

50376  
1993  
193

50376  
1993  
193

RETOUR

THESE DE DOCTORAT

pour le titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Option: Immunologie

-----

**LES MOLECULES FIXANT L'IgE ET LEUR  
IMPLICATION DANS LES FONCTIONS  
EFFECTRICES DES POLYNUCLEAIRES  
EOSINOPHILES ET NEUTROPHILES**

-----

**Tu-Anh Marie-José TRUONG-MAURICE**



Présentée le 19 Mai 1993.

Membres du jury:

Président: Mme le Pr. G. Spik  
Rapporteurs: Mr. le Pr. J.-P. Dessaint  
Mr. le Pr. J.-Y. Bonnefoy  
Examineurs: Mr. le Pr. A. Capron  
Mme le Pr. M. Capron

Laboratoire d'accueil:

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, Unité Mixte U167 - CNRS 624,  
1 rue du Pr. Calmette, Lille. Directeur: Mr. le Pr. André Capron.

---

Je dédie ce mémoire,

à Rémy

à Hervé

à mes parents

à mes beaux-parents

à ma grande famille

et à tous mes amis.

Avec toute mon affection

---

## SOMMAIRE GENERAL

REMERCIEMENTS	p 4
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	p 5
ABREVIATIONS	p 7
GENERALITES	p 8
RESULTATS et DISCUSSION	p 74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p 138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 143
TABLE DES MATIERES / ILLUSTRATIONS	p 171

---

Je remercie très chaleureusement:

- Monsieur le Pr. André Capron pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche.

Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance;

- Madame le Pr. associé Monique Capron, qui par son dynamisme et son enthousiasme, m'a fait partager sa "passion éosinophile". Qu'il me soit permis, en cette occasion, de lui exprimer tous mes remerciements pour m'avoir permis d'intégrer son équipe;

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

- Messieurs les Prs. Jean-Paul Dessaint et Jean-Yves Bonnefoy, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pendant une courte période de stage et d'avoir accepté de juger les travaux présentés dans cette thèse. Que ce mémoire soit, pour Mr. le Pr. J.-P. Dessaint, un témoignage de ma profonde gratitude pour sa grande discrétion et son encouragement. Qu'ils soient assurés de toute mon estime.

Je tiens également à remercier

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

---

## Publications

Truong MJ, Gruart V, Papin JP, Loiseau S, Kusnierz JP, Capron A and Capron M (1993) Human neutrophils express IgE-binding molecules of the S-type lectin family. Role in IgE-dependent activation. *J. Exp. Med.* 177:243.

Truong MJ, Gruart V, Capron A, Capron M and Tourvieille B (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding a non-classical MHC class I antigen (HLA-E) in eosinophils from hypereosinophilic patients. *J. Immunol.* 148:627.

Gruart V, Truong MJ, Plumas J, Zandecki M, Kusnierz JP, Prin L, Vinatier D, Capron A and Capron M (1992) Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood* 79:2592.

Capron M, and Truong MJ (1992) CD23 and eosinophils. *Res. Immunol.* 143:442.

Capron M, Truong MJ, Aldebert D, Gruart V, Suemura H, Delespesse G, Tourvieille B, Capron A (1992) Eosinophil IgE receptor and CD23. *Immunol. Res.* 11:442.

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

Plumas J, Gruart V, Prin L, Aldebert D, Truong MJ, Capron A and Capron M (1991) Human eosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 IL-2 receptor subunit. *Eur. J. Immunol.* 21:1265.

Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A and Capron M. Human eosinophils express functional IgE-binding molecules (Mac-2/εBP) of the S-type lectin family. *Soumis pour publication.*

## Communications

"HLA-E et éosinophiles humains" IVème Conférence Européenne d'Histocompatibilité, Starsbourg. Communication orale, mars 1990.

"Cloning and expression of a cDNA encoding a non-classical MHC class I (HLA-E) in eosinophils from hypereosinophilic patients" British Society for Immunology/Société Française d'Immunologie, Londres. Poster, octobre 1991.

"Human eosinophils express IgE-binding molecules of the Mac-2 family" FASEB Meeting, Anaheim, Californie. Poster, avril 1992.

"Human eosinophils express lectin-type IgE-binding molecules" VIIIème Congrès International d'Immunologie, Budapest, Hongrie. Poster et présentation orale, août 1992.

"Mac-2/εBP et leur implication dans les fonctions effectrices des granulocytes" Réunion d'automne de la Société Française d'Immunologie, Paris. Présentation orale, décembre 1992.

"Human granulocytes express functional IgE-binding molecules (Mac-2/εBP) of the S-type lectin family" American Academy of Allergy and Immunology, Chicago, USA. Poster, mars 1993.

---

## **ABREVIATIONS**

- ADCC**, Antibody-Dependent Cell-Cytotoxicity  
**ANCA**, Auto-Anticorps Anti-Cytoplasme des neutrophiles  
**ASGP-R**, Asialoglycoprotein Receptor  
**BCGF**, B-Cell Growth Factor  
**CBP 35**, Carbohydrate Binding Protein 35  
**CHL**, Chicken Hepatic Lectin  
**CLC**, Charcot-Leyden Crystal  
**CMH**, Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**EAF**, Eosinophil Activating Factor  
**EBV**, Epstein-Barr Virus  
**ECF-A**, Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis  
**ECP**, Eosinophil Cationic Protein  
**EDN**, Eosinophil Derived Neurotoxin  
**EGF**, Epidermal Growth Factor  
**ELAM**, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule  
**EPO**, Eosinophil Peroxydase  
**FMLP**, Formyl Methionyl Leucyl Phénylalanine  
**GM-CSF**, Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor  
**HE**, Hyperéosinophilique  
**HIV**, Human Immunodeficiency Virus  
**HLA**, Human Leukocyte Antigen  
**HL29**, Human Lectin 29  
**HRF**, Histamine Releasing Factor  
**HTLV**, Human T Lymphocyte Virus  
**ICAM**, Intercellular Adhesion Molecule  
**IgEBP**, IgE-binding protein  
**LAM**, Leukocyte Adhesion Molecule  
**LCF**, Lymphokine Chimiotactic Factor  
**LEC-CAM**, Leukocyte Endothelial Cell-Cell Adhesion Molecule  
**LFA**, Leukocyte Functional Antigen  
**LPS**, Lipopolysaccharide  
**LTB4**, Leucotriène B4  
**MBP**, Major Basic Protein of eosinophil  
**MBP**, Mannose-binding protein  
**M-ECEF**, Monocyte-derived Eosinophil Cytotoxicity Enhancing Factor  
**MIP**, Macrophage Inflammatory Peptide  
**MPO**, Myeloperoxydase  
**PAF**, Platelet Activating Factor  
**PF4**, Platelet Factor 4  
**RANTES**, Regulated upon Activation in Normal T cells Expressed and Secreted  
**RHL**, Rat Hepatic Lectin  
**RL29**, Rat Lectin 29  
**TCR**, T-cell receptor  
**TGF**, Transforming Growth Factor  
**TNF**, Tumor Necrosis Factor  
**TRE**, TPA Responding Element  
**VLA**, Very Late Activation Antigen

---

# CHAPITRE I.

## INTRODUCTION GENERALE

En 1967, d'une part K. et T. Ishizaka et d'autre part Johansson et Bennich établirent que le facteur humoral responsable des manifestations de l'hypersensibilité de type I était une nouvelle classe d'immunoglobuline appelée IgE. Dans des conditions normales, l'IgE est retrouvée sous forme de traces dans le sérum humain ( $> 0,001\%$  des Ig totales). Cette concentration d'IgE sérique peut être augmentée dans de nombreuses maladies allergiques (asthme, rhinite, manifestations cutanées) ou non allergiques (maladies parasitaires notamment la schistosomiase et la filariose, hémopathies, certaines affections de nature virale ou liées à des microorganismes fongiques). Notre compréhension du rôle biologique de l'IgE dans les réactions immunitaires s'est enrichie au cours de ces dernières années, grâce aux outils modernes de la recherche (clonage moléculaire, transfection, expression des protéines recombinantes...) qui ont permis la caractérisation structurale et fonctionnelle des molécules impliquées dans les processus de reconnaissance, de signalisation et de communication intercellulaire. La première molécule réceptrice de l'IgE a été décrite sur les basophiles et les mastocytes. Il s'agit d'un récepteur membranaire de forte affinité ou Fc $\epsilon$ RI capable d'induire un signal d'activation à la cellule lorsqu'il est agrégé par les complexes IgE-antigène spécifique (Figure 1).

Les mastocytes tissulaires et les basophiles sanguins ont été longtemps considérés comme les seules cellules directement impliquées dans l'hypersensibilité à IgE. Cependant, lors des phases plus tardives de la réaction inflammatoire, on observe un afflux de nombreux autres types cellulaires, recrutés par voie sanguine ou à partir de tissus voisins, telles les éosinophiles, les macrophages, les neutrophiles et les plaquettes. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux types de polynucléaires: les éosinophiles et les neutrophiles, dont les caractéristiques structurales seront définies dans les chapitres suivants. L'augmentation du nombre de polynucléaires éosinophiles se voit surtout dans les réactions allergiques tandis que les infections à germes pyogènes sont généralement associées à une augmentation du nombre de neutrophiles. Après passage fugace dans le sang, les éosinophiles se localisent principalement au niveau des surfaces corporelles et des muqueuses (peau, intestins et poumons) où ils interviennent



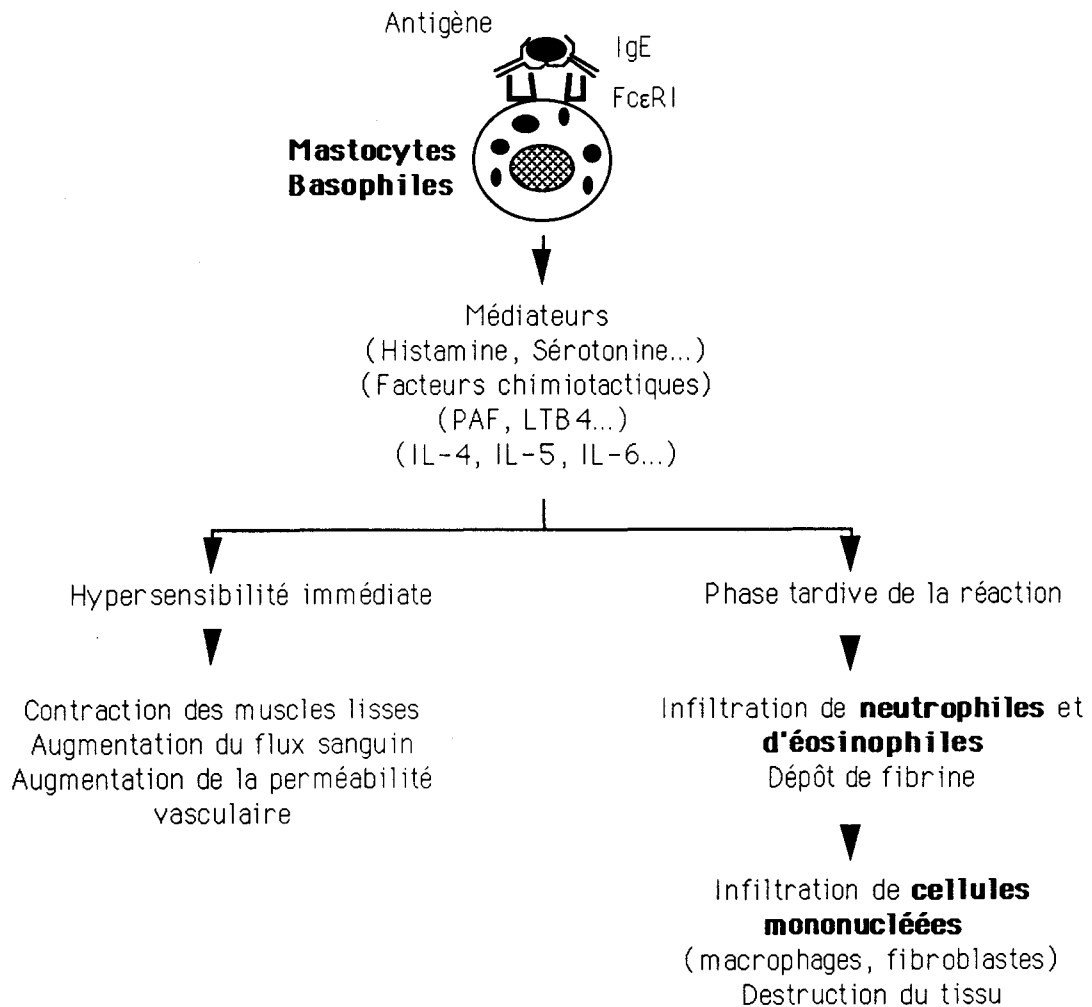


Figure 1. Rôle putatif des médiateurs mastocytaires dans les réactions d'hypersensibilité immédiate et lors de la phase tardive (d'après Gordon *et al.*, 1991). En présence d'antigène spécifique, l'IgE se fixe sur son récepteur. La complexation des récepteurs provoque une libération de médiateurs (PAF, LTB<sub>4</sub>, IL-4, IL-5, IL-6...) qui jouent un rôle important dans le développement de la réaction d'hypersensibilité immédiate et aussi dans la phase tardive de la réaction.

dans l'hypersensibilité immédiate (type I) conjointement aux basophiles et aux mastocytes. A côté de ces maladies allergiques, les parasitoses provoquées par les helminthes, induisent une production intense d'anticorps IgE, en quantité très souvent supérieure à celle observée dans l'allergie. C'est dans l'infection par schistosomes que le rôle direct de cet isotype d'anticorps dans la destruction des schistosomules (larves de parasite) a été défini en coopération avec les cellules effectrices telles les monocytes / macrophages, les éosinophiles ou les plaquettes. L'incubation de ces cellules avec le sérum de patients parasités entraîne une adhérence spécifique aux schistosomules et la mort de ces larves parasitaires. Les éosinophiles, et en particulier une sous-population d'éosinophiles (hypodenses), s'avèrent les plus efficaces pour tuer les parasites en présence d'anticorps IgE. De nombreux travaux initiés dans notre laboratoire ont permis de révéler l'existence d'un autre type de récepteur pour l'IgE (FcεRII) qui est distinct du premier récepteur (FcεRI) de part son affinité de liaison avec l'IgE, son antigénicité, et sa structure moléculaire. Le FcεRII est exprimé par diverses sous-populations cellulaires inflammatoires: monocytes / macrophages, éosinophiles, plaquettes (Capron *et al.*, 1986a) et par des sous-populations lymphocytaires. L'existence de ce type de récepteur au niveau des cellules inflammatoires suggère que ces types cellulaires peuvent agir de manière directe sur les phases précoces de la réaction inflammatoire.

Ainsi, que ce soit dans les réactions allergiques ou les parasitoses, il se produit une hyperproduction d'anticorps d'isotype IgE et un recrutement de polynucléaires accompagné d'une hyperéosinophilie sanguine et/ou tissulaire. L'interaction IgE-récepteurs des cellules effectrices conduit à la libération de médiateurs de l'inflammation (médiateurs lipidiques, interleukines...) mais aussi de molécules pouvant rendre compte des phénomènes d'agression et de destruction tissulaire (protéines cationiques). Toutefois le rôle prépondérant des IgE dans l'activation de ces cellules n'exclut pas pour autant la participation d'autres mécanismes effecteurs (IgG, IgA, cytokines...).

L'éosinophile a tout d'abord été considéré comme une cellule immunomodulatrice grâce à sa capacité d'inactiver certains médiateurs mastocytaires (Weller *et al.*, 1979) bien que la pertinence in vivo de ce modèle n'ait pas été démontrée (Gleich *et al.*, 1979). D'autres études ont introduit la notion inverse d'un rôle amplificateur de la réaction inflammatoire par l'effet histaminolibérateur de

---

certaines composantes granulaires sur les mastocytes et basophiles (MBP pour Major Basic Protein, ECP pour Eosinophil Cationic Protein, EPO pour Eosinophil Peroxydase), par l'effet activateur des processus inflammatoires (PAF-acéther ou Platelet Activating Factor, LTC<sub>4</sub> ou leucotriène C<sub>4</sub>...) en intervenant sur l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme allergique (Gleich *et al.*, 1986). Dans l'immunité anti-parasitaire, les éosinophiles sont considérés comme des cellules bénéfiques capables de lyser des larves de parasite selon un mécanisme de cytotoxicité dépendant d'anticorps (ADCC) IgG, IgE ou IgA (Butterworth *et al.*, 1977; Capron *et al.*, 1984a; 1988a). La contribution des neutrophiles aux manifestations allergiques et notamment dans la réaction tardive est moindre que celle des éosinophiles. Toutefois, ces polynucléaires neutrophiles sont également capables de libérer des médiateurs inflammatoires tels que le LTB<sub>4</sub> et le PAF-acéther.

Les maladies allergiques et les parasitoses sont caractérisées par une production anormale d'anticorps de classe IgE mais aussi par une forte inflammation riche en polynucléaires. L'infiltration des tissus lésés résulte de la migration des cellules inflammatoires à travers l'endothélium par des processus de margination, d'adhérence aux cellules de l'endothélium et d'infiltration entre les cellules endothéliales (extravasation) (Figure 2). Exposée à un gradient de concentration de facteurs chimiotactiques, cette migration cellulaire active toute la machinerie nécessaire pour la locomotion et la maintenance de l'orientation et de la stabilité cellulaire (phénomène de "priming"). Les facteurs attractants, dont nous définirons ultérieurement la nature, peuvent provenir soit des bactéries (polyosides) soit de l'hôte (facteurs dérivés du complément, lymphokines, médiateurs lipidiques). L'agrégation et la margination cellulaire peuvent être dues à la neutralisation des charges négatives à la surface des neutrophiles après une sécrétion limitée de protéines cationiques basiques, augmentant ainsi les propriétés adhésives des cellules par un mécanisme électrostatique. La phase essentielle de cette mobilité est l'étape d'adhérence cellulaire qui fait intervenir des couples de molécules d'adhésion (Springer, 1990). Les principales molécules sont les intégrines leucocytaires et les sélectines dont les caractéristiques structurales sont évoquées dans les chapitres suivants. En particulier, les molécules de type lectine attirèrent notre attention. Une lectine de type S nommée IgEBP (IgE-binding protein) joue un rôle important dans la reconnaissance intercellulaire grâce à sa capacité à lier des carbohydrates. Cette lectine est également capable de fixer l'IgE. Nous définirons, dans les chapitres suivants, les caractéristiques essentielles des différentes molécules capables de lier l'IgE .

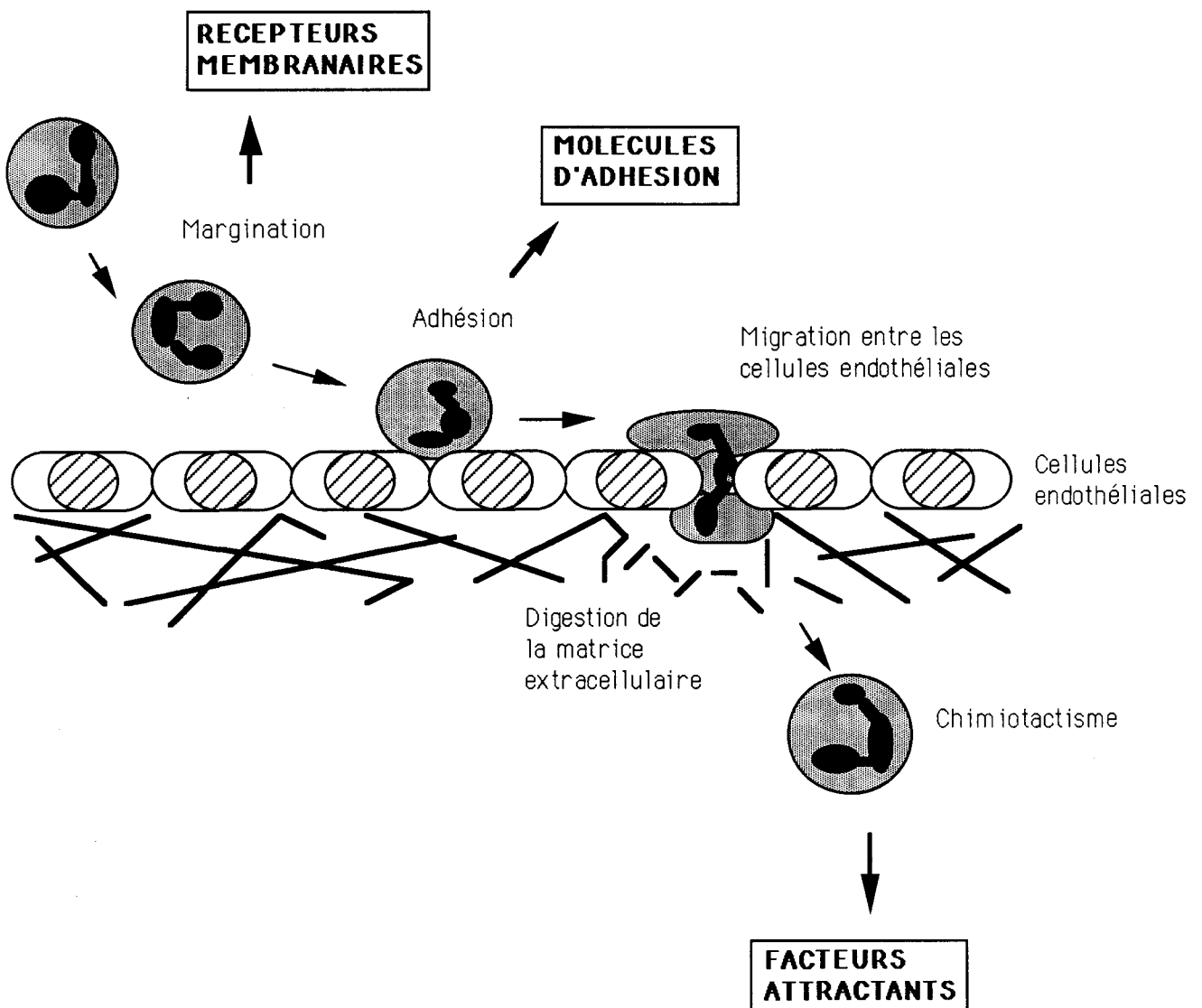


Figure 2. Chimiotactisme et infiltration leucocytaire sous l'influence de facteurs attractants.

## **CHAPITRE II.**

### **LES POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES ET NEUTROPHILES.**

Les granulocytes ou polynucléaires, ainsi nommés en raison de leurs granulations cytoplasmiques abondantes et de leur noyau polylobé, constituent la majorité des cellules nucléées du sang circulant.

Trois types de granulocytes ont pu être définis selon leur affinité tinctoriale:

- Les éosinophiles (15  $\mu\text{m}$  de diamètre) représentent de 1-4% des leucocytes du sang. Ils se caractérisent par de grosses granulations riches en protéines cationiques très affines pour les colorants acides (éosine, fluorescéine).

- Les neutrophiles (10-12  $\mu\text{m}$  de diamètre) représentent 60-70% des leucocytes sanguins. Ils contiennent de nombreuses granulations qui, par leur contenu enzymatique, s'apparentent aux lysosomes.

- Les basophiles, représentant moins de 0,5% des leucocytes sanguins, contiennent également de grosses granulations cytoplasmiques sphériques mais métachromatiques contenant des protéoglycanes acides et de l'histamine.

Dans le cadre de nos travaux, seules les caractéristiques structurales et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles sont détaillées dans les chapitres suivants.

---

## Les polynucléaires éosinophiles.

En dehors de la moëlle osseuse, les éosinophiles sont présents surtout dans les tissus (poumons, tractus digestif et peau). Ils se retrouvent également dans les reins et l'utérus. Leur nombre dans le sang peut s'accroître anormalement au cours de nombreuses affections allergiques et parasitaires, regroupées sous le terme général d'hyperéosinophilie sanguine ou HE ( $> 1,5 \times 10^9$  éosinophiles/l) avec ou non production accrue d'anticorps IgE.

### Hétérogénéité des éosinophiles

Sur la base de leur variabilité en densité et en composition protéique, deux sous-populations d'éosinophiles ont pu être individualisées sur gradient de densité (Prin *et al.*, 1983; 1984; Gruart *et al.*, 1989) (Figure 3). Les éosinophiles normodenses sont présents chez les sujets normaux et possèdent un aspect typique à granules ellipsoïdes avec un cristalloïde central dense aux électrons et entouré d'une matrice plus claire. Quant aux éosinophiles hypodenses, ils sont présents dans certaines conditions d'hyperéosinophilie sanguine ou tissulaire (éosinophiles de lavages bronchoalvéolaires ou d'épanchements pleuraux). Ils possèdent un cytoplasme très vacuolé et des granulations raréfiées ou de plus petite taille avec parfois une inversion de leur opacité aux électrons.

Récemment, il a été démontré que les éosinophiles cocultivés avec des cellules endothéliales ou incubés avec leurs surnageants de culture, acquièrent des caractéristiques d'éosinophiles hypodenses (Rothenberg *et al.*, 1987). L'IL-3 et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) sont également capables de rendre les éosinophiles normodenses en éosinophiles hypodenses (Rothenberg *et al.*, 1988; Owen *et al.*, 1987).

Des arguments fonctionnels (cytotoxicité) et structuraux (modification de certains récepteurs de membrane) laissent à penser que les éosinophiles hypodenses, anormalement retrouvés dans la circulation sanguine chez les patients allergiques et dans les parasitoses, sont le reflet des éosinophiles tissulaires. Les éosinophiles hypodenses expriment un plus grand nombre de récepteurs pour les IgG et pour le complément que les cellules normodenses. L'expression des sites de fixation pour l'IgE est accrue sur les éosinophiles hypodenses et la proportion de cellules

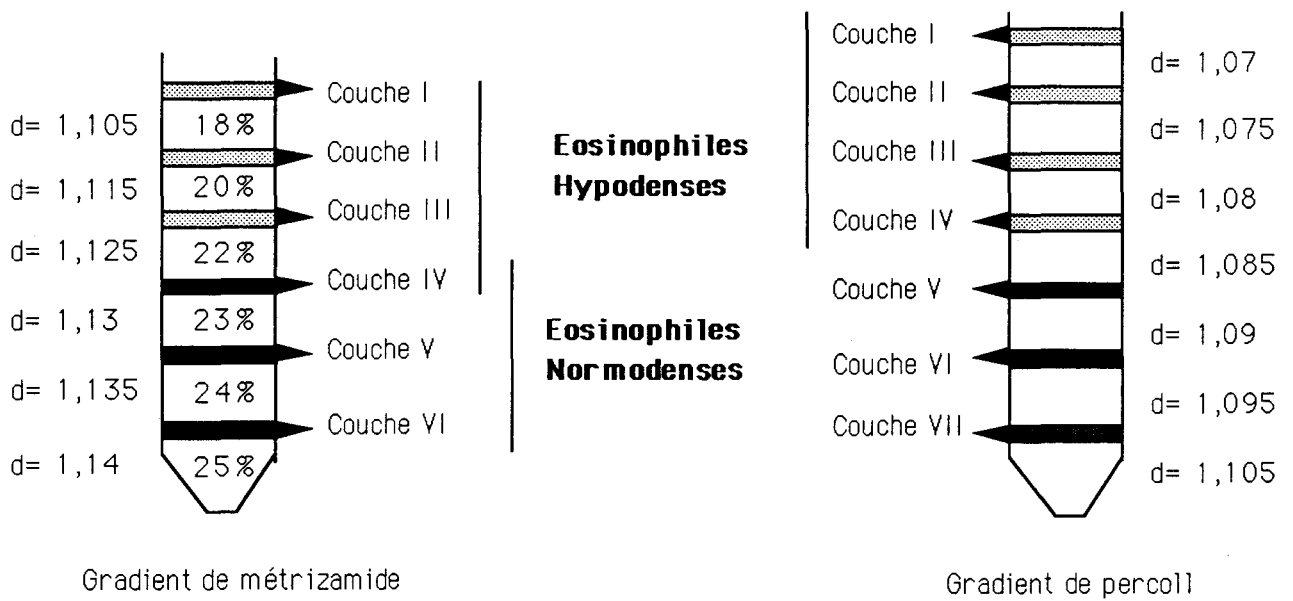


Figure 3. Isolement des sous-populations d'éosinophiles sur gradients discontinus de densité (métrizamide ou percoll). Les éosinophiles hypodenses sont recueillis au niveau des couches I à IV..

fixant l'IgE cytophile est plus élevée lorsqu'il s'agit d'éosinophiles tissulaires (Capron *et al.*, 1985). Les deux sous-populations fixent l'IgE mais, seuls les éosinophiles hypodenses répondent à cette stimulation par un relargage d'une des protéines cationiques de l'éosinophile, l'EPO (Khalife *et al.*, 1986). De plus, la capacité de cytotoxicité des éosinophiles hypodenses, en présence d'IgE, est bien plus importante que celle des éosinophiles normodenses (Capron *et al.*, 1984a). La situation inverse est observée dans le cas de la cytotoxicité IgG dépendante (David *et al.*, 1980). Les éosinophiles hypodenses sont considérés comme étant plus différenciés et plus activés que les éosinophiles normodenses (Fukuda and Gleich, 1989).

### Cytokines et leurs récepteurs

Non seulement les cytokines telles que l'IL-5, le GM-CSF et l'IL-3 jouent un rôle essentiel dans l'éosinopoïèse via des récepteurs de membrane respectifs, elles possèdent également des effets activateurs induisant la dégranulation des éosinophiles (IL-5, GM-CSF), mais aussi permettent la prolongation de survie de ces cellules en s'opposant à leur apoptose (IL-5, IL-3, IL-1, GM-CSF) (Figure 4).

Plusieurs études ont montré que les récepteurs pour ces interleukines se présentaient en nombre relativement peu élevé, de 300 à 900 sites par cellule pour l'IL-3 ( $K_d = 470$  pM) et le GM-CSF ( $K_d = 44$  pM) (Lopez *et al.*, 1989) et de 200 à 600 pour l'IL-5 ( $K_d = 0,39$  à  $1,93 \times 10^{-9}$  M) (Chihara *et al.*, 1990). Ces récepteurs sont formés de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne  $\beta$  commune et une chaîne  $\alpha$  spécifique pour le ligand (Cosman *et al.*, 1990). Ces 4 chaînes appartiennent à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques qui comprend les récepteurs pour l'érythropoïétine (Epo), la prolactine, les récepteurs pour l'IL-4, l'IL-6, l'IL-7 et le G-CSF.

L'existence des récepteurs pour le TNF (Tumor Necrosis Factor, Silberstein *et al.*, 1986), l'IL-1 (Pincus *et al.*, 1986) et l'IFN (Interféron, Valerius *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1987) est suspectée du fait de leur action sur les éosinophiles. Par ailleurs, les éosinophiles sont capables d'exprimer à leur surface la sous-unité p55 ( $K_d = 10^{-8}$  M) et pas la sous-unité p75 du récepteur pour l'IL-2 (Plumas *et al.*, 1991). Récemment, il a été suggéré que l'IL-2 serait impliquée dans l'induction du chimiotactisme des éosinophiles (Rand *et al.*, 1991a). De plus, les éosinophiles expriment des



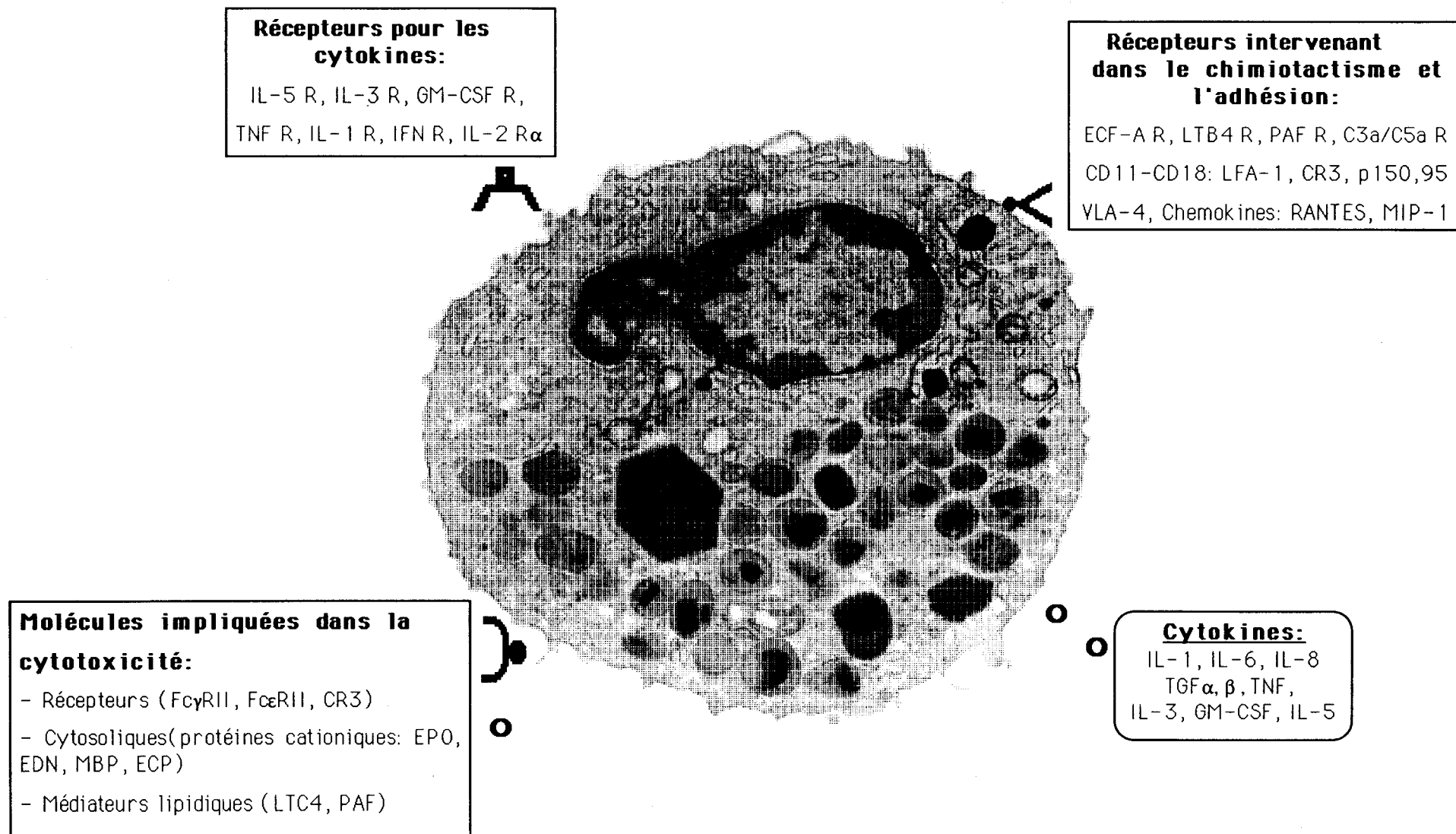


Figure 4. Les récepteurs et les médiateurs impliqués dans les fonctions effectrices de l'éosinophile.

---

cytokines impliquées dans la génèse de la lignée éosinophile telles l'IL-3, le GM-CSF (Kita *et al.*, 1991) et l'IL-5 (Desreumaux *et al.*, 1992) et également celles qui sont impliquées dans les réactions inflammatoires tels l'IL-1 $\alpha$  (Del Pozo *et al.*, 1990), le TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ , Wong *et al.*, 1990), le TGF- $\beta$ 1 (Wong *et al.*, 1991) et l'IL-6 (Hamid *et al.*, 1992).

### **Les récepteurs impliqués dans le chimiotactisme et l'adhésion.**

Les éosinophiles, intervenant dans les processus inflammatoires tardifs des réactions allergiques, exercent leurs fonctions dans les tissus inflammatoires après avoir quitté le sang par diapédèse sous l'influence de facteurs chimiotactiques tels que l'ECF-A (Eosinophil chemotactic Factor of Anaphylaxis), le LTB<sub>4</sub>, le PAF-acéther, et les anaphylatoxines C3a et C5a. Certains de ces récepteurs ont été caractérisés. Les éosinophiles possèdent un récepteur pour le C3a de faible affinité (Goers *et al.*, 1984) et 2 types de récepteurs pour le C5a, celui de faible affinité ( $K_d = 3 \times 10^{-11}M$ ) plus faiblement exprimé que celui de forte affinité ( $K_d = 10^{-7}M$ ) (Gerard *et al.*, 1989). Il a été démontré que les éosinophiles sont capables d'exprimer le récepteur pour le C3bi (CR3/CD11b-CD18) (Fischer *et al.*, 1986). Celui-ci est impliqué dans l'adhérence et la cytotoxicité IgE-dépendante vis à vis de *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1987). De plus, l'éosinophile exprime l'intégrine LFA-1 (Hartnell *et al.*, 1990) et le complexe protéique VLA-4 $\alpha$  (Very Late Activation Antigen, CD49d/CD29) (Walsh *et al.*, 1991; Dobrina *et al.*, 1991). Ces molécules sont impliquées dans les mécanismes d'adhésion entre l'éosinophile et la cellule endothéliale. Par ailleurs, le marqueur CD4, exprimé par les éosinophiles (Lucey *et al.*, 1989a) est capable de transduire un stimulus migratoire et sert également de récepteur pour la lymphokine chimioattractante (LCF) (Rand *et al.*, 1991b). Des études récentes ont démontré que la molécule RANTES (Regulated upon Activation in Normal T cells Expressed and Secreted) de même que MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Factor-1), jouent un rôle dans le chimiotactisme des éosinophiles normaux (Rot *et al.*, 1992).

### **Les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène.**

Les éosinophiles de sujets hyperéosinophiliques sont capables de présenter à leur surface des antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-DR) (Lucey *et al.*,

1989b). Il a d'ailleurs été démontré que les éosinophiles peuvent jouer un rôle de cellule présentatrice de l'antigène initiant ainsi la réponse immunitaire vis à vis d'éléments infectieux au niveau du site inflammatoire (Weller *et al*, 1993).

### Les récepteurs impliqués dans la cytotoxicité.

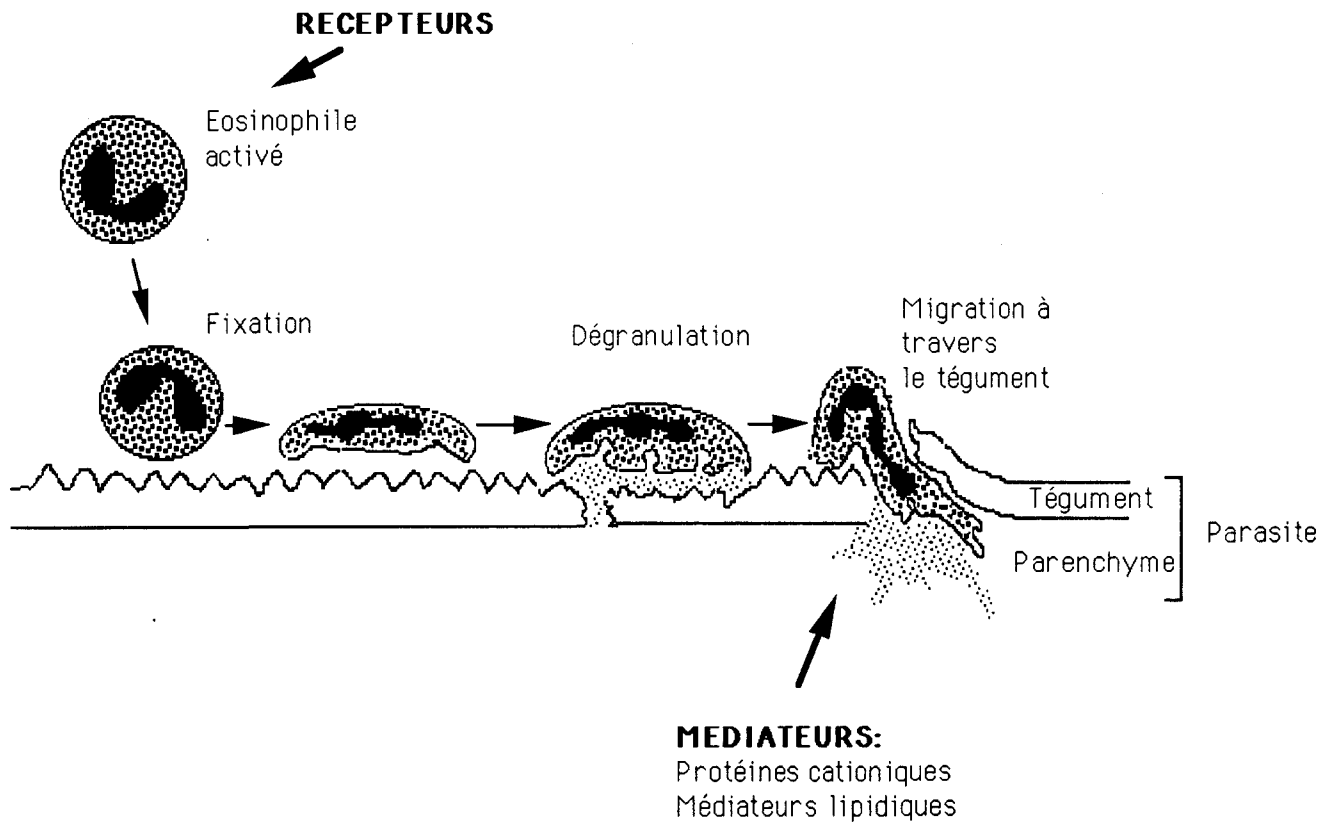
Les réactions de cytotoxicité à médiation cellulaire dirigées contre les larves de parasites, ne reposent pas sur les cellules T cytotoxiques, ni sur les cellules NK, mais sur les cellules non lymphoïdes. Ce sont principalement les macrophages, éosinophiles et plaquettes qui sont responsables de la destruction du parasite par un mécanisme de cytotoxicité (ADCC) où les anticorps se lient aux récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, présents sur ces cellules et reconnaissent les antigènes cibles à la surface du parasite (Figure 5).

Plusieurs arguments plaident en faveur de l'intervention réelle des éosinophiles dans les mécanismes d'ADCC dans l'immunité à la réinfestation: (1) l'accumulation d'éosinophiles et de macrophages autour des schistosomules morts chez les animaux immuns (Hsu *et al*, 1971; Von Lichtenberg *et al*, 1976); (2) l'injection de sérum anti-éosinophile aux souris diminue leur immunité (Mahmoud *et al*, 1975); (3) le transfert adoptif d'éosinophiles de rats immuns confère aux receveurs un état de résistance (Capron *et al*, 1984b). Les éosinophiles sont particulièrement efficaces dans la destruction des parasites comme les helminthes, qui sont très souvent résistants aux enzymes lysosomales des neutrophiles et macrophages.

De nombreuses études ont permis de démontrer que différentes classes d'anticorps ont pu être incriminées: des IgG se fixant au récepteur Fc $\gamma$ RII/CD32 (Butterworth *et al*, 1977), des IgE se fixant au récepteur Fc $\epsilon$ RII/CD23 (Capron *et al*, 1981, 1984a) et plus récemment des anticorps IgA (Capron *et al*, 1988a) qui se fixent probablement sur des récepteurs pour l'IgA.

Les potentialités cytotoxiques des éosinophiles dépendent étroitement de son état d'activation. Si la cytotoxicité dépendante d'anticorps IgG peut être effectuée par des éosinophiles normaux (Butterworth *et al*, 1975) en revanche, seuls les éosinophiles activés ou hypodenses sont cytotoxiques en présence d'anticorps IgE (Capron *et al*, 1984a).

L'activation de ces éosinophiles est liée à l'effet de nombreux facteurs tels les facteurs de croissance et les cytokines (Capron and Prin 1990) ou des médiateurs lipidiques, comme le PAF (Capron *et al*, 1988b).



**Figure 5.** L'attaque des polynucléaires éosinophiles contre les parasites. L'attachement spécifique de la cellule effectrice à la cible parasitaire conduit à la libération à la surface du parasite des médiateurs (protéines cationiques, médiateurs lipidiques...) causant de petites lésions dans le tégument du parasite à travers lequel d'autres éosinophiles peuvent pénétrer dans le parasite.

**Cytotoxicité IgG-dépendante.**

Les anticorps IgG, présents dans le sérum immun préchauffé, ont été les premiers anticorps incriminés dans cette fonction de cytotoxicité (Butterworth *et al*, 1977). Plus récemment, il a été démontré que les quatre sous-classes d'IgG ne sont pas tous de la même efficacité dans les mécanismes d'ADCC (Khalife *et al*, 1989). En absence de facteurs stimulants exogènes, les anticorps IgG1 et IgG3 purifiés des sérums de patients bilharziens se révèlent être les plus efficaces. Quant aux anticorps IgG2, ils agissent de manière différente suivant l'état d'activation des éosinophiles: en présence des éosinophiles normaux, ils agissent en tant qu'anticorps bloquant et en présence des éosinophiles hypodenses, ils représentent de bons anticorps effecteurs (Khalife *et al*, 1989). Les anticorps IgG4 sont aussi capables d'inhiber la cytotoxicité induite par les Ac IgG1 et IgG3.

**Cytotoxicité IgE-dépendante.**

Ce sont des travaux entrepris dans le cadre de l'immunité parasitaire qui ont conduit à l'identification de récepteurs pour les IgE sur les éosinophiles. L'activité anti-parasitaire est déclenchée par l'interaction des anticorps IgE avec les récepteurs pour cette immunoglobuline à la surface cellulaire (Capron *et al*, 1981). L'interaction directe de l'IgE avec les éosinophiles humains dans ce mécanisme de cytotoxicité a été suspectée pour diverses raisons: (1) la labilité du facteur sérique au chauffage; (2) l'analyse statistique révélant une corrélation positive entre la capacité de cytotoxicité du sérum immun et la présence d'anticorps IgE dirigés contre les schistosomules; (3) l'effet inhibiteur des anticorps anti-FcεRII sur la formation de rosettes IgE et sur la cytotoxicité en présence de sérum non chauffé; (4) l'absence de compétition croisée entre les récepteurs pour l'IgG et les récepteurs pour l'IgE. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre les éosinophiles (Ac BB10) (Capron *et al*, 1986b). Ces récepteurs pour l'IgE étant de faible affinité, il est fort probable que cette cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles nécessite la collaboration des molécules d'adhésion. Il a été démontré que les anticorps anti-chaîne α du CR3 (CD11b) inhibent de manière spécifique l'adhérence et la cytotoxicité des éosinophiles hypodenses vis à vis de schistosomules opsonisés par les IgE (Capron *et al*, 1987). Au contraire, les anticorps anti-CD11a (chaîne α du LFA-1) ou anti-CD18 (chaîne β commune des intégrines) n'inhibent pas l'adhérence et la cytotoxicité.

**Cytotoxicité IgA-dépendante.**

Des récepteurs pour le fragment Fc des Ig, autre que le FcεRII, ont été également étudiés pour leur rôle dans les mécanismes d'ADCC. En particulier, l'existence de récepteurs pour l'IgA à la surface des éosinophiles a été mise en évidence par des études en cytofluorométrie en flux (Capron *et al*, 1988a). Il semblerait que ce type de récepteur est également impliqué dans les phénomènes de cytotoxicité puisque la préincubation des éosinophiles humains avec les IgA polymériques inhibe la fonction d'ADCC de ces cellules (Capron *et al*, 1988a).

#### **Facteurs régulateurs de la cytotoxicité.**

Des facteurs tels que l'EAF, Eosinophil Activating Factor (Veith *et al*, 1983), le M-ECEF, Monocyte-derived Eosinophil Cytotoxicity-Enhancing Factor (Lenzi *et al*, 1985), ou le TNF (Silberstein and David, 1986) augmentent la cytotoxicité des éosinophiles. Toutefois, ces facteurs ont été étudiés lors de la cytotoxicité médiée par l'IgG et non par l'IgE. Très récemment, un accroissement de la cytotoxicité IgE-dépendante a été observé par des facteurs tels LIF/HILDA, l'IL-4 humaine, l'IL-5 murin ou humain, le TNF-α ou le GM-CSF, et ceci de manière dose dépendante (Capron *et al*, 1989a).

#### **Récepteurs pour l'IgE des éosinophiles.**

L'existence des sites de fixation de l'IgE à la surface des éosinophiles a été mise en évidence par de nombreuses techniques. L'analyse en microscopie électronique a été possible en utilisant un marquage indirect avec l'IgE et l'anti-IgE marqué à la ferritine (Hubscher, 1975). La fixation directe de l'IgE marquée à la peroxidase sur son récepteur a été obtenue sur les éosinophiles péritonéaux de rat (Capron *et al*, 1977). Enfin, la démonstration la plus évidente, de la présence de récepteurs pour l'IgE à la surface des éosinophiles a été obtenue par technique de rosettes IgE (Capron *et al*, 1981). Il a été initialement démontré qu'environ 30% des éosinophiles humains ou de rat forment des rosettes avec des érythrocytes couplés avec de l'IgE. Cette proportion augmente de manière très significative (> 50% augmentation) quand les éosinophiles sont isolés à partir de sujets atteints d'hyperéosinophilie ou de rats infectés par *Schistosoma mansoni*. Par ailleurs, la méthode d'analyse en cytofluorométrie a également permis d'évaluer de manière quantitative la proportion d'éosinophiles humains (de 20 à 60%) capables de présenter à leur surface des molécules fixant l'IgE (Capron *et al*, 1985). Ces résultats sont en accord avec le taux de formation

de rosettes IgE évoqué auparavant. De plus, il a été démontré que les IgE de nature cytophilique sont détectées sur les éosinophiles provenant de la majorité des patients HE, et ceci en relation avec un taux d'IgE sérique élevé (Capron *et al*, 1985; Prin *et al*, 1986).

L'analyse quantitative et qualitative des récepteurs pour l'IgE sur les éosinophiles a été rendue possible grâce à l'utilisation d'IgE radiomarquée par de l'iode 125 (Jouault *et al*, 1988). Cette fixation de l'IgE radiomarquée sur les éosinophiles est inhibée par de l'IgE froide de manière dose-dépendante. Le nombre de récepteurs par cellule (environ  $10^5$  récepteurs / cellule) de même que la constante d'association ( $K_a = 10^7$  L/M) (Capron *et al*, 1984a) ont pu être ainsi déterminés.

La caractérisation biochimique du récepteur pour l'IgE des éosinophiles a été entreprise grâce à plusieurs techniques. L'utilisation de colonne d'affinité couplée avec de l'IgE a permis l'isolement des récepteurs pour l'IgE des éosinophiles (Jouault *et al*, 1988). En conditions non réductrices, seule une molécule de taille supérieure à 200 kDa a été retrouvée alors qu'en conditions réductrices, deux composants de poids moléculaires différents ont été caractérisés: 45-50 et 23 kDa. Une molécule additionnelle de 15 kDa a été retrouvée dans les deux conditions d'analyse. La taille de ces peptides est similaire à celle connue pour le récepteur pour l'IgE des lymphocytes B (CD23) (Meinke *et al*, 1978), des monocytes/macrophages (Melewicz *et al*, 1982a, 1982b) ou des plaquettes (Joseph *et al*, 1986b).

Un anticorps monoclonal dirigé contre la membrane des éosinophiles a été obtenu après immunisation des souris avec des éosinophiles hypodenses (Capron *et al*, 1986b). Les particularités de cet anticorps BB10 sont la reconnaissance spécifique des cellules hypodenses et la capacité d'inhibition de la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles vis à vis de larves de parasites. Cette inhibition est également observée pour d'autres types cellulaires telles les monocytes et les plaquettes (Capron *et al*, 1986b). De plus, cet anticorps BB10 inhibe spécifiquement la formation de rosettes IgE par les éosinophiles. Ainsi, grâce à cet Ac BB10, il a été possible de déterminer la quantité de molécules susceptibles d'être reconnues par BB10 à la surface des éosinophiles ( $2 \times 10^7$  molécules/cellule) et des études de Scatchard ont permis de déterminer une constante d'affinité de l'anticorps monoclonal de  $1,17 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> (Jouault *et al*, 1988). Ces résultats confirment d'ailleurs ceux obtenus avec l'IgE et soulignent de ce fait, la faible affinité du BB10 pour le FcεRII des éosinophiles. Des immunoabsorbants réalisés avec BB10

révèlent deux composants majeurs de taille 45 et 23 kDa et un composant de 15 kDa, présent dans des conditions réductrices et non réductrices. Ce profil protéique est également obtenu par immunoabsorbant IgE. De plus, les immunoprécipitations réalisées avec l'Ac BB10 mettent en évidence les 2 polypeptides spécifiques de taille 45-50 et 15 kDa et occasionnellement une molécule de 20-25 kDa provenant des extraits éosinophiliques (Grangette *et al*, 1989). Il a été démontré que les anticorps anti-CD23 (Ac 135) (Rector *et al*, 1985) et BB10 (Capron *et al*, 1986b) reconnaissent la même molécule de 45-50 kDa sur les éosinophiles hypodenses (Grangette *et al*, 1989). De plus, l'absence de compétition entre ces 2 anticorps suggère qu'ils reconnaissent des épitopes distincts du récepteur pour l'IgE de l'éosinophile. Par ailleurs, les anticorps anti-fibronectine immunoprécipitaient les peptides de 45-50 kDa du FcεRII et inhibaient la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles. Ces résultats suggèrent que (1) les séquences inversées de l'adhésiotope Arg-Gly-Asp (RGD) sont retrouvées au niveau des récepteurs FcεRII des éosinophiles de la même manière que pour les récepteurs FcεRII des lymphocytes B, et que (2) les structures d'adhésion cellulaire jouent un rôle essentiel dans la fonction du FcεRII des éosinophiles (Grangette *et al*, 1989).

L'expression du récepteur pour l'IgE des éosinophiles peut être régulée par divers facteurs. Une augmentation de l'expression du FcεRII sur les éosinophiles par de l'IgE a été démontrée par incubation des éosinophiles de rats normaux avec soit du sérum de rat infecté par *S. mansoni* soit de l'IgE de myélome (Capron *et al*, 1983). Des molécules chimioattractantes telles que l'ECF-A et le PAF-acéther sont des facteurs stimulant l'expression du FcεRII par les éosinophiles normaux (Capron *et al*, 1981; Walsh *et al*, 1990) alors qu'elles semblent être inefficaces sur les éosinophiles de patients bilharziens ou hyperéosinophiliques, considérés comme étant déjà très activés. Aucune des interleukines connues comme régulatrice de l'expression du CD23 sur d'autres populations cellulaires (et en particulier l'IL-4) n'a donné de résultats concluants sur les éosinophiles humains, à la différence des résultats obtenus sur les lignées cellulaires.

### **Phénomènes de dégranulation.**

L'interaction des anticorps avec les récepteurs pour le fragment Fc de l'éosinophile, en présence de l'antigène parasitaire induit un signal d'activation qui se manifeste par la libération des protéines cationiques granulaires ainsi que par la génération de médiateurs néoformés (Figure 5). Ainsi, la



notion d'un rôle amplificateur de l'éosinophile est due à l'activité cytotoxique très puissante de ces médiateurs vis à vis de cibles étrangères (larves de parasite ou cellules tumorales) et aussi vis à vis de cellules ou de tissus normaux. Les premières études indiquent que les éosinophiles libèrent les composants de leurs granulations soit après avoir adhéré aux parasites qui ont préalablement fixé des anticorps (Butterworth, 1984) soit après avoir interagit avec des complexes immuns (Ishikawa *et al*, 1974; Takenaka *et al*, 1977).

Au nombre de quatre, les protéines cationiques de l'éosinophile sont la MBP, l'EPO, l'ECP et l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin). Les principales caractéristiques de ces protéines sont résumées dans le Tableau I. Quant aux médiateurs lipidiques (LTC<sub>4</sub>, PAF, ...), dérivés des phospholipides membranaires, le LTC<sub>4</sub> est produit préférentiellement par les éosinophiles contrairement aux neutrophiles qui produisent du LTB<sub>4</sub> (Weller *et al*, 1983). En réponse au calcium ionophore, les éosinophiles hypodenses libèrent plus de PAF que les éosinophiles normodenses. Cette libération de médiateurs lipidiques participe à la fonction IgE-dépendante des éosinophiles dans les réactions inflammatoires et allergiques.

Des études antérieures ont permis de démontrer que l'EPO peut être relarguée après stimulation des éosinophiles (de rats normaux ou infectés par *S. mansoni*) par des IgG2a ou des IgE en présence d'anti-Ig correspondant (Khalife *et al*, 1985). Un relargage sélectif d'EPO, mesuré par test de chimioluminescence, a été obtenu par incubation des éosinophiles humains hypodenses avec de l'anti-IgE, alors qu'un taux très faible d'EPO n'est relargé que par les normodenses en contact avec les anti-IgG (Khalife *et al*, 1986). Il a ailleurs été démontré que les allergènes spécifiques pouvaient également induire une libération extracellulaire de l'EPO par les éosinophiles de patients allergiques (Tomassini *et al*, 1991). L'HRF (Histamine Releasing Factor) causant le relargage de l'histamine par les mastocytes dans un système IgE-dépendant, provoque aussi la libération d'EPO des éosinophiles de la même manière que l'anti-IgE (Capron *et al*, 1989b).

Dans des conditions d'activation identiques, l'exocytose de 2 autres protéines cationiques de l'éosinophile, la MBP et l'ECP, a été évaluée par des tests radioimmunologiques. La MBP est relarguée après addition d'antigènes spécifiques et d'anti-IgE alors que l'ECP n'est pas détectée après incubation des éosinophiles avec l'anti-IgE ou l'HRF mais seulement après addition d'anti-IgG. Cette stimulation des éosinophiles par l'IgG, n'induit pas une libération d'EPO, mais au

	MBP	EPO	EDN/EPX	ECP
PM	13,8 kD	72 kD 2 sous-unités de 14 et 58 kD	18 kD	17-20 kD
pl	10,9	>11	>11	>11
Quantité	8 µg	15 µg	10 µg	>25 µg
Localisation	Core	Matrice	Matrice	Matrice
ARNm	1 kb	3,2-3,5 kb	1 kb	1 kb
Gène	<3 kb	12 kb	-	-
Spécificité Cellulaire	<b>HL60 indifférenciées éosinophiles basophiles</b>	<b>HL60 éosinophiles*</b>	<b>HL60 indifférenciées HL60 éosinophiles* HL60 neutrophiles* HL60 monocytes* éosinophiles neutrophiles</b>	<b>HL60 éosinophiles* cultivée en IL-5 éosinophiles</b>
Fonction	- toxique pour les parasites et les cellules de mammifères - neutralise l'héparine - induit la dégranulation des basophiles et des mastocytes	- activité peroxidasique - toxique pour les microor- ganismes et les cellules tumorales - induit la dégranulation des mastocytes	- neurotoxine - activité ribonu- cléasique	- toxique pour les parasites - induit la libération d'histamine - activité ribonucléasique faible

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

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

---

contraire une libération tardive d'ECP (Khalife *et al*, 1986; Capron *et al*, 1989b). Très récemment, il a été démontré que le complément C5a, le PAF, le FMLP (Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine) et l'IL-8 agissent aussi sur la libération de l'EPO (Kernen *et al*, 1991). Toutefois, les effets du FMLP et de l'IL-8 sont moins importants que ceux produits par le C5a et le PAF.

Quant à la stimulation par l'IgA, elle entraîne la décharge de trois protéines cationiques de l'éosinophile: EPO, ECP (Tomassini *et al*, 1991) et EDN (Abu Ghazaleh *et al*, 1989). Ces protéines cationiques de l'éosinophile sont toxiques vis à vis de différentes cibles de par leurs propriétés basiques et catalytiques. On décrit ainsi des activités bactéricides, anti-protazoaires, anti-helminthes, anti-tumorales, mais aussi neurotoxiques (Gleich and Adolphson, 1986).

Les éosinophiles, de la même manière que les neutrophiles, produisent en grande quantité des radicaux libres dérivés de l'oxygène, et principalement l'hydroperoxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sous l'action de la MPO, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se transforme en molécules fortement toxiques (Pincus, 1983) (Figure 7).

A côté de ces récepteurs pour les immunoglobulines, des récepteurs pour l'œstradiol, les glucocorticoïdes (K<sub>d</sub>= 15 nM) sont présents sur les éosinophiles (Peterson *et al*, 1981). Chez les sujets hyperéosinophiliques corticorésistants, il semble exister un défaut d'expression ou de fonctionnement des récepteurs pour les glucocorticoïdes (Prin *et al*, 1989). Par ailleurs, de récents travaux montrent que les corticoïdes diminuent la survie des éosinophiles (Wallen *et al*, 1991).

Il a également été démontré que les intercrines/chémokines telles que RANTES et MIP-1 $\alpha$  induisaient une libération d'ECP par les éosinophiles prétraités à la cytochalasine B mais ne provoquaient pas de formation de LTC<sub>4</sub> (Rot *et al*, 1992).

## Les polynucléaires neutrophiles.

Dans certaines pathologies, le nombre des neutrophiles sanguins peut augmenter au-delà des limites physiologiques (polynucléose,  $> 10000 / \text{mm}^3$ ). A l'inverse, au cours de certaines infections virales, d'intoxications médicamenteuses ou à la suite de certains traitements, une diminution significative des neutrophiles est observée (neutropénie,  $< 500 / \text{mm}^3$ ). Généralement absents des tissus sains, les neutrophiles s'accumulent au niveau du territoire lésé, au cours des infections et lors des phases tardives des réactions allergiques. Ce fait implique une attraction des neutrophiles vers le site inflammatoire par des facteurs chimiotactiques.

### Les facteurs chimiotactiques et leurs récepteurs.

En situation normale, les neutrophiles sont des cellules physiologiquement inactives, mais prêtes à réagir à la moindre alerte. L'alerte d'une atteinte tissulaire est donnée par des agents chimiotactiques qui sont aussi bien des peptides relâchés par les bactéries (FMLP) que des facteurs provenant de l'hôte (facteur du complément C5a, leucotriènes...). La figure 6 résume les caractéristiques biochimiques des neutrophiles.

Au nombre de  $10^5$  récepteurs pour le FMLP par cellule, les récepteurs de forte affinité ( $K_d = 0,53 \text{ nM}$ ) se distinguent des récepteurs de faible affinité ( $K_d = 24,4 \text{ nM}$ ) (Koo *et al*, 1982). De même, deux classes de récepteurs pour le LTB<sub>4</sub> ont été décrites suivant leur affinité pour le ligand, l'un de forte affinité ( $K_d = 0,4 \text{ nM}$ ) responsable d'une réponse chimiocinétique (migration non directionnelle) et du chimiotactisme, et l'autre de faible affinité ( $K_d = 10^{-7} \text{ M}$ ) entraîne l'activation du neutrophile (Goldman *et al*, 1982; 1984). Le PAF (Platelet Activating Factor) exerce également un effet chimiotactique marqué sur les neutrophiles par la présence de deux types de récepteurs, l'un de forte affinité induisant la perméabilité au calcium et l'autre de faible affinité, qui en association avec la protéine G, costimule la phospholipase C (Naccache *et al*, 1986).

D'autres cytokines chimiotactiques ont été récemment caractérisées. L'IL-8/NAP-1, NAP-2, gro/MIP-2 et ENA-78, appartenant à la famille des intercrines/chemokines de type C-X-C (Oppenheim *et al*, 1991), sont des attractants relativement spécifiques pour les neutrophiles

(Baggiolini *et al*, 1989; Moser *et al*, 1990; Schröder *et al*, 1990; Walz *et al*, 1991). Elles agissent sur toutes les étapes de la migration des neutrophiles et peuvent être considérées comme des cytokines inflammatoires par leur activité stimulatrice de la dégranulation de médiateurs de l'inflammation et du métabolisme oxydatif conduisant à la production des radicaux oxygénés libres, nécessaires à la bactéricidie (Pevery *et al*, 1988; Moser *et al*, 1991; Sherry and Cerami, 1991). Le récepteur spécifique pour l'IL-8 est de forte affinité ( $K_d = 80 \text{ nM}$ ) (Samanta *et al*, 1989). La protéine PF4 (Platelet Factor 4) et le MIP-1 sont également capables d'attirer et d'activer les neutrophiles (Deuel *et al*, 1981; Wolpe *et al*, 1988).

### **Les molécules impliquées dans la migration et l'adhérence du neutrophile.**

La migration des neutrophiles à travers l'endothélium vers le tissu lésé (diapédèse) est un processus actif nécessitant à la fois l'augmentation de l'expression des molécules adhésives telles les intégrines du complexe CD11-CD18, les L-sélectines dont la L-sélectine LEC-CAM (Leukocyte Endothelial Cell-Cell Adhesion Molecule) ou LAM-1 (Leucocyte Adhesion Molecule-1) du neutrophile. L'interaction a lieu par des molécules adhésives de l'endothélium, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) et ICAM-2, E et P-sélectines. Les polynucléaires neutrophiles non activés adhèrent aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de l'intégrine LFA-1 (CD11a-CD18) alors que quand ils sont activés, l'adhésion se fait par l'intermédiaire de l'intégrine Mac-1 (CD11b-CD18, CR3) et des L-sélectines (Figure 6).

Au site de l'inflammation / infection, l'adhésion non spécifique des neutrophiles aux agents infectieux ou aux débris tissulaires est favorisée par la présence de récepteurs pour les fragments C3b/C4b du complément (CR1) et pour le fragment Fc des IgG. Plusieurs types de récepteurs pour le fragment Fc des IgG ont été décrits: le Fc $\gamma$ RI de forte affinité, le Fc $\gamma$ RII/CD32 et le Fc $\gamma$ RIII/CD16 d'affinité plus faible. Seuls les Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII sont présents sur le polynucléaire neutrophile au repos (Huizinga *et al.*, 1989) cependant que l'expression du Fc $\gamma$ RI est induite par l'interféron (IFN- $\gamma$ ) (Perussia *et al.*, 1983). De plus, le CD16 est exprimé en nombre plus important que le CD32 (3 à 6 fois plus). L'affinité du CD16 pour les IgG est variable suivant la sous-classe des IgG: dimères IgG1 ( $K_d = 11 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) et dimères IgG3 ( $K_d = 20 \text{ à } 60 \times 10^{-7} \text{ M}$ ). Il est à noter que la forme ancrée aux phospholipides du Fc $\gamma$ RII, présent sur les

**Molécules impliquées dans la migration et l'adhérence:**  
Intégrines (CD11-CD18): LFA-1, Mac-1  
Sélectines (LEC-CAM), LAM-1, CR1  
FcγRI, RII (CD32) et RIII (CD16)



**Récepteurs des facteurs chimiotactiques:**  
FMLP R, LTB4 R, PAF R,  
IL-8/NAP-1 R, MIP-1 R,  
NAP-2, gro/MIP-2, ENA 78

**Les molécules bactéricides:**  
Métabolites toxiques de  
l'O<sub>2</sub>, NO-  
MPO  
Lysosyme  
Lactoferrine  
CAP 57  
Défensines

Figure 6. Les récepteurs et les médiateurs impliqués dans les fonctions effectrices du neutrophile (image de microscopie à balayage représentant un neutrophile au contact d'une hématie, avec la permission du Dr. Sharon)

---

neutrophiles, ne transmet pas un signal induisant les processus de phagocytose et d'endocytose alors que quand il est de nature transmembranaire, comme dans les macrophages et les cellules de Langerhans, il est capable de déclencher l'endocytose d'immuns complexes (Fridman *et al.*, 1992).

### **Fonctions des neutrophiles**

En réponse aux différents stimuli, les neutrophiles subissent toute une série de transformations que ce soit au niveau du cytosquelette membranaire ou au niveau de leur activité métabolique.

#### **Phénomène de dégranulation des neutrophiles.**

Lors du processus de phagocytose, des médiateurs essentiellement enzymatiques présents dans les granules du neutrophile sont déchargés à l'intérieur du phagolysosome. Les constituants des granules des neutrophiles et leur rôle sont résumés dans le Tableau II.

Parmi ces constituants, certains sont les cibles des auto-anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA) (Jennette *et al.*, 1990). Ces ANCAs sont dirigés principalement contre la protéinase 3 (C-ANCA) (Goldschmeding *et al.*, 1989) ou contre la myéloperoxidase MPO (P-ANCA) (Falk and Jennette, 1988). Ces autoanticorps ont un intérêt diagnostique et pronostique au cours des différentes vascularites systémiques (Savage *et al.*, 1987), notamment des granulomatoses de Wegener (Van der Woude *et al.*, 1985) et de glomérulonéphrite nécrisante à croissants (Falk and Jennette., 1988). Par ailleurs, ces ANCAs sont capables d'activer les neutrophiles et d'induire des lésions nécrotiques par libération de médiateurs toxiques pour les neutrophiles et par activation du métabolisme oxydatif.

#### **Les activités métaboliques.**

La phagocytose est un processus exigeant beaucoup d'énergie et qui est compensée par deux types d'activités métaboliques: l'activité métabolique dépendante de l'oxygène ("respiratory burst") et l'activité indépendante de la consommation d'oxygène (Tableau III).

Tableau II. Les constituants des granulations des polynucléaires neutrophiles  
(d'après Borregaard, 1988)

	<b>Granulations I aires (azurophiles, <math>\alpha</math>)</b>	<b>Granulations II aires (spécifiques, <math>\beta</math>)</b>	<b>Granulations sécrétions</b>
<b>Sérine Protéases neutres</b>	* Protéinase 3 * Cathepsine G * Elastase		
<b>Métalloprotéinases</b>		Collagénase	Gélatinase
<b>Enzymes bactéricides</b>	* Myéloperoxydase Lysosyme	* Lactoferrine Lysozyme	
<b>Protéines bactéricides</b>	* CAP57 Défensines Azurocidine		
<b>Hydrolases acides</b>	N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase Cathepsine $\beta$ Cathepsine D $\beta$ -glucuronidase $\beta$ -glycérophosphatase $\alpha$ -mannosidase		
<b>Autres</b>		Protéine liant la vitamine D Cytochrome c Flavoprotéine Récepteur pour le FMLP CR3	Cytochrome c Flavoprotéine Récepteur pour le FMLP CR3

\* Cibles antigéniques des ANCA de spécificité de type C (répartition cytoplasmique) ou de type P (répartition périnucléaire) visualisable en immunofluorescence indirecte sur lame fixée à l'éthanol. Certains n'ont pas de spécificité donnée.



Tableau III. Les systèmes anti-microbiens des neutrophiles.

Oxygène dépendant	Oxygène indépendant
MPO dépendant MPO plus halogénure plus H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MPO indépendant Anion superoxyde O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Radical hydroxyl OH <sup>-</sup> Oxygène singulet O <sub>2</sub> Peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Lysozyme Lactoferrine Protéines cationiques Hydrolases lysosomales Protéases neutres Vacuole de phagocytose Environnement acide

### L'activité métabolique dépendante de l'oxygène

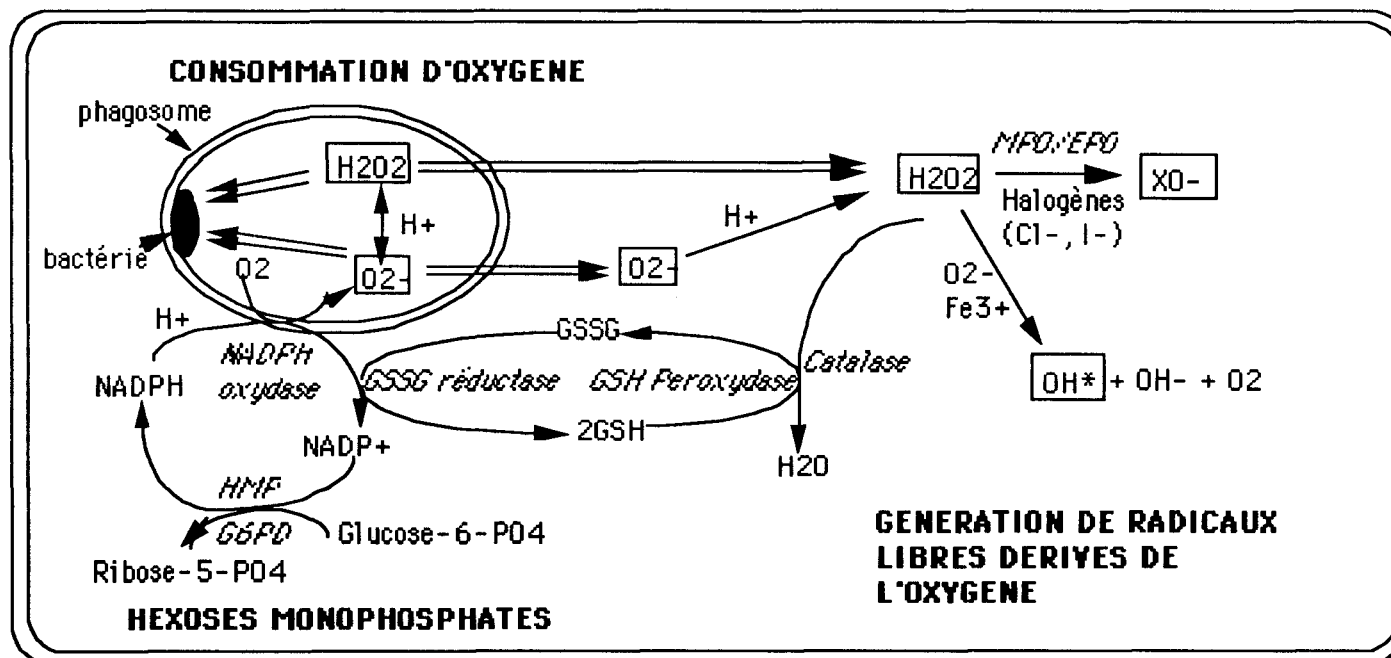
Elle regroupe toute une série de réactions oxydatives: consommation d'oxygène, catabolisme du glucose par la voie de l'hexose monophosphate et génération des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Figure 7). L'adhésion de particules à la surface des neutrophiles active la NAD(P)H oxydase qui est accessible au NADP(H) cytosolique et à l'oxygène moléculaire externe. Ce dernier se réduit en ion superoxyde  $O_2^-$ , se dismute de manière spontanée ou induite par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , puis se transforme secondairement en radicaux hydroxyde OH et en oxygène singulet  $O_2$ . L'effet toxique de ces radicaux libres dérivés de l'oxygène, et principalement l' $H_2O_2$ , s'opère soit directement soit en association avec le système des peroxydases phagocytaires telles que la myéloperoxydase (MPO) pour les granulocytes et la peroxydase spécifique des éosinophiles (EPO). Sous l'effet de ces peroxydases et des ions halogènes ( $I^-$ ,  $Cl^-$ ), une partie de l' $H_2O_2$  se transforme en ions  $ClO^-$  fortement toxiques.

Ce phénomène d'activation métabolique respiratoire intervient lors de toute stimulation des neutrophiles par des composés divers tels que le FMLP ou la fraction C5a du complément, des complexes immuns ou des anticorps.

Outre leur capacité d'inactiver les bactéries, les radicaux libres de l'oxygène peuvent également exercer leur effet toxique envers d'autres agents pathogènes: parasites, cellules tumorales ainsi qu'envers les propres cellules de l'organisme (hématies, plaquettes, cellules endothéliales, fibroblastes, voire lymphocytes).

### Le système de bactéricidie indépendant de l'oxygène

Il est plus limité en terme d'activité. Il met en jeu des médiateurs tels le lysosome, la lactoferrine et les hydrolases. Le lysosome, une des enzymes les plus abondantes des neutrophiles, est très spécifique vis à vis de bactéries à Gram<sup>+</sup> saprophytes. Par contre, la lactoferrine des granules spécifiques rend le fer non disponible aux bactéries qui en ont besoin pour leur développement. Elle est efficace contre les Staphylocoques et les Coliformes. Elle peut aussi être active dans la modulation du fonctionnement des neutrophiles, macrophages et lymphocytes. Les protéines cationiques telle la CAP57 (Pereira *et al.*, 1990) et les hydrolases ont aussi une activité anti-bactérienne.



**Figure 7.** Principales voies de synthèse et de désintoxication des métabolites de l'oxygène produits par les phagocytes. GSH- glutathion réduit, GSSG-glutathion oxydé, HMP-shunt des hexoses monophosphates, G6PD-glucose 6 P04 deshydrogénase.

---

## Rôle des neutrophiles dans les manifestations allergiques

L'afflux des neutrophiles dans les sites de la réaction allergique tardive est moins intense que celui des éosinophiles. La contribution des neutrophiles à cette pathologie peut être évoquée par le relargage de médiateurs des granules azurophiles et spécifiques (Zweiman *et al.*, 1990) et par la production de médiateurs lipidiques.

Les médiateurs lipidiques sont les produits de l'oxygénation de l'acide arachidonique et du lyso-PAF. L'acide arachidonique, via la cyclooxygénase, donne naissance aux thromboxanes et aux prostaglandines. Une autre voie métabolique de l'acide arachidonique résulte de l'action d'une lipooxygénase qui donne naissance aux HPETE et aux leucotriènes. Les neutrophiles produisent essentiellement du LTB<sub>4</sub> et semblent être également capables de synthétiser du PAF. La production des médiateurs du polynucléaire neutrophile peut être déclenchée par les facteurs chimiotactiques eux-mêmes, la protéine majeure de l'éosinophile ou MBP (Moy *et al.*, 1990) ainsi que diverses cytokines inflammatoires (MIP-1, IL-8, TNF $\alpha$ ).

---

## CHAPITRE III.

### LES MOLECULES FIXANT L'IgE

Dans les situations d'allergie ou de parasitose, l'élévation du taux d'IgE apparaît associée à une expression accrue de récepteurs pour l'IgE. Ces récepteurs ont été identifiés à la surface de nombreuses populations cellulaires, locales ou recrutées, qui sont les cibles directes et indirectes de l'activation IgE-dépendante. L'interaction de ces IgE liés aux mastocytes et basophiles avec l'allergène se révèle être le mécanisme de déclenchement du relargage par les mastocytes de médiateurs de l'hypersensibilité de type I. Une telle interaction est également observée avec les cellules inflammatoires telles que les monocytes, macrophages, plaquettes et éosinophiles sanguines.

Outre son rôle néfaste dans les phénomènes d'hypersensibilité de type I qui est dû à une dégranulation de médiateurs spasmogènes ou toxiques par les cellules effectrices (basophiles / mastocytes, cellules inflammatoires), l'IgE peut également jouer un rôle bénéfique dans les maladies parasitaires en collaboration avec diverses populations cellulaires inflammatoires et en particulier, les éosinophiles. Des arguments épidémiologiques récents ont pu conforter l'hypothèse d'une relation entre la présence d'anticorps IgE dirigés contre les vers adultes et la résistance acquise à la réinfection (Hagan *et al.*, 1991; Rihet *et al.*, 1991; Dunne *et al.*, 1992).

#### L'IgE

Comme toutes les immunoglobulines, l'IgE est une glycoprotéine composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. La chaîne  $\epsilon$  a un poids moléculaire de 72,5 kDa et se répartit en 4 domaines constants (Figure 8). Des clivages enzymatiques de l'IgE peuvent libérer les fragments  $F(ab)'_2$  (domaines  $C\epsilon 1$  et  $C\epsilon 2$ ),  $F_c$  (domaine  $C\epsilon 2$ ,  $C\epsilon 3$  et  $C\epsilon 4$ ) et  $F_c''$  ( $C\epsilon 2$ ). Deux caractéristiques essentielles des IgE sont leur thermolabilité et leur aptitude à se fixer à de nombreuses populations cellulaires par leur fragment  $F_c$  et plus précisément par les domaines  $C\epsilon 3$ .

Le contrôle de la production des IgE est à la fois d'ordre cellulaire (lymphocytes T) mais également d'ordre moléculaire (contrôle par les gènes de la réponse immunitaire Ir et par les gènes non associés au complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH). Les médiateurs responsables de l'équilibre de la réponse IgE sont essentiellement l'IL-4, activatrice de la synthèse d'IgE et à l'inverse, l'IFN- $\gamma$ , inhibiteur de cette synthèse IL-4 dépendante. Un défaut de production de l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T provoque une hyperproduction de l'IgE. Par ailleurs, certains adjuvants tels que l'hydroxyde d'alumine et le *Bordetella pertussis* induisent également une réponse anticorps de type IgE. L'IgE, par elle-même, rétrocontrôle positivement sa synthèse par sa fixation sur son récepteur spécifique Fc $\epsilon$ RII dont la forme soluble sCD23 est active sur le lymphocyte B.

L'IgE, sous sa forme libre ou complexée à l'allergène, se fixe au moins à deux types de molécules. Il s'agit d'une part des molécules définies comme étant des récepteurs avec leur domaine transmembranaire (Fc $\epsilon$ R) et d'autre part, des molécules capables de fixer à la fois l'IgE et des carbohydrates (lectines de type C et de type S). Deux types de récepteurs spécifiques pour l'IgE, désignés par Fc $\epsilon$ RI et Fc $\epsilon$ RII, diffèrent entre eux par leur affinité pour l'IgE, leur distribution cellulaire et leur structure moléculaire. Le récepteur Fc $\epsilon$ RII qui fixe l'IgE fait également partie de la famille des C-lectines.

---

## Les récepteurs pour L'IgE

### Le récepteur de type I, FcεRI.

De très forte affinité ( $K_a = 10^9 - 10^{10}$  L/mole), le récepteur pour l'IgE (FcεRI) des mastocytes (300 à 700,000 récepteurs par cellule) et des basophiles (30,000 à 100,000 récepteurs / cellule) est un tétramère constitué de l'association de trois chaînes glycoprotéiniques:  $\alpha\beta\gamma_2$  (Metzger, 1992).

Plus récemment, une définition moléculaire de ces 3 sous-unités a été établie par le clonage des ADNc correspondants. Seule la chaîne  $\alpha$  (55 kDa), formée de 2 domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , est impliquée dans l'interaction avec l'IgE (rapport 1:1) (Figure 8). Cette chaîne présente des homologies de séquence nucléotidique avec les récepteurs pour le fragment Fc des IgG. La chaîne  $\beta$  (33 kDa) comporte 4 séquences transmembranaires et possède des homologies avec la molécule CD20 (Ravetch and Kinet, 1991). La chaîne  $\gamma$  présente des similitudes avec la protéine CD3 $\zeta$  (Miller *et al.*, 1989). Ces deux chaînes sont impliquées dans la délivrance du signal activateur et peuvent s'associer à d'autres protéines, en particulier avec le Fc $\gamma$ RIII/CD16 ou le TCR (T cell receptor). De plus, le FcεRI apparaît être associé à un canal calcique Ca<sup>2+</sup> de 100 kDa activable par la fixation de l'IgE sur son récepteur (Metzger, 1992).

La reconnaissance de l'IgE par la chaîne  $\alpha$  du FcεRI implique les acides aminés 301 à 368 des domaines Cε2 et Cε3 (Helm *et al.*, 1988; Gould *et al.*, 1991) (Figure 8). Cette interaction IgE-récepteur augmente la demi-vie du récepteur à la membrane cellulaire et le protège de l'action des enzymes protéolytiques. Récemment, la construction d'une molécule d'IgE formée de domaines humains et murins a permis de démontrer que le récepteur murin fixe l'IgE par son domaine Cε3 (Nissin *et al.*, 1991).

La fixation des anticorps IgE dirigés à leur allergène spécifique, provoque l'agrégation des récepteurs FcεRI adjacents, qui déclenche une série d'évènements transductionnels initiée par une hypothétique protéine G et une protéinase K, aboutissant à la dégranulation des mastocytes / basophiles s'accompagnant du relargage des médiateurs intervenant dans les phases précoces de l'hypersensibilité de type I, tels que l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et plus tardivement des lymphokines (IL-4, IL-5 et IL-6) (Figure 1). Des facteurs chimiotactiques pour les

éosinophiles (ECF) et les neutrophiles (NCF) sont également libérés entraînant ainsi un recrutement de ces 2 types cellulaires au niveau du site inflammatoire.

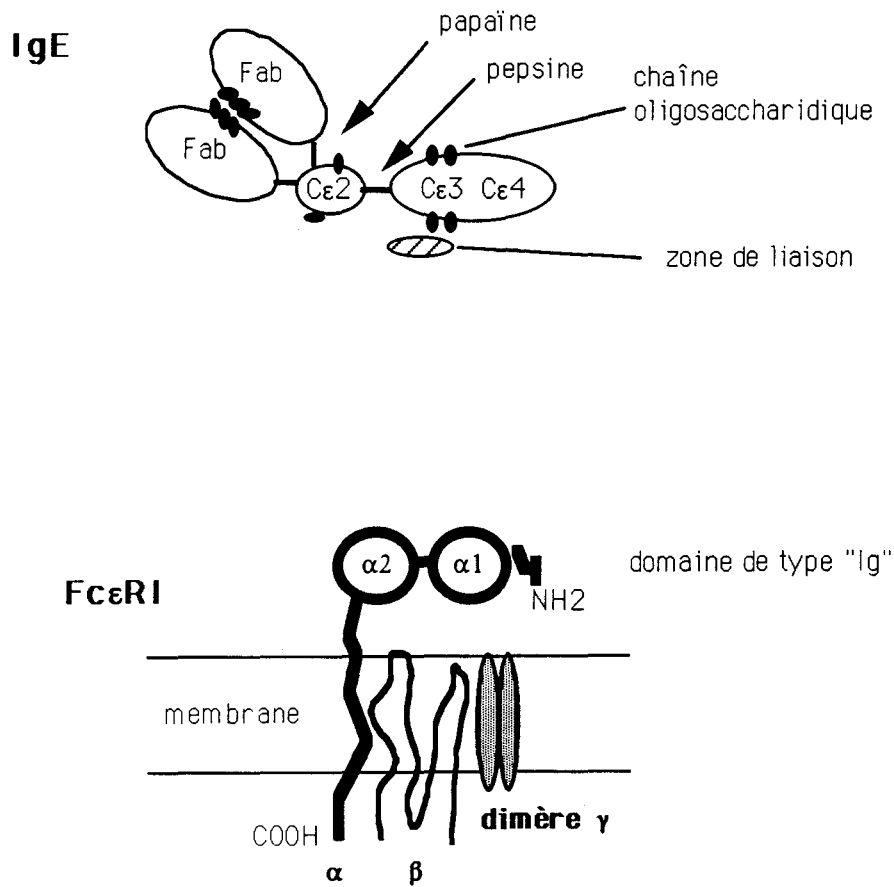


Figure 8. Interaction de l'IgE monomérique avec le récepteur de forte affinité pour l'IgE, FcεRI des basophiles et mastocytes.



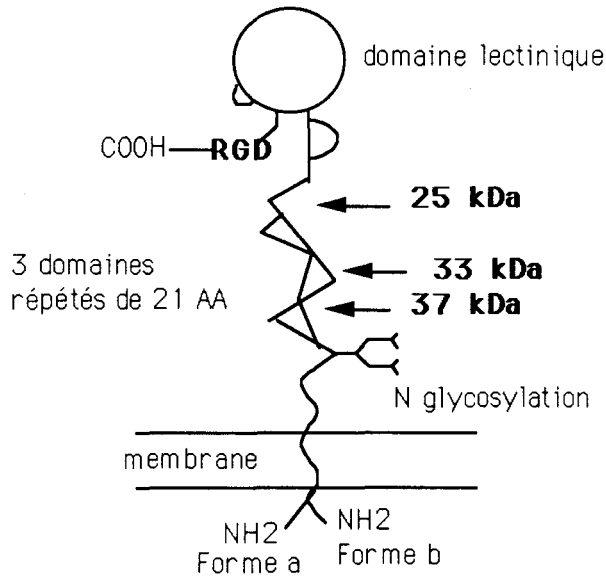
## Le récepteur de faible affinité, FcεRII/CD23.

La technique des rosettes a permis la découverte des récepteurs pour l'IgE sur des populations cellulaires autres que les basophiles et les mastocytes. Les cellules lymphoïdes (Lawrence *et al.*, 1975) expriment à leur surface des récepteurs de faible affinité pour le fragment Fc des IgE (FcεRII,  $K_a = 10^6-10^7$  l/mole). Il a été démontré que le FcεRII des cellules B est identique à l'antigène de différenciation CD23 (Yukawa *et al.*, 1987, Bonnefoy *et al.*, 1987). Depuis, FcεRII/CD23 a été décrit sur de nombreuses populations cellulaires telles que les éosinophiles (Capron *et al.*, 1981), les monocytes / macrophages (Joseph *et al.*, 1986b), les cellules T (Yodoï *et al.*, 1979a), les cellules de Langerhans (Bruynzeel-Koomen *et al.*, 1989; Bieber *et al.*, 1989), certaines lignées NK (Yodoï *et al.*, 1985) et certaines cellules épithéliales, notamment dans le thymus (Rousselet *et al.*, 1991).

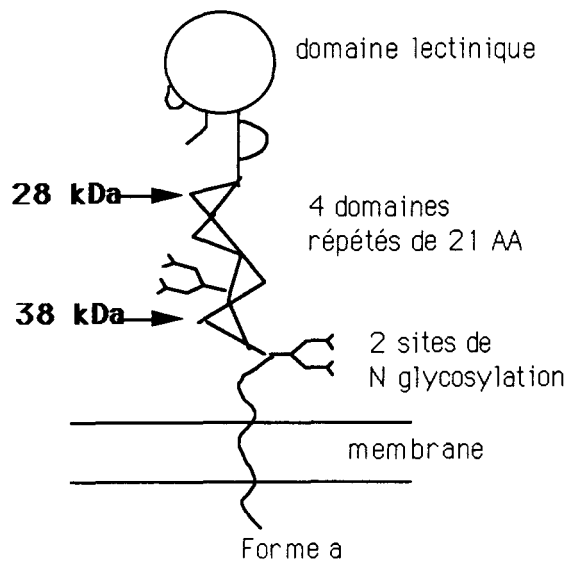
### Structure biochimique.

Le FcεRII/CD23 humain est composé d'une seule chaîne glycoprotéique de 45 kDa avec des sites de glycosylation (N- et O-glycosylation) et quelques résidus d'acide sialique (Figure 9). Des études biochimiques ont permis de révéler la présence de molécules de plus petite taille (37, 33, 25-27, 12-16 kDa) désignées sous le terme de molécules FcεRII/CD23 solubles (Nakajima *et al.*, 1986 et 1987). Une molécule de 80-90 kDa, provenant probablement de la dimérisation du FcεRII/CD23, est également retrouvée. Les fragments solubles de 37, 33 et 25 kDa libérés par clivage protéolytique conservent leur capacité à lier l'IgE (Letellier *et al.*, 1989). La région peptidique du FcεRII/CD23 fixant l'IgE se localise au niveau du domaine d'homologie avec les lectines (Bettler *et al.*, 1989a). Il est à noter que l'IgE non glycosylée se fixe sur le FcεRII en impliquant les domaines Cε2-Cε4 de l'IgE (Vercelli *et al.*, 1989).

Récemment, le FcεRII/CD23 murin a été mise en évidence. Il s'agit d'une sialoglycoprotéine de 49 kDa possédant plusieurs sites de N-glycosylation (Conrad *et al.*, 1984, 1988). La présence de molécules solubles (38, 28 et 25 kDa) a été également retrouvée mais contrairement à leurs homologues humains, ces fragments ne sont pas capables de fixer l'IgE (Keegan *et al.*, 1987).



**FcεRII  
humain**



**FcεRII  
murin**

Figure 9. Représentation schématique des récepteurs de faible affinité FcεRII pour l'IgE chez l'homme et chez la souris. Les fragments solubles sFcεRII sont produits par clivage protéolytique.

---

## Structure nucléotidique et génomique.

L'ADNc du FcεRII/CD23 humain a été cloné et exprimé par plusieurs équipes (Kikutani *et al.*, 1986a; Koïchi *et al.*, 1987; Ludin *et al.*, 1987). Sa taille est de 1,5 kb avec un cadre de lecture ouvert codant pour une protéine de 321 AA et de 37 kDa de masse théorique (Figure 10). Cette séquence prédit une protéine transmembranaire (TM) à orientation inversée avec un domaine cytoplasmique court (23 AA) du côté de l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale et un domaine extracellulaire long (277 AA) séparés par une région hydrophobe transmembranaire de 21 AA. Cette orientation classe ainsi le FcεRII/CD23 dans la catégorie des protéines membranaires de type II (Singer *et al.*, 1987), comme les récepteurs pour l'asialoglycoprotéine (ASPG-R) et la transferrine (Spiess *et al.*, 1985; McClelland *et al.*, 1984). La partie extracellulaire présente un domaine de 120 AA homologue à celui des lectines animales (C-lectines) constituant le site de liaison de l'IgE. Les 3 zones extracellulaires répétitives de 21 AA chacun peuvent former un domaine globulaire replié en double hélice permettant ainsi la dimérisation des récepteurs. Le FcεRII/CD23 humain contient un motif Asp-Gly-Arg (DGR), séquence inversée de l'adhésiotope RGD commun à la plupart des intégrines. Des comparaisons de séquences ne mettent en évidence aucune analogie avec les membres de la superfamille des immunoglobulines ni des lectines de type S.

Récemment, deux espèces de FcεRII/CD23 (FcεRIIa et FcεRIIb) ont été identifiées (Kikutani *et al.*, 1986b; Yokota *et al.*, 1988). La comparaison de ces deux séquences d'ADNc révèle une seule différence dans la région cytoplasmique (5' non codant). Les parties extracellulaires (COOH terminale) hydrophobes sont identiques alors que la portion intracellulaire (NH<sub>2</sub> terminale) diffère selon l'espèce du FcεRII/CD23 (Figure 10). Cette différence de 7 AA semble être due à une initiation de la transcription en des sites différents localisés entre les exons 2 et 3 du FcεRIIa ou à une maturation alternative du messager (Suter *et al.*, 1987). L'expression du FcεRIIa est constitutive chez les lymphocytes B normaux et les lignées cellulaires B, alors que le FcεRIIb n'est présent qu'après une induction par l'IL-4 des cellules B, des monocytes U937, des lignées T (TCL, Fuj2) et des cellules EoL3 (lignée éosinophile non différenciée). Ces résultats suggèrent que la portion intracellulaire du récepteur pour l'IgE jouerait un rôle important dans la définition des fonctions du FcεRII/CD23. Ainsi, seule la forme FcεRIIb transfectée à des macrophages, est capable d'induire la phagocytose IgE-dépendante des macrophages (Kikutani and Kishimoto, 1990).

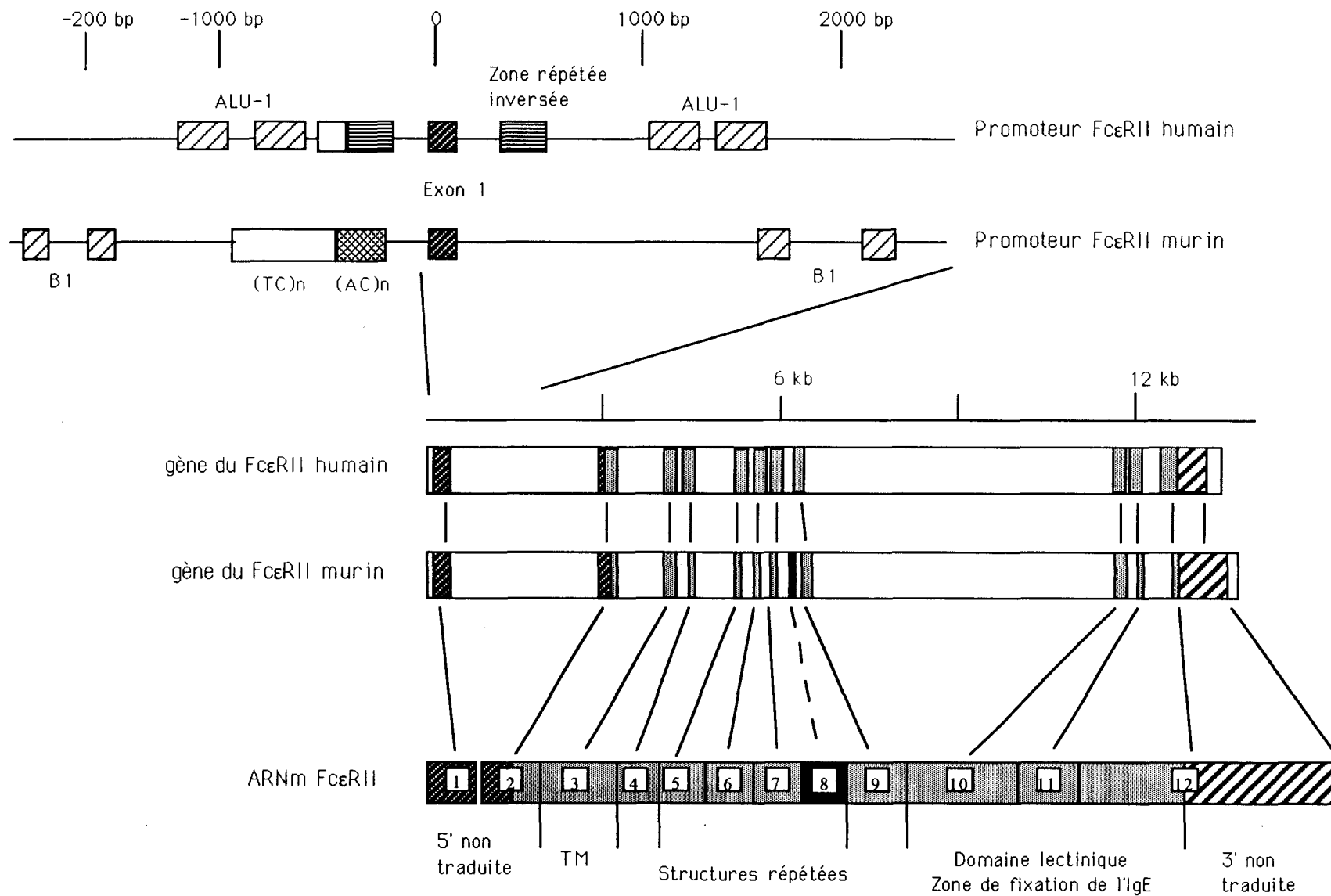


Figure 10. Cartographie des promoteurs et des gènes des FcεRII humain et murin.

---

Le FcεRII/CD23 murin a également été cloné (Bettler *et al.*, 1989b; Gollnick *et al.*, 1990). L'homologue murin est similaire au FcεRIIa humain en séquence nucléotidique, en taille, et en orientation membranaire (Figure 10). Par contre, il possède quatre domaines répétitifs de 21 AA et la séquence DGR présente dans le domaine carboxyterminal du FcεRII/CD23 humain n'est pas retrouvée dans le FcεRII/CD23 murin. La présence des FcεRII/CD23 alternatifs murins n'a pas été reportée, ce qui laisse supposer l'absence d'expression du FcεRII/CD23 par les cellules proinflammatoires.

L'organisation génomique du FcεRII/CD23 humain a été également définie (Suter *et al.*, 1987) (Figure 10). Elle s'étend sur 13 kb comprenant 11 exons et le gène du FcεRII/CD23 n'est présent qu'à une seule copie dans le génome. L'exon 2 contient le site d'initiation de la traduction du FcεRIIa. Les exons 5, 6 et 7 codent pour les 3 séquences répétitives de 21 AA. La conservation des résidus cystéines dans certaines lectines, laisse à penser que le domaine de fixation des carbohydrates du FcεRII/CD23 présente une structure secondaire similaire au récepteur pour l'ASPG (Gollnick *et al.*, 1990).

Le gène du FcεRII/CD23 murin a également été séquencé et présente de fortes similitudes avec son homologue humain (Richards *et al.*, 1991) (Figure 10). Additionnellement, les domaines lectiniques et non lectiniques sont séparés par des séquences répétées très denses incluses dans un intron de grande taille (4,1 kb). La présence de certaines structures telles que des poly-(GT)<sub>n</sub> laisse à penser que ces gènes ont des prédispositions pour des événements de reconnaissance et de transposition (Slighton *et al.*, 1980; Nishioka *et al.*, 1980). Juste après l'exon 1, les gènes FcεRII/CD23 humains et murins présentent une zone riche en GC, connue comme étant des séquences de régulation très importantes (Suter *et al.*, 1987; Richards *et al.*, 1991). De plus, des domaines "doigts de zinc" contenant des facteurs transcriptionnels sont également identifiés (Nardelli *et al.*, 1991; Rauscher *et al.*, 1990). La région proximale du promoteur est flanquée par 2 régions de 188 pb répétées et inversées: une région localisée au niveau de l'intron 1 et l'autre région à -243 de l'initiation de la translation (Suter *et al.*, 1989). Ces zones de 188 pb ne sont pas retrouvées chez l'homologue murin. Deux séquences Alu-1 (homologue du motif répétitif B1 murin) juxtaposent les zones répétées inversées. Des boîtes "X" et "Y" et des éléments de réponse pour le TPA (TRE, TPA-responding element), séquences fonctionnelles au niveau des gènes des

---

antigènes de classe II du CMH, sont également retrouvés au niveau du promoteur (Benoist and Mathis, 1990). Ainsi, ces observations peuvent expliquer la régulation du FcεRII/CD23 et des antigènes de classe II du CMH en parallèle dans les lymphocytes B, tout particulièrement sous les effets de l'IL-4 et de l'IFN-γ (Noelle *et al.*, 1984; Roehm *et al.*, 1984). Les motifs TRE (ou AP-1) sont des cibles de la transactivation par les oncoprotéines c-Fos et c-Jun (Gaub *et al.*, 1990) et par les récepteurs pour la vitamine D3 (molécule inhibant l'expression du FcεRII/CD23 des macrophages) (Schüle *et al.*, 1990).

### Régulation de l'expression du FcεRII/CD23

Plusieurs situations pathologiques, en particulier le syndrome d'hyper-IgE et les allergies, sont associées à une augmentation de l'expression du FcεRII/CD23 (Nagai *et al.*, 1985). Des observations similaires ont été reportées pour le récepteur pour l'IgE chez les patients hyperéosinophiliques (Capron *et al.*, 1981). L'augmentation du FcεRII/CD23 peut être accompagnée d'une augmentation de la libération des molécules FcεRII/CD23 solubles (Delespesse *et al.*, 1989). De récents travaux décrivent une régulation de l'expression du FcεRII/CD23 par des cytokines, en plus de celle induite par l'IgE. L'exposition des cellules FcεRII/CD23 positives à de fortes concentrations d'IgE a été associée avec une élévation du taux d'expression du FcεRII/CD23 (Yodoi *et al.*, 1979b; Chen *et al.*, 1981). L'IgE ne semble pas augmenter l'expression du FcεRII/CD23 sur les cellules B (Lee *et al.*, 1987), ni stimuler la synthèse du FcεRII/CD23 des lignées monocytaires, éosinophiliques (EoL-1 et EoL-3) ou lignées cellulaires T mais protège le récepteur occupé des effets des enzymes protéolytiques (Naray-Fejes-Toth and Guyre, 1984; Hosoda *et al.*, 1989; Kawabe *et al.*, 1988). L'IL-4 augmente l'expression du FcεRII/CD23 sur les cellules B normales, de même qu'une accumulation du messager correspondant (Defrance *et al.*, 1987; Hudak *et al.*, 1987). De plus, l'IL-4 combiné à d'autres stimulus tels que les leucotriènes B4 (Dugas *et al.*, 1990) et l'IL-5 (Pene *et al.*, 1988) costimulent la production du FcεRII/CD23. L'IL-2, en présence d'anti-IgM costimule également le FcεRII/CD23. Par contre, l'IFN (α et γ) agit de manière variable suivant le type cellulaire: il induit l'expression du FcεRII/CD23 sur les cellules de Langerhans et sur les monocytes / macrophages mais supprime l'expression et le relargage du sCD23 sur les cellules B en présence ou non d'IL-4

(Denoroy *et al.*, 1990; Galizzi *et al.*, 1988). De même que l'IFN, les PGE2 (Defrance *et al.*, 1987; Galizzi *et al.*, 1988), le TGFβ et les glucocorticoïdes (Delespesse *et al.*, 1989) sont capables de moduler de manière négative l'expression du FcεRII/CD23. Par ailleurs, l'induction du FcεRII/CD23 par l'IL-4 est plus importante en présence de costimulants comme l'anti-IgM, le LPS, et le SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I), aussi bien qu'en présence de lymphocytes T ou de leur surnageants de culture (Delespesse *et al.*, 1989; Conrad *et al.*, 1988).

### Distribution cellulaire.

Les lymphocytes B. Chez l'homme, les lymphocytes B CD5+ et CD5- expriment le CD23 (Hivroz *et al.*, 1989). En revanche, chez la souris, les cellules B Ly-1+ (équivalent murin du CD5) sont CD23-, alors que la présence du CD23 semble être un marqueur sélectif des précurseurs B sécrétrices des IgE (Kehry and Hudak, 1989a; Lebrun *et al.*, 1988). Le CD23 est exprimé par 90% des lymphocytes B μ+, δ+ et pas par les lymphocytes qui ont commuté en IgG ou IgA (Suemura *et al.*, 1986; Kikutani *et al.*, 1986b; Hudak *et al.*, 1987). Le CD23 est exprimé en faible densité par la majorité des B circulants. Par ailleurs, les cellules B transformées comme les lignées cellulaires RPMI 8866 (sécrétrices des IgG) peuvent exprimer le CD23 après le switch (Sarfati *et al.*, 1984a; Ludin *et al.*, 1987; Kikutani *et al.*, 1986b; Ikuta *et al.*, 1987). Dans certains cas, les cellules B malignes de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques coexpriment des IgA ou des IgG de surface et du CD23 bien qu'il n'y ait pas d'expression de sIgD (Hivroz *et al.*, 1989; Sarfati *et al.*, 1990). Quant aux cellules B isolées du sang de cordon, elles expriment un niveau élevé de CD23. Par ailleurs, l'analyse du cycle cellulaire indique que le CD23 est préférentiellement exprimé à l'état d'activation cellulaire précoce Go (Walker *et al.*, 1986; Gordon *et al.*, 1986; Bonnefoy *et al.*, 1987).

Les lymphocytes T. Des résultats discordants ont été signalés pour l'expression du CD23 par les lymphocytes T. Ils sont probablement dûs à (1) l'utilisation de différents anticorps à affinité variable; (2) la faible densité du CD23 sur les cellules T, (3) des différences techniques mineures telles que le temps d'incubation des cellules avec les anticorps ou la température à laquelle les cellules ont été isolées (Delespesse *et al.*, 1989). Certains laboratoires ne détectent pas de CD23

---

(Suemura and Kishimoto, 1987) alors que d'autres signalent une faible proportion de lymphocytes T humains et murins, essentiellement CD4+ ou CD8+ présentant des sites de fixation pour l'IgE (Young *et al.*, 1984; Spiegelberg *et al.*, 1985; Thompson *et al.*, 1985). Les lymphocytes T circulants ou tissulaires et les lymphocytes de patients atteints de la maladie de Kimura (Hyper-IgE non allergique) ou infectés par HIV (Human Immunodeficiency Virus) présentent le CD23 (Nagai *et al.*, 1985; Carini *et al.*, 1988a, 1988b). De même que les lymphocytes T transformés par le virus HTLV-1 (Human T Lymphocyte Virus-1) expriment spontanément le CD23 (Nutman *et al.*, 1987; Sarfati *et al.*, 1987).

Les monocytes / macrophages. Les monocytes normaux et les macrophages alvéolaires fraîchement isolés n'expriment pas de FcεRII. Par contre, la présence du FcεRII a été clairement démontrée sur les monocytes de patients présentant un syndrome Hyper-IgE (Melewicz *et al.*, 1980, 1981) et sur les macrophages de patients asthmatiques ou atteints d'alvéolite extrinsèque (Melewicz *et al.*, 1982b; Joseph, *et al.*, 1983; Pforte *et al.*, 1990). Il a ailleurs été décrit que les monocytes exprimaient uniquement le messager codant pour le FcεRIIb (Yokota *et al.*, 1988).

Les éosinophiles et neutrophiles. Les éosinophiles hypodenses provenant de patients hyperéosinophiliques présentent à leur surface des sites de fixation pour l'IgE (Capron *et al.*, 1981). Deux lignées cellulaires éosinophiliques (EoL-3 et EoL-1) sont capables d'exprimer le FcεRII/CD23 (Yokota *et al.*, 1988; Saito *et al.*, 1985). Il est à noter que le motif consensus DGR (de type fibronectine) est retrouvé au niveau de la région COOH-terminale du CD23 des lymphocytes B et également dans le récepteur pour l'IgE des éosinophiles. De plus, des communautés antigéniques entre le récepteur pour l'IgE des éosinophiles et le CD23 ont été décrites (Capron *et al.*, 1985; Grangette *et al.*, 1989).

L'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD23 des lymphocytes B ne révèle pas la présence de molécules FcεRII/CD23 sur les neutrophiles. Toutefois, une interaction entre les neutrophiles et les anticorps IgE dans un mécanisme de cytotoxicité anti-parasitaire a été décrite chez la souris (Lopez *et al.*, 1983).



Autres cellules. Les lignées cellulaires LGL/NK et YT coexpriment le FcγR, le FcαR et le FcεRII (Yodoï *et al.*, 1988). De nombreux laboratoires ont décrit des sites de fixation de l'IgE sur les cellules NK humaines (Galli *et al.*, 1982; Rosenthal *et al.*, 1984). Les cellules folliculaires dendritiques sont particulièrement riches en FcεRII (Masuda *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1986). Les FcεRII des plaquettes humains et murines interviennent dans les mécanismes de cytotoxicité vis à vis des parasites en présence d'anticorps IgE (Joseph *et al.*, 1983; 1986a; 1986c) grâce à la libération de médiateurs toxiques. Le FcεRII est également présent sur les cellules épithéliales thymiques (Rousselet *et al.*, 1991), sur les cellules de carcinome nasopharyngé infectées par EBV (Billaud *et al.*, 1989) et aussi sur les cellules stromales de la moëlle osseuse. La présence du FcεRII/CD23 a été décrite sur les cellules de Langerhans. Certains laboratoires signalent que les cellules de Langerhans de la peau provenant de sujets atteints de dermatite atopique expriment le FcεRII/CD23 en association avec le CD1 (Bruijnzeel-Koomen *et al.*, 1989) alors que d'autres mentionnent la présence des deux types de récepteur pour l'IgE: FcεRI (Bieber *et al.*, 1992) et FcεRII (Bieber *et al.*, 1989).

### **Les fonctions du FcεRII/CD23**

Le FcεRII/CD23 peut être considéré comme une molécule multifonctionnelle, avec toutefois, une distinction biologique entre la molécule membranaire et les fragments solubles sCD23.

#### **Fonctions du FcεRII/CD23 membranaire.**

Rôle de facteur de croissance. La découverte de l'identité entre le FcεRII et l'antigène de différenciation des cellules B ou CD23 a représenté la première identification du rôle potentiel du FcεRII comme un facteur de croissance pour les cellules B (Yukawa *et al.*, 1987; Bonnefoy *et al.*, 1987). Différentes études laissent à penser que le FcεRII présente une activité IL-1-like (Swendeman *et al.*, 1987) ou qu'il serait le récepteur pour le facteur de croissance de faible poids moléculaire (BCGF, B Cell Growth Factor) (Guy and Gordon, 1987). Certains auteurs démontrent que l'activité BCGF est portée par le fragment de 12 kDa (Swendeman *et al.*, 1987) et d'autres impliquent le fragment de 37 kDa du FcεRII (Gordon *et al.*, 1989). Par ailleurs, les complexes immuns (IgE-antigène spécifique) sont capables d'augmenter l'expression des

antigènes du CMH au niveau des cellules B murines au repos et ceci qu'après pontage des FcεRII/CD23. Ces résultats sont en faveur du rôle du FcεRII/CD23 comme molécule impliquée dans la présentation de l'antigène (Richards *et al.*, 1988).

Rôle dans la présentation de l'antigène. La co-augmentation du FcεRII/CD23 et des molécules de classe II du CMH, ainsi que l'association physique de ces 2 types de molécules sur les lymphocytes B, laissent à penser que les cellules B peuvent présenter des antigènes aux cellules T auxiliaires via le FcεRII/CD23 (Kehry *et al.*, 1989b; Pirron *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 1988; Bonnefoy *et al.*, 1988). La présence d'anticorps IgE à spécificité donnée améliore l'activité présentatrice de l'antigène par les cellules B. Ce rôle du FcεRII est également retrouvé au niveau d'autres cellules FcεRII/CD23+, telles les cellules folliculaires dendritiques et les cellules de Langerhans (Mudde *et al.*, 1990).

Rôle dans les défenses immunitaires. Au niveau des monocytes, macrophages, plaquettes et éosinophiles, le FcεRII est impliqué dans les processus de cytotoxicité IgE-dépendante et dans le relargage de médiateurs déjà évoqués dans les chapitres précédents (Capron *et al.*, 1983; Joseph *et al.*, 1986a; Capron *et al.*, 1987). Il est à noter que pour les éosinophiles, cette cytotoxicité requiert une association fonctionnelle avec le CR3 (Capron *et al.*, 1987). Par ailleurs, de récentes études ont démontré que les deux formes du FcεRII/CD23 (FcεRIIa et FcεRIIb) possèdent des fonctions différentes (Yokota *et al.*, 1992). Le FcεRIIa est impliqué dans les phénomènes d'endocytose alors que le FcεRIIb est impliqué dans la phagocytose. Par mutation dirigée, il a été décrit que le résidu Tyr de la région spécifique pour le type a est important pour l'endocytose cependant que les résidus Asn-Pro de la région spécifique du FcεRIIb sont importants dans la phagocytose.

Transduction et signalisation intracellulaire via le FcεRII/CD23. La transduction par le FcεRII/CD23 a été récemment étudiée (Kolb *et al.*, 1990). Cette étude suggère que le FcεRII/CD23 est connecté à la voie de signalisation liée au phosphoinositol grâce au composant GTP-dépendant. Il semblerait que le FcεRII/CD23 soit associé à une protéine tyrosine kinase.

#### **Fonctions des fragments solubles.**

Production de l'IgE. A cause de l'existence de nombreuses cytokines potentialisatrices pour la production de l'IgE, le rôle propre du FcεRII/CD23 reste encore imprécis. Toutefois plusieurs

résultats suggèrent que le FcεRII ou les fragments solubles jouent un rôle important dans la synthèse de l'IgE et ceci probablement en étroite interaction avec les cytokines IL-4 et IFN. Ainsi, les FcεRII/CD23 solubles provenant des cellules B CD23+ sont capables de stimuler la synthèse de l'IgE (Sarfati *et al.*, 1984a et 1984b). La complexation des FcεRII/CD23 solubles par des anticorps anti-FcεRII inhibe la synthèse de l'IgE induite par l'IL-4. Il s'agirait d'une inhibition du relargage des FcεRII/CD23 solubles (Pene *et al.*, 1988; Sarfati and Delespesse, 1988).

Par contre, chez la souris, le sCD23 est sans effet sur la synthèse de l'IgE (Conrad *et al.*, 1988). La fixation des complexes immuns à l'IgE sur le FcεRII/CD23 pourrait favoriser son internalisation et sa dégradation au détriment de la production des FcεRII/CD23 solubles, ce qui conduirait à une inhibition de la synthèse de l'IgE. Comme il existe des anticorps anti-IgE dans le sérum des patients présentant des allergies cutanées ou respiratoires, un tel mécanisme pourrait donc être opérationnel *in vivo*.

Rôle dans la différenciation. L'utilisation des molécules FcεRII solubles recombinantes a permis de démontrer que les sFcεRII, seuls ou associés à de l'anti-μ, permettent la fixation de l'IgE, mais ne possèdent pas d'activité BCGF (Uchibayashi *et al.*, 1989). Par contre, les sCD23 étaient capables d'induire la maturation des prothymocytes humains en synergie avec l'IL-1 (Mossalayi *et al.*, 1990a). Un tel effet prolifératif et de différenciation des sCD23 a été observé sur les précurseurs myéloïdes vers la voie des basophiles (Mossalayi *et al.*, 1990b). Toujours en association avec l'IL-1, les fragments de 25 kDa du FcεRII/CD23, produits par les cellules folliculaires dendritiques, agissent négativement sur l'apoptose des cellules B du centre germinatif (Liu *et al.*, 1989) et au contraire, ils induisent en présence d'IL-1, la différenciation des cellules B en plasmocytes (Liu *et al.*, 1991).

Rôle dans l'adhérence et la migration cellulaire. L'addition de sCD23 purifié sur des cellules monoblastiques U937 inhibe la migration spontanée des cellules. Cette inhibition de la migration est levée en présence d'anticorps anti-CD23 (Flores-Romo *et al.*, 1989). La séquence consensus RGD du FcεRII/CD23 interviendrait dans les phénomènes d'adhérence. Il est également à noter que le FcεRII/CD23 présente des homologies, au niveau du domaine lectinique, avec des récepteurs de domiciliation des lymphocytes (MEL-14, LAM-1, ELAM-1).

---

## Les lectines

Le recrutement des polynucléaires au niveau du site de l'inflammation met en jeu des facteurs chimiotactiques mais également des phénomènes d'adhérence avec l'endothélium vasculaire. La reconnaissance et l'adhésion cellulaire sont des événements essentiels dans une variété de phénomènes biologiques telles que la migration cellulaire, la formation d'organes, la phagocytose ou la destruction de cellules cibles et la formation de métastases.

Cette reconnaissance intercellulaire est médiée par 2 types de molécules: des molécules membranaires et des lectines solubles. Ces dernières sont des protéines ou glycoprotéines qui reconnaissent spécifiquement et de manière non covalente des résidus glucidiques (Sharon and Lis, 1989a). Il a été bien défini que toutes les cellules portent des carbohydrates à leur surface sous forme de glycoprotéines, glycolipides et polysaccharides. La diversité des structures glucidiques est biologiquement significative, puisque dans certains cas, les carbohydrates peuvent modifier les activités des protéines et sont considérés comme des marqueurs de différenciation cellulaire, de développement et des états pathologiques (Rademacher, 1988).

A l'origine, les lectines furent isolées à partir de végétaux, où on les trouve en quantité importante dans de nombreuses graines, mais elles ont ensuite été mises en évidence dans tous les types d'organisme, à la surface ou à l'intérieur des cellules. Typiquement, les lectines et les carbohydrates complémentaires sont localisés à la surface des cellules opposées, qui peuvent être ou non du même type cellulaire (Tableau IV). Les cellules peuvent également interagir via des ponts formés par des glycoprotéines solubles qui se fixent aux molécules lectiniques de la surface cellulaire. Alternativement, les lectines peuvent se combiner avec des carbohydrates des composants insolubles de la matrice extracellulaire qui permettent l'adhésion cellule-substrat. De plus, les lectines solubles peuvent se comporter comme des ponts en se fixant sur les carbohydrates des cellules opposées. La dépendance des carbohydrates dans les interactions intercellulaires peut être démontrée par des méthodes variées telles que l'inhibition avec les sucres ou les glycoconjugués, l'augmentation ou l'inhibition par modification chimique des carbohydrates membranaires, ou l'utilisation de cellules mutantes pour les carbohydrates de surface.

Tableau IV. Différent modèles d'interaction cellule-cellule et cellule-molécules médiée par les lectines (d'après Sharon and Lis, 1989b).

	Homotypique	Hétérotypique
Homophilique		
Hétérophilique		

cellules; sucres; lectines de surface; lectine soluble;  
 glycoprotéines solubles.

---

La spécificité et le rôle des lectines ont été mis en évidence dans de nombreux systèmes tels que dans les processus d'infection par des virus, bactéries, et protozoaires, dans les processus de différenciation, de migration cellulaire et dans les phénomènes de cytotoxicité et de formation de métastases. La spécificité de certaines lectines impliquées dans la reconnaissance cellulaire est résumée dans le Tableau V.

Dans les phénomènes de cytotoxicité, il a été démontré que les lectines spécifiques pour le galactose et l'acide sialique (N-acétyl galactosamine) sont impliquées dans le processus d'élimination des érythrocytes âgés du système circulatoire et ceci par les macrophages et les hépatocytes (Ashwell and Harford, 1982). Ainsi, ces carbohydrates apparaissent comme étant les responsables de la capacité des macrophages activés à distinguer les cellules tumorales des cellules normales et de ne tuer que spécifiquement les cellules cibles. Il s'avère que seuls les macrophages activés possèdent ces carbohydrates à leur surface alors qu'ils sont absents sur les macrophages quiescents. Des lectines membranaires à spécificité autre que le galactose ont été isolées à partir de différentes cellules animales: lectine hépatique de poulet (N-acétyl glucosamine), ou lectine des cellules Kupffer de rat (L-fucose) (Drickamer, 1988). Les lectines membranaires présentent de fortes homologues entre elles au niveau du domaine de fixation des carbohydrates (CRD). Des lectines spécifiques pour le mannose et la N-acétylglucosamine de macrophages semblent jouer un rôle dans la fixation et la phagocytose (lectinophagocytose) de microorganismes tels que les promastigotes de *Leishmania donovani* (Blackwell *et al.*, 1985) ou les trypomastigotes du parasite *Trypanosoma cruzi*.

Une autre fonction possible des lectines animales est le contrôle de la différenciation et de la formation d'organe. Différentes des lectines membranaires précédemment décrites, les lectines à spécificité pour le  $\beta$ -galactoside (12 à 16 kDa et 34 kDa) présentent entre elles des homologues de séquences considérables (Drickamer, 1988). Il a été démontré que la localisation cellulaire des lectines spécifiques pour le  $\beta$ -galactoside change au cours du développement. Tel est le cas de la lectine I de poulet qui est concentrée dans le cytoplasme au niveau des muscles, et externalisée lors de la maturation. Une fois à l'extérieur de la cellule, la lectine peut médier des interactions cellule-matrice et cellule-cellule par fixation de protéoglycanes (constituants de la surface cellulaire et la matrice extracellulaire). Par ailleurs, des lectines spécifiques pour le  $\beta$ -galactoside trouvées dans

Tableau V. Spécificité des lectines impliquées dans la reconnaissance cellulaire (d'après Sharon and Lis, 1989a).

Rôle fonctionnel	Spécificité glucidique	PM (kDa)	Origine
Lectinophagocytose	Mannose	175	Macrophages de rat, lapin et humains
Domiciliation des lymphocytes	Man-6-P	80-90	Lymphocytes péritonéaux murins
Contrôle de la maturation des thymocytes	$\beta$ -Galactosides	15	Thymus de poulet
Élimination des cellules tumorales	Gal/GalNAc	45-60	Macrophages péritonéaux murins
Compaction des filaments de myéline	Mannose	31,5	Cerveau de rat
Métastases	$\beta$ -Galactosides	34	Mélanome et autres cellules cancéreuses

---

l'épithélium du thymus sont probablement responsables du maintien des thymocytes à l'état immature dans le cortex thymique par fixation des résidus galactosides à la surface de ces cellules (Levi and Teichberg, 1983; Sharon, 1983). Au niveau du thymocyte mature, les résidus galactose sont masqués par attachement de l'acide sialique et les cellules perdent ainsi leur capacité à lier des lectines. Les thymocytes sont alors libres de migrer vers la zone médullaire thymique.

D'autres lectines spécifiques pour le  $\beta$ -galactoside (14,5 et 34 kDa) sont retrouvées à la surface des cellules tumorales incluant des mélanomes, des carcinomes et des fibrosarcomes. L'expression de ces lectines, mesurée par test d'agrégation des cellules en présence de l'asialofétuine ou par fixation d'anticorps spécifiques pour cette lectine, corrèle avec la potentialité de cellules tumorales à faire des métastases (Raz *et al.*, 1987). Ainsi, dans un but diagnostique, les profils de distribution des lectines et des carbohydrates des cellules normales seront comparés avec ceux des cellules tumorales dans l'espoir de trouver des variations lectiniques.

La première étape de la migration des cellules est une interaction adhésive entre les cellules migrantes et les cellules endothéliales. Cette interaction semble être inhibée par le L-fucose et le mannose-6-phosphate de même que par un polymère du L-fucose (fucoïdine) (Stoolman *et al.*, 1983). La lectine impliquée dans la reconnaissance lymphocytes - cellules des organes lymphoïdes, est une glycoprotéine de 90 kD (MEL 14) contenant un domaine très homologue avec les lectines membranaires telles que les lectines hépatiques (Lasky *et al.*, 1989).

En réalité, la reconnaissance requiert une multiplicité de lectines à spécificité distincte, et d'autres molécules appartenant aux familles des intégrines, des sélectines, ou des molécules apparentées aux Ig (Figure 11). La coopération de ces diverses molécules existant à la surface d'un même type cellulaire contribue à la reconnaissance cellulaire, à la force physique de l'adhérence et à la transduction de signaux intracellulaires via le cytosquelette. Ainsi, ces différentes molécules à potentialité lectinique ont été classées dans plusieurs catégories, dont deux d'entre elles (les lectines de type C et de type S) sont détaillées dans le chapitre suivant.



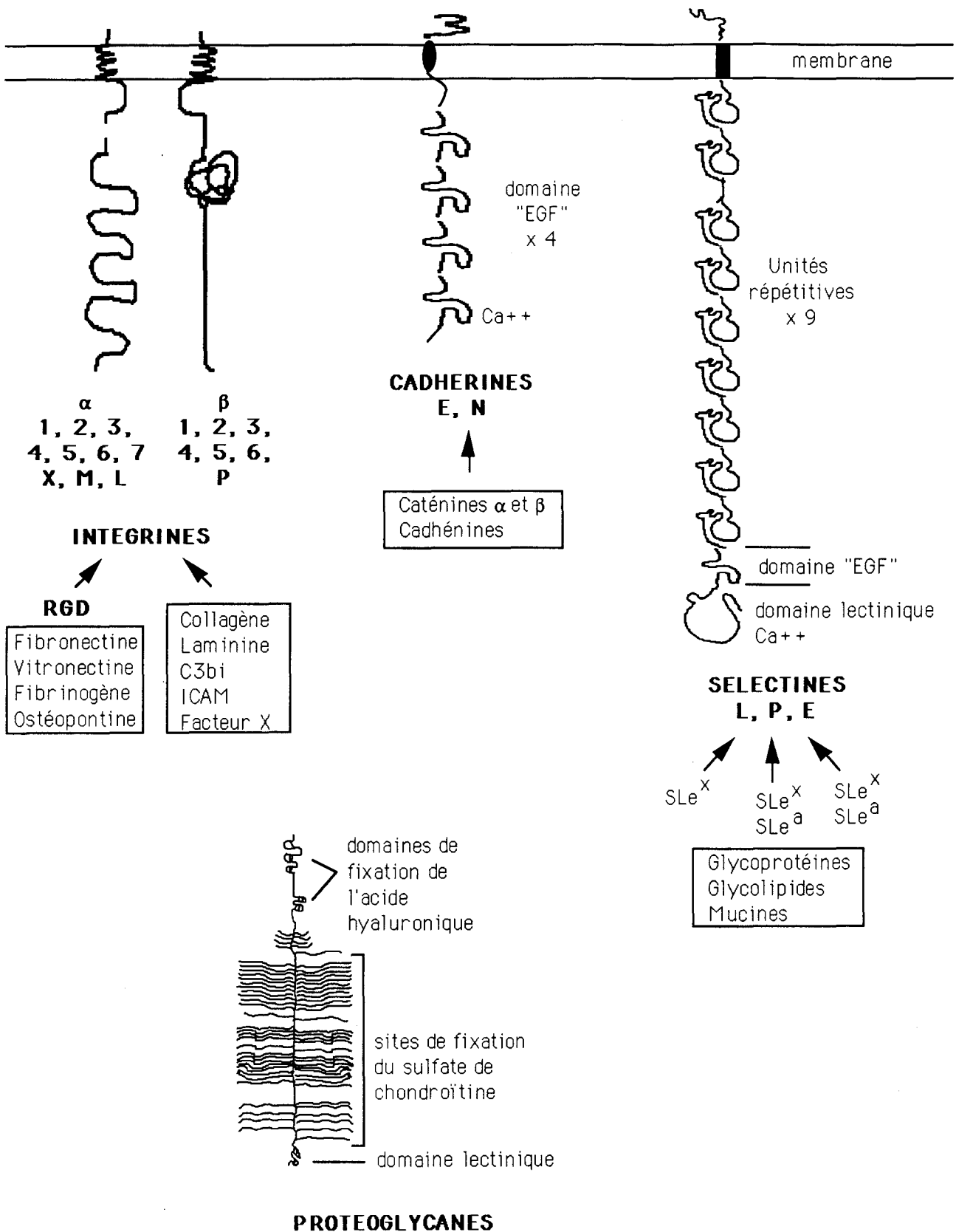


Figure 11. Représentation schématique de certaines familles de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire.

## Les C-lectines

Les lectines de type C ( $\text{Ca}^{2+}$  dépendant) sont structurellement liées au récepteur pour l'asialoglycoprotéine (ASGP-R) alors que les lectines de type S (thiol-dépendant) forment un groupe bien distinct. Le tableau VI résume les propriétés qui permettent de distinguer les 2 classes de lectines.

Les C-lectines sont des protéines qui possèdent une partie extracellulaire et sont de taille variable. Elles n'exercent leur fonction de fixation des carbohydrates qu'en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et dans un environnement à pH avoisinant 6,5. Le domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) est spécifique pour chaque famille de lectines (Figure 12). La comparaison des CRDs des C-lectines solubles ou membranaires révèle la présence de 118 résidus invariants au niveau du domaine conservé composé de 130 AA. Le CRD des C-lectines est représenté par un motif de 30 AA conservés sur 130 AA: G/C/G-TD/T/W/P/G-E-C/G-WND-C/CE. Les CRDs sont retrouvés en association avec une série de domaines fonctionnels variés: domaine transmembranaire (ASGP-R, CHL, FcεRII), domaines d'attachement des glycosaminoglycanes GAG et de fixation de l'acide hyaluronique (protéoglycane de cartilage), domaine de reconnaissance du facteur de croissance de l'épiderme EGF (protéoglycane de fibroblastes) et domaines semblables aux collagènes (mannose-binding protein ou MBP, fragment du complément C1q, apoprotéine surfactant pulmonaire). Cette famille regroupe également des molécules telles que les sélectines (L-sélectine: MEL-14/Leu8, P-sélectine: GMP-140, E-sélectines: ELAM-1), la protéine granulaire de plaquettes et des cellules endothéliales.

### **MBP, mannose binding protein ou récepteur pour le mannose.**

#### **Distribution cellulaire.**

Le MBP est sécrété par les hépatocytes et se retrouve présent dans le sérum à très forte concentration après des événements de stress (Ezekowitz *et al.*, 1988). Le récepteur pour le mannose a été purifié à partir de macrophages et de placenta humain (Taylor *et al.*, 1990). Il s'agit d'une protéine de 175 kDa qui se distingue des autres C-lectines par sa spécificité glucidique:

Tableau VI. Propriétés distinctes des lectines de type C et de type S  
(d'après Drickamer, 1988).

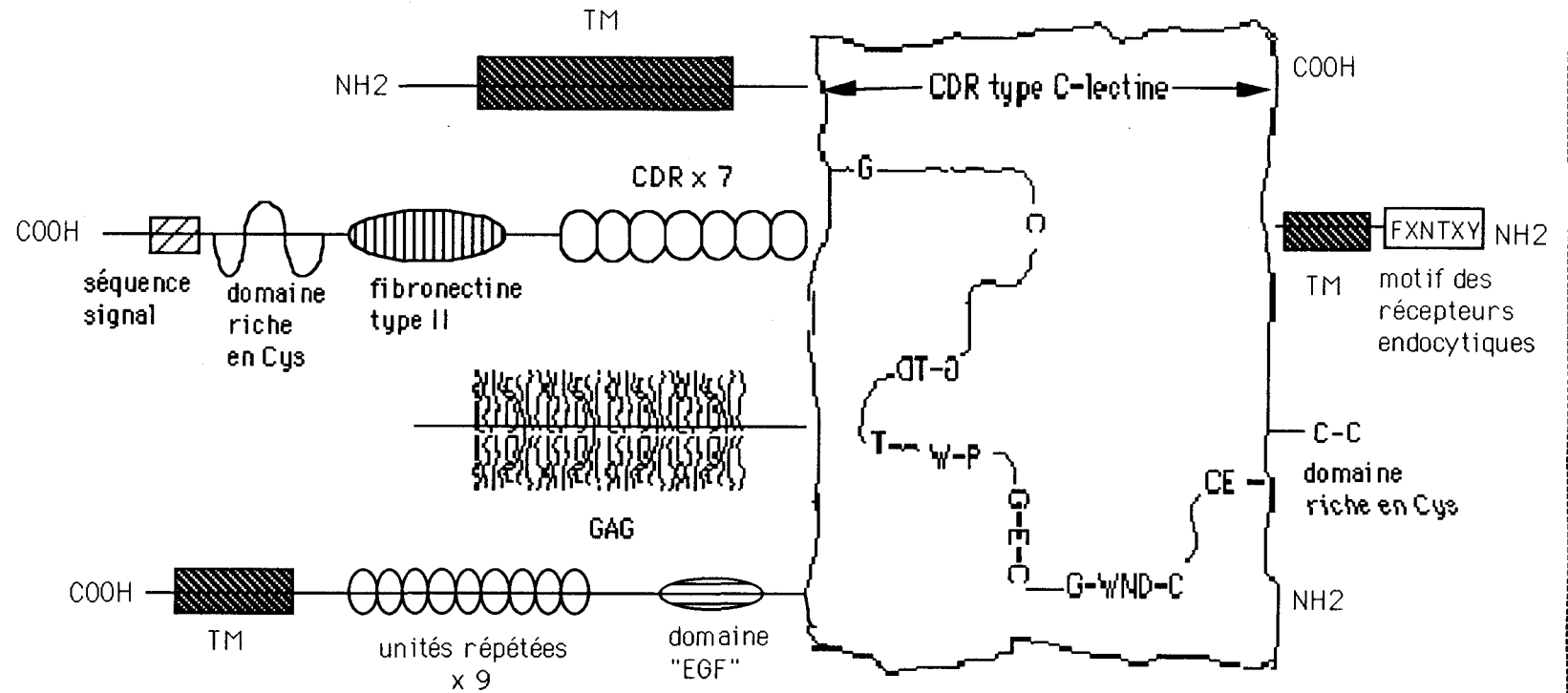
<b>Propriétés</b>	<b>C-lectines</b>	<b>S-lectines</b>
Dépendance du Ca <sup>2+</sup>	Oui	Non
Etat des cystéines	Disulfures	Libre (thiols)
Solubilité	Variable	Soluble
Localisation	Extra et membranaire	Intra et extracellulaire
Spécificité des carbohydrates	Variée	β-galactosides

**ASGP-R**  
**CHL/RHL**  
**FcεRII**

**MBP**  
**Récepteur pour**  
**le mannose**

**Protéoglycane**  
**de cartilage**

**Sélectines**  
**de type L, P, E**



**Figure 12.** Résumé des caractéristiques des C-lectines. Le domaine de fixation des carbohydrates (CDR), spécifique des C-lectines est associé à d'autres domaines fonctionnels. ASGP-R, asialoglycoprotein receptor; CHL, chicken hepatic lectin; RHL, rabbit hepatic lectin; FcεRII, récepteur pour l'IgE de type II; MBP, mannose-binding protein; GAG, Glycosaminoglycanes; EGF, epidermal growth factor; TM, domaine transmembranaire.

---

mannose (Wileman *et al.*, 1986; Lennartz *et al.*, 1987), et fucose qui sont des ligands les plus reconnus alors que la N-glucosamine et les glucoses sont d'affinité plus faible (Largent *et al.*, 1984). Le transcrit de 5,2 kb est identifié dans les macrophages alvéolaires et pas du tout dans les lignées Hela, HepG2, ni dans les monocytes ou myélomonocytes humains (HL60, U937, THP) (Ezekowitz *et al.*, 1990). Le récepteur de 170-175 kDa est exprimé par les macrophages tissulaires (Wileman *et al.*, 1986), par les fibroblastes (Taylor *et al.*, 1990) et non par les monocytes circulants (Ezekowitz *et al.*, 1983). Semblable aux autres lectines, le récepteur pour le mannose se présente sous une forme multimérique (hexamère).

#### **Structure moléculaire.**

La séquence nucléotidique du MBP des macrophages (Taylor *et al.*, 1990) prédit (1) un peptide signal typiquement hydrophobe; (2) une région NH<sub>2</sub> terminale riche en cystéine de 147 AA qui peut intervenir dans la stabilité des récepteurs multimériques à la membrane; (3) un domaine proche de la fibronectine de type II; (4) 8 domaines CRDs typiques des C-lectines avec la conservation des résidus invariants; (5) une région hydrophobe transmembranaire; et (6) une queue cytoplasmique contenant le motif FXNTXY typique des récepteurs endocytiques (Figure 15).

Du fait de l'analogie structurale entre le MBP et le récepteur pour le mannose, ainsi que de leur équivalence fonctionnelle et de leur poids moléculaire semblable, il est concluant de penser qu'il s'agit d'une seule et même molécule.

La structure cristalline du CDR du MBP de rat a été déterminée (Weis *et al.*, 1991). Celle-ci révèle une forme non usuelle consistant en 2 régions distinctes, dont une qui contient la structure secondaire non régulière stabilisée par deux ions héliums. Cette structure reflète bien la conservation des 32 résidus du CRD des C-lectines.

#### **Rôles fonctionnels.**

Rôle dans la phagocytose. Le récepteur pour le mannose peut jouer un rôle important dans les réactions de défense de l'organisme de manière indépendante des Ig et ceci vis à vis d'agents pathogènes variés tels le virus HIV et les bactéries (Ezekowitz *et al.*, 1989; Kuhlman *et al.*, 1989). Cette fonction se fonde sur les propriétés de fixation du MBP sur les oligosaccharides très riches

---

en mannose des bactéries et tue ainsi ces organismes par lyse médiée par activation du complément (Ikeda *et al.*, 1987) ou par opsonisation. Le MBP peut également agir en tant qu'inhibiteur des infections par le virus Influenza (Anders *et al.*, 1990). Le signal de phagocytose semble être contenu dans la queue cytoplasmique. Des glycoconjugués solubles peuvent aussi être pinocytés via le récepteur pour le mannose (Warr, 1980). La séquence FXNPXY retrouvée au niveau de la queue cytoplasmique semble jouer un rôle dans la localisation de certains récepteurs au niveau des "coated pits" (Chen *et al.*, 1990).

Rôle dans l'adhésion. Le domaine proche de la fibronectine de type II est important pour les interactions macrophage et matrice cellulaire et de ce fait peut promouvoir l'adhésion cellulaire.

Rôle dans l'inflammation. Le MBP des macrophages est responsable de la signalisation de la sécrétion d'un certain nombre de médiateurs de l'inflammation tels que les métabolites de l'acide arachidonique (Rouzer *et al.*, 1982), les monokines (Nathan and Gordon, 1987), les protéases neutres (Gordon and Ezekowitz, 1981) et les radicaux libres de l'oxygène (Berton and Gordon, 1983).

### **ASGP-R, asialoglycoprotein receptor**

L'ASGP-R est une glycoprotéine plasmatique qui reconnaît spécifiquement les protéines désialylées (galactosyl). Il est exprimé exclusivement par les cellules du parenchyme hépatique. Les ASGP-Rs de lapin, de rat et d'homme ont été isolés (Hudgin *et al.*, 1974; Tanabe *et al.*, 1979; Baenziger and Maynard, 1980). L'ARNm correspondant de 1,5-1,6 kb code pour une protéine de 33-34 kDa qui après glycosylation, possède un poids moléculaire de 46 kD. L'ASGP-R contient 2 sites de N-glycosylation. Il présente une orientation transmembranaire non typique des autres protéines transmembranaires classiques telles les protéines de classe I du CMH. Le domaine COOH-terminal se retrouve à l'extérieur alors que le domaine NH<sub>2</sub>-terminal à l'intérieur de la cellule (glycoprotéine de type II).

L'ASGP-R est très homologue aux lectines hépatiques de rat (RHL), ou de poulet (CHL, Drickamer, 1981) qui jouent un rôle important dans l'endocytose des glycoprotéines.

---

## **FcεRII, le récepteur de faible affinité pour l'IgE.**

Le FcεRII appartient à la famille des C-lectines. Il présente de nombreuses similitudes avec le CHL (Drickamer, 1981), de même qu'avec les ASGP-R (Spiess *et al.*, 1985). De manière semblable au récepteur pour l'asialoglycoprotéine et totalement différent du MBP, le profil d'hydrophilie du FcεRII ne révèle aucune séquence signal dans le domaine NH<sub>2</sub>-terminal ni de domaine transmembranaire proche de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminal. De plus, il présente une orientation inversée identique aux ASGP-Rs. La zone d'homologie entre ces deux molécules recouvre une séquence continue de 119 AA. Plus remarquable encore, la position des résidus cystéines est constante.

Le FcεRII et l'ASGP-R présentent des homologies au niveau de la portion NH<sub>2</sub>-terminale (CRD) avec d'autres protéines intégrales membranaires telles la neuraminidase du virus influenza (Bos *et al.*, 1984), la chaîne invariante γ des antigènes de classe II du CMH (Claesson *et al.*, 1983), le récepteur de la transferrine (Schneider *et al.*, 1984). Et plus récemment, il a été démontré que le FcεRII et l'ASGP-R présentent des homologies avec un antigène de différenciation des cellules B murins Lyb-2 (Nakayama *et al.*, 1989) et aussi avec un récepteur de domiciliation murin mLHRc identifié comme étant la sélectine MEL-14.

Le site de fixation de l'IgE sur le FcεRII est localisé au niveau du domaine lectinique (Bettler *et al.*, 1989a). Toutefois, l'activité de fixation des carbohydrates par le FcεRII n'a pas été démontrée. En fait, l'IgE non glycosylée se fixe au FcεRII (Vercelli *et al.*, 1989), ce qui suggère que la partie protéique suffit à la fixation mais la participation des carbohydrates dans l'amélioration de la fixation ne peut être exclue.

## **Les sélectines**

Les sélectines (Figure 11), ainsi nommées en raison de leur homologie structurale importante avec les lectines (plus particulièrement les C-lectines), se fixent également à des ligands de nature osidique. Trois catégories de sélectines ont été décrites selon leur origine cellulaire. La sélectine L (MEL 14, gp90MEL, LAM-1, Leu-8, LECAM-1) est exprimée, de manière constitutive, par les lymphocytes humains (Tedder *et al.*, 1989; Bowen *et al.*, 1989) et se retrouve également au niveau

---

des neutrophiles et monocytes (Lewinsohn *et al.*, 1987). La sélectine P (GMP-140, PADGEM, CD62, LECAM-3) est présente dans les plaquettes et les cellules endothéliales activées (Johnston *et al.*, 1989) tandis que la sélectine E (ELAM-1, ELAM-2) est synthétisée de novo par les cellules endothéliales activées (Bevilacqua *et al.*, 1989). Ces sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 et sont riches en sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Thr/Ser). Elles comportent une extrémité N-terminale constituée par le domaine C-lectinique (130 AA) et d'un domaine "EGF" (epidermal growth factor). Ces 2 domaines semblent intervenir dans la liaison avec le type cellulaire approprié (Walz *et al.*, 1990; Bowen *et al.*, 1990). La nature du ligand osidique des sélectines a été définie par des études d'inhibition en utilisant soit des inhibiteurs osidiques soit des anticorps monoclonaux dirigés contre des structures osidiques déterminées (Brandley *et al.*, 1990), soit des exoglycosidases qui éliminent séquentiellement les résidus osidiques. Il s'agit essentiellement du déterminant sialyl Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>) portés par des glycoprotéines ou des glycolipides (Foxall *et al.*, 1992). Les sélectines E et P reconnaissent les mêmes déterminants SLe<sup>x</sup> et SLe<sup>a</sup> (Walz *et al.*, 1990; Philipps *et al.*, 1990; Hauda *et al.*, 1991; Polley *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1991). En particulier, la sélectine E joue un rôle d'activateur de la synthèse des  $\beta$ 2 intégrines par les neutrophiles (Lo *et al.*, 1991). Il est à noter que les neutrophiles activés présentent à leur surface des glycoprotéines porteurs du déterminant SLe<sup>x</sup> qui est reconnu par les E- et P-sélectines de la cellule endothéliale.



---

## Les S-lectines

Plusieurs caractéristiques distinguent les lectines de type C des lectines de type S (Tableau VI). La caractéristique la plus importante est l'indépendance des cations divalents de l'activité fixatrice des carbohydrates des lectines de type S. Par ailleurs, cette activité est inhibée par l'oxydation des résidus thiols. La plupart des S-lectines décrites jusqu'à présent sont solubles en absence de détergents. Elles sont retrouvées associées à la membrane grâce à leur capacité à fixer les carbohydrates des composants membranaires (glycoprotéines, glycolipides, protéoglycanes). Une large proportion des S-lectines présente une spécificité de fixation pour les  $\beta$ -galactosides, mais quelques unes semblent être spécifiques de la N-acétylgalactosamine. Du fait de leur capacité à former des dimères, les S-lectines de 14-16 kDa sont multivalentes.

La localisation subcellulaire des S-lectines est difficile à établir. L'analyse des ARNm de certaines de ces S-lectines révèle que celles-ci ne possèdent ni séquence signal peptidique au niveau du domaine NH<sub>2</sub>-terminal ni séquence signal interne permettant la translocation des protéines à la surface membranaire. Ceci suggère que les S-lectines, détectées à l'extérieur de la cellule, résultent du relargage par les cellules. Toutefois, il est à noter que cette situation est également décrite pour d'autres protéines que les S-lectines telles l'IL-1 (March *et al.*, 1985). L'apparition des S-lectines semble être régulée au cours du développement ce qui suggère que leur expression est coordonnée dans le temps avec celle des structures carbohydrates spécifiques.

L'analyse combinatoire des protéines et des séquences des ADNc a récemment permis d'établir une structure primaire partielle ou complète de quelques S-lectines. Les S-lectines sont homologues entre elles en terme de séquence protéique avec une conservation de certains résidus d'AA de toutes les protéines (Figure 13). Le profil des résidus invariants est complètement différent de celui des C-lectines. Particulièrement, les résidus cystéines des C-lectines sont hautement conservés alors qu'il n'y a aucun résidu cystéine invariant dans les S-lectines. Les CRDs des S-lectines peuvent également être couplés à d'autres domaines fonctionnels.

Deux catégories de molécules peuvent être identifiées dans cette catégorie de lectines: les lectines de 29 kDa spécifiques pour le galactose (CBP 35, IgEBP, Mac-2, récepteur pour l'élastine...) et les molécules solubles de 14-16 kDa (RL-14,5...).

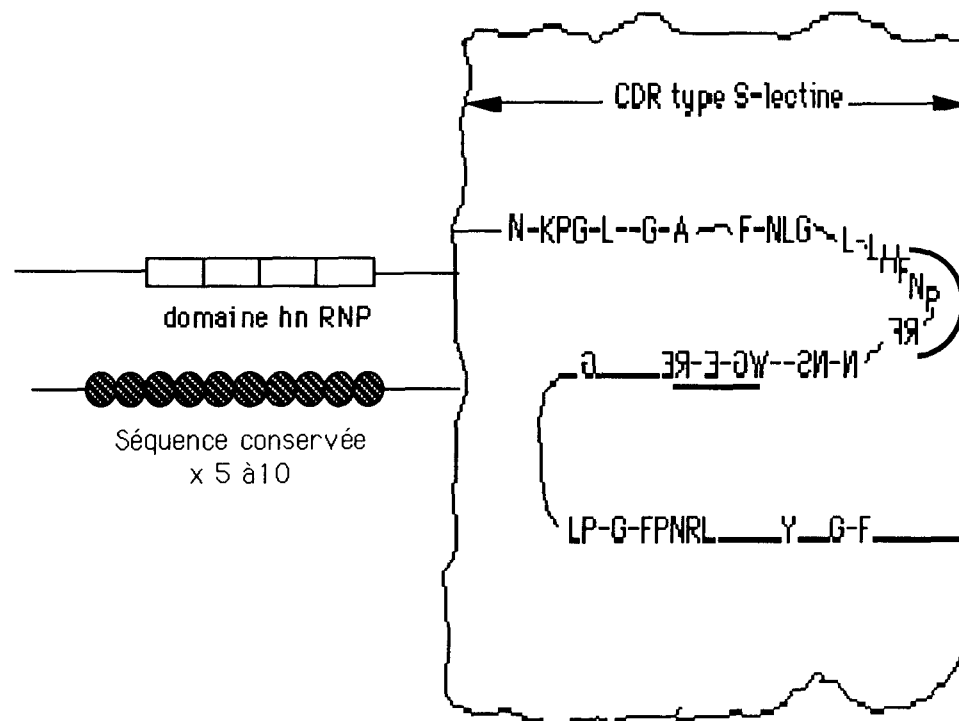
**lectines solubles de 14-16 kD****L-14****CLC**, Crystal Charcot-Leyden**lectines de 29-35 kD****CBP 35****Mac-2****IgEBP/εBP****RLL**, rat lung lectin**L-13 et L-34**, fibrosarcoma lectin**CLS**, chicken lectin skin**BHL**, bovin heart lectin**HLL**, human lung lectin**HPL**, human placenta lectin**HHC1, HHC2**, human hepatoma lectin

Figure 13. Résumé des caractéristiques des lectines de type S. Le domaine de fixation des carbohydrates (CDR), spécifique des S-lectines, est associé à d'autres domaines fonctionnels. La séquence WGXEXRE est impliqué dans la fixation du galactose. hnRNP, high nuclear ribonucleoprotein.

## Les lectines de 29 kDa

Un certain nombre de lectines de 29 kDa spécifiques pour les résidus  $\beta$ -galactosyl a été isolé dans de nombreux tissus. Elles ont été nommées en fonction de leur source cellulaire: lectine de poumon de rat (RL-29, Cerra *et al.*, 1985), d'homme (HL-29, Sparrow *et al.*, 1987), protéine fixant le carbohydrate (CBP 35, Jia and Wang, 1988); lectine murine de tumeur (L-34, Raz *et al.*, 1989); protéine de rat fixant l'IgE (IgEBP, Albrandt *et al.*, 1987) et l'antigène de macrophage de rat (Mac-2, Cherayil *et al.*, 1989). Ces molécules sont de nature cytoplasmique et peuvent être externalisées et se refixer à des résidus galactosides des glycoprotéines ou glycolipides membranaires.

### IgEBP ou $\epsilon$ BP.

L' $\epsilon$ BP est la première molécule soluble décrite comme étant capable de lier l'IgE. Elle a été découverte lors des études de fixation d'IgE sur les cellules basophiles de rat ou RBL (Liu *et al.*, 1985).

#### Structure moléculaire.

Le tracé d'hydropathie de l'ADNc de l'IgEBP (Albrandt *et al.*, 1987) révèle une structure en 2 domaines. Le domaine carboxy-terminal (122 AA) contient à la fois des régions hydrophiles et des régions hydrophobes typiques des protéines globulaires. Le domaine amino-terminal (140 AA) bien distinct, ne présente pas une structure définie. Ce domaine est composé de séquences hautement conservées de 9 AA répétées 10 fois. La séquence consensus est Tyr-Pro-Gly-Pro/Gln-Ala/Thr-Pro/Ala. L'analyse de la séquence protéique révèle que (1) le domaine NH<sub>2</sub>-terminal contient également beaucoup de proline (26%), glycine (23%) et d'alanine (16%); (2) des 33 AA chargés, 32 sont au niveau du domaine C-terminal; (3) la protéine ne contient pas de peptide signal, ni de site potentiel de N-glycosylation, ni de région transmembranaire, et (4) la protéine ne contient qu'un résidu cystéine. Le produit de traduction de 28,5 kDa fixe spécifiquement l'IgE et non l'IgG1.

### Homologies avec d'autres lectines.

Le CBP35, isolé à partir des fibroblastes murins 3T3, est une protéine de 35 kDa spécifique pour le galactose. Sa séquence nucléotidique a été clonée et séquencée (Jia and Wang, 1988). Elle présente de fortes homologies avec celle de l'IgEBP: (1) 85% des résidus d'AA sont identiques; (2) la chaîne polypeptidique est composée de 2 domaines bien distincts; et (3) les séquences répétitives hautement conservées sont présentes dans le domaine NH<sub>2</sub>-terminal. Ainsi, CBP35 et l'IgEBP semblent être des protéines homologues et les différences mineures observées sont probablement dûes à la différence d'espèce animale. Des faits immunologiques confirment l'identité de ces deux molécules: (1) des sérums anti-CBP35 ou anti-IgEBP cross-réagissent avec la même protéine; (2) CBP35, comme l'IgEBP, peut fixer l'IgE et cette fixation est réversible par du lactose; (3) l'IgEBP se fixe à une colonne d'affinité galactose (Laing *et al.*, 1989).

La comparaison de l'IgEBP et les autres membres des lectines spécifiques pour le  $\beta$  galactosyl révèle des similitudes en séquence dans le domaine C-terminal au niveau des 19 AA invariants dont 6 séquences d'AA des résidus 45 à 50 (HFNPRF) sont prédominantes. La séquence WGSEXRE (résidus 69 à 75) est impliquée dans la fixation du galactose (Paroutaud *et al.*, 1987). Il est à noter que l'IgEBP présente également des similitudes significatives avec le récepteur pour l'IgG (Fc $\gamma$ R) au niveau du domaine COOH-terminal: sur une région de 26 AA (38% identité) et une autre de 52 AA (25% d'identité) (Albrandt *et al.*, 1987). Toutefois, il n'existe aucune hypothèse basée sur la capacité du Fc $\gamma$ R à présenter une activité de fixation de carbohydrates.

### Distribution cellulaire.

L'IgEBP est exprimée dans un grand nombre de tissus incluant le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate, les reins, le foie, les poumons, le cerveau et l'estomac (Gritzmacher *et al.*, 1988) et aussi dans différentes lignées cellulaires: macrophages murin P388D1, mastocytome murin (CXBGABMCT-1) et dans les neuroblastomes murins (PC12) mais jamais dans les lignées B (J558L) et T (EL4) murins. Toutefois, leur niveau d'expression est variable suivant le tissu: plus abondant dans le thymus et le poumon. Le CBP35 est également exprimé dans divers tissus à un taux d'expression variable suivant le tissu analysé. Ainsi, l'IgEBP et le CBP35 sont des lectines cytoplasmiques qui possèdent les caractéristiques d'abondance et d'ubiquité. Le CBP35 est présent également dans le noyau et dans le cytoplasme avant d'être exposé à la membrane. La

localisation du CBP35 apparait être sous la dépendance du cycle cellulaire: au niveau du noyau dans les cellules en prolifération et dans le cytoplasme dans les cellules quiescentes. Par ailleurs, l'analogie de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du CBP35 et des protéines du hnRNP (high nuclear ribonucleoprotein) suggère que le CBP35 serait un composant du hnRNP.

### Fonctions.

Rôle de récepteur pour l'IgE. L'IgEBP reconnaît des carbohydrates de l'IgE. Si l'IgEBP, comme beaucoup d'autres lectines, est bivalente ou multivalente en terme de fixation de carbohydrates, elle peut s'associer à la fois avec le récepteur pour l'IgE (FcεR) de surface et avec l'IgE en collaborant ainsi à la fixation des 2 molécules. Cette hypothèse est en accord avec la présence de galactose ou de galactosamine au niveau de la chaîne α du FcεRII (Pecoud *et al.*, 1981). De ce fait, il est probable que la fixation de l'IgEBP sur l'IgE peut impliquer à la fois des interactions protéine-protéine et des interactions protéine-carbohydate, augmentant ainsi la spécificité de l'IgEBP pour l'IgE. Une telle dualité d'interaction a été également démontrée pour le récepteur de l'élastine qui est aussi une protéine liant le galactose (Hinek *et al.*, 1988). Bien que l'IgG contienne des asialogalactosides, l'IgEBP fixe l'IgE et non l'IgG (Liu *et al.*, 1985; Albrandt *et al.*, 1987). Il est probable que l'IgE est préférentiellement reconnue par les lectines en raison de son degré de glycosylation plus important.

Rôle de cytokine. L'IgEBP est sécrétée par de nombreuses cellules dans des conditions particulières. Elle est capable de reconnaître les récepteurs glycosylés ayant fixé ou non l'IgE et induit ainsi un relargage de médiateurs par les cellules. Dans le cas des basophiles / mastocytes, l'IgEBP peut être considérée comme une protéine capable d'induire le relargage de l'histamine telle l'HRF (Schulman *et al.*, 1988; White *et al.*, 1988; Warner *et al.*, 1986). Il est également à noter quelques similitudes entre HRF et l'IgEBP: (1) HRF est présent dans des cellules variées; (2) la masse moléculaire de quelques HRFs est semblable à IgEBP; et (3) tout particulièrement, l'HRF agit sur les cellules présensibilisées par l'IgE dont l'activité diffère suivant la provenance de l'IgE (Liu *et al.*, 1986; MacDonald *et al.*, 1987), reflétant ainsi une variation dans la glycosylation des IgE. Par ailleurs, il a été démontré que les éosinophiles en présence d'IgE et de HRF relarguent des protéines cationiques telles l'EPO mais pas d'ECP (Capron *et al.*, 1989a). Ainsi, il est

---

probable que l'IgEBP interviendrait également dans les processus de relargage des médiateurs de l'éosinophile.

Rôle dans la reconnaissance intracellulaire. L'IgEBP, étant une protéine intracellulaire, peut reconnaître l'IgE internalisée par endocytose après fixation sur son récepteur. Une telle signalisation peut être soit directe, comme une translocation du complexe IgEBP-IgE au noyau, soit indirecte via les autres voies classiques de signalisation intracellulaire. Par ailleurs, le fait que l'IgEBP/CBP35 paraisse appartenir aux hnRNP, il peut jouer le rôle de régulateur de la prolifération cellulaire qui n'est requis que par certains types cellulaires (Laing and Wang, 1988).

## Mac-2

Identifié comme une protéine de surface des macrophages péritonéaux portant des thioglycolates, Mac-2 est une protéine de 32 kDa (Ho and Springer, 1982).

### Distribution cellulaire.

Mac-2 est exprimé de manière variable suivant la population cellulaire, de macrophages, les cellules dendritiques interdigitées des organes lymphoïdes, et dans quelques cellules épithéliales incluant les lignées Hela, SCC, HT-29 et CaCO2 (Leenen *et al.*, 1986; Flotte *et al.*, 1983, Cherayil *et al.*, 1990). Fortement exprimé par les macrophages induits par le thioglycollate ( $1,7 \times 10^5$  sites/cellules), les promyélocytes HL60 et plus modérément par les lignées macrophagiques (Nibbering *et al.*, 1987) et la lignée monocytaire THP-1, il est également présent au niveau des fibroblastes 3T3 et SL68 (Cherayil *et al.*, 1989 et 1990). Il ne semble pas être présent sur les cellules lymphoïdes (Flotte *et al.*, 1983).

### Structure moléculaire.

L'ADNc de Mac-2 a été cloné et séquencé (Cherayil *et al.*, 1989 et 1990). La séquence d'AA se répartit en 2 domaines de manière semblable à l'IgEBP: (1) NH<sub>2</sub>-terminal contient un motif répétitif riche en proline-glycine PGAYPG, et (2) COOH-terminal contenant la séquence invariante HFNPRF...WGEXR des S-lectines (Drickamer, 1988). Il n'y a pas de site de glycosylation, ni de séquence signal. Toutefois, il semblerait que Mac-2 puisse être épissé de manière

---

alternative afin de produire une protéine colinéaire avec une séquence d'initialisation (codon CTG) proche de la séquence peptide signal classique. Ceci pourrait expliquer la présence de Mac-2 en quantité significative dans le milieu extracellulaire. Le transcript de 1,2 kb code pour une protéine de 27 kD.

### **Homologie.**

La séquence nucléotidique de Mac-2 est identique à celle du CBP35 et très homologue à celle de l'IgEBP. La lectine de surface L-34 identifiée sur les cellules tumorales (Raz *et al.*, 1989) présente également de fortes homologies avec Mac-2. La structure de Mac-2 ressemble également à celle de la MBP: (1) tous deux sont de taille d'environ 30 kDa avec (2) un domaine COOH-terminal lectinique et un domaine NH2-terminal contenant une structure proline-glycine riche.

### **Fonctions.**

Rôle de récepteur pour l'IgE. Mac-2 se fixe aux déterminants contenant des résidus galactose, de même qu'à l'IgE. Cette fixation sur l'IgE semble être spécifique puisqu'elle n'est pas abolie par traitement de l'IgE par la N-glycanase, et qu'elle ne se produit pas avec les IgG ni les IgM (Cherayil *et al.*, 1989). Par ailleurs, le fait que cette interaction est inhibée par le galactose ou le lactose, il est concluant de penser que la fixation de Mac-2 sur l'IgE fait intervenir des carbohydrates fixés à des sites de O-glycosylation.

Rôle dans la phagocytose. Le récepteur pour le mannose-fucose est impliqué dans la fixation et la phagocytose de *Leishmania* (Blackwell *et al.*, 1985) et probablement de mycobactéries. Un des composants pathogènes majeurs de la *Leishmania major* est un lipophosphoglycane riche en galactose qui semble être impliqué dans la fixation du parasite aux macrophages (Handman and Goding, 1985; McConville *et al.*, 1987). Puisque cette fixation est inhibée par le galactose, Mac-2 semble être un bon candidat en tant que récepteur pour ce glycoconjugué parasitaire.

Rôle dans les interactions cellules-membrane basale. Il a été décrit que Mac-2 est une non-intégrine fixant la laminine (Woo *et al.*, 1990). Cette description a des implications importantes sur le rôle de Mac-2 dans les réactions inflammatoires. CBP35/Mac-2/IgEBP peut former des ponts entre les oligosaccharides de la surface cellulaire et les oligosaccharides des protéines de la

membrane basale (laminine) et jouer ainsi sur le mouvement directionnel (chimiotactisme) des cellules vers la membrane basale. Ainsi, le CBP35/Mac-2/IgEBP jouerait un rôle dans l'agglutination et dans l'adhésion cellulaire à l'état d'homo- et d'hétérodimère formé par l'intermédiaire de la cystéine 186 (Woo *et al.*, 1991). De ce fait, la définition des S-lectines comme étant des molécules thiol-dépendantes n'est plus appropriée pour classer les lectines animales. Toutefois, l'EBP ne semble pas former des dimères quand il est exprimé par *E. coli*. Par ailleurs, les propriétés de fixation de la laminine par Mac-2 peuvent expliquer le rôle joué par cette molécule dans la formation de métastases en corrélation avec le taux d'expression de L-34. Mac-2 est également retrouvé dans les cellules de mélanome et de fibrosarcome (Raz *et al.*, 1986; Meromsky *et al.*, 1986).

Les séquences nucléotidiques de CBP35, L-34, IgEBP et Mac-2 ainsi que la séquence peptidique de RL 29 et les propriétés de RL 29 et HL 29 suggèrent qu'il s'agit dans tous les cas de la même protéine.

### Les lectines 14-16 kDa

Les autres membres de la famille des S-lectines sont regroupés sous le terme de molécules de 14-16 kDa.

#### Structure moléculaire.

Un certain nombre d'ADNc provenant de différentes espèces, codant pour la lectine de 13-14 kDa a été séquencée (Gitt and Barondes, 1986; Raz *et al.*, 1988; Abbott and Feizi, 1989; Couraud *et al.*, 1989; Hirabayashi *et al.*, 1987, 1988, 1989; Wilson *et al.*, 1989; Cooper and Barondes, 1990). Les séquences d'AA déduites montrent un degré d'homologie importante entre les espèces (46%: poulet, bovin, souris, rat, homme...) et entre les espèces mammifères (78%). La molécule la mieux étudiée est L-14, une lectine dimérique formée de 2 sous-unités de 14 kDa. La séquence protéique de L-14 révèle une forte homologie avec la lectine de poulet de 14 kDa de même qu'avec le CBP35 au niveau des résidus HFNPRF et plusieurs points de séquences entre les résidus IVCNS/K/WG-E-R/FPF--G constituant probablement le site de fixation des  $\beta$ -galactosides. Dans toutes les lectines de 14 kDa, la cystéine en position 2 est conservée ce qui suggère qu'elle est



cruciale pour la maintenance de la conformation active de la protéine. Le messenger correspondant de 570 pb est détecté dans les poumons de souris nouveau-nés, dans les fibroblastes et dans les tissus tumoraux. Comme pour la lectine de poulet et la lectine de poumon de rat, il n'y a pas d'évidence d'une séquence peptide signal sécrétrice.

#### **Distribution cellulaire et régulation.**

L'expression de L-14 est remarquablement accrue durant la différenciation épidermique, de même qu'à des stades de différenciation spécifique des cellules musculaires murines, suggérant ainsi un rôle dans la maturation musculaire (Cooper and Barondes, 1990). La régulation de la lectine de poulet (Oda *et al.*, 1989) et L-14 (Clerch *et al.*, 1987) par les glucocorticoïdes a été apportée de même que des relations entre L-14 et la néoplasie et les métastases (Raz *et al.*, 1987). La séquence génique de L-14 (Gitt *et al.*, 1986) révèle la présence en amont du gène de multiples éléments de contrôle incluant ceux qui répondent aux glucocorticoïdes, aux chocs (Chaleur et environnement), aux métaux. On distingue aussi des séquences consensus de fixation de Sp1 (Dyanan and Tjian, 1985), un site de fixation de Ap2 (Roesler *et al.*, 1988), trois boîtes CCAAT et une séquence ressemblant aux boîtes Y des gènes d'histocompatibilité (Graves *et al.*, 1986; Dorn *et al.*, 1987; Kelly and Trowsdale, 1985). Ainsi, l'existence d'une relation entre L-14 et le système d'histocompatibilité est intéressante car les lectines sont impliquées dans le système de défense primitive par fixation à des glycoconjugués de surface des organismes invasives, facilitant ainsi la phagocytose. Il existe une remarquable similitude entre les séquences des L-14 de type cellulaire varié (coeur, fibroblastes) et de tissu humain (poumons, utérus).

**L'importance des polynucléaires dans les maladies associées à une élévation du taux d'IgE sérique et la description de nombreuses molécules réceptrices de l'IgE de nature transmembranaire (FcεRII/CD23) ou cytosoluble (lectines Mac-2/εBP) nous ont conduit à identifier les structures moléculaires capables de fixer l'IgE à la surface des éosinophiles et des neutrophiles. Le rôle fonctionnelle de ces molécules réceptrices pour l'IgE est également étudiée dans les mécanismes de cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles vis à vis de larves de parasites et dans les phénomènes d'activation du neutrophile par test de chimioluminescence.**

---

## RESULTATS / DISCUSSION

---

**RESULTATS I.****Hétérogénéité de l'expression des épitopes du CD23  
par les éosinophiles de patients HE.  
Relation avec les fonctions IgE-dépendantes.**

L'existence de sites de liaison pour l'IgE a été démontrée par différentes techniques: rosettes, fixation de l'IgE radiomarquée (Capron *et al.*, 1981) et cytofluorométrie (Capron *et al.*, 1985). Environ 30% des éosinophiles humains (essentiellement des éosinophiles hypodenses) expriment à leur surface des récepteurs pour l'IgE. Cette proportion s'accroît de manière significative (> 50%) chez les patients hyperéosinophiliques (HE) et chez les rats infectés par *Schistosoma mansoni*. Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs pour l'IgE présents sur les éosinophiles de patients HE peuvent être occupés par de l'IgE cytophile présente dans le sérum. Ce taux de récepteurs occupés (55 à 74%) est en étroite relation avec le taux d'IgE sérique élevé (Capron *et al.*, 1985; Prin *et al.*, 1986).

Des études entreprises grâce à la technique de chromatographie d'affinité avec l'IgE ou le BB10, en conditions réductrices, révèlent la présence de 3 polypeptides de taille respective 45-50, 23 et 15 kDa (Jouault *et al.*, 1988). Ces poids moléculaires sont très proches de ceux décrits pour le CD23 des lignées B. Ces résultats ont été confirmés par immunoprécipitation avec BB10 ou IgE, dans des conditions réductrices (Grangette *et al.*, 1989). Ainsi, ce composant de 45-50 kDa pourrait correspondre à la molécule réceptrice membranaire FcεRII/CD23 alors que les composants de 20-25 kDa et de 15 kDa correspondraient probablement à des produits de clivage (sCD23), comme dans le cas des cellules B. De plus, l'analyse des surnageants de culture d'éosinophiles de patients HE révèle la présence de 2 molécules de taille 14 et 18 kDa, reconnues par BB10 et encore capables de fixer l'IgE. En outre, la molécule de 45 kDa des éosinophiles, est détectée à la fois par un anticorps monoclonal anti-FcεRII/CD23 du lymphocyte B (Ac 135) et par l'anticorps BB10. Ces résultats laissent à suggérer qu'il existe des communautés antigéniques entre le récepteur pour l'IgE des lymphocytes et celui des éosinophiles (Grangette *et al.*, 1989). Toutefois, l'absence d'inhibition croisée entre BB10 et l'anticorps 135 indique que ces 2 anticorps reconnaissent des

épitopes distincts du CD23. L'ensemble des résultats suppose que le FcεRII/CD23 des éosinophiles serait comparable à celui des lymphocytes B.

Malgré tout, la relation entre le récepteur pour l'IgE des éosinophiles et le CD23 des lymphocytes B reste à définir de manière plus précise.

Ainsi, la première partie du travail a consisté à poursuivre les investigations sur la variabilité d'expression du FcεRII/CD23 parallèlement à la fixation de l'IgE et du BB10, sur les éosinophiles provenant d'un plus grand nombre de patients HE. Cette étude s'est effectuée suivant deux voies: (1) une étude en cytofluorométrie avec différents anticorps monoclonaux anti-CD23 (Ac 135 et Ac 8-30, dirigés contre le site de fixation de l'IgE; Ac 3-5, dirigé contre la partie COOH-terminale du CD23); et (2) une étude en Northern blot grâce à la sonde CD23.

La deuxième partie du travail a consisté à démontrer le rôle des épitopes du FcεRII/CD23 présents sur les éosinophiles dans les phénomènes de cytotoxicité vis à vis de cibles parasitaires (ADCC), tout en sachant que les éosinophiles de patients HE sont très cytotoxiques en présence d'anticorps IgE. Les éosinophiles hypodenses (exprimant en plus grand nombre le FcεRII) sont plus cytotoxiques que les éosinophiles normodenses en présence d'IgE (Capron *et al.*, 1984a). Des résultats antérieurs ont déjà révélé que le BB10 et l'Ac 135 inhibent partiellement la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles (Grangette *et al.*, 1989).

Monique Capron,  
Marie-José Truong,  
Delphine Aldebert,  
Valérie Gruart,  
Masaki Suemura<sup>●</sup>,  
Guy Delespesse<sup>▲</sup>,  
Béatrice Tourvieille and  
André Capron

Centre d'Immunologie et de  
Biologie Parasitaire, Unité Mixte  
INSERM U 167-CNRS 624, Institut  
Pasteur de Lille, Department of  
Internal Medicine<sup>●</sup>, Osaka  
University Hospital, Osaka and  
Centre de Recherches en Allergie<sup>▲</sup>,  
Hôpital Notre Dame, Montreal

## Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions

The receptor for IgE (FcεRII) on human eosinophils presents some common characteristics with CD23, a differentiation marker of B cells. We have used flow cytometry for evaluating the expression of various epitopes of CD23 on purified eosinophils from patients with eosinophilia. A correlation was found between the binding of myeloma IgE protein and the binding of a monoclonal antibody (mAb 135), directed against the IgE-binding site of B cell CD23. Using two additional anti-CD23 mAb, directed (8-30) or not (3-5) against the IgE-binding site, a low expression of these CD23 epitopes was observed on eosinophils from different eosinophilic patients. Northern blot analysis of eosinophil RNA with the cDNA probe of CD23 revealed a low-abundance transcript in three of the six patients expressing membrane CD23. The inhibition by all anti-CD23 mAb of IgE-mediated cytotoxicity and IgE binding to eosinophils clearly indicated the participation of a CD23-related molecule in IgE-dependent eosinophil functions.

### 1 Introduction

The low-affinity receptor for IgE (FcεRII), expressed on eosinophils, monocytes, MΦ and platelets, is involved in IgE antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and IgE-dependent release of mediators [1]. On B lymphocytes, FcεRII, which is identical to the CD23 differentiation antigen, was recently implicated in IgE-dependent antigen presentation [2]. The membrane form of FcεRII/CD23 on B cells can be cleaved by a receptor-associated proteolytic activity in soluble fragments (IgE-binding factors or soluble CD23), which display pleiotropic activities [3–6].

FcεRII/CD23 on B lymphocytes is a glycoprotein with an apparent molecular mass of 45 kDa. The cDNA coding for FcεRII/CD23 in human B lymphoblastoid cells (RPMI 8866) has been cloned and its sequence analysis revealed an unusual orientation with an extracellular carboxy terminus, and a significant homology with the animal lectin family [7–9]. More recently, two isoforms of FcεRII have been identified, FcεRIIa constitutively expressed on B cells and FcεRIIb expressed on B cells and some cell lines (monocytic, eosinophilic) only after induction with IL 4 [10]. Their cytoplasmic tails differ by some N-terminal amino acids, a result of a differential splicing event. These results suggest potential differences in the function of FcεRII/CD23 expressed on various cell types.

The FcεRII present on human eosinophils was first characterized by binding assays such as IgE rosette formation, binding of radiolabeled IgE and FCM. Although the affinity of the receptor for monomeric IgE is low ( $10^7/M$ ), the detection of IgE bound to eosinophils from patients with allergy or parasitic infection indicated that the affinity

was high enough to allow binding of IgE complexes *in vivo* [11, 12]. On the other hand, eosinophil FcεRII was involved in IgE-dependent cytotoxicity to helminth parasites [13] and IgE-dependent release of granule proteins or newly formed mediators [11–14].

As in B cell, eosinophil FcεRII is mainly expressed on activated cells, characterized by their low density and present in the blood of patients with elevated eosinophilia or in the tissues [11, 13], which indicates the potential existence of regulatory factors. Among others, IgE itself, ECF-A and PAF acether, IL 5, granulocyte-macrophage CSF and TNF-α, have been shown to up-regulate FcεRII expression as well as affect IgE-dependent biological properties [11, 15–17].

The production of an mAb (BB10) raised against FcεRII<sup>+</sup> hypodense eosinophils, and able to inhibit IgE binding to eosinophils and platelets as well as their IgE-mediated parasite-killing properties has contributed to a better knowledge of the structure of eosinophil IgE receptor [18]. Three polypeptides of 45–50, 23 and 15 kDa were detected by immunosorbent chromatography or by immunoprecipitation either with BB10 or with IgE [19, 20]. Moreover, it was shown thereafter that BB10 (anti-eosinophil FcεRII) [18] and 135 (anti-B cell CD23) [20] bound to the major 45–50-kDa component on purified hypodense eosinophils and on a B cell line (WIL 2 WT). A two-step procedure revealed that the 45–50-kDa molecules immunoprecipitated by BB10 are still able to bind IgE (as detected on a Western blot) on both cell populations [20]. Using the same assays, it was shown that the 135 mAb bound to molecules immunoprecipitated by BB10 and *vice versa*, on eosinophils and on B cells, strongly suggesting the existence of cross-reactive molecules between eosinophil FcεRII and B cell CD23. However, the lack of cross-inhibition between BB10 and 135 indicated their binding to distinct epitopes. The structural analogy of eosinophil IgER with CD23 together with the immunoprecipitation of the 45–50-kDa molecule from eosinophils by 135 anti-CD23 mAb strongly suggested the existence of common epitopes between eosinophil FcεRII and CD23.

[I 9415]

**Correspondence:** Monique Capron, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, B.P. 245, F-59019 Lille Cédex, France

In spite of these arguments, the relationship between eosinophil IgE and CD23 is still a matter of debate. The aim of the present study was to investigate the expression of CD23 epitopes on eosinophils from a large series of patients in parallel to the binding of IgE or BB10 mAb. For that purpose, various anti-CD23 mAb directed (135 and 8-30) or not (3-5) against the IgE-binding site of B cell CD23 were used. In addition mRNA samples from eosinophils were analyzed by Northern blot with the cDNA of CD23. Our results confirm the presence of several distinct epitopes of CD23 on eosinophils, although there was a large variability of expression between the patients, and reveal the low level of expression of mRNA encoding CD23. Functional studies clearly indicate that a CD23-related molecule participates in IgE-dependent cytotoxicity and IgE binding to eosinophils.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Patients

Twenty-one patients with hypereosinophilia (HE) of various etiologies (parasitic infections, hypereosinophilic syndrome, allergic diseases, T lymphomas) were selected for this study after informed consent.

### 2.2 Reagents

Purified human myeloma IgE (PS) was kindly donated by Dr. H. L. Spiegelberg (San Diego, CA). Normal human IgG was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Anti-CD23 mAb 135 (IgG), 3-5 (IgG) and 8-30 (IgM) were prepared as previously described [21, 22]. mAb 135 and 8-30 were directed against the IgE-binding site of CD23, whereas mAb 3-5 was unable to inhibit IgE-binding to CD23-expressing B lymphoblastoid cell lines [22]. The mAb BB10 raised against hypodense human eosinophils and capable of inhibiting IgE rosette formation and IgE-dependent cytotoxicity has been extensively described in previous reports [18-20]. Isotype controls were anti-toxoplasma IgG<sub>1</sub> mouse mAb and control SP2/0 IgM without any known antigen specificity [20]. FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of polyclonal anti-Ig antibodies were purchased from Cappel (Organon Teknika, Malvern, PA) for anti-human IgE and anti-mouse IgG, or Sigma for anti-mouse IgM. The cDNA probe of CD23 was a generous gift of Dr. H. Hofstetter (Ciba Geigy, Basel, Switzerland).

### 2.3 Eosinophil purification

Human eosinophils were isolated as previously described [13]. Briefly, cells from venous blood of HE patients were purified by centrifugation through discontinuous metrizamide (Nyegaard, Oslo, Norway) gradients. Hypodense eosinophils were collected in the low-density layers corresponding to 20%-22% metrizamide ( $\rho = 1.115$  to  $1.125$  g/ml). The degree of eosinophil purity was estimated by staining cytocentrifuged preparations with Giemsa and ranged between 67% and 100% (mean: 90.4%;  $n = 21$  experiments). The contaminating cells were mainly neutrophils (4.6%). The proportion of total lymphocytes was

consistently very low, ranging between 0% and 3%, which indicates a negligible percentage of B cells. Eosinophils were also purified from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from two patients, according to a previously described method [12].

### 2.4 Cell lines and culture conditions

The WIL2WT B lymphoblastoid cell line was kindly donated by Dr. B. Stadler (Bern, Switzerland) and Dr. H. L. Spiegelberg. Two different U-937 cell lines, with different IgE-binding capacities [19, 23], were obtained from Dr. R. Van Furth (Leiden, The Netherlands) and Dr. B. Stadler. Two NK-like cell lines (YT-Neo and YTSer, the latter transfected with the cDNA encoding CD23) were a gift from Dr. J. Yodoi (Kyoto, Japan). All cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 mM 2-ME, 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin, except the U-937 cells which were cultured in DMEM medium (Gibco, Paisley, Scotland).

### 2.5 FCM analysis

Purified eosinophils ( $10^5$  to  $10^6$ /ml) were incubated for 90 min at 4°C with the different reagents at their optimal concentrations [(myeloma IgE and BB10: 100  $\mu$ g/ml; the other mAb at 40  $\mu$ g/ml: control IgM (SP2/0) or IgG (anti-toxoplasma) at 100 or 40  $\mu$ g/ml, respectively]. After washing, the cells were stained for 30 min at 4°C by the appropriate FITC-labeled antibody [*i.e.* anti-human IgE (1/20) or anti-mouse IgM or anti-mouse IgG (diluted 1/200 and 1/400)]. After two washings, quantitative analysis of the stained cells (at least  $10^4$ ) was performed by using an Epics Profile cytofluorometer (Coultronics, Hialeah, FL). The granulocyte population was identified by analysis of two parameters: forward scatter and logarithm of the side scatter. The specific binding was obtained by using a computerized program subtracting the signals of the non-specific controls.

### 2.6 Northern blot analysis

Total RNA from eosinophils (10 to 20  $\mu$ g for  $10^8$  eosinophils) was extracted by the guanidinium isothiocyanate method [24]. For RNA blotting, 10- $\mu$ g aliquots of RNA per lane were run on 1.2% formaldehyde-agarose gels, transferred to nylon filters (Amersham Int., Amersham, GB) and hybridized for 16 h at 42°C with the cDNA probe of CD23 labeled with <sup>32</sup>P by the random primer method [25]. The nylon membranes were washed three times at room temperature in 0.05% SDS and 2  $\times$  SSC then twice at 55°C in 0.05% SDS and 1  $\times$  SSC, 30 min for each washing step. The filters were then exposed to Kodak X-ARS film (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -70°C between intensifying screens.

### 2.7 Cytotoxicity assay

*Schistosoma mansoni* schistosomula prepared according to the skin-penetration procedure were the targets of the IgE-mediated eosinophil-dependent cytotoxicity assays, as

previously described [13]. Briefly, hypodense eosinophils purified from HE subjects were added to schistosomula in the presence of IgE-rich immune sera from *S. mansoni*-infected patients (unheated, final dilution = 1/32) at an E/T ratio of 5000/1. For inhibition experiments, the indicated mAb and their respective isotype-matched controls were added to the wells of the microplates at various concentrations. Results were given as percent dead larvae (% cytotoxicity).

**2.8 Binding of radiolabeled IgE**

Purified human myeloma IgE (PS) was radioiodinated by the chloramine-T method as previously described [18]. One hundred micrograms of IgE was labeled with 0.1 mCi (3.7 kBq) of Na<sup>125</sup>I to a specific activity of 3-4 µCi/µg. For quantitation of IgE binding, purified eosinophils (2.5 × 10<sup>6</sup>/ml) were incubated with labeled IgE (10 µg/ml) in a total volume of 100 µl PBS-BSA1%. After 2 h of incubation at 4°C, cell suspensions were centrifuged at 8500 × g for 2 min through 1 ml of 25% sucrose and the radioactivity of the pellets was measured as previously reported [18].

For competition experiments, eosinophils were incubated together with radiolabeled IgE and cold reagent (human IgG or IgE) used in a 100-fold excess. mAb or isotype-matched controls were added at 1, 10 or 100 µg/ml together with labeled IgE. In each case, the bound radioactivity, measured in duplicate samples, was evaluated as % inhibition, calculated as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{\text{mean cpm with inhibitor}}{\text{mean cpm with isotype control}} \times 100$$

Since IgE binding was variable between individual patients, results were expressed as % inhibition.

**3 Results**

**3.1 Expression of FcεRII and CD23 on eosinophils**

To investigate the variability of expression of CD23 epitopes in individual patients, the binding of mAb 135, known to bind to eosinophils [21], was analyzed by FCM in 16 HE patients. A comparison with the expression of IgE receptor, evaluated by the binding of myeloma IgE protein followed by staining with FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-human IgE Ab, was performed (Fig. 1). A significant correlation was found between the binding of mAb 135 and the expression of IgER (*r* = 0.62; *p* < 0.01).

**3.2 Comparison of binding of BB10 and various anti-CD23 mAb**

Since various mAb which are directed against different epitopes of CD23 and which are not mutually cross-reactive have been produced, it was interesting to evaluate and to compare their binding to eosinophils with that of BB10. A second series of experiments was then performed and results are presented in Fig. 2. Unfortunately, for quantitative reasons, not all the mAb could be tested on all patients.

Some variations were observed in the binding of three different anti-CD23: 135 (IgG) and 8.30 (IgM), both directed against the IgE-binding site, and 3-5 (IgG) not directed against the IgE-binding site of CD23. The mean percentage of positive cells was 7.3 ± 1.7% for mAb 135, 15.2 ± 4.1% for mAb 3-5 and 16.1 ± 3% for mAb 8.30. BB10 bound to 24.4 ± 3.5% eosinophils (Fig. 2). Analysis of variance revealed no significant difference between the results obtained with the different anti-CD23 mAb; however, a significant difference was found between the binding of BB10 and the binding of anti-CD23 antibodies (*p* < 0.01).

Since mAb BB10 and 8.30 are both IgM, their binding could be evaluated in the same experimental conditions and their results could be statistically compared (Table 1). Nine patients (43%) were positive for both markers (group I), whereas four patients showed a low expression for both markers (group II). However, discordant results were also found with seven patients (33%) being very low for 8.30 and positive for BB10 (group III) whereas only one patient

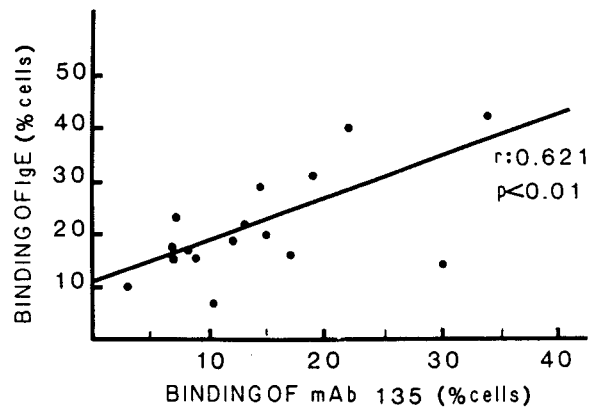


Figure 1. Comparative analysis by FCM of the binding of anti-CD23 mAb (135) and IgE to human eosinophils. The binding of the mAb (135) was revealed by staining with FITC-labeled anti-mouse IgG and the binding of myeloma IgE (PS) was detected after addition of FITC-labeled anti-human IgE antibodies.

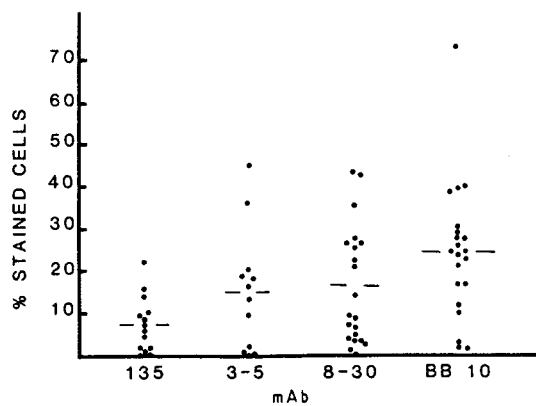


Figure 2. FCM analysis of the binding of three different anti-CD23 mAb and BB10. The binding of mAb 135 and 3-5 was revealed by staining with FITC-labeled anti-mouse IgG, whereas the binding of mAb 8.30 and BB10 was detected by staining with FITC-labeled anti-mouse IgM. The results obtained with the different anti-CD23 mAb were not statistically significant.

**Table 1.** Comparative binding of BB10 and anti-CD23 IgM (8.30) mAb to eosinophils

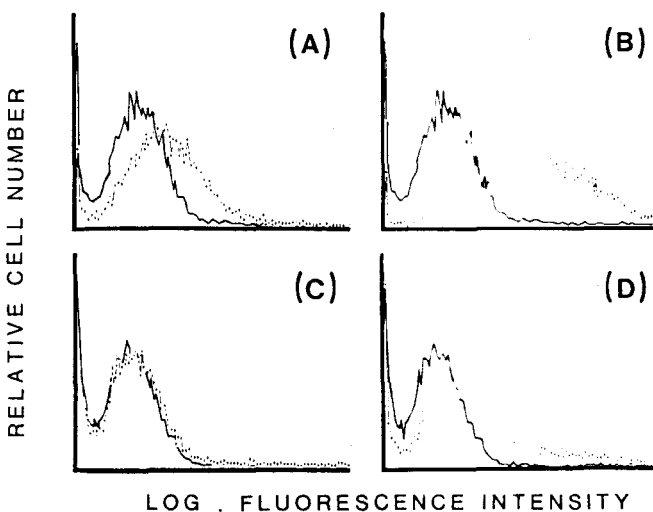
	Number of patients	% Stained cells <sup>a)</sup>	
		8.30 <sup>b)</sup>	BB10 <sup>c)</sup>
Group I	9	27.0 ± 2.7	30.9 ± 5.7
Group II	4	2.7 ± 1.6	6.4 ± 2.6
Group III	7	5.9 ± 0.9	29.3 ± 3.1
Group IV	1	43.6	3.2

a) Mean % ± SEM.  
 b) Used at 40 µg/ml.  
 c) Used at 100 µg/ml.

showed inverse results (group IV). Fluorescence histograms illustrating the binding of mAb 8.30 and BB10 for representative patients of group I and group III are presented in Fig. 3. The percentage of stained cells as well as the measurement of the density of expression of each marker were not correlated in the different patients. These findings indicate a large variability in the expression of CD23 epitopes among the patients and the absence of correlation between the binding of BB10 and anti-CD23 mAb.

**3.3 Expression of mRNA encoding CD23 by human eosinophils**

Northern blot analysis of RNA from various cell populations by using the cDNA probe of CD23 revealed the presence of a 1.7-kb transcript on CD23-expressing cell lines (WIL2 WT and U-937-H), but not on CD23<sup>-</sup> cell types (U-937-B and YT Neo; Fig. 4a). Moreover, the YT-Ser cell line, transfected with the cDNA of CD23, expressed a 3.5-kb transcript, as already reported [26].

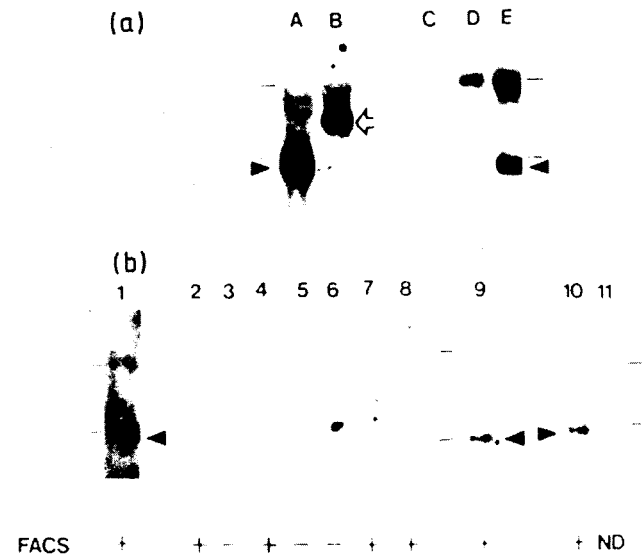


**Figure 3.** Histograms of the binding of 8.30 or BB10 IgM mAb (dotted lines). Patient of group I positive for 8-30 (A) and for BB10 (B); patient of group III negative for 8-30 (C) and positive for BB10 (D). The solid lines represent results of isotype-matched control, used at the same concentrations as the mAb.

RNA extracted from blood eosinophils from nine patients or from BAL eosinophils from two patients were analyzed under the same conditions (Fig. 4b). The presence of the 1.7-kb mRNA was found in three RNA samples: two extracted from blood eosinophils (lanes 1 and 9) and one extracted from BAL fluids (lane 10), whereas the corresponding blood sample was negative (lane 8). The patients showing the presence of the 1.7-kb transcript expressed CD23 and FcεR2 as detected by FCM. However, three patients expressing membrane CD23 (22%–35% positive cells) were negative by Northern analysis (lanes 2, 4, 7 and 8). RNA samples extracted from purified neutrophils of two donors were negative (not shown).

**3.4 Involvement of CD23 in IgE-mediated eosinophil-dependent cytotoxicity**

To study whether the various epitopes of CD23 expressed on eosinophil surface are involved in the function of FcεR2, we have analyzed the ability of the different anti-CD23 mAb to inhibit IgE-mediated cytotoxicity (Fig. 5). The various anti-CD23 mAb, BB10 and isotype-matched controls were added directly at increasing concentrations from 1 µg/ml to 100 µg/ml to the cytotoxicity assay, in the presence of antibody-coated parasite targets and purified hypodense eosinophils. A dose-dependent inhibition was observed with all the mAb tested, when compared with their respective isotype-matched controls. The IgG mAb, directed or not against the IgE-binding site, induced significantly higher inhibition at lower doses (10 µg/ml) than the two IgM mAb.



**Figure 4.** Northern blot analysis of eosinophil RNA with the cDNA probe of CD23. (a) WIL2 WT (lane A), YT-Ser (transfected with CD23; lane B), YTNeo (not transfected; lane C), U-937-B (FcεR2 negative; lane D) or U-937-H (FcεR2 positive; lane E) cell lines; (b) blood eosinophils (lanes 1 to 9 correspond to different HE patients) or lung eosinophils (two patients, lanes 10 and 11). Membrane expression of CD23 on blood eosinophils was quoted as FACS + or -. Arrowheads indicate the band at 1.7-kb in lanes A, E, 1, 9 and 10. In lane B, the indicated band is at 3.5 kb.



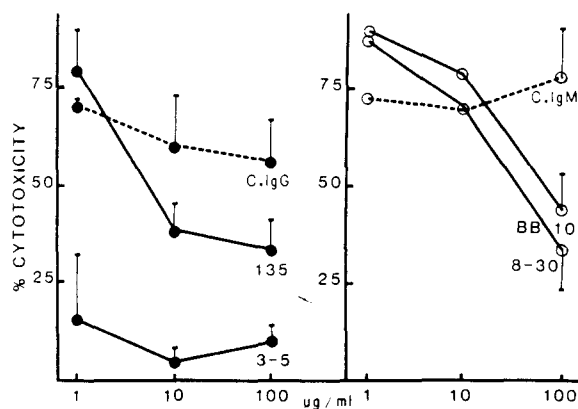


Figure 5. Inhibition of IgE-dependent eosinophil cytotoxicity by various antibodies. Increasing concentrations of mAb 135, 3-5, 8-30 and BB10 were added to the wells of the cytotoxicity assay. Isotype-matched control mAb were used in the same conditions. The abscissa values are the final concentrations of mAb in the assay. Results are the mean of three to five experiments ( $\pm$  SEM).

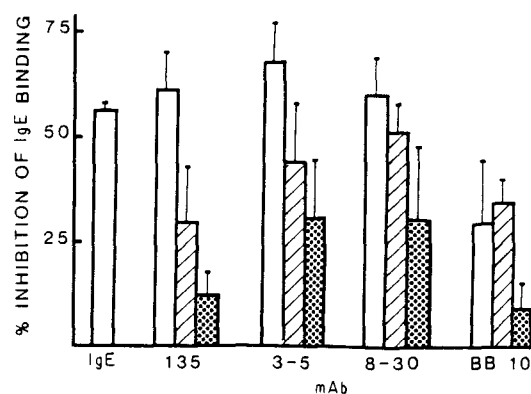


Figure 6. Inhibition of radiolabeled IgE binding to eosinophils.  $^{125}$ I-labeled human myeloma IgE (PS) was incubated at 4°C for 2 h with purified eosinophils (10  $\mu$ g IgE/ml for  $2.5 \times 10^6$  cells). Competition experiments were performed by adding either cold IgE at 1 mg/ml (a 100-fold excess) or the various mAb at 100 ( $\square$ ), 10 ( $\square$ ) or 1 ( $\boxtimes$ )  $\mu$ g/ml. The percentage of inhibition was calculated by comparison with the respective isotype-matched controls (human IgG, mouse IgG or IgM) for each experiment. The given values represent the mean percentage of inhibition  $\pm$  SEM of five experiments.

### 3.5 Inhibition of IgE binding to eosinophils by anti-CD23 mAb

To relate the decrease in cytotoxicity to the inhibition of IgE binding, the various anti-CD23 mAb were assessed in a radiolabeled IgE binding assay. Because of large variations in total IgE binding from one patient to another, the percentage of inhibition was calculated individually for each experiment and then expressed as the mean of five experiments. Results presented in Fig. 6 clearly indicate that all the anti-CD23 mAb studied (3.5, 8.30 and 135)

induced a dose-dependent inhibition of the binding of radiolabeled IgE to purified eosinophils. BB10 inhibited IgE binding only partially confirming the recognition of an epitope probably distant from the IgE-binding site. The level of inhibition reached with the highest concentrations of anti-CD23 mAb was similar to the maximal inhibition obtained with a 100-fold excess of cold IgE. In contrast, similar experiments performed with the CD23<sup>+</sup> B cell line

Table 2. Effect of anti-CD23 mAb on radiolabeled IgE binding to a B cell line (WIL2 WT)

Competitor <sup>a)</sup>	Final concentration in the assay ( $\mu$ g/ml)	Bound radioactivity <sup>b)</sup> (mean cpm $\pm$ SD)	% Inhibition <sup>c)</sup>
Human IgG	1000	34 825 $\pm$ 2615	
Human IgE	1000	3 337 $\pm$ 178	90.4
Control mouse IgG	100	37 409 $\pm$ 1996	
	10	36 434 $\pm$ 2419	
	1	35 053 $\pm$ 519	
mAb 3-5	100	30 894 $\pm$ 8352	17.4
	10	29 492 $\pm$ 752	19.1
	1	33 825 $\pm$ 7107	3.5
mAb 135	100	2 104 $\pm$ 873	94.4
	10	2 708 $\pm$ 210	92.4
	1	3 388 $\pm$ 394	90.3
Control mouse IgM	100	30 982 $\pm$ 1078	
	10	30 357 $\pm$ 62	
	1	35 445 $\pm$ 3289	
mAb 8.30	100	9 879 $\pm$ 2216	68.1
	10	19 132 $\pm$ 8399	37
	1	19 767 $\pm$ 4211	44.2
mAb BB10	100	31 518 $\pm$ 2643	0
	10	34 204 $\pm$ 65	0
	1	34 184 $\pm$ 3196	1

- a) Purified WIL2 WT cells were incubated together with the various reagents and with 10  $\mu$ g/ml of  $^{125}$ I-labeled IgE for 2 h at 4°C.
- b) After centrifugation of cells through sucrose, the radioactivity bound to the cell pellet was measured in a gamma scintillation spectrometer.
- c) Calculated by comparison to the respective isotype-matched controls used at the same concentrations.

(WIL2 WT) revealed that only cold IgE and anti-CD23 mAb directed against the IgE-binding site (135 and 8.30) significantly inhibited the IgE binding (Table 2) but not the mAb 3.5 nor BB10, even at the highest concentration.

#### 4 Discussion

The existence of a low-affinity receptor for IgE has been demonstrated on various cell populations by binding assays and more recently by immunosorbent chromatography [11]. The identification of structural similarities between eosinophil, M $\Phi$ , platelet and B cell IgER [19, 21, 24] led to the concept of a second class of receptors, called Fc $\epsilon$ RII [1]. The demonstration that B cell Fc $\epsilon$ RII was identical to the differentiation antigen CD23 and the availability of anti-CD23 antibody led to the molecular characterization of the human Fc $\epsilon$ RII on various cell lines [7–10]. However, few studies have dealt with cells from patients, particularly eosinophils and platelets. In the present report, we have tried to bring together arguments for the existence and the function of CD23 or CD23-related molecules on human blood eosinophils.

An FCM analysis of the binding of either IgE, three different mAb anti-CD23 or BB10, an anti-eosinophil Fc $\epsilon$ RII mAb, was first performed on a large series of patients studied individually. These results indicate a significant correlation between the binding of myeloma IgE protein and the binding of one mAb 135, directed against the IgE-binding site of CD23, with approximately half of the patients expressing both markers. The analysis of CD23 expression was extended to two other mAb either directed or not to the IgE-binding site. More precisely, all anti-CD23 mAb except 3-5 recognize the region of CD23 between Cys<sup>163</sup> and Cys<sup>288</sup>, while mAb 3-5 recognizes the 20 C-terminal amino acid residues [27]. A specific binding could be observed, with differences probably linked to the affinity of the mAb. Approximately half of the patients were positive. The optimal concentrations of CD23 mAb (defined after preliminary dose-dependent studies; 40  $\mu$ g/ml) were higher than that usually required for the detection of CD23 on B cell lines [21, 22]. These results might explain the apparent discrepancies with other findings obtained with lower doses of anti-CD23 mAb [28]. The comparison between two mAb of IgM isotype (8-30, anti-CD23 and BB10, anti-eosinophil) revealed the absence of correlation in the binding of these two mAb allowing the definition of three main groups of patients with high or low expression of each marker, whereas a third group of patients expressed BB10 but not CD23. The latter results might be due to the binding of BB10 to a molecule containing an adhesion sequence, which might be present on molecules different from CD23. However, since BB10 has been shown to immunoprecipitate only a molecule cross-reactive with CD23, one case also suggests that BB10 binds to an isoform of CD23 and that the expression of the BB10 and CD23 epitopes might vary according to cell maturation, as suggested for the isoforms of the CD45 molecule [29]. In this respect, one should bear in mind that eosinophils from HE patients, even purified according their cell density, are a very heterogeneous population [11]. Double-labeling experiments now in progress will certainly bring interesting information on the co-expression of the two markers on the same cells.

Taken together, these results are consistent with the low membrane expression of a molecule recognized by different non-cross-reactive anti-CD23 antibodies on eosinophils from HE patients. They led us to investigate the synthesis of such a molecule by eosinophils. The Northern blot analysis with the cDNA probe of CD23 revealed a very weak band in three out of six patients detected as positive by FCM. This might be due to a lack of sensitivity of the Northern blot procedure or to the lability of this mRNA species in differentiated cells. A decrease in the expression of mRNA encoding eosinophil granule proteins has recently been shown to correlate with eosinophil differentiation (Gruart et al., submitted for publication). It is also interesting to notice that RNA from lung eosinophils was positive, in contrast to the corresponding blood RNA sample from the same patient. This might be related to the previously described increased expression of Fc $\epsilon$ RII in lung eosinophils [12]. However, these results, associated to the lack of obtention of CD23-related clones by screening a cDNA library from blood eosinophils with the CD23 probe (Truong et al., unpublished data), suggest a low expression of mRNA encoding CD23 in mature blood eosinophils.

They indicate, moreover, that blood eosinophils differ in this respect from the so-called eosinophilic cell line Eo-L3 [10]. The cloning of eosinophil IgER by a strategy of direct expression in COS cells, now in progress, should bring a definitive answer to these questions.

The functional aspects of the molecule cross-reactive with CD23 expressed on human eosinophils were also investigated. As previously reported, at the highest concentrations BB10 and 135 significantly decreased IgE-dependent cytotoxicity to *S. mansoni* targets by hypodense eosinophils [21]. However, interestingly enough, both the mAb directed (8.30) or not (3.5) to the IgE-binding site of CD23 strongly decreased the levels of cytotoxicity. In a limited number of experiments, no synergy was found when combinations of suboptimal concentrations of anti-CD23 and/or BB10 mAb were tested (not shown). Our results are reinforced by similar findings obtained with platelets (M. Capron and M. Joseph, submitted for publication). They clearly indicate that a CD23 cross-reactive molecule, expressed on inflammatory cells, can participate in their effector function. However, since cytotoxicity assays might involve, in addition to IgE antibodies, other factors such as IgG or IgA antibodies [11, 30], chemotactic factors, complement fragments [31] or adhesion molecules [20], it was crucial to know whether anti-CD23 mAb were able to inhibit IgE binding to eosinophils. Our results indicate that all the anti-CD23 mAb tested, directed or not directed against the IgE-binding site of B cell CD23, were able to inhibit the binding of radiolabeled IgE to purified eosinophils. In contrast, when tested under similar conditions, only 135 and 8.30 mAb, directed against the IgE-binding site but not 3.5 mAb, inhibited the IgE binding to WIL2 WT cells as previously reported [21, 22]. These findings indicate a major difference in the function of CD23 when expressed on eosinophils or on B cells. Among other hypotheses the existence of conformational differences or post-transcriptional modifications, as already suggested for Fc $\epsilon$ RIIa and Fc $\epsilon$ RII [10], has to be investigated.

In summary, the binding of three mAb directed against distinct regions of the CD23 molecule confirmed the

membrane expression of CD23 by eosinophils from some eosinophilic patients. The Northern blot analysis revealed for the first time in eosinophils from a limited number of patients the presence of a 1.7-kb mRNA hybridizing with the cDNA probe of CD23. The potent inhibitory effect of the three anti-CD23 mAb on IgE-dependent parasite killing and also on IgE binding clearly indicated the involvement of CD23 in IgE-mediated functions of eosinophils. However, differential effects of anti-CD23 mAb on eosinophils and on B cells suggested some level of heterogeneity between FcεRII/CD23 expressed on eosinophils and other cell types. These results did not exclude the possible existence of other types of IgE-binding proteins on eosinophils, a hypothesis currently being tested.

*The authors would like to thank Dr. J. P. Dessaint and Dr. M. Joseph for helpful discussion, and Dr. L. Prin for access to eosinophilic patients. They are grateful to J. P. Papin and S. Loiseau for their participation to the experimental procedure and to M. F. Massard for secretarial assistance.*

Received March, 21, 1991; in revised form June 19, 1991.

## 5 References

- 1 Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J. C. and Tonnel, A. B., *Immunol. Today* 1986. 7: 15.
- 2 Kehry, M. R. and Yamashita, L. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989. 86: 7556.
- 3 Gordon, J. J., Flores-Romo, L., Cairns, J. A., Millsum, M. J., Lane, P. J., Johnson, G. D. and MacLennan, I. C. M., *Immunol. Today* 1989. 10: 153.
- 4 Letellier, M., Nakajima, T., Pulido-Cejudo, G., Hofstetter, H. and Delespesse, G., *J. Exp. Med.* 1990. 172: 693.
- 5 Mossalayi, M. D., Lecron, J. C., Dalloul, A. H., Sarfati, M., Bertho, J. M., Hofstetter, H., Delespesse, G. and Debré, P., *J. Exp. Med.* 1990. 171: 959.
- 6 Mossalayi, M. D., Arock, M., Bertho, J. M., Blanc, C., Dalloul, A. H., Hofstetter, H., Sarfati, M., Delespesse, G. and Debré, P., *Blood* 1990. 75: 1924.
- 7 Kikutani, H., Inui, S., Sato, R., Barsumian, E. L., Oawaki, H., Yamasaki, K., Kaisho, T., Uchibayashi, N., Hardy, R. R., Hirano, T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Suemura, M. and Kishimoto, T., *Cell* 1986. 47: 657.
- 8 Ludin, C., Hofstetter, H., Sarfati, M., Ley, C. A., Suter, U., Alaimo, D., Kilcherr, E., Frost, H. and Delespesse, G., *EMBO J.* 1987. 6: 109.
- 9 Ikuta, K., Takama, M., Won Kim, C., Honjo, J., Miyoshi, T., Tagaya, U., Kawabe, T. and Yodoi, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987. 84: 819.
- 10 Yokota, A., Kikutani, H., Tanaka, T., Sato, S., Barsumian, E. L., Suemura, M. and Kishimoto, T., *Cell* 1988. 55: 611.
- 11 Capron, M., Grangette, C., Torpier, G., Capron, A., *Chem. Immunol.* 1989. 47: 128.
- 12 Capron, M., Kusnierz, J. P., Prin, L., Spiegelberg, H. L., Ovlaque, G., Gosset, P., Tonnel, A. B. and Capron, A., *J. Immunol.* 1985. 134: 3013.
- 13 Capron, M., Spiegelberg, H. L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A. E., Pierce, R. J., Ouasssi, M. A. and Capron, A., *J. Immunol.* 1984. 132: 462.
- 14 Khalife, J., Capron, M., Cesbron, J. Y., Tai, P. C., Taelman, H., Prin, L. and Capron, A., *J. Immunol.* 1986. 137: 1659.
- 15 Capron, M., Coffman, R. L., Papin, J. P., Ajana, F. and Capron, A., *Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res.* 1991. 21: 975.
- 16 Moqbel, R., Walsh, G. M., Nagakura, T., MacDonald, A. J., Wardlaw, A. J., Ilkura, Y. and Kay, A. B., *Immunology* 1990. 70: 251.
- 17 Moqbel, R., MacDonald, A. J., Cromwell, O. and Kay, A. B., 1990. 69: 435.
- 18 Capron, M., Jouault, T., Prin, L., Joseph, M., Ameisen, J. C., Papin, J. P., Kusnierz, J. P. and Capron, A., *J. Exp. Med.* 1986. 164: 72.
- 19 Jouault, T., Capron, M., Balloul, J. M., Ameisen, J. C. and Capron, A., *Eur. J. Immunol.* 1988. 18: 237.
- 20 Grangette, C., Gruart, V., Ouasssi, M. A., Rizvi, F., Delespesse, G., Capron, M. and Capron, A., *J. Immunol.* 1989. 143: 3580.
- 21 Rector, E., Nakajima, T., Rocha, C., Duncan, D., Lestourgeon, D., Mitchell, R. S., Fischer, S., Schon, A. H. and Delespesse, G., *Immunology* 1985. 55: 481.
- 22 Suemura, M., Kikutani, H., Barsumian, E. L., Hattori, Y. and Kishimoto, T., *J. Immunol.* 1986. 137: 1214.
- 23 Spiegelberg, H. L., *Adv. Immunol.* 1984. 35: 61.
- 24 Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, J. and Rutter, W. J., *Biochemistry* 1979. 18: 5294.
- 25 Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., *Anal. Biochem.* 1983. 132: 10.
- 26 Yodoi, J., Teshigawara, K., Nikaido, T., Fukui, K., Noma, T., Honjo, T., Takigawa, M., Sasaki, M., Minato, N., Tsudo, M., Uchiyama, T. and Maeda, M., *J. Immunol.* 1985. 134: 1623.
- 27 Bettler, B., Maier, R., Ruegg, D. and Hofstetter, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989. 86: 7118.
- 28 Hartnell, A., Walsh, G. M., Moqbel, R. and Kay, A. B., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989. 83: 192 (Abstract 81).
- 29 Serra, H. M., Krowka, J. F., Ledbetter, J. A., Pilarski, L. M., *J. Immunol.* 1988. 140: 1435.
- 30 Capron, M., Tomassini, M., Vandervorst, E., Kusnierz, J. P., Papin, J. P., Capron, A., *C. R., Acad. Sci.* 1988. 307: 397.
- 31 Capron, M., Kazatchkine, M. D., Fischer, E., Joseph, M., Butterworth, A. E., Kusnierz, J. P., Prin, L., Papin, J. P. and Capron, A., *J. Immunol.* 1987. 139: 2059.

---

## Discussion

La variabilité d'expression des molécules fixant l'IgE et plus particulièrement du CD23 sur les éosinophiles de sujets HE a été confirmée par deux méthodes d'analyse différentes: (1) la comparaison de l'expression membranaire des deux marqueurs par cytofluorométrie, et (2) l'étude des ARN messagers codant pour le CD23 en Northern blot.

La première partie de l'analyse a été réalisée avec des anticorps monoclonaux anti-CD23 dirigés (Ac 135 et Ac 8-30) ou non (Ac 3-5) contre le site de fixation de l'IgE. Nos résultats suggèrent que les épitopes du CD23 ne sont exprimés que par un pourcentage d'éosinophiles inférieur à ceux qui fixent l'IgE. Des études de comparaison entre 4 types d'IgE de myélomes différentes a permis de démontrer qu'il existe des variations dans la fixation de l'IgE sur les éosinophiles et de ce fait, suggèrent que soit (1) les IgE de myélomes sont très hétérogènes et présentent des affinités différentes pour leur récepteur; soit (2) elles ne possèdent pas toutes le même degré de glycosylation, voire même une composition glycanique différente. Cette hétérogénéité des molécules IgE peut expliquer les résultats négatifs reportés initialement par d'autres laboratoires (Walsh *et al.*, 1984), alors que ces mêmes auteurs confirment la formation de rosettes IgE par les éosinophiles (Walsh *et al.*, 1986). La variation du taux de fixation de l'IgE et du pourcentage d'éosinophiles exprimant le CD23 est probablement liée au caractère monoclonal des anticorps anti-CD23 utilisés qui reconnaissent un épitope du récepteur pour l'IgE. Une telle influence des conditions expérimentales (Ac à affinité variée, la faible expression du CD23, le temps d'incubation, la température à laquelle les cellules ont été isolées, méthodes de purification des éosinophiles, utilisation de sujets HE ou de sujets normaux, etc..) est également évoquée dans le cas des cellules T pour lesquelles des résultats contradictoires ont été reportés sur l'existence du CD23 sur ces cellules.

Parmi les 20 sujets dont l'ARN a été testé en Northern blot, seuls 3 présentent l'ARN messager de 1 700 pb correspondant au CD23 (Figure 4, Résultats I). Il s'agit pour deux d'entre eux, des enfants très jeunes atteints d'infection par *Toxocara canis* et avec pour l'un d'eux, une infection par le virus EBV (Epstein Barr Virus). Dans l'autre cas, il s'agit d'éosinophiles tissulaires provenant d'un lavage bronchoalvéolaire (réalisé lors d'un asthme sévère chez un sujet atteint d'angéite allergique de Churg et Strauss). Sachant que l'EBV est un agent stimulateur de

---

l'expression membranaire du CD23 par les lymphocytes B (Wang *et al.*, 1987), nous ne pouvons exclure l'hypothèse que le signal observé en Northern blot soit dû à la production d'ARNm codant pour le CD23 par les lymphocytes B contaminants quoi qu'en très faible pourcentage dans les préparations cellulaires utilisées. Il est néanmoins intéressant de signaler que le patient EBV(+), exprimant le messenger CD23 est également celui dont les éosinophiles expriment le plus de CD23 reconnu par un autre anticorps anti-CD23 (Ac 45). Quant aux éosinophiles tissulaires (lavage bronchoalvéolaire), ce résultat positif laisse supposer que ces éosinophiles alvéolaires exprimeraient en quantité plus importante l'ARNm codant pour le CD23 que les éosinophiles sanguins (résultats en accord avec une augmentation de l'expression du FcεRII sur les cellules alvéolaires décélées en cytométrie) (Capron *et al.*, 1985) ou qu'ils n'auraient pas subi une régulation négative au niveau de la transcription du messenger. Par ailleurs, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une positivité due à de l'ARN de macrophages alvéolaires contaminants.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées afin d'expliquer la faible expression des molécules de type CD23 sur les éosinophiles et la difficulté de détection des ARNm correspondants. Il est probable que les épitopes cibles des anticorps monoclonaux anti-CD23 utilisés ne soient pas tous accessibles sur les éosinophiles de patients HE. On peut également émettre l'hypothèse d'une régulation négative du gène du CD23 dans les éosinophiles. En effet, de très importantes séquences de régulation (zone riche en GC) ont été décrites au niveau du promoteur du CD23 humain. Des domaines en doigt de zinc, des boîtes X et Y, et des motifs TRE sont également identifiés au niveau du promoteur du CD23. Toutes ces séquences géniques régulatrices du CD23 sont juxtaposées par des séquences de types Alu-1. Elles sont particulièrement connues comme étant des séquences impliquées dans les événements de transposition. Ces séquences Alu-1 peuvent être très actives dans les éosinophiles et se transposent vers une autre partie du génôme en emportant ainsi les séquences de régulation nécessaires pour une transcription efficace.

Il a été démontré que le site de fixation de l'IgE sur le CD23 des lymphocytes B se localise au niveau du domaine lectinique (Cys<sup>163</sup>-Cys<sup>288</sup>) et que la fixation de l'IgE sur son récepteur FcεRII ne tient pas compte des composants glucidiques de l'IgE. Il est probable qu'au niveau des éosinophiles, la fixation de l'IgE via le récepteur membranaire fasse intervenir les domaines

lectiniques capables de lier les carbohydrates des IgE ou qu'il existerait un second ligand pour l'IgE de nature différente du FcεRII/CD23.

Par ailleurs, un nouveau ligand pour le CD23 a été récemment découvert grâce à l'utilisation des liposomes fluorescents porteurs du CD23 reconstitué (Pochon *et al.*, 1992; Aubry *et al.*, 1992). L'interaction du CD23 et de ce ligand, défini comme étant le CD21, est spécifique (inhibée par les anticorps anti-CD23) et dépendante du Ca<sup>2+</sup>. Ces résultats suggèrent que le CD23 se lie à l'IgE par son domaine protéique mais peut également fixer un autre ligand par son domaine lectinique. Cette hypothèse est soutenue par l'importance des structures glycaniques (type fucose-1 phosphate) dans les interactions avec le CD23. L'existence possible des molécules CD21 sur les éosinophiles de patients HE pourrait expliquer la faible détection des épitopes du CD23 à la surface de ces cellules.

Ainsi, l'expression du CD23 par les éosinophiles ne représente probablement pas l'unique molécule capable de lier l'IgE. La recherche d'autres structures susceptibles de fixer l'IgE telles les lectines a alors été entreprise.

**RESULTATS II.****Criblage d'une banque d'éosinophiles de patients HE.  
Clonage et expression d'un ADNc codant pour un antigène du CMH  
de classe I (HLA-E) .**

Dans le cadre de nos travaux concernant les fonctions de l'éosinophile dans les maladies parasitaires et allergiques, un des buts de notre travail était de cloner le récepteur pour l'IgE de l'éosinophile. Ainsi, en se basant sur le fait que le récepteur pour l'IgE des éosinophiles et le CD23 des lymphocytes B présentaient d'une part des similitudes structurales et d'autre part, des épitopes communs (Résultats I), la stratégie employée consistait à (1) construire une banque d'ADNc à partir de 100 µg d'ARN totaux provenant de 2 patients HE (Gruart, 1990); puis (2) d'utiliser l'ADNc du CD23 comme sonde nucléotidique pour le criblage de cette banque.

## CLONING AND EXPRESSION OF A cDNA ENCODING A NON-CLASSICAL MHC CLASS I ANTIGEN (HLA-E) IN EOSINOPHILS FROM HYPEREOSINOPHILIC PATIENTS<sup>1</sup>

MARIE-JOSÉ TRUONG,<sup>2</sup> VALÉRIE GRUART, ANDRÉ CAPRON, MONIQUE CAPRON, AND BÉATRICE TOURVIEILLE

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167—CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France

A cDNA library, constructed from purified blood eosinophils, was screened with the B cell CD23 cDNA probe. A clone designated EO15 has been isolated and found to encode a non-classical HLA class I gene transcript. EO15 was compared with HLA-E and found to be 99.9% similar at the nucleotide level and to extend further in the 3' untranslated region. The presence of an additional polyadenylation signal in the EO15 3' end suggests that EO15 clone represents a copy of the 3.3-kb mRNA species detected in Northern blot analyses. HLA-E transcripts of 1.9 and 3.3 kb have been described in a variety of cell types. The two EO15 mRNA species, similar in size to the previously defined HLA-E mRNA, were present at high levels in blood leukocyte populations and at variable levels in different cell lines. The EO15 transcripts were found at abundant levels in hypodense and normodense eosinophils from hypereosinophilic patients. In situ hybridization confirmed the expression of EO15 mRNA in eosinophils. Neutrophils and lymphocytes from normal donors or from patients with hypereosinophilia also strongly expressed EO15 mRNA. Among the cell lines studied, the highest levels of EO15 transcripts were detected in B and monocytic cell lines, whereas intermediate and lower levels were found in eosinophilic, NK-like, megakaryocytic, and T cell lines, respectively. Similar to its effect on classical HLA class I transcripts, IFN- $\gamma$  increased the levels of EO15 mRNA in eosinophils and neutrophils from hypereosinophilic patients. These results suggest that purified blood eosinophils as well as neutrophils express EO15/HLA-E mRNA; however, further experiments are needed to investigate the localization and the function of EO15 protein products.

Human eosinophils express several membrane-associated molecules that are also expressed by other blood leukocytes. These include Fc and complement receptors as well as receptors for interleukins such as IL-3 and

granulocyte-macrophage CSF (1), and more recently IL-5 (2) and IL-2 (3). The surface expression of CD4 (4) and MHC class II Ag (5) has also been detected. Among FcR, the eosinophil receptor for IgE (Fc $\epsilon$ R2) has been shown to contain structural similarities and common epitopes (6, 7), as well as some differences with CD23, the B cell differentiation Ag (8). Because of our interest in the function of eosinophils in parasitic diseases and allergies, we decided to clone the eosinophil Fc $\epsilon$ R2. We constructed a cDNA library with RNA from blood eosinophils purified from HE<sup>3</sup> patients that we screened with a B cell CD23 cDNA probe (9). This strategy led to the isolation of a clone, designated EO15, which is highly homologous to HLA class I genes.

Class I Ag are transmembrane glycoproteins of relative molecular mass 35,000 to 45,000 associated with  $\beta$ 2-microglobulin. The HLA molecules consist of three extracellular domains ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3), a hydrophobic transmembrane region, and an intracytoplasmic segment (10). They are expressed on the surface of virtually all nucleated cells. Aside from the three classical HLA class I genes (HLA-A, -B, -C) which are among the most polymorphic in the human genome, several class I-related genes have been recently characterized and cloned. These include HLA 6.0 (also designated HLA-G) (11) and RS5 (12), which is closely related to HLA 6.2 (HLA-E) (13) and to an HLA-E-related cDNA, JTW15 (14). Recently, two additional genes have been isolated and designated HLA 5.4 (HLA-F) (15) and HLA-H (16), this one being shown to be a pseudogene. In transfected cells, HLA-E, -F, and -G genes encode proteins that are smaller than classical class I proteins, and which are also able to associate with  $\beta$ 2-m. Their pattern of expression in different cell lines and human blood cells is distinct from that of classical class I molecules (17). Variability in their level of expression in different cell types and the low degree of polymorphism of these class I-like genes suggest that they might be the human equivalents of Qa and/or T1a genes in mouse H-2 histocompatibility complex (18). Some Qa molecules are secreted and may have regulatory effects, but, until now, no function has been assigned to human non-classical HLA class I molecules.

The aim of the present study was to compare the expression of EO15 with that of non-classical MHC class I genes. Interestingly, HLA-E mRNA has been detected at high levels in resting T lymphocytes, whereas lower levels were found in activated T cells (13). Thus we investigated the EO15 mRNA expression in two previously described

<sup>3</sup> Abbreviation used in this paper: HE, hypereosinophilic.

Received for publication July 10, 1991.  
 Accepted for publication October 28, 1991.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by Unité Mixte INSERM U167—CNRS 624.  
<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to M. J. Truong, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167—CNRS 624, Institut Pasteur, 1 Rue du Pr. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France.



eosinophil subpopulations purified from HE patients (19). Normodense eosinophils and hypodense eosinophils can be differentiated by morphologic and functional criteria, the former being described as a particular step of *in vivo* activation (20–23). The expression of EO15 mRNA was also investigated in neutrophils and lymphocytes from HE patients and normal donors and in various cell lines. The effects of IFN- $\gamma$ , previously determined to up-regulate HLA class I mRNA expression, were also examined on the expression of EO15 mRNA in eosinophils, neutrophils, and some cell lines.

#### MATERIALS AND METHODS

**Leukocyte separation.** Human eosinophils were obtained from the venous blood of patients with eosinophilia of various etiologies by centrifugation through metrizamide discontinuous gradients according to previously described techniques (24, 19). Hypodense eosinophils were collected in the lower density layers corresponding to 20 to 22% metrizamide solutions. Normodense eosinophils were collected from the 23 to 24% metrizamide layers. Unseparated eosinophil preparations were obtained after dextran sedimentation of leukocytes from patients with eosinophilia counts higher than 85%. Human neutrophils and lymphocytes obtained from HE patients or normal donors were collected from the 22 to 23% and the 18 to 20% metrizamide layers, respectively. The degree of purity and the morphologic integrity of cell populations were estimated after staining of cytocentrifuged preparations with Giemsa. Only preparations of at least 85% purity were used.

**Cell lines.** The monocytic cell line (U937), the Fc $\epsilon$ RII<sup>+</sup> B cell line (Wil-2wt), and the rat basophilic leukemia (RBL) cells (25) were kindly donated by Dr. B. Stadler (Bern, Switzerland) and Dr. R. Van Furth (Leiden, The Netherlands), respectively. EO13, a so-called eosinophilic derived cell line, has been established from the peripheral blood of a patient with eosinophilic leukemia (26). The NK-like cell line YT was established from a patient with acute lymphocytic leukemia with thymoma (27). DAMI, a megakaryocytic cell line, has been established from the blood cells of a patient with megakaryocytic leukemia (28). The T cell line Jurkat was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). All cells were maintained in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50  $\mu$ M  $\beta$ 2-ME, and antibiotics. IFN- $\gamma$ , purchased from Genzyme (Boston, MA), was added when indicated to the cultures at a concentration of 100 U/ml for 24 h.

**Screening of a cDNA library.** A cDNA library was constructed from total RNA obtained from eosinophils of two HE patients according to the cDNA library construction kit in  $\lambda$ gt11 (Amersham, UK). Approximately 500,000 recombinants were screened with the CD23 cDNA probe under low stringency conditions (9). Filters were washed three times at room temperature in 2X SSC, 0.05% SDS, and twice at 42°C in 1X SSC, 0.05% SDS, for 1 h each.

**Sequencing method.** The EO15 nucleotide sequence was determined by using the dideoxynucleotide chain-termination method (29) with T7 polymerase according to the USB protocol (Cleveland, Ohio) using specific synthetic oligonucleotide sequencing primers.

**Northern blot analysis.** RNA was extracted by using the guanidine thiocyanate/CsCl gradient method (30). Equal amounts of total RNA (10  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on 1.2% agarose formaldehyde denaturing gels and transferred to nylon membranes (Amersham, France). The blots were subsequently hybridized with human  $\beta$ -actin cDNA probe and with two cDNA probes from EO15 clone, labeled with <sup>32</sup>P (Amersham, UK; <sup>32</sup>P dCTP, 3000 Ci/nmol) by random hexamer priming (31). The blots were washed at high stringency conditions: three times at room temperature in 2X SSC, 0.05% SDS, and twice at 60°C in 0.1X SSC, 0.05% SDS, for 1 h each.

**In situ hybridization.** Purified eosinophil preparations were washed three times in HBSS and approximately  $1 \times 10^5$  cells were cytocentrifuged onto acid-cleaned microscope slides. They were stored with desiccant at -80°C until required. To eliminate nonspecific binding of riboprobes to eosinophils (32, 33), slides were prehybridized at 52°C for 2 h in the presence of unlabeled single-strand pBS RNA (33). <sup>35</sup>S-labeled UTP was incorporated into EO15 riboprobes (sense or antisense) transcribed from EO15 cDNA cloned into pBS according to manufacturer's protocol (Stratagene, La Jolla, CA). <sup>35</sup>S-labeled riboprobes (10<sup>6</sup> cpm) were added to prehybridized cells and incubated at 52°C overnight. The washes and RNase treatment were as previously described (33). After 1 day of exposure, preparations were stained with Giemsa and examined at  $\times 100$  with a Polyvar microscope.

#### RESULTS

**Detection and isolation of EO15 clone.** Based on the similarities in structure and antigenic cross-reactivity between the B cell CD23 and the eosinophil Fc $\epsilon$ RII, a CD23 cDNA probe was used to screen a cDNA library prepared from eosinophils purified from HE patients. Under low stringency screening, only three weakly positive clones were obtained. A comparison of the restriction maps of these three clones revealed that two of them, designated EO15 (1820 bp) and EO9 (1300 bp) were the same (Fig. 1A), whereas the third, EO13, contains two artifactually linked cDNA encoding actin and ribosomal RNA. The longest clone, EO15, was studied in more detail.

**EO15 nucleotide sequence comparisons with non-classical HLA class I sequences.** Alignment of EO15 sequence with those of previously published HLA class I genes revealed that EO15 was 99.9% homologous to the non-classical class I genomic clone, HLA-E (13) and to an HLA-E cDNA clone, JTW15 (14) (Fig. 1B). EO15 starts at nucleotide 2411 of the HLA-E gene and extends 435 nucleotides further in the 3' direction, whereas the HLA-E clone JTW15 terminates at nucleotide 955 of the EO15 cDNA (Fig. 1B) and was generated by using one of the two polyadenylation signals located at the 3' end of the Alu sequence. EO15 contains an additional polyadenylation signal, which is followed 18 bp downstream by a poly(A) tail. Within the overlapping sequences, EO15 cDNA differs from HLA-E exons at only two positions: a deletion of a C base at nucleotide 876 and a substitution of A for G at nucleotide 925, both in the 3' untranslated region. The comparison of EO15 to another HLA-E-related gene, RS5 (12), revealed more divergence (Fig. 1B). Most modifications (2 base-inversion, deletion, and addition) were found in the 3' untranslated region of EO15 cDNA including a loss of similarity between the sequence following nucleotide 1149 of EO15 and the last 30 bp of RS5. In addition, the 28-bp repeat sequence absent in RS5 but present in HLA-E was also found in EO15 (nucleotides 402–429). The EO15 clone contains an open reading frame from nucleotides 1 to 366, which correspond to the middle of the  $\alpha 3$  domain (nucleotides 1–173), followed by the transmembrane region (nucleotides 174–290) and the cytoplasmic domain (nucleotides 291–366) (Fig. 1). One hundred percent similarity is found at the amino acid level between HLA-E, JTW15, and EO15. These comparisons indicate an identity between HLA-E and EO15.

**Expression of the EO15 mRNA in purified blood cell populations.** Two different cDNA probes were used to identify EO15 transcripts in Northern blots. The nonspecific probe (EO15-NS) contains the entire EO15 cDNA, whereas the specific probe (EO15-S) consists of the 404-bp BamHI-EcoRI fragment from the 3' extension of EO15 cDNA (for probe localization, see Fig. 1A). The EO15-NS probe revealed two EO15 mRNA species of 1.9 and 3.3 kb, which were present at high levels in the different human blood cell populations examined (Fig. 2A). Normodense (lanes 1, 2, 11, and 12), hypodense (lanes 3, 4, 13, and 14), and unseparated eosinophils (lanes 5, 6, 15, and 16), all expressed both messages at the same ratio. Identical observations could be made on neutrophils either obtained from a normal donor (lane 7) or from an

HLA-E IN EOSINOPHILS

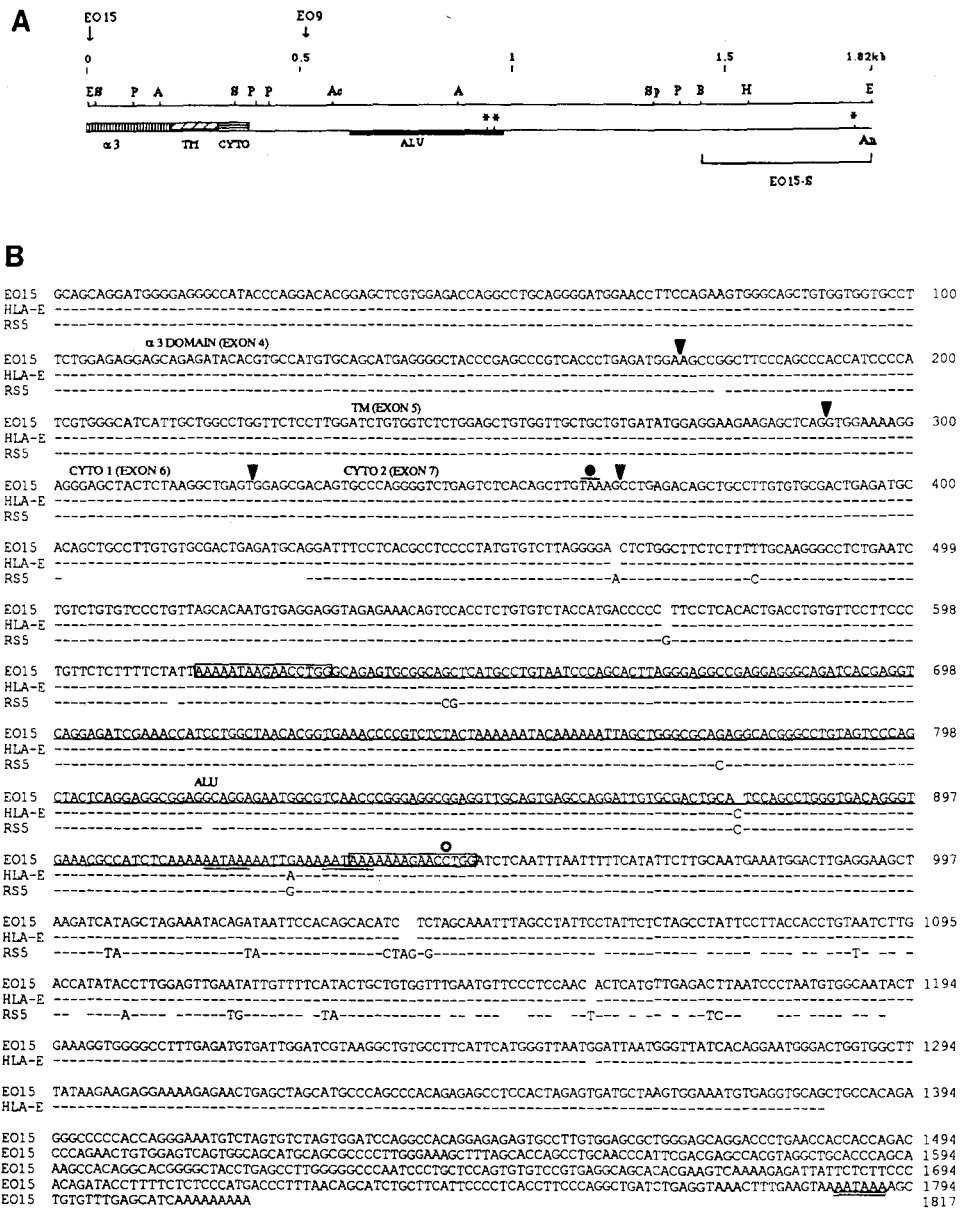


Figure 1. A, organization of EO15 and EO9 cDNA clones (↓ indicates starting point). A restriction map of EO15 clone is shown at top. Restriction sites indicated are: A, Aval; Ac, Accl; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PvuII; S, SacI; Sp, SphI. \* indicates the three polyadenylation signals. Region of EO15 subcloned and used as probe is indicated by line EO15-S. B, complete nucleotide sequence of EO15 cDNA and comparison with the nucleotide sequence of HLA-E and RS5 (exons 4, 5, 6, 7, and 3' untranslated). Terminal repeats of the Alu sequence are boxed. Alu sequence is underlined and polyadenylation sites are double underscored. ▼, limits of exon; ●, stop codon; ○, indicates the 3' end of JTW15/HLA-E cDNA. TM, transmembrane region. CYTO, cytoplasmic domain. (These sequence data are available from EMBL under accession number X56841.)

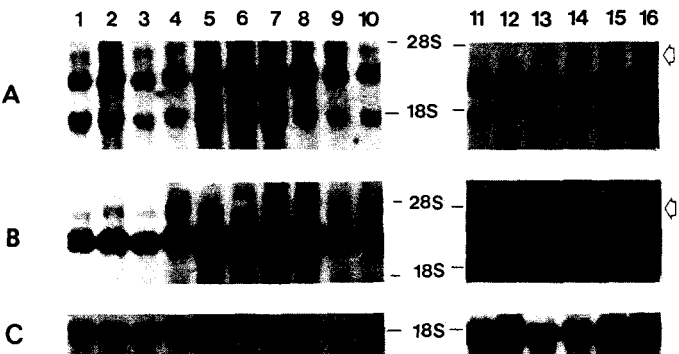


Figure 2. Northern blot analysis of total RNA derived from blood purified cell populations: normodense eosinophils (lanes 1, 2, 11, and 12), hypodense eosinophils (lanes 3, 4, 13, and 14), unseparated eosinophils (lanes 5, 6, 15, and 16), normal donor neutrophils (lane 7), HE neutrophils (lane 8), normal donor lymphocytes (lane 9), and HE lymphocytes (lane 10). Arrows indicate the third form of EO15 mRNA species (4.5 kb). The blots were subsequently hybridized with EO15-NS probe (A), EO15-S probe (B), and β-actin probe (C).

HE patient (lane 8). Control lymphocytes purified from a normal donor (lane 9) and from an HE patient (lane 10) also expressed EO15 mRNA at similar ratios to eosinophil

or neutrophil populations.

Another form of EO15 mRNA (4.5 kb) seems to exist in the various cell types studied in addition to the 1.9 and 3.3 kb messages (Fig. 2). This species could correspond to an unspliced nuclear precursor. Similar patterns of mRNA levels were seen when the blood samples were probed with EO15-S, which only recognizes the 3.3 kb and the 4.5 kb species (Fig. 2B). Samples were standardized using a β-actin probe (Fig. 2C).

**Expression of the EO15 mRNA in various cell lines.** The expression of EO15 mRNA was much more variable in the several cell lines tested in contrast to purified human blood cells (Fig. 3A). The monocytic (U937, lane 3) and B (WiL-2wt, lane 4) cell lines expressed EO15 mRNA at higher levels than other tested cell lines. Intermediate levels were found in the NK-like (YT, lane 2) and eosinophilic (EoL3, lane 6) cell lines. Only low levels were detected in the megakaryocytic (DAMI, lane 1) and T (Jurkat, lane 5) cell lines. All these cell lines also showed the same variability in the expression of the 4.5 kb-species of EO15 mRNA.

When EO15-S was used as probe, the pattern of expres-

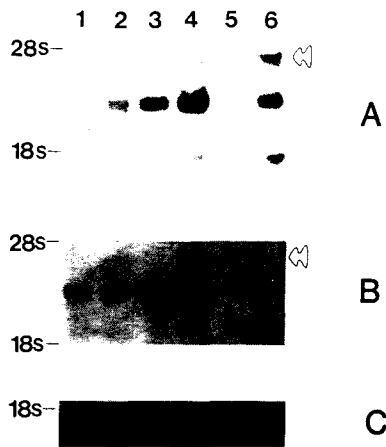


Figure 3. Northern blot analysis of total RNA derived from different cell lines: the megakaryocytic cell line (DAMI, lane 1), the NK-like cell line (YT, lane 2), the monocytic cell line (U937, lane 3), the B cell line (WiL-2wt, lane 4), the T cell line (Jurkat, lane 5), and the eosinophilic cell line (EoL3, lane 6). Arrows indicate the 4.5-kb species. The blots were hybridized with EO15-NS probe (A), EO15-S probe (B), and  $\beta$ -actin probe (panel C).

sion of the 3.3-kb and 4.5-kb mRNA species was the same as when the EO15-NS probe was used (Fig. 3B). The level of  $\beta$ -actin expression was used to control the amount of RNA (Fig. 3C).

**Localization of EO15 mRNA in human eosinophils by in situ hybridization.** To confirm the cell type of the 1.9- and 3.3-kb mRNA expressing cells, the EO15-NS and EO15-S riboprobes (sense or antisense) were used to perform in situ hybridization on human blood eosinophils (preparations containing 98% eosinophils) (Fig. 4). Only the  $^{35}$ S-antisense (-) EO15-S and EO15-NS riboprobes strongly hybridized to eosinophils (Fig. 4, A and C). Sense (+) EO15-S and EO15-NS riboprobes produced only non-specific background binding to eosinophils (Fig. 4, B and D). In addition, when cells were hybridized with EO15-

NS riboprobes (detecting 1.9 and 3.3 kb transcripts), a greater accumulation of silver grains was observed in the cytoplasm of eosinophils in comparison with EO15-S riboprobe hybridization. These results, which can be explained by a cross-hybridization of EO15-NS riboprobes with perhaps other HLA class I transcripts, are in agreement with the Northern blot analysis.

**Increased expression of EO15 mRNA by IFN- $\gamma$ .** The effect of IFN- $\gamma$  on the expression of EO15 transcripts was examined in eosinophils, neutrophils, and in the EoL3 cell line (Fig. 5). The level of EO15 mRNA was increased after culture with 100 U/ml of IFN- $\gamma$  in EoL3 cell line (A) and in eosinophils obtained from HE patients (B), whereas increase was much less evident in neutrophils (C). The dose of IFN- $\gamma$  used increased in parallel both the 1.9- and 3.3 kb-transcripts. In the EoL3 cell line (A) the 4.5-kb EO15 species seems also to increase. No significant variation was observed for the  $\beta$ -actin mRNA level.

DISCUSSION

To clone the eosinophil Fc $\epsilon$ R2, a strategy was designed based on the described antigenic similarities between the eosinophil IgE receptor and the B cell CD23/Fc $\epsilon$ R2 (7). A CD23 cDNA (9) was used to screen an eosinophil cDNA library under low stringency conditions, previously shown to be required for the CD23 mRNA detection in eosinophils (8). The reduced stringency conditions might explain the cloning of unrelated cDNA. To explain why the CD23 probe resulted in the isolation of EO15/HLA-E, EO15 and CD23 sequences were compared and revealed no significant similarity, only several isolated stretches of homology (88% similarity within 12 to 15 adjacent bases) were found on the 3' untranslated regions. The hypothesis that it might be due to Alu sequences in both genes can be excluded since CD23 probe does not contain Alu sequences.

Analysis of the EO15 cDNA sequence revealed a very

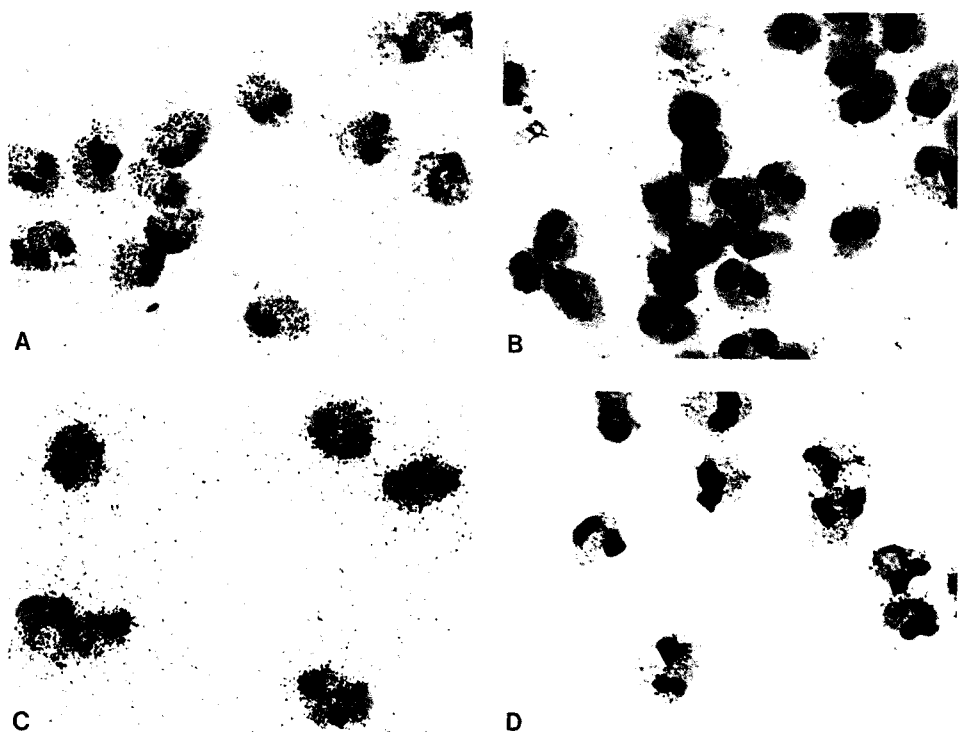


Figure 4. Detection by in situ hybridization of EO15 mRNA expression on un-separated eosinophils from HE patients (A-D). The EO15 specific probes (EO15-S) used are antisense (-) (A) and sense (+) (B). The EO15 nonspecific probes (EO15-NS) are antisense (-) (C) and sense (+) (D). After 1 day of exposure, the slides were stained with Giemsa and examined at  $\times 100$ .

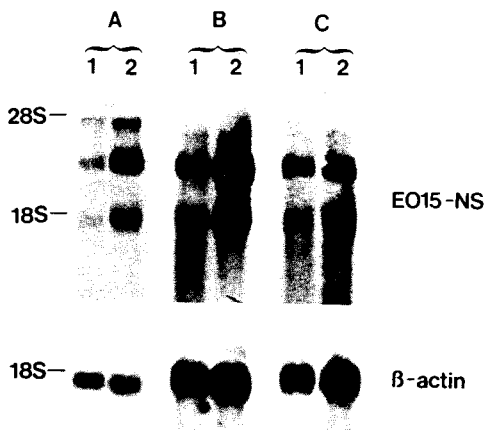


Figure 5. Northern blot analysis of RNA derived from EoL3 cell line (A), unseparated eosinophils (B), and neutrophils (C) from HE patients cultured for 24 h in the absence (lane 1) and presence (lane 2) of IFN- $\gamma$  at 100 U/ml. The total RNA was hybridized with EO15-NS and  $\beta$ -actin probes.

high degree of similarity with HLA-E exons (13). Since EO15  $\alpha$ -1 and  $\alpha$ -2 sequences are unknown, eosinophil mRNA was probed with two oligonucleotides corresponding to HLA-E-derived sequences for the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 domains, respectively. The mRNA that were detected with those probes (data not shown) co-migrated with the two mRNA species (1.9 and 3.3 kb) found with EO15-NS probe (Fig. 2A). Based on these results, it was concluded that EO15 is identical to HLA-E. We demonstrated here that the two EO15/HLA-E messages can be generated by an alternative use of two different poly(A) addition signals. The previously published cDNA clone, JTW15, seems to correspond to the 1.9-kb message, whereas EO15 and EO9 cDNA represent the 3.3-kb mRNA species. In contrast to classical HLA class I genes which are highly polymorphic, EO15/HLA-E and JTW15 appear to be very conserved in nucleotide and amino acid sequences.

T, B, and myelomonocytic cell lines have been shown to possess HLA-E transcripts (13). The level of HLA-E expression appears to be variable according to the cell type and the activation state of the cells. Resting peripheral blood T lymphocytes expressed the 3.3-kb transcript at a higher level than the activated T lymphocytes (13). In contrast to normodense eosinophils, hypodense eosinophils are considered as activated cells with regard to their metabolic response (20), IgE-dependent cytotoxic ability (21), or mediator release (22) and organ-tissue distribution (23). To detect possible variations in EO15 mRNA expression during the eosinophil activation, the amount of EO15 messages on blood normodense and hypodense eosinophils was compared. This investigation revealed that both eosinophil subpopulations express high levels of EO15/HLA-E mRNA. In spite of the higher background observed in eosinophil preparations, in situ hybridization clearly confirmed the presence of EO15 mRNA in human eosinophils and also excluded the possibility that positive signals in Northern blot analyses resulted from contaminating cells. These studies indicate that HLA-E mRNA regulation in eosinophils differs from that of T lymphocytes (13). EO15/HLA-E seems therefore to be expressed constitutively in hypodense and normodense eosinophils from HE patients. This investigation should be extended to eosinophils from normal subjects to determine a possible difference between normodense

eosinophils from HE patients and eosinophils from normal subjects. It is interesting to note that HLA-DR molecules (5) and IL-2R (CD25) (34) were detected on the surface of normal eosinophils only after stimulation by co-culture with 3T3 fibroblasts and granulocyte-macrophage CSF. However, a recent study shows that CD25 could be expressed spontaneously by eosinophils from HE patients (3). Thus, to determine whether EO15/HLA-E mRNA are translated and if corresponding proteins are translocated to the cell surface, EO15/HLA-E molecules must be localized and quantified in blood leukocytes taken at various stages of activation.

IFN- $\gamma$  receptors have been identified on granulocytes (35) and IFN- $\gamma$  has been shown to be an activator of eosinophil functions (36). The presence of an IFN-responsive element in the HLA-E promoter (13) suggested that IFN- $\gamma$  could increase EO15/HLA-E mRNA in eosinophils and neutrophils. We observed such an up-regulation after 24-h culture with 100 U IFN- $\gamma$  in eosinophils from HE patients. Likewise, EO15 mRNA levels increased in the eosinophil-derived EoL3 (Fig. 5A) and megakaryocytic DAMI cell lines (data not shown) after IFN- $\gamma$  stimulation. The other form of HLA-E/EO15 mRNA (4.5 kb), previously observed in U937 cells only after stimulation by IFN- $\gamma$  (14) and detected here in all cell types studied, was also up-regulated by IFN- $\gamma$ .

It has been shown that eosinophils have phagocytic properties facilitating ingestion of IgG or IgE immune complexes (37, 38). A recent report also indicated that human eosinophils can process Ag and function as class II (HLA-DR)-restricted APC (39). However, until now, neither the detection of membrane HLA-E proteins nor its function in Ag presentation have been reported. Therefore, the localization and the level of HLA-E products have still to be determined to understand the potential role of EO15/HLA-E proteins in eosinophil functions.

**Acknowledgments.** The authors acknowledge Drs. L. Prin and A. B. Tonnel for access to hypereosinophilic patients. They thank Drs. B. Stadler, R. Van Furth, S. M. Greenberg, J. Yodoi, and H. Saito for their generous supply of cell lines, and Drs. G. Delespesse and H. Hofstetter for providing the cDNA CD23 probe. We would also like to thank Dr. C. Grangette for advice regarding in situ hybridization, Dr. J. P. Kusnierz for providing oligonucleotides, and S. Loiseau and C. Drolez for technical assistance. The authors also acknowledge Drs. J. P. Dessaint and D. Williams for critical review of the manuscript.

REFERENCES

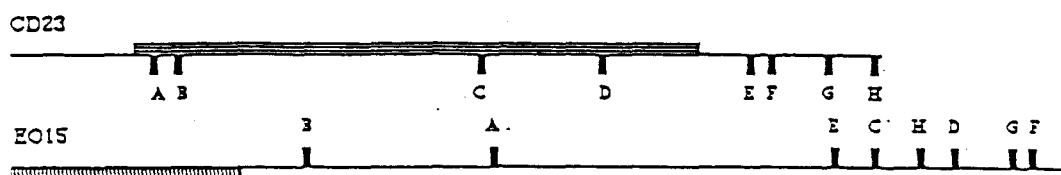
- Lopez, A. F., J. M. Eglinton, D. Gillis, L. S. Park, S. Clark, and M. A. Vadas. 1989. Reciprocal inhibition of binding between interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7022.
- Chihara, J., J. Plumas, V. Gruart, J. Tavernier, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1990. Characterization of a receptor for interleukin 5 on human eosinophils: variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 172:1347.
- 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.
- 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.
- Lucey, D. R., A. Nicholson-Weller, and P. F. Weller. 1989. Mature

- human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1348.
6. Jouault, T., M. Capron, J. M. Balloul, J. C. Ameisen, and A. Capron. 1988. Quantitative analysis of the Fc receptor for IgE (FcεRII) on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* 18:237.
  7. Grangette, C., V. Gruart, M. A. Ouaisi, F. Rizvi, G. Delespesse, A. Capron, and M. Capron. 1989. IgE receptor on human eosinophils (FcεRII): comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.* 143:3580.
  8. Capron M., M. J. Truong, D. Aldebert, V. Gruart, H. Suemura, G. Delespesse, B. Tourvielle, and A. Capron. 1991. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur. J. Immunol.* 21:2423.
  9. Ludin, C., H. Hofstetter, M. Sarfati, C. A. Levy, U. Suter, D. Alaimo, E. Kilchherr, H. Frost, and G. Delespesse. 1987. Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. *EMBO J.* 6:109.
  10. Koller, B. H., D. E. Geraghty, H. T. Orr, Y. Shimizu, and R. DeMars. 1987. Organization of the human class I major histocompatibility complex genes. *Immunol. Res.* 6:1.
  11. Geraghty, D. E., B. H. Koller, and H. T. Orr. 1987. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9145.
  12. Srivastava, R., M. J. Chorney, S. K. Lawrance, J. Pan, Z. Smith, C. L. Smith, and S. M. Weissman. 1987. Structure, expression, and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4224.
  13. Koller, B. H., D. E. Geraghty, Y. Shimizu, R. DeMars, and H. T. Orr. 1988. HLA E: A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunol.* 141:897.
  14. Mizuno, S., J. A. Trapani, B. H. Koller, B. Dupont, and S. Y. Yang. 1988. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a novel HLA class I gene. *J. Immunol.* 140:4024.
  15. Geraghty, D. E., X. H. Wei, H. T. Orr, and B. H. Koller. 1990. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J. Exp. Med.* 171:1.
  16. Chorney, M. J., I. Sawada, G. A. Gillespie, R. Srivastava, J. Pan and S. M. Weissman. 1990. Transcription analysis, physical mapping, and molecular characterization of a non classical human leukocyte antigen class I gene. *Mol. Cell. Biol.* 10:243.
  17. Shimizu, Y., D. E. Geraghty, B. H. Koller, H. T. Orr, and R. DeMars. 1988. Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A, B, C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:227.
  18. Flaherty L., E. Elliot, J. A. Tine, A. C. Walsh, and J. B. Waters. 1990. Immunogenetics of the Q and TL regions of the mouse. *Crit. Rev. Immunol.* 10:131.
  19. Prin, L., M. Capron, A. B. Tonnel, O. Bletty, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils. I. Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72:336.
  20. Prin, L., J. Charon, M. Capron, P. Gosset, H. Taelman, A. B. Tonnel, and A. Capron. 1984. Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. Exp. Immunol.* 57:735.
  21. Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A. E. Butterworth, R. J. Pierce, M. A. Ouaisi, and A. Capron. 1984. Role of the IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.
  22. Khalife, J., M. Capron, J. Y. Cesbron, P. C. Tai, H. Taelman, L. Prin, and A. Capron. 1986. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* 137:1659.
  23. Prin, L., M. Capron, P. Gosset, B. Wallaert, J. P. Kusnierz, O. Bletty, A. B. Tonnel, and A. Capron. 1986. Eosinophilic lung disease: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 63:249.
  24. Vadas, M. A., J. R. David, A. E. Butterworth, N. T. Pisani, and T. A. Siongok. 1979. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *S. mansoni*. *J. Immunol.* 122:1228.
  25. Barsumian, E. L., C. Isersky, M. G. Petrino, and R. P. Siraganian. 1981. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemic lines: isolation of releasing and non releasing clones. *Eur. J. Immunol.* 11:317.
  26. Saito, H., A. Bourinbaier, M. Ginsburg, K. Minato, E. Ceresi, K. Yamada, D. Machover, J. Breard, and G. Mathe. 1985. Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* 66:1233.
  27. Yodoi, J., K. Teshigawara, T. Nikaido, K. Fukui, T. Noma, T. Honjo, M. Takigawa, M. Sasaki, N. Minato, M. Tsudo, T. Uchiyama, and M. Maeda. 1985. TCGF(IL2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL2-receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* 134:1623.
  28. Greenberg, S. M., D. S. Rosenthal, T. A. Greeky, R. Tontravali, and R. I. Haudin. 1972. Characterization of a new megakaryocytic cell line: the DAMI cell. *Blood* 6:1968.
  29. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.
  30. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294.
  31. Feinberg, A. P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6.
  32. Patterson, S., J. Gross, and A. D. B. Webster. 1988. DNA probes bind non-specifically to eosinophils during in situ hybridization: carbol chromotrope blocks binding to eosinophils but does not inhibit hybridization to specific nucleotide sequence. *J. Virol. Methods* 23:105.
  33. Fox, C. H., D. Kotler, A. Tierney, C. S. Wilson, and A. S. Fauci. 1989. Detection of HIV-1 RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. *J. Infect. Dis.* 159:467.
  34. Riedel, D., A. Lindemann, M. Brach, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce surface expression of interleukin-2 receptor p55-chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* 70:258.
  35. Ucer, U., H. Bartsch, P. Scheurich, D. Berkovic, C. Ertel, and F. Pfizenmaier. 1986. Quantification and characterization of  $\gamma$ -interferon receptors on human tumor cells. *Cancer Res.* 46:5339.
  36. Valerius, T., R. Repp, J. R. Kalden, and E. Platzer. 1990. Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines: a novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. *J. Immunol.* 145:2950.
  37. Grover, W. H., H. H. Winkler, and D. E. Normansel. 1978. Phagocytic properties of isolated human eosinophils. *J. Immunol.* 121:718.
  38. Fujita, Y., E. Rubinstein, D. B. Reisman, and C. E. Arbesman. 1975. Antigen-antibody complexes in or on eosinophils in nasal secretions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 48:577.
  39. Weller P. F., T. H. Rand, and R. W. Finberg. 1991. Human eosinophil function as HLA-DR dependent, MHC-restricted antigen-presenting cells. *FASEB J.* 15:A640 (Abstr).

## Résultats complémentaires

Dans le but de comprendre pourquoi des clones ne correspondant pas au CD23 ont été obtenus avec la sonde CD23 des lymphocytes B, la recherche des zones d'homologie existants entre les séquences des clones obtenues et celle du CD23 a été réalisée grâce au programme PC-Gene.

**Figure 6.** Localisation des zones homologues au niveau de la séquence du clone EO15 (HLA-E) et de celle du CD23. Ces zones sont mentionnées par ordre alphabétique. Leur taille est indiquée par le nombre de nucléotides et le pourcentage d'homologie est donné pour chaque zone homologue.



Zones homologues	nombre de nucléotides	% d'homologie
A	82	63.4
B	46	69.5
C	45	73.3
D	12	91.7
E	12	91.7
F	17	88.2
G	43	69.8
H	10	100

---

## Discussion

La stratégie de clonage du récepteur pour l'IgE (FcεRII) de l'éosinophile nécessitait tout d'abord le choix de la sonde la mieux appropriée. Comme l'anticorps monoclonal anti-éosinophile (Ac BB10) reconnaît une séquence d'adhésion associée au récepteur pour l'IgE mais également présente sur d'autres structures ou types cellulaires (Grangette *et al.*, 1989), nous n'avons pas pu l'utiliser comme sonde spécifique. D'autres résultats ayant suggéré une analogie structurale et une antigénicité croisée entre le CD23 et le récepteur pour l'IgE de l'éosinophile, la voie d'approche pour le clonage du FcεRII de l'éosinophile s'est basée sur une homologie probable en séquence nucléotidique avec le CD23 pour le criblage d'une banque d'ADNc d'éosinophiles provenant de patients HE.

Ce criblage n'a pas abouti à l'obtention de clones correspondant au CD23. Par alignement des séquences, les ADNc des clones obtenus ne présentent que de faibles homologies avec celui du CD23 (Figure 6). Les seules zones homologues significatives (zones D, E, F, et H) sont de taille très courte (entre 10 et 17 nucléotides) et se localisent essentiellement dans la partie non codante du CD23 et du clone EO15 (HLA-E). Ces zones d'homologies peuvent correspondre aux épitopes CD23 exprimés par les éosinophiles de patients HE (Résultats I).

Plusieurs raisons peuvent être évoquées afin d'expliquer l'absence d'homologie des clones obtenus vis à vis de la sonde utilisée. Sachant que les banques d'ADNc sont spécifiques de types cellulaires et puisqu'une cellule donnée ne possède pas tous les ARN messagers de l'individu, mais uniquement ceux dont l'état de différenciation cellulaire permettent la transcription, les ARN totaux d'éosinophiles des deux sujets HE utilisés pour la construction de la banque d'ADNc, ne contenaient probablement pas l'ARN messenger correspondant au CD23. D'ailleurs, les éosinophiles de ces deux patients n'avaient pas été testés pour leur taux de fixation de l'IgE en cytofluorométrie en flux. Deuxièmement, la faible stringence utilisée pour les lavages des filtres de nitrocellulose lors du criblage de la banque peut également influencer sur la spécificité du clonage. Troisièmement, l'hypothèse d'une homologie en séquence nucléotidique entre le CD23 et le récepteur IgE des éosinophiles pourrait être remise en cause.

---

Par ailleurs, cette même stratégie de clonage utilisant l'ADNc du CD23 comme sonde nucléotidique, en des conditions homologues, pour le criblage d'une banque d'ADNc de lymphocytes B murins activées par l'IL-4 a été entreprise avec succès (Bettler *et al.*, 1989b) pour le clonage du CD23 murin. Certes les facteurs d'induction de l'expression du CD23 sont bien décrits et les lignées cellulaires B sont facilement mises en culture *in vitro* sans pour autant que leur taux d'ARNm soit diminué; ce qui n'est pas le cas pour les éosinophiles de patients HE. Ainsi, cette voie d'approche n'est pas applicable pour le clonage du récepteur pour l'IgE de l'éosinophile.

Néanmoins, ce travail a permis de cloner et de caractériser une molécule appartenant à la famille du complexe majeur d'histocompatibilité et plus particulièrement aux antigènes de HLA de classe I non classique, HLA-E. L'originalité de la séquence de ce clone, par rapport aux séquences publiées, est l'existence d'un troisième signal de polyadénylation au niveau de l'extrémité 3' non codante (435 nucléotides en plus de la séquence publiée).

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'expression en surface de ces molécules de classe I non-classique, HLA-E. La transfection du fragment HLA-E de 6,2 kb dans une lignée LCL mutante négative pour les HLA classe I permet l'obtention d'une chaîne intracellulaire de 41 kDa coprécipitée par la  $\beta$ 2m (Shimizu *et al.*, 1988; Koller *et al.*, 1988). Au contraire, la transfection du fragment HLA-E de 16 kb dans les cellules L murins exprimant la  $\beta$ 2m ne produit aucune molécule détectable en surface (Srivastava *et al.*, 1987). Ces résultats laissent à penser que l'expression des antigènes HLA-E est régulée par un contrôle post-transcriptionnel codé au niveau de la région 3' non codante (Ulbrecht *et al.*, 1992a). Il est à noter que le transport intracellulaire et l'expression à la surface des molécules de classe I classiques (HLA-A, -B, et -C) sont contrôlés par un assemblage efficace de complexe trimoléculaire et sont sous la dépendance de la disponibilité de certains peptides contenus dans le réticulum endoplasmique (Alexander *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1991; Spies *et al.*, 1992). L'expression non productive des molécules HLA-E à la surface cellulaire, semble être le résultat d'une faible stabilité des molécules HLA-E durant leur transport vers la surface cellulaire. Ceci est probablement dû à un déficit de liaison entre HLA-E et des peptides endogènes ayant pour rôle le transport des protéines vers la membrane. Cette faible expression membranaire de HLA-E peut être



significativement augmentée soit par la baisse de la température de culture des cellules transfectées soit par une supplémentation en  $\beta$ 2m dans le milieu de culture (Ulbrecht *et al.*, 1992b).

Les antigènes de classe I classiques jouent un rôle essentiel dans la présentation d'antigène aux cellules CTL par leur capacité à lier des peptides cytoplasmiques provenant de protéines virales dégradées et les exposent à la surface cellulaire (Towsend *et al.*, 1989). La fonction des antigènes de classe I non classiques n'a pas été définie de manière très précise. Toutefois, le fait que la séquence nucléotidique HLA-E est très conservée par opposition à celle des antigènes de classe I classiques suggère que ces molécules non classiques (de type HLA-E) peuvent représenter des éléments essentiels de restriction. Il a été proposé, chez la souris, que certains antigènes du complexe H2 non-classique peuvent jouer un rôle dans la présentation de peptides synthétiques aux cellules T (Miligan *et al.*, 1991; Vidovic *et al.*, 1989) et dans la tolérance du soi (Stroynowski, 1990). Par ailleurs, HLA-G, un homologue des molécules de classe I non classiques, semble représenter un élément majeur de restriction chez les primates (Watkins *et al.*, 1990).

Les éosinophiles sont capables de conditionner des antigènes et de fonctionner comme des cellules présentatrices de l'antigène via les molécules HLA de classe II (HLA-DR) (Weller *et al.*, 1993). Le fait que les éosinophiles normodenses expriment en très grande quantité les messagers codant pour HLA-E, de la même manière que les éosinophiles hypodenses, suggère que ces antigènes de classe I non-classiques interviendraient dans une des fonctions effectrices de l'éosinophile en tant que cellule présentatrice de l'antigène.

---

## **RESULTATS III.**

### **Les éosinophiles de sujets HE expriment à leur surface des molécules appartenant à la famille des S-lectines (Mac-2/εBP).**

Ayant pour but d'identifier les molécules capables de fixer l'IgE sur les éosinophiles humains, la première stratégie d'étude basée sur le criblage de la banque d'ADNc d'éosinophiles de patients HE avec la sonde CD23 n'a pas donné de résultats très concluants (Résultats II). Le fait que ce criblage n'ait pas permis l'obtention de clones reliés au CD23, laisse à penser que soit l'ARMm codant pour le CD23 ne soit que très faiblement représenté dans les éosinophiles, soit que les molécules liant l'IgE présentes sur les éosinophiles humains puissent être de nature autre que le CD23.

La description d'une nouvelle famille de molécules capables de fixer l'IgE attira notre attention. Il s'agit non pas de molécules transmembranaires mais de molécules de type lectine présentant des spécificités pour les β-galactosides essentiellement (lectines de type S). La toute première molécule découverte fût le CBP 35 qui est exprimée par les fibroblastes (Moutsatsos *et al.*, 1987). De nombreuses lectines spécifiques pour le β-galactoside sont depuis définies sur différents types cellulaires: IgEBP ou εBP sur les basophiles, Mac-2 sur les macrophages... Des évidences structurales et moléculaires laissent à penser qu'il s'agit d'une seule et même molécule. Toutefois, la capacité de fixation de l'IgE a surtout été décrite pour la molécule εBP.

Ainsi, l'objectif de ce travail a été de démontrer que (1) ce type de molécules lectiniques pouvait être exprimé par les éosinophiles de sujets HE; et que (2) ces lectines (Mac-2/εBP) étaient également impliquées dans la cytotoxicité IgE-dépendante des éosinophiles.

**Running Title:**

**IgE-binding molecules in eosinophils.**



**HUMAN EOSINOPHILS EXPRESS FUNCTIONAL IgE-BINDING  
MOLECULES (MAC-2/εBP) OF THE S-TYPE LECTIN FAMILY.**

**Marie-José TRUONG \*, Valérie GRUART \*, Fu-Tong LIU ‡, Lionel PRIN\*,  
André CAPRON \* and Monique CAPRON \*.**

\*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624,  
Institut Pasteur, Lille, France;

‡Allergy Research Section, Department of Molecular and Experimental Medicine, Research  
Institute of Scripps clinic, 10666 North Torrey Pines Rd, La Jolla, CA 92037.

**En soumission pour publication à Eur. J. Immunol.**

---

**FOOTNOTES**

<sup>1</sup> This work was supported by Unité Mixte INSERM U167 - CNRS 624.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint request to M. J. TRUONG, C.I.B.P., Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex (France).

<sup>3</sup> Abbreviations: HE, Hypereosinophilic; h $\epsilon$ BP, human IgE-binding protein; CBP35, carbohydrate-binding protein 35; hMac-2, human macrophage cell-surface protein 2; hGMCSF, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; CRD, carbohydrate recognition domain; CLC, Charcot-Leyden Crystal; MBP, Major Basic Protein, RBL, rat basophilic leukemia.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Drs. O. Bletry and A. B. Tonnel for access to hypereosinophilic patients and macrophages from bronchoalveolar lavage; to Drs. B. Stadler, J. Yodoi, and D. Stehelin for their generous supply of cell lines; to Dr. H. L. Spiegelberg for providing human myeloma IgE-PS; to Dr. B. Cherayil for supplying the anti-Mac-2 hybridoma supernatant and the cDNA probe for hMac-2; and to Dr. L. Shen for the gift of anti-Fc $\alpha$ R MY43 mAb. We also like to thank S. Loiseau, J. P. Papin, J. P. Kusnierz, J. L. Neyrinck and C. Drolez for technical assistance and Dr. B. Tourvieille for critical reviewing.

**ABSTRACT**

Mac-2 is an S-type lectin identified in inflammatory macrophages and shows homology to the rat IgE-binding protein ( $\epsilon$ BP). In the present study, we found that human eosinophils express Mac-2/ $\epsilon$ BP. By flow cytometry, significant binding of anti-Mac-2 mAb was detected on the surface of highly purified eosinophils from about half of the eosinophilic patients tested. Northern blot performed with human eosinophil RNA hybridized with the human Mac-2 or  $\epsilon$ BP cDNA probes revealed that eosinophils presented an unique transcript at 1.2 kb. Eosinophil molecules were characterized by immunoblotting and immunoprecipitation with anti-Mac-2 and anti- $\epsilon$ BP antibodies. The same protein pattern was observed with the two immunoprobes: presence of a

---

molecule at 29 kD and detection of two additional molecules at 20 and 15 kD, absent from control alveolar macrophages. The function of these molecules was first investigated in a radiolabeled IgE binding assay. Anti-Mac-2 mAb as well as galactose and lactose saccharides significantly inhibited the binding of radiolabeled human myeloma IgE protein to eosinophils. Moreover, the dose-dependent inhibition by anti-Mac-2 mAb of IgE-dependent eosinophil-mediated cytotoxicity towards parasite targets indicated the role of these IgE-binding molecules in the function of human eosinophils. These results suggest that in addition to transmembrane receptors, lectin-type molecules can participate in the IgE-dependent function of eosinophils.

## INTRODUCTION

Eosinophil numbers dramatically increase in the blood of patients with various diseases. Circulating eosinophils obtained from hypereosinophilic (HE) patients are very heterogeneous and two populations of eosinophils (designated normodense and hypodense) have been identified on the basis of density gradient sedimentation (1). Hypodense eosinophils can be differentiated from normodense eosinophils by various criteria such as morphological alterations and membrane receptor increase (2-5). Effector functions such as the capacity to induce IgE-dependent cytotoxicity (3) or IgE-mediated release of mediators (4), are enhanced in hypodense eosinophils. Understanding of the implication of human eosinophils in diseases associated with increased IgE levels requires structural and functional analyses of the various IgE-binding molecules present on these cells.

Immunoglobulin E is the class of immunoglobulin responsible for human anaphylaxis and allergic reactions, which exerts its biological function through interaction with cell surface proteins. Two main groups of IgE-binding molecules have been described. The first class of molecules, defined as IgE receptors with a membrane anchor domain, is found on most cells involved in the immune response. Mast cells and basophils present high affinity Fc receptors for IgE (FcεRI) (6) while lymphocytes and inflammatory cells present a low affinity Fc receptor for IgE (FcεRII/CD23) (7). Beside these IgE Fc receptors, several molecules present the ability to bind both IgE and selective carbohydrates. These molecules constitute a part of the family of lectins with specific carbohydrate-recognition domain (CRD) (8).

In order to identify the molecules that bind IgE on human eosinophils, a first strategy was based on the described antigenic similarities between eosinophil IgE receptor and the B cell Fc $\epsilon$ RII/CD23 (9, 10). This approach allowed us to demonstrate the variable membrane expression of several epitopes of CD23 on eosinophils from patients. Moreover, CD23 was shown to participate to IgE binding and IgE mediated cytotoxicity of human eosinophils (10). However, the screening of an eosinophil cDNA library with the CD23 probe did not permit the cloning of a cDNA related to CD23 (11), leading to the hypothesis that human eosinophils might express another type of IgE-binding molecule. A family of molecules has particularly drawn our attention: Mac-2, a murine macrophage cell surface protein (12) shown to be highly homologous to the carbohydrate binding protein 35 (CBP35) (13) and to the rat IgE-binding protein ( $\epsilon$ BP) (14). The human counterparts of  $\epsilon$ BP (h $\epsilon$ BP) and Mac-2 (hMac-2) cDNA have been recently cloned (15, 16). The comparison between hMac-2 and h $\epsilon$ BP sequences reveals that hMac-2 is identical to h $\epsilon$ BP except for one nucleotide in the coding region and one nucleotide upstream of the polyA tail (B. Cherayil, personal communication). These molecules belonging to the S-type lectins (thiol-dependent) with a specific b-galactoside recognition domain (17), are detected on the cell surface, in the cytoplasm and in the nucleus. They are expressed by various cell types, specifically after activation (18). The precise functions of these lectins are still unknown; however,  $\epsilon$ BP has been recently proposed as a cell adhesion protein (18).

The purpose of the present study was to investigate whether human eosinophils can express molecules of this lectin family, using binding of antibodies directed against Mac-2 or against h $\epsilon$ BP and Northern blot with the corresponding cDNAs. In addition, we have evaluated the involvement of these molecules in an IgE binding assay and in IgE-dependent eosinophil-mediated cytotoxicity against parasite larvae. Our results suggest that besides Fc $\epsilon$ RII/CD23, lectin-type molecules can participate to the IgE-dependent effector function of eosinophils.

## MATERIALS AND METHODS

Leukocyte separation. Human eosinophils were obtained from venous blood of patients with eosinophilia of various etiologies by centrifugation through metrizamide discontinuous gradients according to previously described techniques (1). Hypodense eosinophils were present in the

lower density layers (layer III) corresponding to 20-22% metrizamide solutions. Intermediate density eosinophils were collected from the 22-23% metrizamide solutions (layer IV) whereas normodense eosinophils were collected from the 23-24% and 24-25 % metrizamide layers (layer V and VI). The layer presenting the highest degree of purity of eosinophils in sufficient amounts was selected for each patient. Blood eosinophils were also directly obtained after dextran sedimentation of leukocytes from patients with eosinophil counts superior to 82%. Human alveolar macrophages were obtained by bronchoalveolar lavage of asthmatic subjects. The degree of purity and the morphologic integrity of cell populations were estimated after staining of cytocentrifuged preparations with Giemsa.

Cell Lines. The Rat Basophilic Leukemia (RBL) cells was kindly donated by Dr. Stadler (Bern, Switzerland). The NK-like cell line (YT) was established from a patient with acute lymphocytic leukemia with thymoma (19) and obtained from Dr. Yodoi (Kyoto, Japan). The promyelocytic HL60 cell line was kindly donated by Dr. Stehelin (Lille, France). The HL60 cell line was induced to differentiate toward the macrophage phenotype by treatment with  $10^{-7}$ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48 hr (16). All cells were maintained in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% Fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 50 mM  $\beta$ 2-mercaptoethanol and antibiotics.

Immunoglobulins and Antibodies. Human myeloma IgE-PS was kindly donated by Dr. H. L. Spiegelberg (San Diego, CA). Rat-mouse hybrid monoclonal antibodies anti-Mac-2 (M3/38) were purchased from Boehringer Mannheim (Germany). The anti-Mac-2 hybridoma supernatant (20) was kindly given by Dr. B. Cherayil (Boston, USA). The rabbit immune serum raised against human recombinant  $\epsilon$ BP has been previously described (18). As controls, purified rat IgG (Miles, Rehovot, Israel) or normal rabbit serum have been used. Control hybridoma supernatants were murine anti-Fc $\alpha$ R My43 (kindly donated by Dr. L. Shen, Hanover, NH) that binds to eosinophils (21) and rat anti-S. mansoni. Fluoresceinated (FITC) anti-human IgE antibodies (Fab'2) and anti-rat IgG2a antibodies (affinity purified goat anti-rat IgG2a,  $\gamma$  chain specific (Fab'2) were purchased from Cappel Laboratories (Cochranville, PA). Labeled antibodies to rat IgG (H+L) and to rabbit IgG (H+L) peroxidase were purchased from Diagnostics Pasteur (France).

Flow cytometry. For the detection of Mac-2,  $10^6$  purified eosinophils were incubated with M3/38 or nonspecific isotype control mAb at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ , in a total volume of 100  $\mu\text{l}$ . After 1 hr at  $4^\circ\text{C}$ , cells were washed and incubated with FITC-conjugated anti-rat IgG2a antibodies (dilution 1/40) for 30 min, then washed and fixed with 1% paraformaldehyde. For IgE binding analysis, aliquots of the same eosinophil preparations were incubated with IgE-PS (50 mg/ml) for 1 hr at  $4^\circ\text{C}$ . After washing, cells were labeled with FITC-labeled anti-IgE antibodies (1/40 final dilution) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . All dilutions and washes were performed in PBS. Cells were analysed with an Orthocytofluorograph 50H (Ortho Diagnostics Systems, Westwood, MA) using a logarithmic fluorescence intensity scale. Results are expressed as percentage of labeled eosinophils over the threshold (10). The background fluorescence obtained with isotype controls has been subtracted.

Northern blot analysis. Total RNA was isolated from cells as described (11), and was subjected to electrophoresis in a formaldehyde/1.2% agarose gel, blotted onto a nylon filter and hybridized overnight at  $42^\circ\text{C}$  in hybridization solution (10% dextran sulfate, 40% deionised formamide, 4 x SSC, 20 mM Tris pH 7.4, 1 x Denhardt's solution, 0.1% SDS and 20  $\mu\text{g/ml}$  DNA sperm hareng) containing  $^{32}\text{P}$  labeled hMac-2 cDNA probe (16). The probe was removed by boiling the blots on a solution of 0.1% SDS. The same filter was then hybridized with two more probes:  $^{32}\text{P}$ -labeled h $\epsilon$ BP cDNA probe (15) and  $\beta$ -actin. Washes were carried out in 1 x SSC, 0.05% SDS at  $55^\circ\text{C}$ .

Preparation of cell extracts. The cells were lysed with a nonionic detergent mixture consisting of 0.5% NP-40 in 1 mM PMSF, 10 mM benzamidine hydrochloride, 50 mM  $\epsilon$ -amino caproic acid and 20 mM iodoacetamide. After 30 min of incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the insoluble material was removed by centrifugation at 20,000 x g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Bradford's method, using the microassay procedure outlined in the Bio-Rad technique, was employed to estimate the protein concentration as previously described (22).



---

**Western blot analysis.** Protein extracts separated on 13% SDS-PAGE, were electrophoretically transferred for 2 hr onto nitrocellulose paper as previously described (23). Protein blots were probed with anti-Mac-2 (dilution 1/40) or anti-εBP (dilution 1/300) antibodies and further detected by the addition of anti-rat or anti-rabbit antibodies conjugated with horseradish peroxidase, respectively. The presence of peroxidase was revealed by incubating the nitrocellulose with substrate solution (60 mg 4-chloro-1-naphtol in 20 ml methanol diluted in 100 ml PBS containing 100 ml hydrogen peroxide at 30%).

**Labeling of leukocytes and Immunoprecipitation.** Twenty mg of cell extracts were iodinated with  $^{125}\text{I}$  (100  $\mu\text{Ci}$  by reaction) by the chloramine T method. Aliquots of  $2 \times 10^6$  cpm were precleared for 2 hr with normal rat serum or with normal rabbit serum and 50  $\mu\text{l}$  of protein A-sepharose or 50  $\mu\text{l}$  of protein G-sepharose (Pharmacia) in TNSTEN (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Triton X100, 5 mM EDTA, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) with 0.1% aprotinine. Immunoprecipitations were carried out by adding 40  $\mu\text{l}$  of anti-Mac-2 hybridoma supernatant or 1  $\mu\text{l}$  of anti-εBP rabbit antiserum followed by 50  $\mu\text{l}$  of protein G-Sepharose or 50  $\mu\text{l}$  of protein A-Sepharose, respectively. After overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the Sepharose beads were washed ten times with TNSTEN, 0.1% aprotinine and then resuspend and boiled for 3 min in 40  $\mu\text{l}$  of 1 x SDS-PAGE sample buffer. Aliquots of released material were analysed by SDS-PAGE.

**Binding of radiolabeled IgE.** Human myeloma IgE-PS protein was radioiodinated by the chloramine T technique as previously described, with a specific activity of  $1 \times 10^6$  cpm/  $1 \mu\text{g}$  (3). Human eosinophils were purified from 6 different patients with eosinophilia. Cells with low density (layer III or IV of the metrizamide gradient) were used. The degree of eosinophil purity ranged between 83 and 93%. They were all Mac-2 positive (from 13 to 20%). Human eosinophils ( $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) were incubated with various concentrations of anti-Mac-2 or control hybridoma supernatants together with  $^{125}\text{I}$ -IgE (1  $\mu\text{g}/\text{tube}$  in a total volume of 60  $\mu\text{l}$ ). The effect of anti-Mac-2 mAb was compared to the inhibitory effects of carbohydrates in competition experiments performed with a final concentration 100 mM of galactose, lactose and glucose. After incubation for 90 min at  $+4^\circ\text{C}$ , the cell suspensions were centrifuged over 20% sucrose and the radioactivity

of the pellets was measured in a gamma scintillation spectrometer. The % inhibition of radiolabeled IgE binding by a 100-fold excess dose of unlabeled IgE was considered as the maximum inhibition. All results obtained with anti-Mac-2 or control antibodies were presented as mean % inhibition  $\pm$  SEM in relation to those obtained with unlabeled IgE. Student's t test was used to compare the values obtained in the presence or absence of anti-Mac-2 antibodies.

Cytotoxicity assay. *Schistosoma mansoni* schistosomula prepared according to the skin penetration procedure were the targets of the IgE-mediated eosinophil dependent cytotoxicity as previously described (3). Briefly, hypodense eosinophils (layer IV) were purified from 6 different HE patients. The degree of purity ranged between 81 and 96%. They were all surface Mac-2 positive (between 12 and 35%). Purified eosinophils were then added to schistosomula in the presence of IgE-rich immune sera from *S. mansoni* infected patients (unheated, final dilution = 1/32) at a ratio of 5,000 effector cells to one target and supplemented with recombinant huGM-CSF at 10-12M to obtain optimal levels of cytotoxicity. For inhibition experiments, various concentration of anti-Mac-2 hybridoma or control anti-Fc $\alpha$ R My43 supernatants and M3/38 or control rat IgG were added directly to the wells of the microplates together with the targets, antibodies and effector cells, without preincubation. Results were given as percent dead larvae (mean % cytotoxicity from 6 duplicate experiments  $\pm$  S.E.M) after 24 h incubation at 37°C.

## RESULTS

### Flow cytometry analysis of Mac-2 and IgE receptors on human eosinophils.

In order to investigate the membrane expression of Mac-2 molecules, eosinophils from different patients were submitted to flow cytometry after incubation with anti-Mac-2 mAb (M3/38) or irrelevant rat IgG antibodies. In parallel, eosinophils of the same patients were incubated with IgE in order to evaluate the percentage of eosinophils that possess IgE-binding capacity. As summarized in Table I, independently of eosinophil origin and density, surface Mac-2 molecules were detected in about half of the patients (group I). All patient eosinophils from this group both expressed Mac-2 molecules (range: 14 - 29%) and bound IgE (range: 18 - 79%). The patients

from the second group (group II) did not express Mac-2 molecules (range: 1 - 5%) on the surface of their eosinophils but bound IgE (range: 14 - 52%).

#### Detection of mRNA encoding Mac-2/εBP.

With the aim to know whether eosinophils can express the hMac-2/εBP mRNA, Northern blot performed with eosinophil RNA from some patients tested by flow cytometry was probed with the hMac-2 cDNA (Fig.1, panel A) and further with the hεBP cDNA (Fig.1, panel B). The two probes revealed the same mRNA band at 1.2 kb in all eosinophil preparations from both groups of patients (group I: patients n° 3, 5, 13, 15 and group II: patients n° 6, 7, 11). As controls, the analysis of RNA from alveolar macrophages (M $\phi$ ) and from several cell lines (HL60, NK-like (YT), and RBL) also revealed the presence of the 1.2 kb mRNA. The  $\beta$ -actin mRNA was used as a monitor of the amount of RNA loaded onto each gel (Fig.1, panel C).

#### Characterization of the molecules expressed on eosinophils by western blotting.

The characterization of molecules was performed by immunoblotting with anti-Mac-2 (Fig.2). Western blot analysis performed with different eosinophil protein extracts revealed, at variable levels, a molecule at the molecular weight of 29 kD in eosinophil extracts from patients n° 5, 13, 6, 7 and 16. An additional molecule at approximately 20 kD was found in the case of patients n° 13, 6 and 7. As control, alveolar macrophage extracts also showed the presence of the 29 kD molecule and, at higher amount, an additional molecule at approximately 27 kD but nothing apparent at 20 kD. The 20 kD molecule seemed specifically present in eosinophil extracts from some patients. The 29 kD molecule was found in eosinophils from patients of both group I (surface Mac-2+, IgE+) and group II (surface Mac-2-, IgE+).

Protein blots of some patients were comparatively tested with anti-Mac-2 and anti-εBP antibodies and the results of 4 representative patients (at least one in each group) were shown in Fig.3. The two immunoprobings (Mac-2, lane b and εBP, lane c) revealed the same protein pattern concerning the 29 kD molecule in eosinophils. Similar results were observed for alveolar macrophages and for RBL. The 20 kD molecule present in eosinophils was also detected by anti-εBP antibodies (patients n°13, 6 and 7, lane c).

**Immunoprecipitation analysis.**

Immunoprecipitation by anti-Mac-2 mAb was performed with at least 3 donors in both groups of patients mentioned in Table I, and all presented the same protein pattern. Only results of one patient from each group (patient n° 3, group I; n° 16, unclassified; n° 8, group II) and control alveolar macrophage extracts were shown in Fig.4. Autoradiography of SDS-PAGE confirmed the presence of the 29 kD molecule in eosinophils from both patients and in macrophages. Surprisingly, an additional molecule at 15 kD, absent in western blotting, was detected, but only in eosinophils (Fig.4, lane a). The 16 kD and 45 kD bands present in patient n°16 (lane a) seemed non specific, since there were also detected with control serum (lane b).

**Involvement of Mac-2/εBP in IgE-binding to eosinophils.**

Mac-2/εBP molecules have been shown to bind several IgE glycoforms (15). In order to investigate whether Mac-2/εBP expressed on eosinophils could be involved in IgE binding, experiments of inhibition of radiolabeled IgE binding were performed. As shown in Figure 5, anti-Mac-2 mAb significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the binding of <sup>125</sup>I-IgE to human eosinophils. A similar level of inhibition was observed with unlabeled IgE and with the highest concentration of anti-Mac-2 supernatant. In contrast, no significant inhibition was detected with the control mAb used at the same concentrations (Fig.5). Since Mac-2 has been described as a b-galactoside-binding lectin, detected by SDS-PAGE using either SDS or lactose elution but not in glucose-eluted samples, competition experiments with carbohydrates have been performed. Only galactose and lactose, at 100 mM, induced the same level of inhibition (100%) as unlabeled IgE or anti-Mac-2 mAb, whereas glucose, used as negative control, inhibited at lower level the binding of <sup>125</sup>I-IgE to eosinophils (not shown).

**Role of Mac-2 /εBP molecules in IgE-dependent eosinophil mediated cytotoxicity.**

In order to evaluate whether the molecules recognized by anti-Mac-2 mAb could be involved in the IgE-dependent effector function of eosinophils, the effect of anti-Mac-2 mAb was investigated in a cytotoxicity assay involving eosinophils and polyclonal IgE antibodies from patients. Hypodense eosinophils were incubated together with IgE containing immune serum and various concentrations of purified anti-Mac-2 mAb or anti-Mac-2 hybridoma supernatant in the presence of

---

schistosomula targets. Results illustrated in Fig.6 clearly showed a highly significant and dose-dependent inhibition of eosinophil mediated cytotoxicity in the presence of anti-Mac-2 mAb, by comparison to control supernatant, rat IgG or to medium. It has to be pointed out that the control supernatant was My43, a mAb which binds to eosinophils (21). Not only schistosomula killing but also adherence of eosinophils to their targets was strongly inhibited by anti-Mac-2 mAb (data not shown).

## DISCUSSION

IgE receptors on human eosinophils have been demonstrated by a variety of experimental approaches (22). The presence of different epitopes of CD23, the low affinity FcεRII, on eosinophils from patients has been recently reviewed (10). However, the low level of membrane and mRNA expression of CD23 led us to suggest the existence of other types of IgE binding proteins. In the present paper, we describe the capacity of eosinophils to express molecules belonging to the S-type lectin family, namely Mac-2/εBP. Mac-2 was defined as a cytosolic lectin with ability to bind to carbohydrates on the cell surface and on extracellular molecules (12, 16). The expression of Mac-2 molecules on eosinophil surface was first analysed by flow cytometry, and compared to the presence of IgE-binding sites. Two groups of patients have been defined based upon the expression of Mac-2 versus IgE-binding. Patients of group I were positive for both markers, while patients of group II were Mac-2- and IgE-binding+. These findings suggested that other IgE-binding molecules than Mac-2 were expressed by eosinophils. Among them, CD23 might probably be involved, as recently demonstrated (10).

The expression of S-type lectins appears to be linked to cell differentiation or maturation. The hMac-2 mRNA was found in various cell lines, particularly in HL60 differentiated toward the macrophage phenotype (16), and has been shown to increase during macrophage maturation (24). Similarly to hMac-2, the hεBP mRNA was detected in a variety of tissues and different cell lines (15). The hεBP was only found in one of the few human lymphoma cell lines tested (15) and its surface expression widely varies among different mast cell lines (18). In the present work, only eosinophils from HE patients have been analysed. No apparent difference in mRNA and FACS analysis was detected between hypodense eosinophils (Table I, layer III), previously defined as

"activated" eosinophils, and normodense eosinophils (Table I, layers V and VI). Eosinophils from normal subjects are difficult to obtain in sufficient amounts but it would be nevertheless interesting to compare eosinophils from HE patients and from normal subjects. The expression of surface Mac-2 and of the corresponding mRNA by eosinophils differentiated *in vitro* from immature cord blood cells, when CD23 was still undetectable, suggested an early expression of Mac-2 during eosinophil differentiation (manuscript in preparation).

Both anti- $\epsilon$ BP and anti-Mac-2 antibodies detect a Mr 28-35 kD protein, in macrophages and HeLa cells respectively (15, 16). Eosinophils from patients belonging to group I as well as to group II expressed a 29 kD molecule detected both with anti-Mac-2 and with anti- $\epsilon$ BP antibodies. That these two antibodies recognize the same molecule on eosinophils was confirmed by immunoprecipitation with anti- $\epsilon$ BP antisera on cell extracts previously treated with anti-Mac-2 mAb (data not shown). We demonstrate that anti-Mac-2 mAb recognizes two other proteins than the 29 kD Mac-2 on eosinophils: one at 20 kD and another one at 15 kD, the latter predominantly detected in patient 3 by immunoprecipitation. Since anti-Mac-2 mAb can immunoprecipitate molecules of different Mr, experiments of surface iodination are now in progress to identify which one was expressed on the eosinophil surface. These 20 and 15 kD molecules could correspond to degradation products of the 29 kD protein with carbohydrate-binding domain preserved. However, interestingly, various molecules at 14-15 kD located in eosinophils have been shown to exhibit homology with the COOH-terminal domain of IgE-binding proteins, such as the CLC protein (25). In consequent, CLC proteins could possess similar carbohydrate- and IgE-binding properties. The 15 kD molecule might also correspond to another member of the b-galactoside lectin family, previously found around Mr 14-16 kD (26). Based upon these findings, all cited proteins should present IgE-binding capacity via saccharide portions. In addition, it is possible that other glycoproteins belonging the S-type lectin family (not only Mac-2) could be implicated in the interactions with IgE. Further experiments are required to identify the smaller Mr molecules and other b-galactoside-binding lectins on eosinophils.

The absence of Mac-2 on the surface of eosinophils from group II patients (Mac-2-, IgE-R+), which are positive in Northern blot, can be explained by the fact that Mac-2/ $\epsilon$ BP proteins are predominantly found as cytosolic molecules (15, 16). Nevertheless, the requirement of high amount of Mac-2 protein in cell extracts and the low sensitivity of the Western blot technique

---

might explain the discordant results observed with immunoprecipitation technique employing the same cell extract, particularly concerning the patient from group I (cell surface Mac-2 by FCM, presence of mRNA by Northern blot, absence of protein by Western blot but positive by immunoprecipitation). The detection of a 29 kD molecule by Western blot on eosinophil extracts from group II patients (surface Mac-2-) is in agreement with the presence of a cytosolic form. Also interesting is the finding that all eosinophil patients expressing variable surface Mac-2/εBP protein levels, possessed a relatively comparable Mac-2/εBP mRNA content. Similar observations of variable cell surface εBP levels, with comparable total εBP, have been recently reported for several mast cell lines (18). Our results suggest that expression of Mac-2/εBP on cell surface can be differentially regulated according to the patients. The mechanism of surface expression has still to be established. The role of various cytokines, known to influence eosinophil differentiation and survival, as well as expression of membrane markers should be highlighted.

Among inflammatory cells involved in the allergic reaction, eosinophils and macrophages play an important role. Eosinophils have been described to present phagocytic properties facilitating ingestion of IgG or IgE immune complexes (27). Lectin-mediated phagocytosis has been shown for activated macrophages in relation with secreted Mac-2 molecules (12). Recently, Mac-2 was defined as the major non-integrin laminin binding protein (28) and can form functional dimers (29). It has also been suggested that Mac-2 protein present in macrophages play an important role in acute and chronic inflammation. A main IgE-dependent effector function of eosinophils is the release of cytotoxic mediators, in the presence of IgE antibodies, involving at least partly FcεRII/CD23 epitopes (9, 10). FcεRII plays an important role in the regulation of IgE antibody response and presents significant sequence homology with a class of animal lectins (30). However, in the case of C-type (calcium dependent binding) lectins, IgE binding to FcεRII is pH-dependent but independent of the carbohydrate structure of IgE (31, 32). In contrast to FcεRII/CD23, which binds to the protein moiety of IgE (31), Mac-2 and hεBP bind to IgE in a carbohydrate-dependent manner and show heterogeneity in the binding of various IgE glycoforms (15, 33). The present paper demonstrates the participation of Mac-2/εBP in IgE binding via specific saccharides (galactose and lactose) and IgE-dependent cytotoxicity mediated by human eosinophils. The participation of the two groups of IgE binding molecules (CD23 and Mac-2/εBP) in the cytotoxic function of eosinophils suggests an important role in the recognition of IgE

proteins by CRD domains of C- and S-type lectins. In addition to the role of Mac-2/εBP in IgE binding to eosinophils, the inhibition by anti-Mac-2 mAb of eosinophil adhesion to parasite targets also suggests the function of such molecules as cell adhesion proteins, and should be explored in other adhesive properties of eosinophils.

In conclusion, our results indicate that not only transmembrane receptors such as FcεRII/CD23 but also soluble molecules expressed on the surface of eosinophils might participate to the IgE-dependent effector function. The functional relationships between these two families of molecules, both exhibiting a lectin domain and expressed on a variety of cell populations, have still to be explored.

## REFERENCES

1. Prin, L., M. Capron, A. B. Tonnel, O. Bletry, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils. I. Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72:336.
2. Prin, L., J. Charon, M. Capron, P. Gosset, H. Taelman, A. B. Tonnel, and A. Capron. 1984. Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. Exp. Immunol.* 57:735.
3. Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A. E. Butterworth, R. J. Pierce, M. A. Ouaiissi, and A. Capron. 1984. Role of the IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.
4. Khalife, J., M. Capron, J. Y. Cesbron, P. C. Tai, H. Taelman, L. Prin, and A. Capron. 1986. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* 137:1659.
5. Prin, L., M. Capron, P. Gosset, B. Wallaert, J. P. Kusnierz, O. Bletry, A. B. Tonnel, and A. Capron. 1986. Eosinophilic lung disease: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 63:249.
6. Metzger, H., G. Alcaraz, R. Holman, J. P. Kinet, V. Pribluda, and R. Quarto. 1986. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Ann. Rev. Immunol.* 4:419.



7. Capron, A. J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, J. C. Ameisen, and A. B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy: the second receptor for IgE (FcεR2). *Immunol. Today* 7:15.
8. Drickamer K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263:9557.
9. Grangette, C., V. Gruart, M. A. Ouaissi, F. Rizvi, G. Delespesse, A. Capron, and M. Capron. 1989. IgE receptor on human eosinophils (FcεRII): comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J. Immunol.* 143:3580.
10. Capron M., M. J. Truong, D. Aldebert, V. Gruart, H. Suemura, G. Delespesse, B. Tourvieille, and A. Capron. 1991. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur. J. Immunol.* 21:2423.
11. Truong, M. J., V. Gruart, A. Capron, M. Capron, and B. Tourvieille. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding a non-classical MHC class I antigen (HLA-E) in eosinophils from hypereosinophilic patients. *J. Immunol.* 148:627.
12. Cherayil, B. J., S. J. Weiner, and S. Pillai. 1989. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J. Exp. Med.* 170:1959.
13. Jia, S., and J. L. Wang. 1988. Carbohydrate binding protein 35. Complementary DNA sequence reveals homology with proteins of the heterogeneous nuclear RNP. *J. Biol. Chem.* 263:6009.
14. Albrandt, K., N. K. Orida, and F. T. Liu. 1987. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:6859.
15. Robertson, M. W., K. Albrandt, D. Keller, and F. T. Liu. 1990. Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochem.* 29:8093.
16. Cherayil, B. J., S. Chaitivitz, C. Wong, and S. Pillai. 1990. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7324.
17. Paroutaud, P., G. Levi, V. I. Teichberg, and A. D. Strosberg. 1987. Extensive amino-acid sequence homologies between animal lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:6345.
18. Frigeri, L. G., and F-T Liu. 1992. Surface expression of functional IgE-binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J. Immunol.* 148:861.

19. Yodoi, J., K. Teshigawara, T. Nikaido, K. Fukui, T. Noma, T. Honjo, M. Takigawa, M. Sasaki, N. Minato, M. Tsudo, T. Uchiyama, and M. Maeda. 1985. TCGF(IL2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL2-receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* 134:1623.
20. Ho, M-K, and T. A. Springer. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 128:1221.
21. Capron, M., M. J. Truong, P. Desreumaux, B. Lamkhioued, M. Tomassini, and A. Capron. 1992. Eosinophil membrane receptors: function of IgE and IgA binding molecules. In *Eosinophils: Immunological and clinical aspects*, G. J. Gleich, A. B. Kay, eds; M. Dekker. Inc. NY (in press).
22. Gruart V., J. M. Balloul, L. Prin, M. Tomassini, S. Loiseau, A. Capron, and M. Capron. 1989. Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. *J. Immunol.* 142:4416.
23. Capron, M., C. Grangette, G. Torpier, and A. Capron. 1989. The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem. Immunol.* 47:128.
24. Leenen, P. J. M., A. M. A. C. Jansen, and W. van Ewijk. 1986. Murine macrophage cell lines can be ordered in a linear differentiation sequence. *Differentiation* 32:157.
25. Ackerman, S. J., H. F. Rosenberg, S. E. Corrette, D. G. Tenen. 1990. Molecular cloning of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal (CLC) protein: similarities to IgE-binding proteins and the 14 kD S-type animal lectin superfamily. *Faseb J.* 4:A1699 (Abstr.).
26. Levi, G., and V. I. Teichberg. 1981. Isolation and physicochemical characterization of Electrolectin, a β-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus Electricus*. *J. Biol. Chem.* 256:5735.
27. Fujita, Y., E. Rubinstein, D. B. Reisman, and C. E. Arbesman. 1975. Antigen-antibody complexes in or on eosinophils in nasal secretions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 48:577.
28. Woo, H-J., L. M. Shaw, J. M. Messier, and A. M. Mercurio. 1990. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J. Biol. Chem.* 265:7097.

29. Woo, H-J., M. M. Lotz, J. U. Jung, and A. M. Mercurio. 1991. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *J. Biol. Chem.* 266:18419.
30. Ikuta, K., M. Takami, C. W. Kim, T. Honjo, T. Miyoshi, Y. Tagaya, T. Kawabe, and J. Yodoi. 1987. Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:819.
31. Vercelli, D., B. Helm, P. Marsh, E. Padlan, R. S. Geha, and H. Gould. 1989. The B cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 338:649.
32. Richards, M. L., and D. H. Katz. 1990. The binding of IgE to murine FcεRII is calcium-dependent but not inhibited by carbohydrate. *J. Immunol.* 144:2638.
33. Robertson, M. W., and F-T Liu. 1991. Heterogeneous IgE glycoforms characterized by differential recognition of an endogenous lectin (IgE-binding protein). *J. Immunol.* 147:3024.

**Table I.**  
Flow cytometry analysis of the expression of  
Mac-2 and IgE-binding molecules by human eosinophils.

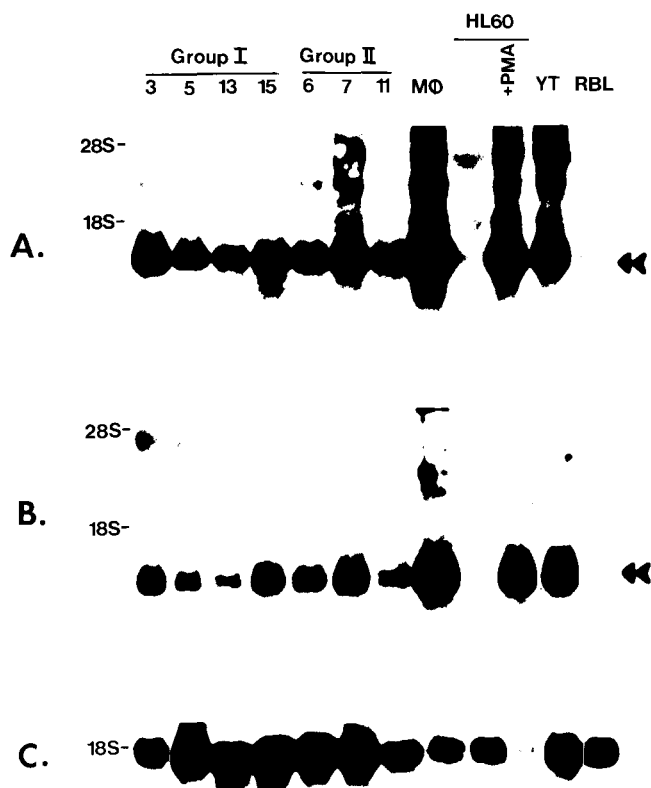
Eosinophil Donor	Cell purification *				FCM analysis (% stained cells)		
	Layer	% cell types				Mac-2 †	IgE-Binding ‡
		Eo	Neutro	Ly	Mono		
<b>Group I:</b>							
1	D	82	17	1	0	18	23
3	D	89	9	1	1	20	79
5	D	92	7	1	0	25	18
9	IV	93	6	1	0	20	23
10	V	99	0	1	0	20	18
13	III	94	3	2	0	20	41
15	III	84	15	1	0	14	23
17	IV	86	14	0	0	16	45
18	IV	99	1	0	0	20	22
20	V	92	6	2	0	15	25
23	IV	95	4	1	0	29	43
<b>Group II:</b>							
6	D	84	13	3	0	1	52
7	III	88	9	3	0	3	20
8	IV	94	2	4	0	1	47
11	III	81	10	8	1	2	50
12	IV	88	11	1	0	5	14
14	IV	86	11	3	0	1	39
19	IV	95	5	0	0	5	33
21	V	98	1	1	0	5	40
22	IV	89	11	0	0	5	16
24	IV	96	3	1	0	3	27
<b>Unclassified:</b>							
16	D	93	0	7	0	N.D	46

\* Eosinophils were obtained either after dextran sedimentation (D) or after centrifugation upon metriza-mide gradients. Differential counts of cells were based on 200 cells. Abbreviations: Eo, eosinophil; Neutro, neutrophil; Ly, lymphocyte; Mono, monocyte.

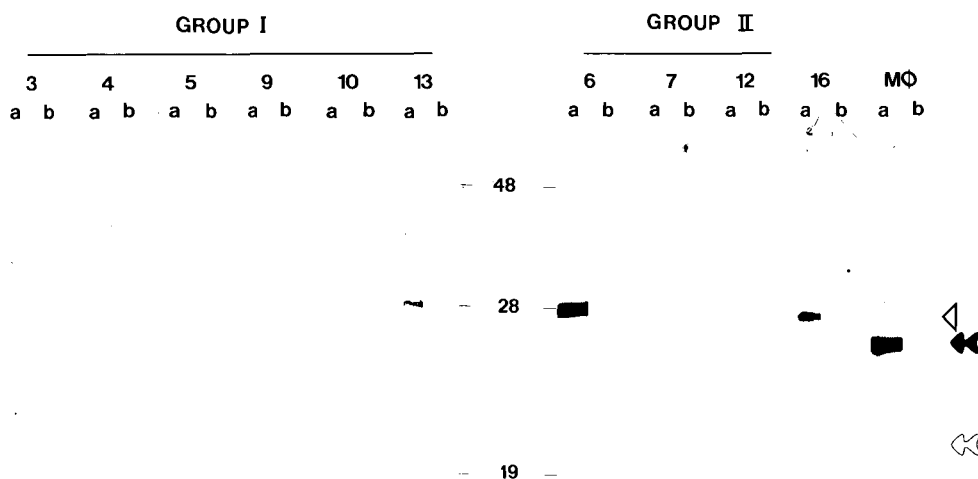
† Eosinophils were incubated with anti-Mac-2 (M3/38) mAb or non specific rat IgG at 10 µg/ml, then stained with FITC-labeled anti-rat antibodies. The % of stained cells was obtained after subtraction of the non specific binding with the isotype matched control antibody.

‡ The % of eosinophils binding to IgE (IgE-Binding) was evaluated after incubation of eosinophils with human IgE-PS at 50 µg/ml and staining with FITC-labeled anti-IgE antibodies.

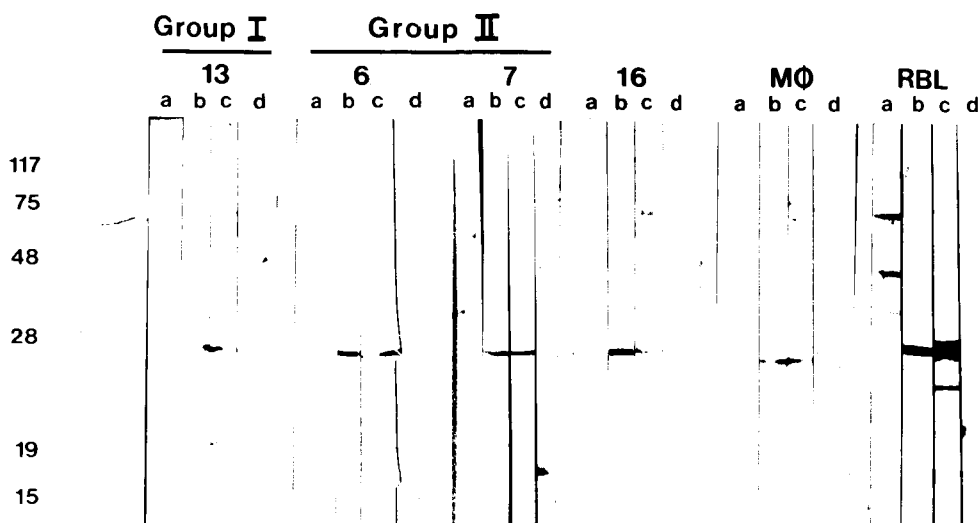
**Figure 1.** Northern blot analysis of RNA prepared from eosinophils and various cell lines. Patient numbers of the two groups (group I: Mac-2+ n° 3, 5, 13, 15 and group II: Mac-2- n° 6, 7, 11) were reported on top of the blot. HL60 were induced or not toward the macrophage phenotype (+PMA). The blots were subsequently hybridized with hMac-2 (panel A), hεBP (panel B) and β-actin (panel C) probes. Arrows indicates the 1.2 kb mRNA.



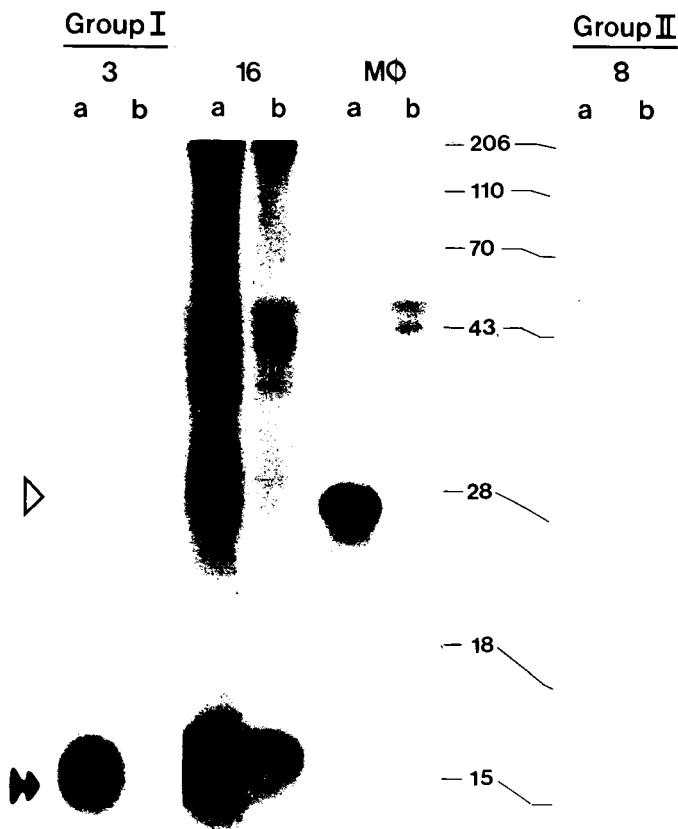
**Figure 2.** Western blot analysis of Mac-2 molecules revealed by anti-Mac-2 hybridoma supernatant (lane a) as first antibody and visualized by a peroxidase-labeled second antibody. In control, protein blots were incubated with normal rat serum (lane b). Cells extracts from patients group I and II have been compared. The Mr is indicated in kD. The open arrowhead indicates the 29 kD Mac-2 protein, the open arrow indicates the 20 kD protein, whereas the filled arrow localizes the 27 kD protein expressed by macrophages.



**Figure 3.** Western blot analysis of Mac-2 and εBP molecules detected by anti-Mac-2 hybridoma supernatant (lane b) and by anti-εBP antisera (lane c). In controls, protein blots were incubated with normal rat serum (lane a) and normal rabbit serum (lane d). Patient numbers of each group were indicated in the top of the figure. The Mr is indicated in kD.

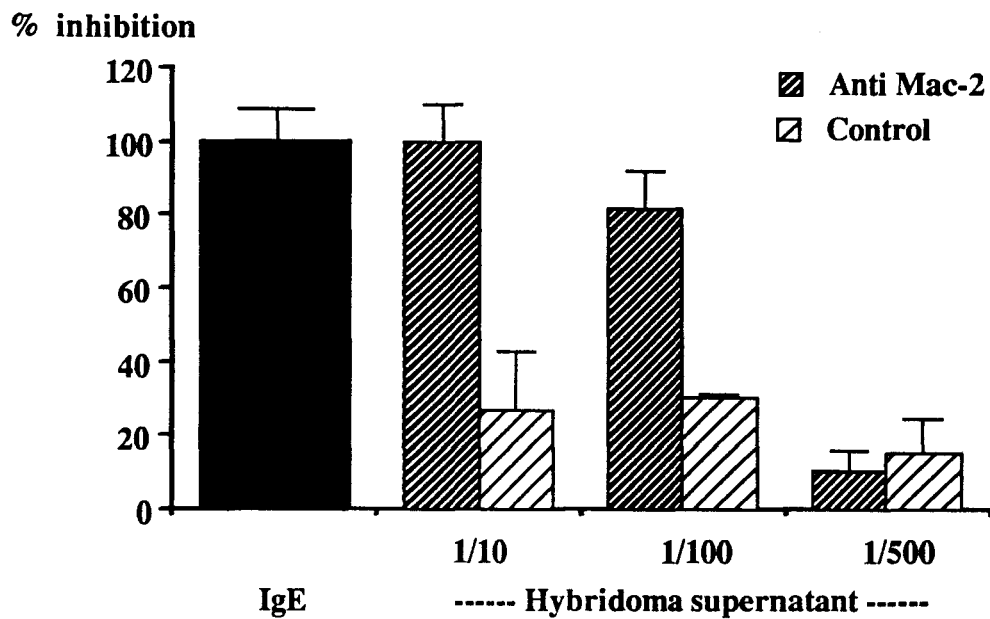


**Figure 4.** Immunoprecipitation of <sup>125</sup>Iodine-labeled lysates of eosinophils from 3 patients (n° 3, group I; n° 8, group II; and n° 16, unclassified) and of alveolar macrophages (Mφ) as control. Results obtained with anti-Mac-2 hybridoma supernatant were shown in lane a and with normal rat serum control in lane b. The Mr is indicated in kD. The arrowhead indicates the 29 kD molecule and the filled arrow indicates the 15 kD molecule.

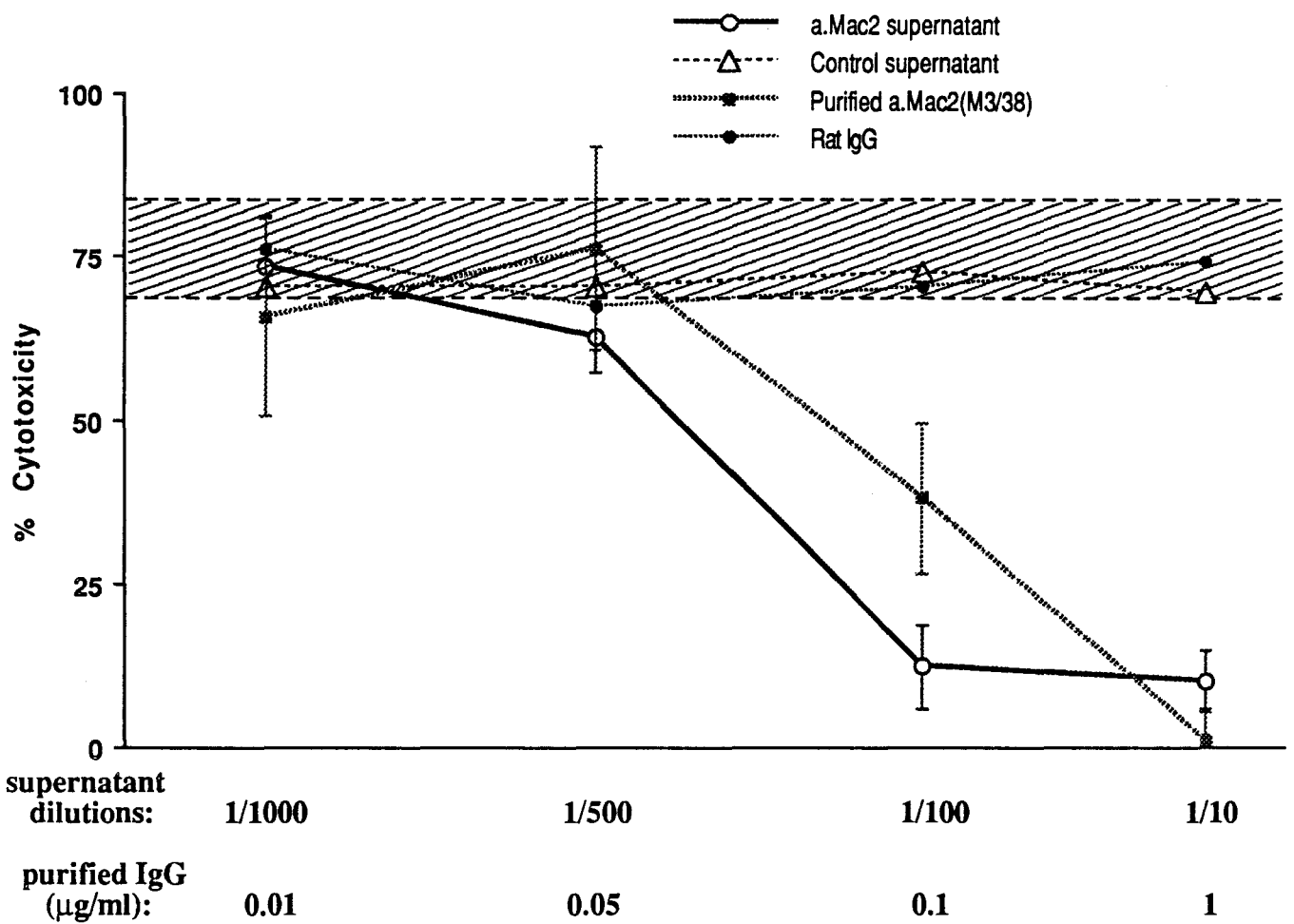




**Figure 5.** Inhibition of radiolabeled IgE-binding to eosinophils by unlabeled IgE (1 mg/ml final concentration) or by various dilutions (1/10 to 1/500) of anti-Mac-2 and control hybridoma supernatants. Purified eosinophils were incubated with 10  $\mu\text{g/ml}$   $^{125}\text{I}$ -IgE together with the antibodies, for 90 min at +4°C (competition protocol). The final concentration of 1 mg/ml of unlabeled IgE correspond to a 100-fold molar excess dose. The % inhibition of binding was calculated by comparison to cells incubated with unlabeled IgE (mean of 6 experiments  $\pm$  SEM).



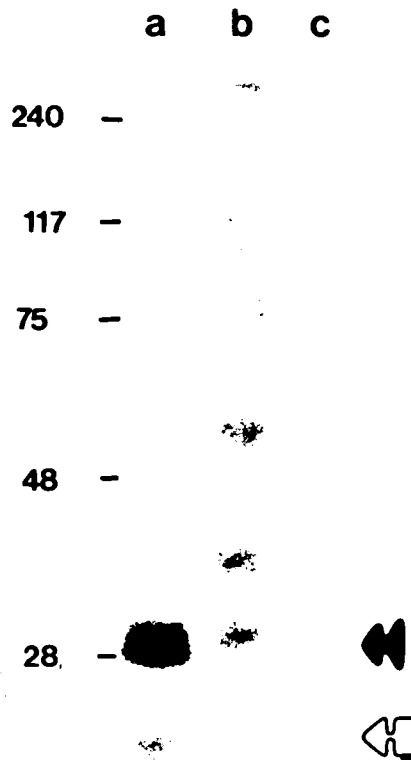
**Figure 6.** Inhibitory effect of anti-Mac-2 mAb on eosinophil-dependent cytotoxicity. The various antibodies (anti-Mac-2  $\circ$  and control My43 hybridoma supernatant  $\triangle$  or purified fraction Mab 3/38  $\blacksquare$  and control rat IgG  $\bullet$  ) were incubated directly at different concentrations to purified eosinophils, IgE-containing immune serum and *S. mansoni* schistosomula targets. The percentage of dead larvae was estimated after 24 h at 37°C microscopically and compared to positive control wells in the presence of medium (mean of 6 experiments  $\pm$  SEM).



## Résultats complémentaires.

1/ Dans le but de démontrer que les anticorps dirigés soit contre l'IgEBP, soit contre Mac-2, reconnaissent les mêmes molécules dans les éosinophiles, des immunoprécipitations ont été réalisées avec les anticorps anti- $\epsilon$ BP sur des extraits cellulaires préalablement traités par les anticorps anti-Mac-2. La figure 7 illustre une expérience représentative réalisée avec des extraits protéiques d'éosinophiles n°13. Les molécules de 29 et 20 kDa sont immunoprécipitées par les anticorps anti- $\epsilon$ BP (ligne a) mais ne le sont pas lorsque les extraits sont préalablement immunoprécipités avec les anticorps anti-Mac-2 (ligne c). Les résultats obtenus avec le sérum de lapin sain sont représentés à la ligne b.

Figure 7. Immunoprécipitations des lysats d'éosinophiles marqués à l'I<sup>125</sup> réalisées avec les anticorps anti- $\epsilon$ BP (ligne a), avec le sérum de lapin sain (ligne b). Immunoprécipitations par les anti- $\epsilon$ BP sur des extraits préalablement traités avec les anticorps anti-Mac-2 (ligne c). Les masses moléculaires sont indiquées en kDa.  $\leftarrow$ - 29 kDa;  $\leftarrow$ - 20 kDa.



2/ Sachant que les lectines de type S, telle l'IgEBP, ont été définies comme étant des lectines spécifiques pour le β-galactoside, il est intéressant de vérifier que les molécules Mac-2/εBP détectées sur les éosinophiles sont également spécifiques pour ces carbohydrates. Des expériences de compétition ont été réalisées avec 100 mM de carbohydrates. Seuls le galactose et le lactose inhibent de manière comparable à l'IgE froide, la fixation de l'IgE radiomarquée sur les éosinophiles.

**Tableau II.** Inhibition de la fixation de l'IgE sur les éosinophiles. Les différents Ig ou carbohydrates sont ajoutés aux cellules en même temps que l'IgE radiomarquée pendant 90 min à +4°C. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport aux cellules en présence de milieu seul (moyenne ± déviation standard).

Inhibiteur	Concentration Finale	% d'inhibition
IgE non marquée	1 mg/ml	57,9 ± 8,7
Carbohydrates:		
Galactose	100 mM	58,4 ± 13,4
Lactose	100 mM	64,2 ± 16,0
Glucose	100 mM	35,5 ± 3,2

---

## Discussion

La faible expression des épitopes CD23 par les éosinophiles par rapport à la fixation de l'IgE à la surface, suggère qu'il existe d'autres types de molécules capables de lier l'IgE sur les éosinophiles humains. Grâce aux sondes immunologiques (Ac monoclonaux) et aux sondes moléculaires (ADNc codant pour une nouvelle famille de molécules de nature lectinique capables de fixer l'IgE), notre étude a été poursuivie par l'identification biochimique et moléculaire des protéines liant l'IgE à la surface des polynucléaires éosinophiles.

Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que les éosinophiles normodenses, de la même manière que les éosinophiles hypodenses de patients HE, expriment le messenger Mac-2/εBP et que celui-ci est traduit de manière efficace en donnant une molécule fonctionnelle, susceptible de se retrouver à la surface cellulaire (groupe I). Sur d'autres populations d'éosinophiles (groupe II), il n'a pas été possible de détecter des molécules Mac-2/εBP à la surface cellulaire bien que les cellules soient encore capables de fixer l'IgE. Le caractère cytosolique des lectines peut expliquer l'absence de molécule Mac-2 à la surface de certaines populations d'éosinophiles et le fait qu'elles soient extériorisées à la membrane cellulaire implique un phénomène de relargage et une fixation sur les glycoprotéines ou glycolipides membranaires (Cherayil *et al.*, 1989, 1990). De plus, puisque les éosinophiles présentent des sites de fixation de l'IgE sans que cela ne soit dû aux molécules Mac-2, il est tout à fait possible qu'il existe d'autres molécules susceptibles de lier l'IgE sur les éosinophiles humains. Il pourrait s'agir soit des récepteurs pour l'IgE (FcεRII/CD23), dont la présence a déjà été démontrée sur les éosinophiles; soit d'autres molécules de type lectine, soit encore du récepteur FcεRI dont la présence n'a pas été analysée au cours de ce travail.

L'utilisation de deux sources différentes d'anticorps anti-S-lectine (Ac anti-Mac-2 et Ac anti-εBP) a permis de démontrer dans un premier temps, que ces deux types d'anticorps sont dirigés contre les mêmes protéines de l'éosinophile (Figure 7). Le prétraitement des extraits protéiques d'éosinophiles par les anticorps anti-Mac-2, inhibe la reconnaissance des molécules de 29 et 20 kDa par les anticorps anti-εBP.

Bien que la détection des molécules Mac-2 à la surface des éosinophiles du groupe II n'ait pas été possible, cette catégorie d'éosinophile (Mac-2-, IgE+) présentent la molécule de 29 kDa correspondant à Mac-2/εBP et deux autres molécules de plus petite taille d'environ 20 et 15 kDa. Ces dernières peuvent correspondre à des produits de dégradation de la molécule de 29 kDa tout en ayant conservé leur capacité de fixation de l'IgE. Ces molécules peuvent également appartenir à la famille des S-lectines, et plus particulièrement aux lectines de 14-16 kDa. Ces lectines présentent de fortes homologues avec les lectines de 29 kDa d'où sont issus Mac-2 et εBP. Il a été récemment démontré qu'une protéine à fonction enzymatique des éosinophiles, la CLC (Charcot Leyden Cristal) fait partie de cette famille de lectines de par son homologie en séquence nucléotidique avec l'IgEεBP, Mac-2 et CBP 35 (25-30% d'homologie au niveau du domaine COOH-terminal) (Ackerman *et al.*, 1993). De plus, la CLC possède de nombreuses caractéristiques physicochimiques et biologiques des lectines de type S, incluant la formation de dimères (Ackerman *et al.*, 1980) et l'état libre des résidus cystéines (thiols) (Weller *et al.*, 1984). La similitude entre la CLC et Mac-2/εBP peut s'étendre également sur les capacités de fixation des carbohydrates et de l'IgE. Plusieurs arguments laissent à penser qu'il s'agit là d'un bon candidat pour la molécule de 15 kDa détectée dans les extraits d'éosinophiles par les anticorps anti-Mac-2: (1) la CLC peut se localiser au niveau de la partie interne de la membrane et dans le sérum (Dvorak *et al.*, 1990, 1991), et (2) elle n'est détectée que dans les éosinophiles et non pas dans les extraits de macrophages.

L'implication des composants glucidiques dans les interactions Mac-2/εBP et l'IgE a été démontrée par des tests d'inhibition de la fixation de l'IgE sur les cellules par différents carbohydrates (Tableau II). Le fait que seuls le galactose et le lactose inhibent la fixation de l'IgE radiomarquée, de manière comparable à l'IgE froide, prouve que les molécules présentes sur les éosinophiles et impliquées dans la fixation de l'IgE corrélaient bien avec les molécules de type Mac-2/εBP. Il est à noter que le glucose inhibe également la fixation de l'IgE (environ 50% d'inhibition). Tout laisse à penser que ces molécules ne sont pas uniquement spécifiques pour les galactosides ou qu'ils existent d'autres molécules à spécificité variée pour les carbohydrates sur les éosinophiles. Il pourrait s'agir des lectines de type C, dont l'affinité pour les sucres n'est pas

---

déterminée de manière spécifique. En particulier, le récepteur pour le mannose ou MBP est localisé dans de nombreuses cellules telles les macrophages alvéolaires et les fibroblastes.

Parmi les cellules inflammatoires, les éosinophiles et les macrophages jouent un rôle important dans les réactions allergiques et parasitaires. Le rôle des éosinophiles dans les processus de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'IgE, implique directement les molécules fixant l'IgE à la surface des cellules. La participation des molécules de type membranaire telle le FcεRII/CD23 dans les fonctions d'ADCC a été décrite vis à vis de larves de *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1989a). Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que les molécules Mac-2/εBP étaient également impliquées dans les mécanismes d'ADCC. L'anticorps anti-Mac-2 inhibe de manière dose-dépendante la cytotoxicité induite par le sérum de patient parasité en présence d'éosinophiles humains. Dans la même voie, il a été démontré que les molécules Mac-2 jouent un rôle dans les phénomènes de phagocytose de *L. major* par les macrophages (Handman *et al.*, 1985; McConville *et al.*, 1987). De même que pour le MBP, un tel rôle dans la phagocytose a été décrit vis à vis d'agents pathogènes tels le virus HIV (Ezekowitz *et al.*, 1988) et les bactéries (Kuhlman *et al.*, 1989). Comme le processus d'ADCC met en jeu des interactions entre la cellule effectrice et le parasite, les molécules Mac-2/εBP à la surface des éosinophiles peuvent être impliquées dans ces interactions de la même manière que les lectines Mac-2 des macrophages qui sont impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-membrane basale (Woo *et al.*, 1990).

Ainsi, ces lectines Mac-2/εBP présentent des molécules très importantes dans les réactions inflammatoires mais également dans les processus de cytotoxicité contre les parasites, qu'elles agissent de manière directe ou associées à d'autres types de protéines tel le FcεRII/CD23.

## **RESULTATS IV.**

### **Les neutrophiles de patients HE ou de sujets sains expriment les molécules appartenant à la famille des S-lectines (Mac-2/εBP). Rôle dans l'activation IgE-dépendante.**

Les études fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles ont été essentiellement restreintes à leur capacité de phagocytose et aucune implication directe des neutrophiles dans les maladies allergiques n'a été décrit jusqu'à présent bien que ces cellules soient également présentes au niveau du site inflammatoire lors de la phase tardive des réactions d'hypersensibilité.

L'objectif de cette étude a été de savoir (1) si les neutrophiles pouvaient exprimer à leur surface des molécules lectiniques de type S capables de lier l'IgE puisque celles-ci ont une distribution cellulaire très large; et (2) si les neutrophiles, de la même manière que les éosinophiles et les basophiles / mastocytes, peuvent subir une activation soit par des IgE, soit par des anticorps IgE présents chez les patients bilharziens, laissant ainsi suspecter une fonction potentielle (et inattendue) des neutrophiles dans les mécanismes d'hypersensibilité à IgE.



**Brief Definitive Report****Human Neutrophils Express Immunoglobulin E (IgE)-binding Proteins (Mac-2/εBP) of the S-Type Lectin Family: Role in IgE-dependent Activation**

By Marie-José Truong, Valérie Gruart, Jean-Pierre Kusnierz, Jean-Paul Papin, Sylvie Loiseau, André Capron, and Monique Capron

*From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (CIBP), Unité Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U167-Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 624, Institut Pasteur, 59019 Lille, France*

**Summary**

It has been suggested that neutrophils may be involved in the late-phase reaction of immunoglobulin E (IgE)-dependent hypersensitivity states. However, the identity of neutrophil-associated molecules inducing the release of mediators remains unclear. In this report, we demonstrate that human neutrophils from normal donors or from patients with inflammatory disorders could bind myeloma IgE proteins, especially after desialylation. Northern blot, immunoprecipitation, and flow cytometry analyses revealed that neutrophils did not express FcεRII/CD23, but rather Mac-2/ε binding protein (BP), belonging to the S-type lectin family. Similarly to IgA used as positive control, myeloma IgE proteins, as well as polyclonal IgE antibodies with or without antibody specificity, were both capable of inducing a neutrophil respiratory burst. Anti-Mac-2 but not anti-CD23 mAb strongly decreased the IgE-dependent activation of neutrophils, induced either by the specific antigen or by anti-IgE antibodies. These findings open new perspectives on the functional role of neutrophils in IgE-associated diseases including allergic states or parasitic infections.

Inflammatory reactions generally involve a vast array of mediators and a variety of effector cells such as mast cells, macrophages, eosinophils, platelets, and neutrophils. Among them, neutrophils have been rather neglected in studies concerning allergic diseases, although an increase in neutrophil numbers and activity was found to be correlated to airway hyperresponsiveness in asthmatic patients (1). These findings have suggested that neutrophils might play a role in allergic diseases characterized by a marked elevation of serum IgE, such as asthma, especially during the late-phase reaction. However, neutrophils represent the only blood cell population that does not seem to express conventional Fc receptors for IgE, neither FcεRI, like basophils or mast cells (2), nor FcεRII, like macrophages, eosinophils, or platelets (3). Besides these IgE Fc receptors, a new family of IgE-binding molecules has been recently described. They belong to S-type lectins with the ability to bind IgE through carbohydrate recognition domain (4). Members of the family include Mac-2/εBP, which are endogenous soluble lectins and can be expressed by various cell types (5, 6). One feature of εBP molecules is their restricted recognition by specific glycoforms of IgE. It is interesting that the majority of myeloma IgE proteins and polyclonal IgE from some patients are able to bind to εBP only after desialylation (5, 7). In this respect, it has to be mentioned that the few IgE binding assays previously reported

on human neutrophils (8, 9) have been performed with myeloma IgE proteins, and therefore did not allow us to investigate the existence of functional interactions between neutrophils and IgE antibodies from patients. The wide cell distribution of Mac-2/εBP molecules and their recent demonstration in eosinophils from hypereosinophilic patients (10) led us to investigate their possible existence in human neutrophils.

**Materials and Methods**

*Neutrophil Preparations.* Patient neutrophils were obtained from the venous blood of patients with various diseases (allergic diseases, parasitic infections, and eosinophilic disorders) by centrifugation through metrizamide discontinuous gradients, according to previously described techniques (11), and collected in the lower density layer (layer II) corresponding to 20–22% metrizamide solutions. Neutrophils from normal blood donors were isolated by the same technique or by dextran sedimentation, followed by centrifugation through a cushion of Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) and hypotonic lysis to remove remaining erythrocytes (12). The degree of purity (up to 97.5%) and the morphologic integrity of cell populations were estimated after staining of cytocentrifuged preparations with Giemsa. Contamination by eosinophils in neutrophil preparations was <10%. As control, human alveolar macrophages were obtained by bronchoalveolar lavage of

asthmatic patients (Truong, M. J., V. Gruart, F.-T. Liu, L. Prin, A. Capron, and M. Capron, manuscript submitted for publication).

**Immunoglobulins, Antibodies, and Antigens.** Human myeloma IgE-PS was kindly donated by Dr. H. L. Spiegelberg (School of Medicine, University of California, San Diego, CA) and IgE-BL was purchased from Bernet Laboratories (Buena Park, CA). Human sera from patients with hyper-IgE syndrome (25,000 IU/ml) were obtained from Dr. F.-T. Liu (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Human sera from patients infected with the parasite *Schistosoma mansoni* were provided by Dr. P. Desreumaux (Centre Hospitalier St. Louis, St. Louis, Sénégal). Serum IgA was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The anti-Mac-2 hybridoma supernatant, previously described (13), a kind gift of Dr. B. Cherayil (MGH Cancer Research, Boston, MA) and irrelevant anti-*S. mansoni* hybridoma supernatant have been used at different dilutions in the various assays. Anti-CD23 mAb (8-30) directed against the IgE binding domain of CD23 (14) was donated by Dr. Suemura (Osaka University Hospital, Osaka, Japan). FITC-labeled anti-human IgE, anti-human IgA, anti-rat IgG, or anti-mouse IgM antibodies (Fab 2') were purchased from Cappel Laboratories (Cochranville, PA). Unlabeled anti-human IgE and anti-human IgA antibodies were obtained from Immunotech (Marseille, France). The recombinant antigen Sm28GST from *S. mansoni* (15) was kindly given by F. Trottein (CIBP, Institut Pasteur).

**Northern Blot Analysis.** Total RNA was isolated from neutrophil populations and was subjected to electrophoresis in a formaldehyde/1.2% agarose gel, blotted onto a nylon filter, and successively hybridized overnight at 42°C with <sup>32</sup>P-labeled CD23 (16), Mac-2 cDNA (6), and β-actin probes. Probes were removed by boiling the blot on a 0.1% SDS solution, and washes were carried out in 1× SSC, 0.05% SDS at 55°C.

**Labeling of Leukocytes and Immunoprecipitations.** The cells were lysed with a nonionic/detergent mixture and cell extracts were iodinated with <sup>125</sup>I as previously described (Truong et al., manuscript submitted for publication). Aliquots of 2 × 10<sup>6</sup> cpm radioiodinated cell extracts were precleared for 2 h with normal rat serum and 50 μl of protein G-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) in TNSTEN (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Triton-X 100, 5 mM EDTA, 0.02% NaN<sub>3</sub>) with 0.1% aprotinine. Immunoprecipitation was carried out by adding anti-Mac-2 hybridoma supernatant (1:10 final dilution) followed by 50 μl of protein G-Sepharose. After overnight incubation at 4°C, the Sepharose beads were washed 10 times with TNSTEN, 0.1% aprotinine, and then resuspended and boiled for 3 min in 40 μl of 1× SDS-PAGE sample buffer. Aliquots of released material were analyzed by SDS-PAGE.

**Flow Cytometry.** For the detection of surface Mac-2, 10<sup>6</sup> neutrophils were incubated with anti-Mac-2 or control anti-*S. mansoni* supernatants at a final dilution of 1:10 in PBS for 1 h at 4°C. For IgE and IgA binding analysis, neutrophils were incubated with 50 μg/ml of myeloma IgE (IgE-PS or IgE-BL) or serum IgA for 1 h at 4°C. In some experiments, myeloma IgE proteins or IgA have been incubated with untreated or heat-inactivated neuraminidase (*Clostridium perfringens* type, 0.5 U/mg of protein, Sigma Chemical Co.) for 90 min at 37°C before binding to neutrophils. For the detection of CD23, neutrophils were incubated with 50 μg/ml mAb 8-30 or control IgM mAb for 1 h at 4°C. In all experiments, after washing with PBS, cells were incubated with the corresponding FITC-conjugated anti-Ig antibodies (1:40 final dilution) for 30 min at 4°C. After washing, cells were fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed with an Orthocytofluorograph (model 50H; Ortho Diagnostics Systems, Westwood, MA) using a logarithmic fluores-

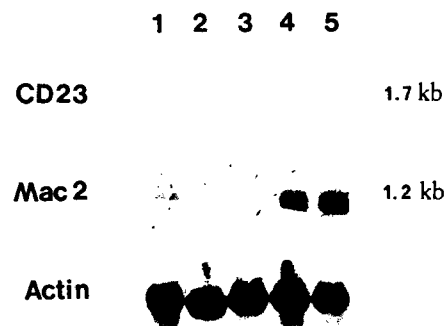
cence intensity scale. Results are expressed as a percentage of labeled neutrophils after subtraction of the background fluorescence obtained with isotype controls, similarly to techniques reported for eosinophils (17).

**Neutrophil Activation.** Neutrophils (2.5 × 10<sup>6</sup>/ml) were incubated with 10 μg/ml myeloma IgE proteins, serum IgA, or with medium for 30 min at 4°C. Anti-IgE or anti-IgA antibodies (25 μg/ml) were then added, respectively. Experiments also have been performed with polyclonal IgE present in serum from *S. mansoni*-infected patients, and further stimulation with the specific antigen (recombinant Sm28GST) (15) or with anti-IgE. Sera from patients with hyper-IgE syndrome also have been used to activate neutrophils. The respiratory burst after activation was evaluated by a chemiluminescence (CL) procedure in the presence of luminol (250 μg/ml). Light emission was monitored after 15–30 min of incubation at 37°C using a photometer (Nucleotimetre 107; Interbio CLV, Villeurbanne, France) and was expressed in mV (100 CL U = 1 mV). For inhibition experiments, anti-Mac-2 or control hybridoma supernatants and anti-CD23 or control mAb were added at various concentrations together with IgE or serum before addition of anti-IgE antibodies or antigen.

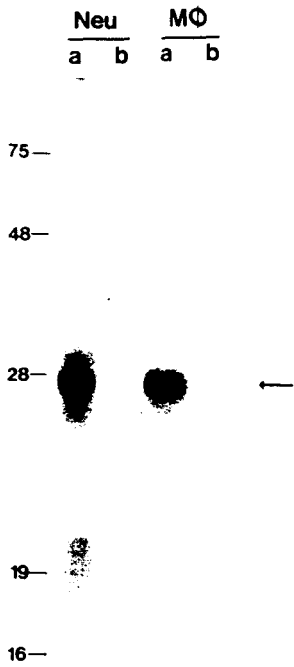
**Statistical Analysis.** Student's *t* test for unpaired and paired experiments, and correlation analysis have been used.

## Results and Discussion

**Detection of mRNA Encoding Mac-2/εBP.** The existence of IgE-binding molecules such as FcεRII/CD23 or Mac-2/εBP in purified human neutrophils was first investigated by Northern blot (Fig. 1). Neutrophil RNA extracted from different donors was first probed with the cDNA encoding CD23. No apparent mRNA band was detected at the expected 1.7-kb size. The same Northern blot was then hybridized with the Mac-2 cDNA probe. Neutrophils from both normal donors (Fig. 1, lanes 1 and 2) or patients (Fig. 1, lanes 3–5) expressed the 1.2-kb mRNA corresponding to Mac-2/εBP. Neutrophils purified from some patients (Fig. 1, lanes 4 and 5) appeared to express higher amounts of Mac-2/εBP mRNA than neutrophils purified from other patients or from normal donors. These findings seem in agreement with the variable levels of S-type lectin expression during cell differen-



**Figure 1.** Northern blot analysis of neutrophil RNA prepared from normal donors (lanes 1 and 2) and from three patients with allergic diseases (lanes 3–5). The blot was successively hybridized with CD23, hMac-2, and β-actin probes.



**Figure 2.** Immunoprecipitation of <sup>125</sup>I-labeled lysates of neutrophils from one patient with hypereosinophilic syndrome (*Neu*), and of alveolar macrophages (*Mφ*) as control. Results were obtained with anti-Mac-2 hybridoma supernatant (lanes *a*) and with normal rat serum control (lanes *b*). The *M<sub>r</sub>* is indicated in kD. (←) 28-kD molecule.

tiation and maturation, such as in HL60 differentiated to macrophages (6) or in different mast cell lines (18). The variations in Mac-2 mRNA denoted in patients suggest that, in some diseases, neutrophils could be in different stages of maturation, leading therefore to higher expression of Mac-2 mRNA. Our results indicate that neutrophils did not seem to express CD23 mRNA, but have the capacity to synthesize Mac-2/εBP mRNA, although in lower amounts than eosinophils (Truong, M. J., et al., manuscript submitted for publication).

**Characterization of Mac-2/εBP Molecules by Immunoprecipitation.** To characterize the translation products of Mac-2/εBP mRNA detected above, immunoprecipitation by anti-Mac-2 hybridoma supernatant (Fig. 2, lanes *a*) or control (Fig. 2, lanes *b*) was performed with neutrophil extract from one representative patient (*Neu*) and with alveolar macrophage ex-

tract (*Mφ*). Similarly to results obtained with macrophages, the 28-kD molecule could be detected in human neutrophils. Based upon these results, it was concluded that human neutrophils have the capacity to express Mac-2/εBP, previously detected in a variety of cell types such as macrophages, mast cell lines, and eosinophils (6, 7, 10, 18).

**Flow Cytometry Analysis of Mac-2 Surface Expression and IgE-binding Capacity.** The detection of Mac-2/εBP by Northern blot and by immunoprecipitation led us to investigate their surface expression on neutrophils, by flow cytometry (Table 1). In comparison to FcεRII/CD23, which was not detected on neutrophils, a finding in agreement with Northern blot results, surface Mac-2 molecules were expressed on a significant percentage of neutrophils purified from patients as well as from normal donors. Since Mac-2/εBP lectins have the capacity to bind to carbohydrate determinants of IgE (5, 7), we have evaluated the binding of IgE to neutrophils by flow cytometry (Table 1). When myeloma IgE-PS was used, a significant correlation was obtained between the expression of Mac-2 and the binding of IgE-PS, both for patients ( $r = 0.57$ ;  $p < 0.01$ ) and for normal donors ( $r = 0.56$ ;  $p < 0.05$ ), suggesting that IgE-PS could bind to Mac-2 expressed on neutrophil surface. Increased IgE binding was observed in the case of neutrophils from patients, which also showed similar increased binding of IgA, known to bind to neutrophils (19). These findings, already described for eosinophils (8) could be related to the state of activation of neutrophils from patients. It is interesting that the IgE-binding capacity of neutrophils from all donors varied according to the myeloma IgE tested (Table 1). A significantly lower percentage of neutrophils bound to IgE-BL in comparison to IgE-PS ( $p < 0.001$ ). This result was surprising since it has been previously reported that myeloma IgE-PS was poorly recognized by Mac-2/εBP (7). A comparative analysis between the two IgE-PS preparations (one provided by Dr. Ishizaka, La Jolla Institute Allergy and Immunology, La Jolla, CA) and the other by Dr. Spiegelberg) has been performed, and results indicate that the IgE-PS used in the present work was better recognized by εBP, a finding probably reflecting different glycosylation between the two IgE preparations (Dr. F.-T. Liu, personal communication).

**Table 1.** Flow Cytometry Analysis of Membrane Expression of CD23, Mac-2, IgE- and IgA-binding Molecules

Source of neutrophils*	Percent positive cells†				
	CD23	Mac-2	IgE-PS	IgE-BL	IgA
Patients	2.1 ± 0.8	40.1 ± 4.7	40.1 ± 5.9	9.7 ± 3.6	52.9 ± 13.6
Normal donors	2.3 ± 1.2	54.6 ± 5.6	27.9 ± 8.0	13.8 ± 4.2	33.3 ± 5.9

\* Neutrophils were purified from patients ( $n = 16$ ) or from normal donors ( $n = 10$ ).

† Neutrophils were incubated with 50 μg/ml anti-CD23 8-30 mAb, myeloma IgE (PS or BL), serum IgA, or anti-Mac-2 hybridoma supernatant (dilution 1:10), before staining with the corresponding FITC-conjugated anti-Ig antibodies. The percentage of positive cells was obtained after subtraction of the nonspecific binding with the control antibody or medium (mean ± SEM).

**Table 2.** Binding of Neuraminidase-treated Ig to Neutrophils

Treatment of Ig	Percent positive cells*		
	IgE-PS	IgE-BL	IgA
None	58.7 ± 8.1	16.8 ± 2.1	47.3 ± 7.9
Neuraminidase†	79.5 ± 4.4	55.7 ± 5.1	50.1 ± 8.5
Heat-inactivated neuraminidase‡	60.7 ± 5.9	22.5 ± 4.0	52.7 ± 11.6

\* Neutrophils were incubated with 50 μg/ml IgE-PS, IgE-BL, or serum IgA and stained with the corresponding FITC-labeled anti-Ig (mean of 4–11 experiments ± SEM).

† The various Ig have been treated with neuraminidase (0.03 U/ml) for 90 min at 37°C before incubation with neutrophils.

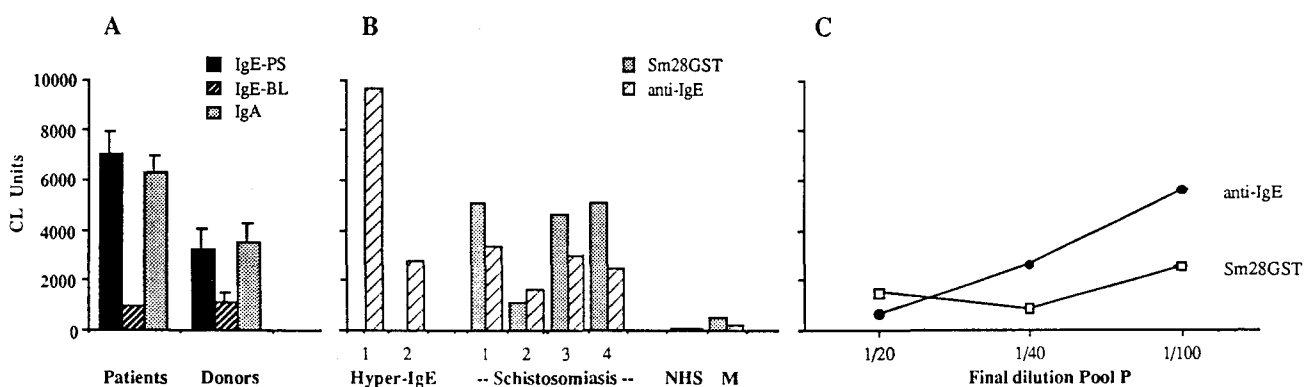
‡ Neuraminidase was heat-inactivated for 1 h at 56°C before incubation with Ig.

In relation to the fact that Mac-2/εBP could bind to restricted IgE glycoforms, experiments were performed with the same myeloma IgE proteins previously treated with neuraminidase (Table 2). A significant increase in IgE binding was observed both for IgE-PS and for IgE-BL, but more pronounced for the latter. In contrast, neuraminidase treatment did not affect the binding of serum IgA to neutrophils, which occurs through the myeloid FcαR (19). It has to be noticed that the effect of neuraminidase on IgE-BL binding was abolished after heat inactivation. It was concluded that neutrophils can bind some IgE glycoforms likely through surface Mac-2/εBP and not through transmembrane CD23. In contrast to eosinophils which express both CD23 epitopes (17) and Mac-2/εBP (10) and which therefore can bind myeloma IgE independently of their degree of glycosylation, neutrophils seem to express only molecules of the S-type lectin family with IgE recognition modulated by sialylation of IgE oligosaccharides.

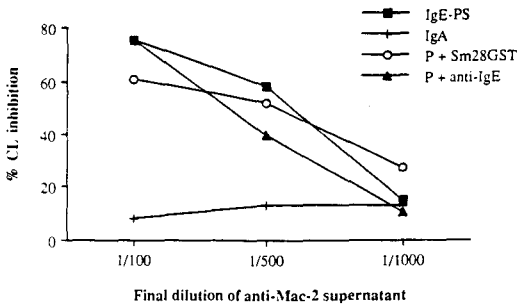
**Neutrophil Activation by Myeloma or Polyclonal IgE.** The function of IgE-binding molecules expressed on neutrophil

surface has been investigated in an experimental assay measuring the respiratory burst by CL. After preliminary dose-dependence studies, we could show that incubation of neutrophils with 10 μg/ml of IgE or IgA and then with the corresponding anti-Ig antibodies, induced a luminol-dependent CL reaction. As shown in Fig. 3 A, only myeloma IgE-PS, but not IgE-BL, induced a CL level close to that induced by serum IgA, as positive control (19). In addition, the magnitude order of IgE-PS- and IgA-dependent respiratory burst was significantly higher for neutrophils from patients than from normal donors. These results were in agreement with IgE-PS- and IgA-binding observed by flow cytometry (Table 1). Unfortunately, CL experiments with neuraminidase-treated Ig could not be performed since neuraminidase by itself nonspecifically inhibited the CL production.

To know whether, in addition to myeloma IgE, polyclonal IgE with or without antibody specificity could also induce neutrophil activation, neutrophils were incubated either with the serum from patients with hyper-IgE syndrome or from schistosomiasis-infected patients (Fig. 3 B). The former sera,



**Figure 3.** IgE-dependent activation of neutrophils from individual donors measured by CL. (A). CL of neutrophils purified from hyper-eosinophilic patients (associated or not with parasitic infections or allergic disease) and from normal donors by incubation with 10 μg/ml myeloma IgE (IgE-PS and IgE-BL) or serum IgA, and 25 μg/ml anti-IgE or anti-IgA antibodies. (B). Normal donors' neutrophil CL induced by anti-IgE (▨) or Sm28GST Ag (▩) with: sera from two patients with hyper-IgE syndrome (1 and 2) which contained 8,000 IU/ml IgE; and sera from four different patients with schistosomiasis (1–4). Normal human serum (NHS), Sm28GST, and anti-IgE alone (M) represented the controls. (C) Normal donors' neutrophil CL induced by different concentrations of pooled sera from schistosomiasis patients (P = 1, 3, and 4). The evaluation of CL was calculated as described in Materials and Methods.



**Figure 4.** Dose-effect of anti-Mac-2 supernatant on myeloma IgE-PS (—■—) and IgA (+) dependent CL, on pool P (polyclonal IgE)-dependent activation induced by Sm28GST (—○—) or anti-IgE (—▲—) on normal donors' neutrophils. The percent CL inhibition was calculated by comparison to results obtained with control used at the same concentrations, as described in Materials and Methods.

previously shown to bind to Sepharose-linked hεBP (7), induced a variable respiratory burst in the presence of anti-IgE varying with neutrophil donors and with patient sera. In the case of schistosomiasis patient sera, the incubation with specific antigen Sm28GST as well as with anti-IgE antibodies induced a respiratory burst (Fig. 3 B). No CL was produced when only serum, antigen Sm28GST, or anti-IgE alone was added to neutrophils. These results indicate that after cross-linking with antigen or anti-IgE, specific IgE antibodies can induce a respiratory burst in neutrophils. Sera from three schistosomiasis patients were pooled (P, sera 1, 3, and 4) and the pool was shown to induce a dose-dependent CL reaction, in the presence of either specific antigen Sm28GST or anti-IgE (Fig. 3 C). The 1:100 dilution was selected for further experiments.

**Role of Mac-2/εBP in IgE-dependent Neutrophil Activation.** To identify the nature of the molecules involved in IgE-dependent activation of neutrophils, inhibition procedures with various antibodies were performed (Fig. 4). In the case of activation with myeloma IgE and anti-IgE antibodies, a dose-dependent inhibition of CL was observed with anti-Mac-2 hybridoma supernatant, in comparison to control supernatant. In contrast, anti-Mac-2 antibodies showed no significant effect on IgA-dependent activation.

The involvement of Mac-2 was also investigated in neutrophil activation induced by polyclonal IgE antibodies. According to the stimulus (Sm28GST or anti-IgE), a significant dose-dependent inhibition of neutrophil respiratory burst was obtained with anti-Mac-2 mAb (Fig. 4). No significant inhibition was induced by anti-CD23 mAb for a concentration

of 50 μg/ml in the case of Sm28GST antigen or anti-IgE stimulations (14.8 and 0% inhibition, respectively). It has to be noticed that no CL was produced after incubation of neutrophils with anti-Mac-2 or anti-CD23 mAb either alone or after cross-linking with antiisotype antibodies. Based upon these results, Mac-2 molecules but not CD23, appeared involved in IgE-dependent activation of human neutrophils.

Taken together, the present results suggest that human neutrophils from patients with various diseases, but also from normal donors, could express functional IgE-binding molecules. Interactions between mouse neutrophils and IgE antibodies in cytotoxicity assays have been previously reported. However, no attempt at characterization of IgE-binding molecules potentially expressed by neutrophils was made at this time (20). The more interesting question in relation to the *in vivo* relevance was certainly to know whether neutrophils could bind to and be activated by polyclonal IgE from patients. Our results indicate that not only restricted glycoforms of myeloma IgE proteins but also polyclonal IgE antibodies could induce neutrophil activation in an antigen-specific manner. These findings suggest that in addition to FcεR-bearing cell populations, neutrophils might participate in IgE-dependent reactions. It remains to be determined whether, as for other cell populations, the IgE-dependent activation of neutrophils may induce the generation of mediators potentially involved in inflammatory reactions. Along the same line, further experiments are needed to demonstrate the possible implication of neutrophils in the IgE-dependent protective immunity against schistosomiasis (21). When compared with eosinophils, Mac-2 molecules seemed to be expressed on the surface of a larger majority of neutrophil donors (2 negative out of 16 patients and 3 negative out of 10 normal donors), whereas Mac-2 was expressed on the surface of only half of HE patients (Truong, M. J. et al., manuscript submitted for publication). This might indicate a difference in the regulatory process of surface expression of these endogenous lectins on the two cell populations. Another interesting difference between neutrophils and eosinophils is that only Mac-2, but not CD23, seemed to be expressed and was functional on neutrophils, whereas eosinophils possessed both types of molecules. This finding probably explains why all myeloma IgE proteins could bind to eosinophils (8), irrespective of their degree of glycosylation, whereas their binding to neutrophils was increased after sialidase treatment. Thus, it was concluded that neutrophils, similarly to other cell populations, might participate in the IgE-dependent effector phase of various diseases.

The authors wish to thank Drs. J. P. Dessaint and M. Joseph for critically reading the manuscript; C. Drolez for technical assistance; and M. F. Massard for secretarial assistance.

This work was supported by Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624.

Address correspondence to Marie-José Truong, CIBP, Institut Pasteur, BP 245, 59019 Lille Cédex, France.

Received for publication 1 September 1992.

247 Truong et al. Brief Definitive Report

References

1. Kelly, C., C. Ward, C.S. Stenton, G. Bird, D.J. Hendrick, and E.H. Walters. 1988. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness. *Thorax*. 43:684.
2. Metzger, H., G. Alcaraz, R. Holman, J.P. Kinet, V. Pribluda, and R. Quarto. 1986. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.* 4:419.
3. Capron, A., J.P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, J.C. Ameisen, and A.B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy: the second receptor for IgE (FceR2). *Immunol. Today*. 7:15.
4. Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263:9557.
5. Robertson, M.W., K. Albrandt, D. Keller, and F.T. Liu. 1990. Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry*. 29:8093.
6. Cherayil, B.J., S. Chaitivitz, C. Wong, and S. Pillai. 1990. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:7324.
7. Robertson, M.W., and F.-T. Liu. 1991. Heterogeneous IgE glycoforms characterized by differential recognition of an endogenous lectin (IgE-binding protein). *J. Immunol.* 147:3024.
8. Capron, M., H.L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A.E. Butterworth, R.J. Pierce, M.A. Ouaisi, and A. Capron. 1984. Role of IgE receptors in the effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.
9. Capron, M., A. Capron, J.P. Dessaint, G. Torpier, S.G.O. Johansson, and L. Prin. 1981. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:2087.
10. Truong, M.J., V. Gruart, A. Capron, and M. Capron. 1992. Human eosinophils express IgE-binding molecules of the Mac-2 family. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* A359 (Abst.).
11. Prin, L., M. Capron, A.B. Tonnel, O. Blety, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils. I. Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72:336.
12. Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(Supp. 97):77.
13. Ho, M.-K., and T.A. Springer. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 128:1221.
14. Suemura, M., H. Kikutani, E.L. Barsumian, Y. Hattori, S. Kishimoto, R. Sato, A. Maeda, H. Nakamura, H. Owaki, R.R. Hardy, and T. Kishimoto. 1986. Monoclonal anti-Fce receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fce receptors on human B and T cells. *J. Immunol.* 137:1214.
15. Balloul, J.M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J.M. Grzych, R.J. Pierce, D. Carvallo, J.P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen against schistosomiasis. *Nature (Lond.)*. 326:149.
16. Ludin, C., H. Hofstetter, M. Sarfati, C.A. Levy, U. Suter, D. Alaimo, E. Kilchherr, H. Frost, and G. Delespesse. 1987. Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 6:109.
17. Capron, M., M.J. Truong, D. Aldebert, V. Gruart, H. Suemura, G. Delespesse, B. Tourvieille, and A. Capron. 1991. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur. J. Immunol.* 21:2423.
18. Frigeri, L.G., and F.-T. Liu. 1992. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J. Immunol.* 148:861.
19. Stewart, W.W., and M.A. Kerr. 1990. The specificity of the human neutrophil IgA receptor (FcaR) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2. *Immunology*. 71:328.
20. Lopez, A.F., M. Strath, and C.J. Sanderson. 1983. Mouse immunoglobulin isotypes mediated cytotoxicity of targets cells by eosinophils and neutrophils. *Immunology*. 48:503.
21. Dessaint, J.P., and A. Capron. 1989. IgE and immune defense mechanism. *Clin. Rev. Allergy*. 7:105.

---

## Discussion

Parallèlement aux éosinophiles, les neutrophiles ont été utilisés au cours des analyses de Northern blot et d'immunoprécipitation avec la sonde Mac-2/εBP. Ainsi, nous avons pu démontrer que les neutrophiles sont également capables d'exprimer le messenger codant pour Mac-2/εBP et qu'il est traduit en protéine de 29 kDa fonctionnelle.

De manière semblable aux éosinophiles, il est apparu que les neutrophiles fixaient de manière variable les différents myélomes d'IgE. Cette distinction dans la fixation des différents types d'IgE pouvait être due au degré variable de glycosylation des myélomes IgE. En effet, le traitement de l'IgE par de la neuraminidase augmente sa fixation sur les neutrophiles. Ces résultats sont en accord avec la caractéristique de restriction dans la reconnaissance des glycoformes d'IgE par l'IgEBP (Robertson and Liu, 1991). Il a ailleurs été démontré que la majorité des IgE de myélome et polyclonales n'étaient reconnues par l'IgEBP que si celles-ci étaient préalablement désialylées (Robertson *et al.*, 1990, 1991).

Ainsi, les caractéristiques des lectines de types S sont retrouvées en grande partie au niveau des neutrophiles et partiellement sur les éosinophiles. Nos résultats suggèrent que les lectines sont les seules molécules capable de lier l'IgE sur les neutrophiles; alors qu'il existerait plusieurs types de molécules fixant l'IgE sur les éosinophiles qui sont d'une part des protéines membranaires (FcεRII/CD23, MBP...) et d'autre part des lectines solubles (lectines de 29-31 kDa et de 14-16 kDa).

Longtemps négligés par rapport aux autres cellules participant aux réactions inflammatoires, les neutrophiles sont toutefois les premières cellules qui migrent vers le site inflammatoire. La présence à leur surface de molécules de nature lectinique capables de fixer l'IgE, nous a conduit à étudier l'activation des neutrophiles par différentes sources d'IgE. L'état activé des neutrophiles, est constaté de manière indirecte, par chimioluminescence, reflétant l'activité métabolique oxydative de la cellule. Les IgE de myélome (IgE-PS) suivies de l'addition d'anticorps anti-IgE induisent un état d'activation des neutrophiles comparable à celui induit par les anticorps IgA en présence d'anti-IgA via le récepteur membranaire FcαR (Stewart and Kerr, 1990). Cette augmentation du métabolisme oxydatif est également retrouvée lors de la stimulation soit par des

---

IgE polyclonales provenant de sujets atteints de syndrome Hyper-IgE soit par des anticorps IgE provenant de patients parasités par *S. mansoni* en présence ou non d'antigène spécifique Sm28GST. De plus que ce soit dans les processus d'activation par les IgE de myélome ou par les anticorps IgE, les molécules impliquées dans la fixation de l'IgE semblent être des molécules Mac-2/εBP, puisque les anticorps anti-Mac-2 inhibent de manière dose-dépendante la chimioluminescence des neutrophiles induite par les IgE alors qu'aucune inhibition n'est obtenue dans le cas d'activation par les IgA.

La découverte de molécules fonctionnelles capables de lier l'IgE à la surface des neutrophiles, replace ce type cellulaire parmi les autres populations cellulaires impliquées dans les maladies associées à une hyperproduction d'IgE telles que les allergies et les parasitoses. Il avait d'ailleurs été décrit que les neutrophiles pouvaient jouer un rôle dans les mécanismes de cytotoxicité en présence d'anticorps IgE, chez la souris (Lopez *et al.*, 1983), sans que les molécules membranaires en cause soient identifiées. Chez l'homme, les neutrophiles ne semblent pas être cytotoxiques vis à vis des schistosomules. Ceci suggère l'absence de certaines molécules d'adhésion impliquées dans ce phénomène de cytotoxicité cellulaire. Par contre, les polynucléaires neutrophiles sont dotés de capacités phagocytaires vis à vis d'agents infectieux essentiellement bactériens. Le mécanisme de phagocytose est le résultat de deux phénomènes séquentiels: l'adhérence et l'ingestion des particules. Cette étape d'adhérence peut être favorisée par la présence des molécules Mac-2/εBP à la surface des neutrophiles qui reconnaissent des structures glucidiques des bactéries (Chen *et al.*, 1990). Une telle implication des S-lectines dans la phagocytose a été décrite pour les macrophages vis à vis des promastigotes de *L. major* et des trypanostigotes de *T. cruzi*. (Blackwell, 1985).

Rappelons qu'un certain nombre de facteurs sont capables d'activer les neutrophiles et d'induire des lésions nécrotiques par libération de médiateurs toxiques pour les neutrophiles et par activation du métabolisme oxydatif. Il s'agit en particulier des auto-anticorps anti-neutrophiles (ANCA) qui sont dirigés principalement contre des molécules bactéricides: MPO, CAP57 et contre les protéinases 3. De même que des cytokines inflammatoires telle l'IL-8 sont capables d'activer les neutrophiles et provoquer une décharge des médiateurs tel que la lactoferrine (Sherry and Cerami, 1991). Ces dernières sont particulièrement spécifiques pour les neutrophiles en ce qui concerne



l'activité chimioattractante. Le fait que les IgE sont associées à une augmentation de l'activité métabolique respiratoire des neutrophiles suggère que ce type d'immunoglobuline puisse être actif, de la même manière que l'IL-8, dans le relargage d'un certain nombre de médiateurs granulaires des neutrophiles. Une telle libération de protéines cationiques induite par les immunoglobulines, et plus particulièrement par les IgE, a été démontrée sur les éosinophiles. Un relargage sélectif des protéines cationiques telles l'EPO et la MBP a été obtenu en incubant les éosinophiles humains porteurs d'IgE de surface avec de l'anti-IgE (Khalife *et al.*, 1985; Capron *et al.*, 1987).

---

## CONCLUSION / PERSPECTIVES

---

## Conclusion

Tout au long de notre travail, nous avons voulu déterminer la présence des différentes molécules fixant l'IgE qu'elles soient de nature transmembranaire de type FcεR, ou de nature soluble de type Mac-2/εBP, sur les granulocytes éosinophiles et neutrophiles.

Grâce aux anticorps monoclonaux dirigés soit contre les éosinophiles (BB10) soit contre le FcεRII/CD23 des lymphocytes B, il a été possible de démontrer que la fixation de l'IgE correspondait à la présence d'épitopes du CD23 sur les éosinophiles de patients HE. Ainsi, sur la base des résultats antérieurs évoquant des similitudes structurales entre le CD23 des lymphocytes B et le FcεRII des éosinophiles et de la récente démonstration d'une hétérogénéité d'expression des épitopes du CD23 par les éosinophiles de patients HE, nous avons poursuivi le clonage du récepteur pour l'IgE de l'éosinophile. L'utilisation de l'ADNc codant pour le CD23 des lymphocytes B comme sonde nucléotidique pour le criblage de la banque d'ADNc d'éosinophiles de patients HE n'a pas représenté la sonde la mieux appropriée puisqu'aucun clone obtenu n'exprime le CD23. Néanmoins, une molécule originale HLA-E appartenant aux antigènes de HLA de classe I non classique a été clonée. Le fait que ces antigènes soient fortement exprimés par les éosinophiles et les neutrophiles suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans la présentation d'antigène. Une telle fonction a été proposée pour des antigènes du complexe H2 non classique dans le modèle murin, par plusieurs équipes de recherches (Miligan *et al.*, 1991). Il est à noter que les éosinophiles sont capables d'exprimer à leur surface des antigènes de classe II, HLA-DR (Lucey *et al.*, 1989b). Il a été démontré que le CD23 membranaire joue un rôle dans la présentation de l'antigène en association avec HLA-DR (Flores-Romo *et al.*, 1990).

L'utilisation de sondes immunologiques (anticorps anti-Mac2/εBP) et de sondes nucléotidiques (ADNc codant pour Mac2/εBP) a permis de révéler la présence des lectines Mac2/εBP, seulement sur la moitié des éosinophiles de patients HE capables de fixer l'IgE, alors qu'elles présentaient toutes le messenger correspondant. Cette discordance est probablement dûe au caractère soluble de ces molécules lectiniques qui nécessitent un relargage puis une exposition à la surface de la

---

membrane par fixation aux glycoprotéines ou glycolipides membranaires (Cherayil *et al.*, 1989, 1990).

De manière inattendue, les neutrophiles, qui ont été considérés comme des cellules n'exprimant pas de récepteur pour l'IgE, sont également capables de présenter à leur surface des molécules de type Mac-2/εBP. De plus, ils peuvent fixer de manière significative les IgE et en particulier quand elles sont désialylées. La capacité des molécules Mac-2/εBP à lier des IgE est aussi retrouvée sur les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. Les anticorps anti-Mac2/εBP inhibent de manière dose-dépendante la fixation de l'IgE radiomarquée par les polynucléaires.

Le rôle de ces lectines dans les fonctions effectrices des éosinophiles a été mis en évidence dans les phénomènes de cytotoxicité vis à vis de larves de parasites, sans que l'on sache de manière précise l'étape (d'adhésion ou de relargage de médiateurs) à laquelle ces molécules Mac2/εBP interviendraient. Par ailleurs, ces lectines jouent un rôle dans l'activation IgE-dépendante des neutrophiles en augmentant leur métabolisme oxydatif. L'originalité de ce travail sur les neutrophiles est la toute première description d'une activation cellulaire par les IgE de myélome ou par les anticorps IgE complexés soit par l'anti-IgE, soit par l'antigène spécifique. Ces résultats ouvrent ainsi de nouvelles perspectives sur le rôle fonctionnel des neutrophiles dans les maladies liées à une augmentation des IgE sériques telles l'allergie et les parasitoses.

---

## Perspectives

La présence de deux types de molécules fixant l'IgE sur les éosinophiles de patients HE et leur implication respective dans les phénomènes d'ADCC vis à vis de larves de parasite, posent le problème de la réelle participation de ces molécules dans ce mécanisme de défense anti-parasitaire. Certes, il est nécessaire de définir de manière précise quelle est l'étape dans laquelle les récepteurs pour l'IgE (FcεRII et lectines Mac-2/εBP) interviendraient. Plusieurs hypothèses peuvent être émises, sur la base des caractéristiques des lectines: (1) Mac-2/εBP, de par sa nature soluble, favoriserait la fixation de l'IgE sur les récepteurs membranaires et agirait donc comme un coactivateur du mécanisme d'ADCC; (2) Mac-2/εBP, en tant que molécule d'adhésion, participerait à la première étape de fixation des cellules effectrices sur les parasites.

Les molécules de type Mac-2/εBP et du FcεRII/CD23 sont toutes deux capables de fixer l'IgE. Il est tout à fait probable qu'il existe une coopérativité entre ces deux types de molécules pour la liaison de l'IgE. La reconnaissance de la partie protéique de l'IgE par le FcεRII peut être renforcée par la liaison des molécules lectiniques Mac-2/εBP à l'IgE. Cette coopérativité provoquerait l'agrégation des récepteurs FcεRII adjacents qui déclencherait une activation cellulaire se traduisant par une libération de médiateurs éosinophiliques. Cette coopérativité éventuelle dans la fixation de l'IgE et dans l'activation des éosinophiles mérite d'être approfondie.

Toutefois, les molécules FcεRII/CD23 et Mac-2/εBP ne semblent pas être les seules molécules capables de fixer l'IgE sur les polynucléaires éosinophiles puisque le pourcentage de cellules capables de fixer l'IgE est plus important que celui qui exprime ces deux types de molécules. Une identification biochimique et moléculaire de nouvelles molécules capables de fixer l'IgE semble être nécessaire afin de comprendre la complexité des molécules mises en jeu dans les interactions IgE-éosinophiles.

Une des stratégies possibles pour cette étude serait de (1) construire une autre banque d'ADNc d'éosinophiles de patients HE préalablement sélectionnés pour leur capacité à lier l'IgE; (2) puis d'utiliser le ligand IgE comme sonde immunologique pour le criblage de cette banque. La construction de la banque se fera à partir de très peu d'ARN totaux d'éosinophiles qui seront amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) après avoir été rétrotranscrits en ADNc. Une

---

quantité suffisante d'ADN sera alors obtenue puis insérée dans un vecteur d'expression susceptible d'être amplifié à la fois dans un système bactérien (MC1061/P3) et dans un système eucaryote (cellule Cos).

L'avantage de cette banque en cellule Cos est la production de molécules telles que nous en trouvons chez les eucaryotes, c'est à dire des molécules qui ont subi des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations et les glycosylations. Cette dernière modification semble jouer un rôle essentiel dans l'activité de fixation de l'IgE par les molécules présentes dans les polynucléaires éosinophiles et plus particulièrement les neutrophiles. Bien sur cette stratégie est également applicable pour l'identification moléculaire des molécules fixant l'IgE sur les neutrophiles.

La capacité des IgE à induire un signal d'activation aux neutrophiles via les molécules Mac-2/εBP suggère que cette classe d'immunoglobuline peut provoquer un relargage de certains médiateurs contenus ou non dans les granulations des neutrophiles. Il serait intéressant d'étudier la cinétique de la libération des médiateurs telles que la myéloperoxydase (présente dans les granulations primaires) et la lactoferrine (granulations secondaires).

Outre une meilleure connaissance des différents récepteurs susceptibles d'intervenir dans la liaison de l'IgE sur les éosinophiles, notre travail a permis (1) de révéler que des molécules de la famille des lectines de type S, sans domaine transmembranaire, pouvaient être associées à une activation cellulaire. Il est nécessaire de définir la signalisation transductionnelle correspondant à chacun de ces deux types de molécules réceptrices (complémentarité, synergie d'action, antagonisme ?). Le mécanisme de signalisation liée à Mac-2/εBP est actuellement en cours d'étude en prenant comme modèle les neutrophiles, dépourvus de FcεRII/CD23 mais possédant uniquement les molécules Mac-2/εBP; (2) d'indiquer que les neutrophiles, de la même manière que les autres granulocytes, pouvaient participer à des réactions d'hypersensibilité IgE-dépendante. Leur rôle éventuel dans la défense immunitaire anti-parasitaire mérite d'être envisagé.

---

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- 
- Abbott WM and Feizi T** (1989) Evidence that the 14 kDa soluble  $\beta$ -galactoside binding lectin in man is encoded by a single gene. *Biochem J*, 259:291.
- Abu-Ghazaleh RI, Kujisawa RI, Mestecky J, Kyle RA and Gleich GJ** (1989) IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol*, 142:2393.
- Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, Weller PF, Chin DT and Tenen DG** (1993) Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (Lysophospholipase). *J Immunol*, 150:456.
- Ackerman SJ, Loegering DA and Gleich GJ** (1980) The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay. *J Immunol*, 125:2118.
- Albrandt K, Orida NK and Liu FT** (1987) An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6859.
- Alexander J, Payne JA, Shigekawa B, Frelinger JA and Cresswell P** (1990) The transport of class I major histocompatibility complex antigens is determined by sequences in the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  protein domains. *Immunogenetics*, 31:169.
- Anders M, Hartley CA and Jackson DC** (1990) Bovine and mouse serum  $\beta$  inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:4485.
- Anderson K, Cresswell P, Gammon M, Hermes J, Williamson A and Zweerink H** (1991) Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med*, 174:489.
- Ashwell G and Harford J** (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*, 51:531.
- Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU and Bonnefoy JY** (1992) CD21 Is a Ligand for CD23 and Regulates IgE Production. *Nature*, 358:505.
- Baenziger JU and Maynard Y** (1980) Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *J Biol Chem*, 255:4607.
- Baggiolini M, Walz A and Kunkel SL** (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*, 84:1045.
- Barondes S** (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem Sci*, 13:480.
- Benoist C and Mathis D** (1990) Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y, and other letters of the alphabets. *Annu Rev Immunol*, 8:681.



- 
- Berg EL, Robinson MK, Mansson O et al.** (1991) A carbohydrate domain common to both sialyl Le<sup>a</sup> and sialyl Le<sup>x</sup> is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem*, 266:14869.
- Berton G and Gordon S** (1983) Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilised zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. *Immunology*, 49:705.
- Bettler B, Hofstetter H, Rao M, Yokoyama WM, Kilchherr F and Conrad DH** (1989b) Molecular structure and expression of the murine lymphocyte low-affinity receptor for IgE (FcεRII). *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7566.
- Bettler B, Maier R, Rüegg D and Hofstetter H** (1989a) Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fcε receptor (FcεRII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7118.
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr. and Seed B** (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243:1160.
- Bieber T, De la Salle H, Wollenberg A, Chizzonite R, Rakimi J, Ring J, Hanau D and De la Salle C** (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI). *J Exp Med*, 175:1285.
- Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz JC, Rieber EP, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Kraft D, Ring J and Stingl G** (1989) Induction of Fc epsilon R2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin-4 and gamma interferon. *J Exp Med*, 170:309.
- Billaud M, Busson P, Huang D, Mueller-Lantzsch N, Rousselet G, Pavlish O, Wakasugi H, Seigneurin JM, Tursz T and Lenoir GM** (1989) Epstein-Barr virus (EBV)-containing nasopharyngeal carcinoma cells expressed the B-cell activation antigen blast2/CD23 and low levels of the EBV receptor CR2. *J Virol*, 63:4121.
- Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB and Gordon S** (1985) Macrophage complement and lectin receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J Exp Med*, 162:324.
- Bonnefoy JY, Aubry JP, Peronne C, Wijdenes J and Banchereau J** (1987) Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low-affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol*, 138:2970.
- Bonnefoy JY, Guillot O, Spits H, Blanchard D, Ishizaka K and Banchereau J** (1988) The low-affinity receptor for IgE (CD23) on B lymphocytes is spatially associated with HLA-DR antigens. *J Exp Med*, 167:57.
- Borregaard N** (1988) The human neutrophil. Function and dysfunction. *Eur J Haematol*, 41:401.

- 
- Bos TJ, Davis AR, and Nayak DP** (1984) NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic region of influenza virus neuraminidase provides the signal function in translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:2327.
- Bowen BR, Nguyen T and Lasky LA** (1989) Characterization of a human homologue of the murine peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol*, 109:421.
- Brandley BK, Swiedler SJ and Robbins PW** (1990) Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell*, 63:861.
- Bruynzeel-Koomen CA, Mudde GC and Bruynzeel PL** (1989) The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in atopic dermatitis and their significance for its pathogenesis. *Allerg Immunol*, 21:219.
- Butterworth AE** (1984) Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol*, 23:143.
- Butterworth AE, Remold HG, Houba V, David JR, Franks D, David PH and Sturrock RF** (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to <sup>51</sup>Cr-labelled schistosomula of *S. mansoni*: mediation by IgE and inhibition by antigen-antibody complexes. *J Immunol*, 118:2230.
- Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V and Rees PM** (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 256:727.
- Capron A, Dessaint JP, Capron M, Joseph M, Ameisen JC and Tonnel AB** (1986a) From parasites to allergy: the second receptor for IgE. *Immunol Today*, 7:15.
- Capron A, Dessaint JP, Joseph M, Torpier G, Capron M, Rousseaux R, Santoro F and Bazin H** (1977) IgE and cells and schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*, 26:39.
- Capron M, Benveniste J, Braquet P and Capron A** (1988b) Role of PAF-acether in IgE-dependent activation of eosinophils. in Braquet, New trends in lipid mediators research, vol 2, pp.10-17.
- Capron M, Capron A, Dessaint JP, Torpier G, Johansson SG and Prin L** (1981) Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J Immunol*, 126:2087.
- Capron M, Capron A, Joseph M and Verwaerde C** (1983) IgE receptors on phagocytic cells and immune response to schistosome infection. *Monogr Allergy*, 18:33.
- Capron M, Grangette C, Torpier G and Capron A** (1989a) The second receptor for IgE in eosinophil effector function. *Chem Immunol*, 47:128.
- Capron M, Jouault T, Prin L, Joseph M, Ameisen JC, Butterworth AE, Papin JP, Kusnierz JP and Capron A** (1986b) Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FcεR2) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J Exp Med*, 164:72.

- 
- Capron M, Kazatchkine MD, Fischer E, Joseph M, Butterworth AE, Kusnierz JP, Prin L, Papin JP and Capron A (1987) Functional role of the  $\alpha$  chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J Immunol*, 139:2059.
- Capron M, Kusnierz JP, Prin L, Spiegelberg HL, Ovlaque G, Gosset P, Tonnel AB and Capron A (1985) Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils: detection by flow microfluorometry. *J Immunol*, 134:3013.
- Capron M, Nogueira-Queiroz JA, Papin JP and Capron M (1984b) Interaction between eosinophils and antibodies: in vivo protective role against rat schistosomiasis. *Cell Immunol*, 3:60.
- Capron M and Prin L (1990) The IgE receptor of eosinophils. *Springer Semin Immunopathol*, 12:327.
- Capron M, Spiegelberg HL, Prin L, Bennich H, Butterworth AE, Pierce RJ, Ouaiissi MA and Capron A (1984a) Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J Immunol*, 132:462.
- Capron M, Tomassini M, Torpier G, Kusnierz JP, MacDonald S and Capron A (1989b) Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int Arch Allergy and Appl Immunol*, 88:54.
- Capron M, Tomassini M, Vandervorst E, Kusnierz JP, Papin JP and Capron A (1988a) Existence et fonction d'un récepteur pour l'IgA sur les éosinophiles humains. *C R Acad Sci*, 307:397.
- Carini C, Margolick J, Yodoi J and Ishizaka K (1988a) Formation of IgE-binding factors by T cells of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:9214.
- Carini C, Margolick J, Yodoi J and Ishizaka K (1988b) Formation of IgE-binding factors by lymphocytes of HIV-infected patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 88:116.
- Cerra RF, Gitt MA and Barondes SH (1985) Three soluble rat  $\beta$ -galactoside-binding lectins. *J Biol Chem*, 260:10474.
- Chen SS, Bohn JW, Liu F-T and Katz DH (1981) Murine lymphocytes expressing Fc receptors for IgE (FcR epsilon). I. Conditions for inducing FcR epsilon+ lymphocytes and inhibition of the inductive events by suppressive factor of allergy (SFA). *J Immunol*, 127:166.
- Chen WJ, Goldstein JL and Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 265:3116.
- Cherayil BJ, Chaitivitz S, Wong C and Pillai S (1990) Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:7324.
- Cherayil BJ, Weiner SJ and Pillai S (1989) The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med*, 170:1959.

- 
- Chihara J, Plumas J, Gruart V, Tarvernier J, Prin L, Capron A and Capron M (1990)** Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils. Variable expression and induction by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 172:1347.
- Claesson L, Larhammar D, Rask L, and Peterson PA (1983)** cDNA clone for the human invariant  $\gamma$  chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:7395.
- Clerch LB, Whitney PL and Massaro D (1987)** Rat lung lectin synthesis, degradation and activation. *Biochem J*, 245:683.
- Conrad DH, Keegan AD, Kalli KR, VanDusen R, Rao M and Levine AD (1988)** Superproduction of low affinity IgE receptors on murine B lymphocytes by LPS and interleukin-4. *J Immunol*, 141:1091.
- Conrad DH and Peterson LH (1984)** The murine lymphocyte receptor for IgE. I. Isolation and characterization of the murine B cell Fc $\epsilon$  receptor and comparison with Fc $\epsilon$  receptors from rat and human. *J Immunol*, 132:796.
- Cooper DNW and Barondes SH (1990)** Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*, 110:692.
- Cosman D, S.D. L, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG and March CJ (1990)** A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci*, 15:265.
- Couraud PO, Casentini-Borocz D, Bringman TS, Griffith J, McGrogan M and Nedwin GE (1989)** Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J Biol Chem*, 264:1310.
- David JR, Vadas MA, Butterworth AE, De Brito PA, Carvalho EM, David RA, Bina JC and Andrade ZA (1980)** Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *New Engl J Med*, 303:1147.
- Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K, De Vries JE and Banchereau J (1987)** Human recombinant interleukin 4 induces Fc $\epsilon$  receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med*, 165:1459.
- Del Pozo V, De Andreas B, Martin E, Maruni N, Zubeldia JM, Palomino P and Lahoz C (1990)** Murine eosinophils and IL-1: alpha-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J Immunol*, 144:3117.
- Delespesse G, Hofstetter H, Sarfati M, Suter U, Nakajima T, Frost H, Letellier M, Peleman R and Kilchherr E (1989)** Human Fc $\epsilon$ RII. Molecular, biological, and clinical aspects. *Chem Immunol*, 47:79.

- 
- Denoroy M-C, Yodoi J and Banchereau J** (1990) Interleukin 4 and interferons  $\alpha$  and  $\gamma$  regulate Fc $\epsilon$ RII/CD23 mRNA expression on normal human B cells. *Mol Immunol*, 27:129.
- Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A and M. C** (1992) Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with Coeliac disease. *J Exp Med*, 175:293.
- Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL and Kaiser ET** (1981) Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:4584.
- Dobrina A, Menegazzi R, Carlos TM, Nardon E, Cramer R, Zacchi T, Harlan JM and Patriarca P** (1991) Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. Eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J Clin Invest*, 88:20.
- Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C and Mathis D** (1987) A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell*, 50:863.
- Drickamer K** (1981) Complete amino acid sequence of a membrane receptor for glycoproteins. Sequence of the chicken hepatic lectin. *J Biol Chem*, 11:5827.
- Drickamer K** (1988) Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, 263:9557.
- Dugas B, Paul-Eugene N, Cairns J, Gordon J, Calenda A, Mencia-huerta JM and Braquet P** (1990) Leukotriene B<sub>4</sub> potentiates the expression and release of Fc $\epsilon$ RII/CD23, and proliferation and differentiation of human B lymphocytes induced by IL-4. *J Immunol*, 145:3406.
- Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ and Sturrock RF** (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol*, 22:1483.
- Dvorak AM, Furitsu T, Letourneau L, Ishizaka T and Ackerman SJ** (1991) Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human IL-5. Part I. Piecemeal degranulation of specific granules and distribution of Charcot-Leyden protein. *Am J Pathol*, 138:69.
- Dvorak AM, Weller RA, Monahan-Earley RA, Letourneau L and Ackerman SJ** (1990) Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) and peroxidase in macrophages, eosinophils, and extracellular matrix of the skin in the hypereosinophilic syndrome. *Lab Invest*, 62:590.
- Dynan WS and Tjian R** (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*, 316:774.

- 
- Ezekowitz RAB, Day L and Herman G** (1988) A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med*, 167:1034.
- Ezekowitz RAB, Kuhlman J, Groopman J and Byrn R** (1989) A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med*, 169:185.
- Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P and Warner A** (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med*, 172:1785.
- Ezekowitz RAB, Sim R, Hill M and Gordon S** (1983) Local opsonization by secreted macrophage components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med*, 159:244.
- Falk RJ and Jennette JC** (1988) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med*, 318:1651.
- Fischer E, Capron M, Prin L, Kusnierz JP and Kazatchkine M** (1986) Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell Immunol*, 97:297.
- Flores-Romo L, Cairns JA, Millsum MJ and Gordon J** (1989) Soluble fragments of the low-affinity IgE receptor (CD23) inhibit the spontaneous migration of U937 monocytic cells: neutralization of MIF-activity by a CD23 antibody. *Immunology*, 67:547.
- Flores-Romo L, Johnson GD, Ghaderi AA, Stanworth DR, Veronesi A and Gordon J** (1990) Functional implication for the topographical relationship between MHC class II and the low-affinity IgE-receptor: occupancy of CD23 prevents B lymphocytes from stimulating allogeneic mixed lymphocyte responses. *Eur J Immunol*, 20:2465.
- Flotte TJ, Springer TA and Thorbecke GJ** (1983) Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol*, 111:112.
- Foxall X, Watson SR, Dowbenko D et al** (1992) The three members of the selectins receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewix x oligosaccharide. *J Cell Biol*, 117:895.
- Fridman, WF, Bonnerot C, Daron M, Amigorena S, Teillaud JL, and Sautès C** (1992) Structural bases of Fcγ receptor functions. *Immunol Rev*; 125:49.
- Fukuda T and Gleich GJ** (1989) Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 83:369.
- Galli SJ, Dvorak AM, Ishizaka T, Nabel G, Der Simonian H, Cantor H and Dvorak HF** (1982) A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. *Nature (Lond)*, 298:288.

- 
- Gallizi JP, Cabrillat H, Rousset F, Menetrier C, De Vries J and Banchereau J** (1988) IFN- $\gamma$  and prostaglandin E2 inhibit IL-4 induced expression of Fc $\epsilon$ R2/CD23 on B lymphocytes through different mechanisms without altering binding of IL-4 to its receptor. *J Immunol*, 141:1982.
- Gaub M-P, Bellard M, Sceuer I, Chambon P and Sassone-Corsi P** (1990) Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. *Cell*, 63:1267.
- Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF and Gerard C** (1989) Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem*, 264:1760.
- Gitt MA and Barondes SH** (1986) Evidence that a human soluble  $\beta$ -galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:7603.
- Gleich GJ and Adolphson CR** (1986) The eosinophilic leukocyte. Structure and function. *Adv Immunol*, 36:177.
- Gleich GJ, Olson GM and Loegerin DA** (1979) The effect of ablation of eosinophil on immediate type hypersensitivity reactions. *Immunol*, 38:343.
- Goers JW, Glovsky MM, Hunkapiller MW, Farnsworth V and Richards JH** (1984) Studies on C3ahu binding to human eosinophils. Characterization of binding. *Int Arch Appl Immunol*, 74:147.
- Goldman DW and Goetzl EJ** (1982) Specific binding of leukotriene B4 to receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*, 129:1600.
- Goldman DW and Goetzl EJ** (1984) Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B4. *J Exp Med*, 159:1027.
- Goldschmeding R, Van der Schoot CE, Ten Boickel Huinink D et al.** (1989) Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel DFP-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest*, 84:1577.
- Gollnick SO, Trounstein ML, Yamashita LC, Kehry MR and Moore KW** (1990) Isolation, characterization, and expression of cDNA clones encoding the mouse Fc receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RII). *J Immunol*, 144:1974.
- Gordon J, Cairns JA, Liu YJ, Flores-Romo L, MacLennan ICM, Jansen KU and Bonnefoy JY** (1991) Role of membrane and soluble CD23 in lymphocyte physiology. In CD23. A novel multifunctional regulator of the immune system that binds IgE. *Monographs in Allergy*, 29:156.
- Gordon J, Flores-Romo L, Cairns JA, Millsum MJ, Lane PJ, Johnson GD and MacLennan ICM** (1989) CD23: a multi-functional receptor/lymphokine? *Immunol Today*, 10:153.

- 
- Gordon J, Rowe M, Walker L and Guy G** (1986) Ligation of the CD23, p45 (BLAST-2, EBVCS) antigen triggers the cell-cycle progression of activated B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 16:1075.
- Gordon S and Ezekowitz RAB** (1981) Macrophage neutral proteinases: nature, regulation, and role. *In* The Reticuloendothelial System, Vol. III. Plenum Press, New York., pp.95-115.
- Gould H, Sutton B, Beavil A et al.** (1991) Immunoglobulin E receptors. *Clin Exp Allergy*, 21:138.
- Graves BJ, Johnson PF and McKnight SL** (1986) Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. *Cell*, 44:565.
- Gritzmacher CA, Robertson MW and Liu FT** (1988) IgE-binding protein: subcellular location and gene expression in many murine tissues and cells. *J Immunol*, 141:2801.
- Grangette C, Gruart V, Ouaissi MA, Rivzi F, Delespesse G, Capron A and Capron M** (1989) IgE receptor on human eosinophils (FcεRII): comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *J Immunol*, 143:3580.
- Gruart V** (1990) Etude de l'activation cellulaire des éosinophiles en relation avec leur hétérogénéité: caractérisation moléculaire de marqueurs d'activation et de différenciation. *Thèse de Doctorat, Lille I*.
- Gruart V, Balloul JM, Prin L, Tomassini M, Loiseau S, Capron A and Capron M** (1989) Variations in protein expression related to human eosinophil heterogeneity. *J Immunol*, 142:4416.
- Guy GR and Gordon J** (1987) Coordinated action of IgE and a B cell stimulating factor on the CD23 receptor molecule up-regulate B-lymphocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6239.
- Hagan P, Blumanthal UJ, Dunn D, Simpson JG and Wilkins HA** (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 349:243.
- Hamid Q, Barkans J, Meng Q, Ying S, Abrams JS, Kay AB and Moqbel R** (1992) Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood*, 80:1496.
- Handman E and Goding JW** (1985) The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J*, 4:329.
- Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, Bradley B and Kay AB** (1990) Fc-gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology*, 69:264.
- Hauda K, Nudelman ED, Stroud MR et al** (1991) Selectins GMP-140 (CD62; PAD-GEM) binds to sialosyl-Le<sup>a</sup> and sialosyl-Le<sup>x</sup>, and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 181:1223.
- Helm B, Marsh P, Vercelli D, Padlan E, Gould H and Geha R** (1988) The mast cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature (Lond)*, 228:180.



- 
- Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP and Barondes SH** (1988) The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science*, 239:1539.
- Hirabayashi J, Ayaki J, Soma G and Kasai KI** (1989) Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kD  $\beta$ -galactoside-binding lectin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1008:85.
- Hirabayashi J and Kasai KI** (1988) Complete amino-acid sequence of a  $\beta$ -galactoside-binding lectin from human placenta. *J. Biochem (Tokyo)*, 104:1.
- Hirabayashi J, Kawasaki H, Suzuki K and Kasai KI** (1987) Complete amino-acid sequence of 14 kDa  $\beta$ -galactoside-binding lectin of chick embryo. *J Biochem*, 101:775.
- Hivroz C, Valle A, Brouet JC, Banchereau J and Grillo-Courvalin C** (1989) Regulation by interleukin 2 of CD23 expression of leukemic and normal B cells: comparison with interleukin 4. *Eur J Immunol*, 19:1025.
- Ho MK and Springer TA** (1982) Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, 128:1221.
- Hosoda M, Makino S, Kawabe T, Maeda Y, Satoh S, Takami M, Mayumi M, Arai K-I, Saitoh H and Yodoi J** (1989) Differential regulation of the low affinity Fc receptor for IgE (Fc $\epsilon$ R2/CD23) and the IL-2 receptor (Tac-p55) on eosinophilic leukemia cell line (EoL-1 and EoL-3). *J Immunol*, 143:147.
- Hsu SYL, Lust GL and Hsu HF** (1971) The fate of challenge schistosome cercariae in a monkey immunized by cercariae exposed to high doses of X-irradiation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 136:727.
- Hubscher T** (1975) Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI on eosinophil derived inhibitor of histamine release. *J Immunol*, 114:1379.
- Hudak SA, Gollnick SO, Conrad DH and Kehry MR** (1987) Murine B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:4606.
- Hudgin RL, Pricer WE, Ashwell G, Stockert RJ and Morell AG** (1974) The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem*, 249:5536.
- Huizinga TW, Van Kemenade F, Koenderman L, Dolman KM, Von Dem Borne A, Tetteroo P, and Roos D** (1989) The 40 kDa Fc $\gamma$  receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J Immunol*, 142:2365.
- Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T and Yamashina I** (1987) Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem*, 262:7451.

- 
- Ikuta K, Takami M, Kim CW, Honjo T, Miyoshi T, Tagaya Y, Kawabe T and Yodoi J (1987)** Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:819.
- Ishikawa T, Wischer K and Arbesman CE (1974)** In vitro and in vivo studies on uptake of antigen-antibody complexes by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 72:336.
- Jennette JC and Falk RJ (1990)** Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis*, 15:517.
- Jia S and Wang JL (1988)** Carbohydrate binding protein 35. Complementary DNA sequence reveals homology with proteins of the heterogeneous nuclear RNP. *J Biol Chem*, 263:6009.
- Johnson GD, Hardie DL, Ling NR and MacLennan IC (1986)** Human follicular dendritic cells (FDC): a study with monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol*, 64:205.
- Johnston GI, Cook RG and McEver RP (1989)** Cloning of GMP-140 a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell*, 56:1033.
- Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H and Viens P (1986a)** A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature (Lond)*, 303:810.
- Joseph M, Capron A, Ameisen JC, Capron M, Vorng H, Pancre V, Kusnierz JP and Viens P (1986b)** The receptor for IgE on blood platelets. *Eur J Immunol*, 16:306.
- Joseph M, Capron M, Thorel T and Tonnel AB (1986c)** Nedocromil sodium inhibits IgE-dependent activation of rat macrophages and platelets as measured by schistosome killing, chemiluminescence and enzyme release. *Eur J Respir Dis, Suppl.* 147:220.
- Joseph M, Tonnel AB, Torpier G, Capron A, Arnoux B and Benveniste J (1983)** Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Clin Invest*, 71:221.
- Jouault T, Capron M, Balloul JM, Ameisen JC and Capron A (1988)** Quantitative and qualitative analysis of the Fc receptor for IgE (FcεRII) on human eosinophils. *Eur J Immunol*, 18:237.
- Kawabe T, Takami M, Hosoda M, Maeda Y, Sato S, Mayumi H, Arai K-I and Yodoi J (1988)** Regulation of FcεR2/CD23 gene expression by cytokines and specific ligands (IgE and anti-FcεR2 monoclonal antibody). *J Immunol*, 141:1376.
- Keegan AD and Conrad DH (1987)** The murine lymphocyte receptor for IgE. V. Biosynthesis, transport and maturation of the B cell Fcε receptor. *J Immunol*, 139:1199.

- 
- Kehry MR and Hudak SA** (1989a) Characterization of B-cell populations bearing Fc epsilon receptor II. *Cell Immunol*, 118:504.
- Kehry MR and Yamishita LC** (1989b) Fce receptor II (CD23) function on mouse B cells: role in IgE dependent antigen focusing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7566.
- Kelly A and Trowsdale J** (1985) Complete nucleotide sequence of a functional HLA-DP $\beta$  gene and the region between the DP $\beta$ 1 and DP $\alpha$ 1 genes: comparison of the 5' ends of HLA class II genes. *Nucleic Acids Res*, 13:1607.
- Kernen P, Wymann MP, Vontscharner V, Deranleau DA, Tai PC, Spry CJ, Dahinden CA and Baggiolini M** (1991) Shape Changes, Exocytosis, and Cytosolic Free Calcium Changes in Stimulated Human Eosinophils. *J Clin Invest*, 87:2012.
- Khalife J, Capron M, Cesbron JY, Tai PC, Taelman H, Prin L and Capron A** (1986) Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J Immunol*, 137:1659.
- Khalife J, Capron M, Grzych JM, Bazin H and Capron A** (1985) Extracellular release of rat eosinophil peroxidase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J Immunol*, 134:1968.
- Khalife J, Dunne DW, Richardson BA, Mazza G, Thorne KJI, Capron A and Butterworth AE** (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, 142:4422.
- Kikutani H, Inui S, Sato R, Barsumain EL, Owaki H, Yamasaki K, Kaisho T, Uchibayashi N, Hardy RR, Hirano T and Kishimoto T** (1986a) Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell*, 47:657.
- Kikutani H and Kishimoto T** (1990) Molecular genetics and biology of two different species of Fc $\epsilon$ RII. *Res Immunol*, 141:249.
- Kikutani H, Suemura MO H., Nakamura HS R., Yamasaki K, Barsumian EL, Hardy RR and Kishimoto T** (1986b) Fce receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J Exp Med*, 164:1455.
- Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS and Gleich GJ** (1991) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med*, 174:745.
- Koichi I, Takama M, Won Kim C, Honjo J, Miyoshi T, Tagaya U, Kawabe T and Yodoi J** (1987) Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:819.

- 
- Kolb JP, Renard D, Dugas B, Genot E, Petitkoskas E, Sarfati M, Delespesse G and Poggioli J** (1990) Monoclonal anti-CD23 antibodies induce a rise in intracellular calcium and polyphosphoinositide hydrolysis in human activated B-cells. Involvement of a GP protein. *J Immunol*, 145:429.
- Koller BH, Geraghty DE, DeMars R and Orr HT** (1988) HLA-E: a novel HLA class I gene expressed in resting T-lymphocytes. *J Immunol*, 141:897.
- Koo C, Lefkowitz RJ and Snyderman R** (1982) The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *Biochem Biophys Res Commun*, 106:442.
- Kuhlman M, Joiner K and Ezekowitz RAB** (1989) The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*, 169:1733.
- Laing JG, Robertson MW, Grtzmacher CA, Wang JL and Liu FT** (1989) Biochemical and immunological comparisons of carbohydrate-binding protein 35 and an IgE-binding protein. *J Biol Chem*, 64:1907.
- Laing JG and Wang JL** (1988) Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*, 27:5329.
- Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC and Schaar RL** (1984) Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *J Biol Chem*, 259:1764.
- Lasky LA, Singer MS, Yednock TA et al.** (1989) Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell*, 56:1045.
- Lawrence DA, Weigle WO and Spiegelberg HL** (1975) Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *J Clin Invest*, 55:268.
- Lebrun P, Sidman CL and Spiegelberg HL** (1988) IgE formation and Fc receptor-positive lymphocytes in normal, immuno-deficient, and auto-immune mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol*, 141:249.
- Lee WT, Rao M and Conrad DH** (1987) The murine lymphocyte receptor for IgE. IV. The mechanism of ligand-specific receptor upregulation on B cells. *J Immunol*, 139:1191.
- Leenen PJM, Jansen AMAC and Van Ewijk W** (1986) Murine macrophage cell lines can be ordered in a linear differentiation sequence. *Differentiation*, 32:157.
- Lennartz MR, Cole FS, Shepherd V, Wileman TE and Stahl PE** (1987) Isolation and characterization of a mannose specific endocytosis receptor from human placenta. *J Biol Chem*, 262:9942.

- 
- Lenzi HL, Mednis A and Dessein AJ** (1985) Activation of human eosinophils by monokines and lymphokines: source and biochemical characterization of eosinophil cytotoxicity-enhancing factor (ECEP). *Cell Immunol*, 94:333.
- Letellier M, Sarfati M and Delespesse G** (1989) Mechanisms of formation of IgE-binding factors (soluble CD23). I. FcεRII bearing B cells generate IgE-binding factors of different molecular weights. *Mol Immunol*, 26:1105.
- Levi G and Teichberg VI** (1983) Selective interaction of electrolectins from eel electric organ and mouse thymus with mouse immature thymocyte. *Immunol Lett*, 7:35.
- Lewinsohn DM, Bargatze RF and Butcher EC** (1987) Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol*, 138:4313.
- Liu FT, Albrandt K, Mendel E, Kulczycki A Jr. and Orida NK** (1985) Identification of an IgE-binding protein by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:4100.
- Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, MacGlashan DW Jr., Schleimer RP, Adkinson NF Jr., Kagey-Sobotka A, Schulman ES and Plaut M** (1986) Human lung macrophage-derived histamine-releasing activity is due to IgE-dependent factors. *J Immunol*, 136:2588.
- Liu YJ, Cairns JA, Jansen K, Bonnefoy JY, Gordon J and MacLennan ICM** (1991) Recombinant 25-kilodalton CD23 and interleukin 1 alpha promote survival and differentiation of germinal center B cells.
- Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J and MacLennan ICM** (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature*, 342:929.
- Lo SK, Lee S, Ramos RA et al** (1991) Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, αmβ2) on human neutrophils. *J Exp Med*, 173:1493.
- Lopez AF, Eglinton JM, Gillis D, Park LS and Vadas MA** (1989) Reciprocal inhibition of binding between interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7022.
- Lopez AF, Stath M and Sanderson CJ** (1983) Mouse immunoglobulin isotypes mediated cytotoxicity of targets cells by eosinophils and neutrophils. *Immunology*, 48:503.
- Lucey DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller A and Weller PF** (1989a) Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus I gp120. *J Exp Med*, 169:327.
- Lucey DR, Nicholson-Weller A and Weller PF** (1989b) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1348.

- 
- Ludin C, Hofstetter H, Sarfati ML C.A., Suter U, Alaimo D, Kilchherr E, Frost H and Delespesse G** (1987) Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. *EMBO J*, 6:109.
- MacDonald SM, Lichtenstein LM, Proud D, Plaut M, Naclerio RM, MacGlashan DW and Kagey-Sobotka A** (1987) Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: heterogeneity of IgE. *J Immunol*, 139:506.
- Mahmoud AAF, Warren KS and Peters PA** (1975) A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by anti-eosinophil serum. *J Exp Med*, 142:805.
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerratti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabsteins K, Conlon PJ, Hopp TP and Cosman D** (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, 315:641.
- Masuda A, Kasajima T, Mori N and Oka K** (1989) Immunohistochemical study of low affinity Fc receptor for IgE in reactive and neoplastic follicles. *Clin Immunol Immunopathol*, 53:309.
- McClelland A, Kuhn LC and Ruddle FH** (1984) The human transferrin receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 39:267.
- McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF and Handman E** (1987) Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkyl-glycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:8941.
- Meinke GC, Magro AM, Lawrence DA and Spiegelberg HL** (1978) Characterization of an IgE-receptor isolated from cultured B-type lymphoblastoid cells. *J Immunol*, 121:1321.
- Melewicz FM, Kline LE, Cohen AB and Spiegelberg HL** (1982a) Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin Exp Med*, 49:364.
- Melewicz FM, Plummer JM and Spiegelberg HL** (1982b) Comparison of the Fc receptors for IgE and human lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 129:563.
- Melewicz FM and Spiegelberg HL** (1980) Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J Immunol*, 125:1026.
- Melewicz FM, Zeiger RS, Mellon MH, O'Connor RD and Spiegelberg HL** (1981) Increased peripheral blood monocytes with Fc receptors for IgE in patients with severe allergic disorders. *J Immunol*, 126:1592.
- Meromsky L, Lotan R and Raz A** (1986) Implications of endogenous tumor cells surface lectins as mediators of cellular interactions and lung colonization. *Cancer Res*, 46:5270.

---

**Metzger H** (1992) The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Res*, 125:37.

**Miligan GN, Flaherty L, Braciale VL and Braciale TJ** (1991) Nonconventional (TL-encoded) major histocompatibility complex molecules present processed viral antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 174:133.

**Miller L, Blank U, Metzger H, and Kinet JP** (1989) Expression of high affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science*, 244:334.

**Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R and Baggiolini M** (1990) Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J Exp Med*, 171:1797.

**Moser B, Schumacher C, Von Tscherner V, Clark-Lewis I and Baggiolini M** (1991) Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J Biol Chem*, 266:10666.

**Mossalayi MD, Arock M, Bertho JM, Blanc CD A.H., Hofstetter H, Sarfati M, Delespesse G and Debre P** (1990b) Proliferation of early human myeloid precursors induced by interleukin-1 and recombinant soluble CD23. *Blood*, 75:1924.

**Mossalayi MD, Lecron JC, Dalloul AH, Sarfati M, Bertho JM, Hofstetter H, Delespesse G and Debre P** (1990a) Soluble CD23 (FcεRII) and interleukin 1 synergistically induce early human thymocyte maturation. *J Exp Med*, 171:959.

**Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M and Wang JL** (1987) Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6452.

**Moy JN, Gleich G and Thomas LL** (1990) Non cytotoxic activation of neutrophils by eosinophil granule major basic protein. Effect on superoxide anion generation and lysosomal enzyme release. *J Immunol*, 145:2626.

**Mudde GC, Van Reijssen FC, Boland GJ, De Gast GC, Bruynzeel PLB and Bruynzeel-Koomen CAFM** (1990) Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology*, 69:335.

**Naccache PH, Molski MM, Volpi M, Shefcyk J, Molski TFP, Loew L, Becker EL and Sha'arfi RI** (1986) Biochemical events associated with the stimulation of rabbit neutrophils by platelet-activating factor. *J Leukocyte Biol*, 40:533.

**Nagai T, Adachi M, Noro N, Yodoi J and Uchino H** (1985) T- and B-lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors (FcεR) in patients with nonallergic hyperimmunoglobulinemia E: demonstration using a monoclonal antibody against Fc epsilon R-associated antigen. *Clin Immunol Immunopathol*, 35:261.

- 
- Nakajima T and Delespesse G** (1986) IgE receptors on human lymphocytes. I. Identification of the molecules binding to monoclonal anti-Fcε receptor antibodies. *Eur J Immunol*, 16:809.
- Nakajima T, Sarfati M and Delespesse G** (1987) Relationship between human IgE-binding factors (IgE-BF) and lymphocyte receptors for IgE. *J Immunol*, 139:848.
- Nakayama E, Hoegen IV and Parnes JR** (1989) Sequence of the Lyb-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1352.
- Naray-Fejes-Toth A and Guyre PM** (1984) Recombinant human immune interferon induces increased IgE receptor expression on the human monocyte cell line U937. *J Immunol*, 133:1914.
- Nardelli JGTJ., Vesque C and Charnay P** (1991) Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains. *Nature*, 349:175.
- Nathan C** (1987) Macrophages secretion. *J Clin Invest*, 79:319.
- Nibbering PH, Leijh PCJ and Van Furth R** (1987) Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. I. Monoblasts, promonocytes, monocytes and peritoneal and alveolar macrophages. *Cell Immunol*, 105:374.
- Nishioka Y and Leder P** (1980) Organization and complete sequence of identical embryonic and plasmacytoma K V-region genes. *J Biol Chem*, 255:3691.
- Nissin A, Jouvin MH, and Eshhar Z** (1991) Mapping of the high affinity Fcε receptor binding site to the third constant region domain of IgE. *The EMBO J*, 10:101.
- Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW and Vitetta ES** (1984) Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6149.
- Nutman TB, Delespesse G, Sarfati M and Volkman DJ** (1987) T-cell-derived IgE-binding factors. I. Cloned and transformed T cells producing IgE-binding factors. *J Immunol*, 139:4049.
- Oda Y, Ohyama Y, Obinata A, Endo H and Kasai K** (1989) Endogenous galactoside-binding lectin expression is suppressed in retinoinduced mucous metaplasia of chick embryonic epidermis. *Exp Cell Res*, 182:33.
- Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaika N and Matsushima K** (1991) Properties of the novel proinflammatory-supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*, 9:617.
- Owen WF, Rothenberg ME, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF and Soberman RJ** (1987) Regulation of human eosinophil viability, density and function by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med*, 166:129.



- 
- Paroutaud P, Levi G, Teichberg VI and Strosberg AD** (1987) Extensive amino acid sequence homologies between animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6354.
- Pecoud AR, Ruddy S and Conrad DH** (1981) Functional and partial chemical characterization of the carbohydrate moieties of the IgE receptor on rat basophilic leukemia cells and rat mast cells. *J Immunol*, 126:1624.
- Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Wideman J, Bonnefoy J-Y and De Vries JE** (1988) Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur J Immunol*, 18:929.
- Pereira A, Spitznagel J, Winton EF et al.** (1990) The ontogeny of a 57-kD cationic anti-microbind protein of human polymorphonuclear leucocytes: localization to a novel granule population. *Blood*, 76:825.
- Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, and Trinchieri** (1983) Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med*, 158:1092.
- Peterson AP, Altman LC, Hill JS, Gosney K and Kadin ME** (1981) Glucocorticoid receptors in normal human eosinophils: comparison with neutrophils. *Clin Immunol*, 68:212.
- Pevery P, Waltz A, Dewald B and Baggiolini M** (1988) A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 167:1547.
- Pforte A, Breyer G, Prinz JC, Gais P, Burger G, Häussinger K, P. RE, Held E and Ziegler-Heitbrock HWL** (1990) Expression of the Fc-receptor for IgE (FcεRII, CD23) on alveolar macrophages in extrinsic allergic alveolitis. *J Exp Med*, 171:1163.
- Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA et al.** (1990) ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand sialyl-Le<sup>x</sup>. *Science*, 250:1130.
- Pincus SH** (1983) Hydrogen peroxide release from eosinophils: quantitative, comparative studies of human and guinea pig eosinophils. *J Invest Dermatol*, 80:278.
- Pincus SH, Whitcomb EA and Dinarello CA** (1986) Interaction of IL-1 and TPA in modulation of eosinophil function. *J Immunol*, 137:3509.
- Pirron U, Schlunch T, Prinz JC and Rieber EP** (1990) IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE. *Eur J Immunol*, 20:1547-1551.
- Plumas J, Gruart V, Aldebert D, Truong MJ, Capron M, Capron A and Prin L** (1991) Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 IL-2 receptor subunit. *Eur J Immunol*, 21:1265.

- 
- Pochon S, Graber P, Yeager M, Jansen K, Bernard AR, Aubry JP and Bonnefoy J-Y (1992) Demonstration of a second ligand for the low affinity receptor for immunoglobulin E (CD23) using recombinant CD23 reconstituted into fluorescent liposomes. *J Exp Med*, 176:389.
- Polley MJ, Phillips ML, Wayner E et al (1991) CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis<sup>x</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:6224.
- Prin L, Capron M, Gosset P, Walleart B, Kusnierz JP, Bletry O, Tonnel AB and Capron A (1986) Eosinophilic lung disease: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin Exp Immunol*, 63:249.
- Prin L, Capron M, Tonnel AB, Bletry O and Capron A (1983) Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: Variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 72:336.
- Prin L, Charon J, Capron M, Gosset P, Taelman H, Tonnel AB and Capron A (1984) Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin Exp Immunol*, 57:735.
- Prin L, Lefebvre P, Gruart V, Capron M, Storme L, Formstecher P, Loiseau S and Capron A (1989) Heterogeneity of human eosinophil glucocorticoid receptor expression in hypereosinophilic patients: absence of receptor correlates with resistance to corticotherapy. *Clin Exp Immunol*, 63:728.
- Rademacher TW, Parekh RB and Dwek RA (1988) Glycobiology. *Annu Rev Biochem*, 57:785.
- Rand TH, Cruikshank WW, Center DM and Weller PF (1991b) CD4-mediated stimulation of human eosinophils - Lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med*, 173:1521.
- Rand TH, Silberstein DS, Kornfeld H and Weller PF (1991a) Human eosinophils express functional interleukin-2 receptors. *J Clin Invest*, 88:825.
- Rauscher FJ, Morris JF, Tournay OE, Cook DM and Curran T (1990) Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, 250:1259.
- Ravetch JV and Kinet J-P (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 9:457.
- Raz A, Carmi P and Pazerini G (1988) Expression of two different endogenous galactoside-binding lectins sharing sequence homology. *Cancer Res*, 48:645.
- Raz A, Meromsky L and Lotan R (1986) Differential expression of endogenous lectins on the surface of nontumorigenic, tumorigenic, and metastasis cells. *Cancer Res*, 46:3667.

- 
- Raz A, Meromsky L, Zvibel I and Lotan R (1987) Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer*, 39:353.
- Raz A, Pazenini G and Carmi P (1989) Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene products with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res*, 49:3489.
- Rector E, Nakajima T, Rocha C, Duncan D, Lasturgeon D, Mitchell RS, Fischer S, Sehon AH and Delespesse G (1985) Detection and characterization of monoclonal antibodies specific to IgE receptors on human lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*, 55:481.
- Rihet P, Demeure CE, Bourgeois A, Prata A and Dessein AJ (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol*, 21:2679.
- Richards ML, Marcelletti SF and Katz DH (1988) IgE-antigen complexes enhance FcεR and Ia expression by murine B lymphocytes. *J Exp Med*, 168:571.
- Richards ML, Katz DH and Liu FT (1991) Organization and complete sequence of the murine gene encoding the low affinity Fc receptor for IgE. *J Immunol*, 147:1067.
- Robertson MW, Albrandt K, Keller D and Liu FT (1990) Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochem*, 29:8093.
- Robertson MW, and Liu FT (1991) Heterogeneous IgE glycoforms characterized by differential recognition of an endogenous lectin (IgE-binding protein). *J Immunol*, 147:3024.
- Roehm NW, Leibson HJ, Zlotnik A, Kappler JW, Marrak P and Cambier JC (1984) Interleukin-induced increase in Ia expression by normal mouse B cells. *J Exp Med*, 160:679.
- Roesler WJ, Vandenbark GR and Hanson RW (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem*, 263:9063.
- Rosenthal KL, Ishizaka T, Befus AD, Dennert G, Hengartner H and Bienenstock J (1984) Expression of IgE receptors and histamine in cloned natural killer cell lines. *J Immunol*, 133:642.
- Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ and Dahinden CA (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein-1α induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med*, 176:1489.
- Rothenberg ME, Owen WFJ, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL (1987) Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science*, 237:645.

- 
- Rothenberg ME, Owen WFJ, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF and Stevens RL** (1988) Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin-3. *J Clin Invest*, 81:1986.
- Rousselet G, Billaud M, Busson P, Lenoir G and Tursz T** (1991) CD23 and epithelial cells. In CD23. A novel multifunctional regulator of the immune system that binds IgE. *Monographs in Allergy*, vol 29, pp 186.
- Rouzer CA, Scott WA, Hamill AL and Cohn ZA** (1982) Synthesis of leucotriene C and other arachidonic acid metabolites by mouse pulmonary macrophages. *J Exp Med*, 155:720.
- Saito H, Bourinbaiar A, Ginsburg M, Minato K, Caresi E, Yamada K, Machover D, Breard J and Mathé G** (1985) Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood*, 66:1233.
- Saito H, Hayakawa T, Yui Y and Shida T** (1987) Effect of human interferon on different functions of human neutrophils and eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 82:133.
- Samanta AK, Oppenheim JJ and Matsushima K** (1989) Identification and characterization of specific receptors for monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils. *J Exp Med*, 169:1185.
- Sarfati M and Delespesse G** (1988) Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol*, 141:2195.
- Sarfati M, Fournier S, Christoffersen M and Biron G** (1990) Expression of CD23 antigen and its regulation by IL-4 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 14:47.
- Sarfati M, Nutman TB, Suter U, Hofstetter H and Delespesse G** (1987) T-cell-derived IgE-binding factors. II. Purification and characterization of IgE-binding factors produced by human T cell leukemia/lymphoma virus-1 transformed T lymphocytes. *J Immunol*, 139:4055.
- Sarfati M, Rector E, Rubio-Trujillo M, Wong K, Sehon AH and Delespesse G** (1984b) In vitro synthesis of IgE by human lymphocytes. III. IgE-potentiating activity of culture supernatants from Epstein-Barr virus (EBV) transformed B cells. *Immunology*, 53:207.
- Sarfati M, Rector E, Wong K, Rubio-Trujillo M, Sehon AH and Delespesse G** (1984a) In vitro synthesis of IgE by human lymphocytes. II. Enhancement of the spontaneous IgE synthesis by IgE-binding factors secreted by RPMI 8866 lymphoblastoid B cells. *Immunology*, 53:197.
- Savage COS, Jones S, Winearls CG, Marshall PD and Lockwood CM** (1987) Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet*, 1:138.

- 
- Schneider C, Owen MJ, Banville D, Rask L and Peterson PA** (1984) Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature (Lond.)*, 311:675.
- Schröder J-M, Persoon NLM and Christophers E** (1990) Lipopolysaccharide-stimulated human monocytes secrete, a part from neutrophil-activating peptide 1/interleukine 8, a second neutrophil-activating protein. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence identity with melanoma growth stimulatory activity. *J Exp Med*, 171:1091.
- Schulman ES, McGettigan MC, Post TJ, Vigderman RJ and Shapiro SS** (1988) Human monocytes generate basophil histamine-releasing activities. *J Immunol*, 140:2369.
- Schüle R, Umesomo K, Mangelsdorf DJ, Bolado J, Pike JW and Evans RM** (1990) Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*, 61:497.
- Sharon N** (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv Immunol*, 34:213.
- Sharon N and Lis H** (1989a) Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227.
- Sharon N and Lis H** (1989b) Lectins. (Chapman and Hall, London)
- Sherry B and Cerami A** (1991) Small cytokine superfamily. *Curr Op Immunol*, 3:56.
- Shimizu Y, Geraghty DE, Koller BH, Orr HT and DeMars R** (1988) Transfer and expression of three cloned human non HLA-A, B, C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:227.
- Silberstein DS and David JR** (1986) Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:1055.
- Singer SJ, Maher PA and Yaffe MP** (1987) On the transfer of integral proteins into membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:1960.
- Slighton JL, Blechl AE and Smithies O** (1980) Human fetal G $\gamma$ - and A $\gamma$ -globulin genes: complete nucleotide sequences suggests that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 21:627.
- Sparrow CP, Leffler H and Barondes SH** (1987) Multiple soluble  $\beta$ -galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem*, 262:7383.
- Spiegelberg HL, Thompson LF, MacNeil D and Buckley RH** (1985) Murine lymphocytes expressing Fc receptor positive T, B and NK cells in patients with the hyper-IgE syndrome. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 77:277.

- 
- Spies T, Cerundolo V, Colonna M, Cresswell P, Townsned A and DeMars R** (1992) Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature (Lond)*, 355:644.
- Spieß M, Schwartz AL and Lodish HF** (1985) Sequence of human asialoglycoprotein receptor cDNA. An internal signal sequence for membrane insertion. *J Biol Chem*, 260:1979.
- Springer TA** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346:425.
- Srivastava R, Chorney MJ, Lawrence SK, Pan J, Smith Z, Smith CL and Weismann SM** (1987) Structure, expression, and molecular mapping of a divergent member of the class I HLA gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:4224.
- Stewart WW and Kerr MA** (1990) The specificity of the human neutrophil IgA receptor (FcαR) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2. *Immunology*, 71:328.
- Stoolman LM and Rosen SD** (1983) Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J Cell Biol*, 96:722.
- Stroynowski I** (1990) Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Annu Rev Immunol*, 8:501.
- Suemura M, Kikutani H, Barsumian EL, Hattori Y, Kishimoto S, Sato R, Maeda A, Nakamura H, Owaki H, Hardy RE and Kishimoto T** (1986) Monoclonal anti-Fcε receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fcε receptors on human B and T cells. *J Immunol*, 137:1214.
- Suemura M and Kishimoto T** (1987) IgE class-specific regulatory factors and Fcε receptors on lymphocytes. *Int Rev Immunol*, 2:27.
- Suter U, Bastos R and Hofstetter H** (1987) Molecular structure of the gene and the 5'-flanking region of the human lymphocyte immunoglobulin E receptor. *Nuc Acids Res*, 15:7295.
- Suter U, Texido G and Hofstetter H** (1989) Expression of human lymphocyte IgE receptor (FcεRII/CD23). Identification of the FcεRIIa promoter and its functional analysis in B lymphocytes. *J Immunol*, 143:3087.
- Swendeman S and Thorley-Lawson DA** (1987) The activation antigen BLAST-2, when shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells. *EMBO J*, 6:1637.
- Tanabe T, Pricer WE and Ashwell G** (1979) Subcellular membrane topology and turnover of a rat hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem*, 254:1038.
- Takenaka T, Okuda M, Kawabori S and Kubo K** (1977) Extracellular release of rat peroxidase from eosinophils by interaction with immune complexes. *Clin Exp Immunol*, 28:56.

- 
- Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD and Drickamer K** (1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate recognition domains. *J Biol Chem*, 265:12156.
- Tedder TF, Isaacs CM, Ernst TJ et al** (1989) Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. *J Exp Med*, 170:123.
- Thompson LF, Spiegelberg HL and Buckley RH** (1985) IgE Fc receptor positive T and B lymphocytes in patients with the hyper IgE syndrome. *Clin Exp Immunol*, 59:77.
- Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, Capron A and Capron M** (1991) Release of granule proteins by eosinophils from allergic and non-allergic patients with eosinophilia upon immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol*, 88:365.
- Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren H-G, Foster L and Kärre K** (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, 340:443.
- Uchibayashi N, Kikutani H, Barsumian EL, Hauptmann R, Schneider FJ, Schwendenwein R, Sommergruber W, Spevak W, Maurer-Fogy I, Suemura M and Kishimoto T** (1989) Recombinant soluble Fcε receptor II (FcεRII/CD23) has IgE binding activity but not B cell growth promoting activity. *J Immunol*, 142:3901.
- Ulbrecht M, Honka T, Person S, Johnson JP and Weiss EH** (1992a) The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol*, 149:2945.
- Ulbrecht M, Kellermann J, Johnson JP and Weiss EH** (1992b) Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HL-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med*, 176:1083.
- Valerius T, Repp R, Kalden JR and Platzer E** (1990) Effects of IFN on Human Eosinophils in Comparison with Other Cytokines - A Novel Class of Eosinophil Activators with Delayed Onset of Action. *J Immunol*, 145:2950.
- Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Permin H, Van der Giessen M, Rasmussen M, Wiik A et al** (1985) Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*, 1:425.
- Veith MC and Butterworth AE** (1983) Enhancement of human eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae by mononuclear cell products in vitro. *J Exp Med*, 157:1828.
- Vercelli D, Helm B, Marsh P, Padlan E, Geha RS and Gould H** (1989) The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature*, 338:649.
- Vidovic D, Roglic M, K. M, Guerder S, Mackay C and Demic Z** (1989) Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a gd T-cell hybridoma. *Nature (Lond)*, 340:646.

- 
- Von Lichtenberg F, Sher A, Gibbons N and Doughty BL (1976) Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *S. mansoni*. *Am J Pathol*, 84:479.
- Walker L, Guy G, Brown G, Rowe M, Milner AE and Gordon J (1986) Control of human B lymphocyte replication. I. Characterization of novel activation states that precede the entry of Go B cells into cycle. *Immunology*, 58:583.
- Wallen N, Kita H, Weiller D and Gleich GJ (1991) Glucocorticoids inhibit eosinophil responses to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, 147:3490.
- Walsh GM and Kay AB (1984) Binding of IgG(Fc) (but not IgE) to human neutrophils and eosinophils and enhancement by chemotactic factors. *J Allergy Clin Immunol*, 73:Abstr.250, p.171
- Walsh GM and Kay AB (1986) Binding of immunoglobulin classes and subclasses to human neutrophils and eosinophils. *Clin Exp Immunol*, 63:466.
- Walsh GM, Mermod JJ, Hartnell A, Kay AB and Wardlaw AJ (1991) Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1 stimulated human umbilical vascular endothelial cells is  $\alpha 4 \beta 1$  (very late antigen-4) dependent. *J Immunol*, 146:3419.
- Walsh GM, Moqbel R, Nagakura T, Iikura Y and Kay AB (1990) Enhancement of the expression of eosinophil IgE receptor (FceRII) and its function by PAF. *J Lip Mediators*, 2:177.
- Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL and Strieter RM (1991) Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *J Exp Med*, 174:1355.
- Walz G, Aruffo A, Kolanus W et al (1990) Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le<sup>x</sup> determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, 250:1132-1145.
- Wang F, Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB, Wang D, Birkenback M, Kikutani H, Kishimoto T and Kieff E (1987) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:3452.
- Warner JA, Pienkowski MM, Plaut M, Norman PS and Lichtenstein LM (1986) Identification of histamine releasing factor(s) in the late phase of cutaneous IgE-mediated reactions. *J Immunol*, 136:2583.
- Warr SA (1980) A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 93:737.
- Watkins DI, Chen ZW, Hughes AL, Evans MG, Tedder TF and Letvin NL (1990) Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes. *Nature (Lond)*, 346:60.



- 
- Weis WI, Kahn R, Fourme R, Drickamer K and Hendrickson WA (1991) Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science*, 254:1604.
- Weller PF, Bach DS and Austen KF (1984) Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). *J Biol Chem*, 259:15100.
- Weller PF and Goetz EJ (1979) The regulatory and effector roles of eosinophils. *Adv Immunol*, 27:339.
- Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF and Lewis RA (1983) Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:7626.
- Weller PF, Rand TH, Barret T, Elovic A, Wong DTW and Finberg RW (1993) Accessory cell function of human eosinophils: HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 $\alpha$  expression. *J Immunol*, 150:2554.
- White MV, Kaplan AP, Haak-Frendscho M and Kaliner M (1988) Neutrophils and mast cells: comparison of neutrophil-derived histamine-releasing activity with other histamine-releasing factors. *J Immunol*, 141:3575.
- Wileman T, Lennartz M and Stahl P (1986) Identification of the macrophage mannose receptor as a 175 kD membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:2501.
- Wilson TJG, Firth MN, Powell JT and Harrison FL (1989) The sequence of the mouse 14 kDa  $\beta$ -galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem J*, 261:847.
- Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B et al (1988) Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med*, 167:570.
- Wong DTW, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, Chiang T, Chou MY, Matossian K, McBride J and Todd R (1990) Human Eosinophils Express Transforming Growth Factor- $\alpha$ . *J Exp Med*, 172:673.
- Wong DTW, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, Gordon JR, Rand TH, Galli SJ and Weller PF (1991) Eosinophils from Patients with Blood Eosinophilia Express Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Blood*, 78:2702.
- Woo HJ, Lotz MM, Jung JU and Mercurio AM (1991) Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *J Biol Chem*, 266:18419.
- Woo HJ, Shaw LM, Messier JM and Mercurio AM (1990) The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem*, 265:7097.

- 
- Yodoi J and Ishizaka K** (1979a) Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. I. Presence of human and rat T lymphocytes with Fc epsilon receptors. *J Immunol*, 122:2577.
- Yodoi J, Ishizaka T and Ishirzaka K** (1979b) Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. II. Induction of Fc epsilon-receptor bearing rat lymphocytes by IgE. *J Immunol*, 123:455.
- Yodoi J, Kawabe T and Takami M** (1988) Regulation of IgE synthesis. Lymphocyte Fcε receptor, IgE-binding factor(s) and glycosylation-modulating factor. *Clin Rev Allergy*, 7:141.
- Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, Fukui K, Noma T, Honjo T, Takigawa M, Sasaki M, Minato N, Tsudo M, Uchiyama T and Maeda M** (1985) TCGF (IL2)-receptor inducing factor(s). I Regulation of IL2-receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J Immunol*, 134:1623.
- Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M and Kishimoto T** (1988) Two Species of Human Fcε Receptor II (FcεRII/CD23): Tissue-Specific and IL-4-Specific Regulation of Gene Expression. *Cell*, 55:611.
- Yokota A, Yukawa K, Yamamoto A, Sugiyama K, Suemura M, Tashiro Y, Kishimoto T and Kikutani H** (1992) Two Forms of the Low-Affinity Fc-Receptor for IgE Differentially Mediate Endocytosis and Phagocytosis - Identification of the Critical Cytoplasmic Domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5030.
- Young MC, Leung DY and Geha RS** (1984) Production of IgE-potentiating factor in man by T cell lines bearing Fc receptors for IgE. *Eur J Immunol*, 14:871.
- Yukawa K, Kikutani H, Owaki H, Yamasaki K, Yokota A, Nakamura H, Barsumian EL, Hardy RR, Suemura M and Kishimoto T** (1987) A B cell-specific differentiation antigen CD23, is a receptor for IgE (FcεR) on lymphocytes. *J Immunol*, 138:2576.
- Zweiman B, Kucich U, Shalit M et al** (1990) Release of lactoferrin and elastase in human allergic skin reactions. *J Immunol*, 144:3953.

---

**TABLE DES MATIERES**  
**ILLUSTRATIONS**

## TABLES DES MATIERES

<b>GENERALITES .....</b>	<b>p 8 à 73</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>8</b>
<b>LES POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES ET NEUTROPHILES.....</b>	<b>13</b>
<b>Les polynucléaires éosinophiles.....</b>	<b>14</b>
Hétérogénéité des éosinophiles.....	14
Cytokines et leurs récepteurs .....	16
Les récepteurs impliqués dans le chimiotactisme et l'adhésion.....	18
Les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène. ....	18
Les récepteurs impliqués dans la cytotoxicité.....	19
Cytotoxicité IgG-dépendante.....	21
Cytotoxicité IgE-dépendante. ....	21
Cytotoxicité IgA-dépendante.....	22
Facteurs régulateurs de la cytotoxicité. ....	22
Récepteurs pour l'IgE des éosinophiles.....	22
Phénomènes de dégranulation.....	24
<b>Les polynucléaires neutrophiles.....</b>	<b>28</b>
Les facteurs chimiotactiques et leurs récepteurs.....	28
Les molécules impliquées dans la migration et l'adhérence du neutrophile. ....	29
Fonctions des neutrophiles .....	31
Phénomène de dégranulation des neutrophiles.....	31
Les activités métaboliques.....	31
L'activité métabolique dépendante de l'oxygène .....	34
Le système de bactéricidie indépendant de l'oxygène.....	34
Rôle des neutrophiles dans les manifestations allergiques .....	36
<b>LES MOLECULES FIXANT L'IgE.....</b>	<b>37</b>
<b>Les récepteurs pour L'IgE.....</b>	<b>39</b>
Le récepteur de type I, FcεRI.....	39

Le récepteur de faible affinité, FcεRII/CD23.....	41
Structure biochimique.....	41
Structure nucléotidique et génomique.....	43
Régulation de l'expression du FcεRII/CD23.....	46
Distribution cellulaire.....	47
Les fonctions du FcεRII/CD23.....	49
Fonctions du FcεRII/CD23 membranaire.....	49
Fonctions des fragments solubles.....	50
<b>Les lectines.....</b>	<b>52</b>
Les C-lectines.....	58
MBP, mannose binding protein ou récepteur pour le mannose.....	58
Distribution cellulaire.....	58
Structure moléculaire.....	61
Rôles fonctionnels.....	61
ASGP-R, asialoglycoprotein receptor.....	62
FcεRII, le récepteur de faible affinité pour l'IgE.....	63
Les sélectines.....	63
Les S-lectines.....	65
Les lectines de 29 kDa.....	67
IgEBP ou εBP.....	67
Structure moléculaire.....	67
Homologies avec d'autres lectines.....	68
Distribution cellulaire.....	68
Fonctions.....	69
Mac-2.....	70
Distribution cellulaire.....	70
Structure moléculaire.....	70
Homologie.....	71
Fonctions.....	71
Les lectines 14-16 kDa.....	72
Structure moléculaire.....	72
Distribution cellulaire et régulation.....	73
<b>RESULTATS et DISCUSSION.....p 74 à 137</b>	
<u>Résultats I.</u> Hétérogénéité de l'expression des épitopes du CD23 par les éosinophiles de patients HE. Relation avec les fonctions IgE-dépendantes.....	75
Discussion.....	84
<u>Résultats II.</u> Criblage d'une banque d'éosinophiles de patients HE. Clonage et expression d'un ADNc codant pour un antigène du CMH de classe I (HLA-E).....	87
Résultats complémentaires.....	94

---

Discussion .....	95
<u>Résultats III.</u> Les éosinophiles de sujets HE expriment à leur surface des molécules appartenant à la famille des S-lectines (Mac-2/εBP).....	98
Résultats complémentaires.....	123
Discussion .....	125
<u>Résultats IV.</u> Les neutrophiles de patients HE ou de sujets sains expriment les molécules appartenant à la famille des S-lectines (Mac-2/εBP). Rôle dans l'activation IgE-dépendante .....	128
Discussion .....	135
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>p 138 à 142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>p 143 à 170</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>p 171 à 174</b>
<b>ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>p 175 à 178</b>

## ILLUSTRATIONS

<b>GENERALITES.....</b>	<b>.....</b>
<b><u>Figure 1.</u></b> Rôle putatif des médiateurs mastocytaires dans les réactions d'hypersensibilité immédiate et lors de la phase tardive. ....	9
<b><u>Figure 2.</u></b> Chimiotactisme et infiltration leucocytaire sous l'influence de facteurs attractants. ....	12
<b><u>Figure 3.</u></b> Isolement des sous-populations d'éosinophiles sur gradients discontinus de densité (métrizamide ou percoll). ....	15
<b><u>Figure 4.</u></b> Les récepteurs et les médiateurs impliqués dans les fonctions effectrices de l'éosinophile.....	17
<b><u>Figure 5.</u></b> L'attaque des polynucléaires éosinophiles contre les parasites. ....	20
<b><u>Tableaux I.</u></b> Principales caractéristiques des protéines cationiques de l'éosinophile. ....	26
<b><u>Figure 6.</u></b> Les récepteurs et les médiateurs impliqués dans les fonctions effectrices du neutrophile.....	30
<b><u>Tableaux II.</u></b> Les constituants des granulations des polynucléaires neutrophiles.....	32
<b><u>Tableaux III.</u></b> Les systèmes anti-microbiens du neutrophile. ....	33
<b><u>Figure 7.</u></b> Principales voies de synthèse et de désintoxication des métabolites de l'oxygène produits par les phagocytes. ....	35
<b><u>Figure 8.</u></b> Intéraction de l'IgE monomérique avec le récepteur de forte affinité pour l'IgE, FcεRI des basophiles et mastocytes.....	40
<b><u>Figure 9.</u></b> Représentation schématique des récepteurs de faible affinité FcεRII pour l'IgE chez l'homme et chez la souris. ....	42
<b><u>Figure 10.</u></b> Cartographie des promoteurs et des gènes des FcεRII humain et murin. ....	44
<b><u>Tableaux IV.</u></b> Différents modèles d'interactions cellules-cellules et cellules-molécules médiées par les lectines.....	53

<u>Tableaux V</u> , Spécificité des lectines impliquées dans la reconnaissance cellulaire.....	55
<u>Figure 11</u> , Représentation schématique de certaines familles de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire. ....	57
<u>Tableau VI</u> , Propriétés distinctes des lectines de type C et de type S.....	59
<u>Figure 12</u> , Résumé des caractéristiques des C-lectines.....	60
<u>Figure 13</u> , Résumé des caractéristiques des S-lectines. ....	66

## RESULTATS ET DISCUSSION.....

### Résultats I.

<u>Figure 1</u> , Comparative analysis by FCM of the binding of anti-CD23 mAb (135) and IgE to human eosinophils. ....	79
<u>Figure 2</u> , FCM analysis of the binding of three different anti-CD23 mAb and BB10. ....	79
<u>Table I</u> , Comparative binding of BB10 and anti-CD23 IgM (8-30) mAb to eosinophils. ....	80
<u>Figure 3</u> , Histograms of the binding of 8-30 or BB10 IgM mAb.....	80
<u>Figure 4</u> , Northern blot analysis of eosinophil RNA with the cDNA probe of CD23. ....	80
<u>Figure 5</u> , Inhibition of IgE-dependent eosinophil cytotoxicity by various anti-CD23 antibodies.....	81
<u>Figure 6</u> , Inhibition of radiolabeled IgE binding to eosinophils with cold IgE or the various anti-CD23 mAb. ....	81
<u>Table II</u> , Effect of anti-CD23 mAb on radiolabeled IgE binding to a B cell line (WIL-2wt). ....	81

### Résultats II.

<u>Figure 1</u> , A, organization of EO15 and EO9 cDNA clones. B, complete nucleotide sequence of EO15 cDNA and comparison with the nucleotide sequence of HLA-E and RS5. ....	90
---	----



<u>Figure 2.</u> Northern blot analysis of total RNA derived from blood purified cell populations with EO15-NS, EO15-S and $\beta$ -actin probes. ....	90
<u>Figure 3.</u> Northern blot analysis of total RNA derived from different cell lines with EO15-NS, EO15-S and $\beta$ -actin probes.....	91
<u>Figure 4.</u> Detection by in situ hybridization of EO15 mRNA expression on unseparated eosinophils from HE patients. ....	91
<u>Figure 5.</u> Northern blot analysis of RNA derived from EoL-3 cell line, unseparated eosinophils, and neutrophils from HE patients cultured for 24 h in the absence and presence of IFN- $\gamma$ with EO15-NS and $\beta$ -actin probes.....	92
<u>Figure 6.</u> Localisation des zones homologues au niveau de la séquence du clone EO15 (HLA-E) et de celle du CD23. ....	94

### **Résultats III.**

<u>Table I.</u> Flow cytometry of the expression of Mac-2 and IgE-binding molecules by human eosinophils. ....	116
<u>Figure 1.</u> Northern blot analysis of RNA prepared from eosinophils and various cell lines with hMac-2, h $\epsilon$ BP and $\beta$ -actin probes.....	117
<u>Figure 2.</u> Western blot analysis of Mac-2 molecules revealed by anti-Mac-2 hybridoma supernatant and visualized by a peroxidase labeled second antibody. ....	118
<u>Figure 3.</u> Western blot analysis of Mac-2 and $\epsilon$ BP molecules detected by anti-Mac-2 hybridoma supernatant and by anti- $\epsilon$ BP antisera. ....	119
<u>Figure 4.</u> Immunoprecipitation of $^{125}$ Iodine-labeled lysates of eosinophils from 3 patients and of alveolar macrophages with anti-Mac-2 hybridoma supernatant and with normal rat serum as control. ....	120
<u>Figure 5.</u> Inhibition of radiolabeled IgE-binding to eosinophils by unlabeled IgE or by various dilutions of anti-Mac-2 and control hybridoma supernatants. ....	121
<u>Figure 6.</u> Inhibitory effect of anti-Mac-2 mAb on eosinophil-dependent cytotoxicity. ....	122
<u>Figure 7.</u> Immunoprécipitations des lysats marqués à l'I $^{125}$ réalisées avec les anticorps anti- $\epsilon$ BP et le sérum de lapin sain. ....	123

---

<b>Tableau II.</b> Inhibition de la fixation de l'IgE sur les éosinophiles par les carbohydrates. .....	124
--	-----

#### **Résultats IV.**

<b>Figure 1.</b> Northern blot analysis of neutrophil RNA prepared from normal donors and from three patients with allergic diseases with CD23, hMac-2 and $\beta$ -actin probes.....	130
<b>Figure 2.</b> Immunoprecipitation of $^{125}\text{I}$ -labeled lysates of neutrophils from one patient with HE and of alveolar macrophages as control.....	131
<b>Table I.</b> Flow cytometry analysis of membrane expression of CD23, Mac-2, IgE- and IgA-binding molecules.....	131
<b>Table II.</b> Binding of neuraminidase-treated Ig to neutrophils. ....	132
<b>Figure 3.</b> IgE-dependent activation of neutrophils from individual donors measured by CL.....	132
<b>Figure 4.</b> Dose-effect of anti-Mac-2 supernatant on myeloma IgE-PS and IgA dependent CL, on pool P (polyclonal IgE)-dependent activation induced by Sm28GST or anti-IgE on normal donors' neutrophils. ....	133

