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

### 3. Coopération TLR/TCR

Afin de déterminer la nature de la coopération entre les voies TLR et TCR, nous avons effectué des expériences d'activation des éosinophiles en utilisant différentes combinaisons LM/TUBag, ligand de TLR2 et de CD3/TCR $\gamma\delta$  respectivement (**Figure 3**). Une synergie est observée pour une dose suboptimale de LM (0.1ng/ml) en combinaison avec différentes doses de TUBag (10-40nM) alors que le LM (0.01 $\mu$ g/ml) et différentes concentrations de TUBag (20-40nM) montrent plutôt un effet additionnel. Des résultats similaires ont été obtenus avec des combinaisons de PAM et BrHPP (données non montrées). Même si le LM n'induit pas de synthèse de ROS par les éosinophiles, une synergie est néanmoins obtenue pour toutes les concentrations en combinaison avec le TUBag (données non montrées). Ces observations montrent que TLR2 agit de concert avec le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  pour augmenter la production de ROS et d'EPO par les éosinophiles. De plus, cet effet est soit additif, soit synergique, suivant la dose utilisée.



**Figure 3 : Effect of TLR2 and CD3/ $\gamma\delta$ TCR cooperation on EPO release by eosinophils.** Eosinophils were stimulated with the combinations of TLR2 agonist (LM from *M. bovis* BCG) and CD3/ $\gamma\delta$ TCR ligand (TUBag) at different concentrations. EPO released in cell supernatants was measured by chemiluminescence. Results are expressed as EPO cps (counts

per second) values. Results are represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## ***Rôle du récepteur au complément (CR3) dans l'activation des éosinophiles en réponse à différentes espèces mycobactériennes (résultats complémentaires).***

*Les légendes des figures sont en anglais en vue de la préparation d'une publication.*

Les éosinophiles peuvent être activés par de nombreux facteurs incluant des complexes immuns, des allergènes, des cytokines, des phosphoantigènes mais aussi des pathogènes comme *M. bovis* BCG. Ceci nous a conduits à comparer la capacité de différentes espèces mycobactériennes à activer les éosinophiles. En outre, de nombreux pathogènes dont les mycobactéries expriment des molécules qui influencent directement les voies d'activation des cellules immunitaires, soit négativement, soit positivement. Ainsi les lipoarabinomannanes (LAM) et les lipomannanes (LM), lipoglycanes majeurs de la paroi mycobactérienne, peuvent être considérés comme des « moduline » en raison de leur capacité à moduler le système immunitaire de l'hôte (cf II.4.4.2). En effet, ces composants, selon la souche mycobactérienne, présentent un éventail d'activités biologiques améliorant les défenses antimycobactériennes de l'hôte ou facilitant la survie mycobactérienne par inhibition de la réponse immune. Celles-ci incluent entre autres la régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, l'inhibition de l'activité microbicide des macrophages et la suppression de la prolifération des lymphocytes T.

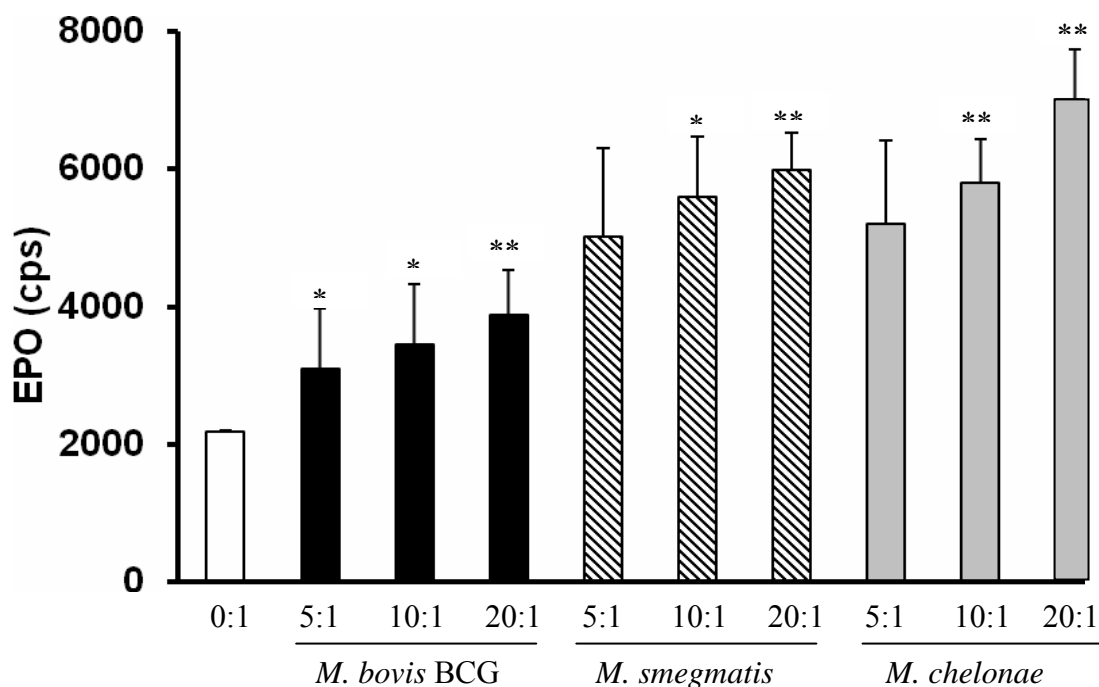
Nous avons étudié, dans un premier temps, 3 souches différentes de mycobactéries : *M. bovis* BCG (nous avons démontré précédemment une interaction BCG/éosinophiles), *M. smegmatis* et *M. chelonae*. Il nous semblait tout à fait justifié de comparer ces 3 souches mycobactériennes puisqu'elles représentent les 3 familles de LAM identifiées actuellement (ManLAM (BCG), PILAM (*M. smegmatis*) et AraLAM (*M. chelonae*)). Nous avons donc comparé les effets des différents LAM ainsi que de leur précurseur biosynthétique, le LM purifié à partir des 3 souches mycobactériennes sur l'activation des éosinophiles. Nos résultats montrent une libération différentielle d'EPO par les éosinophiles en réponse aux différentes espèces mycobactériennes. En effet, en comparaison avec les deux autres espèces mycobactériennes, le BCG active moins les éosinophiles. Cette faible activation des éosinophiles en réponse au BCG semble liée au ManLAM. De plus, par cytométrie en flux et par l'utilisation d'anticorps bloquants, nous avons montré que CR3 exprimé par les éosinophiles reconnaît le ManLAM purifié à partir du BCG. Dans un second temps, nous

avons testé les capacités modulatrices du ManLAM sur l'activation des éosinophiles médiée par TLR2 ou TCR $\gamma\delta$ .

Une spécificité de réponse des éosinophiles a pu être observée vis-à-vis des différentes espèces mycobactériennes ainsi que de leurs composants. Notre étude a également mis en évidence une activité inhibitrice du ManLAM, purifié du BCG, sur l'activation des éosinophiles médiée par CR3 et la PI3K.

**1. La libération d'EPO par les éosinophiles obtenue avec les espèces opportunistes est plus importante que celle obtenue avec *M. bovis* BCG**

Afin de déceler une éventuelle spécificité de réponse des éosinophiles en fonction des espèces mycobactériennes, nous avons choisi de comparer les réponses des éosinophiles induites par *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* et *M. chelonae*. Nous avons choisi la libération d'une protéine granulaire spécifique, l'EPO comme paramètre d'activation (**Figure 1**). Par une technique de chimioluminescence, nous montrons que les 3 espèces mycobactériennes étudiées induisent une libération d'EPO par les éosinophiles mais *M. smegmatis* et *M. chelonae* semblent aboutir à une meilleure réponse que *M. bovis* BCG.



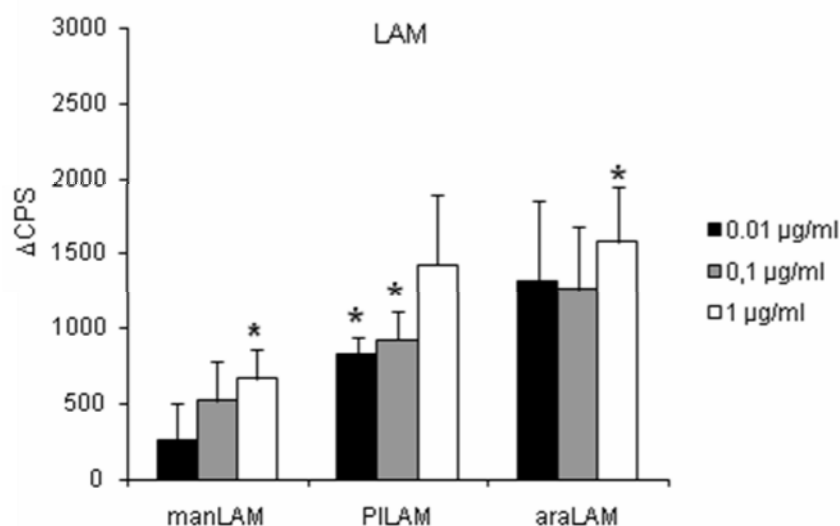
**Figure 1: EPO release by eosinophil activated by mycobacteria.** EPO release by eosinophils, activated by different mycobacteria : eosinophil ratios for 2 hours, was measured

by chemiluminescence in cell supernatants. Results are expressed as EPO cps (counts per second) values. Results are represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$ .

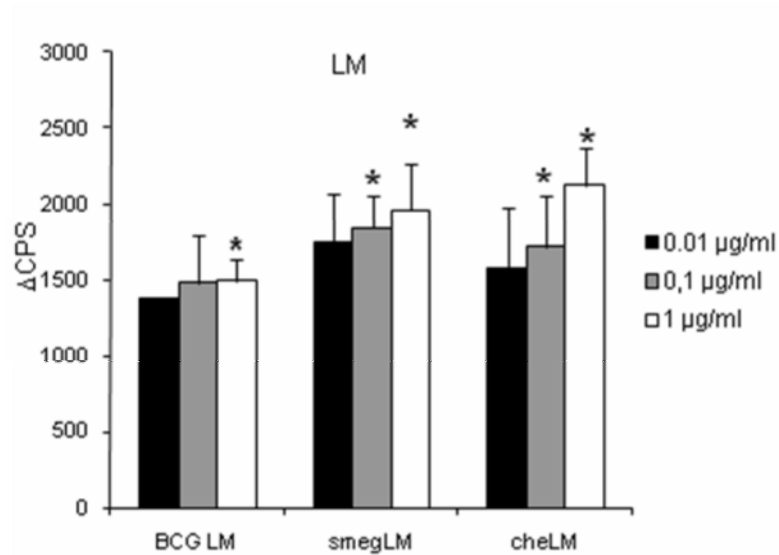
**2. Le ManLAM purifié de *M. bovis* BCG induit une libération d'EPO par les éosinophiles plus faible que celle observée pour le PILAM (*M. smegmatis*) et l'AraLAM (*M. chelonae*)**

Ayant obtenu une réponse quantitativement différente des éosinophiles suite à l'activation par 3 espèces de mycobactéries, nous avons comparé l'activité des LAM et LM purifiés à partir de ces 3 espèces (**Figure 2**). Le ManLAM purifié de *M. bovis* BCG induit une libération moindre d'EPO que le PILAM obtenu à partir de *M. smegmatis* et l'AraLAM de *M. chelonae* (2 fois moins d'EPO avec le ManLAM (1  $\mu\text{g/ml}$ ) qu'avec le PILAM ou l'AraLAM) (**Figure 2A**). Tous les LM provoquent une activation des éosinophiles et aucune différence n'est observée dans l'activité des LM provenant des différentes espèces mycobactériennes (**Figure 2B**). De plus, les LM sont significativement plus activateurs que les LAM, confirmant le rôle important du LM dans la réponse immune.

**A.**



**B.**

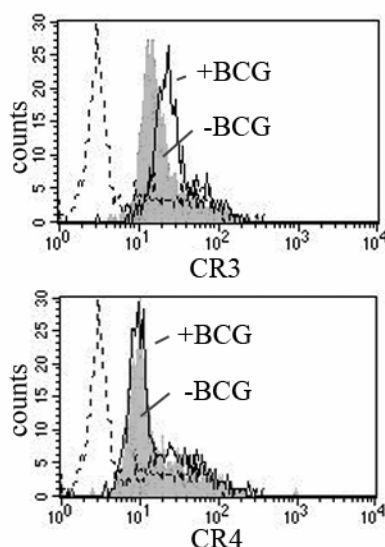


**Figure 2 : Heterogenous EPO release induced by LAM and LM from different mycobacteria.** Purified eosinophils were incubated with or without ManLAM and PILAM purified from *M. bovis* BCG and *M. smegmatis* respectively following (A) or with LM isolated from various mycobacterial species (B), for 2 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Results are expressed as  $\Delta$ EPO cps (counts per second) values (values from medium stimulation are subtracted from values obtained with each ratio). Results are represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$ . BCG LM, *M. bovis* BCG ; smegLM, *M. smegmatis* ; cheLM, *M. chelonae*.

### 3. Le BCG augmente l'expression du récepteur au complément 3 (CR3), mais pas de CR4, à la surface des éosinophiles

Le récepteur au complément (CR3) intervient dans la reconnaissance du ManLAM (Velasco-Velazquez, Barrera et al. 2003). Comme CR3, CR4 reconnaît *M. tuberculosis* non opsonisé (Zaffran et al. 1998). Afin de déterminer l'implication de ce récepteur dans la reconnaissance des mycobactéries par les éosinophiles, nous avons mesuré par cytométrie en flux l'expression de CR3 et CR4 sur les éosinophiles humains purifiés et mis en contact ou non avec les mycobactéries. Aucune modification de l'expression de ces récepteurs n'est observée avec *M. smegmatis* et *M. chelonae* (données non montrées). Par contre, le BCG induit une augmentation de CR3, mais pas CR4, à la surface des éosinophiles (**Figure 3**).

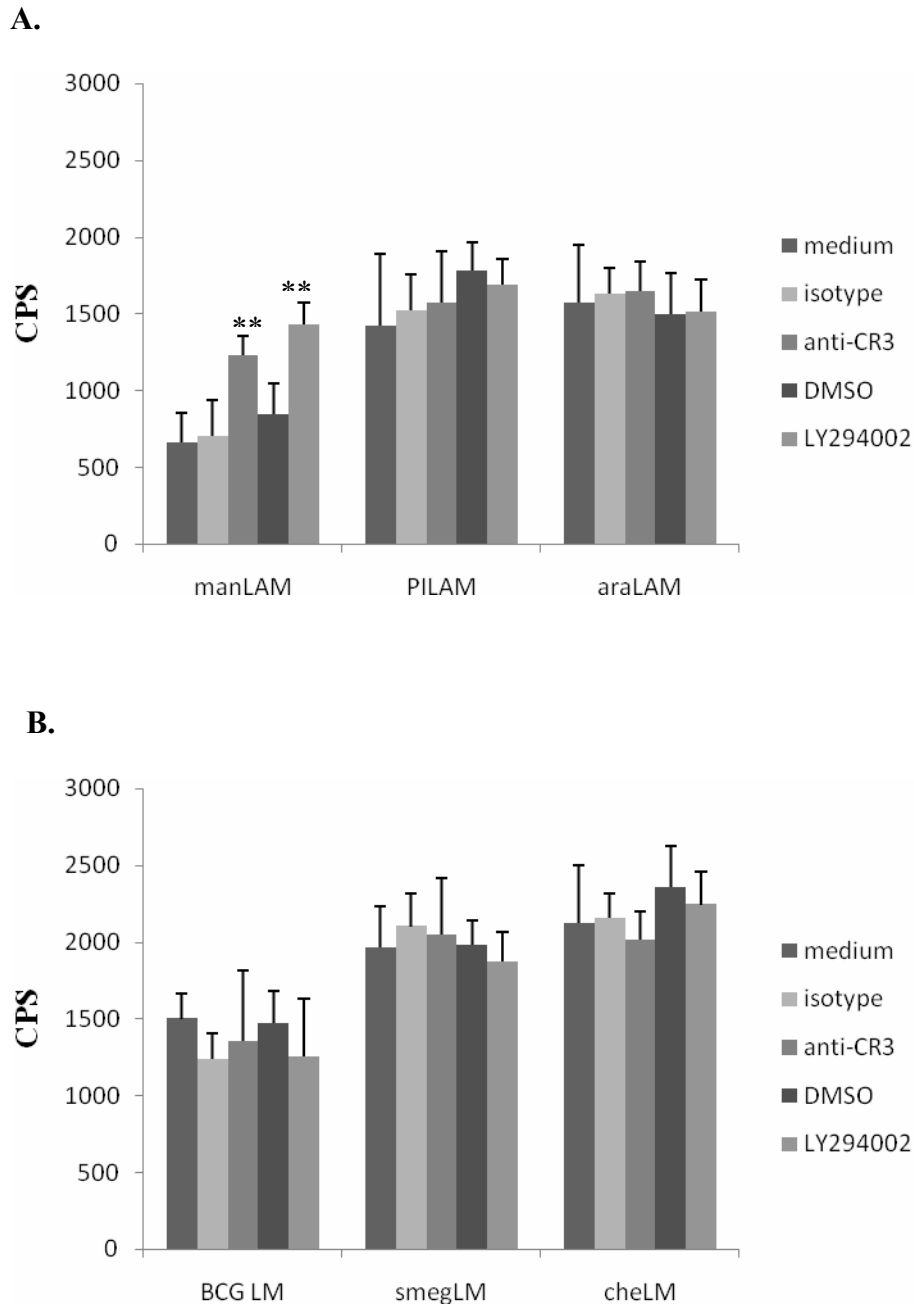




**Figure 3: CR3 and CR4 expression on human eosinophils.** Human peripheral blood eosinophils isolated from healthy volunteers were incubated with (black line) or without (grey histogram) BCG (10:1) for 2 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. CR3 and CR4 expression was determined by flow cytometry on the cells using anti-CR3 and anti-CR4 antibodies, compared to isotype control (pointed line).

#### 4. CR3 et PI3K interviennent dans la reconnaissance du ManLAM par les éosinophiles

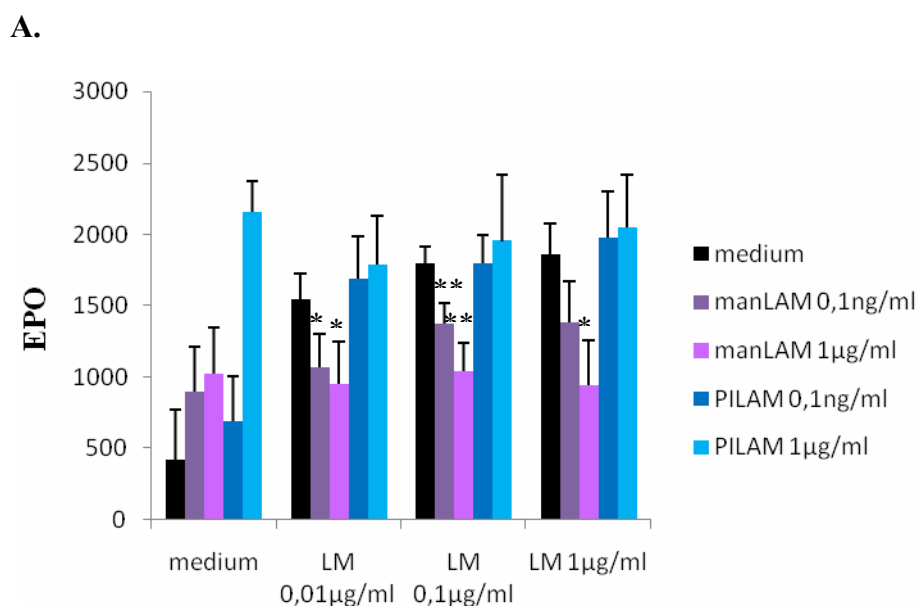
La PI3K joue un rôle important dans de nombreux processus dont l'internalisation médiés par CR3 dans des macrophages péritonéaux murins (Lutz MA 2003). Afin de confirmer que dans notre modèle le ManLAM était bien reconnu par CR3 exprimé sur les éosinophiles, nous avons utilisé un anticorps bloquant anti-CR3 et un inhibiteur de la PI3K, le LY294002 puis nous avons mesuré l'EPO libérée dans le surnageant d'éosinophiles activés ou non avec le ManLAM, le PILAM et l'AraLAM (**Figure 4 A**). De manière surprenante, l'addition d'un anticorps bloquant anti-CR3 ou de l'inhibiteur LY294002 augmente la libération d'EPO par les éosinophiles activés par le ManLAM uniquement. Aucun effet n'est observé pour les LM purifiés des différentes espèces (**Figure 4B**). Ces résultats suggèrent que le ManLAM régulerait négativement l'activation des éosinophiles par sa liaison au CR3 et l'activation de la voie de la PI3K.

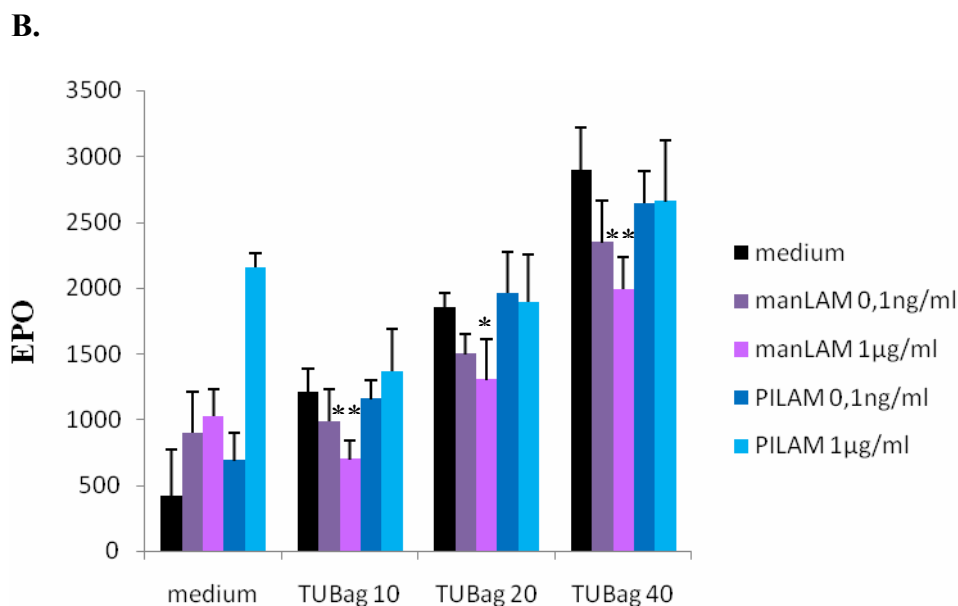


**Figure 4: Activation of eosinophils by ManLAM and CR3 and PI3K pathways.** Eosinophils were incubated with blocking anti-CR3 (15  $\mu\text{g/ml}$ ) or isotype control, LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ) or DMSO control (20  $\mu\text{M}$ ) following by stimulation with (A) LAM purified from *M. bovis* BCG (ManLAM), *M. smegmatis* (PILAM) and *M. chelonae* (AraLAM) and (B) LM (1  $\mu\text{g/ml}$ ) isolated from *M. bovis* BCG (BCG LM), *M. smegmatis* (smegLM) and *M. chelonae* (cheLM) for 2 hours. EPO was measured by chemiluminescence. Results are expressed as EPO cps (counts per second) values. Results are represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM. \*\*,  $p < 0.01$ .

## 5. Le ManLAM module l'activation des éosinophiles

Nous avons ensuite analysé l'activité immunomodulatrice du ManLAM sur l'activation des éosinophiles activés par le LM, ligand de TLR2 (cf. article 1) et par le TUBag1, ligand de TCR $\gamma\delta$  (cf article 2). En prenant comme paramètre d'activation la libération d'EPO, nous pouvons constater qu'une préincubation des éosinophiles avec le ManLAM inhibe leur activation induite par le LM (**Figure 5 A**) et TUBag1 (**Figure 5 B**) (31,2 % et 27,8 % d'inhibition respectivement). Le PILAM sert ici de contrôle négatif. De plus, une préincubation par le ManLAM n'a pas d'effet sur la libération d'EPO par des éosinophiles préalablement incubés avec un anticorps bloquant anti-CR3 puis activés par LM ou TUBag1 (résultats non montrés). Ces résultats montrent que le ManLAM interfère avec les voies d'activation de TLR2 et de TCR $\gamma\delta$  exprimés par les éosinophiles.





**Figure 5: Inhibitory effect of ManLAM on eosinophil activation mediated by TLR2 and  $\gamma\delta$ TCR.** (A) Purified eosinophils were incubated with ManLAM from *M. bovis* BCG or PILAM from *M. smegmatis* at different concentrations in combination with LM purified from *M. bovis* BCG (A) or with TUBag1 (B), TLR2 and  $\gamma\delta$ TCR ligands respectively. EPO released was measured in the supernatants after 2h by chemiluminescence. Results are  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  and are from three independent experiments.

Ces observations confirment que la reconnaissance du ManLAM par CR3 permet l'internalisation de *M. bovis* BCG et activerait la voie de la PI3K qui inhiberait l'activation des éosinophiles médiée par TLR2 ou le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ .

*Discussion et perspectives*

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre étude avait pour but de développer nos connaissances sur les propriétés des éosinophiles et d'améliorer la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la reconnaissance des mycobactéries.

Nos travaux montrent tout d'abord l'existence de TLR2, TCR $\gamma\delta$  et CR3 sur les éosinophiles ainsi que leur fonctionnalité puisque les éosinophiles peuvent répondre à différents ligands impliquant ces récepteurs (**points 1 et 2**). Nous avons pu mettre en évidence la libération de nombreux médiateurs par les éosinophiles en réponse au BCG, notamment les défensines, peptides antimicrobiens intervenant dans l'immunité innée (**point 3**). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les éosinophiles, principalement localisés au niveau des tissus, puissent interagir avec l'environnement en reconnaissant des signaux de danger et en régulant finement leur réponse dans le contexte d'immunité innée (**point 4**). Nous avons ainsi choisi de nous focaliser sur les mycobactéries comme modèle d'étude et nous avons montré une activation différentielle des éosinophiles selon l'espèce mycobactérienne. Ceci soulève alors la question du rôle des éosinophiles dans la tuberculose dont l'agent pathogène est *M. tuberculosis* (**point 5**). Au-delà du rôle bénéfique et/ou néfaste des éosinophiles dans les infections mycobactériennes, nous pouvons élargir ces observations à d'autres pathologies inflammatoires, notamment l'allergie et les infections par les Helminthes associant une éosinophilie mais aussi au cancer de la vessie et aux syndromes hyperéosinophiliques (**point 6**). Enfin, nous nous intéresserons aux limites de notre modèle (**point 7**).

### **Point 1 : Eosinophiles et lymphocytes T $\gamma\delta$ : même combat?**

#### *Différences et similitudes*

Nous avons pu mettre en évidence l'expression d'un complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  fonctionnel sur une sous-population d'éosinophiles. Cette découverte révolutionne le dogme du « TCR, récepteur spécifique de la lignée lymphoïde ». Jusqu'à maintenant, une seule étude a rapporté l'existence de la chaîne  $\alpha$  mais pas de la chaîne  $\beta$  du TCR $\alpha\beta$  sur une sous-population de neutrophiles (Puellmann *et al.* 2006). Des réarrangements de la chaîne  $\gamma$  ont été retrouvés chez des progéniteurs thymiques de cellules NK et l'expression intracellulaire du CD3 $\epsilon$  peut

être induite par l'activation du récepteur Notch chez des cellules NK (De Smedt *et al.* 2007; Veinotte *et al.* 2008).

Nos résultats présentés dans l'article 2 montrent que le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  exprimé par les éosinophiles semble similaire mais pas identique à celui des lymphocytes T $\gamma\delta$ . En effet plusieurs différences peuvent être mises en avant :

- 1) Le TCR  $\gamma\delta$  appartient à la superfamille des Immunoglobulines. Il est ancré dans la membrane par un court segment transmembranaire associé à la molécule CD3. CD3 $\epsilon$  intervient dans la formation du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  et est indispensable pour l'expression du complexe à la membrane puisque, comme pour le TCR $\alpha\beta$ , CD3 $\epsilon$  empêche la dégradation intracellulaire des chaînes du récepteur (Wileman *et al.* 1990). Dans le cas des éosinophiles, on observe une plus faible expression de CD3 $\epsilon$  en cytométrie en flux, co-immunoprécipitation et PCR en temps réel par comparaison avec les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Néanmoins, une corrélation hautement significative entre l'expression membranaire de CD3 et de TCR $\gamma\delta$  a été montrée chez un grand nombre de donneurs. Ceci laisse supposer que le complexe exprimé par les éosinophiles n'est pas identique à celui des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Cependant, comme le montre l'utilisation de ligands spécifiques au TCR, ce récepteur est fonctionnel sur les éosinophiles.
- 2) Les réarrangements des gènes du TCR retrouvés chez les éosinophiles sont différents des lymphocytes T  $\gamma\delta$  : seul un réarrangement V $\delta$ 2 a été mis en évidence dans les éosinophiles par immunoscope (1 ou 2 pics pour éosinophiles contre 8 pics pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ ). Le répertoire des éosinophiles serait donc beaucoup plus restreint que celui des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . La diversité du TCR, comme celle des immunoglobulines, est générée par la combinaison de différents segments V, J et C pour les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  ou V, D, J et C pour les chaînes  $\beta$  et  $\delta$  : il s'agit de la diversité combinatoire. Ainsi il existe chez l'homme plusieurs segments de gènes codant les chaînes des TCR  $\gamma\delta$  (Arden *et al.* 1995).

Néanmoins des similitudes existent entre éosinophiles et lymphocytes T  $\gamma\delta$  :

- 1) Malgré la forte hétérogénéité observée (**ARTICLE n°2**), en moyenne 10% des éosinophiles et des lymphocytes T purifiés à partir du sang périphérique exprime le TCR  $\gamma\delta$ . Il ne nous a pas été possible, pour des raisons techniques, de comparer pour chaque donneur l'expression du TCR  $\gamma\delta$  chez les éosinophiles et chez les lymphocytes T, ce qui aurait permis de mettre en évidence d'éventuelles similitudes dans le mécanisme de différenciation.
- 2) Les éosinophiles et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des cellules principalement tissulaires. Pour des raisons évidentes, nous n'avons pas pu évaluer l'expression du TCR  $\gamma\delta$  sur des éosinophiles tissulaires : ce qui est intéressant, c'est que comme les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les

éosinophiles sont présents dans la peau et dans l'intestin. Il serait très intéressant de savoir si les éosinophiles tissulaires expriment un TCR  $\gamma\delta$  comme les éosinophiles sanguins ou un TCR V $\delta$ 1 comme les lymphocytes tissulaires.

3) Comme les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les éosinophiles peuvent libérer des cytokines Th1, Th2 et des cytokines immunorégulatrices. Les deux types cellulaires possèdent un arsenal important de molécules cytotoxiques.

Plusieurs questions restent ouvertes :

- Comme pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , un contact cellulaire est-il nécessaire à une activation des éosinophiles médiée par le TCR ? Y a-t-il la formation d'une synapse immunologique ?
- Y a-t-il nécessité d'un co-signal ? Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment très rarement les co-récepteurs CD4 et CD8. Une autre particularité de ces cellules est la probable non nécessité d'un second signal tel qu'il a été décrit pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$ . En effet, CD28 n'est pas exprimé par toutes les cellules  $\gamma\delta$  qui sont activés *in vitro* en l'absence de B7, ligand de CD28. Or les éosinophiles expriment CD28, capable d'induire leur activation sans qu'un autre signal soit nécessaire (Woerly *et al.* 1999b) ainsi que NKG2D, dont la ligation augmente la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (Groh *et al.* 2001).

### ***Expression d'un « récepteur lymphoïde » par une cellule myéloïde***

Parmi les cellules myéloïdes et dans nos conditions expérimentales, l'expression du TCR $\gamma\delta$  semble spécifique aux éosinophiles puisque d'autres cellules myéloïdes comme les monocytes et les neutrophiles ne l'expriment pas. Une question se pose alors : comment les éosinophiles, cellules myéloïdes, peuvent-ils acquérir le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  ? Afin de répondre à cette question, plusieurs hypothèses peuvent être émises:

- **La maturation thymique** : des éosinophiles ont été identifiés grâce à leur morphologie particulière dans le thymus humain (cf. I.2). Les éosinophiles pourraient ainsi se différencier à partir d'un progéniteur lymphoïde et conserver l'expression de certains marqueurs de cette lignée, non seulement TCR  $\gamma\delta$  mais aussi CD4, CD25 ou CD28. Il serait intéressant à cet égard d'étudier la coexpression de ces marqueurs lymphocytaires sur les mêmes éosinophiles. Néanmoins, au cours de la différenciation, la lignée myéloïde apparaît avant la lignée lymphoïde, ce qui ne rend pas cette hypothèse la plus plausible.



- **La maturation extrathymique** : chez la souris, des éosinophiles matures sont présents dans le thymus et les précurseurs dans la moëlle osseuse. Si les mêmes observations se confirmaient chez l'homme, nous pourrions émettre l'hypothèse que les éosinophiles subissent une maturation extrathymique, dans les tissus tout comme les lymphocytes. Ainsi les lymphocytes T  $\gamma\delta$  intraépithéliaux mûrissent dans les tissus intestinaux (Iwasaki *et al.* 2006). Des taux sanguins augmentés de progéniteurs éosinophiles sont observés dans les biopsies bronchiques et nasales et dans les LBA d'individus allergiques (Dorman *et al.* 2004). Ces cellules progénitrices migrent de la moelle osseuse au tractus respiratoire supérieur en réponse à un allergène et représentent une nouvelle source d'effecteurs. L'hypothèse avancée par Judah Denburg est qu'une « hématopoïèse *in situ* » aurait lieu, chez des patients allergiques, grâce au microenvironnement tissulaire des voies respiratoires qui, par la libération de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, influencerait localement la différenciation des cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> (Denburg 1995).

- **Le transfert synaptique** : la distribution similaire au sein de l'organisme des LT  $\gamma\delta$  et des éosinophiles facilite leur proximité et leur permettrait d'interagir, par le biais de médiateurs solubles ou par une coopération cellulaire. Aucune étude à ce jour ne s'est consacrée à la coopération que pourrait entretenir ces deux populations. Néanmoins, lors d'un contact membranaire, un transfert de récepteurs est théoriquement possible. Nos résultats obtenus sur la mise en évidence d'une activité transcriptionnelle et recombinatoire des éosinophiles eux-mêmes (RAG-1, RAG-2, immunoscope), associés aux différences notées dans la composition du récepteur entre les 2 types cellulaires nous permet cependant d'exclure l'idée d'un transfert synaptique du TCR  $\gamma\delta$  de lymphocyte T  $\gamma\delta$  à l'éosinophile. A l'inverse, il serait intéressant d'étudier l'expression de gènes exprimés par les éosinophiles comme les gènes codant la MBP, l'EPO, l'ECP ou l'EDN dans les lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

## **Point 2 : Coopération entre les récepteurs exprimés par les éosinophiles**

A côté des immunorécepteurs, les éosinophiles expriment des PRRs, tels que les TLRs et l'intégrine CR3, dont l'expression par les éosinophiles a été mise en évidence au laboratoire (Fischer *et al.* 1986). Ces récepteurs leur permettent de reconnaître des signatures de pathogènes et de répondre en sécrétant des médiateurs cytotoxiques, ou en abaissant leur seuil d'activation.

Les TLRs jouent un rôle primordial dans la détection des pathogènes. Plusieurs mécanismes par lesquels les TLRs discriminent les microorganismes ont été proposés. Ainsi,

de plus en plus d'études suggèrent une interaction physique ou fonctionnelle entre les TLRs et plusieurs types de récepteurs (Mukhopadhyay *et al.* 2004).

### ***TLR et CD3/TCR $\gamma\delta$***

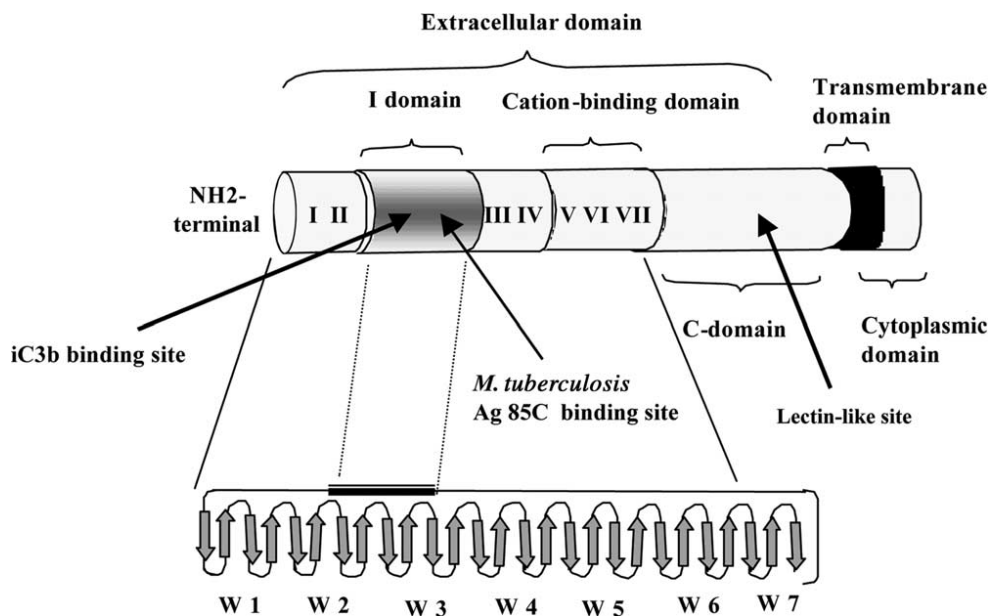
Plusieurs études ont rapporté la difficulté de mettre en évidence les TLRs sur les cellules T $\gamma\delta$ . Cependant, Roederer et ses collaborateurs ont montré l'expression de TLR2 sur des cellules T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 (nomenclature américaine pour les T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2) en marquant les cellules avec un anticorps anti-TLR2 non pas à 4°C mais à 37°C et seulement sur une petite partie des cellules (Roederer communication orale). TLR2, faiblement exprimé par les cellules T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2, est fonctionnel puisque le Pam<sub>3</sub>Cys augmente leur dégranulation induite par un anticorps anti-TCR $\gamma\delta$  (Deetz *et al.* 2006). Les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 stimulées par un anti-TCR $\gamma\delta$  et un ligand de TLR3, le poly (I:C) prolifèrent et libèrent de l'IFN- $\gamma$  (Wesch *et al.* 2006).

Dans la même optique, nous avons montré que TLR2 collabore avec CD3/TCR $\gamma\delta$  et participe à l'activation des éosinophiles en réponse au BCG. Pour la première fois, nous montrons une coopération entre TLR et TCR $\gamma\delta$  suite à une activation par des ligands physiologiques (LM et TUBag). Il est également intéressant de noter les différences observées dans la cinétique d'activation de ces deux récepteurs sur les éosinophiles. En effet, l'utilisation de ligands spécifiques montre que le TCR $\gamma\delta$  semble s'activer beaucoup plus rapidement que TLR2. L'association du TLR2 et TCR $\gamma\delta$  permet d'obtenir rapidement une meilleure réponse. De plus, seuls 10 à 15% des éosinophiles expriment le TCR $\gamma\delta$  tandis que 100% des éosinophiles expriment TLR2. Une question persiste : TCR et TLR s'activent-ils simultanément sur la même cellule et/ou de manière indirecte sur des cellules différentes. De même, est-ce que ce sont tous les éosinophiles qui s'activent en réponse au BCG ou seulement une proportion ?

### ***CR3 : récepteur inhibiteur***

CR3 est décrit sur les éosinophiles comme un récepteur activateur. En effet, les éosinophiles activés par du sérum relarguent de l'ECP de manière dépendante du CR3 (Egsten *et al.* 1998). De plus, CR3 et Fc $\gamma$ RIIa coopèrent pour induire la libération de PAF par les éosinophiles (van der Bruggen *et al.* 1994). Or, nos résultats montrent que l'activation de CR3 par le ManLAM interfère sur l'activation des éosinophiles par TLR2 et/ou CD3/TCR $\gamma\delta$ .

Dans notre modèle, CR3 se comporte donc en tant que récepteur inhibiteur. Ceci peut s'expliquer par le fait que toutes les études effectuées sur les éosinophiles ont été faites en conditions opsonisantes. Le récepteur CR3 est constitué de plusieurs domaines (**Figure 18**). Le domaine lectine-like, différent du domaine qui lie iC3b, intervient dans la liaison de molécules non opsonisées. La phagocytose médiée par le domaine reconnaissant iC3b correspond à l'internalisation de type II alors que celle médiée par le domaine lectine-like est la phagocytose de type I (Le Cabec *et al.* 2005).



**Figure 18: Structure du récepteur au complément CR3.** CR3 est un récepteur hétérodimérique de surface possédant de multiples sites de liaison et peut médier l'entrée de *M. tuberculosis* opsonisé par le complément ou non opsonisé dans les macrophages (Velasco-Velazquez *et al.* 2003).

Certains récepteurs comme 2B4, dont le ligand est CD48, peuvent être soit activateurs, soit inhibiteurs. Une nouvelle classe de récepteurs a été récemment découverte sur le polynucléaire éosinophile, celle des récepteurs inhibiteurs. Les éosinophiles expriment IRp60/CD300 $\alpha$ , p140, Siglec-8, Siglec-10, ILT5/LIR3, CD33, et p75/adhesion inhibitory receptor molecules (Munitz and Levi-Schaffer 2007). Ainsi, à l'instar des cellules NK, la résultante nette entre les signaux activateurs et inhibiteurs induits dans un éosinophile régulerait finement leurs réponses en ajustant leur seuil d'activation et déterminerait si celui-ci va s'activer ou non. Peut-être existe-t-il, comme les DC, des sous-populations d'éosinophiles tolérogènes et immunogènes.

Des études futures sont nécessaires afin de préciser la nature de ces interactions (physiques ou uniquement fonctionnelles) et d'étudier les interactions réciproques existant entre les voies de signalisation de TLR2, TCR $\gamma\delta$  et CR3. Ces interactions TLR2/TCR $\gamma\delta$ /CR3 peuvent augmenter ou inhiber les fonctions des partenaires mis en jeu au cours de la reconnaissance des mycobactéries. Au cours de l'inflammation, une diversité de réponses des éosinophiles pourrait être observée en fonction de la combinaison des récepteurs recrutés.

Ainsi, différents récepteurs de l'immunité innée sont exprimés par les éosinophiles. Les fonctions des éosinophiles seraient la résultante de signaux d'activation et de signaux inhibiteurs. Toutefois il ne faut pas oublier que les éosinophiles interagissent et coopèrent avec d'autres cellules immunitaires, possédant des fonctionnalités spécialisées, pour aboutir à une réponse immune spécifique du pathogène. Par conséquent, les collaborations entre différents récepteurs doivent être interprétées dans un contexte plus large de coopération cellulaire au cours des réponses immunitaires. En conclusion, les collaborations entre les récepteurs détermineraient la nature et le devenir de la réponse immune contre un pathogène particulier et confèreraient aux éosinophiles leur rôle immunorégulateur. L'expression d'une mosaïque de récepteurs de spécificité et de fonctions (activatrices et inhibitrices) différentes par une même cellule offre également de multiples possibilités de régulation de la fonction des éosinophiles au cours de pathologies inflammatoires.

### **Point 3 : Médiateurs libérés par les éosinophiles activés en réponse au BCG**

#### ***Les défensines : nouvel argument pour un rôle des éosinophiles dans l'immunité innée ?***

Les peptides antimicrobiens sont l'un des éléments clefs de la défense immunitaire innée. De nombreux peptides ayant une activité antimicrobienne, dont les défensines, ont été identifiés chez l'homme. Cette famille de peptides cationiques antimicrobiens comprend entre autres les  $\alpha$ -défensines. Les défensines sont apparues très tôt au cours de l'évolution et sont très conservées entre espèces très éloignées. Les défensines sont des peptides possédant des résidus cystéines (motif consensus), permettant la formation de trois ponts disulfure intramoléculaires. À ce jour, le mécanisme d'action exact n'a pas encore été clairement identifié. Toutefois, l'hypothèse actuellement admise est que les défensines se fixeraient sur la membrane des micro-organismes cibles sous forme de pores multimériques (Chen *et al.*

2006). L'activité antimicrobienne des alpha-défensines consiste donc, comme pour la plupart des peptides lytiques, à perméabiliser la bicouche lipidique.

Le sous-groupe comportant les défensines HNP-1 à HNP-4, découvert dans les années 1980 au sein des cellules myéloïdes est présent dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, les défensines HNP-1 à HNP-3 ont été retrouvées dans les lymphocytes B et les cellules NK (Agerberth *et al.* 2000). Nous avons montré pour la première fois l'expression constitutive et la libération d' $\alpha$ -défensines par les éosinophiles humains, qui participe directement à la mort mycobactérienne. Cette découverte ajoute encore de nouvelles potentialités à l'arsenal cytotoxique des éosinophiles. Cependant, l'activité bactéricide des défensines est inhibée en conditions physiologiques (concentration en sel, présence des composants du sérum) (Maisetta *et al.* 2008). Une activité bactéricide extracellulaire des défensines est ainsi peu envisageable. Il serait intéressant de déterminer si, comme les neutrophiles, les défensines des éosinophiles se trouvent dans les phagosomes contenant les mycobactéries mais aussi d'étudier directement les défensines dans les éosinophiles tissulaires. Concernant un autre sous-groupe, les  $\beta$ -défensines, nous n'avons pas pu montrer la présence de leurs ARNm, par RT-PCR, ou de leur expression, par cytométrie en flux. Nous ne pouvons pas exclure que l'expression des  $\beta$ -défensines pourrait être induite dans les éosinophiles, à l'instar d'autres types cellulaires (Mendez-Samperio *et al.* 2008).

Très peu d'études se sont intéressées à la synergie existant entre les différents médiateurs libérés par les éosinophiles. Seule une étude a montré un effet synergique entre l'ECP et les métabolites de l'oxygène au cours de la mort des schistosomules de *S. mansoni* (Yazdanbakhsh *et al.* 1987). De manière originale, nous montrons une synergie entre l'ECP et les  $\alpha$ -défensines. Ainsi, les propriétés de l'ECP et des défensines sont complémentaires : tout comme les défensines, l'ECP déstabilise les membranes mais l'ECP possède de plus une activité RNAsique importante. Les défensines pourraient alors potentialiser l'activité cytotoxique des protéines contenues dans les granules des éosinophiles au cours de certaines pathologies dans lesquelles les éosinophiles exerceraient un rôle bénéfique. Par exemple, les thérapies conventionnelles anti-cancéreuses utilisent très souvent des composés exogènes hautement immunogènes comme l'ECP (Jinno *et al.* 2002). Cependant, à côté de cette activité cytotoxique, les protéines de granules des éosinophiles présentent d'autres propriétés qui pourraient être amplifiées en combinaison avec les défensines ou d'autres médiateurs (cf. I.3.4.1.1).

Les peptides antimicrobiens n'éliminent pas seulement les bactéries mais constituent également un lien entre les cellules effectrices de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. En effet, les propriétés chimioattractantes des défensines ont été montrées envers des DC et des cellules T (Yang *et al.* 1999). Les défensines augmentent la production de différents médiateurs par les cellules immunitaires (Niyonsaba *et al.* 2007) et induisent la sécrétion d'histamine par les mastocytes (Befus *et al.* 1999). Ces observations suggèrent fortement que les défensines pourraient participer à la régulation de la réponse immune. Elles participent également à la résolution de l'inflammation en favorisant la prolifération des fibroblastes et des cellules épithéliales et induisent la néovasculogénèse (Murphy *et al.* 1993; Aarbiou *et al.* 2002; Chavakis *et al.* 2004). Enfin, Oppenheim et ses collaborateurs considèrent les défensines comme des alarmines puisque ces peptides sont libérés très rapidement en réponse à des signaux de danger afin d'alerter le système immunitaire.

### ***Libération de cytokines/chimiokines***

Les mécanismes qui conduisent à la production et à la libération différentielle des cytokines ne sont pas encore tous compris. Néanmoins une étude ultrastructurale récente décrit pour la première fois les mécanismes de dégranulation sélective de l'IL-4 préformée. On retrouve, associés aux granules ou aux vésicules sécrétoires, des récepteurs de cytokines, tels les récepteurs pour l'IL-4, l'IL-6, l'IL-13, ou encore CCR3. L'IL-4 stockée dans les granules secondaires est transportée, suite à une stimulation par l'éotaxine, liée à son récepteur vers les vésicules sécrétoires afin d'être sécrétée (Spencer *et al.* 2006). La première hypothèse basée sur l'existence de deux sous-populations distinctes d'éosinophiles produisant préférentiellement des cytokines de type 1 ou de type 2 est actuellement abandonnée. Les éosinophiles stockent à la fois des cytokines Th1 et Th2 et sont capables d'orienter la production des cytokines en fonction des signaux membranaires perçus.

Sachant que les éosinophiles font preuve d'une grande plasticité, nous avons examiné le profil de sécrétion de cytokines et de chimiokines par les éosinophiles. Suite à une activation par le BCG, les éosinophiles libèrent à la fois des cytokines Th1, Th2 mais aussi de nombreuses chimiokines. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence de libération d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-10 par les éosinophiles stimulés par du BCG. Le TNF- $\alpha$ , tout comme l'IFN- $\gamma$ , intervient dans l'activation du macrophage et stimule ses propriétés antimicrobiennes. Cette cytokine joue, en outre, un rôle actif dans la pathogénie tuberculeuse en participant à la formation de granulomes qui sont capables de contenir les mycobactéries, empêchant ainsi

leur dissémination dans l'organisme infecté (Algood *et al.* 2005). La sécrétion précoce d'IL-8 et d'autres chimiokines par les éosinophiles pourrait participer au recrutement de cellules inflammatoires au site de l'infection. Les éosinophiles semblent être recrutés précocement au cours de l'infection mycobactérienne. En effet, chez la souris, l'injection de *M. bovis* BCG dans la cavité pleurale induit une réaction inflammatoire biphasique 24 h et 15 jours après l'infection. Après 4 heures d'infection, une arrivée massive de neutrophiles est observée dans la cavité pleurale et atteint son maximum à 24 heures. Au même moment les éosinophiles et les cellules mononucléées sont aussi recrutés (Menezes-de-Lima-Junior *et al.* 1997).

#### **Point 4 : Réponse aux signaux de danger, l'éosinophile : une cellule de l'immunité innée**

Le concept de signal de danger est une notion relativement récente qui permet d'expliquer que le contexte dans lequel une molécule est reconnue par le système immunitaire détermine la nature de la réponse (tolérance ou inflammation) et que, ainsi, deux individus dont les seuils de perception du signal de danger seront différents pourront répondre de manière opposée au même contact. La perception et la transmission du signal de danger mettent en jeu des motifs moléculaires, d'origine exogène ou endogène, capables d'activer des récepteurs spécifiques. Par exemple, les *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) constituent des signaux de danger exogènes reconnus par différents PRRs et les alarmines et/ou endokines sont des signaux de dangers endogènes.

Les éosinophiles seraient particulièrement réceptifs aux signaux de l'environnement tissulaire par le biais notamment de leurs nombreux récepteurs. De plus, ces signaux leur permettraient de survivre et d'exercer leurs multiples fonctions. Les éosinophiles ont la capacité d'intégrer de façon très précoce des signaux de danger de l'environnement grâce à l'expression de récepteurs tels que les TLRs, récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent des structures particulières exogènes sur les microorganismes et des structures endogènes *damage-associated molecular patterns* (DAMP), suggérant la participation des éosinophiles à la réponse immunitaire innée. De plus, nous avons montré que les éosinophiles expriment un TCR $\gamma\delta$  fonctionnel impliqué dans leur activation face à deux types de ligands, pathogènes ou endogènes (soi modifié) respectivement exprimés par les mycobactéries et les cellules tumorales.

## **Point 5 : Eosinophiles et infections mycobactériennes**

### ***Rôle potentiel des éosinophiles dans la tuberculose***

Nos résultats suggèrent donc que les éosinophiles peuvent s'activer en réponse aux mycobactéries et qu'ils sont armés pour avoir un rôle dans la mise en place du granulome tuberculeux et un rôle cytotoxique. Dans ce contexte, nous pourrions étudier l'activation des éosinophiles en réponse à l'agent de la tuberculose, *M. tuberculosis*.

Il serait ainsi intéressant d'utiliser des modèles animaux d'infection afin de valider le rôle des éosinophiles au cours de la réponse antituberculeuse *in vivo*. Le modèle murin diffère de la situation humaine sur plusieurs points. D'une part, les éosinophiles de souris possèdent moins de granules que ceux du rat et de l'homme et d'autre part, les récepteurs de forte affinité pour l'IgE sont absents chez les éosinophiles murins contrairement aux éosinophiles humains. Une étude sur les récepteurs aux IgA sur les éosinophiles a récemment montré que leur distribution était différente chez l'homme, la souris et le rat (Decot *et al.* 2005). Un modèle alternatif consisterait en des souris humanisées par transferts d'éosinophiles humains à des souris SCID, modèle que nous avons commencé à utiliser.

L'infection de cobayes par *M. tuberculosis* présente de nombreux avantages : non seulement la pathologie de la tuberculose y est similaire à celle de l'homme mais aussi la distribution des éosinophiles. De plus, la MBP a été identifiée dans les éosinophiles de cobaye avant celle des éosinophiles humains. Le cobaye constituerait donc un modèle de choix pour étudier l'implication des éosinophiles dans la tuberculose (Turner *et al.* 2003). Différents paramètres pourraient être étudiés : bactériologiques (charge bactérienne), immunologiques (phénotype et localisation des éosinophiles, sécrétion de cytokines et chimiokines) et pathologiques (taille et composition des granulomes pulmonaires). Les résultats pourraient révéler un rôle protecteur ou néfaste des éosinophiles dans la sévérité des infections à mycobactéries.

### ***Recrutement au niveau du granulome***

Le rôle des éosinophiles dans le cadre des infections naturelles chez des patients atteints de tuberculose, à différents stades de la maladie reste à déterminer. En effet, le(s) stade(s), précoce ou tardif, au cours du/desquel(s) les éosinophiles interviennent au cours de la réponse immune anti-mycobactérienne restent à identifier. Très peu d'études ont rapporté la présence



des éosinophiles dans les granulomes de patients infectés par des mycobactéries (cf. I.5.4.4.2). Chez la souris les éosinophiles sont recrutés précocement, c'est-à-dire dans les 24 heures suivant l'infection (cf. point 3). Chez le porc infecté par *M. avium*, des études histopathologiques ont montré une grande diversité de stades granulomateux, allant de réactions exudatives jusqu'à des réactions fibrotiques (Hibiya *et al.* 2008). Les éosinophiles ont été particulièrement observés dans les réactions exudatives (Ordway *et al.* 2007). Au vue de ces résultats, nous suspectons que les éosinophiles soient présents aux stades précoces de l'infection mycobactérienne.

Au-delà du rôle possible des éosinophiles dans la pathogenèse au cours d'infections, il apparaît maintenant important d'étudier les éosinophiles comme régulateurs de la réponse développée contre les mycobactéries.

### ***Rôle régulateur des éosinophiles***

Outre leur fonction cytotoxique, les éosinophiles sécrètent de nombreuses cytokines. Ils s'intègrent dans la réponse immunitaire principalement en tant qu'effecteurs mais aussi comme régulateurs.

Des médiateurs tels l'EPO, l'ECP (Article n°1) et l'EDN (données non présentées), libérés par les éosinophiles activés par le BCG, participent aussi aux propriétés immunorégulatrices des éosinophiles.

L'ECP inhibe la prolifération des lymphocytes T et la synthèse d'immunoglobulines par les cellules B, induit la dégranulation des mastocytes et stimule la sécrétion de mucus et la production de glycosamines par les fibroblastes (Venge *et al.* 1999). Une autre fonction a été associée à l'activité RNAsique de l'ECP : celle de la clairance des débris tissulaires consécutifs au renouvellement tissulaire physiologique ou à une nécrose inflammatoire grâce à la dégradation des ARN libérés (Lee *et al.* 2005). Ce mécanisme prévient le développement d'une réponse immune excessive.

L'EPO catalyse les réactions d'oxydation de chlorures, bromures, d'iodures, de nitrite et de thiocyanate pour former des espèces réactives de l'oxygène et des métabolites réactifs de l'azote (Wang *et al.* 2006). Ces molécules favorisent le stress oxydatif et donc la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Wu *et al.* 1999). L'EPO peut également modifier l'activité transcriptionnelle de cellules épithéliales et participer ainsi au remodelage tissulaire (Pegorier *et al.* 2006).

L'EDN est chimiotactique pour les cellules dendritiques (Yang *et al.* 2003) et stimule la production des cytokines et favorise leur maturation (Yang *et al.* 2004). L'EDN serait un ligand endogène de TLR2 rapidement libéré par les éosinophiles et peut être considéré comme une alarmine (cf. I.3.4.1.1).

Nous avons démontré que les éosinophiles libèrent divers médiateurs en réponse au BCG. De plus, nous avons démontré que l'activation des éosinophiles par le BCG est principalement médiée par TLR2 et TCR $\gamma\delta$ . Ainsi, de façon indirecte, nous suggérons que TLR2 et TCR $\gamma\delta$  participent au rôle régulateur des éosinophiles. Ces observations doivent être confirmées notamment en précisant la participation de chacun des récepteurs dans la libération des différents médiateurs.

### ***Les éosinophiles : un lien entre immunité innée et adaptative ?***

Les éosinophiles sont des cellules cytotoxiques qui participent à l'immunité cellulaire mais aussi des cellules qui sécrètent de nombreuses cytokines effectrices et régulatrices. Par la libération de divers médiateurs, les éosinophiles pourraient alors contribuer à initier ou entretenir une réponse inflammatoire. Au cours d'une réponse inflammatoire, les éosinophiles pourraient être des effecteurs additionnels et complémentaires aux lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Cette hypothèse leur conférerait, à l'instar des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , un rôle dans la détection d'un danger et dans le dialogue entre le système immunitaire et les autres cellules selon la théorie de Polly Matzinger (Matzinger 1994). Ces particularités placent les éosinophiles à la frontière des immunités innée et acquise. D'autres cellules, comme les NKT exprimant des TCR canoniques partagent cette situation. Ces types cellulaires particuliers nous aident à comprendre le fonctionnement du système immunitaire dans son ensemble. Ils nous montrent combien les deux systèmes immunitaires, inné et adaptatif, sont intimement intégrés.

Selon certains auteurs, les éosinophiles sont capables, comme les DC, de remplir les fonctions de cellule présentatrice d'antigènes (CPA) dans un modèle murin d'allergie (Shi 2004). Les éosinophiles migrent vers les ganglions locaux et se localisent principalement dans les zones paracorticales riches en cellules T où les éosinophiles vont stimuler la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> (Duez *et al.* 2004). Les éosinophiles ont également la capacité d'exprimer CD80, CD86 et CMHII (cf introduction). Des données contradictoires concernent la capacité des éosinophiles à stimuler des cellules T naïves. Les éosinophiles de la cavité

péritonéale de souris transgéniques pour l'IL-5 et incubés *in vitro* en présence d'ovalbumine (OVA) activent les cellules Th2 chez des souris naïves participant ainsi à la réponse allergique (MacKenzie *et al.* 2001). Au contraire, les éosinophiles purifiés de LBA de souris sensibilisées à l'OVA sont incapables d'induire la prolifération de cellules T (van Rijt *et al.* 2003). Ces résultats suggèrent que les capacités des éosinophiles à présenter les antigènes varient probablement en fonction de l'état d'activation et de maturation des éosinophiles. Compte tenu des différences déjà mentionnées entre éosinophiles humains et murins, il est de plus difficile de tirer des conclusions quant à la relevance de ces observations pour la physiopathologie, par exemple dans un contexte allergique ou parasitaire. Un rôle de CPA pour certains lymphocytes T  $\gamma\delta$  a été évoqué, dépendant de leur état d'activation (Casetti *et al.* 2008).

## **Point 6 : Implication et modulation des éosinophiles dans d'autres pathologies inflammatoires**

### ***SHE***

#### Hétérogénéité phénotypique

Les éosinophiles provenant de patients éosinophiliques (**ARTICLE n°1**) et allergiques (données non présentées) expriment, sans stimulus additionnel *in vitro*, davantage de TLRs que les éosinophiles de donneurs sains. Des résultats obtenus avec des éosinophiles différenciés à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon montrent une diminution de l'expression de TLR2 et TLR4 après 4 semaines de différenciation (données non publiées). Ces observations suggèrent que les éosinophiles provenant des patients éosinophiliques et allergiques seraient plus immatures que ceux des donneurs sains. En effet, chez l'homme, une stimulation allergénique ou un contexte atopique induirait non seulement une production médullaire accrue d'éosinophiles mais aussi une augmentation du nombre de progéniteurs CD34<sup>+</sup> circulants (Sehmi *et al.* 1996; Sehmi *et al.* 1997). Cette hypothèse reste toutefois à démontrer. Ainsi l'expression des TLRs dépendrait de l'état de maturation des éosinophiles.

Dans l'article n°2, nous montrons une forte hétérogénéité dans l'expression du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ . Cependant, aucune corrélation entre l'expression de ce récepteur et l'éosinophilie sanguine ou la pathologie n'a été démontrée. Pour un statut donné, par exemple

les donneurs sains, une hétérogénéité de l'expression de CD3/TCR $\gamma\delta$  est également présente. Des observations similaires ont été décrites pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ . En effet, la proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$  dans le sang périphérique varie chez les donneurs sains (données non présentées). Cependant, aucune explication n'a été trouvée. Nous pouvons aisément imaginer que les éosinophiles et les lymphocytes TCR $\gamma\delta^+$  possèdent des mécanismes de différenciation similaires. Ainsi nous ignorons s'il existe une corrélation entre la proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$  et d'éosinophiles TCR $\gamma\delta^+$  chez un même individu.

### Hétérogénéité fonctionnelle

Nos résultats préliminaires montrent que parmi les patients SHE certains expriment TLR2 et 4 (groupe 1) et d'autres non (groupe 2). Contrairement aux donneurs sains, le BCG n'induit pas l'expression de TLRs sur les éosinophiles provenant du groupe n°2. La recirculation des éosinophiles tissulaires, pré-activés par l'environnement cytokinique, qui retourneraient dans la circulation sanguine est une hypothèse intéressante, qui expliquerait la grande hétérogénéité des éosinophiles chez les sujets présentant de fortes hyperéosinophilies (co-existence d'éosinophiles de maturités différentes au niveau du sang) mais aussi celle rencontrée dans d'autres pathologies. De plus, ces éosinophiles de patients SHE dépourvus en TLRs, mais exprimant TCR $\gamma\delta$ , se révèlent incapables de synthétiser des ROS ou de libérer de l'EPO (résultats non montrés). Ces derniers résultats confirment la coopération nécessaire entre TLR et TCR dans la réponse des éosinophiles au BCG. L'activation des éosinophiles peut être influencée par l'hétérogénéité phénotypique mais aussi par un priming *in vivo*.

Une hétérogénéité quant à la réponse des éosinophiles à une activation est aussi observée selon le statut du donneur (**ANNEXE n°1**). En effet, en réponse au BCG, les éosinophiles purifiés à partir du sang de donneurs allergiques libèrent davantage de ROS que les éosinophiles de donneurs sains. Pour rappel, aucune différence dans l'intensité de réponse n'avait été observée entre les éosinophiles de donneurs sains et de patients éosinophiliques non allergiques en présence de BCG (**ARTICLE n°1**). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées afin d'expliquer la réactivité exacerbée des éosinophiles de donneurs allergiques. Il est possible que le contexte inflammatoire allergique sensibilise *in vivo* les éosinophiles, les rendant plus à même d'être activés vis-à-vis des mycobactéries. Nous avons testé l'effet modulateur de plusieurs cytokines et nous n'avons pas remarqué d'effet significatif. Néanmoins, une préstimulation des éosinophiles avec du GM-CSF potentialise l'activation des éosinophiles de donneurs sains en réponse au BCG. Nous pouvons également envisager

que les éosinophiles de donneurs allergiques expriment à leur surface un récepteur particulier ou présente une expression augmentée de certaines molécules. En effet, l'expression de TLR2 et 4 sur les éosinophiles de donneurs allergiques est supérieure à celle des éosinophiles de donneurs sains (données non présentées). Différentes études ont montré l'implication importante du stress oxydatif dans la pathologie de l'asthme (Kirkham *et al.* 2006). Nous pouvons aussi incriminer un meilleur métabolisme oxydatif chez les donneurs allergiques que chez les donneurs ayant pour conséquence une meilleure synthèse de ROS par les éosinophiles de donneurs allergiques.

En résumé, afin d'améliorer la connaissance de la physiopathologie des éosinophiles, TCR $\gamma\delta$  et TLR pourraient être utilisés comme de nouveaux marqueurs des éosinophiles pour des études cliniques et fondamentales comparant différents statuts de donneurs. Ceci pourrait aboutir à l'identification d'une signature fonctionnelle ou moléculaire des éosinophiles associée à une pathologie ou à un statut, dans une optique d'avancée diagnostique et potentiellement thérapeutique.

### ***Cancer de la vessie***

L'instillation intravésicale de *Mycobacterium bovis* BCG est aujourd'hui reconnue comme traitement de référence de certaines tumeurs non infiltrantes de la vessie (Brandau *et al.* 2007; Loughlin 2008). Cependant, les mécanismes effecteurs de cet effet anti-tumoral restent méconnus. Nos résultats montrent que les éosinophiles peuvent être cytotoxiques vis-à-vis d'une lignée dérivée d'un carcinome colo-rectal, les Colo-205 (ANNEXE n°3), et qu'ils peuvent être activés par le BCG (ARTICLE n°1). Ces observations suggèreraient un rôle potentiel des éosinophiles dans l'effet anti-tumoral du BCG au cours du cancer de la vessie. Le LM pourrait-il constituer un adjuvant dans certaines pathologies où les éosinophiles seraient présents en nombre élevé et joueraient un rôle bénéfique, comme dans le cas de certains cancers ? Un adjuvant désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément. En outre, le muramyl dipeptide (MDP) est le plus petit composant de la paroi des mycobactéries comportant des propriétés adjuvantes. Le TDM est un autre composant de paroi de mycobactéries efficace comme adjuvant et relativement peu toxique. De ce fait, des préparations adjuvantes basées sur des composants mycobactériens pourraient s'avérer bénéfique pour le traitement de nombreuses tumeurs et maladies infectieuses.

## **Allergies**

Le BCG, comme les infections à mycobactéries, semble rééquilibrer la balance Th1/Th2 du sujet allergique. Une réaction à l'encontre de mycobactéries influence la balance Th1/Th2 vers Th1. L'inhibition de la réponse allergique et de l'hyperréactivité bronchique après vaccination par mycobactéries a été montrée chez l'animal (Rook *et al.* 2007). Dans la théorie hygiéniste de l'atopie, consiste à dire que l'absence de contacts bactériens, viraux, au cours de la petite enfance, ne permettrait pas de rééquilibrer les réponses immunes naturellement biaisées Th2 à la naissance (Schroder *et al.* 2007). Ainsi, les enfants élevés en présence d'animaux domestiques et dans un environnement plus riche en microorganismes ont plus de chance de développer des réponses Th1 associées à l'immunité cellulaire et donc de moins souffrir d'allergie. Bien que les bases moléculaires de cette protection par les infections demeurent inconnues, elles pourraient, du moins en partie, impliquer les TLRs qui, en fixant les produits bactériens, induiraient la libération de certaines cytokines « immunorégulatrices ». Nous avons testé le BCG comme immunomodulateur de l'activation des éosinophiles. La libération d'IL-4 par les éosinophiles activés par des complexes immuns IgA/anti-IgA est inhibée par une préincubation avec le BCG (ANNEXE n°1). Ainsi, le rôle immunomodulateur du BCG et de ses composants sur les éosinophiles au cours des réactions allergiques reste cependant à démontrer.

Nous avons identifié le ManLAM comme composant immunomodulateur négatif des éosinophiles. Un effet protecteur du ManLAM serait susceptible d'être observé à l'encontre de la maladie allergique.

## **Maladie de Crohn**

L'origine de la maladie de Crohn reste encore mal déterminée. Mais depuis quelques années, une bactérie *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) est mise en cause (Behr *et al.* 2008). Cette hypothèse n'a été ni véritablement prouvée ni réfutée. *Mycobacterium avium* serait présente chez les personnes atteintes de la maladie de Crohn ainsi que chez certains patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) alors qu'elle n'existe pas chez les personnes saines. Des éosinophiles ont été identifiés dans les tissus de patients atteints de la maladie de Crohn et de RCH mais leur contribution à ces maladies inflammatoires reste méconnue (Coppi *et al.* 2007). C'est néanmoins au cours d'études sur la

maladie coeliaque et la maladie de Crohn qu'il a été démontré pour la première fois au laboratoire que les éosinophiles exprimaient de l'IL-5, leur propre facteur de croissance (Desreumaux *et al.* 1992). Des différences morphologiques et fonctionnelles sont également observées selon que les éosinophiles proviennent de patients ayant la maladie de Crohn ou une RCH.

Il existe une interaction permanente entre la flore microbienne intestinale et le système immunitaire de la muqueuse. Selon certains, la maladie de Crohn résulterait d'un défaut de la réponse immunitaire innée médiée par les PRRs et donc de la reconnaissance des bactéries (Nuding *et al.* 2007). Par ailleurs, dans cette maladie, on observe un déficit de l'activité antimicrobienne liée à une diminution de sécrétion des défensines de mécanisme inconnu et dont le rôle antimicrobien est bien connu. Un défaut d'expression d' $\alpha$ -défensines 5 et 6 par les cellules de Paneth serait associé à une prédisposition pour la maladie de Crohn (Wehkamp *et al.* 2005). L'interaction des éosinophiles avec les mycobactéries ainsi que l'expression de défensines par ces cellules pourraient être un début d'explication quant aux mécanismes impliqués au cours de ces maladies inflammatoires du système digestif.

### ***Schistosomiase et vaccination par le BCG***

L'efficacité de la vaccination par le BCG varie de manière importante en fonction des populations étudiées. Plusieurs explications peuvent être avancées : la variation des souches de BCG utilisées, le patrimoine génétique des individus, la variation de la souche infectieuse de *M. tuberculosis*, l'exposition aux mycobactéries environnementales. Cependant, la principale explication est liée à la présence d'infections chroniques. Ainsi, le vaccin BCG se révèle être peu efficace dans les pays en voie de développement, dans les zones d'endémie parasitaire, notamment par les helminthes comme *Schistosoma mansoni*. Des modèles animaux infectés par *S. mansoni* ont montré la diminution d'une protection efficace par le vaccin BCG contre *M. tuberculosis* (Elias *et al.* 2005). Ces données confirment les études qui ont été faites sur des adultes atteints de schistosomiase et montrant une diminution des réactions immunes en réponse à la vaccination par le BCG (el-Kalouby *et al.* 1979). De même, la sensibilisation *in utero* par *S. mansoni* exerce un impact négatif sur une vaccination BCG (Malhotra *et al.* 1999). Ces travaux indiquent que les réponses immunitaires spécifiques des helminthes acquises durant la gestation persistent durant l'enfance et que cette sensibilisation prénatale entraîne un biais dans la réponse immune vis-à-vis du BCG, traduit par une faible production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T. Lors de l'infection par *S. mansoni*, les

oeufs pondus par les vers provoquent une forte réponse Th2 responsable de la réaction granulomateuse se développant autour des oeufs. L'infection parasitaire entraîne une éosinophilie tissulaire, au niveau du granulome, et sanguine très importante (Mahmoud 1982). Nous avons montré que les éosinophiles sont cytotoxiques pour *M. bovis* BCG (Article n°1). Ceci pourrait donc constituer une nouvelle piste pour investiguer le rôle des éosinophiles dans l'inefficacité de la vaccination par le BCG dans les zones d'endémie parasitaire.

### **Point 7 : Limites de notre modèle *in vitro***

L'étude de l'éosinophile et des mécanismes qui contribuent à son activation dans des situations physiologiques ou physiopathologiques a longtemps été limitée par les difficultés rencontrées pour isoler et caractériser ces cellules. De plus, le faible pourcentage d'éosinophiles dans le sang de sujets sains rend difficile la purification d'éosinophiles.

La caractérisation *in vitro* des propriétés de l'éosinophile activé est essentielle à la compréhension du rôle joué par ces cellules. Les méthodologies actuelles choisies pour caractériser l'éosinophile activé doivent permettre de révéler les modifications morphologiques, métaboliques, phénotypiques et/ou fonctionnelles induites par l'environnement dans lequel se trouvait la cellule *in vivo* avant son isolement. Certes les expériences *in vitro* offrent l'avantage de travailler directement sur des cellules humaines mais possèdent aussi leurs limites. Les méthodes de lyse osmotique ainsi que celles de purification de ces cellules s'avèrent importantes car elles peuvent entraîner des modifications en induisant par exemple un stress cellulaire et un niveau basal d'activation des éosinophiles purifiés. Un autre biais peut apparaître. En effet, l'utilisation de la méthode de purification par sélection négative des éosinophiles CD16<sup>-</sup> conduit à l'élimination des éosinophiles CD16<sup>+</sup> qui pourraient, au moins dans la maladie allergique, représenter une sous-population fonctionnellement importante (Davoine *et al.* 2002). Enfin, les études réalisées sur les éosinophiles purifiés du sang périphérique ne prennent malheureusement pas en compte ni l'influence du microenvironnement tissulaire sur le phénotype membranaire et les capacités activatrices du polynucléaire ni le fait que les éosinophiles tissulaires ne représentent que 0,5% du nombre total d'éosinophiles. Il faut toujours garder à l'esprit qu'*in vivo*, les seuils de réponse sont conditionnés par l'état de différenciation cellulaire et par le microenvironnement dans lequel se déroule la réponse.



L'approche *in situ* et le développement de nouvelles techniques, telles la microdissection au laser, devraient permettre de mieux appréhender le rôle des éosinophiles tissulaires en tant que cellule effectrice et régulatrice de l'immunité. Ainsi, la confrontation des diverses techniques employées pour caractériser les éosinophiles devrait permettre d'explorer plus facilement les fonctions biologiques liées à l'activation des éosinophiles, et de mieux comprendre les bases physiologiques de l'hétérogénéité de ces cellules.

## CONCLUSION

Nos travaux ont permis pour la première fois de mettre en évidence une interaction directe entre les éosinophiles et les mycobactéries. Nous avons montré l'expression et la fonctionnalité du complexe CD3/TCR $\gamma\delta$ , récepteur lymphoïde, à la surface des éosinophiles. Nos travaux décrivent, par ailleurs, un dialogue original entre TLR2, CD3/TCR $\gamma\delta$  et CR3 au cours de l'activation des éosinophiles par *M. bovis* BCG. Les mécanismes consécutifs à l'activation simultanée de ces récepteurs (synergie ou interférence suivant la voie de signalisation analysée) semblent complexes et nécessitent de plus amples recherches. Nos résultats suggèrent également la présence d'une nouvelle activité cytotoxique des éosinophiles médiée par les défensines en synergie avec l'ECP contre les mycobactéries. Ces résultats permettent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires intervenant dans la physiopathologie des infections à mycobactéries. Les éosinophiles peuvent également se révéler néfastes pour l'organisme, car une activation excessive, prolongée ou encore dans un lieu inapproprié peut conduire à des lésions tissulaires sévères impliquées dans la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques. Ceci souligne la nécessité d'une régulation fine et précise de leur activation grâce à la présence de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Ainsi, le LM et le LAM semblent être de bons candidats pour moduler la réponse éosinophilique.

Des réponses différentielles des éosinophiles ont été obtenues vis-à-vis de diverses espèces mycobactériennes. Ces observations résulteraient de la composition moléculaire de l'enveloppe spécifique à chaque mycobactérie mettant en jeu une combinaison de récepteurs exprimés par les éosinophiles. Une étude a montré une expression différentielle des phosphoantigènes selon les espèces mycobactériennes. Ainsi, le BCG produit 50 à 100 fois moins de TUBag que *M. tuberculosis* alors que les mycobactéries opportunistes comme *M. chelonae* et *M. smegmatis* en produisent 10 fois moins que *M. tuberculosis*. De même, la composition en LAM et LM dépend également de l'espèce mycobactérienne. Il serait donc intéressant d'élargir ces investigations à d'autres infections mycobactériennes, notamment par le pathogène *M. tuberculosis*, afin de déterminer (1) si cette capacité à activer les éosinophiles est une caractéristique commune aux mycobactéries, pathogènes et opportunistes ; et (2) le rôle bénéfique et/ou néfaste des éosinophiles dans le développement de la tuberculose. La démonstration que les éosinophiles expriment des récepteurs de membrane répondant à certains ligands mycobactériens, associés à la libération de médiateurs spécifiques, cytokines

et chimiokines ouvrent de nouvelles perspectives quant à leur fonction dans l'immunité innée, notamment dans l'initiation d'une réponse Th1. Des futures expériences semblent nécessaires afin de démontrer la capacité de présentation des antigènes mycobactériens par les éosinophiles et de préciser ainsi la fonction des éosinophiles dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative au cours d'une infection mycobactérienne.

L'éosinophile a longtemps été considéré comme une cellule énigmatique d'importance secondaire. Les découvertes, ces 10 dernières années, de ses propriétés fonctionnelles et de ses multiples récepteurs de membrane ont permis de préciser sa place dans la réponse immunitaire et l'inflammation. Notre étude apporte des arguments supplémentaires favorables à l'hypothèse que les éosinophiles soient des effecteurs de l'immunité innée. Nos résultats suggèrent que les éosinophiles, du fait de leur position stratégique au sein des tissus, puissent reconnaître directement des signaux de danger exogènes et endogènes, incluant les mycobactéries et les cellules tumorales, et, comme les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , être un lien entre immunité innée et adaptative. L'analyse d'éosinophiles tissulaires permettrait de mieux caractériser l'hétérogénéité fonctionnelle et phénotypique des éosinophiles, observée dans notre étude, en fonction de leur localisation sanguine et tissulaire et en fonction de leur origine.

## *Bibliographie*

## BIBLIOGRAPHIE

## A

**Aarbiou, J., M. Ertmann, S. van Wetering, P. van Noort, D. Rook, K. F. Rabe, S. V. Litvinov, J. H. van Krieken, W. I. de Boer and P. S. Hiemstra** (2002). "Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro." J Leukoc Biol 72(1): 167-74.

**Abd El-Maged, M. S., S. A. Shoman, M. M. Al-Sherbieny and A. B. Barakat** (2006). "Cell mediated responses to the mycobacterium tuberculosis specific ESAT-6 antigen in Egyptian tuberculosis patients." Egypt J Immunol 13(1): 131-40.

**Abel, B., N. Thieblemont, V. J. Quesniaux, N. Brown, J. Mpagi, K. Miyake, F. Bihl and B. Ryffel** (2002). "Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice." J Immunol 169(6): 3155-62.

**Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell and G. H. Gudmundsson** (2000). "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations." Blood 96(9): 3086-93.

**Ahren, I. L., E. Eriksson, A. Egesten and K. Riesbeck** (2003). "Nontypeable Haemophilus influenzae activates human eosinophils through beta-glucan receptors." Am J Respir Cell Mol Biol 29(5): 598-605.

**Akira, S., K. Hoshino and T. Kaisho** (2000). "The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses." J Endotoxin Res 6(5): 383-7.

**Alderwick, L. J., H. L. Birch, A. K. Mishra, L. Eggeling and G. S. Besra** (2007). "Structure, function and biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets." Biochem Soc Trans 35(Pt 5): 1325-8.

**Algood, H. M., P. L. Lin and J. L. Flynn** (2005). "Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis." Clin Infect Dis 41 Suppl 3: S189-93.

**Altare, F., D. Lammas, P. Revy, E. Jouanguy, R. Doffinger, S. Lamhamedi, P. Drysdale, D. Scheel-Toellner, J. Girdlestone, P. Darbyshire, M. Wadhwa, H. Dockrell, M. Salmon, A. Fischer, A. Durandy, J. L. Casanova and D. S. Kumararatne** (1998). "Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection." J Clin Invest 102(12): 2035-40.

**Appelmek, B. J., J. den Dunnen, N. N. Driessen, R. Ummels, M. Pak, J. Nigou, G. Larrouy-Maumus, S. S. Gurcha, F. Movahedzadeh, J. Geurtsen, E. J. Brown, M. M. Eysink Smeets, G. S. Besra, P. T. Willemsen, T. L. Lowary, Y. van Kooyk, J. J. Maaskant, N. G. Stoker, P. van der Ley, G. Puzo, C. M. Vandenbroucke-Grauls, C. W. Wieland, T. van der Poll, T. B. Geijtenbeek, A. M. van der Sar and W. Bitter** (2008). "The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the Mycobacterium-host interaction." Cell Microbiol 10(4): 930-44.

**Arden, B., S. P. Clark, D. Kabelitz and T. W. Mak** (1995). "Human T-cell receptor variable gene segment families." Immunogenetics 42(6): 455-500.

**Azad, A. K., J. B. Torrelles and L. S. Schlesinger** (2008). "Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells." J Leukoc Biol.

## B

**Bafica, A., C. A. Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever and A. Sher** (2005). "TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to

Mycobacterium tuberculosis." J Exp Med 202(12): 1715-24.

**Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L. J. Woods and P. F. Weller** (2001). "Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils." J Immunol 166(8): 4813-7.

**Barboni, E., S. Coade and A. Fiori** (2005). "The binding of mycolic acids to galectin-3: a novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids?" FEBS Lett 579(30): 6749-55.

**Basu, S., S. K. Pathak, A. Banerjee, S. Pathak, A. Bhattacharyya, Z. Yang, S. Talarico, M. Kundu and J. Basu** (2007). "Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of Mycobacterium tuberculosis is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem 282(2): 1039-50.

**Baumhueter, S., N. Dybdal, C. Kyle and L. A. Lasky** (1994). "Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin." Blood 84(8): 2554-65.

**Beatty, W. L., E. R. Rhoades, H. J. Ullrich, D. Chatterjee, J. E. Heuser and D. G. Russell** (2000). "Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages." Traffic 1(3): 235-47.

**Beatty, W. L. and D. G. Russell** (2000). "Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages." Infect Immun 68(12): 6997-7002.

**Befus, A. D., C. Mowat, M. Gilchrist, J. Hu, S. Solomon and A. Bateman** (1999). "Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action." J Immunol 163(2): 947-53.

**Behr, M. A. and V. Kapur** (2008). "The evidence for Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease." Curr Opin Gastroenterol 24(1): 17-21.

**Bermudez, L. E., A. Parker and J. R. Goodman** (1997). "Growth within

macrophages increases the efficiency of Mycobacterium avium in invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway." Infect Immun 65(5): 1916-25.

**Bloom, B. R. and C. J. Murray** (1992). "Tuberculosis: commentary on a reemerging killer." Science 257(5073): 1055-64.

**Bochner, B. S., F. W. Luscinikas, M. A. Gimbrone, Jr., W. Newman, S. A. Sterbinsky, C. P. Derse-Anthony, D. Klunk and R. P. Schleimer** (1991). "Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules." J Exp Med 173(6): 1553-7.

**Bodnar, K. A., N. V. Serbina and J. L. Flynn** (2001). "Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells." Infect Immun 69(2): 800-9.

**Bolton, S. J., C. A. McNulty, R. J. Thomas, C. R. Hewitt and A. J. Wardlaw** (2003). "Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils." J Leukoc Biol 74(1): 60-8.

**Bonecini-Almeida, M. G., S. Chitale, I. Boutsikakis, J. Geng, H. Doo, S. He and J. L. Ho** (1998). "Induction of in vitro human macrophage anti-Mycobacterium tuberculosis activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes." J Immunol 160(9): 4490-9.

**Boom, W. H.** (1999). "Gammadelta T cells and Mycobacterium tuberculosis." Microbes Infect 1(3): 187-95.

**Borelli, V., F. Vita, S. Shankar, M. R. Soranzo, E. Banfi, G. Scialino, C. Brochetta and G. Zabucchi** (2003). "Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun 71(2): 605-13.

**Brandau, S. and H. Suttman** (2007). "Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement." Biomed Pharmacother 61(6): 299-305.

**Branger, J., J. C. Leemans, S. Florquin, S. Weijer, P. Speelman and T. Van Der Poll** (2004). "Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice." Int Immunol 16(3): 509-16.

**Brennan, P. J.** (2003). "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*." Tuberculosis (Edinb) 83(1-3): 91-7.

**Briken, V., S. A. Porcelli, G. S. Besra and L. Kremer** (2004). "Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response." Mol Microbiol 53(2): 391-403.

**Brodin, P., I. Rosenkrands, P. Andersen, S. T. Cole and R. Brosch** (2004). "ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?" Trends Microbiol 12(11): 500-8.

**Brookes, R. H., A. A. Pathan, H. McShane, M. Hensmann, D. A. Price and A. V. Hill** (2003). "CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages." Eur J Immunol 33(12): 3293-302.

**Brosch, R., S. V. Gordon, C. Buchrieser, A. S. Pym, T. Garnier and S. T. Cole** (2000). "Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur." Yeast 17(2): 111-23.

**Brosch, R., S. V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, J. K. Inwald, P. Golby, J. N. Garcia, R. G. Hewinson, M. A. Behr, M. A. Quail, C. Churcher, B. G. Barrell, J. Parkhill and S. T. Cole** (2007). "Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy." Proc Natl Acad Sci U S A 104(13): 5596-601.

**Brunet, L. R., E. A. Sabin, A. W. Cheever, M. A. Kopf and E. J. Pearce** (1999). "Interleukin 5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response or host resistance mechanisms during murine schistosomiasis *mansoni* but does play a role in development of IL-4-producing non-T, non-B cells." Infect Immun 67(6): 3014-8.

**Bulut, Y., K. S. Michelsen, L. Hayrapetian, Y. Naiki, R. Spallek, M. Singh and M. Arditi** (2005). "Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals." J Biol Chem 280(22): 20961-7.

**Bush, R. K. and J. J. Prochnau** (2004). "Alternaria-induced asthma." J Allergy Clin Immunol 113(2): 227-34.

## C

**Caccamo, N., G. Sireci, S. Meraviglia, F. Dieli, J. Ivanyi and A. Salerno** (2006). "gammadelta T cells condition dendritic cells in vivo for priming pulmonary CD8 T cell responses against *Mycobacterium tuberculosis*." Eur J Immunol 36(10): 2681-90.

**Cantani, A. and V. Ciaschi** (2004). "Epidemiology of alternaria alternata allergy: a prospective study in 6840 Italian asthmatic children." Eur Rev Med Pharmacol Sci 8(6): 289-94.

**Carreras, E., E. Boix, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues** (2003). "Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein." Biochemistry 42(22): 6636-44.

**Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh and A. G. Bowie** (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." Nat Immunol 7(10): 1074-81.

**Caruso, A. M., N. Serbina, E. Klein, K. Triebold, B. R. Bloom and J. L. Flynn** (1999). "Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis." J Immunol 162(9): 5407-16.

**Casanova, J. L. and L. Abel** (2002). "Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model." Annu Rev Immunol 20: 581-620.

**Casanova, J. L., E. Jouanguy, S. Lamhamedi, S. Blanche and A. Fischer** (1995). "Immunological conditions of children

with BCG disseminated infection." Lancet 346(8974): 581.

**Casetti, R. and A. Martino** (2008). "The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy." Cell Mol Immunol 5(3): 161-70.

**Castro, A. G., N. Esaguy, P. M. Macedo, A. P. Aguas and M. T. Silva** (1991). "Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes." Infect Immun 59(9): 3009-14.

**Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan and B. R. Bloom** (1991). "Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages." Infect Immun 59(5): 1755-61.

**Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen and B. R. Bloom** (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." Proc Natl Acad Sci U S A 86(7): 2453-7.

**Chang, Z., A. Choudhary, R. Lathigra and F. A. Quioco** (1994). "The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein." J Biol Chem 269(3): 1956-8.

**Chatterjee, D.** (1997). "The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action." Curr Opin Chem Biol 1(4): 579-88.

**Chatterjee, D., A. D. Roberts, K. Lowell, P. J. Brennan and I. M. Orme** (1992). "Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor." Infect Immun 60(3): 1249-53.

**Chavakis, T., D. B. Cines, J. S. Rhee, O. D. Liang, U. Schubert, H. P. Hammes, A. A. Higazi, P. P. Nawroth, K. T. Preissner and K. Bdeir** (2004). "Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between

inflammation and angiogenesis." Faseb J 18(11): 1306-8.

**Chen, H., Z. Xu, L. Peng, X. Fang, X. Yin, N. Xu and P. Cen** (2006). "Recent advances in the research and development of human defensins." Peptides 27(4): 931-40.

**Chen, J. M., S. T. Islam, H. Ren and J. Liu** (2007). "Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety." Vaccine 25(48): 8114-22.

**Chen, K., J. Lu, L. Wang and Y. H. Gan** (2004). "Mycobacterial heat shock protein 65 enhances antigen cross-presentation in dendritic cells independent of Toll-like receptor 4 signaling." J Leukoc Biol 75(2): 260-6.

**Chusid, M. J., D. C. Dale, B. C. West and S. M. Wolff** (1975). "The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature." Medicine (Baltimore) 54(1): 1-27.

**Ciaramella, A., A. Cavone, M. B. Santucci, S. K. Garg, N. Sanarico, M. Bocchino, D. Galati, A. Martino, G. Auricchio, M. D'Orazio, G. R. Stewart, O. Neyrolles, D. B. Young, V. Colizzi and M. Fraziano** (2004). "Induction of apoptosis and release of interleukin-1 beta by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection." J Infect Dis 190(6): 1167-76.

**Cirl, C., A. Wieser, M. Yadav, S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg and T. Miethke** (2008). "Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins." Nat Med 14(4): 399-406.

**Co, D. O., L. H. Hogan, S. I. Kim and M. Sandor** (2004). "Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship." Clin Immunol 113(2): 130-6.

**Cohen, I. R.** (1991). "Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes." Annu Rev Immunol 9: 567-89.



**Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg and F. Mosteller** (1994). "Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature." Jama 271(9): 698-702.

**Condos, R., W. N. Rom, Y. M. Liu and N. W. Schluger** (1998). "Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med 157(3 Pt 1): 729-35.

**Conesa, A., P. Tassinari, H. Rivera, J. B. De Sanctis, N. Bianco and O. Aldrey** (2002). "Hypodense eosinophils: characterization of surface molecule expression." Allergy Asthma Proc 23(2): 117-24.

**Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, MA., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., Fournié, JJ.** (1999). "Stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands." Science 264: 267-70.

**Coppi, L. C., S. M. Thomazzi, M. L. de Ayrizono, C. S. Coy, W. J. Fagundes, J. R. Goes, G. C. Franchi, Jr., A. E. Nowill, C. G. Montes, E. Antunes and J. G. Ferraz** (2007). "Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis 13(2): 211-8.

**Cormier, S. A., A. G. Taranova, C. Bedient, T. Nguyen, C. Protheroe, R. Pero, D. Dimina, S. I. Ochkur, K. O'Neill, D. Colbert, T. R. Lombardi, S. Constant, M. P. McGarry, J. J. Lee and N. A. Lee** (2006). "Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response." J Leukoc Biol 79(6): 1131-9.

**Creagh, E. M. and L. A. O'Neill** (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." Trends Immunol 27(8): 352-7.

**Cywes, C., H. C. Hoppe, M. Daffe and M. R. Ehlers** (1997). "Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular

polysaccharides and is strain dependent." Infect Immun 65(10): 4258-66.

## D

**D'Avila, H., P. E. Almeida, N. R. Roque, H. C. Castro-Faria-Neto and P. T. Bozza** (2007). "Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy." Infect Immun 75(3): 1507-11.

**D'Avila, H., N. R. Roque, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. Melo and P. T. Bozza** (2008). "Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and Prostaglandin E production by macrophages." Cell Microbiol.

**Dao, D. N., L. Kremer, Y. Guerardel, A. Molano, W. R. Jacobs, Jr., S. A. Porcelli and V. Briken** (2004). "Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages." Infect Immun 72(4): 2067-74.

**Darwin, K. H., S. Ehrt, J. C. Gutierrez-Ramos, N. Weich and C. F. Nathan** (2003). "The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide." Science 302(5652): 1963-6.

**Das, H., M. Sugita and M. B. Brenner** (2004). "Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components." J Immunol 172(11): 6578-86.

**Daugherty, B. L., S. J. Siciliano, J. A. DeMartino, L. Malkowitz, A. Sirotna and M. S. Springer** (1996). "Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor." J Exp Med 183(5): 2349-54.

**Davoine, F., S. Lavigne, J. Chakir, C. Ferland, M. E. Boulay and M. Laviolette** (2002). "Expression of Fc $\gamma$ RIII (CD16) on human peripheral blood eosinophils increases in allergic conditions." J Allergy Clin Immunol 109(3): 463-9.

**de Andres, B., E. Rakasz, M. Hagen, M. L. McCormik, A. L. Mueller, D. Elliot, A. Metwali, M. Sandor, B. E. Britigan, J. V.**

- Weinstock and R. G. Lynch** (1997). "Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated IgE and eosinophils in parasitic infections." Blood 89(10): 3826-36.
- De Smedt, M., T. Taghon, I. Van de Walle, G. De Smet, G. Leclercq and J. Plum** (2007). "Notch signaling induces cytoplasmic CD3 epsilon expression in human differentiating NK cells." Blood 110(7): 2696-703.
- Decot, V. and M. Capron** (2006). "[Eosinophils: structure and functions]." Presse Med 35(1 Pt 2): 113-24.
- Decot, V., G. Woerly, M. Loyens, S. Loiseau, B. Quatannens, M. Capron and D. Dombrowicz** (2005). "Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat eosinophils." J Immunol 174(2): 628-35.
- Deetz, C. O., A. M. Hebbeler, N. A. Propp, C. Cairo, I. Tikhonov and C. D. Pauza** (2006). "Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys." Infect Immun 74(8): 4505-11.
- Demkow, U., M. Filewska, D. Michalowska-Mitczuk, J. Kus, J. Jagodzinski, T. Zielonka, Z. Zwolska, M. Wasik and E. Rowinska-Zakrzewska** (2007). "Heterogeneity of antibody response to mycobacterial antigens in different clinical manifestations of pulmonary tuberculosis." J Physiol Pharmacol 58 Suppl 5(Pt 1): 117-27.
- Denburg, J. A.** (1995). "Microenvironmental influences on inflammatory cell differentiation." Allergy 50(25 Suppl): 25-8.
- Denis, M.** (1991). "Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol." Clin Exp Immunol 84(2): 200-6.
- Dennehy, K. M., G. Ferwerda, I. Faro-Trindade, E. Pyz, J. A. Willment, P. R. Taylor, A. Kerrigan, S. V. Tsoni, S. Gordon, F. Meyer-Wentrup, G. J. Adema, B. J. Kullberg, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, H. M. Mora-Montes, N. A. Gow, D. L. Williams, M. G. Netea and G. D. Brown** (2008). "Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors." Eur J Immunol 38(2): 500-6.
- Desreumaux, P., A. Janin, J. F. Colombel, L. Prin, J. Plumas, D. Emilie, G. Torpier, A. Capron and M. Capron** (1992). "Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease." J Exp Med 175(1): 293-6.
- Dieli, F., J. Ivanyi, P. Marsh, A. Williams, I. Naylor, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano and A. Salerno** (2003). "Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin." J Immunol 170(1): 463-9.
- Dieli, F., M. Troye-Blomberg, J. Ivanyi, J. J. Fournie, A. M. Krensky, M. Bonneville, M. A. Peyrat, N. Caccamo, G. Sireci and A. Salerno** (2001). "Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes." J Infect Dis 184(8): 1082-5.
- Doherty, T. M. and M. Arditi** (2004). "TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer?" J Clin Invest 114(12): 1699-703.
- Domachowske, J. B., K. D. Dyer, A. G. Adams, T. L. Leto and H. F. Rosenberg** (1998). "Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity." Nucleic Acids Res 26(14): 3358-63.
- Dombrowicz, D. and M. Capron** (2001). "Eosinophils, allergy and parasites." Curr Opin Immunol 13(6): 716-20.
- Dorman, S. C., A. Efthimiadis, I. Babirad, R. M. Watson, J. A. Denburg, F. E. Hargreave, P. M. O'Byrne and R. Sehmi** (2004). "Sputum CD34+IL-5Ralpha+ cells increase after allergen: evidence for in situ eosinophilopoiesis." Am J Respir Crit Care Med 169(5): 573-7.
- Doz, E., S. Rose, J. Nigou, M. Gilleron, G. Puzo, F. Erard, B. Ryffel and V. F.**

**Quesniaux (2007).** "Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan." J Biol Chem 282(36): 26014-25.

**Dubnau, E., J. Chan, C. Raynaud, V. P. Mohan, M. A. Laneelle, K. Yu, A. Quemard, I. Smith and M. Daffe (2000).** "Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice." Mol Microbiol 36(3): 630-7.

**Dubucquoi, S., P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, A. Capron and M. Capron (1994).** "Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion." J Exp Med 179(2): 703-8.

**Duez, C., A. Dakhama, A. Tomkinson, P. Marquillies, A. Balhorn, A. B. Tonnel, D. L. Bratton and E. W. Gelfand (2004).** "Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge." J Allergy Clin Immunol 114(4): 820-5.

**Dunzendorfer, S., N. C. Kaneider, A. Kaser, E. Woell, J. M. Frade, M. Mellado, C. Martinez-Alonso and C. J. Wiedermann (2001).** "Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils." J Allergy Clin Immunol 108(4): 581-7.

**Dvorak, A. M. and P. F. Weller (2000).** "Ultrastructural analysis of human eosinophils." Chem Immunol 76: 1-28.

## **F**

**Edwards, B. S., M. S. Curry, H. Tsuji, D. Brown, R. S. Larson and L. A. Sklar (2000).** "Expression of P-selectin at low site density promotes selective attachment of eosinophils over neutrophils." J Immunol 165(1): 404-10.

**Egesten, A., M. Blom, J. Calafat, H. Janssen and E. F. Knol (1998).** "Eosinophil granulocyte interaction with serum-opsonized particles: binding and degranulation are enhanced by tumor necrosis factor alpha." Int Arch Allergy Immunol 115(2): 121-8.

**el-Kalouby, A. H., R. Amer, M. F. Abdel-Wahab and E. H. el-Raziky (1979).** "Delayed hypersensitivity to specific antigen and heterologous PPD antigen in patients infected with *Schistosoma mansoni* and/or *Schistosoma haematobium*." Egypt J Bilharz 6(1-2): 43-9.

**Elass, E., B. Coddeville, Y. Guerardel, L. Kremer, E. Maes, J. Mazurier and D. Legrand (2007).** "Identification by surface plasmon resonance of the mycobacterial lipomannan and lipoarabinomannan domains involved in binding to CD14 and LPS-binding protein." FEBS Lett 581(7): 1383-90.

**Elias, D., H. Akuffo, A. Pawlowski, M. Haile, T. Schon and S. Britton (2005).** "*Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*." Vaccine 23(11): 1326-34.

**Eriksson, J., C. Woschnagg, E. Fernvik and P. Venge (2007).** "A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein." J Leukoc Biol 82(6): 1491-500.

**Eruslanov, E. B., I. V. Lyadova, T. K. Kondratieva, K. B. Majorov, I. V. Scheglov, M. O. Orlova and A. S. Apt (2005).** "Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice." Infect Immun 73(3): 1744-53.

## **F**

**Feng, C. G., C. A. Scanga, C. M. Collazo-Custodio, A. W. Cheever, S. Hieny, P. Caspar and A. Sher (2003).** "Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals." J Immunol 171(9): 4758-64.

**Ferrari, G., H. Langen, M. Naito and J. Pieters (1999).** "A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria." Cell 97(4): 435-47.

**Ferwerda, G., S. E. Girardin, B. J. Kullberg, L. Le Bourhis, D. J. de Jong, D.**

**M. Langenberg, R. van Crevel, G. J. Adema, T. H. Ottenhoff, J. W. Van der Meer and M. G. Netea** (2005). "NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog 1(3): 279-85.

**Fine, P. E.** (1996). "Regarding antileprosy vaccine--an apprehension by Dr. Prakash." Int J Lepr Other Mycobact Dis 64(4): 448-9.

**Fischer, E., M. Capron, L. Prin, J. P. Kusnierz and M. D. Kazatchkine** (1986). "Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3." Cell Immunol 97(2): 297-306.

**Fischer, K., E. Scotet, M. Niemeyer, H. Kobernick, J. Zerrahn, S. Maillet, R. Hurwitz, M. Kursar, M. Bonneville, S. H. Kaufmann and U. E. Schaible** (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101(29): 10685-90.

**Flesch, I. and S. H. Kaufmann** (1987). "Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*." J Immunol 138(12): 4408-13.

**Flores, M., J. Merino-Angulo, J. G. Tanago and C. Aquirre** (1983). "Late generalized tuberculosis and eosinophilia." Arch Intern Med 143(1): 182.

**Flynn, J. L. and J. Chan** (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol 19: 93-129.

**Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Matthaei and I. G. Young** (1996). "Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model." J Exp Med 183(1): 195-201.

**Fu, Y. X., R. Cranfill, M. Vollmer, R. Van Der Zee, R. L. O'Brien and W. Born** (1993). "In vivo response of murine gamma delta T cells to a heat shock protein-derived peptide." Proc Natl Acad Sci U S A 90(1): 322-6.

## G

**Gagliardi, M. C., R. Teloni, F. Giannoni, M. Pardini, V. Sargentini, L. Brunori, L. Fattorini and R. Nisini** (2005). "*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production." J Leukoc Biol 78(1): 106-13.

**Ganley-Leal, L. M., P. N. Mwinzi, C. B. Cetre-Sossah, J. Andove, A. W. Hightower, D. M. Karanja, D. G. Colley and W. E. Secor** (2006). "Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans." Infect Immun 74(4): 2169-76.

**Gansert, J. L., V. Kiessler, M. Engele, F. Wittke, M. Rollinghoff, A. M. Krensky, S. A. Porcelli, R. L. Modlin and S. Stenger** (2003). "Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity." J Immunol 170(6): 3154-61.

**Garg, A., P. F. Barnes, S. Roy, M. F. Quiroga, S. Wu, V. E. Garcia, S. R. Krutzik, S. E. Weis and R. Vankayalapati** (2008). "Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection." Eur J Immunol 38(2): 459-69.

**Gaynor, C. D., F. X. McCormack, D. R. Voelker, S. E. McGowan and L. S. Schlesinger** (1995). "Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages." J Immunol 155(11): 5343-51.

**Gehring, A. J., K. M. Dobos, J. T. Belisle, C. V. Harding and W. H. Boom** (2004). "*Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing." J Immunol 173(4): 2660-8.

**Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk and**

**Y. Van Kooyk** (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." J Exp Med 197(1): 7-17.

**Geisel, R. E., K. Sakamoto, D. G. Russell and E. R. Rhoades** (2005). "In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin is due principally to trehalose mycolates." J Immunol 174(8): 5007-15.

**Gilleron, M., V. F. Quesniaux and G. Puzo** (2003). "Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response." J Biol Chem 278(32): 29880-9.

**Gilleron, M., C. Ronet, M. Mempel, B. Monsarrat, G. Gachelin and G. Puzo** (2001). "Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells." J Biol Chem 276(37): 34896-904.

**Gleich, G. J. and C. Adolphson** (1993). "Bronchial hyperreactivity and eosinophil granule proteins." Agents Actions Suppl 43: 223-30.

**Gleich, G. J. and C. R. Adolphson** (1986). "The eosinophilic leukocyte: structure and function." Adv Immunol 39: 177-253.

**Gleich, G. J. and K. M. Leiferman** (2005). "The hypereosinophilic syndromes: still more heterogeneity." Curr Opin Immunol 17(6): 679-84.

**Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori and G. De Libero** (2003). "Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells." J Exp Med 197(2): 163-8.

**Gotlib, J.** (2005). "Molecular classification and pathogenesis of eosinophilic disorders: 2005 update." Acta Haematol 114(1): 7-25.

**Goude, R. and T. Parish** (2008). "The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." Future Microbiol 3: 299-313.

**Gounni, A. S., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet and M. Capron** (1994). "High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites." Nature 367(6459): 183-6.

**Gouon-Evans, V. and J. W. Pollard** (2001). "Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus." Endocrinology 142(10): 4515-21.

**Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell and T. Spies** (2001). "Costimulation of CD8 $\alpha$ beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." Nat Immunol 2(3): 255-60.

**Gutierrez-Ramos, J. C., C. Lloyd, M. L. Kapsenberg, J. A. Gonzalo and A. J. Coyle** (2000). "Non-redundant functional groups of chemokines operate in a coordinate manner during the inflammatory response in the lung." Immunol Rev 177: 31-42.

## H

**Hansel, T. T., I. J. De Vries, J. M. Carballido, R. K. Braun, N. Carballido-Perrig, S. Rihs, K. Blaser and C. Walker** (1992). "Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR." J Immunol 149(6): 2130-6.

**Haregewoin, A., G. Soman, R. C. Hom and R. W. Finberg** (1989). "Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein." Nature 340(6231): 309-12.

**Harth, G., D. L. Clemens and M. A. Horwitz** (1994). "Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity." Proc Natl Acad Sci U S A 91(20): 9342-6.

**Hartnell, A., A. B. Kay and A. J. Wardlaw** (1992). "IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils." J Immunol 148(5): 1471-8.

**Hartnell, A., R. Moqbel, G. M. Walsh, B. Bradley and A. B. Kay** (1990). "Fc gamma

and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils." *Immunology* 69(2): 264-70.

**Hayday, A. C.** (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* 18: 975-1026.

**Henderson, R. A., S. C. Watkins and J. L. Flynn** (1997). "Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis." *J Immunol* 159(2): 635-43.

**Hernandez-Pando, R., H. Orozcoe, A. Sampieri, L. Pavon, C. Velasquillo, J. Larriva-Sahd, J. M. Alcocer and M. V. Madrid** (1996). "Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis." *Immunology* 89(1): 26-33.

**Hertz, C. J., S. M. Kiertscher, P. J. Godowski, D. A. Bouis, M. V. Norgard, M. D. Roth and R. L. Modlin** (2001). "Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2." *J Immunol* 166(4): 2444-50.

**Hibiya, K., Y. Kasumi, I. Sugawara and J. Fujita** (2008). "Histopathological classification of systemic Mycobacterium avium complex infections in slaughtered domestic pigs." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31(4): 347-66.

**Hoft, D. F., R. M. Brown and S. T. Roodman** (1998). "Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype." *J Immunol* 161(2): 1045-54.

**Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, A. B. Kay and M. E. Rothenberg** (2008). "Eosinophils: biological properties and role in health and disease." *Clin Exp Allergy* 38(5): 709-50.

**Holscher, C., A. Holscher, D. Ruckerl, T. Yoshimoto, H. Yoshida, T. Mak, C. Saris and S. Ehlers** (2005). "The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during

experimental tuberculosis." *J Immunol* 174(6): 3534-44.

**Honore, N. and S. T. Cole** (1993). "Molecular basis of rifampin resistance in Mycobacterium leprae." *Antimicrob Agents Chemother* 37(3): 414-8.

**Hossain, M., Y. Okubo, S. Horie and M. Sekiguchi** (1996). "Analysis of recombinant human tumour necrosis factor-alpha-induced CD4 expression on human eosinophils." *Immunology* 88(2): 301-7.

**Howard, A. D. and B. S. Zwillling** (1999). "Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines." *Clin Exp Immunol* 115(3): 428-34.

## I

**Ilangumaran, S., S. Arni, M. Poincelet, J. M. Theler, P. J. Brennan, D. Nasir ud and D. C. Hoessli** (1995). "Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes." *J Immunol* 155(3): 1334-42.

**Imler, J. L. and L. Zheng** (2004). "Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals." *J Leukoc Biol* 75(1): 18-26.

**Inoue, Y., Y. Matsuwaki, S. H. Shin, J. U. Ponikau and H. Kita** (2005). "Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils." *J Immunol* 175(8): 5439-47.

**Ito, T., A. Hasegawa, H. Hosokawa, M. Yamashita, S. Motohashi, T. Naka, Y. Okamoto, Y. Fujita, Y. Ishii, M. Taniguchi, I. Yano and T. Nakayama** (2008). "Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from Mycobacterium bovis BCG Tokyo-172." *Int Immunol* 20(7): 849-60.

**Iwasaki, H. and K. Akashi** (2006). "Thymus exclusivity: all the right conditions for T cells." *Immunity* 25(5): 697-700.

## J

**Jacobsen, E. A., S. I. Ochkur, R. S. Pero, A. G. Taranova, C. A. Protheroe, D. C. Colbert, N. A. Lee and J. J. Lee** (2008). "Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells." J Exp Med 205(3): 699-710.

**Jacobsen, E. A., A. G. Taranova, N. A. Lee and J. J. Lee** (2007). "Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation?" J Allergy Clin Immunol 119(6): 1313-20.

**Janis, E. M., S. H. Kaufmann, R. H. Schwartz and D. M. Pardoll** (1989). "Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis." Science 244(4905): 713-6.

**Jia, G. Q., J. A. Gonzalo, C. Lloyd, L. Kremer, L. Lu, A. C. Martinez, B. K. Wershil and J. C. Gutierrez-Ramos** (1996). "Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation." J Exp Med 184(5): 1939-51.

**Jinno, H., M. Ueda, S. Ozawa, T. Ikeda, M. Kitajima, T. Maeda and M. Seno** (2002). "The cytotoxicity of a conjugate composed of human epidermal growth factor and eosinophil cationic protein." Anticancer Res 22(6C): 4141-5.

**Jo, E. K., C. S. Yang, C. H. Choi and C. V. Harding** (2007). "Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors." Cell Microbiol 9(5): 1087-98.

**Johnson, C. M., E. A. Lyle, K. O. Omueti, V. A. Stepensky, O. Yegin, E. Alpsy, L. Hamann, R. R. Schumann and R. I. Tapping** (2007). "Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy." J Immunol 178(12): 7520-4.

**Jonsson, U. B., J. Bystrom, G. Stalenheim and P. Venge** (2006). "A (G->C) transversion in the 3' UTR of the human ECP (eosinophil cationic protein) gene correlates to the cellular content of ECP." J Leukoc Biol 79(4): 846-51.

**Jouault, T., M. El Abed-El Behi, M. Martinez-Esparza, L. Breuilh, P. A. Trinel, M. Chamaillard, F. Trottein and D. Poulain** (2006). "Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling." J Immunol 177(7): 4679-87.

**Jung, S. B., C. S. Yang, J. S. Lee, A. R. Shin, S. S. Jung, J. W. Son, C. V. Harding, H. J. Kim, J. K. Park, T. H. Paik, C. H. Song and E. K. Jo** (2006). "The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes." Infect Immun 74(5): 2686-96.

**Jung, Y. J., R. LaCourse, L. Ryan and R. J. North** (2002). "Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice." Infect Immun 70(11): 6436-43.

## K

**Kabelitz, D.** (2007). "Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes." Curr Opin Immunol 19(1): 39-45.

**Kataoka, S., Y. Konishi, Y. Nishio, K. Fujikawa-Adachi and A. Tominaga** (2004). "Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma." DNA Cell Biol 23(9): 549-60.

**Kay, A. B.** (2005). "The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma." Trends Mol Med 11(4): 148-52.

**Kelley, V. A. and J. S. Schorey** (2003). "Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron." Mol Biol Cell 14(8): 3366-77.

**Khan, N., K. Alam, S. C. Mande, V. L. Valluri, S. E. Hasnain and S. Mukhopadhyay** (2008). "Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60 modulates immune response to PPD by manipulating the

surface expression of TLR2 on macrophages." Cell Microbiol 10(8): 1711-22.

**Kirkham, P. and I. Rahman** (2006). "Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy." Pharmacol Ther 111(2): 476-94.

**Kirman, J., Z. Zakaria, K. McCoy, B. Delahunt and G. Le Gros** (2000). "Role of eosinophils in the pathogenesis of Mycobacterium bovis BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice." Infect Immun 68(5): 2976-8.

**Klebanoff, S. J. and R. W. Coombs** (1996). "Virucidal effect of stimulated eosinophils on human immunodeficiency virus type 1." AIDS Res Hum Retroviruses 12(1): 25-9.

**Klion, A. D. and T. B. Nutman** (2004). "The role of eosinophils in host defense against helminth parasites." J Allergy Clin Immunol 113(1): 30-7.

**Korbel, D. S., B. E. Schneider and U. E. Schaible** (2008). "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth." Microbes Infect 10(9): 995-1004.

**Kremer, L., Besra G. S., Brennan P. J. and Baulard A. R.** (1999). "Le lipoarabinomannane : structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse." Médecine sciences 15: 842-850

**Kroegel, C., J. C. Virchow, Jr., W. Luttmann, C. Walker and J. A. Warner** (1994). "Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I)." Eur Respir J 7(3): 519-43.

**Kroegel, C., J. A. Warner, J. C. Virchow, Jr. and H. Matthys** (1994). "Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II)." Eur Respir J 7(4): 743-60.

## L

**Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. Velazquez, A. B. Kay and R. Moqbel** (1998). "Intracellular localization of interleukin-6 in

eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma." Blood 91(7): 2508-16.

**Lacy, P., S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. R. Velazquez, S. F. Man and R. Moqbel** (1999). "Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils." Blood 94(1): 23-32.

**Ladel, C. H., G. Szalay, D. Riedel and S. H. Kaufmann** (1997). "Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages." Infect Immun 65(5): 1936-8.

**Lasco, T. M., O. C. Turner, L. Cassone, I. Sugawara, H. Yamada, D. N. McMurray and I. M. Orme** (2004). "Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun 72(2): 1147-9.

**Lazarevic, V., A. J. Myers, C. A. Scanga and J. L. Flynn** (2003). "CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol M. tuberculosis infection." Immunity 19(6): 823-35.

**Le Cabec, V., L. J. Emorine, I. Toesca, C. Cougoule and I. Maridonneau-Parini** (2005). "The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor." J Leukoc Biol 77(6): 934-43.

**Le Deist F, de Saint Basile G., Rieux-Laucat F, Hivroz C and Fischer A** (2007). "Expression anomalies of the CD3-TCR complex expression and immunodeficiencies " Medicine Sciences 2: 161-6.

**Lee, B. Y., S. A. Hefta and P. J. Brennan** (1992). "Characterization of the major membrane protein of virulent Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun 60(5): 2066-74.

**Lee, J., K. Choi, M. R. Olin, S. N. Cho and T. W. Molitor** (2004). "Gammadelta T cells in immunity induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination." Infect Immun 72(3): 1504-11.

**Lee, J. J., D. Dimina, M. P. Macias, S. I. Ochkur, M. P. McGarry, K. R. O'Neill, C. Protheroe, R. Pero, T. Nguyen, S. A. Cormier, E. Lenkiewicz, D. Colbert, L.**



**Rinaldi, S. J. Ackerman, C. G. Irvin and N. A. Lee** (2004). "Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils." Science 305(5691): 1773-6.

**Lee, J. J. and N. A. Lee** (2005). "Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function?" Clin Exp Allergy 35(8): 986-94.

**Leemans, J. C., S. Florquin, M. Heikens, S. T. Pals, R. van der Neut and T. Van Der Poll** (2003). "CD44 is a macrophage binding site for Mycobacterium tuberculosis that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis." J Clin Invest 111(5): 681-9.

**Leung, A. S., V. Tran, Z. Wu, X. Yu, D. C. Alexander, G. F. Gao, B. Zhu and J. Liu** (2008). "Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy." BMC Genomics 9: 413.

**Li, Z., C. Kelley, F. Collins, D. Rouse and S. Morris** (1998). "Expression of katG in Mycobacterium tuberculosis is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs." J Infect Dis 177(4): 1030-5.

**Lienhardt, C., A. Azzurri, A. Amedei, K. Fielding, J. Sillah, O. Y. Sow, B. Bah, M. Benagiano, A. Diallo, R. Manetti, K. Manneh, P. Gustafson, S. Bennett, M. M. D'Elis, K. McAdam and G. Del Prete** (2002). "Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo." Eur J Immunol 32(6): 1605-13.

**Liu, P. T., S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B. H. Tan, S. R. Krutzik, M. T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D. L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zugel, R. L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B. W. Hollis, J. S. Adams, B. R. Bloom and R. L. Modlin** (2006). "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response." Science 311(5768): 1770-3.

**Liu, P. T., S. Stenger, D. H. Tang and R. L. Modlin** (2007). "Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on

the induction of cathelicidin." J Immunol 179(4): 2060-3.

**Lopez, M., L. M. Sly, Y. Luu, D. Young, H. Cooper and N. E. Reiner** (2003). "The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2." J Immunol 170(5): 2409-16.

**Loughlin, K. R.** (2008). "Understanding intravesical BCG: A window to the future treatment of noninvasive bladder cancer." Urol Oncol 26(4): 339-40.

**Lucey, D. R., D. I. Dorsky, A. Nicholson-Weller and P. F. Weller** (1989). "Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120." J Exp Med 169(1): 327-32.

## M

**MacKenzie, J. R., J. Mattes, L. A. Dent and P. S. Foster** (2001). "Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function." J Immunol 167(6): 3146-55.

**Maeda, N., J. Nigou, J. L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel and O. Neyrolles** (2003). "The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan." J Biol Chem 278(8): 5513-6.

**Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh and C. K. Stover** (1996). "Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis." J Bacteriol 178(5): 1274-82.

**Mahmoud, A. A.** (1982). "The ecology of eosinophils in schistosomiasis." J Infect Dis 145(5): 613-22.

**Mahmudi-Azer, S., G. P. Downey and R. Moqbel** (2002). "Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release." Blood 99(11): 4039-47.

- Maisetta, G., M. Di Luca, S. Esin, W. Florio, F. L. Brancatisano, D. Bottai, M. Campa and G. Batoni** (2008). "Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3." Peptides 29(1): 1-6.
- Malhotra, I., P. Mungai, A. Wamachi, J. Kioko, J. H. Ouma, J. W. Kazura and C. L. King** (1999). "Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis." J Immunol 162(11): 6843-8.
- Manabe, Y. C. and W. R. Bishai** (2000). "Latent Mycobacterium tuberculosis-persistence, patience, and winning by waiting." Nat Med 6(12): 1327-9.
- Marcenaro, E., B. Ferranti, M. Falco, L. Moretta and A. Moretta** (2008). "Human NK cells directly recognize Mycobacterium bovis via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC." Int Immunol 20(9): 1155-67.
- Mariotti, S., R. Teloni, E. Iona, L. Fattorini, F. Giannoni, G. Romagnoli, G. Orefici and R. Nisini** (2002). "Mycobacterium tuberculosis subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells." Eur J Immunol 32(11): 3050-8.
- Martino, A., R. Casetti, A. Sacchi and F. Poccia** (2007). "Central memory Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes primed and expanded by bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells kill mycobacterial-infected monocytes." J Immunol 179(5): 3057-64.
- Martino, A., A. Sacchi, N. Sanarico, F. Spadaro, C. Ramoni, A. Ciaramella, L. P. Pucillo, V. Colizzi and S. Vendetti** (2004). "Dendritic cells derived from BCG-infected precursors induce Th2-like immune response." J Leukoc Biol 76(4): 827-34.
- Matsuzawa, Y., Y. Nakamura, S. Nakagawa, K. Fujimoto, T. Honda, K. Kubo, T. Kobayashi and M. Sekiguchi** (1992). "[A case of pulmonary tuberculosis associated with severe skin eruption, prominent eosinophilia, and liver dysfunction induced by streptomycin]." Kekkaku 67(5): 413-7.
- Matzinger, P.** (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol 12: 991-1045.
- McNeil, M., M. Daffe and P. J. Brennan** (1991). "Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria." J Biol Chem 266(20): 13217-23.
- Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock and M. J. Fenton** (1999). "Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis." J Immunol 163(7): 3920-7.
- Meerschaert, J., W. W. Busse, P. J. Bertics and D. F. Mosher** (2000). "CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide." Am J Respir Cell Mol Biol 23(6): 780-7.
- Mendez-Samperio, P., E. Miranda and A. Trejo** (2008). "Regulation of human beta-defensin-2 by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG): Involvement of PKC, JNK, and PI3K in human lung epithelial cell line (A549)." Peptides 29(10): 1657-63.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R. S. Cordeiro and M. G. Henriques** (1997). "Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy." J Leukoc Biol 62(6): 778-85.
- Miike, S. and H. Kita** (2003). "Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators." J Allergy Clin Immunol 111(4): 704-13.
- Mishra, A., S. P. Hogan, E. B. Brandt, N. Wagner, M. W. Crossman, P. S. Foster and M. E. Rothenberg** (2002). "Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking." J Biol Chem 277(6): 4406-12.
- Miyazaki, E., R. E. Chaisson and W. R. Bishai** (1999). "Analysis of rifapentine for preventive therapy in the Cornell mouse model

of latent tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother 43(9): 2126-30.

**Monteseirin, J., A. Vega, P. Chacon, M. J. Camacho, R. El Bekay, J. A. Asturias, A. Martinez, P. Guardia, R. Perez-Cano and J. Conde** (2007). "Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes." J Immunol 179(4): 2634-41.

**Moy, J. N., L. L. Thomas and L. C. Whisler** (1993). "Eosinophil major basic protein enhances the expression of neutrophil CR3 and p150,95." J Allergy Clin Immunol 92(4): 598-606.

**Mukhopadhyay, S., J. Herre, G. D. Brown and S. Gordon** (2004). "The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors." Immunology 112(4): 521-30.

**Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H. U. Simon, L. Moretta, M. Colonna and F. Levi-Schaffer** (2005). "2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils." J Immunol 174(1): 110-8.

**Munitz, A. and F. Levi-Schaffer** (2007). "Inhibitory receptors on eosinophils: a direct hit to a possible Achilles heel?" J Allergy Clin Immunol 119(6): 1382-7.

**Munitz, A., M. L. McBride, J. S. Bernstein and M. E. Rothenberg** (2008). "A dual activation and inhibition role for the paired immunoglobulin-like receptor B in eosinophils." Blood 111(12): 5694-703.

**Murphy, C. J., B. A. Foster, M. J. Mannis, M. E. Selsted and T. W. Reid** (1993). "Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts." J Cell Physiol 155(2): 408-13.

## N

**Nagase, H., S. Okugawa, Y. Ota, M. Yamaguchi, H. Tomizawa, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto and K. Hirai** (2003). "Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand." J Immunol 171(8): 3977-82.

**Nicholson, S., G. Bonecini-Almeida Mda, J. R. Lapa e Silva, C. Nathan, Q. W. Xie, R. Mumford, J. R. Weidner, J. Calaycay, J. Geng, N. Boechat, C. Linhares, W. Rom and J. L. Ho** (1996). "Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis." J Exp Med 183(5): 2293-302.

**Nigou, J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher and G. Puzo** (2001). "Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor." J Immunol 166(12): 7477-85.

**Nirmala, R., P. R. Narayanan, R. Mathew, M. Maran and C. N. Deivanayagam** (2001). "Reduced NK activity in pulmonary tuberculosis patients with/without HIV infection: identifying the defective stage and studying the effect of interleukins on NK activity." Tuberculosis (Edinb) 81(5-6): 343-52.

**Niyonsaba, F., H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagaoka, K. Okumura and H. Ogawa** (2007). "Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines." J Invest Dermatol 127(3): 594-604.

**North, R. J.** (1998). "Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis." Clin Exp Immunol 113(1): 55-8.

**Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom and C. V. Harding** (2001). "Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol 167(2): 910-8.

**Nuding, S., K. Fellermann, J. Wehkamp and E. F. Stange** (2007). "Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon." Gut 56(9): 1240-7.

**Nutten, S., J. P. Papin, G. Woerly, D. W. Dunne, J. MacGregor, F. Trottein and M. Capron** (1999). "Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula." Eur J Immunol 29(3): 799-808.

## O

**O'Brien, R. L., Y. X. Fu, R. Cranfill, A. Dallas, C. Ellis, C. Reardon, J. Lang, S. R. Carding, R. Kubo and W. Born** (1992). "Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4348-52.

**O'Neill, L. A.** (2008). "When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction." Immunity 29(1): 12-20.

**O'Neill, L. A. and A. G. Bowie** (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol 7(5): 353-64.

**Odemuyiwa, S. O., A. Ghahary, Y. Li, L. Puttagunta, J. E. Lee, S. Musat-Marcu, A. Ghahary and R. Moqbel** (2004). "Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase." J Immunol 173(10): 5909-13.

**Ordway, D., G. Palanisamy, M. Henao-Tamayo, E. E. Smith, C. Shanley, I. M. Orme and R. J. Basaraba** (2007). "The cellular immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the guinea pig." J Immunol 179(4): 2532-41.

**Orme, I. M. and F. M. Collins** (1984). "Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin." Cell Immunol 84(1): 113-20.

**Orme, I. M., A. D. Roberts, J. P. Griffin and J. S. Abrams** (1993). "Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to

*Mycobacterium tuberculosis* infection." J Immunol 151(1): 518-25.

## P

**Padigel, U. M., J. A. Hess, J. J. Lee, J. B. Lok, T. J. Nolan, G. A. Schad and D. Abraham** (2007). "Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice." J Infect Dis 196(12): 1844-51.

**Page, S. M., G. J. Gleich, K. A. Roebuck and L. L. Thomas** (1999). "Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein." Am J Respir Cell Mol Biol 21(2): 230-7.

**Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Giliani, R. Franceschini, H. D. Ochs, H. Wolf, J. Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L. D. Notarangelo and A. Moretta** (2000). "X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells." J Exp Med 192(3): 337-46.

**Pasic, S., D. Lilic, N. Pejnovic, D. Vojvodic, R. Simic and M. Abinun** (1998). "Disseminated *Bacillus Calmette-Guerin* infection in a girl with hyperimmunoglobulin E syndrome." Acta Paediatr 87(6): 702-4.

**Pathak, S. K., S. Basu, K. K. Basu, A. Banerjee, S. Pathak, A. Bhattacharyya, T. Kaisho, M. Kundu and J. Basu** (2007). "Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages." Nat Immunol 8(6): 610-8.

**Pecora, N. D., A. J. Gehring, D. H. Canaday, W. H. Boom and C. V. Harding** (2006). "*Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function." J Immunol 177(1): 422-9.

**Pedrosa, J., B. M. Saunders, R. Appelberg, I. M. Orme, M. T. Silva and A. M. Cooper** (2000). "Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic

Mycobacterium tuberculosis infection of mice." Infect Immun 68(2): 577-83.

**Pegorier, S., L. A. Wagner, G. J. Gleich and M. Pretolani** (2006). "Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells." J Immunol 177(7): 4861-9.

**Persson, T., P. Andersson, M. Bodelsson, M. Laurell, J. Malm and A. Egesten** (2001). "Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against Escherichia coli." Infect Immun 69(6): 3591-6.

**Peters, W., J. G. Cyster, M. Mack, D. Schlondorff, A. J. Wolf, J. D. Ernst and I. F. Charo** (2004). "CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis." J Immunol 172(12): 7647-53.

**Phipps, S., C. E. Lam, S. Mahalingam, M. Newhouse, R. Ramirez, H. F. Rosenberg, P. S. Foster and K. I. Matthaei** (2007). "Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus." Blood 110(5): 1578-86.

**Pieters, J. and H. Ploegh** (2003). "Microbiology. Chemical warfare and mycobacterial defense." Science 302(5652): 1900-2.

**Plager, D. A., D. A. Loegering, J. L. Checkel, J. Tang, G. M. Kephart, P. L. Caffes, C. R. Adolphson, L. E. Ohnuki and G. J. Gleich** (2006). "Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker." J Immunol 177(10): 7340-5.

**Plotz, S. G., A. Lentschat, H. Behrendt, W. Plotz, L. Hamann, J. Ring, E. T. Rietschel, H. D. Flad and A. J. Ulmer** (2001). "The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent." Blood 97(1): 235-41.

**Plumas, J., V. Gruart, D. Aldebert, M. J. Truong, M. Capron, A. Capron and L. Prin** (1991). "Human eosinophils from hyper eosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2

receptor subunit." Eur J Immunol 21(5): 1265-70.

**Puellmann, K., W. E. Kaminski, M. Vogel, C. T. Nebe, J. Schroeder, H. Wolf and A. W. Beham** (2006). "A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A 103(39): 14441-6.

**Pym, A. S., P. Brodin, L. Majlessi, R. Brosch, C. Demangel, A. Williams, K. E. Griffiths, G. Marchal, C. Leclerc and S. T. Cole** (2003). "Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis." Nat Med 9(5): 533-9.

## Q

**Quesniaux, V., C. Fremont, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, F. Erard, T. Botha, M. Drennan, M. N. Soler, M. Le Bert, B. Schnyder and B. Ryffel** (2004). "Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria." Microbes Infect 6(10): 946-59.

**Quesniaux, V. J., D. M. Nicolle, D. Torres, L. Kremer, Y. Guerardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard and B. Ryffel** (2004). "Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans." J Immunol 172(7): 4425-34.

## R

**Raqib, R., P. K. Moly, P. Sarker, F. Qadri, N. H. Alam, M. Mathan and J. Andersson** (2003). "Persistence of mucosal mast cells and eosinophils in Shigella-infected children." Infect Immun 71(5): 2684-92.

**Rastogi, N., R. Hellio and H. L. David** (1991). "A new insight into the mycobacterial cell envelope architecture by the localization of antigens in ultrathin sections." Zentralbl Bakteriol 275(3): 287-302.

**Reese, T. A., H. E. Liang, A. M. Tager, A. D. Luster, N. Van Rooijen, D. Voehringer and R. M. Locksley** (2007). "Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy." Nature 447(7140): 92-6.

**Robertson, S. A., V. J. Mau, I. G. Young and K. I. Matthaei** (2000). "Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5-deficient mice." J Reprod Fertil 120(2): 423-32.

**Robinson, N., T. Kolter, M. Wolke, J. Rybniker, P. Hartmann and G. Plum** (2008). "Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response." Traffic 9(11): 1936-47.

**Roche-Lestienne, C., S. Lepers, V. Soenen-Cornu, J. E. Kahn, J. L. Lai, E. Hachulla, F. Drupt, A. L. Demarty, A. S. Roumier, M. Gardembas, M. Dib, N. Philippe, N. Cambier, S. Barette, C. Libersa, O. Bletry, P. Y. Hatron, B. Quesnel, C. Rose, K. Maloum, O. Blanchet, P. Fenaux, L. Prin and C. Preudhomme** (2005). "Molecular characterization of the idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES) in 35 French patients with normal conventional cytogenetics." Leukemia 19(5): 792-8.

**Rook, G. A., E. Hamelmann and L. R. Brunet** (2007). "Mycobacteria and allergies." Immunobiology 212(6): 461-73.

**Rosenberg, H. F. and J. B. Domachowske** (2001). "Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens." J Leukoc Biol 70(5): 691-8.

**Rosenberg, H. F., S. Phipps and P. S. Foster** (2007). "Eosinophil trafficking in allergy and asthma." J Allergy Clin Immunol 119(6): 1303-10; quiz 1311-2.

**Rothenberg, M. E.** (2004). "Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID)." J Allergy Clin Immunol 113(1): 11-28; quiz 29.

**Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan** (2006). "The eosinophil." Annu Rev Immunol 24: 147-74.

**Rothenberg, M. E., W. F. Owen, Jr., D. S. Silberstein, R. J. Soberman, K. F. Austen and R. L. Stevens** (1987). "Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties." Science 237(4815): 645-7.

**Roufousse, F., E. Cogan and M. Goldman** (2003). "The hypereosinophilic syndrome revisited." Annu Rev Med 54: 169-84.

**Runyon, E. H.** (1981). "Mycobacteria: an overview." Rev Infect Dis 3(5): 819-21.

**Russell, D. G.** (2007). "Who puts the tubercle in tuberculosis?" Nat Rev Microbiol 5(1): 39-47.

**Ryll, R., Y. Kumazawa and I. Yano** (2001). "Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review." Microbiol Immunol 45(12): 801-11.

## S

**Salo, P. M., S. J. Arbes, Jr., M. Sever, R. Jaramillo, R. D. Cohn, S. J. London and D. C. Zeldin** (2006). "Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms." J Allergy Clin Immunol 118(4): 892-8.

**Satoh, T., A. Knowles, M. S. Li, L. Sun, J. A. Tooze, G. Zabucchi and C. J. Spry** (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(2): 313-8.

**Scanga, C. A., V. P. Mohan, K. Yu, H. Joseph, K. Tanaka, J. Chan and J. L. Flynn** (2000). "Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2." J Exp Med 192(3): 347-58.

**Schlesinger, L. S., S. R. Hull and T. M. Kaufman** (1994). "Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages." J Immunol 152(8): 4070-9.

**Schorey, J. S. and L. Sweet** (2008). "The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis." Glycobiology 18(11): 832-41.

- Schroder, N. W. and M. Arditi** (2007). "The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma: evidence for the involvement of Toll-like receptor signaling." J Endotoxin Res 13(5): 305-12.
- Scior, T., I. Meneses Morales, S. J. Garces Eisele, D. Domeyer and S. Laufer** (2002). "Antitubercular isoniazid and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis--a review." Arch Pharm (Weinheim) 335(11-12): 511-25.
- Seah, G. T. and G. A. Rook** (2001). "IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha." J Immunol 167(3): 1230-7.
- Sehmi, R., K. Howie, D. R. Sutherland, W. Schragge, P. M. O'Byrne and J. A. Denburg** (1996). "Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects." Am J Respir Cell Mol Biol 15(5): 645-55.
- Sehmi, R., L. J. Wood, R. Watson, R. Foley, Q. Hamid, P. M. O'Byrne and J. A. Denburg** (1997). "Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation." J Clin Invest 100(10): 2466-75.
- Seiler, P., P. Aichele, B. Raupach, B. Odermatt, U. Steinhoff and S. H. Kaufmann** (2000). "Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating Mycobacterium tuberculosis." J Infect Dis 181(2): 671-80.
- Selvaraj P., V. N., vijayan VK., Prabhakar R and Narayanan PR.** (1988). "Alveolar macrophages in patients with pulmonary tuberculosis " Lung India 6: 71-4.
- Sharma, S., I. Verma and G. K. Khuller** (2000). "Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against Mycobacterium tuberculosis H37Rv: in vitro and ex vivo study." Eur Respir J 16(1): 112-7.
- Shen, Y., D. Zhou, L. Qiu, X. Lai, M. Simon, L. Shen, Z. Kou, Q. Wang, L. Jiang, J. Estep, R. Hunt, M. Clagett, P. K. Sehgal, Y. Li, X. Zeng, C. T. Morita, M. B. Brenner, N. L. Letvin and Z. W. Chen** (2002). "Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections." Science 295(5563): 2255-8.
- Shi, H. Z.** (2004). "Eosinophils function as antigen-presenting cells." J Leukoc Biol 76(3): 520-7.
- Sieling, P. A. and R. L. Modlin** (1994). "Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection." Immunobiology 191(4-5): 378-87.
- Singh, B., G. Singh, V. Trajkovic and P. Sharma** (2003). "Intracellular expression of Mycobacterium tuberculosis-specific 10-kDa antigen down-regulates macrophage B7.1 expression and nitric oxide release." Clin Exp Immunol 134(1): 70-7.
- Soler, P. and J. F. Bernaudin** (1993). "[Physiology of granulomas]." Rev Pneumol Clin 49(6): 257-61.
- Spencer, C. T., G. Abate, A. Blazevic and D. F. Hoft** (2008). "Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity." J Immunol 181(7): 4471-84.
- Spencer, L. A., R. C. Melo, S. A. Perez, S. P. Bafford, A. M. Dvorak and P. F. Weller** (2006). "Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion." Proc Natl Acad Sci U S A 103(9): 3333-8.
- Spencer, L. A., C. T. Szela, S. A. Perez, C. L. Kirchoffer, J. S. Neves, A. L. Radke and P. F. Weller** (2008). "Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially." J Leukoc Biol.
- Stamont-Salle, D., Legrand, F., Capron, M. and Delaporte, E.** (2007). "Peau et éosinophilie." EMC 98-705-A-10.
- Stenger, S., D. A. Hanson, R. Teitelbaum, P. Dewan, K. R. Niazi, C. J. Froelich, T. Ganz, S. Thoma-Uszynski, A. Melian, C.**

**Bogdan, S. A. Porcelli, B. R. Bloom, A. M. Krensky and R. L. Modlin** (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." Science 282(5386): 121-5.

**Stenger, S., R. J. Mazzaccaro, K. Uyemura, S. Cho, P. F. Barnes, J. P. Rosat, A. Sette, M. B. Brenner, S. A. Porcelli, B. R. Bloom and R. L. Modlin** (1997). "Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection." Science 276(5319): 1684-7.

**Stewart, G. R., L. Wernisch, R. Stabler, J. A. Mangan, J. Hinds, K. G. Laing, P. D. Butcher and D. B. Young** (2002). "The heat shock response of mycobacterium tuberculosis: linking gene expression, immunology and pathogenesis." Comp Funct Genomics 3(4): 348-51.

**Strek, M. E. and Leff, A. R.** (1997). "Eosinophils." Asthma Chapter 30.

**Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser and D. G. Russell** (1994). "Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase." Science 263(5147): 678-81.

**Sugawara, I., T. Udagawa and H. Yamada** (2004). "Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis." Infect Immun 72(3): 1804-6.

**Sun, J., A. E. Deghmane, H. Soualhia, T. Hong, C. Bucci, A. Solodkin and Z. Hmama** (2007). "Mycobacterium Bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation." J Leukoc Biol.

**Svensson, L., E. Redvall, C. Bjorn, J. Karlsson, A. M. Bergin, M. J. Rabiet, C. Dahlgren and C. Wenneras** (2007). "House dust mite allergen activates human eosinophils via formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 1." Eur J Immunol 37(7): 1966-77.

**Svensson, L. and C. Wenneras** (2005). "Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to

different taxonomic groups." Microbes Infect 7(4): 720-8.

**Sweet, L., W. Zhang, H. Torres-Fewell, A. Serianni, W. Boggess and J. Schorey** (2008). "Mycobacterium avium glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through TLR2." J Biol Chem.

## T

**Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel and O. Neyrolles** (2003). "DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells." J Exp Med 197(1): 121-7.

**Takeda, K. and S. Akira** (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol 16(1): 3-9.

**Tan, B. H., C. Meinken, M. Bastian, H. Bruns, A. Legaspi, M. T. Ochoa, S. R. Krutzik, B. R. Bloom, T. Ganz, R. L. Modlin and S. Stenger** (2006). "Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens." J Immunol 177(3): 1864-71.

**Tan, J. S., D. H. Canaday, W. H. Boom, K. N. Balaji, S. K. Schwander and E. A. Rich** (1997). "Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis." J Immunol 159(1): 290-7.

**Tang, C., H. Yamada, K. Shibata, N. Maeda, S. Yoshida, W. Wajjwalku, N. Ohara, T. Yamada, T. Kinoshita and Y. Yoshikai** (2008). "Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine secreting interleukin-15/antigen 85B fusion protein in providing protection against Mycobacterium tuberculosis." J Infect Dis 197(9): 1263-74.

**Tedla, N., C. Bandeira-Melo, P. Tassinari, D. E. Sloane, M. Samplaski, D. Cosman, L. Borges, P. F. Weller and J. P. Arm** (2003). "Activation of human eosinophils through



leukocyte immunoglobulin-like receptor 7." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1174-9.

**Teitelbaum, R., M. Cammer, M. L. Maitland, N. E. Freitag, J. Condeelis and B. R. Bloom** (1999). "Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 96(26): 15190-5.

**Teruya-Feldstein, J., E. S. Jaffe, P. R. Burd, D. W. Kingma, J. E. Setsuda and G. Tosato** (1999). "Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia." Blood 93(8): 2463-70.

**Thielen, C., V. Radermacher, M. Trimeche, F. Roufousse, M. Goldman, J. Boniver and L. de Leval** (2008). "TARC and IL-5 expression correlates with tissue eosinophilia in peripheral T-cell lymphomas." Leuk Res 32(9): 1431-8.

**Thomas, E. L., P. M. Bozeman, M. M. Jefferson and C. C. King** (1995). "Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines." J Biol Chem 270(7): 2906-13.

**Tischendorf, F. W., N. W. Brattig, M. Lintzel, D. W. Buttner, G. D. Burchard, K. Bork and M. Muller** (2000). "Eosinophil granule proteins in serum and urine of patients with helminth infections and atopic dermatitis." Trop Med Int Health 5(12): 898-905.

**Tjarnlund, A., E. Guirado, E. Julian, P. J. Cardona and C. Fernandez** (2006). "Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract." Microbes Infect 8(7): 1790-800.

**Tobian, A. A., N. S. Potter, L. Ramachandra, R. K. Pai, M. Convery, W. H. Boom and C. V. Harding** (2003). "Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide." J Immunol 171(3): 1413-22.

**Tomassini, M., A. Tsicopoulos, P. C. Tai, V. Gruart, A. B. Tonnel, L. Prin, A. Capron and M. Capron** (1991). "Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation." J Allergy Clin Immunol 88(3 Pt 1): 365-75.

**Torrelles, J. B., R. Knaup, A. Kolareth, T. Slepishkina, T. M. Kaufman, P. B. Kang, P. Hill, P. J. Brennan, D. Chatterjee, J. T. Belisle, J. M. Musser and L. S. Schlesinger** (2008). "Identification of mycobacterium tuberculosis clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan." J Biol Chem.

**Torres, M., T. Herrera, H. Villareal, E. A. Rich and E. Sada** (1998). "Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun 66(1): 176-80.

**Trautmann, A., P. Schmid-Grendelmeier, K. Kruger, R. Cramer, M. Akdis, A. Akkaya, E. B. Brocker, K. Blaser and C. A. Akdis** (2002). "T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma." J Allergy Clin Immunol 109(2): 329-37.

**Trias, J., V. Jarlier and R. Benz** (1992). "Porins in the cell wall of mycobacteria." Science 258(5087): 1479-81.

**Truong, M. J., V. Gruart, F. T. Liu, L. Prin, A. Capron and M. Capron** (1993). "IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity." Eur J Immunol 23(12): 3230-5.

**Tsicopoulos, A., Q. Hamid, A. Haczk, M. R. Jacobson, S. R. Durham, J. North, J. Barkans, C. J. Corrigan, Q. Meng, R. Moqbel and et al.** (1994). "Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals." J Allergy Clin Immunol 94(4): 764-72.

**Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima and T. Seya** (2000). "Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors." Infect Immun 68(12): 6883-90.

**Turner, O. C., R. J. Basaraba and I. M. Orme** (2003). "Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun 71(2): 864-71.

**Tydell, C. C., N. Yount, D. Tran, J. Yuan and M. E. Selsted** (2002). "Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils." J Biol Chem 277(22): 19658-64.

## V

**Ulrich, M., A. Petre, N. Youhnovski, F. Promm, M. Schirle, M. Schumm, R. S. Pero, A. Doyle, J. Checkel, H. Kita, N. Thiyagarajan, K. R. Acharya, P. Schmid-Grendelmeier, H. U. Simon, H. Schwarz, M. Tsutsui, H. Shimokawa, G. Bellon, J. J. Lee, M. Przybylski and G. Doring** (2008). "Post-translational Tyrosine Nitration of Eosinophil Granule Toxins Mediated by Eosinophil Peroxidase." J Biol Chem 283(42): 28629-28640.

**Ulrichs, T. and S. H. Kaufmann** (2006). "New insights into the function of granulomas in human tuberculosis." J Pathol 208(2): 261-9.

**Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem** (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A 96(25): 14459-63.

**Urasaki, T., J. Takasaki, T. Nagasawa and H. Ninomiya** (2001). "Pivotal role of 5-lipoxygenase in the activation of human eosinophils: platelet-activating factor and interleukin-5 induce CD69 on eosinophils through the 5-lipoxygenase pathway." J Leukoc Biol 69(1): 105-12.

## V

**van der Bruggen, T., P. T. Kok, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers and L. Koenderman** (1994). "Cooperation between Fc gamma receptor II and complement receptor type 3 during activation of platelet-activating factor release by cytokine-primed human eosinophils." J Immunol 153(6): 2729-35.

**van Rijt, L. S., N. Vos, D. Hijdra, V. C. de Vries, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht** (2003). "Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells." J Immunol 171(7): 3372-8.

**Veinotte, L. L., T. Y. Halim and F. Takei** (2008). "Unique subset of natural killer cells develops from progenitors in lymph node." Blood 111(8): 4201-8.

**Velasco-Velazquez, M. A., D. Barrera, A. Gonzalez-Arenas, C. Rosales and J. Agramonte-Hevia** (2003). "Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3." Microb Pathog 35(3): 125-31.

**Venge, P., J. Bystrom, M. Carlson, L. Hakansson, M. Karawacjzyk, C. Peterson, L. Seveus and A. Trulsson** (1999). "Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease." Clin Exp Allergy 29(9): 1172-86.

**Vijayan, V. K., A. M. Reetha, M. S. Jawahar, K. Sankaran and R. Prabhakar** (1992). "Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis." Chest 101(6): 1708-9.

**Villeneuve, C., G. Etienne, V. Abadie, H. Montrozier, C. Bordier, F. Laval, M. Daffe, I. Maridonneau-Parini and C. Astarie-Dequeker** (2003). "Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids." J Biol Chem 278(51): 51291-300.

**von Meyenn, F., M. Schaefer, H. Weighardt, S. Bauer, C. J. Kirschning, H. Wagner and T. Sparwasser** (2006). "Toll-like

receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells." Immunobiology 211(6-8): 557-65.

**Vordermeier, H. M., X. Zhu and D. P. Harris** (1997). "Induction of CD8+ CTL recognizing mycobacterial peptides." Scand J Immunol 45(5): 521-6.

## W

**Wagner, J. M., M. Franco, G. M. Kephart and G. J. Gleich** (1998). "Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions." Am J Trop Med Hyg 59(1): 66-72.

**Wakeham, J., J. Wang, J. Magram, K. Croitoru, R. Harkness, P. Dunn, A. Zganiacz and Z. Xing** (1998). "Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice." J Immunol 160(12): 6101-11.

**Wang, J. and A. Slungaard** (2006). "Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology." Arch Biochem Biophys 445(2): 256-60.

**Watanabe, T., N. Asano, P. J. Murray, K. Ozato, P. Taylor, I. J. Fuss, A. Kitani and W. Strober** (2008). "Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis." J Clin Invest 118(2): 545-59.

**Wehkamp, J., N. H. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, R. E. Petras, B. Shen, E. Schaeffeler, M. Schwab, R. Linzmeier, R. W. Feathers, H. Chu, H. Lima, Jr., K. Fellermann, T. Ganz, E. F. Stange and C. L. Bevins** (2005). "Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 102(50): 18129-34.

**Welin, A., M. E. Winberg, H. Abdalla, E. Sarndahl, B. Rasmusson, O. Stendahl and M. Lerm** (2008). "Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the

phagosomal maturation block." Infect Immun 76(7): 2882-7.

**Weltman, A. C. and D. N. Rose** (1993). "The safety of Bacille Calmette-Guerin vaccination in HIV infection and AIDS." Aids 7(2): 149-57.

**Wesch, D., S. Beetz, H. H. Oberg, M. Marget, K. Krengel and D. Kabelitz** (2006). "Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes." J Immunol 176(3): 1348-54.

**Wieland, C. W., S. Knapp, S. Florquin, A. F. de Vos, K. Takeda, S. Akira, D. T. Golenbock, A. Verbon and T. van der Poll** (2004). "Non-mannose-capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2." Am J Respir Crit Care Med 170(12): 1367-74.

**Wileman, T., G. R. Carson, M. Concino, A. Ahmed and C. Terhorst** (1990). "The gamma and epsilon subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors." J Cell Biol 110(4): 973-86.

**Winau, F., V. Schwierzeck, R. Hurwitz, N. Rimmel, P. A. Sieling, R. L. Modlin, S. A. Porcelli, V. Brinkmann, M. Sugita, K. Sandhoff, S. H. Kaufmann and U. E. Schaible** (2004). "Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b." Nat Immunol 5(2): 169-74.

**Woerly, G., P. Lacy, A. B. Younes, N. Roger, S. Loiseau, R. Moqbel and M. Capron** (2002). "Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation." J Leukoc Biol 72(4): 769-79.

**Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau and M. Capron** (1999a). "Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils." Int Arch Allergy Immunol 118(2-4): 95-7.

**Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron and M. Capron** (1999b). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon

gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." J Exp Med 190(4): 487-95.

**Wong, C. K., P. F. Cheung, W. K. Ip and C. W. Lam** (2007). "Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils." Am J Respir Cell Mol Biol 37(1): 85-96.

**Wu, W., Y. Chen, A. d'Avignon and S. L. Hazen** (1999). "3-Bromotyrosine and 3,5-dibromotyrosine are major products of protein oxidation by eosinophil peroxidase: potential markers for eosinophil-dependent tissue injury in vivo." Biochemistry 38(12): 3538-48.

## Y

**Yadav, M. and J. S. Schorey** (2006). "The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria." Blood 108(9): 3168-75.

**Yang, D., Q. Chen, H. F. Rosenberg, S. M. Rybak, D. L. Newton, Z. Y. Wang, Q. Fu, V. T. Tchernev, M. Wang, B. Schweitzer, S. F. Kingsmore, D. D. Patel, J. J. Oppenheim and O. M. Howard** (2004). "Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation." J Immunol 173(10): 6134-42.

**Yang, D., Q. Chen, S. B. Su, P. Zhang, K. Kurosaka, R. R. Caspi, S. M. Michalek, H. F. Rosenberg, N. Zhang and J. J. Oppenheim** (2008). "Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses." J Exp Med 205(1): 79-90.

**Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard and J. J. Oppenheim** (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science 286(5439): 525-8.

**Yang, D., H. F. Rosenberg, Q. Chen, K. D. Dyer, K. Kurosaka and J. J. Oppenheim** (2003). "Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with

chemotactic activities for dendritic cells." Blood 102(9): 3396-403.

**Yazdanbakhsh, M., Tai, PC., Spry, CJ., Gleich, GJ and Roos D** (1987). "Synergism between eosinophil cationic protein and oxygen metabolites in killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*." J Immunol 138(10): 3443-7.

**Yoon, J., J. U. Ponikau, C. B. Lawrence and H. Kita** (2008). "Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a beta 2 integrin, CD11b." J Immunol 181(4): 2907-15.

**Young, J. D., C. G. Peterson, P. Venge and Z. A. Cohn** (1986). "Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein." Nature 321(6070): 613-6.

**Yousefi, S., J. A. Gold, N. Andina, J. J. Lee, A. M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G. J. Gleich and H. U. Simon** (2008). "Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense." Nat Med 14(9): 949-53.

**Yu, C., A. B. Cantor, H. Yang, C. Browne, R. A. Wells, Y. Fujiwara and S. H. Orkin** (2002). "Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo." J Exp Med 195(11): 1387-95.

**Yu, C. T., C. H. Wang, T. J. Huang, H. C. Lin and H. P. Kuo** (1995). "Relation of bronchoalveolar lavage T lymphocyte subpopulations to rate of regression of active pulmonary tuberculosis." Thorax 50(8): 869-74.

**Yuan, Y., R. E. Lee, G. S. Besra, J. T. Belisle and C. E. Barry, 3rd** (1995). "Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A 92(14): 6630-4.

## Z

**Zaffran, Y., Zhan, L. and Ellner, JJ.** (1998). "Role of CR4 in *Mycobacterium tuberculosis*-human macrophages binding and signal

transduction in the absence of serum." Infect Immun 66(9): 4541-4.

**Zhang, J., L. J. Lathbury and L. A. Salamonsen** (2000). "Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium." Biol Reprod 62(2): 404-11.

**Zhang, Y., Y. Song, F. Yin, E. Broderick, K. Siegel, A. Goddard, E. Nieves, L. Pasatolic, Y. Tanaka, H. Wang, C. T. Morita**

**and E. Oldfield** (2006). "Structural studies of Vgamma2Vdelta2 T cell phosphoantigens." Chem Biol 13(9): 985-92.

**Zimmerli, S., S. Edwards and J. D. Ernst** (1996). "Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol 15(6): 760-70.

*Annexes*

# ANNEXE 1

## **Eosinophils : new effectors in innate immunity**

**Driss V. Legrand F. and Capron M.**

Inserm, U547, Lille, France ; Université Lille 2, Lille, France ; IFR142 ; Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France.

### **Key words**

Eosinophil, mycobacteria, BCG, allergic diseases, GM-CSF.

### **Introduction**

Eosinophil granulocytes are white blood cells classically involved in helminth parasitic infections and allergic diseases. Typically, differentiation and function of eosinophils is regulated by the CD4 Th2 cytokines IL-3, IL-5, and GM-CSF, and may be regarded as typical cells in type 2 immunity[1]. Recent studies provide evidence that eosinophils are multifunctional leukocytes which can exert effector, inflammatory and immunoregulatory functions through their ability to express different receptors and to produce both Th1- and Th2-type cytokines upon stimulation. Indeed, eosinophils express membrane receptors involved in innate immunity such as Toll-like receptors (TLRs)[2] and adaptive immune receptors like Fc receptors or co-stimulatory molecules, including CD86 and CD28 that allow interactions with lymphocytes and antigen-presenting cells[3]. Triggering eosinophils by engagement of receptors for cytokines, immunoglobulins or complement lead to granule protein release and the secretion of lipid mediators, cytokines and chemokines. Moreover, release of Th2 or Th1 immunoregulatory cytokines and cationic proteins can be specific upon the nature of stimulus[4]. Taken together, these data suggest that eosinophils represent a new link between innate and adaptive immunity.

By contrast with extensive studies of eosinophil contribution during helminth infections, little is known about the role of eosinophils in host defense against other pathogens, in particular mycobacteria. However, eosinophil recruitment within mycobacterial granuloma has been found in different animal models[5, 6]. Using *Mycobacterium bovis*-BCG as experimental model, we have previously evaluated the activating potential of BCG on eosinophils. Several *in vitro* arguments allow to postulate that human eosinophils purified from the peripheral blood of different eosinophilic donors were able to directly interact with BCG and to release different mediators such as reactive oxygen species (ROS) and eosinophil peroxidase (EPO) through TLR2 (unpublished data).

In this study we compared heterogeneity in the activation process of human eosinophils either from normal or allergic donors, in response to BCG. Next, we examined the priming effect of cytokine such as GM-CSF, involved in allergic diseases, on BCG-activated eosinophil response. Finally, we studied modulating potential of BCG on IL-4 release by eosinophils.



## **Material and Methods**

### **Isolation of eosinophils**

Eosinophils were isolated from peripheral blood of healthy and allergic donors after informed consent was obtained. Eosinophils were purified as previously described[7]. Eosinophil purity was > 98%.

### **Mycobacterium bovis BCG**

*Mycobacterium bovis*-BCG was maintained at 37°C in Sauton liquid medium. Viable mycobacteria *M. bovis*-BCG from the logarithmic growth phase were used for stimulation experiments at various concentrations as indicated in figure legends.

### **Release of Reactive Oxygen Species**

In short,  $3 \times 10^5$  eosinophils resuspended in RPMI 1640-without phenol red were activated with BCG and luminol (25µg/ml in Tris HCl 0.01M pH7.4) was added. Chemiluminescence was immediately measured with a luminometer (Victor™ Wallac, Perkin Elmer, Shelton, CT). Kinetic analysis was performed at 37°C during 2h. Prior to stimulation with BCG, eosinophils ( $2 \cdot 10^6$  cells/ml) were incubated with GM-CSF (0.5 ng/ml) in RPMI without red phenol for 30 min at 37°C. After this priming, eosinophils were used for assays without any further washing.

### **IL-4 release**

For stimulation with IgA and anti-IgA, highly purified eosinophils ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were first incubated with secretory IgA at a final concentration of 15 µg/ml (Sigma Aldrich). After 1 h incubation at 37°C, cells were stimulated with 20 µg/ml anti-IgA mAb, with or without BCG (5 : 1), at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After 18h of culture, supernatants were collected. IL-4 levels were measured by specific Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) kits from Diaclone. The lower detection limit was 0.5 pg/ml.

### **Statistical analysis**

Parametric Student's *t*-test was employed to compare variables and a *P* value of less than 0.05 was used to indicate statistical significance. \*, *P* < 0.05 and \*\*, *P* < 0.01 are represented on figures.

## Results

### **Eosinophil activation by BCG is dependent on donor status**

We observed an heterogeneous ROS release by eosinophils induced by different BCG : eosinophil ratios, dependent upon eosinophil donor status (Figure 1. A). Indeed, response against BCG of eosinophils from allergic donors is significantly increased about 2-fold compared to eosinophils from normal donors, both for 5 : 1 and 10 : 1 ratios.

Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) has been found to be required for bronchial eosinophilia and asthma severity[8]. To determine whether GM-CSF could modulate ROS release by eosinophils from normal donors against BCG, we have primed eosinophils from normal donors with GM-CSF at a suboptimal dose (0.5 ng/ml). This priming seems to be necessary for an optimal activation of eosinophils from normal donors in response to BCG (10 : 1) because after 30 minutes of pretreatment with GM-CSF, eosinophils from normal donors exhibited an enhanced ROS release in response to BCG and reached a similar level to that observed for allergic human eosinophils without priming (Figure 1.B). In addition, TLR2 expression increased significantly after incubation of normal human eosinophils with GM-CSF (data not shown).

### **BCG decreases IL-4 release by IgA/anti-IgA complexe- activated eosinophils**

BCG are a good candidate to revert Th2 allergic immune response, due to its strong Th1 cytokine inducing capacity[9]. To determine whether BCG can modulate Th2-cytokine release by allergic human eosinophils, we used IgA immune complexes which are described to activate eosinophils inducing IL-4[10] and IL-10 release[3]. As shown in Figure 2, preincubation of allergic human eosinophils with BCG resulted in a decrease of IL-4 release by eosinophils activated by IgA/anti-IgA complexes.

## Discussion

This study demonstrated that ROS generation in response to BCG by purified eosinophils from allergic donors was more important than activation observed with normal human eosinophils. In addition, a priming with GM-CSF increased BCG-activated eosinophils response. This enhanced activation suggests that eosinophils in the blood of allergic donors were already in a “primed” state, *in vivo*.

Epidemiological evidence, *in vitro* studies and animal models suggest that exposure to the bacterial components can influence the development and severity of allergic diseases[11]. However, the relationships of BCG infection and asthma in human beings is controversial[12]. Our results clearly show that BCG directly regulates IL-4 release by eosinophils after IgA/anti-IgA stimulation. In addition, BCG is a strong inducer of Th1 type immune response since we have recently shown that eosinophils secrete Th1 cytokines such as TNF- $\alpha$  in response to BCG (unpublished data). Experiments are now in progress to know whether the innate response of eosinophils to microbial antigens may polarize the T cell response towards Th1 or Th2 phenotypes. Therefore, the control of allergy is not only a matter of balancing Th1/Th2 immune responses but other mechanisms induced by BCG to prevent, control and treat allergy should be clarified. A better understanding of the interaction between eosinophils and mycobacteria in allergic context might have important implications in prevention and treatment of allergy and asthma.

**Acknowledgements :**

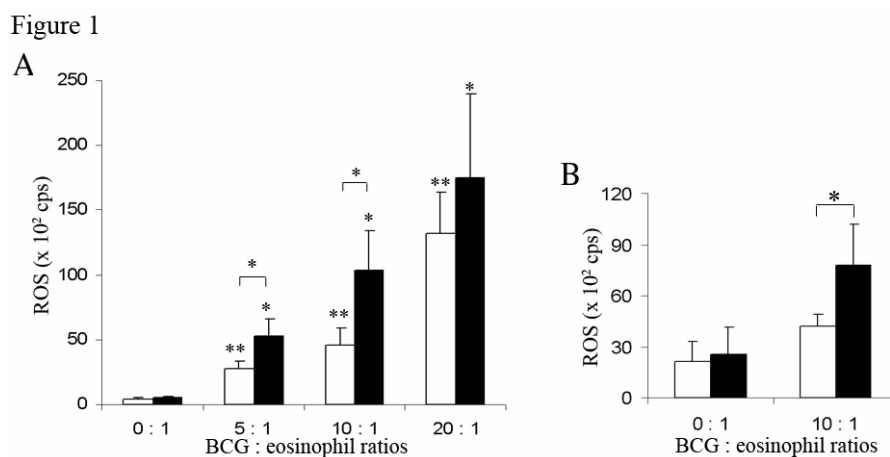
This study was supported by a grant from “Biologie-santé” program (Fonctions des éosinophiles et pathologies à éosinophiles). Dr Emmanuel Hermann, Sylvie Loiseau and Dr David Dombrowicz for their assistance.

**Corresponding author :** Monique Capron. U547 Inserm- Université Lille 2, Institut Pasteur de Lille. 1, r. Prof. Calmette BP245. 59019 Lille Cedex. France. Phone: +33 320 87 78 89. Fax: +33 320 87 78 88. e-mail: [monique.capron@pasteur-lille.fr](mailto:monique.capron@pasteur-lille.fr)

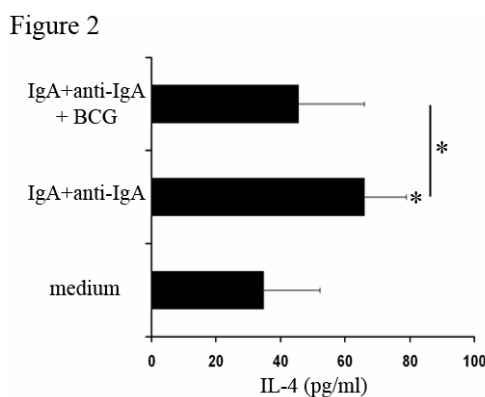
## References

1. Asquith, K.L., Ramshaw, H.S., Hansbro, P.M., Beagley, K.W., Lopez, A.F. and Foster, P.S., The IL-3/IL-5/GM-CSF common receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. *J Immunol*, 2008. **180**(2): p. 1199-206.
2. Rothenberg, M.E. and Hogan, S.P., The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 147-74.
3. Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., Dombrowicz, D., Capron, A. and Capron, M., Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J Exp Med*, 1999. **190**(4): p. 487-95.
4. Woerly, G., Lacy, P., Younes, A.B., Roger, N., Loiseau, S., Moqbel, R. and Capron, M., Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(4): p. 769-79.
5. Basaraba, R.J., Smith, E.E., Shanley, C.A. and Orme, I.M., Pulmonary lymphatics are primary sites of Mycobacterium tuberculosis infection in guinea pigs infected by aerosol. *Infect Immun*, 2006. **74**(9): p. 5397-401.
6. D'Avila, H., Almeida, P.E., Roque, N.R., Castro-Faria-Neto, H.C. and Bozza, P.T., Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy. *Infect Immun*, 2007. **75**(3): p. 1507-11.
7. Legrand, F., Woerly, G., Driss, V. and Capron, M., Innate immune function of eosinophils: from antiparasite to antitumor cells. *Methods Mol Biol*, 2008. **415**: p. 215-40.
8. Su, Y.C., Rolph, M.S., Hansbro, N.G., Mackay, C.R. and Sewell, W.A., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is required for bronchial eosinophilia in a murine model of allergic airway inflammation. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2600-7.
9. Kumar, M., Behera, A.K., Matsuse, H., Lockey, R.F. and Mohapatra, S.S., A recombinant BCG vaccine generates a Th1-like response and inhibits IgE synthesis in BALB/c mice. *Immunology*, 1999. **97**(3): p. 515-21.
10. Nonaka, M., Nonaka, R., Woolley, K., Adelroth, E., Miura, K., Okhawara, Y., Glibetic, M., Nakano, K., O'Byrne, P., Dolovich, J. and et al., Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol*, 1995. **155**(6): p. 3234-44.
11. Schroder, N.W. and Arditi, M., The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma: evidence for the involvement of Toll-like receptor signaling. *J Endotoxin Res*, 2007. **13**(5): p. 305-12.
12. Barlan, I.B., Bahceciler, N., Akdis, M. and Akdis, C.A., Role of bacillus Calmette-Guerin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005. **5**(6): p. 552-7.

## Figures



**Figure 1. Heterogeneity of eosinophil activation by BCG.** (A) ROS release by eosinophils in response to BCG. Eosinophils, from normal donors (white bar) and allergic donors (black bar), were incubated with different BCG: eosinophil ratios and ROS synthesis was measured by chemiluminescence. Results are expressed as counts per second (cps). (B) Effect of GM-CSF on BCG-stimulated eosinophil activation. ROS generation of normal human eosinophils, unstimulated (white bar) or primed with GM-CSF (black bar), after activation with BCG. Data are the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*,  $p < 0.05$ .



**Figure 2. Down-regulation of IgA antibody response of eosinophils by BCG.** Eosinophils were stimulated for 18h with IgA/anti-IgA complexes, with or without BCG (5:1). IL-4 levels were quantified in the culture supernatants by ELISA. Results are represented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$ .

## ANNEXE 2

# 13

---

## Innate Immune Function of Eosinophils

*From Antiparasite to Antitumor Cells*

Fanny Legrand, Gaetane Woerly, Virginie Driss, and Monique Capron

### Summary

Eosinophils are multifunctional leukocytes classically described as being involved in helminth parasitic infections and allergic diseases. Previously restricted to an exclusive role in the release of cytotoxic mediators, they are now also considered to be immunoregulatory cells and potential effectors in innate immune responses. Eosinophils are mainly found in tissues, so specific procedures are needed for their isolation from venous blood and for functional assays. Murine models are very useful for the dissection of eosinophil physiology *in vivo*. But murine eosinophils significantly differ from human ones. A complete understanding of eosinophil biology therefore requires comparative study of eosinophils from different mammalian species. We summarize here the main experimental protocols used to study human, mouse, and rat eosinophil biology. We focus on technical improvements of existing methods that optimize purification and *in vitro* functional studies of eosinophils.

**Key Words:** Eosinophil purification; hypodense; flow cytometry; activation markers; mediator release; cytotoxicity; heterogeneity; animal models; cell lines.

### 1. Introduction

Eosinophils have long been known to be involved in helminth parasitic infections and allergic diseases. Indeed, they have been characterized until recently by this functional duality. Today, eosinophils are considered rather as really multifunctional leukocytes, involved in inflammatory processes as well as in modulation of innate and adaptive immunity (*I*). Eosinophils express membrane receptors involved in adaptive immune responses like

From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 415: *Innate Immunity*  
Edited by: J. Ewbank and E. Vivier © Humana Press Inc., Totowa, NJ

01 Fc receptors, class II major histocompatibility complex (MHC), or co-  
02 stimulatory molecules including CD86 and CD28 that allow interactions with  
03 lymphocytes and antigen-presenting cells (2). They also display an array of  
04 receptors involved in innate immunity, including lectin-type receptors and  
05 protease-activated receptors; Toll-like receptor (TLR)-specific mRNAs have  
06 also been detected (3). Triggering eosinophils by engagement of receptors  
07 for cytokines, immunoglobulins, or complement can lead to the secretion of  
08 numerous cytokines [interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-  
09 16, IL-18, and transforming growth factor (TGF) $\alpha/\beta$ ], chemokines (RANTES,  
10 eotaxin), and lipid mediators (platelet-activating factor, leukotriene C4). We  
11 have demonstrated that there is a specific release of Th2 and Th1 immunoreg-  
12 ulatory cytokines and cationic proteins, dependent on the nature of stimulus  
13 (4,5). Furthermore, eosinophils store in their specific granules great quantities of  
14 cytokines and cationic proteins, known to be highly cytotoxic mediators (6,7).  
15 Eosinophil granules contain a crystalloid core composed of major basic protein  
16 (MBP) and a matrix containing eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-  
17 derived neurotoxin (EDN), and eosinophil peroxidase (EPO) (8). They can also  
18 generate reactive oxygen species (ROS). This high cytotoxic potential can lead  
19 to deleterious effects in inflammatory and allergic processes, but it can also be  
20 deployed effectively to combat parasitic targets. We have in particular demon-  
21 strated that eosinophils are able to kill schistosomula, the young larvae of the  
22 helminth parasite *Schistosoma mansoni*, through an IgE-dependent antibody-  
23 dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mechanism (9,10).

24 Eosinophils are able to integrate the different signals of their environment.  
25 They can respond to danger signals, including bacteria (11) or signals derived  
26 from stressed and necrotic cells (12). Moreover, eosinophil numbers have been  
27 documented to be elevated in peripheral blood and/or to infiltrate the tissues in  
28 some malignant disorders (13,14). Several studies have convincingly shown that  
29 tissue or blood eosinophilia was correlated with a significantly better prognosis  
30 (15). A putative tumoricidal activity of eosinophils is supported by recent in  
31 vitro (16) and animal studies (17,18). Not only efficient during helminthic infec-  
32 tions, recent experimental results implicate the eosinophil cytotoxic potential  
33 in antitumor immunity. Eosinophils are also able to induce apoptosis of human  
34 tumor cells, and a new method has been developed to study this tumoricidal  
35 activity (submitted data).

36 Many arguments favor a primordial role for eosinophils in innate immune  
37 responses: the great storage potential of their granules, their prominent tissue  
38 localization at the interface with the external environment, their capacity for  
39 recognition and integration of danger signals, and their high and specific



01 cytotoxic content, which can be rapidly and selectively mobilized through finely  
02 regulated degranulation pathways.

03 In this chapter, we describe methods that can be needed to functionally charac-  
04 terize eosinophils. It is clear that we still have much to learn about this remarkable  
05 type of cell.

## 06 **2. Materials**

### 07 **2.1. Isolation Protocols**

- 09 1. Dextran solution: 4.5% (w/v) dextran T500 (DxT500, Amersham Pharmacia  
10 Biotech, Uppsala, Sweden) in normal saline.
- 11 2. Tyrode's gel: 0.1% (w/v) D-Glucose (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1% (w/v)  
12 NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% (w/v) KCl, 0.8% (w/v) NaCl, 0.005% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% (w/v)  
13 gelatin, pH 7.5–7.8. First dissolve all the components except the gelatin in distilled  
14 water (smaller volume than desired final solution). Dissolve then the gelatin in a small  
15 volume of distilled water while heating slightly (50–60°C). Maintain the prepared  
16 medium at a warm temperature and add the dissolved gelatin (avoid solidification  
17 of the gelatin). Complete with water to the desired volume and sterilize the solution  
18 while heating slightly by filtering successively through cellulose acetate filters of  
19 0.45- $\mu$ m and 0.22- $\mu$ m pore size. This solution can be stored at 4°C for several months.  
20 Just before use, add 0.003% (w/v) DNase I grade II from bovine pancreas (Boehringer  
21 Mannheim, Mannheim, Germany) to avoid DNA aggregates.
- 22 3. Metrizamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO): Prepare a stock solution of  
23 metrizamide 30% (w/v) in Tyrode's gel. Sterilize through a 0.22- $\mu$ m filter and  
24 store at –20°C in the dark (*see Note 1*). This solution is stable for very long periods  
25 of time. Prepare working solutions by dilution in Tyrode's gel (as mentioned in  
26 **Table 1**). In order to be faster during the purification, we recommend preparing  
27 these gradients solutions 1 day before purification and storing them at 4°C.
- 28 4. Phosphate-buffered saline (PBS) 1 $\times$ : always without calcium and magnesium.
- 29 5. Eosinophil purity: The cytocentrifuge (Shandon Cytospin 2) uses a unique sample  
30 chamber assembly that incorporates a plastic sample chamber, a filter card to act  
31 as a blotter, a microscope slide, and a unique stainless steel slide clip. Perform  
32 May-Grünwald Giemsa (MGG) coloration using RAL 555 (Rieux, France).
- 33 6. Percoll solution (d = 1.082 g/mL): In a graduated cylinder, add nine parts (v/v)  
34 of Percoll (d = 1.13 g/mL, Amersham Biosciences) to one part (v/v) of 9% (w/v)  
35 NaCl to have a solution adjusted to approximately 340 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Transfer  
36 this 90% Percoll solution in a bottle and adjust density with physiological saline  
37 (0.9% NaCl). Calculate the required volume of normal saline ( $V$ ) using the  
38 formula:  $V = 1.7 \times V_o - V_{90}$  with  $V_o$  = volume of undiluted Percoll required;  $V_{90}$  =  
39 volume of total 90% Percoll (*see Note 2*). The solution is stable at 4°C for several  
weeks. As all the preparation should be made under a laminar flow hood in sterile  
conditions, filtering is not necessary.

**Table 1**  
**Preparation of Metrizamide Solutions**

Number of gradients		2		4		6	
Total volume (mL)		28		56		84	
Prepared volume (mL)		30		60		90	
Percentage	Density (g/mL)	Stock (mL)	Gel (mL)	Stock (mL)	Gel (mL)	Stock (mL)	Gel (mL)
18	1.105	3.0	2.0	6.0	4.0	9.0	6.0
20	1.115	3.35	1.65	6.7	3.3	10.05	4.95
22	1.125	3.65	1.35	7.3	2.7	10.95	4.05
23	1.130	3.85	1.15	7.7	2.3	11.55	3.45
24	1.135	4.0	1.0	8.0	2.0	12.0	3.0
25	1.140	4.15	0.85	8.3	1.7	12.45	2.55
Total		22	8	44	16	66	24

Stock: solution of metrizamide 30%; gel: Tyrode's gel.

7. Spinal needle (Terumo Corp., Tokyo, Japan).
8. Lysis buffer (isotonic ammonium chloride solution): 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.4. Sterile filtered through 0.45- $\mu$ m and 0.22- $\mu$ m filters. Stable for months at 4°C.
9. Anti-human CD16 and streptavidin-coated magnetic beads, CS and LD columns, and MACS system are from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.
10. Fraction V bovine serum albumin (BSA) (Eurobio, Les Ulis, France): 10% (w/v) stock solution in PBS, filter sterilized and stored at 4°C.
11. Biotinylated anti-mouse antibodies (anti-CD19, anti-CD90, and anti-CD8 $\alpha$ ) and anti-rat antibodies (anti-CD45R, anti-mononuclear phagocytes and anti-CD8 $\alpha$ ): Pharmingen, San Diego, CA.
12. Nylon filter (90  $\mu$ m): PA 90/35 PW WH (SAATitech, Appiano Gentile, CO, Italy).

## 2.2. Cell Culture

1. The eosinophil culture medium (complete medium): RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, and 10  $\mu$ g/mL of gentamycin. Use 100 IU/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin to replace gentamycin.
2. Recombinant human IL-5 (rhIL-5) (Peprotech, Rocky Hill, NJ): Reconstitute in water to a concentration of 100  $\mu$ g/mL. Make small frozen aliquots. Prepare working solution at 5  $\mu$ g/mL by dilution in complete medium. Store at 4°C. Stable for a few months.

- 01 3. Peroxidase cyanide buffer: EPO is specifically detected by a technique based on  
02 the resistance of EPO enzyme to cyanide (*see Note 3*). Dissolve one tablet (10  
03 mg) of the peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)  
04 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 15 mL of Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6, containing  
05 0.4 mg/mL potassium cyanide. This solution is stored at 4°C for 1 month. Just  
06 before use, add 3 µL of 3% (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution to 1 mL of this buffer for a  
07 single use.

### 08 **2.3. Analysis of Specific Markers and Activation Markers**

#### 09 **2.3.1. Flow Cytometry Analysis**

- 11 1. Saponin (Sigma): 10% (w/v) stock solution in PBS, filter sterilized and stored  
12 at 4°C.  
13 2. Paraformaldehyde (Sigma): Prepare a 4% (w/v) solution in PBS. In order to dissolve  
14 it, add concentrated NaOH to increase the pH (up to 10–11) until the solution  
15 is completely clear and then readjust the pH to 7.5 with concentrated HCl. The  
16 solution is aliquoted and can be stored for a long time at –20°C and for 1 month  
17 at 4°C.  
18 3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) membrane buffer (FACS buffer): 1%  
19 (w/v) BSA, 0.05% NaN<sub>3</sub> in PBS.  
20 4. FACS intracellular buffer (IC buffer): 1% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) saponin in PBS.  
21 5. Antibodies: anti-mouse FcγR (2.4.G2), anti-human MBP, and anti-human EPO  
22 mAbs are from Pharmingen. The anti-human ECP (EG2) is from Pharmacia.

#### 23 **2.3.2. Immunocytochemistry**

- 24 1. Tris-buffered saline (TBS): 0.05 M Tris-Base, 154 mM NaCl, pH 7.6.  
25 2. Dako pen, the APAAP detection system (rabbit anti-mouse immunoglobulins and  
26 mouse APAAP complex), New Fuchsin kit, and Mayer's hematoxylin (ready-to-use  
27 aqueous solution) are from Dako (Glostrup, Denmark).  
28 3. Immumount (Shandon, Pittsburgh, PA).  
29 4. Stratalinker UV 2400 (Stratagene, La Jolla, CA).  
30 5. Human serum albumin (HSA) (Sigma): 10% (w/v) stock solution in PBS, filter  
31 sterilized and stored at 4°C.  
32 6. Fluoromount G (Southern Biotechnology Assoc., Birmingham, AL).

### 34 **2.4. Functional Tests**

#### 35 **2.4.1. Mediator Release Assays by Chemiluminescence**

- 36 1. White 96-well cell culture plate with flat bottom and individual lid (Nunc, Roskilde,  
37 Denmark).  
38 2. RPMI 1640 without phenol red (Cambrex Bio Science, Rockland, ME) (*see Note 4*).  
39

- 01 3. Luminol (Sigma) is dissolved at 5 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored  
02 in single use aliquots: volume of 15  $\mu$ L for measurement of ROS and 80  $\mu$ L for  
03 measurement of EPO. Aliquots are stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the dark.
- 04 4. ROS buffer: 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4.
- 05 5. EPO buffer: 15 mM Tris-HCl, pH 6.
- 06 6. D-Luciferin (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland): 0.16 mM in EPO buffer.  
07 Twenty-microliter aliquots are stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for single use (*see Note 5*).
- 08 7. Stimulus: rhIL-5 at a final concentration of 20 ng/mL.
- 09 8. Luminometer: Victor<sup>2</sup>™ Wallac (PerkinElmer, Shelton, CT) allows the  
10 measurement of the intensity of light released by a chemical reaction (chemilumi-  
11 nescence). Data analysis is performed with Wallac 1420™ software.

#### 12 2.4.2. Cytotoxicity Assays

- 13 1. Hank's medium and Modified Eagle's Medium (MEM) (Cambrex).
- 14 2. 96-well flat-bottomed microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark).
- 15 3. PKH-26 red fluorescent cell linker kit (Sigma): Store at room temperature or refrig-  
16 erate. Keep dye stock tightly capped to prevent evaporation.
- 17 4. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (Pharmingen).
- 18 5. Binding buffer (1 $\times$ ): 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ .  
19 Sterilize through 0.45- $\mu\text{m}$  filter. Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 20 6. Colorectal adenocarcinoma cell line, Colo-205 (ATCC LGC Promochem,  
21 Middlesex, UK).

### 22 3. Methods

23 Eosinophils, which are mainly found in tissues, only represent 1–5% of  
24 circulating leukocytes in normal donors. Specific experimental procedures  
25 are thus needed for eosinophil purification from peripheral blood. Two main  
26 protocols of purification can be used to isolate eosinophils. The first to be  
27 described, using metrizamide discontinuous gradients, is based on the specific  
28 cell density of eosinophils and allows one to obtain separately eosinophils with  
29 normal density (normodense) and with lower density (hypodense), the latter  
30 representing the activated phenotype. The second technique, more efficient  
31 regarding the eosinophil purity and the most commonly used today, consists  
32 of blood centrifugation on a Percoll gradient followed by a negative immuno-  
33 magnetic selection by anti-CD16-coated microbeads and the MACS system.  
34 Even if eosinophils are end-stage cells, they can be maintained overnight in  
35 culture. This rest, after the stress of purification, allows turnover of membrane  
36 receptors. Eosinophils are characterized by their phenotypical and functional  
37 heterogeneity, strongly dependent upon eosinophil donors. Studying phenotype  
38 is possible by immunofluorescent staining using two efficient and comple-  
39 mentary techniques like flow cytometry (FCM) and immunocytochemistry

01 (ICC). Indeed, techniques such as enzymatic or fluorescent ICC analysis can  
02 be used to confirm the membrane or intracellular expression of the proteins of  
03 interest observed by FCM analysis. Moreover, ICC on cytospin preparations  
04 can complement results obtained by FCM by localizing the storage sites of the  
05 molecules studied (granular, cytoplasmic, or membrane-like staining).

06 To understand the effector roles of eosinophils, it is necessary to charac-  
07 terize the functional properties of these cells. We describe here two functional  
08 assays: mediator release and cytotoxicity assays. Release of several cytotoxic  
09 mediators, either neo-synthesized (e.g., ROS) or preformed as granule cationic  
10 proteins (e.g., EPO), can be measured by chemiluminescence. After activation,  
11 release of ROS generated by NADPH-oxidase can be measured by luminol-  
12 dependent chemiluminescence. The ROS produced by eosinophil activation  
13 oxidize luminol, and this oxidation results in an excited state of luminol,  
14 which fluoresces and releases photons as it decays to a lower energy level.  
15 Released photons are then collected by a luminometer (*see Note 6*). EPO,  
16 which constitutes ~25% of the total protein mass of specific granules, catalyzes  
17 the oxidation reactions to form highly ROS and reactive nitrogen metabo-  
18 lites. As EPO is released during degranulation by activated eosinophils, it  
19 can be considered to be a marker of eosinophil activation and degranulation.  
20 EPO release can also be measured by chemiluminescence. The cytotoxicity  
21 assays presented here are based on protocols measuring in vitro beneficial  
22 cytotoxic properties of eosinophils toward two different targets, helminthic  
23 parasite larvae and tumor cell lines. First, parasite killing by purified human  
24 eosinophils is an IgE-dependent ADCC mechanism and seems restricted  
25 to hypodense eosinophils present only in highly hypereosinophilic patients.  
26 Concerning antitumor activity of eosinophils, several in vitro arguments  
27 allow one to postulate that eosinophils are also able to use effectively their  
28 cytotoxic potential toward human tumor cell lines by inducing their apoptosis  
29 (submitted data).

30 To complete our description of methods for eosinophil study, we describe  
31 here isolation protocols for mouse and rat eosinophil purification. The main  
32 experimental procedures detailed for human eosinophils—immunostaining  
33 (FCM and ICC) and mediator release and cytotoxicity experiments toward  
34 parasite targets—can be used with murine eosinophils. Protocol modifications  
35 are then mentioned in notes if needed. Although murine models are advan-  
36 tageous to study eosinophil physiology in vivo, several differences observed  
37 between murine and human eosinophils have to be seriously considered (**19**).  
38 First, mouse eosinophils are poorly granulated, in contrast to rat and human  
39 eosinophils (see **Fig. 1c** and **Fig. 2**), and therefore granule release is more

**Table 2**  
**Different Expression of Ig Receptors in Human, Mouse,**  
**and Rat Eosinophils (18, 19)**

Receptors	Ligand	Human	Mouse	Rat
FcεRI	IgE	Yes <sup>a</sup>	No <sup>b</sup>	Yes
CD89	IgA	Yes	No	mRNA
pIgR	IgA/IgM	Yes	No	No
FcαμR	IgA/IgM	No	mRNA	No
Tf-R	Tf/IgA	Yes (Tf-R1)	Yes (Tf-R1, -R2)	No

Tf, transferrin.

<sup>a</sup> Only expressed on activated cells.

<sup>b</sup> In human IL-5/FcεRIα transgenic mouse, eosinophils express FcεRI with a distribution similar to human cells.

difficult to induce. Second, differences in IgE and IgA membrane receptor expression have been described, as summarized in **Table 2 (20)**.

### 3.1. Isolation Protocols

#### 3.1.1. Purification of Human Eosinophils

##### 3.1.1.1. BLOOD SAMPLING

1. Collect human venous blood from subjects in vacutainers containing heparin or sodium citrate as anticoagulant. Be careful of taking a minimum of 80–100 mL of venous blood if it is a normal donor in order to have enough purified eosinophils. The donors should not have received any corticosteroids or histamine antagonists at the time of the study. It is better they not received such therapy in the preceding weeks.
2. Maintain fresh blood at room temperature and use it as soon as possible (maximum 3–4 h).

##### 3.1.1.2. METRIZAMIDE DISCONTINUOUS GRADIENTS

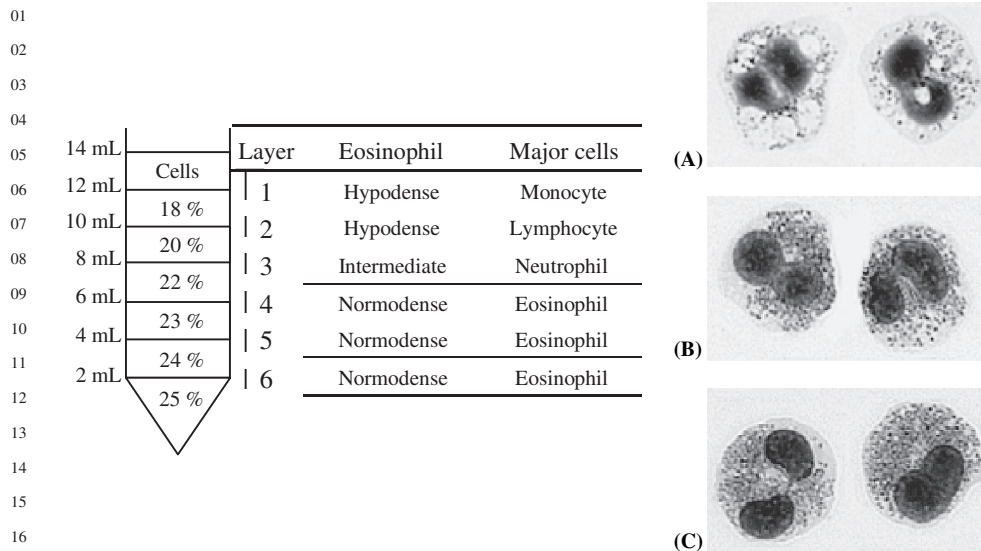
1. Maintain all the solutions used before erythrocyte lysis at room temperature. Perform dextran sedimentation by adding five volumes of heparinized blood to one volume of the dextran solution under a laminar flow hood at room temperature. When the level of sedimentation is stabilized, collect the leukocyte rich supernatant, wash it in Tyrode's gel, and centrifuge at  $500 \times g$  for 8 min (*see Note 7*).
2. Remove the contaminating erythrocytes by hypotonic lysis by adding one volume of 0.2% (w/v) ice-cold NaCl solution to the cell pellet for 10 s while mixing. Restore the physiological osmolarity by addition of one volume of 1.6% (w/v) NaCl

- 01 solution. Centrifuge immediately at 4°C for 8 min at 350 × g. Repeat once the  
02 lysis step.
- 03 3. Wash the cells with Tyrode's gel containing DNase (*see Note 8*). Centrifuge at 4°C  
04 for 8 min at 700 × g. Resuspend the preparation of mixed leukocytes at 25 × 10<sup>6</sup>  
05 to 50 × 10<sup>6</sup> cells per mL in Tyrode's gel.
- 06 4. Prepare the discontinuous metrizamide gradient (this step can be performed during  
07 dextran sedimentation) by using metrizamide solutions prepared 1 day before as  
08 mentioned in **Subheading 2.1., step 3**. With a transfer pipet carefully layer 2 mL  
09 of each metrizamide solution (from 1.140 to 1.105 g/mL density) in a 15 mL tube  
10 (*see Note 9*) and then layer on the top 2 mL of leukocytes suspension in Tyrode's  
11 gel. The details of the metrizamide gradient are presented in the table in **Fig. 1**.
- 12 5. Centrifuge at 1200 × g for 45 min at 20°C (without brake) and recover the different  
13 layers of the metrizamide gradient. Wash the cell suspensions three times with PBS  
14 [centrifugation respectively at 700 × g (*see Note 10*), 550 × g, and 450 × g].
- 15 6. Determine the eosinophil purity: cytocentrifuge the cell suspension for 2 min at  
16 10 × g (prepare a dilution in PBS to have 10<sup>5</sup> cells/100 μL/cytospin) and then  
17 stain cytospin with RAL 555 coloration. Typical results are presented in **Fig. 1**.  
18 One can see morphological changes such as cytoplasmic vacuoles and reduced  
19 numbers and size of granules in activated eosinophils, called "hypodense." We  
20 recommend counting a minimum of 300 cells per cytospin for a good estimation.  
21 The contaminating cells are mainly neutrophils (*see Note 11*).

### 22 3.1.1.3. CD16-COATED BEADS AND MACS SYSTEM

- 23 1. The first step consists of separation of polynuclear and mononuclear cells using a  
24 Percoll gradient (*see Note 12*). Distribute fresh blood in 50-mL tubes (maximum  
25 15 mL per tube) and dilute with PBS (1:1 v/v). After mixing, add gently 15 mL  
26 Percoll solution (d = 1.082 g/mL) at the bottom of the tube using a spinal needle  
27 and centrifuge at room temperature, 700 × g for 20 min without brake.
- 28 2. After centrifugation, the pellet contains red blood cells and granulocytes and the  
29 thin layer at the interface of Percoll and plasma contains mononuclear cells. After  
30 removal of excess plasma, collect carefully the peripheral blood mononuclear cell  
31 (PBMC) layer. Remove all the Percoll and transfer the pellet to new 50-mL tubes  
32 (no more than 10 mL pellet volume per tube) (*see Note 13*).
- 33 3. Perform a hypotonic lysis to remove the contaminating erythrocytes by adding  
34 40 mL of ice-cold lysis buffer directly onto the remaining pellet, mix vigorously,  
35 and leave on ice for 15 min. After centrifugation at 500 × g, 4°C for 15 min,  
36 pool all the pellets in one tube and repeat a second lysis step for 10 min on ice  
37 (*see Note 14*).
- 38 4. Resuspend the granulocytes in cold PBS, count them, and determine the percentage  
39 of neutrophils and eosinophils by staining cytocentrifuged preparation with RAL  
555 coloration. We recommend counting a minimum of 300 cells per cytospin for  
a good estimation.





18 Fig. 1. Human eosinophils purified on metrizamide gradients. Cells are centrifuged  
19 on microscope slides and stained with RAL 555 as described in **Subheading 3**.  
20 Notice the bilobated nucleus and numerous orange granules. (A) Layer 2: hypodense  
21 eosinophils, (B) Layer 3: eosinophils with intermediate density, (C) Layer 4:  
22 normodense eosinophils ( $\times 100$ ). (D) Representation of the metrizamide gradient layers  
23 and cellular composition.

- 24
- 25 The second part of the purification procedure consists of a negative selection of  
26 eosinophils using the MACS system. Resuspend granulocytes in 500  $\mu\text{L}$  ice-cold  
27 filtered PBS–BSA 0.5% and incubate with anti-CD16-coated magnetic beads (80  
28  $\mu\text{L}$  beads for  $100 \times 10^6$  polynuclear neutrophils) for 30 min in the fridge (less cold  
29 than on ice) with intermittent gently mixing (*see Note 15*).
  - 30 Equilibrate the column with cold PBS–BSA 0.5% (it is recommended to perform  
31 this step during incubation with the magnetic beads). For CS column, proceed as  
32 follows: Flush gently the column from the side with 10 mL of buffer to remove air  
33 bubbles, and then add 15 mL buffer at the top. Just before adding the granulocyte  
34 suspension (in 4 mL), add 3 mL of ice-cold PBS–BSA 0.5%. Eosinophils are eluted  
35 following passage through the field of a permanent magnet. After reaching 25 mL  
36 of eluate, flush the column again from the side and continue to collect eluate until  
37 50 mL. Centrifuge the eluted cells at  $350 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , and count them in PBS.
  - 38 Determine the purity of eosinophils on cytocentrifuged preparations after RAL 555  
39 coloration. A purity  $>98\%$  is usually obtained. One really needs to be careful during  
all the procedure to avoid contaminating cells. Contaminating cells are mainly  
lymphocytes (*see Note 16*).



## 01 3.1.2. Purification of Mouse Eosinophils

02 Mouse eosinophils are purified from IL-5 transgenic mice by negative  
03 selection using the MACS system (21). These transgenic mice have the  
04 advantage to exhibit massive eosinophilia in blood and different organs like  
05 spleen, bone marrow, and peritoneal exudate.  
06

- 07 1. To obtain peritoneal cells, flush the peritoneal cavity with ice-cold PBS. Perform  
08 gentle dissociation of the spleen in ice-cold PBS to obtain splenocytes. Isolate bone  
09 marrow cells from femur and tibia of mice by flushing the bone marrow cavities  
10 with ice-cold PBS.
- 11 2. Perform a hypotonic lysis to remove erythrocytes by adding ice-cold lysis buffer  
12 on the pellet (5 mL for spleen cells and 2–3 mL for bone marrow cells). Mix and  
13 leave for 10 min (spleen cells) or 5 min (bone marrow cells) on ice (see Note 17).  
14 Centrifuge for 10 min at  $350 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 15 3. Remove aggregates by filtering the cell suspensions onto a 90- $\mu\text{m}$  nylon filter. Place  
16 a piece of sterile filter on the top of a 50-mL tube. Prewet the filter with two drops  
17 of PBS and then gently layer the cells and let them go through. Centrifuge for 10  
18 min at  $350 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 19 4. Resuspend the cells at  $1 \times 10^8$  cells/mL in cold PBS containing 0.5% BSA and  
20 2 mM EDTA, and incubate for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with biotinylated anti-CD19, anti-  
21 CD90 (Thy1.2), and anti-CD8 $\alpha$  (Ly-2). These antibodies will remove B cells,  
22 macrophages, and T lymphocytes, respectively.
- 23 5. After washing with PBS, resuspend the cells at  $1 \times 10^8$  cells/mL in PBS + 2 mM  
24 EDTA and incubate for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with streptavidin magnetic beads.
- 25 6. Equilibrate the LD column with cold PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA.
- 26 7. Collect the eosinophils by passage through the field of a permanent magnet. Collect  
27 the eluate and centrifuge at  $350 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min.
- 28 8. Count the cells and estimate the cell purity on cytopsin preparation (see  
29 **Subheading 3.1.1.**). Typical results are presented in **Fig. 2**. Notice the morpho-  
30 logical changes of mouse eosinophils compared with human eosinophils, such as  
low granularity and circular nucleus. Cell purity is usually 95–97%.

## 31 3.1.3. Purification of Rat Eosinophils

32 Rat eosinophils are obtained from the peritoneal cavity of LouM rats by  
33 negative selection using the MACS system (22). In order to induce a cell influx  
34 in the peritoneal cavity, we injected rats intraperitoneally with 30 mL of 0.9%  
35 (v/w) NaCl 48 h before killing.  
36

- 37 1. To obtain peritoneal cells, flush the peritoneal cavity with 40 mL of ice-cold PBS.
- 38 2. Remove aggregates by filtering the cell suspensions onto a 90- $\mu\text{m}$  nylon filter, as  
39 described in **Subheading 3.1.2.**

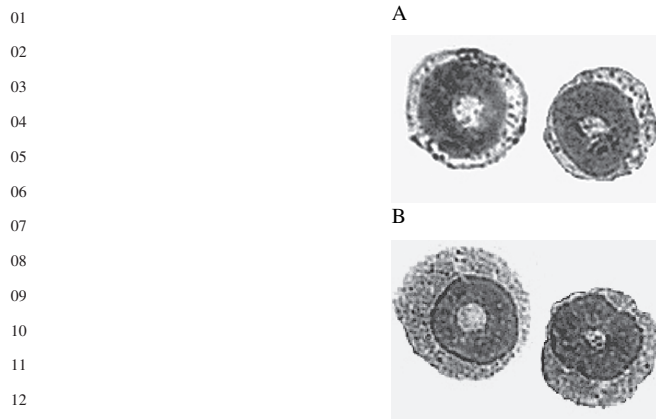


Fig. 2. Murine eosinophils stained with RAL 555 as described in **Subheading 3**. Note the circular nucleus of a mouse (**A**) and a rat (**B**) eosinophil. Notice the low granularity (dark spots) in mouse eosinophils compared with human and rat ones ( $\times 100$ ).

3. Perform a hypotonic lysis to remove erythrocytes by adding 5 mL ice-cold lysis buffer on the pellet, mix and leave for 5 min on ice. Centrifuge for 10 min at  $350 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Resuspend the cells at  $2 \times 10^6$  cells/mL in culture medium and culture for 90 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in order to allow macrophages to adhere to the surface of the culture flask.
5. Collect supernatants and centrifuge at  $350 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min.
6. Resuspend the cells at  $1 \times 10^8$  cells/mL in PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA.
7. Incubate the cells for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with biotinylated anti-CD45R, anti-mononuclear phagocytes (1C7), and anti-CD8 $\alpha$ . These antibodies will remove B cells, macrophages, and T cells.
8. After washing with PBS, resuspend the cells at  $1 \times 10^8$  cells/mL in PBS + 2 mM EDTA and incubate for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with streptavidin magnetic beads.
9. Collect eosinophils, count them, and estimate the cell purity as described in **Subheading 3.1.2., steps 7 and 8**. The cell morphology of rat eosinophils is presented in **Fig. 2**. Cell purity obtained with rat eosinophils is usually 85–90% (*see Note 18*).

### 3.2. Culture Conditions

#### 3.2.1. Eosinophils

1. Purified human eosinophils can be cultured overnight at  $2 \times 10^6$  per mL in complete medium. Increased adhesion of activated eosinophils and mortality of these end-stage cells explain a usual output of 50–75% (*see Note 19*).

- 01 2. IL-5 (1–2.5 ng/mL) can be added to the culture medium to improve eosinophil  
02 survival. Higher concentrations of IL-5 could activate eosinophils and induce  
03 apoptosis (not recommended).
- 04 3. As the purification protocol can generate some cellular stress and increase the  
05 basal activation state of eosinophils, overnight culture with complete medium is  
06 recommended and allows turnover of membrane receptors for phenotype study and  
07 eosinophils to rest before functional assays.
- 08 4. Purified mouse and rat eosinophils are cultured up to 4 days in culture medium  
09 supplemented with 2.5 ng/mL rhIL-5.

### 11 3.2.2. Eosinophilic Cell Lines

12 Three eosinophilic cell lines are available:

- 15 1. YY-1: The YY-1 cell line was kindly provided by Dr. J. Chihara (Akita University,  
16 Akita, Japan) (23). This eosinophilic cell line is derived from the promyelocytic  
17 leukemia cell line HL-60. Cells are maintained in culture in complete medium and  
18 induced to further differentiate into eosinophil-like cells using 0.3 mM butyric acid  
19 as shown in **Fig. 3**.
- 20 2. AML14.3D10: The AML14.3D10 cell line was kindly provided by Dr. Cassandra  
21 Paul (Wright State University, Dayton, OH) (24). This cell line is a fully differ-  
22 entiated eosinophilic myelocyte subline of the AML14 cell line that continues to  
23 proliferate and maintain a differentiated eosinophil phenotype without cytokine  
24 supplementation. It displays many of the characteristics of mature peripheral blood  
25 eosinophils, including constitutive expression of the granule cationic proteins (MBP,  
26 EPO, EDN, and ECP) and Charcot–Leyden crystal (CLC) protein as shown in  
27 **Fig. 3**. AML14.3D10 cells are maintained in culture in complete medium containing  
28  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol.
- 29 3. Eol-1: The Eol-1 cell line was kindly provided by Dr. J. Chihara (Akita, Japan) (25).  
30 This cell line is derived from the blood of a 33-year-old man with acute eosinophilic  
31 leukemia following hypereosinophilic syndrome. Although the Eol-1 cells do not  
32 show visible granules, they express ECP and the fusion protein FIP1L1–PDGFR $\alpha$ ,  
33 which has been recently shown to be associated to the myeloproliferative form of  
34 the hypereosinophilic syndrome and to chronic eosinophilic leukemia (26).
- 35 4. YY-1 and AML14.3D10 cell lines are cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, up to a maximum  
36 density of 10<sup>6</sup> cells/mL. Cultures are diluted in fresh medium twice a week. Fresh  
37 cultures are started from frozen stocks after a maximum of 30 passages to minimize  
38 genetic drift and phenotypic changes. The Eol-1 cell line is maintained in culture  
39 in complete medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and is diluted in fresh medium twice  
a week.

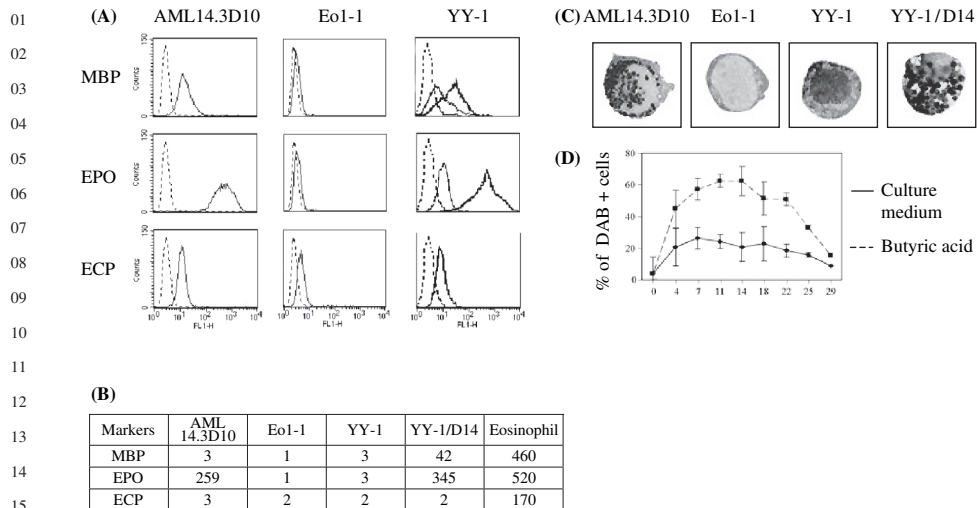


Fig. 3. Analysis by flow cytometry (A, B) and by immunocytochemistry (C, D) of cationic proteins contained in the eosinophilic cell lines, AML14.3D10, Eo1-1, and YY-1. (A) Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-cationic protein (thin line) or isotype-matched antibody (dashed line). Staining obtained with YY-1 cells differentiated for 14 days under butyric acid (YY-1/D14) is represented in bold line. (B) Mean fluorescence intensity values of staining obtained for the cationic proteins in the eosinophilic cell lines in comparison with blood peripheral eosinophils. (C) Eosinophil peroxidase (EPO) detection using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining of cytopsin ( $\times 100$ ). (D) Kinetic of YY-1 differentiation by butyric acid as determined by the percentage of DAB+ cells.

### 3.3. Analysis of Specific Markers and Activation Markers

#### 3.3.1. Flow Cytometry Analysis

Eosinophils are highly granular cells. Forward scattered/side scatter (FSC/SSC) criteria are represented by a dot plot in **Fig. 4A**.

1. Membrane staining: To avoid the turnover of membrane receptors, perform the whole experiment on ice (*see Note 20*). After two washes in PBS, resuspend the eosinophils at  $4 \times 10^6$ /mL in FACS buffer. Add 50  $\mu$ L of the cell suspension in round-bottom 96-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well). For direct staining, incubate with the labeled antibody 30–45 min in the dark and then wash the cells twice with FACS buffer (200  $\mu$ L/well) (*see Note 21*). At the end, resuspend the cellular pellet in 100  $\mu$ L PBS, transfer samples in appropriate FACS tubes, and add 100  $\mu$ L of

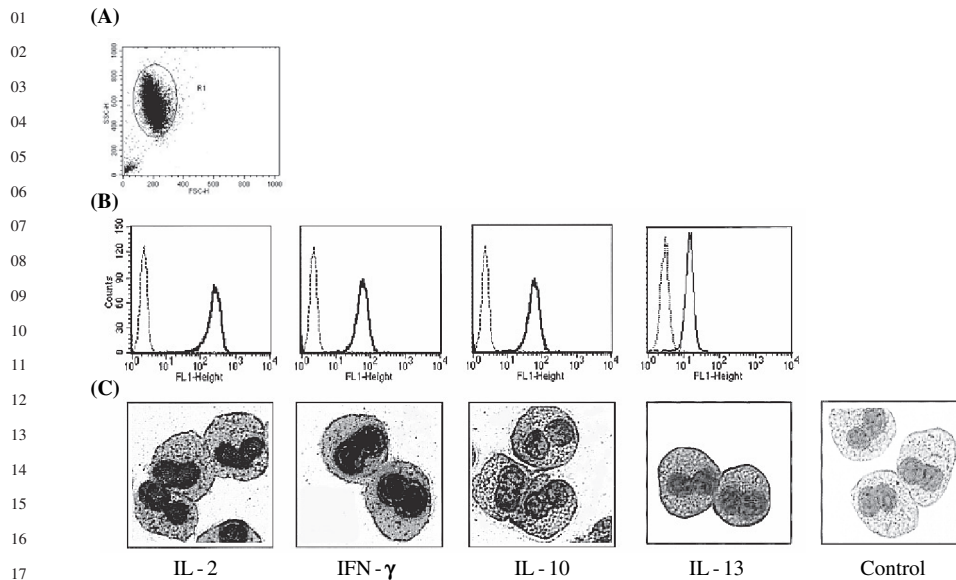


Fig. 4. Flow cytometry and immunocytochemistry (ICC) analysis of eosinophils. (A) Dot plot representation of freshly purified eosinophils. (B, C) Intracellular staining of Th1 and Th2 cytokines analyzed by immunofluorescence cytometry and ICC. (B) Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-cytokine (bold line) or isotype-matched antibody (dashed line). Dot plot and histograms are obtained using a FACSCalibur equipped with the CellQuest software. (C) ICC staining on cytopsin eosinophils revealed using APAAP detection system and New Fuchsin coloration ( $\times 100$ ). (B) and (C) are reproduced from **ref. (2)** (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10) and **ref. (5)** (IL-13).

FACS buffer. Staining with directly-labeled antibody is highly recommended and preferred to indirect staining (*see Note 22*). For indirect staining, incubate the cells with the primary antibody for 30 min, wash twice with FACS buffer (200  $\mu$ L/well), and then add the secondary antibody for 20 min in the dark. If necessary, non-specific binding of secondary antibody can be previously blocked by the addition of serum (10%) of the same species directly on the cell pellet during 10 min at 4°C before incubation with the labeled antibody. Analyze the samples within 2 h (*see Note 22*).

- Intracellular staining: After fixation of the cells, the experiment can be performed at room temperature. To fix the cells, resuspend eosinophils at  $4 \times 10^6$ /mL in PBS and then add the same volume of 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C. After washing in PBS and centrifugation for 7 min at  $350 \times g$ , permeabilize the cells ( $4 \times 10^6$ /mL) for 10 min in IC buffer. Add directly 50  $\mu$ L ( $2 \times 10^5$ ) of the cell suspension

- 01 to round-bottom 96-well plates. For direct staining, first block non-specific binding  
02 by incubating the cells for 10 min with 10% of serum from the species of your  
03 antibody and then add the labeled antibody for 30 min in the dark. For indirect  
04 staining, incubate the cells with the primary antibody for 30 min, wash twice with  
05 IC buffer, block non-specific binding with serum (10%), and incubate with the  
06 secondary antibody for 20 min in the dark (*see Note 23*). Wash the cells twice with  
07 IC buffer (200  $\mu$ L) and once with PBS in order to remove saponin. Resuspend the  
08 pellet in 200  $\mu$ L PBS + 0.5% BSA and analyze within 2 h (*see Note 24*).
- 09 3. Acquisition step: A total of  $10^4$  events are usually acquired for each sample. Analyze  
10 on a FACSCalibur<sup>TM</sup> using the CellQuest<sup>TM</sup> software (Becton Dickinson, Mountain  
11 View, CA) (*see Note 25* and **Fig. 4**).

### 12 3.3.2. Immunocytochemistry

13 For the two procedures described below, perform cytopins from freshly  
14 purified eosinophils as described above or from eosinophils cultured overnight  
15 in complete medium with rhIL-5 (2.5 ng/mL).

#### 16 3.3.2.1. ENZYMATIC IMMUNOCYTOCHEMISTRY

17 The cytopin preparations presented in **Fig. 4** are processed for using the  
18 APAAP method, followed by counterstaining with hematoxylin.

- 19
- 20 1. Encircle eosinophil spot with Dako pen to provide a barrier to liquids. Perform each  
21 step of incubation by adding around 100  $\mu$ L of solution on the spot, and after each  
22 incubation or washing step, tap off excess liquid (*see Note 26*).
  - 23 2. Fix in cold acetone/methanol (1:1 v/v) for 10 min and rehydrate in TBS for 10 min  
24 (*see Note 27*).
  - 25 3. each incubation step, wash cytopins for  $3 \times 10$  min in TBS containing 0.1% BSA  
26 (*see Notes 28* and **29**).
  - 27 4. After blocking unspecific sites with TBS + 3% BSA for 30 min, incubate cytopins  
28 with unlabeled mouse anti-human cytokine or isotype control monoclonal antibodies  
29 at 40  $\mu$ g/mL in TBS + 3% BSA overnight at 4°C.
  - 30 5. Incubate the slides with rabbit anti-mouse immunoglobulins (1:25) in TBS + 3%  
31 BSA for 1 h at room temperature, followed by incubation with the APAAP complex  
32 (1:40) for 1 h (*see Note 30*).
  - 33 6. After an additional wash for  $2 \times 10$  min in TBS, the reaction is developed with  
34 New Fuchsin substrate (*see Note 31*).
  - 35 7. Counterstain slides with Mayer's hematoxylin for 4 min (nuclear blue staining) and  
36 apply coverslips with Immumount.

#### 37 3.3.2.2. IMMUNOFLUORESCENCE

- 38 1. After **step 1** (*see Subheading 3.3.2.1.*), fix eosinophil cytopins in 4%  
39 paraformaldehyde for 10 min and rehydrate in 0.05 M PBS, pH 7.4 (*see Note 32*).

- 01 2. Quench endogenous fluorescence by exposition to UV ( $3 \times 2$  min at 0.12 joules)  
02 using a Stratalinker, followed by incubation with 0.1 M glycine for 4 min and  
03 incubation with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 7.4, for 15 min. After each incubation step,  
04 wash cytopins for 10 min in PBS under soft agitation (*see Note 33*).
- 05 3. To prevent non-specific binding, incubate the slides for 30 min with PBS + 3%  
06 BSA supplemented with 5% HSA. After one additional wash in PBS, incubate  
07 cytopins with primary antibodies overnight in the fridge in a wet chamber.
- 08 4. After washing  $2 \times 10$  min in PBS + 0.1% BSA, incubate the slides with secondary  
09 antibodies in PBS + 3% BSA + 5% HSA for 2 h and then with streptavidin–Texas  
10 red in PBS + 3% BSA for 1 h.
- 11 5. Perform a final step of washes with PBS + 0.1% BSA + 0.02% Tween 20 for  
12  $2 \times 10$  min and with PBS for 10 min. Cytopins are mounted with Fluoromount G  
13 and analyzed by fluorescence microscopy using an oil immersion objective. Texas  
14 red fluorophores require excitation at 543 nm; select the fluorescence emissions  
15 wavelengths pass bands between 581 and 621 nm in accordance with the emission  
16 spectral analysis.

### 17 3.4. Functional Tests

#### 18 3.4.1. Mediator Release Assays by Chemiluminescence

##### 19 3.4.1.1. ROS PRODUCTION

- 21 1. Pre-incubate purified eosinophils ( $3 \times 10^5$  cells per well) in 25  $\mu\text{L}$  RPMI 1640  
22 without phenol red in white 96-well plate for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  (*see*  
23 **Note 34**).
- 24 2. Program the luminometer and prewarm it at  $37^\circ\text{C}$ .
- 25 3. Five minutes prior measurement, prepare luminol solution (0.015 mg/mL) with one  
26 15- $\mu\text{L}$  aliquot in 3 mL ROS buffer.
- 27 4. Add 25  $\mu\text{L}$  of stimulus solution to the 25  $\mu\text{L}$  of eosinophil suspension immediately  
28 before running measurements in the Victor<sup>2</sup>™ Wallac luminometer. Measure ROS  
29 production immediately by the addition of 50  $\mu\text{L}$  of luminol (in injector 1) (*see*  
30 **Note 35**). Perform kinetics at  $37^\circ\text{C}$  over 60-min time period, and for each time-  
31 point, count chemiluminescence for 5 s. Results are expressed in counts per second  
32 (CPS).

##### 33 3.4.1.2. MEASUREMENT OF EPO FOR ASSESSMENT OF DEGRANULATION

- 34 1. Incubate purified eosinophils ( $2 \times 10^5$ ) in 50  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 without phenol red  
35 either alone or with 50  $\mu\text{L}$  stimulus (e.g., rhIL-5 at a final concentration of 20  
36 ng/mL) in 96-well plates at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  (final volume of 100  $\mu\text{L}$ ).
- 37 2. After 2 h stimulation, centrifuge the plate 10 min at  $300 \times g$  and transfer 50  $\mu\text{L}$  of  
38 supernatant in a white 96-well plate. Keep the plate on ice.
- 39 3. Prepare the following solutions and keep them on ice in the dark:



- 01 a. Luminol (80- $\mu$ L aliquot) and D-luciferin (20- $\mu$ L aliquot) in 4 mL EPO buffer.
- 02 b.  $H_2O_2$  solution: 15  $\mu$ L of 30% (w/w)  $H_2O_2$  solution (stored in the dark at 4°C)
- 03 in 3 mL EPO buffer.

04 These solutions should be used immediately and cannot be stored.

- 05 4. Program the luminometer.
- 06 5. Add the luminol/D-luciferin solution in injector 1 and  $H_2O_2$  solution in injector 2
- 07 (see **Note 36**). Start running the protocol: 100  $\mu$ L luminol/D-luciferin and 50  $\mu$ L
- 08  $H_2O_2$  will be added per well (see **Note 37**) to the supernatants. Only one measure
- 09 is taken and the results are expressed in CPS.

### 10 3.4.2. Cytotoxicity Assays

#### 11 3.4.2.1. CYTOTOXIC ACTIVITY OF EOSINOPHILS TOWARD PARASITIC TARGETS

- 13 1. *Schistosoma mansoni* schistosomula are the targets of the cytotoxicity assays and
- 14 their obtention is based on the transformation of the infective larvae, the cercariae,
- 15 into schistosomula after skin penetration, which is enhanced by light illumination.
- 16 Schistosomula are prepared according to the skin-penetration procedure: under
- 17 sterile conditions, shave with caution the abdomen of an anesthetized normal albino
- 18 OF1 mouse and cut off the shaved skin. Degrease the inner leaflet of this skin
- 19 sample with a gauze to facilitate the transpenetration of the cercariae, the invading
- 20 form of *S. mansoni*. Fill the bottom part of a glass collector with Hank's medium.
- 21 Place then the thin skin sample on the top of the collector (without air bubbles
- 22 underneath) and assemble the upper part of the chamber. Fix the system with pliers
- 23 and put the cercaria suspension on the skin. Protect the top of the collector from
- 24 the light to allow cercariae to be attracted by the light at the bottom and to cross
- 25 the skin barrier. Incubate the bottom collector for 2 h in a water bath at 37°C.
- 26 During skin penetration, cercariae mature to become larvae called schistosomula.
- 27 After separation of the two parts of the collector, recover then the larvae-containing
- 28 medium and centrifuge it at  $100 \times g$  for 3 min. Keep schistosomula overnight in
- 29 96-well flat-bottomed plate at 37°C, 5%  $CO_2$ , in MEM with 1% normal serum
- 30 before use in the cytotoxicity assay. They can be kept longer in medium culture.
- 31 Only schistosomula obtained 3 h after skin penetration are susceptible targets for
- 32 cytotoxicity (see **Note 38**).
- 33 2. Because eosinophils need to be activated by antibodies to become cytotoxic in this
- 34 ADCC procedure, use unheated serum samples from *S. mansoni*-infected patients
- 35 (IgE-rich) as a source of IgE antibodies (see **Note 39**).
- 36 3. For IgE-mediated eosinophil-dependent cytotoxicity, add 50  $\mu$ L of the schistosomula
- 37 suspension containing 50 targets (1000/mL) in MEM supplemented with 1% heat-
- 38 inactivated FCS in flat-bottomed microtiter plates. Then add 50  $\mu$ L of unheated
- 39 serum from *S. mansoni*-infected patients or normal subjects as controls at a final
- dilution of 1:32 together with 100  $\mu$ L of effector cells at an effector/target ratio of
- 5000/1 (see **Note 40**) (9).



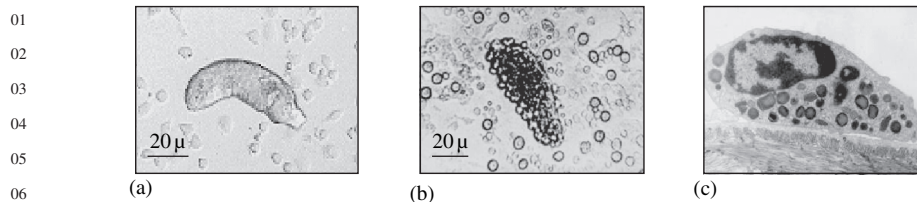


Fig. 5. Eosinophil cytotoxicity toward *Schistosoma mansoni* schistosomula. (A) Living schistosomula. (B) After 48-h coculture, eosinophils firmly adhered to schistosomula. Photographs by light microscopy ( $\times 100$ ). (C) Adhesion of an hypodense eosinophil to schistosomula by electron microscopy.

- Evaluate the percentage of schistosomula with adherent eosinophils and the percentage of cytotoxicity (dead schistosomula) by optical microscopic examination after 24- and 48-h culture at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . After 24 h, eosinophil adherence to schistosomula can be easily observed and quantified. After 48 h, the percentage of dead schistosomula can be counted (*see Fig. 5*). No additional staining is required to differentiate dead or alive schistosomula, because live parasites are transparent and dead larvae are becoming black and are surrounded by numerous adherent eosinophils.

#### 3.4.2.2. CYTOTOXIC ACTIVITY OF EOSINOPHILS TOWARD TUMOR CELL LINES

- Determine eosinophil-mediated cytotoxicity against tumor cell lines by using PKH-26 and Annexin V-FITC stainings (*see Note 41*).
- After overnight culture in complete medium, test for eosinophils' (effector cells; E) cytotoxicity against carcinoma cell lines (target cells; T). Culture eosinophils in 96-well U-bottom plates at  $2 \times 10^6$  per mL ( $4 \times 10^5$  eosinophils per well).
- Stain target cells with  $10 \mu\text{M}$  PKH-26 according to the manufacturer's instructions. Perform all steps at room temperature. Place  $2 \times 10^6$  cells in a conical bottom polypropylene tube and wash once in PBS. After centrifugation for 5 min at  $350 \times g$ , carefully aspirate the supernatant leaving no more than 25  $\mu\text{L}$  on the cell pellet. Resuspend the cells at  $10^7$  per mL in diluent C (supplied with the kit), pipetting to ensure complete dispersion. Do not vortex. Prior to staining, prepare a  $20 \mu\text{M}$  PKH-26 dye solution using diluent C. Add an equal volume of this PKH-26 solution to the cell suspension and immediately mix by pipetting. Incubate for 5 min. Stop the reaction by adding an equal volume of FCS. After 1 min incubation, dilute with 10 mL PBS. Centrifuge at  $400 \times g$  for 10 min (*see Note 42*). After three washes, resuspend stained cells in complete medium and add the target cells ( $1.6 \times 10^4$  per well) to the plate containing eosinophils (E:T ratio of 25:1).
- After 6-h coculture, measure apoptotic cell death by FCM using FITC-conjugated Annexin V. Recover the cells from the plate and wash the samples twice with cold

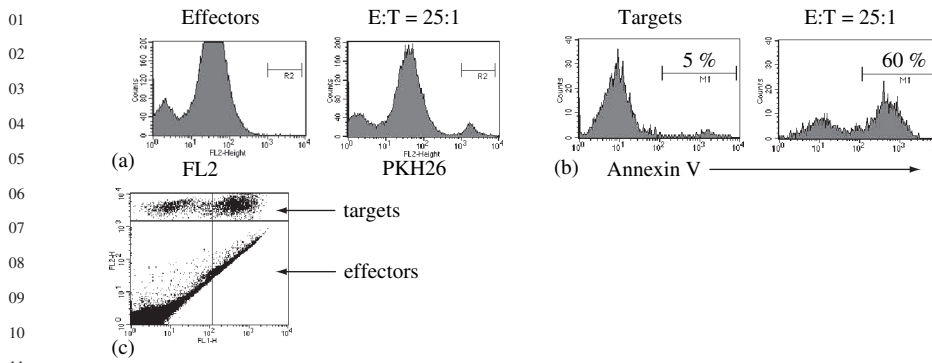


Fig. 6. Eosinophil tumoricidal activity after 6-h coculture with Colo-205. (A) FL2 fluorescence of effectors (eosinophils) and effectors plus targets cells. A high PKH26 staining of targets allows to gate them on R2 (FL2 high cells). (B) Annexin V–fluorescein isothiocyanate (FITC) staining (FL1) on PKH26+ cells, gated on R2. Eosinophil coculture induces apoptosis of Colo-205 (55%). (C) Dot plot representation, not gated. Observe the good separation of the cell populations. Histograms and dot plot are obtained using a FACSCalibur equipped with the CellQuest software.

PBS. Resuspend cells in binding buffer at  $2 \times 10^6/\text{mL}$  and incubate with Annexin V-FITC (5  $\mu\text{L}$  per test) for 15 min at room temperature in the dark (*see Note 43*). Analyze by FCM as soon as possible (within 1 h).

5. Acquisition step: A total of 5000 PKH-26<sup>+</sup> cells are usually acquired per experimental condition and analyzed on a FACSCalibur™ using the CellQuest™ software. Eosinophil-mediated cytotoxicity against tumor cells is determined by evaluation of the number of PKH-26<sup>+</sup> Annexin V<sup>+</sup> cells. A representative experiment performed with a colon carcinoma cell line is shown in **Fig. 6**.

#### 4. Notes

1. Metrizamide is not autoclavable; therefore the solution has to be sterilized by filtration. This is an important point because metrizamide solutions are susceptible to bacterial degradation.
2. Percoll has to be used at room temperature to avoid errors of measurement caused by volume retraction. The coefficient 1.7 used in the formula comes from the following equation:  $(d_0 - 1)/(d - 0.1d_{10} - 0.9)$ , where  $d_0$  = density of Percoll undiluted (1.13 g/mL);  $d$  = desired density of final working solution (1.082 g/mL); and  $d_{10}$  = density of 1.5 M NaCl (1.058).
3. Detection of EPO by ICC using DAB staining and by FCM are two complementary protocols: DAB solution allows one to detect only mature EPO whereas anti-EPO

- 01 antibody used for FCM can detect mature and immature forms of the eosinophil  
02 peroxidase.
- 03 4. The use of RPMI 1640 without phenol red, rather than PBS, allows an optimal  
04 activation of eosinophils. Neither FCS nor BSA should be present in the medium  
05 because these proteins give a high background in chemiluminescence measure-  
06 ments.
- 07 5. Contrary to D-luciferin obtained from Sigma, we have found D-luciferin from  
08 Roche Diagnostics to be excellent for measurement of eosinophil peroxidase  
09 release.
- 10 6. This protocol has the advantage of detecting general synthesis of ROS (superoxide,  
11 oxygen radicals, and peroxide), and of not being restricted to superoxide anion  
12 generation as are methods based on cytochrome c (27).
- 13 7. Dextran sedimentation step allows removing of erythrocytes, platelets, and some  
14 small lymphocytes. This step stands generally for around 20–30 min.
- 15 8. The use of DNase is important to remove all dead cells from the cell suspension  
16 before performing the metrizamide separation.
- 17 9. Use polystyrene tube (transparent) and not polypropylene tube.
- 18 10. Metrizamide is a slightly hypertonic medium and can alter the cells, so high-speed  
19 centrifugation is needed to remove all the metrizamide.
- 20 11. There is a cell density variation with the physiological state of the eosinophils (28).  
21 In normal donors, eosinophils are found mainly in layer 4 and a few in layer 3.  
22 By contrast, in eosinophilic donors, hypodense eosinophils are principally found  
23 in layers 1 and 2.
- 24 12. Percoll solution has to be used at room temperature for good separation of polynu-  
25 clear and mononuclear cells. Ficoll solution ( $d = 1.077 \text{ g/mL}$ ) has also been tested  
26 and compared with Percoll ( $d = 1.082 \text{ g/mL}$ ). Ficoll is less efficient because more  
27 contaminating lymphocytes are found in the polynuclear cell pellets.
- 28 13. To avoid lymphocyte or monocyte contamination, we recommend very careful  
29 removal of the PBMC layer without touching the tube wall.
- 30 14. It has been observed that the type of buffer used for erythrocyte lysis can influence  
31 some functional studies, as shown in mouse (1). For example, compared with NaCl  
32 lysis, the use of ammonium chloride buffer can interfere with mouse eosinophil  
33 antigen-presentation activity, because ammonium chloride is an inhibitor of  
34 lysosome acidification needed for antigen presentation.
- 35 15. Anti-human CD16-coated magnetic beads are used for negative selection to  
36 separate neutrophils from eosinophils, which do not usually express CD16. A  
37 subpopulation of CD16<sup>+</sup> eosinophils can, however, be found in some patients (29).  
38 The proportion of this minor population can differ between patients.
- 39 16. Compared with metrizamide, Percoll (not hypertonic) is less toxic for the cells.  
Percoll gradients and negative selection by anti-CD16 is routinely used because  
this procedure allows one to increase the yield and the degree of purity and is  
faster than metrizamide gradients. It leads, however, to the obtention of the whole

- 01 eosinophil population and does not allow the comparison of normodense and  
02 hypodense activated eosinophils.
- 03 17. For peritoneal cells, no lysing step is necessary as no erythrocytes are found in the  
04 peritoneal exudate.
- 05 18. For higher cell purity (95–98%), rat eosinophils can be obtained by sorting  
06 peritoneal cells according to their typical forward and side scatter.
- 07 19. We have noticed that culture yield is increased when RPMI without phenol red is  
08 used when making complete medium.
- 09 20. During all the procedure, do not vortex eosinophils. Just shake tubes or tap plates  
10 to avoid stress and activation of the cells.
- 11 21. For mouse eosinophils, it is absolutely necessary to block Fc receptors by anti-Fc $\gamma$   
12 receptor antibody (2.4.G2) before primary antibody incubation.
- 13 22. We recommend using directly-labeled monoclonal antibodies for eosinophil  
14 membrane receptor detection as we have noticed that weakly expressed receptors  
15 are usually not detected by indirect staining (**21**).
- 16 23. Do not fix the eosinophil samples with paraformaldehyde for further analysis,  
17 rather leave them on ice and analyze them within 2 h. We have observed staining  
18 alterations after fixation.
- 19 24. An important step is blocking of non-specific binding by serum pre-incubation  
20 particularly for intracellular staining. Although a blocking step is not really  
21 necessary for membrane staining on freshly purified eosinophils, one do need  
22 to use blocking after overnight culture, otherwise you might observe a second  
23 fluorescent peak.
- 24 25. It could be interesting to compare membrane and intracellular staining on freshly  
25 purified eosinophils and after overnight culture. This will allow one to observe  
26 whether expression or increased expression of molecule of interest at the plasma  
27 membrane correlates with decreased expression of the intracellular pool, or whether  
28 culture allows neo-synthesis of the protein with, or without, membrane expression.  
29 Eosinophils are able to express several receptors or cytokines and to store them  
30 in intracellular pools. Very often intracellular expression is higher than membrane  
31 expression (**21**).
- 32 26. The acquisition step has to be performed the day of the experiment because  
33 eosinophils, contrary to lymphocytes, cannot be fixed for overnight analyses.
- 34 27. Avoid drying the spot during all the procedure. If you have to suspend the protocol  
35 for a moment, add TBS onto the cells. Ready-to-use degreased microscope glass  
36 slides are needed.
- 37 28. By performing fixation in acetone/methanol, one can keep the cytopsin preparations  
38 for 1 year at  $-20^{\circ}\text{C}$ . For this procedure, let dry the cytopsin in a hood after fixation  
39 and freeze individually in aluminium. When needed, let thaw at room temperature  
for 30 min and then rehydrate in 0.05 M TBS, pH 7.4, for 15 min.
29. TBS is a suitable diluent for this protocol. Phosphate buffers must be avoided as  
phosphate is a substrate for alkaline phosphatase and, therefore, competes with the

- 01 chromogenic substrate. Additionally, phosphate in the dilution buffer for APAAP  
02 will form an insoluble precipitate with magnesium.
- 03 30. Perform each step of washing in a bath containing around 200 mL of TBS + 0.1%  
04 BSA under gentle agitation.
- 05 31. The APAAP method consists of using soluble immune complexes of calf intestinal  
06 alkaline phosphatase and anti-alkaline phosphatase. This method is preferred for  
07 staining eosinophils, as this leukocyte cell type is rich in endogenous peroxidase  
08 and furthermore it adds an amplification step (alkaline phosphatase–anti-alkaline  
09 phosphatase).
- 10 32. One can increase the intensity of the reaction by performing a second round of  
11 APAAP reaction. It is the case for interferon- $\gamma$  and IL-10 detection, presented in  
12 **Fig. 4C**.
- 13 33. Contrary to the intracellular procedure, after fixation in paraformaldehyde for  
14 membrane staining, one cannot freeze the cytopins. The fixed cytopin prepara-  
15 tions can, however, be stored for 1 week at 4°C in a humid chamber.
- 16 34. Unstained human eosinophils exhibit marked autofluorescence in comparison  
17 with other leukocytes due to granule-associated fluorescent substances. Eosinophil  
18 endogenous fluorescence is more pronounced in green than in red wavelengths.  
19 Ultraviolet exposition and glycine and NH<sub>4</sub>Cl incubations are required for  
20 quenching the autofluorescence. Add 100  $\mu$ L of PBS during UV exposition to  
21 avoid drying spot.
- 22 35. We noted that, before activation, a pre-incubation (30 min) of eosinophils with  
23 serum-free medium effectively decreases cellular stress and background.
- 24 36. Use of injectors allows one to perform a homogenous and synchronous addition  
25 of luminol, D-luciferin, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions directly in the wells of the plate and to  
26 start measurements rapidly.
- 27 37. To avoid the degradation of EPO in supernatants and the loss of signal, the measure  
28 of chemiluminescence must be taken immediately. Keep supernatants and solutions  
29 on ice until measurement. Here, the released peroxidase catalyzes the oxidation  
30 of luminol by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which gives the excited molecule 3-aminophthalate. As the  
31 reactant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is added in excess, photons collected are proportional to the quantity  
32 of catalyst, which is EPO. The reaction is amplified by D-luciferin.
- 33 38. Mouse strain: OF1. Avoid taking young mice with too thin skin. Be careful during  
34 skin cleaning to avoid making holes in sample that could allow passive passage  
35 of cercaria. Use first sterile gauze soaked with culture medium to put out skin  
36 muscles and fatty tissues and then wipe with dry cotton.
- 37 39. Unheated sera from infected patients have to be used to allow evaluation of IgE-  
38 dependent cytotoxicity (heat-labile).
- 39 40. Effector cells are hypodense eosinophils, purified by metrizamide discontinuous  
gradients. The cytotoxic activity of eosinophils purified from hypereosinophilic  
patients is increased when compared with eosinophils from normal donors.  
Moreover, there is a heterogeneity of eosinophil cytotoxic function among

01 different subpopulations of eosinophils purified from the same patient; hypodense  
02 eosinophils are more cytotoxic than normodense eosinophils (28).

- 03 41. Annexin V-FITC is used to quantitatively determine the percentage of cells under-  
04 going apoptosis, by detecting the phosphatidylserine (PS) exposed on the cell  
05 membrane of apoptotic cells. In the early phases of apoptosis, PS translocates from  
06 the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet.
- 07 42. PKH26 staining is a primordial parameter for this experiment. High and  
08 homogenous PKH26 staining allows a good discrimination of the two cell popula-  
09 tions and consequently a quantification of the percentage of apoptotic targets, by  
10 gating on R2. As one can see in **Fig. 6A and B**, eosinophil fluorescence in FL2  
11 channel does not interfere with FL2 fluorescence of stained targets.
- 12 43. Because of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent affinity of Annexin V for PS, the cell staining  
13 with FITC-conjugated Annexin V has to be performed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -enriched binding  
14 buffer.

#### 15 Acknowledgments

16 The authors thank Sylvie Loiseau, Jean Paul Papin, and Christelle Faveeuw  
17 for providing helpful technical comments during the preparation of the  
18 manuscript. Results concerning eosinophilic cell lines are unpublished data.

#### 19 References

- 20
- 21 1. Rothenberg, M. E., and Hogan, S. P. (2006) The eosinophil. *Annu Rev Immunol*  
22 **24**, 147–74.
- 23 2. Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., Dombrowicz, D., Capron, A., and Capron, M.  
24 (1999) Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the  
25 secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by  
26 immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* **190**, 487–95.
- 27 3. Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima,  
28 K., et al. (2003) Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils:  
29 activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* **171**, 3977–82.
- 30 4. Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., and Capron, M. (1999) Expression of Th1 and  
31 Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*  
32 **118**, 95–7.
- 33 5. Woerly, G., Lacy, P., Younes, A. B., Roger, N., Loiseau, S., Moqbel, R., et al.  
34 (2002) Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent  
35 activation. *J Leukoc Biol* **72**, 769–79.
- 36 6. Yazdanbakhsh, M., Tai, P. C., Spry, C. J., Gleich, G. J., and Roos, D. (1987)  
37 Synergism between eosinophil cationic protein and oxygen metabolites in killing  
38 of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **138**, 3443–7.
- 39 7. Young, J. D., Peterson, C. G., Venge, P., and Cohn, Z. A. (1986) Mechanism of  
membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* **321**,  
613–6.

- 01 8. Decot, V., and Capron, M. (2006) [Eosinophils: structure and functions]. *Presse Med*  
02 **35**, 113–24.
- 03 9. Gounni, A. S., Lamkhioed, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A.,  
04 et al. (1994) High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence  
05 against parasites. *Nature* **367**, 183–6.
- 06 10. Nutten, S., Papin, J. P., Woerly, G., Dunne, D. W., MacGregor, J., Trottein, F., et al.  
07 (1999) Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent  
08 cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schisto-  
09 somula. *Eur J Immunol* **29**, 799–808.
- 10 11. Svensson, L., and Wenneras, C. (2005) Human eosinophils selectively recognize  
11 and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups.  
12 *Microbes Infect* **7**, 720–8.
- 13 12. Stenfeldt, A. L., and Wenneras, C. (2004) Danger signals derived from stressed  
14 and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. *Immunology* **112**, 605–14.
- 15 13. Ionescu, M. A., Rivet, J., Daneshpouy, M., Briere, J., Morel, P., and Janin, A.  
16 (2005) In situ eosinophil activation in 26 primary cutaneous T-cell lymphomas  
17 with blood eosinophilia. *J Am Acad Dermatol* **52**, 32–9.
- 18 14. Munitz, A., and Levi-Schaffer, F. (2004) Eosinophils: ‘new’ roles for ‘old’ cells.  
19 *Allergy* **59**, 268–75.
- 20 15. Fernandez-Acenero, M. J., Galindo-Gallego, M., Sanz, J., and Aljama, A. (2000)  
21 Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal  
22 carcinoma. *Cancer* **88**, 1544–8.
- 23 16. Munitz, A., Bachelet, I., Fraenkel, S., Katz, G., Mandelboim, O., Simon, H. U.,  
24 et al. (2005) 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils.  
25 *J Immunol* **174**, 110–8.
- 26 17. Cormier, S. A., Taranova, A. G., Bedient, C., Nguyen, T., Protheroe, C., Pero, R.,  
27 et al. (2006) Pivotal advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and  
28 persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol* **79**, 1131–9.
- 29 18. Mattes, J., Hulett, M., Xie, W., Hogan, S., Rothenberg, M. E., Foster, P., et al.  
30 (2003) Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an  
31 eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* **197**, 387–93.
- 32 19. Dombrowicz, D., and Capron, M. (2001) Eosinophils, allergy and parasites. *Curr*  
33 *Opin Immunol* **13**, 716–20.
- 34 20. Decot, V., Woerly, G., Loyens, M., Loiseau, S., Quatannens, B., Capron, M., et al.  
35 (2005) Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat  
36 eosinophils. *J Immunol* **174**, 628–35.
- 37 21. Kayaba, H., Dombrowicz, D., Woerly, G., Papin, J. P., Loiseau, S., and Capron, M.  
38 (2001) Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse  
39 eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon  
receptor activation. *J Immunol* **167**, 995–1003.



- 01 22. Dombrowicz, D., Quatannens, B., Papin, J. P., Capron, A., and Capron, M. (2000)  
02 Expression of a functional Fc epsilon RI on rat eosinophils and macrophages.  
03 *J Immunol* **165**, 1266–71.
- 04 23. Honda, K., Yamada, Y., Cui, C., Saito, N., Kayaba, H., Kobayashi, Y., et al. (1999)  
05 Effect of eotaxin on the generation of reactive oxygen species from eosinophil cell  
06 line, YY-1. *Int Arch Allergy Immunol* **120 Suppl 1**, 48–50.
- 07 24. Baumann, M. A., and Paul, C. C. (1998) The AML14 and AML14.3D10 cell lines:  
08 a long-overdue model for the study of eosinophils and more. *Stem Cells* **16**, 16–24.
- 09 25. Mayumi, M. (1992) EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk Lymphoma* **7**,  
243–50.
- 10 26. Griffin, J. H., Leung, J., Bruner, R. J., Caligiuri, M. A., and Briesewitz, R. (2003)  
11 Discovery of a fusion kinase in EoL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic  
12 syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7830–5.
- 13 27. Suzuki, M., Kato, M., Hanaka, H., Izumi, T., and Morikawa, A. (2003) Actin  
14 assembly is a crucial factor for superoxide anion generation from adherent human  
15 eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 126–33.
- 16 28. Prin, L., Capron, M., Tonnel, A. B., Bletry, O., and Capron, A. (1983) Hetero-  
17 geneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and  
18 cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int*  
*Arch Allergy Appl Immunol* **72**, 336–46.
- 19 29. Davoine, F., Labonte, I., Ferland, C., Mazer, B., Chakir, J., and Laviolette, M.  
20 (2004) Role and modulation of CD16 expression on eosinophils by cytokines and  
21 immune complexes. *Int Arch Allergy Immunol* **134**, 165–72.
- 22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39



## ANNEXE 3

**Human eosinophils exert potent cytotoxic activity  
towards a colorectal carcinoma cell line**

**Fanny Legrand<sup>1\*</sup>, Virginie Driss<sup>1\*</sup>, Sylvie Loiseau<sup>1</sup>, Emmanuel Hermann<sup>1</sup>, Gaëtane Woerly<sup>1,2</sup>, Estelle Adam<sup>1</sup>, David Dombrowicz<sup>1</sup> and Monique Capron<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Inserm, U547, Lille, France ; Université Lille 2, Lille, France ; IFR142 ; Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France.

<sup>2</sup> Current address : Cellular Biomarkers BS, CHBS, WKL-135.3.19, Novartis Pharma AG, Klybeckstrasse 141, CH-4057 Basel, Switzerland.

\* V.D and F.L contributed equally to this work.

**Corresponding author :** Monique Capron. U547 Inserm Université Lille 2 Institut Pasteur de Lille. 1, r. Prof. Calmette BP245. 59019 Lille Cedex. France. Phone: +33 320 87 78 89. Fax: +33 320 87 78 88. e-mail: [Monique.capron@pasteur-lille.fr](mailto:Monique.capron@pasteur-lille.fr)

**Running title :** Eosinophil in innate immunity against carcinoma cell line

**Key Words:** Eosinophil cytotoxicity; Colo-205; Membrane receptors; Granule proteins; Granzyme A.

**Abstract**

Peripheral blood and tissue eosinophilia is a prominent feature in allergic diseases and during helminth infections. In cancer patients, notably those with carcinoma, TATE (Tumor Associated Tissue Eosinophilia) is frequently observed. TATE can be associated with a good prognosis, notably during colorectal carcinoma. However, the biologic role of eosinophils in anti-tumor responses is poorly understood and the cytotoxic mechanism by which eosinophils interact with tumor cells remains largely unknown. We have here investigated the direct interactions of human eosinophils with a colorectal carcinoma cell line, the Colo-205 and show that eosinophils are able to induce apoptosis and to directly kill the tumor cell line *in vitro*. Using blocking antibodies to define molecules involved in eosinophil-tumor cell interaction, we found that several receptors played a role in the tumoricidal activity: CD11a/CD18 complex, CD226 and at a less extent, 2B4. Colo-205 induces eosinophil-derived neurotoxin (EDN) and eosinophil cationic protein (ECP) release and TNF- $\alpha$  secretion. Finally, we studied expression of mediators present in other effector cells, such as perforin, granulysin or granzymes and detected expression by eosinophils of granzyme A for the first time. Colo-205-induced release of granzyme A and inhibition of eosinophil-mediated cytotoxicity by FUT-175, an inhibitor of trypsin-like enzymatic activity shared by granzyme A, suggest that this new mediator could be required in tumoricidal effect towards Colo-205. Taken together, these results provide novel mechanistic evidence for innate immunity mechanisms in eosinophil tumoricidal activity.

## Introduction

Eosinophils are multifunctional leukocytes that have been described for many years as granulocytes being exclusively involved in helminth parasitic infections and allergic diseases (1, 2). In many cancers, notably carcinoma, eosinophil recruitment, commonly named TATE for Tumor Associated Tissue Eosinophilia has been observed in some patients near the tumor site (3, 4). Clinical observations of eosinophils detected at tumor site were not recent (5). Several epidemiological studies have been performed to correlate TATE and cancer prognosis or to study the relation between allergic-related disorders and cancer development (6). Beneficial effect of TATE is still controversial. Nevertheless, the presence of eosinophils seems to be a good prognostic indicator in some cancers like head and neck cancers (7-9), gastrointestinal cancers (10) particularly in colorectal cancers, where high eosinophil counts were associated to a better rate of five-year survival (11). Clinical observations that eosinophil accumulation in intestinal tumors was associated to a better prognosis has been recently supported by experimental data in murine models (12-14).

Eosinophils are potent effector cells, which release several cytotoxic mediators upon activation. Cytoplasmic specific granules contain high amounts of cytotoxic proteins in particular cationic proteins major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO) and eosinophil-derived neurotoxin (EDN). These cationic proteins have been described to exert cytotoxic properties on tumor cell lines with variable efficiency (15). Beside cytotoxic mediators, eosinophil granules constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially (16). They are able to release Th2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10 but also Th1 and pro-inflammatory cytokines such as interferon (IFN)- $\gamma$  (17) and TNF- $\alpha$ , which are known to play an important role during some anti-tumor responses. Some cellular interactions between eosinophil and tumor cells have been described *in situ* using microscopy (18, 19).

Although eosinophils can be attracted at tumor sites, their activation and involvement in the anti-tumor responses have not been extensively investigated. Eosinophil granule proteins that are released upon activation are highly tumor-cytotoxic at least *in vitro* (15), but activating receptors initiating eosinophil degranulation and mediator release in contact to tumor cell are unknown. Only one earlier study demonstrated cytotoxic activity of eosinophils towards B lymphoma cell line *in vitro* and implication of 2B4 receptor in antitumor responses

of eosinophils (20). In the present work, we used the Colo-205 as a model to study the potential interactions between eosinophils and a colorectal tumor cell line.

## Materials and Methods

### *Cell lines and reagent*

Colo-205 cell line (human colon carcinoma) was from American Type Tissue Culture Collection (ATCC). Cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in culture medium RPMI 1640 without phenol red (supplemented with 10% fetal calf serum, 25mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate and 10 µg/ml gentamycin), hereafter referred to as complete medium (CM). Adherent tumor cells were harvested from the culture flasks after treatment with 0.05% Trypsin EDTA at 37°C, followed by one wash in CM. Cell viability was determined by Trypan Blue dye exclusion and was >98%. ECP and EDN purified cationic proteins were purchased from Diagnostics Development (A.P. & M. Venge AB-Company, Uppsala, Sweden). BrHPP was a kind gift of Dr. JJ. Fournié (Toulouse, France) (21).

### *Cell purification and culture*

Peripheral venous blood was obtained from healthy donors or eosinophilic patients after informed consent. Human eosinophils were isolated as previously described (17) on a Percoll gradient followed by a negative immunomagnetic selection by anti-CD16 coated microbeads (Miltenyi). Purity was determined on cytospin preparations after RAL555 staining and was above 98 %. Purified human eosinophils were cultured overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in CM.  $\gamma\delta$ TCR lymphocytes were generated from PBMC isolated from heparinized blood over Percoll gradient. PBMC were resuspended at a concentration of  $0.5 \times 10^6$ /ml in complete medium. After a single stimulation with 200 nM BrHPP,  $\gamma\delta$  T lymphocytes are expanded for 10 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in culture medium with rhIL-2 added at day 0 and all three days at 20 ng/ml. Cells were analyzed by flow cytometry for cell staining or cytotoxicity assays at day 8. At this time point, > 60% of CD3<sup>+</sup> cells were  $\gamma\delta$  T cells.  $\gamma\delta$ T cells tested for cytotoxicity were sorted using FacsAria™ cell sorter and Diva™ software (BD).

### *Cytotoxicity assays*

Colo-205 cells were first stained with PKH26 (Sigma) (10  $\mu$ M) as recommended by the manufacturer. Eosinophil-mediated cytotoxicity against PKH-26-labelled Colo-205 was measured in complete medium at  $1.6 \times 10^4$  targets/well into U-bottom plates containing eosinophils (Effector:Target ratio of 25:1). Apoptosis was measured after annexinV-FITC (Pharmingen) staining for 15 min at RT. Analysis was performed on a FACScalibur flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). In some experiments, discrimination between apoptosis and necrosis was achieved by additional staining with 5  $\mu$ g/ml 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (Sigma).

Determination of target necrosis was assessed by using Fluorometric Assessment of T Lymphocyte Ag-specific Lysis (FATAL) assay. Protocol was adapted from protocol described previously (22). Briefly Colo-205 cells were first stained with PKH26 and then with CFSE. Lysis of Colo-205 was measured by the percentage of PKH-26<sup>high</sup> positive cells who presented decreased CFSE fluorescence (in comparison to non lysed PKH-26<sup>high</sup>CFSE<sup>high</sup> Colo-205 ).

For inhibition experiments, eosinophils or Colo-205 were preincubated with blocking mouse monoclonal antibodies (10  $\mu$ g/ml) for 20 mn, then washed, resuspended, and cocultured (200  $\mu$ l/well, in CM). Blocking antibodies were anti-CD226 (DX11), anti-CD112 (Abcam); anti-CD244 (C1.7, Immunotech); anti-CD11a (R7.1), anti-CD18 (R3.3), anti-ICAM-1 (RR1/1) mAbs (Bender MedSystem); isotype matched controls were mouse IgG1 (Diacclone) or total mIgG isotype control (Jackson ImmunoResearch). Caspases inhibitors (Z-VAD-fmk) (Pharmingen) were added in Colo-205 for 30 min at 37°C at 100 $\mu$ M, before the addition of eosinophils, so that concentration of inhibitors was of 50  $\mu$ M during coculture.

### *Cell adhesion assay*

Colo-205 adhesion to purified eosinophils was measured by flow cytometry assay as previously described (23). Briefly, eosinophils ( $1 \times 10^6$ /ml) were stained with CFSE (5(6)-carboxyfluorescein- *N*-hydroxysuccinimide ester) (v:v) (Invitrogen) at the final concentration of 0.5  $\mu$ M for 15 min at 37°C. After blocking and three washes in the same medium, eosinophils ( $2 \times 10^5$ ) were mixed in 200  $\mu$ l of CM with PKH26 stained Colo-205 ( $4 \times 10^4$ ) in a 12-x 75-mm polystyrene tube (Becton Dickinson). After centrifugation at 400 rpm for 3 min, cells were cocultured for different times at 37°C. The cells were then placed on ice, gently resuspended and directly analyzed by flow cytometry. To determine the metabolic requirements for binding, CFSE-labeled eosinophils or PKH26<sup>+</sup> Colo-205 cells were fixed

with 1% paraformaldehyde (PFA) for 20 mn at 4°C and washed extensively with CM. Percentage of Colo- 205 cells binding to the purified eosinophils was calculated as follows:  
 $\% \text{ binding} = (\text{Nb of Colo-205 bound to eosinophils (PKH26}^+\text{CFSE}^+ \text{ cells)} / \text{total nb of Colo-205 (PKH26}^+ \text{ cells)}) \times 100$

#### *Flow cytometry*

Cell surface staining was performed using mouse anti-CD226 (DX11 Abcam), mouse anti-CD244 (anti-2B4) (C1.7 Immunotech) in PBS 0.1% BSA and, after two washes in FACS buffer, incubation was done with a goat PE-anti-mouse IgG1 secondary antibody (Southern Biotech) for 20 min. For intracellular staining, purified eosinophils were first fixed with 2 % paraformaldehyde and then permeabilized with 0.01 % saponin in PBS. Non-specific binding was blocked with mouse serum for 10 min, and the cells were incubated for 30 min in 0.01% saponin buffer with FITC conjugated mouse monoclonal antibodies: anti-Perforin (dC9) (Biosciences), anti-granzyme A (CB9), anti-granzyme B (GB11) (Pharmingen) or IgG<sub>1</sub> or the matched isotype control mIgG1 (MOPC-21). Staining with anti-Granulysin (RB1) (MBL), anti-granzyme K and anti-granzyme M (gift from J. Lohrmann and B. Bade, GENOVAC GmbH, Freiburg, Germany)(24). After washing, cells were incubated with a goat FITC-anti-mouse IgG1 secondary antibody (Southern Biotech) for 20 min. Cells were then washed and were immediately analyzed on a FACSCalibur™.

#### *RT-PCR analysis*

DNase-treated total RNA was prepared using the RNeasy kit (Qiagen) from 10<sup>7</sup> purified cells. RNA concentration was determined by absorption at 260 nm, and integrity was electrophoretically verified. Total RNA was reverse transcribed with SuperScript™ Reverse Transcriptase (MMLV 200U/μl) as described in the manufacturer protocol (Invitrogen). cDNA were then amplified using specific primers (Proligo) (20 pmoles/μl). The primers were designed using the Primer3 Website to span at least one intron. PCR were run for 40 cycles (1 min at 95°C, 1 min annealing and 1 min at 72°C) using Taq polymerase (Bioprobe). Primer sequences and the annealing temperature are listed below:

Perforin (Perf) (5'-ATTTTCGTCCTTGCTGTTGG-3'

and 5'GTTTCCTTGAAGGTGGCTGT-3') 56°C,

Granulysin (GNLY) (5'-CGTTTCTCTCTGGCCTGGTA-3'

and 5'-CCATGTGATGCTGGTATTGC-3') 56°C,

Granzyme A (GzmA) (5'-GGGGCAAGATGGTAATGAAG-3'

and 5'-CCAGGATACTGAGGGCATGT-3') 62°C,  
 Granzyme B (GzmB) (5'-GCTGGATGGAATCCTCTTCA-3'  
 and 5'-GCCACGTCTCTTGTCCAAA-3') 57,5°C,  
 Granzyme K (GzmK) (5'-ACTTGTGGGGTCCTTCTCCT-3'  
 and 5'-GTCTCCCGATTTGACCACAG - 3') 56°C,  
 Granzyme M (GzmM) (5'- GGGGCAAGATGGTAATGAAG-3'  
 and 5'-CCAGGATACTGAGGGCATGT-3') 57,5°C,  
 Granzyme H (GzmH) (5'- ATTTTCGTCCTTGCTGTTGG-3'  
 and 5'GTTTCCTTGAAGGTGGCTGT-3') 57,5°C,  
 CD8 (5'-CTATACCTCTCCCAAACAAGCCC-3'  
 and 5'-CCCAgATGTAgATATCACAggCGA-3') 56°C,  
 β<sub>2</sub>-microglobulin (5'-CAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT-3'  
 and 5'-TGGAGACAGCACTCAAAGTAGAA-3') 52°C (30 cycles).

#### *Real-time PCR*

Total RNA was prepared from eosinophil by guanidium/CsCl centrifugation method. Briefly, purified cells were pelleted by centrifugation and then lysed in 4 M guanidium isothiocyanate, 1 mM EDTA, 25 mM sodium acetate, 4.9 % β-mercaptoethanol, 68 mM Nlauryl sarcosine. Lysate was drawn through a 20G needle. RNA was obtained by ultracentrifugation (28000 rpm, 20h, and 20°C) through a CsCl gradient. RNA pellet was washed twice and dissolved in water and precipitated overnight at -20°C with ethanol 70% and sodium acetate 0.08 M. After centrifugation (10000 rpm, 45 minutes at 4°C), RNA was washed twice in ethanol 70%, resuspended in water and store at -80°C until use. RNA from γδ T cells and Colo205 cells was prepared using RNeasy mini-spin columns (Qiagen, UK) according to the manufacturer's instructions. All samples were quantified by absorbance measurement at 260nm on a spectrophotometer (Biorad), and RNA quality was checked by running samples on 1.5 % agarose gel in RNA loading buffer (Sigma).

Total RNA was first submitted to DNase I (Invitrogen) treatment (15 min at room temperature), and cDNA was generated using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer instructions.

Samples were analyzed by real-time PCR, performed according to manufacturer's protocol, using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied



Biosystems). The following primer pairs were designed using the Primer3 Website and customsynthesized by Eurogentec (Ougree, Belgium):

CD226 (5'-TTTTCGTCTCAAACAAGCAT-3' and 5'-5'GTTTCCTTGAAGGTGGCTGT-3')

GAPDH (5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3' and 5'-GGTCAATGAAGGGGTCGTT-3').

Samples were run in triplicate for 40 cycles, with denaturation at 95 °C for 10 min during the first cycle and subsequently for 15 seconds, annealing and extension for 1 minute at 60°C. A dissociation temperature gradient was included at the end of the run. Gene expression was normalized according to GAPDH expression. Relative gene expression was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (25).

### *Immunofluorescence*

Purified eosinophils were cytocentrifuged on slides for 2min at 300 rpm. In some experiments, effectors were previously cocultured with colo-205 at 5:1 for 3 hrs at 37°C. Cells were fixed in PBS- 4% PFA for 10 min at room temperature (RT). PBS washes were performed between each incubation step. Endogenous fluorescence was quenched by exposition to UV (2 min), followed by 0.1M glycine for 4 min and 50mM NH<sub>4</sub>Cl pH 7.4. For intracellular staining, cells were permeabilized with PBS 1% BSA 0,2% Triton X-100 for 5 min on ice. After incubation with PBS-3% BSA supplemented with 5% HSA for 30 min to prevent non-specific binding, slides were directly incubated overnight at 4°C with primary antibodies at 10 µg/ml in PBS-3% BSA-5%HSA. After washing in PBS-0.1% BSA, cells were incubated for cationic protein staining with FITC-secondary Fab'2 antibodies (Jackson Immunoresearch) in PBS-3% BSA-5% HSA for 2 hours. Anti- eosinophil cationic proteins antibodies are all mouse monoclonal: anti-EPO,-MBP (Pharmingen), anti-ECP,-EDN (Diagnostics Development, Uppsala, Sweden). Cytocentrifugated preparations were then stained with Hoescht 33342 solution (Invitrogen) (1:1000) immediately prior to cytospin mounting with Fluoromount G (Southern Biotechnology).

### *ELISA*

Eosinophils ( $2 \times 10^6$ /ml) were incubated with Colo-205 (E:T ratios of 1:1, 1:2 and 1:5). After 18h of coculture, supernatants were collected. ECP, EDN, TNF- $\alpha$  and granzyme A levels were measured by specific Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) kits from MBL International Corp, Diaclone, HyCult Biotechnology and Sanquin (Pelikine Compact™,

Amsterdam, the Netherlands) respectively. The lower detection limit was 0.125 ng/ml for ECP, 0.62 ng/ml for EDN, 8 pg/ml for TNF $\alpha$  and 4 pg/ml for granzyme A.

### *Statistical analysis*

All results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analyses were performed using SPSS software. Normality of data samples was first assessed with the Normality test of Shapiro and Wilk, then Parametric Student's *t*-test for paired experiments was employed to compare variables. Differences were considered significant for a *P* value of less than 0.05. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01 and \*\*\*, *P* < 0.01 are presented on the figures.

## **Results**

### **1. Human eosinophils induce cell death of Colo-205.**

To evaluate the anti-tumoral activity of eosinophils during colorectal cancer, we have investigated the toxicity of purified human eosinophils towards the intestinal cell line Colo-205. Colo-205 were cultured or not with eosinophils at an E:T ratio of 25:1 for 6 hours, and the level of cell death was measured by annexin-V staining of PKH-26 stained Colo-205. We found that eosinophils were able to rapidly induce target cell death reaching a percentage of 60% apoptotic Colo-205 after 6 hours as shown on representative histogram (Fig. 1A and 1B).

To discriminate between necrosis and apoptosis of Colo-205 cell death, we analysed necrosis induction of target cells using the FATAL assay (22). As shown on representative dot plots in Fig.1C or by graph in Fig.1D, eosinophils could induce  $15.8 \pm 3.3$  % specific lysis of Colo-205 after 3 hours, and  $23.6 \pm 6.0$  % after 6 hours. As FATAL assay has never been tested with eosinophils as effectors, experiments have been performed with  $\gamma\delta$  T lymphocytes as positive control. Cytotoxic effect of  $\gamma\delta$  T lymphocytes towards Colo-205 reached similar level of induced necrosis after 3 hours ( $24.8 \pm 2.7\%$ , *p*<0,01). Similar results were obtained using annexin V-7AAD double staining for eosinophils and  $\gamma\delta$  T cells as shown on Fig. 1E and 1F respectively. Thus, we demonstrate for the first time that eosinophils display strong cytotoxic functions against Colo-205 and inducing both necrosis and apoptosis.

## **2. Adhesion of Colo-205 to eosinophils is mediated by CD11a and CD18.**

Eosinophils might induce cell death either through release of soluble factors or through cell-cell contacts. We then performed a cell-cell adhesion assay to evaluate the role of cellular contacts in Colo-205 cell death. As shown in Fig.2A, Colo-205 adhered to purified eosinophils, reaching  $24.3 \pm 0.5\%$  after 1 hour of co-incubation (n=3).

To determine whether metabolic changes and membrane dynamics were required for cellular adhesion, Colo-205 or eosinophils were fixed with paraformaldehyde (PAF) prior to coculture (Fig. 2B). Colo-205 binding to eosinophils was strongly inhibited when granulocytes were prefixed with PAF, inhibition values running from 70 to 53% until time 30 min. Prefixation of Colo-205 cells, induced 52% inhibition of adhesion after 7.5 min and only 15% inhibition after 30 min coculture, suggesting that membrane receptors and ligands were either sensitive to fixation or may undergo a conformational alteration to allow ligand binding. After having demonstrated that cellular adhesion was important in the killing of Colo-205 by eosinophils, we have examined which integrins could be involved in such adhesion. Binding of Colo-205 to eosinophils was specifically inhibited in the presence of specific blocking anti-CD11a and anti-CD18 antibodies (Fig. 2C). This demonstrates that interaction of eosinophils with target cells was partly mediated through CD11a and CD18.

## **3. Adhesion is needed for eosinophil cytotoxicity towards Colo-205.**

By providing stable contacts with target cells, adhesion is a prerequisite for lymphocyte cytotoxicity. To demonstrate that eosinophil adhesion to Colo-205 was a major event to exert cytolytic activities, we have analysed whether inhibiting cellular adhesion could reduce cytotoxicity. As shown in Fig. 3A, prefixation of eosinophils with PAF strongly inhibited the percentage of Colo-205 undergoing cell death after 1 hour coculture with purified eosinophils. When blocking monoclonal antibodies to CD11a and CD18 were added to eosinophils before co-incubation with Colo-205, eosinophils cytolytic activity was also decreased by  $58.3 \pm 5.9\%$ ,  $p < 0.01$  and  $49.9 \pm 27.1\%$ ,  $p < 0.05$  respectively (Fig.3B). These data confirm that eosinophils need to adhere to their target to kill them and strongly suggest that CD11a/CD18 play a crucial role in this cytolytic process.

## **4. Eosinophils express DNAM-1 that is involved in their cytotoxicity for Colo-205.**

Interestingly, Colo-205 cells express CD112 or nectin-2, a CD226 ligand (26). Expression of DNAM-1 by eosinophils has been recently evoked (27) but their precise expression profiles and functions still remain unclear. The expression of DNAM-1 in freshly isolated eosinophils

was then examined by Q-PCR and flow cytometry (Fig. 4A and B). As compared with  $\gamma\delta$  T cells, CD226 was weakly expressed by eosinophils, while undetectable on Colo-205. Blocking CD226 on the surface of eosinophils significantly decreased the cytolytic effect of eosinophils ( $20.5 \pm 3.3\%$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig.4C). Inhibition obtained with  $\gamma\delta$  lymphocytes was significant ( $30.4 \pm 12.9\%$ ,  $p < 0.05$ ), but at a lesser extent due to the heterogeneity of inhibition (8 to 67%) (Fig.4D). CD112 neutralization on target cells blocked significantly the cytolytic effect even if it was less important ( $9.0 \pm 1.6\%$ )( $p < 0.05$ ). Moreover, in spite of a very weak CD226 expression compared to 2B4, CD226 seems to be more involved in eosinophil cytotoxicity towards Colo-205 than 2B4 (Fig.5).

### **5. 2B4 plays a minor role in tumoricidal activity of eosinophils.**

As activation of eosinophil-mediated cytotoxicity by 2B4 towards malignant cell lines has been previously reported (20), we investigated the role of 2B4 in eosinophil tumoricidal activity against Colo-205. Colo-205 and eosinophils both highly express 2B4 on their surface. Target cells or purified eosinophils were pre-incubated in the presence or the absence of anti-2B4 mAb or matching isotype control. Washings were then performed before co-culturing cells to avoid interference between cellular types. We found that blocking 2B4 on either eosinophils or on the target cells slightly but consistently decreased cytolytic effect of eosinophils, with inhibition values obtained in the same range, of  $11.9 \pm 3.2$  and  $13.3 \pm 1.3\%$ , respectively ( $p < 0.05$  and  $0.01$ ;  $n = 3$ ). These data suggest that 2B4 could be involved on the cytolytic activity of eosinophils.

### **6: ECP, EDN and TNF- $\alpha$ released by eosinophils are cytotoxic for Colo-205.**

We next intended to define cytotoxic mediators potentially involved in the target cell death observed. We focused on eosinophil specific cationic proteins, EPO, ECP and EDN, described to be highly cytotoxic against helminths or other tumor cell lines (1). Eosinophil peroxidase (EPO) release upon incubation with Colo-205 was first evaluated. Unfortunately, we could not detect significant EPO release by either chemiluminescence or colorimetric assays (data not shown). We then incubated eosinophils with different numbers of Colo-205 for 18 hours and supernatants were collected to measure ECP and EDN by ELISA. We detected significant increase of ECP and EDN level secreted when eosinophils were cocultured with Colo-205. Dose-dependent EDN release was observed with increasing eosinophil:Colo-205 ratios (Fig.6A). The direct effects of both cationic proteins on Colo-205 survival were then

tested. Graph presented in Fig 6B indicates that ECP and EDN display strong cytolytic activity against Colo-205 and are thus potent anti-tumoral molecules produced by eosinophils. We performed intracellular immunofluorescence staining of each cationic effector on eosinophils and Colo-205 suspension collected after 3 hours of culture. The staining indicates that EDN was detected inside the target cells in contrast to other cationic proteins including ECP (Fig.6C), or EPO and MBP (**Supplementary Fig.1**). It's worth pointing out that Colo-205 were negative for EDN expression in absence of eosinophils (data not shown). To know whether this protein could be internalised by tumor cells, incubation of Colo-205 alone with purified EDN (10µg/ml) was performed during 3 hours followed by immunofluorescence staining of ECP after withdrawal of extracellular protein by washes. Immunofluorescence staining obtained with anti-EDN suggests that this mediator could be internalised by the Colo-205 (data not shown).

Other potential cytotoxic mediators released by eosinophils are cytokines such as TNF- $\alpha$ . We could indeed detect TNF- $\alpha$  release when eosinophils were cocultured overnight with Colo-205 (**Supplementary Fig.2**). This secretion seemed to be dependent upon eosinophil-target adhesion since blocking antibodies anti-CD11a and CD18 inhibited the amount of TNF- $\alpha$  released in supernatants. Colo-205 has been described to be sensitive to TNF- $\alpha$  (28) and this latter would play a role in Colo-205 cell death observed during incubation with eosinophils. Taken together, these findings indicate that Colo-205 activate eosinophils inducing release of ECP, EDN and TNF- $\alpha$ .

## 7. Eosinophils express granzyme A

The proportion of Colo-205 cell death measured by Annexin-V staining was not decreased with the caspase inhibitor Z-VAD-fmk, suggesting that Colo-205 cell death was caspase independent (data not shown). This lead us to evaluate whether other cytotoxic mediators known to induce caspase independent cell death could be implicated. Regarding the literature about the cytotoxic molecules involved in anti-tumor responses expressed by NK cells or  $\gamma\delta$  T cells, we decided to focus on potent cytolytic mediators such as perforin, granulysin and serine protease family members, the granzymes, that are major effector molecules in innate immunity against tumor and virus-infected cells. We did not detect any expression of mRNA perforin, granulysin or granzyme except for granzyme A (Fig. 6A). CD8 mRNA was assessed to exclude some lymphocyte contamination in eosinophil mRNA samples. As shown in Fig. 6 B, granzyme A was also detected in eosinophils by flow cytometry. Taken together, our

results show a constitutive expression of granzyme A in eosinophils. These observations led us to hypothesize that eosinophils may respond to Colo-205 by rapid release of granzyme A. We detected granzyme A release by eosinophils during coculture with Colo-205 (Fig 6C). Eosinophil granzyme A production was dependent upon increasing Colo-205 numbers. To determine the role of granzyme A in the tumoricidal activity of eosinophils, we used a highly rapid, potent and selective inhibitor of granzyme A, FUT-175 (Nafamostat Mesilate), which lead to an 20 % inhibition of Colo-205 cell death (29). Taken together, these findings indicate that granzyme A could be implicated in eosinophil apoptosis induction of Colo-205.

## Discussion

Besides helminth infections and allergic diseases, peripheral blood and tissue eosinophilia have been associated to several tumors (3, 4) including intestinal tumors. However, as only very few studies have addressed the role of eosinophils in intestinal cancerogenesis, their impact on tumor development remains obscure; in particular, functional data are missing. We have here investigated the mechanism of eosinophil-colorectal carcinoma interactions in order to provide a molecular basis to this observation.

The present results indicate that Colo-205 activate eosinophils and that CD11a/CD18 integrins, CD226 and at a lesser extent 2B4 play a role in the activation process.

We anticipated that LFA-1 is primordial for eosinophil adhesion to Colo-205 and subsequent activation. It has been suggested that LFA-1/ICAM-1 interaction plays a role in establishing the stable adhesion between  $\gamma\delta$ T cells and tumor cells loaded with nonpeptide Ags (30). However, we could not detect inhibition with anti-ICAM-1 mAbs suggesting that LFA1 recognise another counter-receptor expressed on Colo-205.

As reported for natural killer cells, DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1, CD226) has been reported as potential activator receptor involved in tumoricidal activity towards several tumor cell lines (31-34). This is the first description of CD226 mRNA expression and tumoricidal activity by eosinophils. Surprisingly, we were unable to detect any EPO, ECP, EDN or TNF- $\alpha$  secretion upon CD226 cross-linking. It is likely that activation of eosinophils by CD226 cross-linking may not be sufficient. Indeed, it has been recently described physical interaction between CD11a (LFA-1 $\alpha$ ) and CD226 (35, 36). Partial inhibition of eosinophil

cytotoxicity obtained with anti-LFA1 and anti-CD226 antibodies might suggest involvement of others membrane receptors or additional/synergistic effect between these two receptors.

Contradictory results have been reported regarding  $\gamma\delta$  T lymphocyte cytotoxic potential towards Colo-205 cell line (37). Indeed, we demonstrated  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity towards Colo-205, whereas Corvaisier et al. did not observe Colo-205 lysis by  $\gamma\delta$  T cells. They explain these  $\gamma\delta$  anergy by the fact that Colo-205 do not express ICAM-1. Discrepancies may come from experimental procedures or genetic derive of Colo-205 cell lines. Indeed, we found some weak membrane ICAM-1 expression on Colo-205. More importantly, we described for the first time implication of CD226 in tumoricidal activity of  $\gamma\delta$  T cells.

Only one previous study demonstrated cytotoxic activity of eosinophils towards B lymphoma cell line *in vitro* and implication of 2B4 receptor in antitumor responses of eosinophils (20). It has been demonstrated that 2B4 cross linking activates human eosinophils to release IL-4, IFN- $\gamma$  or EPO. Nevertheless, our data indicate that 2B4 only play a minor role in tumoricidal activity. It may be due to high expression of this molecule by the target cells.

Relationship between allergy and cancer is still controversial (6). Theoretically, two general hypotheses may be advanced: either an allergy context reinforces tumor immunosurveillance that may operate more efficiently or altered immune system enhances inflammation leading to promote tumor development. We observed that eosinophil purified from allergic donors displayed exacerbated cytotoxicity towards Colo-205 (data not shown). Increased CD11a on eosinophils from atopic donors might provide stronger eosinophils-tumor cell contacts (38). Moreover, human eosinophils from atopic donor have been recently described to display enhanced CD48 expression (39, 40). CD48 is a GPI-anchored protein expressed on almost all leukocyte populations and is a high-affinity ligand for 2B4 (41). Taken together, these observations might explain why eosinophils from eosinophilic donors display a faster response to Colo-205 than eosinophils from normal donors (data not shown).

We demonstrated that eosinophils released several cytotoxic mediators in presence of Colo-205 and notably granzyme A. Granzyme A is a serine protease with trypsin-like specificity found in the large granules of activated cytotoxic T lymphocytes, natural killer cells and  $\gamma\delta$  T cells located in peripheral blood and in lymphoid tissues (42). Polynuclear neutrophils have been reported to express granzyme A (43, 44). However, we were unable to detect GrzA mRNA in neutrophil sampling tested. Granzyme A is believed to function by entering tumor cells via pores formed by perforin, which participate in the apoptosis of abnormal cells (42, 45). We were unable detect perforin in eosinophils. Interestingly, recent

results suggest that on one hand perforin is not necessary for the entry of granzyme, raising doubt about the molecular mechanisms involved (46) and on the other hand, that expression of granzyme A could be found in absence of perforin, as in the majority of small intestinal intra-epithelial lymphocyte (IEL), which do not express perforin, but where granzyme A is found in 30% of cells. Granzyme A might be involved *in vivo* in enterocyte exfoliation through cleavage of extracellular matrix components (47, 48). Purified GzmA induces detachment of the intestinal epithelial cell line or to induce rapid caspase independent apoptosis of target cells *in vitro* (45, 49). A recent study also compared the cytolytic enzyme content of several lymphocyte populations ( $CD8^+$  or  $CD4^+$   $\alpha\beta$  T cells and  $V\delta 1$ ,  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T cell subsets)(50). Across these various T cell types, characteristic pattern for perforin/granzyme expression has been observed. Notably, cells frequently expressed granzyme A alone; many  $GzmA^+$   $GzmB^-$  cells expressed low levels of perforin and a unique small population of  $CD4^+$   $\alpha\beta$   $GzmA^+$   $GzmB^-$  cells that did not express perforin at all was identified.

If perforin is indeed needed for proapoptotic properties of granzyme A, we can speculate that the pore forming effect of perforin could be substituted by another mediator, such as eosinophil cationic proteins. We thus measured release of ECP and EDN during incubation of eosinophils with Colo-205. These latter eosinophil proteins have been described for their tumoricidal effect (51-54) and their pore-membrane properties, particularly for ECP (55, 56). A recent study shows that ECP is not internalised (57). As we could detect internalisation of EDN and not of ECP by the Colo-205, we are tempted to speculate that EDN might act synergistically with granzyme A to induce apoptosis. In addition, EDN was found to induce apoptosis via caspase independent pathway.

In conclusion, our results represent the first evidence of granzyme A expression and release by human eosinophils upon stimulation by a colorectal carcinoma cell line. This study highlights a new mechanism of direct recognition of tumor cells by human eosinophils, thereby broadening their functional importance as early direct sensors and effectors against tumors.

### **Acknowledgements**

*This study was supported by a grant from “Biologie-santé” program (Fonctions des éosinophiles et pathologies à éosinophiles). We thank Dr B. Bade and J. Lohrman (GmbH, Freiburg, Germany) for providing antibodies against granzymes and Dr J.J. Fournié for giving BrHPP. We thank M. Delbecke for help in the experimental procedures.*



## Authorship

F.L. performed research and wrote the paper; V.D. performed research and statistical analysis; E.H. analysed data and reviewed the drafts of the paper; S.L. was essential for helping with patient sample purifications; G.W. critically reviewed the manuscript, D.D. interpreted the experiments and reviewed drafts of the paper; M.C. provided intellectual input and reviewed drafts of the paper.

## References

1. Rothenberg, M. E., and S. P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174.
2. Jacobsen, E. A., A. G. Taranova, N. A. Lee, and J. J. Lee. 2007. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 119:1313-1320.
3. Munitz, A., and F. Levi-Schaffer. 2004. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 59:268-275.
4. Lotfi, R., J. J. Lee, and M. T. Lotze. 2007. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother* 30:16-28.
5. Lowe, D., J. Jorizzo, and M. S. Hutt. 1981. Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol* 34:1343-1348.
6. Carrozzini, L., and G. Viegi. 2005. Allergy and cancer: a biological and epidemiological rebus. *Allergy* 60:1095-1097.
7. Dorta, R. G., G. Landman, L. P. Kowalski, J. R. Lauris, M. R. Latorre, and D. T. Oliveira. 2002. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 41:152-157.
8. Fujii, M., T. Yamashita, R. Ishiguro, M. Tashiro, and K. Kameyama. 2002. Significance of epidermal growth factor receptor and tumor associated tissue eosinophilia in the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 29:175-181.
9. Goldsmith, M. M., D. A. Belchis, D. H. Cresson, W. D. Merritt, 3rd, and F. B. Askin. 1992. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 106:27-33.
10. Nielsen, H. J., U. Hansen, I. J. Christensen, C. M. Reimert, N. Brunner, and F. Moesgaard. 1999. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol* 189:487-495.
11. Fernandez-Acenero, M. J., M. Galindo-Gallego, J. Sanz, and A. Aljama. 2000. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 88:1544-1548.
12. Cormier, S. A., A. G. Taranova, C. Bedient, T. Nguyen, C. Protheroe, R. Pero, D. Dimina, S. I. Ochkur, K. O'Neill, D. Colbert, T. R. Lombardi, S. Constant, M. P. McGarry, J. J. Lee, and N. A. Lee. 2006. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol* 79:1131-1139.
13. Mattes, J., M. Hulett, W. Xie, S. Hogan, M. E. Rothenberg, P. Foster, and C. Parish. 2003. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 197:387-393.
14. Simson, L., J. I. Ellyard, L. A. Dent, K. I. Matthaei, M. E. Rothenberg, P. S. Foster, M. J. Smyth, and C. R. Parish. 2007. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol* 178:4222-4229.
15. Wagner, L., K. Leiferman, and G. Gleich. 2006. Eosinophils. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.
16. Spencer, L. A., C. T. Szela, S. A. Perez, C. L. Kirchhoffer, J. S. Neves, A. L. Radke, and P. F. Weller. 2008. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*.
17. Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron, and M. Capron. 1999. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 190:487-495.

18. Caruso, R. A., F. Fedele, V. Zuccala, M. G. Fracassi, and A. Venuti. 2007. Mast cell and eosinophil interaction in gastric carcinomas: ultrastructural observations. *Anticancer Res* 27:391-394.
19. Caruso, R. A., A. Ieni, F. Fedele, V. Zuccala, M. Riccardo, E. Parisi, and A. Parisi. 2005. Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 29:29-36.
20. Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H. U. Simon, L. Moretta, M. Colonna, and F. Levi-Schaffer. 2005. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* 174:110-118.
21. Espinosa, E., C. Belmant, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagne, H. Brailly, M. Bonneville, and J. J. Fournie. 2001. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem* 276:18337-18344.
22. Sheehy, M. E., A. B. McDermott, S. N. Furlan, P. Klenerman, and D. F. Nixon. 2001. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *J Immunol Methods* 249:99-110.
23. Shibuya, A., L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1998. Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *J Immunol* 161:1671-1676.
24. Bade, B., H. E. Boettcher, J. Lohrmann, C. Hink-Schauer, K. Bratke, D. E. Jenne, J. C. Virchow, Jr., and W. Luttmann. 2005. Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. *Int Immunol* 17:1419-1428.
25. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
26. Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, Y. Onoda, H. Zhang, S. Yamazaki, A. Miyamoto, S. Honda, L. L. Lanier, and A. Shibuya. 2004. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol* 16:533-538.
27. Bachelet, I., A. Munitz, D. Mankutad, and F. Levi-Schaffer. 2006. Mast cell costimulation by CD226/CD112 (DNAM-1/Nectin-2): a novel interface in the allergic process. *J Biol Chem* 281:27190-27196.
28. Herbeuval, J. P., C. Lambert, O. Sabido, M. Cottier, P. Fournel, M. Dy, and C. Genin. 2003. Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 95:611-621.
29. Poe, M., J. K. Wu, J. T. Blake, H. J. Zweerink, and N. H. Sigal. 1991. The enzymatic activity of human cytotoxic T-lymphocyte granzyme A and cytotoxic T-lymphocytes are potently inhibited by a synthetic antiprotease, FUT-175. *Arch Biochem Biophys* 284:215-218.
30. Kato, Y., Y. Tanaka, M. Hayashi, K. Okawa, and N. Minato. 2006. Involvement of CD166 in the activation of human gamma delta T cells by tumor cells sensitized with nonpeptide antigens. *J Immunol* 177:877-884.
31. Pende, D., G. M. Spaggiari, S. Marcenaro, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, M. Falco, E. Lanino, I. Pierri, R. Zambello, A. Bacigalupo, M. C. Mingari, A. Moretta, and L. Moretta. 2005. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 105:2066-2073.
32. Elishmereni, M., I. Bachelet, and F. Levi-Schaffer. 2008. DNAM-1: an amplifier of immune responses as a therapeutic target in various disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 9:491-496.
33. Castriconi, R., A. Dondero, M. V. Corrias, E. Lanino, D. Pende, L. Moretta, C. Bottino, and A. Moretta. 2004. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* 64:9180-9184.
34. Carlsten, M., N. K. Bjorkstrom, H. Norell, Y. Bryceson, T. van Hall, B. C. Baumann, M. Hanson, K. Schedvins, R. Kiessling, H. G. Ljunggren, and K. J. Malmberg. 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67:1317-1325.
35. Shibuya, K., L. L. Lanier, J. H. Phillips, H. D. Ochs, K. Shimizu, E. Nakayama, H. Nakauchi, and A. Shibuya. 1999. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11:615-623.
36. Shirakawa, J., Y. Wang, S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. 2006. LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol* 18:951-957.
37. Corvaisier, M., A. Moreau-Aubry, E. Diez, J. Bennouna, J. F. Mosnier, E. Scotet, M. Bonneville, and F. Jotereau. 2005. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 175:5481-5488.
38. Lantero, S., G. Alessandri, D. Spallarossa, L. Scarso, and G. A. Rossi. 1998. LFA-1 expression by blood eosinophils is increased in atopic asthmatic children and is involved in eosinophil locomotion. *Eur Respir J* 12:1094-1098.
39. Munitz, A., I. Bachelet, F. D. Finkelman, M. E. Rothenberg, and F. Levi-Schaffer. 2007. CD48 is critically involved in allergic eosinophilic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 175:911-918.

40. Munitz, A., I. Bachelet, R. Eliashar, M. Khodoun, F. D. Finkelman, M. E. Rothenberg, and F. Levi-Schaffer. 2006. CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils. *J Immunol* 177:77-83.
41. Brown, M. H., K. Boles, P. A. van der Merwe, V. Kumar, P. A. Mathew, and A. N. Barclay. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188:2083-2090.
42. Trapani, J. A., and M. J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747.
43. Hocegger, K., P. Eller, and A. R. Rosenkranz. 2004. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in innate immunity? *Blood* 103:1176.
44. Hocegger, K., P. Eller, J. M. Huber, D. Bernhard, G. Mayer, G. J. Zlabinger, and A. R. Rosenkranz. 2007. Expression of granzyme A in human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* 121:166-173.
45. Chowdhury, D., and J. Lieberman. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26:389-420.
46. Palm-Apergi, C., A. Lorents, K. Padari, M. Pooga, and M. Hallbrink. 2008. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *Faseb J*.
47. Yoshikawa, Y., H. Hirayasu, S. Tsuzuki, and T. Fushiki. 2008. Granzyme A causes detachment of alveolar epithelial A549 cells accompanied by promotion of interleukin-8 release. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2481-2484.
48. Hirayasu, H., Y. Yoshikawa, S. Tsuzuki, and T. Fushiki. 2008. A lymphocyte serine protease granzyme A causes detachment of a small-intestinal epithelial cell line (IEC-6). *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2294-2302.
49. Hirayasu, H., Y. Yoshikawa, S. Tsuzuki, and T. Fushiki. 2007. A role of a lymphocyte tryptase, granzyme A, in experimental ulcerative colitis. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:234-237.
50. Chattopadhyay, P. K., M. R. Betts, D. A. Price, E. Gostick, H. Horton, M. Roederer, and S. C. De Rosa. 2008. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*.
51. Newton, D. L., and S. M. Rybak. 1998. Unique recombinant human ribonuclease and inhibition of Kaposi's sarcoma cell growth. *J Natl Cancer Inst* 90:1787-1791.
52. Maeda, T., M. Kitazoe, H. Tada, R. de Llorens, D. S. Salomon, M. Ueda, H. Yamada, and M. Seno. 2002. Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur J Biochem* 269:307-316.
53. Chang, C., D. L. Newton, S. M. Rybak, and A. Wlodawer. 2002. Crystallographic and functional studies of a modified form of eosinophil-derived neurotoxin (EDN) with novel biological activities. *J Mol Biol* 317:119-130.
54. Carreras, E., E. Boix, S. Navarro, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo, and M. V. Nogues. 2005. Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 272:1-7.
55. Young, J. D., C. G. Peterson, P. Venge, and Z. A. Cohn. 1986. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321:613-616.
56. Torrent, M., E. Cuyas, E. Carreras, S. Navarro, O. Lopez, A. de la Maza, M. V. Nogues, Y. K. Reshetnyak, and E. Boix. 2007. Topography studies on the membrane interaction mechanism of the eosinophil cationic protein. *Biochemistry* 46:720-733.
57. Navarro, S., J. Aleu, M. Jimenez, E. Boix, C. M. Cuchillo, and M. V. Nogues. 2008. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell Mol Life Sci* 65:324-337.

## Figures

Figure 1

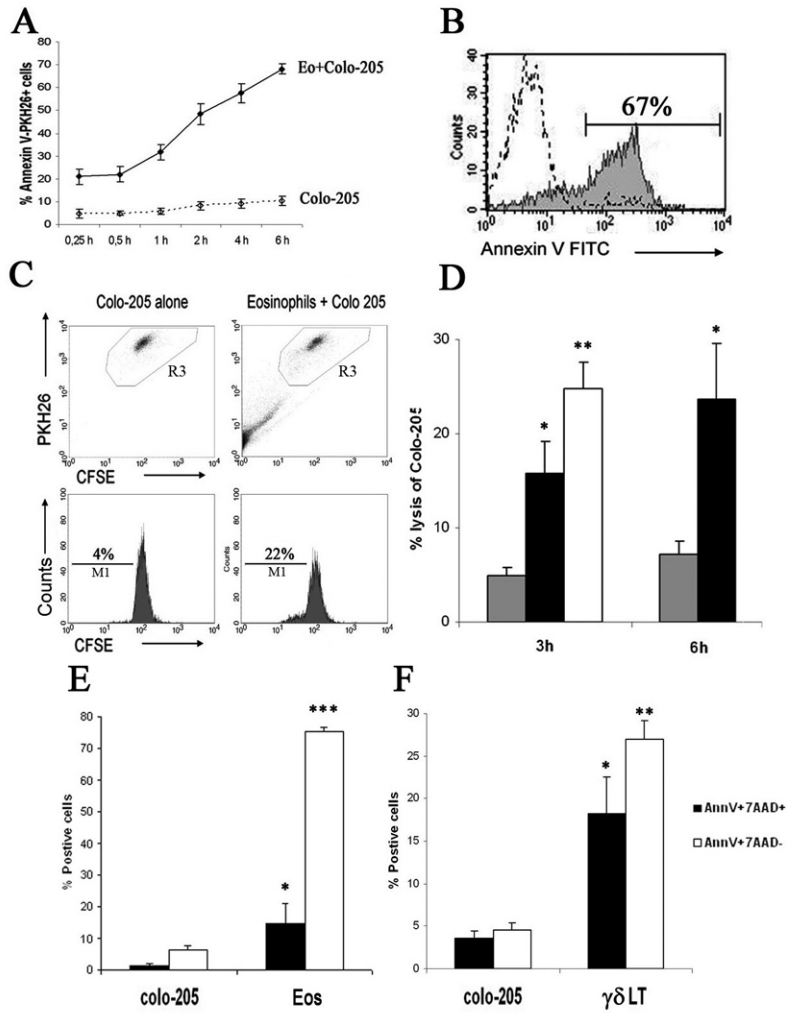


Figure 2

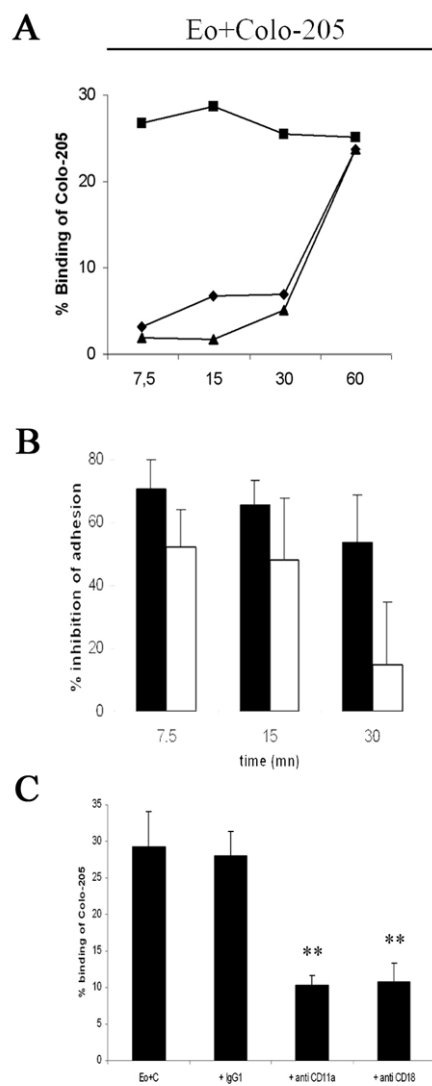


Figure 3

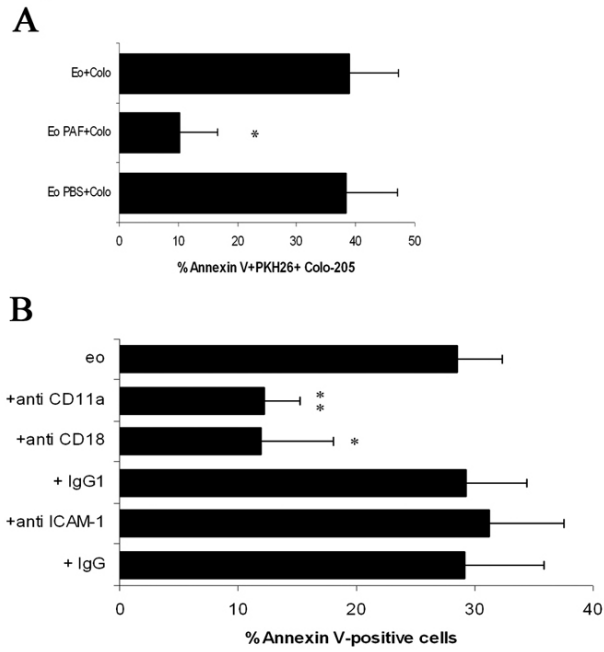


Figure 4

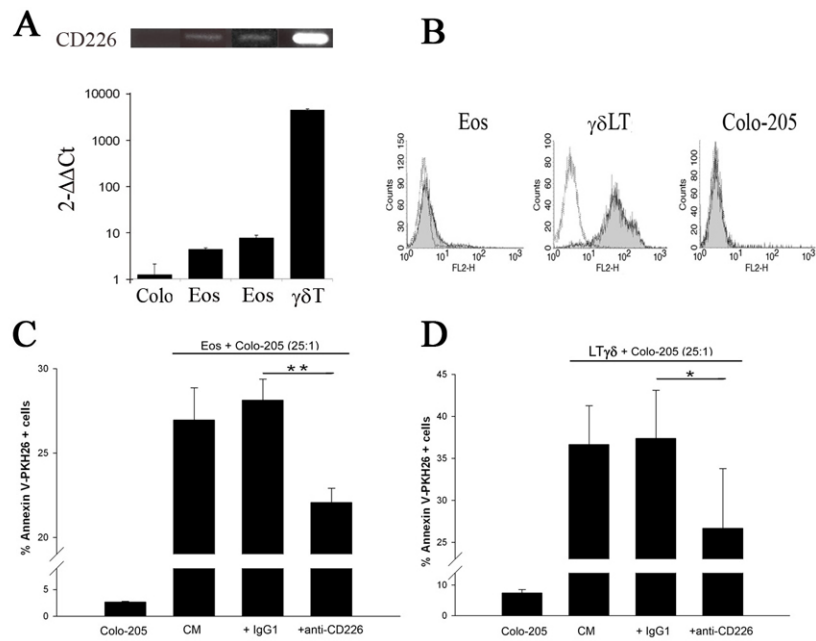


Figure 5

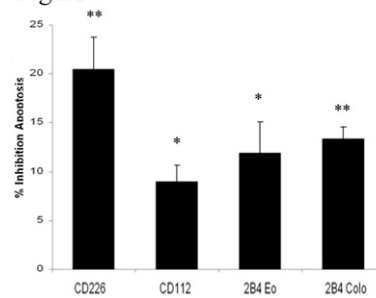
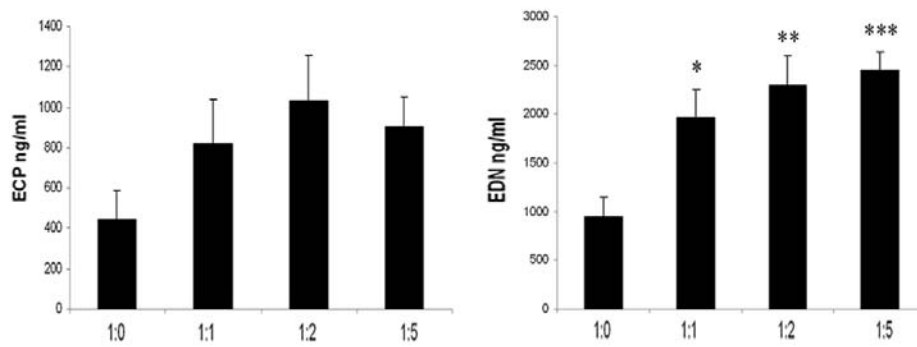
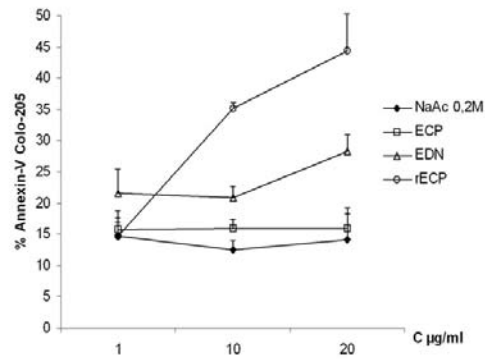


Figure 6

A



B



C

Eo+Colo-205

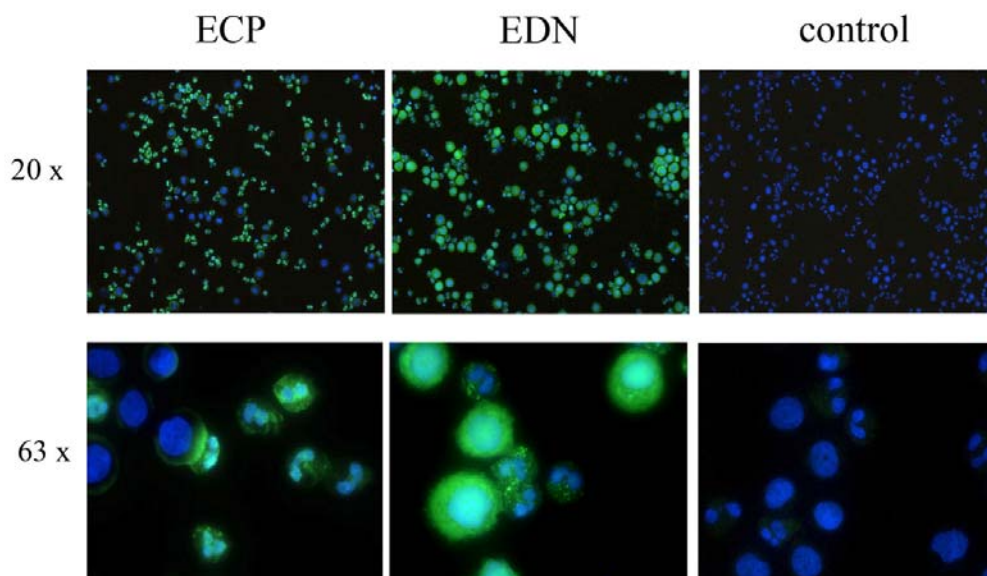
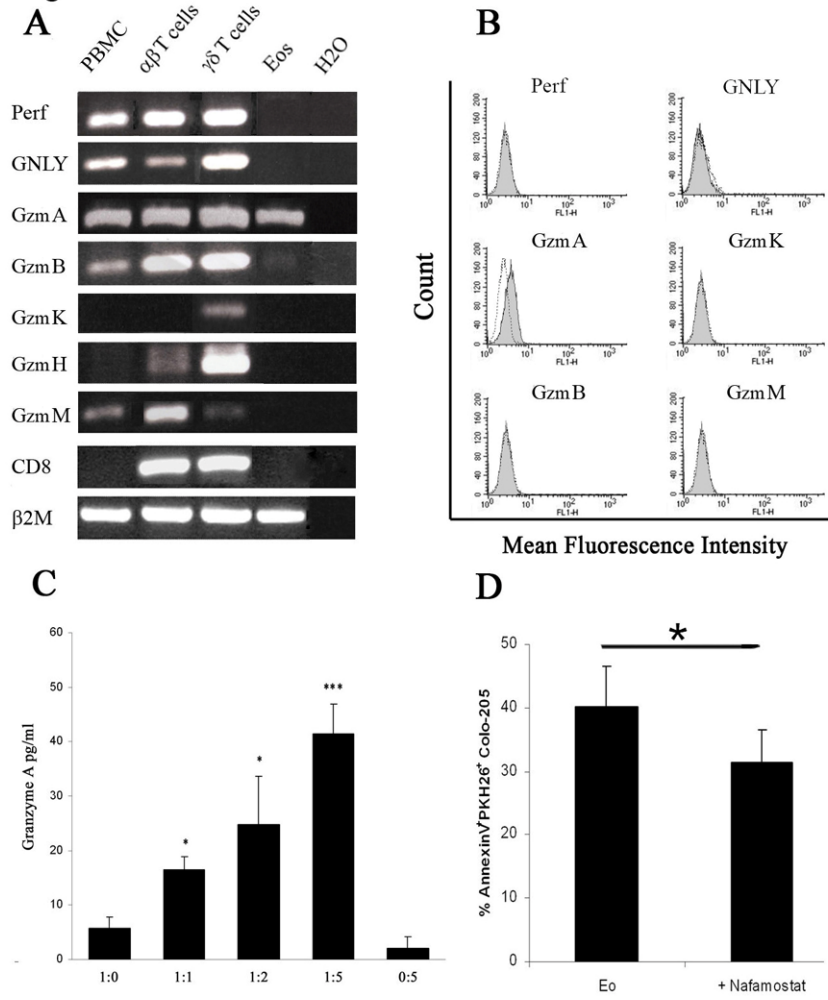


Figure 7

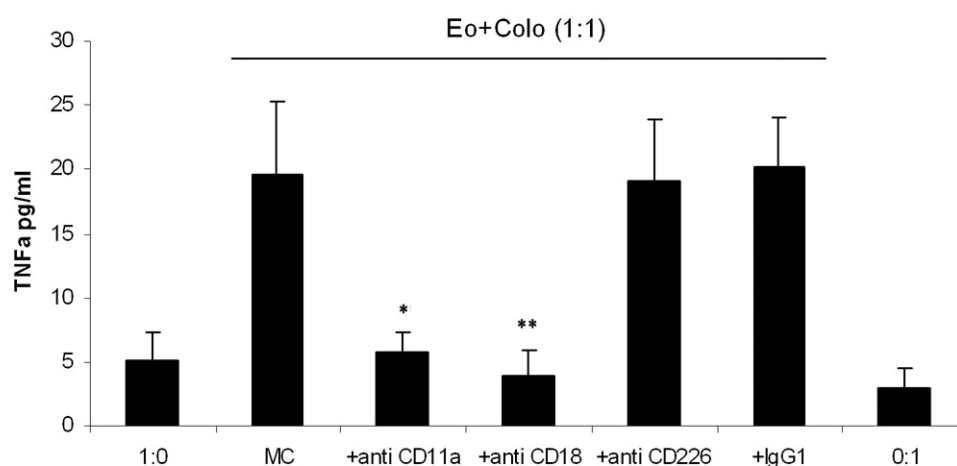




## Human eosinophils exert potent cytotoxic activity towards a colorectal carcinoma cell line

Fanny Legrand, Virginie Driss, Sylvie Loiseau, Emmanuel Hermann, Gaëtane Woerly,  
Estelle Adam, David Dombrowicz and Monique Capron

### Supplementary figure legends



### Figure S1: TNF alpha release during coculture eo-Colo205: role of adhesion

Eosinophils were stimulated for 18h with Colo-205 at eosinophil:Colo-205 ratio of 1:1. TNF- $\alpha$  levels were quantified in the culture supernatants by ELISA. Blocking anti-CD11a or CD18 antibodies (10  $\mu$ g/ml) were added prior to co-incubation. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. (n=3)